

厚生労働化学科学研究費補助金

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19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20(2008)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・・・・・・・・・・・・・・・・・・16

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・17

I. 総括研究報告

(H17-化学-008) 研究成果の概要
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)

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。

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。

倫理面への配慮

人の場合、防塵マスク、グローブを使用するため健康を害することは本研究ではないと考えられる。動物実験に関しては、法令及び国立循環器病センター動物実験指針に従い、「動物の愛護及び管理に関する法律」や「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」に則って行った。行う動物

実験等は通常の実験範囲のものであり、特段、倫理的に問題のあるものとは思われない。

C. 研究成果

1. 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、体内動態を検討した。

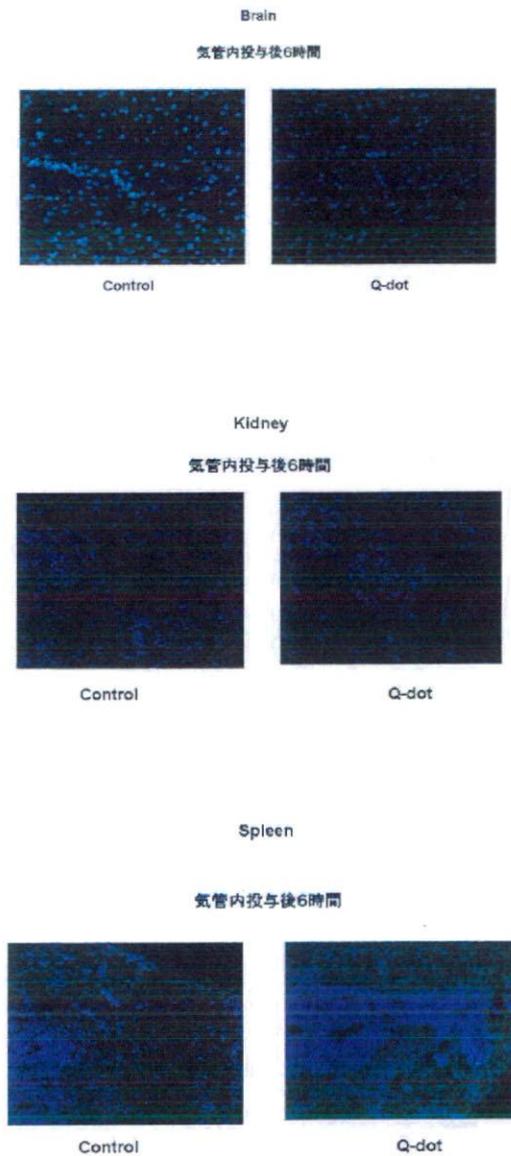
(試験方法)

蛍光ナノ粒子である,Quantum dot (Q-dot) (11.2 nmol/ml、粒子径: 20 nm)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、パラフィン切片を作製し、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。

ナノ粒子の体内動態



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。更に脾臓で Q-dot の蛍光シグナルが確認できたことよりナノ粒子が体内に侵入す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、ナノ粒子の物理化学的性状と、ナノ粒子を取り込む細胞の機能（エンドサイトーシス、ファゴサイトーシス、ピノサイトーシス）に依存することが推察できた。

2. 各臓器・組織障害を形態学的・生化学的・生理的に明らかにし、モデル動物でナノ粒子の経気道曝露が心血管系疾患を増悪させるメカニズムを解明する

1) カーボンブラック、水溶性フラーレン処置後血管内皮細胞の形態学的変化とカーボンブラック処置後培養マクロファージの形態学的変化

HUVEC に CB (100 $\mu\text{g/ml}$)、水溶性フラーレン(100 $\mu\text{g/ml}$)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、細胞密度の減少が観察された。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 1 and 2)。また、マウスマクロファージに 20 ng/ml の水溶性フラーレンを 10 日間処理するとファゴソームが多数確認できた (Figure 3)。以上、細胞レベルではナノ粒子の取り込みと、既に報告済みであるが細胞障害を引き起こすことが判っている。

