

200736008B

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 17 年度～19 年度 総合研究報告書

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. 総合研究報告

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・・・・・・・・・・・・・・・・・・33

III. 研究成果の刊行物・別刷・・・・・・・・・・・・・・・・・・34

I. 総合研究報告

(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）

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：

丹羽 保晴（国立循環器病センター研究所疫学部 室長）、

体内で炎症や組織損傷を引き起こすと考えられている。

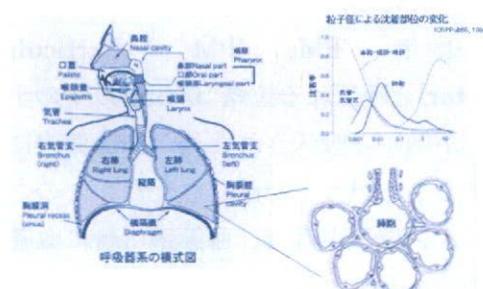
A. 研究目的

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。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、

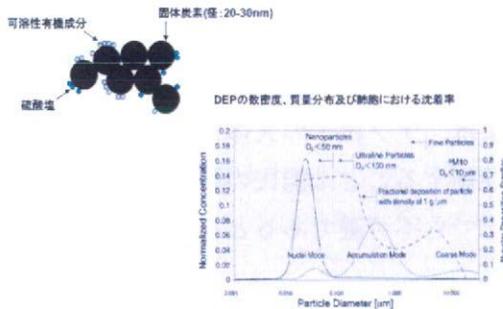
粒子状物質の呼吸器系への沈着



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（上図）。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

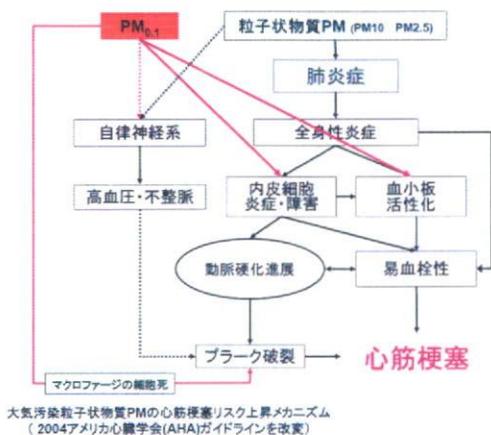
した。

ディーゼル微粒子の形態



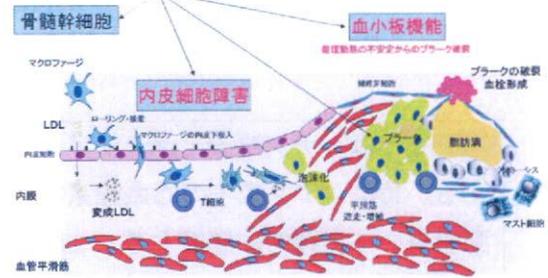
実際にアメリカ及びヨーロッパの大規模疫学調査により、大気中に排出された微小粒子状物質の人体への暴露が循環器系疾患の罹病率・致死率を有意に上昇させることが知られている。

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、



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、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。

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

H17-19 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)を24時間処置し、以下の項目を検討した。

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

- 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) ウェスタンブロット、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)。

Figure 1

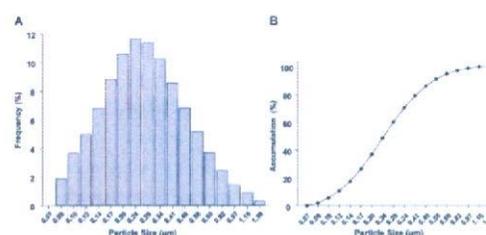


Fig 1 Particle size of carbon black responded in culture medium. (A) Frequency, (B) accumulation