Figure 1

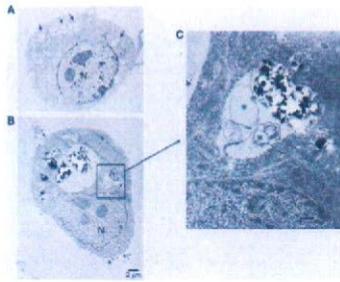


Fig. 1. Ultrastructural features of human endothelial vein endothelial cells (HEV/ECs) treated with carbon black (CB). HEV/ECs were treated without (A, control) or with 100 µg/ml CB (B, C) for 24h. Arrows, autophagic vacuoles; (*) lysosomes; white, N, nucleus; M, Mitochondria; V, vacuole. Scale Bar: 2 µm (A, B) and 500 nm (C).

Figure 2

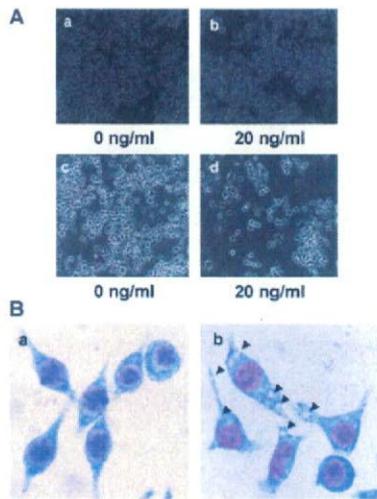


Fig. 3. Water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄) induced phagosome formation in RAW264.7 cells. (A) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄ (a, 0 ng/ml; b, 20 ng/ml) for 24 h or 10 days (c, 0 ng/ml; d, 20 ng/ml), and cell morphology was then visualized (×200 magnification). (B) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄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

Figure 3

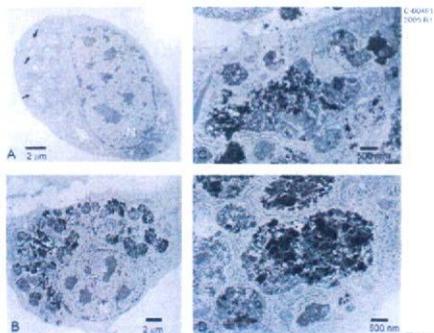


Fig. 6

6) 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 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, 2 and Figure 9) これらの結果を Gene set enrichment analysis (GSEA) により再解析し、gene set によるプロファイリングを行った。その結果、炎症性メディエーター遺伝子で NFκ-B により発現誘導した遺伝子は、*ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2*, *SELE*, *CXCL3*, *IL-8*, *BMP2* であり、また、細胞増殖を促進するマスター転写因子 *FOS*, *NFκ-B2*, *PPAR-alpha* の発現が上昇した。

Table 1

Gene sets							
NF κ B induced							
gene sets of high expression values	<i>ICAM-1</i>	<i>CXCL2</i>	<i>CCL2</i>	<i>SELE</i>	<i>CXCL3</i>	<i>IL8</i>	<i>BMP2</i>
gene sets of lowest expression values	<i>MMP9</i>	<i>CXCL10</i>	<i>WNT5A</i>	<i>CDH61</i>			
Cell adhesion							
gene sets of high expression values	<i>NLGN3</i>	<i>CD98</i>	<i>ITGB3</i>	<i>CXCL3</i>	<i>IL8</i>	<i>IL8</i>	<i>CCL3</i>
gene sets of lowest expression values	<i>VWF</i>	<i>ECOR1</i>	<i>DISCAM</i>	<i>CDH2</i>	<i>NECAM1</i>		
Matrix metalloprotease							
gene sets of high expression values	<i>MMP3</i>	<i>MMP9</i>					
gene sets of moderate expression values	<i>MMP10</i>						
gene sets of lowest expression values	<i>TFP</i>	<i>MMP11</i>	<i>TFP1</i>				
Cell proliferation							
gene sets of high expression values	<i>EPH1</i>	<i>LAMP3</i>	<i>CXCL1</i>	<i>CHP1</i>	<i>IL8</i>	<i>ISG20</i>	
gene sets of lowest expression values	<i>PCNA</i>	<i>CD275C</i>	<i>IL6</i>	<i>IL1H</i>	<i>FOXP1</i>		
Transcription factor							
gene sets of high expression values	<i>FOS</i>	<i>PPARA</i>	<i>NFKB2</i>	<i>FOSB</i>			
gene sets of lowest expression values	<i>MYC</i>	<i>WCL6</i>	<i>TFM</i>	<i>MYR</i>			