- 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)。

Figure 2

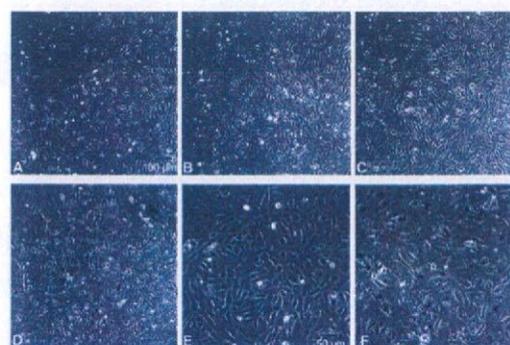
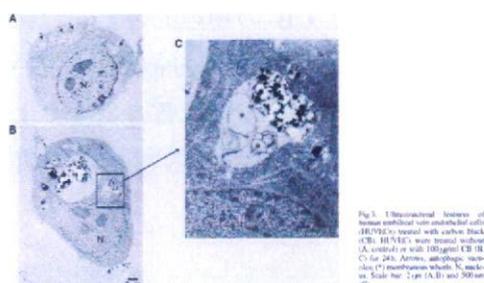


Fig 2. Representative photomicrographs of human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) treated with carbon black. (A, D) HUVECs at 90% confluence were treated with CB (A, E: 0 µg/ml; B, F: 1 µg/ml; C, F: 100 µg/ml) for 24 h. Scale bar: 100 µm (A-D) and 50 µm (E, F).

Figure 3



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)。

Figure 4

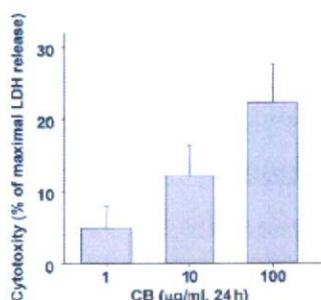


Fig4. Carbon black (CB) induced cytotoxic injury in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in a dose-dependent manner. HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1-100 µg/ml) for 24 h. Lactate dehydrogenase (LDH) released into supernatant was measured and maximal LDH release was assessed 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)。

た (Figure 5)。

Figure 5

Figure 6

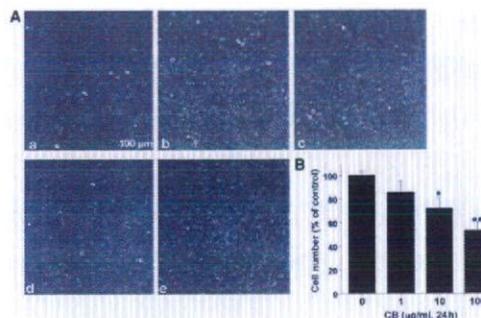


Fig5. Carbon black (CB) inhibited cell growth in a dose-dependent manner. Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) at ~30% confluence were treated with CB (1-100 µg/ml) for 24h. (A) Representative photomicrographs of CB for 24h (a: control; b: 0 µg/ml; c: 1 µg/ml; d: 10 µg/ml; e: 100 µg/ml). Scale bar: 100 µm. (B) Total number of living cells was counted using water-soluble tetrazolium salt (WST-8). Results are shown as percentage relative to control (n=4). *p<0.05 and **p<0.01 compared with control.

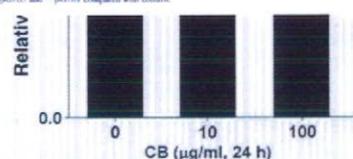


Fig6. Carbon black (CB) inhibited expression of proliferation marker in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~30% confluence were treated with CB (0, 10 or 100 µg/ml) for 24h, total cell lysates were harvested. (A) Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) expression determined 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)。