HEV/EC without CB vs. with CB

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 CB 処置後の HUVEC の遺伝子発現プロファイリングと比較検討し、動脈硬化症の発症メカニズムを解明する。

(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
- 6) 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 (CB 処置後の HUVEC の結果と比較する)

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

(g)	0% Chol	0% Chol + CB	0.51% Chol	0.51% Chol + CB
Baseline body weight	22.7 ± 1.0	21.8 ± 1.0	23.4 ± 1.0	25.0 ± 1.0
Body weight	36.2 ± 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	1.52 ± 0.225	2.69 ± 0.514	2.32 ± 0.333
Spleen	0.072 ± 0.008	0.066 ± 0.011	0.090 ± 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

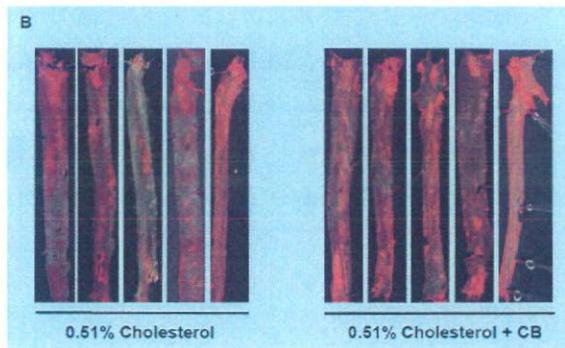
LDLR/KO マウスは高脂肪食を負荷すると大動脈に硬化巣を形成することが知られている。我々は昨年度の研究から動脈硬化初期病変を引き起こす脂肪濃度を確定した。その結果、0.51% コレステロール食の負荷が指摘な濃度であった。それに対して、全く硬化巣を形成しない 0% コレステロール食 (カロリーは単位グラム当り 0.51% コレステロール食と同じになるように調製済み) をコントロールとして使用した。10 週間の食事負荷と CB の気管内噴霧を行い、実験終了後に大動脈と血液を採取した。大動脈の外側の結合組織を除去後、血管を縦軸に開き、内皮側を上にしてオイルレッド O 染色を行った。その結果、0% 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 (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くなる事が判明した (Figure 1B)。