Figure 7

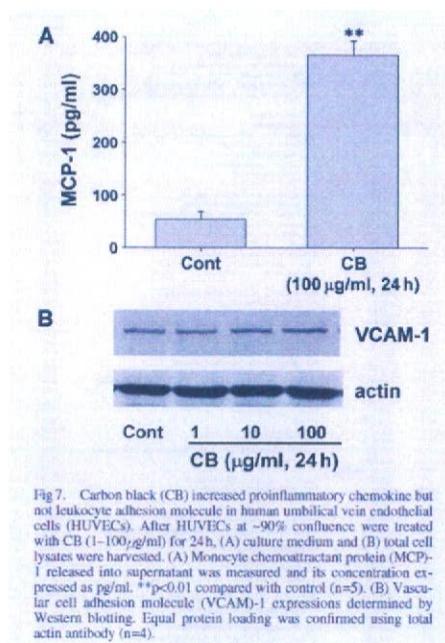


Fig 7. Carbon black (CB) increased proinflammatory chemokine but not leukocyte adhesion molecule in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h. (A) culture medium and (B) total cell lysates were harvested. (A) Monocyte 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)。

Figure 8

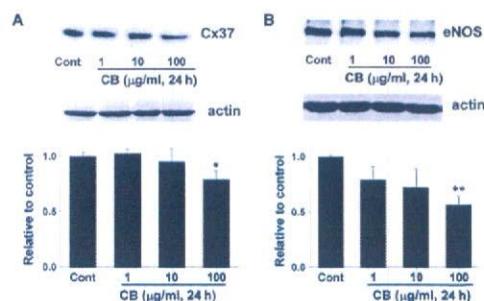
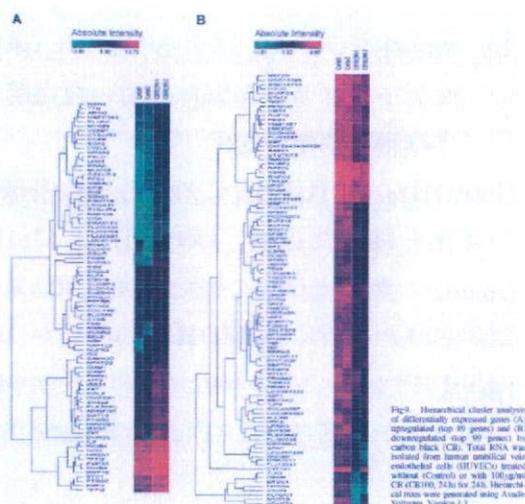


Fig 8. Carbon black (CB) inhibited expressions of connexin37 (Cx37) and endothelial nitric oxide synthase (eNOS) in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs). After HUVECs at ~90% confluence were treated with CB (1–100 µg/ml) for 24 h. Total cell lysates were harvested. (A) Cx37 and (B) eNOS expressions were determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total actin antibody. Expression is shown as the fold-change relative to control (n=4–6 (A) and n=3–5 (B)). * $p < 0.05$ 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

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 *ICAM1* (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)

Figure 9



考察

以上の結果から、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る。

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。しかし、実験で細胞に影響が現れた濃度は実生活の中で血中レベルがこの濃度に達することは無い。したがって、疫学調査から報告されている心疾患への関与はナノ粒子暴露による二次的な影響であると考えられる。

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。

本研究は Am J Physiol Cell Physiol 2006; 290: C1495-1502.に掲載済みである。

- 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泡形成、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(OH₂₄)も HUVEC に対して細胞障害を引き起こすことが示された。

Figure 1

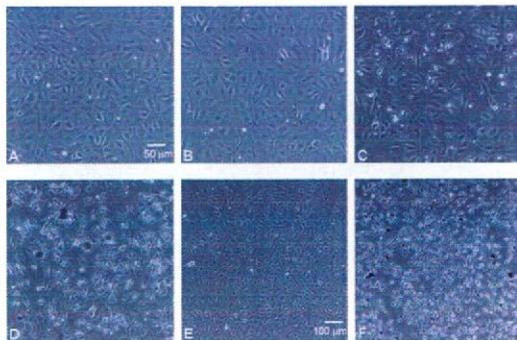


Fig.1

Figure 1. Representative photomicrographs of HUVECs treated with hydroxyl fullerene C60(OH₂₄). HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH₂₄) (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(OH₂₄)による細胞障害を培地中の LDH (乳酸脱水素酵素) 活性を測定することより定量した。その結果、C60(OH₂₄)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