Figure 1A

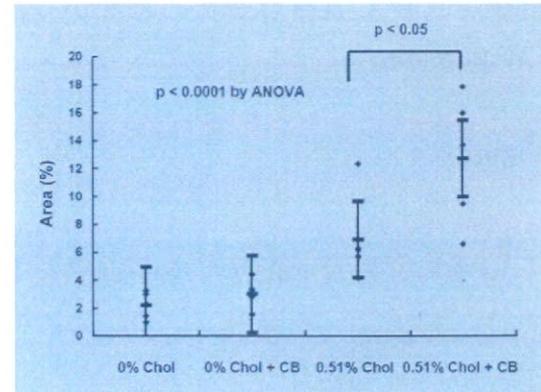


Figure 1B



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)。

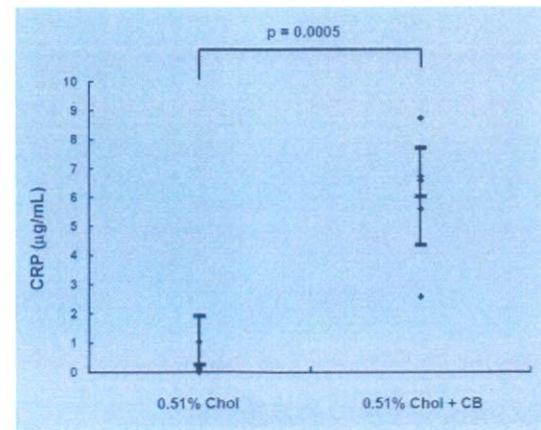
Figure 2



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

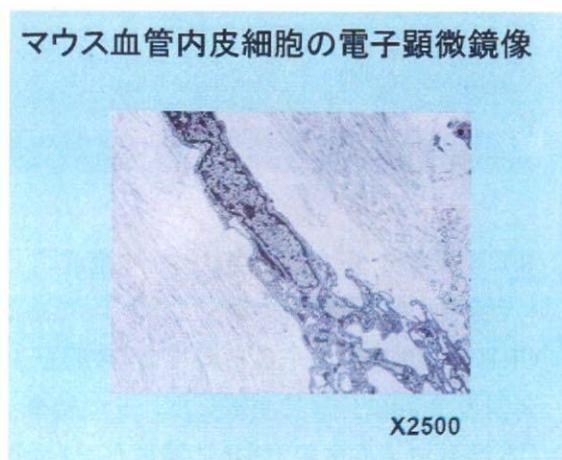
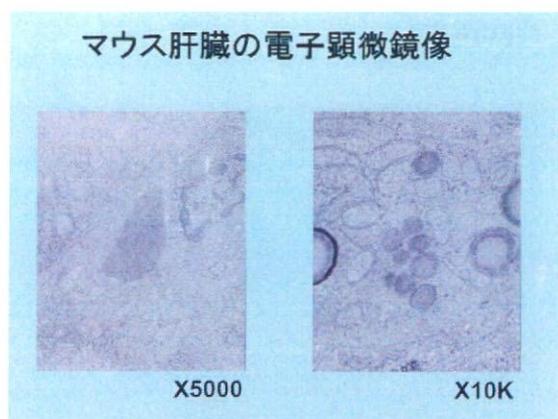


Figure 5



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 LDLR/KO マウスでは CB 曝露により、炎症性の転写因子、NF- κ B により発現が促進される *ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2*, 細胞接着因子として機能する *CCL2*, マスター転写因子である、*FOS*, *NF- κ B2*, *PPAR-A*, *Jun* などの遺伝子が個体レベルで上昇した。これとは対照的に、活性酸素種 (reactive oxygen species, ROS) を消去し、細胞障害を抑制する、*SOD1*, *2* の発現が有意に減少した。GSEA による gene set の解析から、動脈硬化発症に関わる遺伝子発現の増加と、減少が確認できた。この結果と HUVEC の CB 曝露後の遺伝子発現を GSEA により再解析した結果と比較したところ、HUVEC, LDLR/KO マウス間で *ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2*, *FOS*, *PPAR-A* and *NF- κ B2* 遺伝子の発現が共に上昇した。これらの結果から、CB 曝露によって *ICAM-1*, *CXCL2*, *CCL2*, *FOS* and *PPAR-A* の遺伝子群の発現が上昇し、内皮細胞障害から始まる動脈硬化発症に関与することが強く示唆された。

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

Table 2

Gene sets									
NF-κB induced									
Gene lists of high expression values	ICAM-1	CCL2	CCL2	IL-1A					
Gene lists of low expression values	SEI24C	IRAP-2		IL-1B	IL-10	IL-10			
Cell adhesion									
Gene lists of high expression values	ICAM-1	ICAM-2	ICAM-3	ICAM-4	ICAM-5	ICAM-6	ICAM-7	ICAM-8	ICAM-9
Gene lists of low expression values	VCAM-1	VCAM-2	VCAM-3	VCAM-4	VCAM-5	VCAM-6	VCAM-7	VCAM-8	VCAM-9
Matrix metalloproteinase									
Gene lists of high expression values	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-4	MMP-5	MMP-6	MMP-7	MMP-8	MMP-9
Gene lists of low expression values	MT1-MMP	MMP-10	MMP-11	MMP-12	MMP-13	MMP-14	MMP-15	MMP-16	MMP-17
Cell proliferation									
Gene lists of high expression values	PCNA	Myc	PCNA	CDC20	PTEN	IL-1A			
Gene lists of low expression values	ISG15								
Transcription factor									
Gene lists of high expression values	MYC	PCNA							
Gene lists of low expression values	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA

6.5% (indicated as 6.5%) (Cholesterol with CB)

Gene sets									
NF-κB induced									
Gene lists of high expression values	ICAM-1	CCL2	CCL2	IL-1A	CCL3	IL-1	MMP-2		
Gene lists of low expression values	MMP-9	ICAM-2	ICAM-3	ICAM-4	ICAM-5	ICAM-6	ICAM-7	ICAM-8	ICAM-9
Cell adhesion									
Gene lists of high expression values	ICAM-1	ICAM-2	ICAM-3	ICAM-4	ICAM-5	ICAM-6	ICAM-7	ICAM-8	ICAM-9
Gene lists of low expression values	VCAM-1	VCAM-2	VCAM-3	VCAM-4	VCAM-5	VCAM-6	VCAM-7	VCAM-8	VCAM-9
Matrix metalloproteinase									
Gene lists of high expression values	MMP-1	MMP-2	MMP-3	MMP-4	MMP-5	MMP-6	MMP-7	MMP-8	MMP-9
Gene lists of low expression values	MT1-MMP	MMP-10	MMP-11	MMP-12	MMP-13	MMP-14	MMP-15	MMP-16	MMP-17
Cell proliferation									
Gene lists of high expression values	PCNA	Myc	PCNA	CDC20	PTEN	IL-1A			
Gene lists of low expression values	ISG15								
Transcription factor									
Gene lists of high expression values	MYC	PCNA							
Gene lists of low expression values	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA	PCNA

6.5% (indicated as 6.5%) (Cholesterol with 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/m³ 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 の中に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。

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し、それに引き続く血管内皮細胞障害から動脈硬化へと進展すると思われる。

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
 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(Figure 2)。CBの平均粒径分布は約111.4 nmとなった(Figure 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。

Figure 1

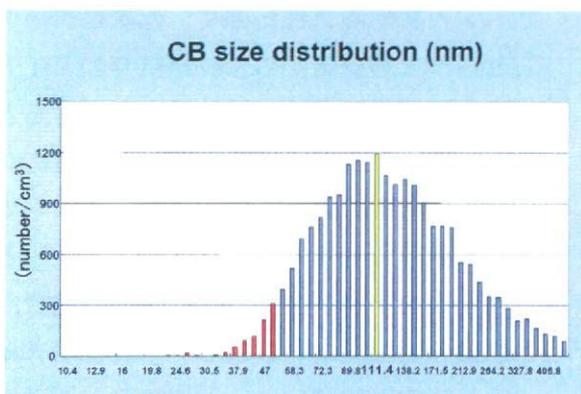
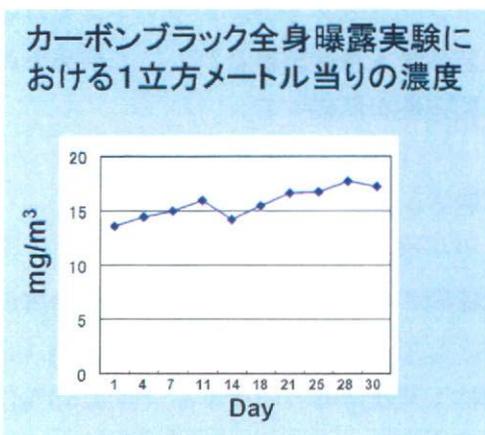


Figure 2



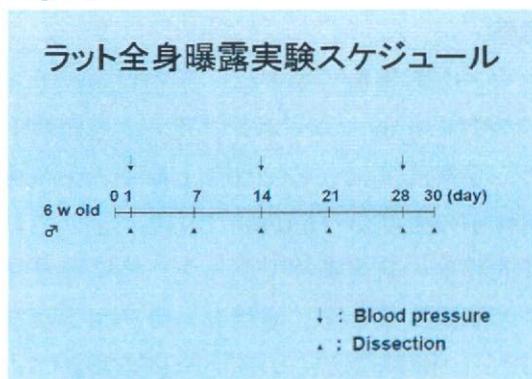
2. 群構成

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

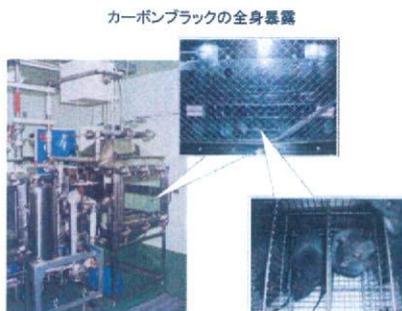
- 1) 体重測定、各臓器重量
- 2) 尾部での血圧測定 (tail cuff plethysmography system, model: BP-98A)
- 3) 血液成分の測定。
- 4) 組織学的検証：肺組織でのマクロファージ数を特異抗体による免疫組織学的方法で検討する。肺組織の繊維化をエラスチカ・ワーギン

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

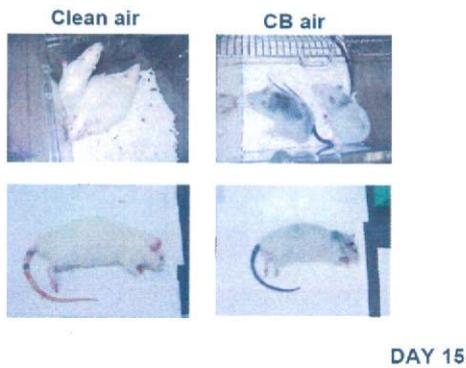
結果

Figure 4



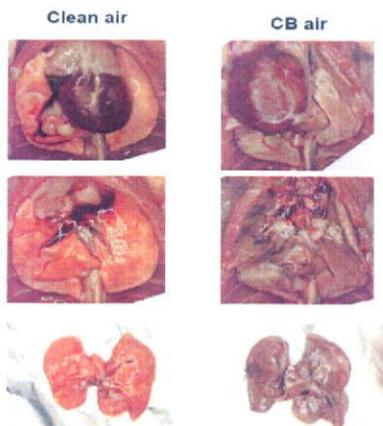
解剖前

Figure 5



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

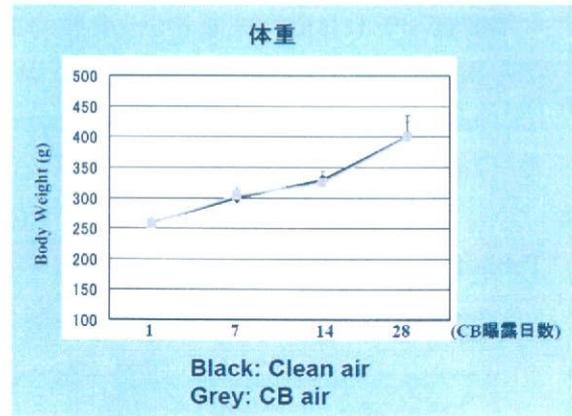
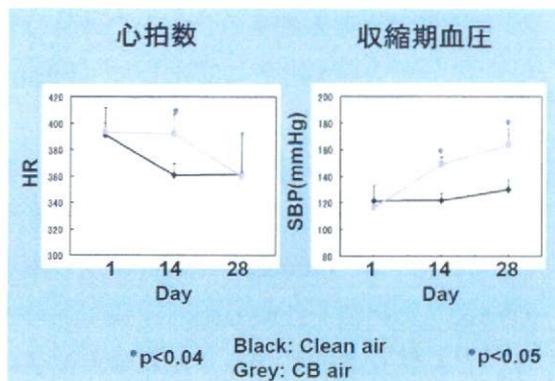


Figure 8



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)。

1) 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=10)	CB air (n=10)	p value
Red blood cell (x10 ¹² /μl)	727.6 (±117.0)	713.6 (±103.0)	ns
White blood cell (x10 ⁹ /μl)	55.9 (±10.0)	57.7 (±9.0)	ns
Platelet (x10 ⁹ /μl)	105.00 (CL 10.75)	99.75 (L 9.00)	ns
Aspartate aminotransferase (U/L)	871.6 (±412.0)	571.4 (±130.0)	ns
Alanine aminotransferase (U/L)	0.256 (L 0.020)	0.196 (L 0.020)	ns
AST [†] (U/L)	98.2 (L 20.00)	108.4 (L 22.00)	ns
ALT [‡] (U/L)	35.6 (±0.00)	30.4 (±2.00)	ns
Serum albumin (g/dL)	3.80 (L 0.020)	3.7 (L 0.47)	ns

[†] Aspartate aminotransferase
[‡] Alanine aminotransferase

Data are presented as mean ± SD

2) 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、肺気道の貪食細胞 (マクロファージ系細胞)、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

ラット肺気道

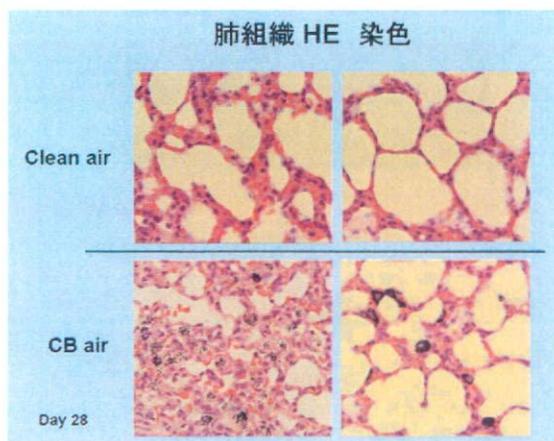
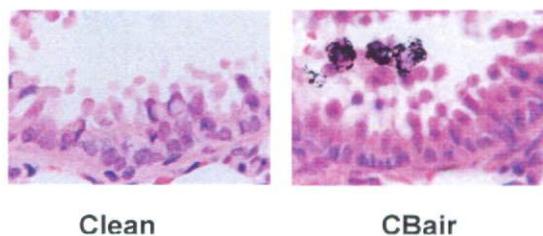


Figure 10

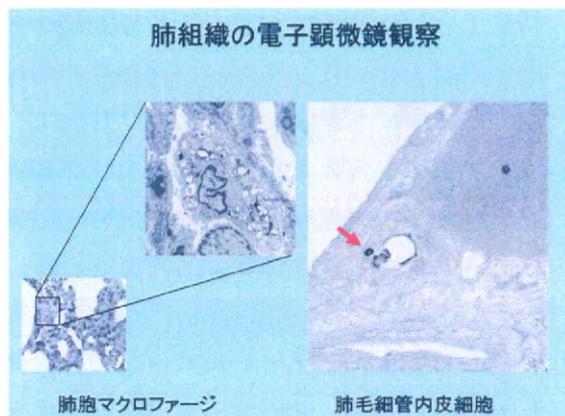


Figure 11

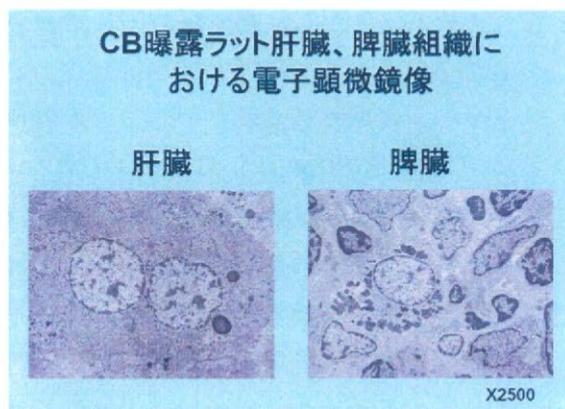
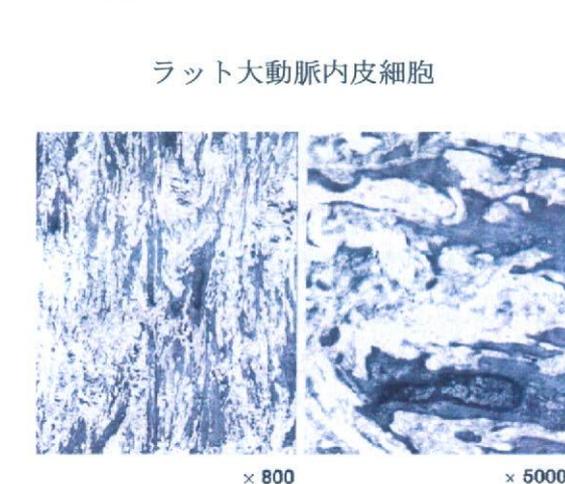


Figure 12



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

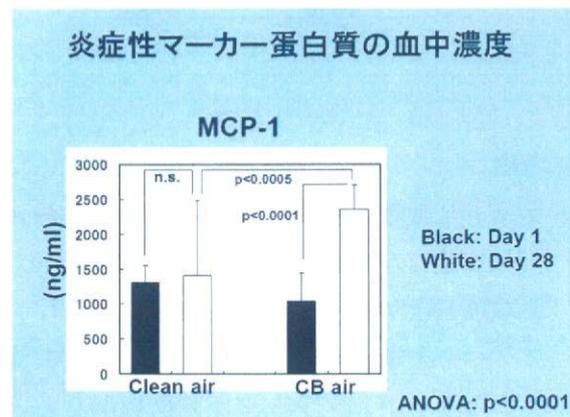


Figure 14

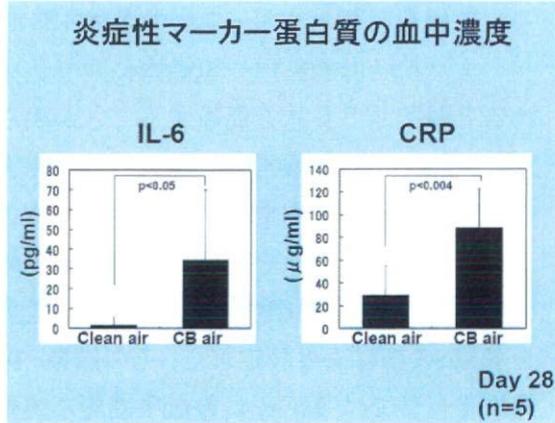
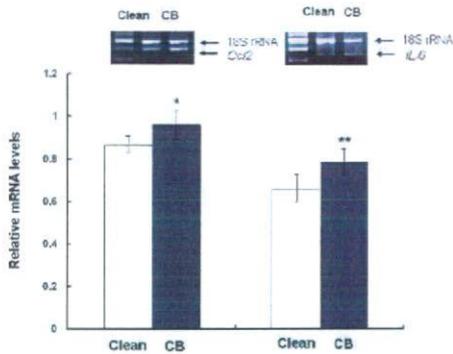


Figure 15



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 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、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 $146.8 \sim 666.2 \text{ μg/m}^3$ の大気中微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ギ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されるサイトカイン(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。

D. 結論

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可否を検証した結果、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が肺気道を通り、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比較的容易に体内へ侵入できると推察される。

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。

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し、それに引き続く血管内皮細胞障害から動脈硬化へと進展すると考えられる。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、炎症反応のマスター遺伝子、*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障害が個体レベルでの病態発症へと繋がると考察した。

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 6 5 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 7 1 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 7 7 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