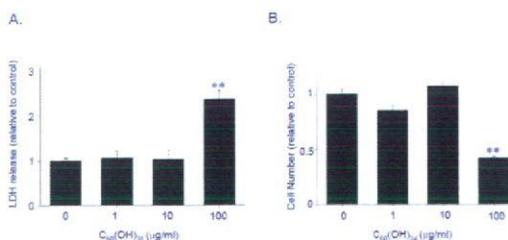


Figure 2. Fullerene induced cytotoxic injury in HUVEC. HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH₂₄)(1-100 µg/ml, 24 h). Culture medium was then collected. (A) Lactate dehydrogenase (LDH) released into supernatant was measured using a commercially available kit. Cytotoxicity was expressed relative 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 µg/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 µg/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

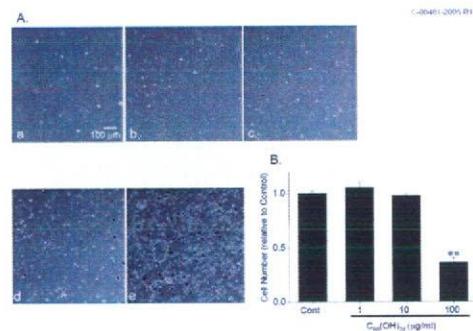


Figure 3. Fullerene inhibited cell growth in HUVECs. HUVECs at ~30% confluence were treated with C60(OH₂₄)(1-100µg/ml) for 24 h. (A) Representative photomicrographs are shown (a: at start; b: 0 µg/ml; c: 1 µg/ml; d: 10 µg/ml; e: 100 µg/ml for 24 h). Scale bar: 100 µm. (B) Total number of living cells 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 caspase 3 を介さない細胞死を誘導し、細胞内蛋白質のユ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明らかにするため、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 µg/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
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

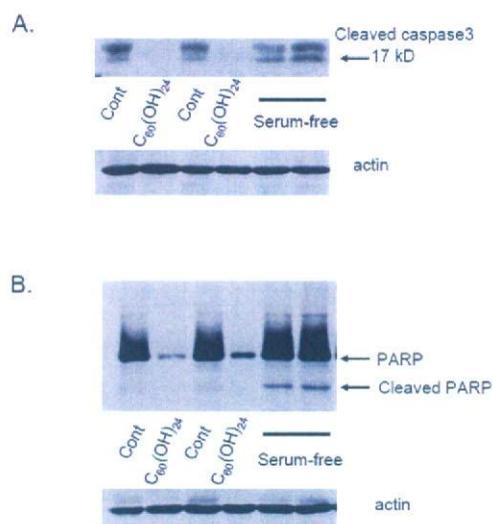


Figure 4. Fullerene does not induce apoptosis in HUVECs. After HUVECs~90% confluence were treated with C60(OH₂₄) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Cleaved caspase3 (17 KD) and Poly (ADP-ribose) Polymerase (PARP) expressions were determined using Western blotting. Equal protein loading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

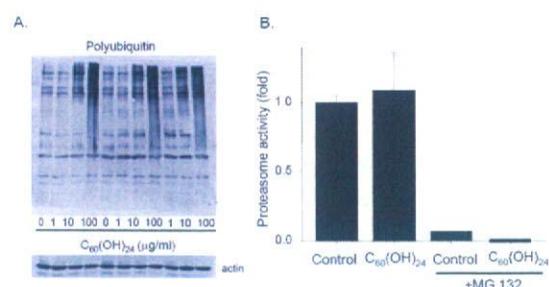


Figure 5. Fullerene treatment induces polyubiquitination in HUVECs. After HUVECs at ~90% confluence were treated with C60(OH₂₄) (1-100 µg/ml) for 24 h, total cell lysates were harvested. (A) Accumulation of polyubiquitin was determined by Western blotting. Equal protein loading was confirmed using total 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
細胞内に異常蓄積することが判明した
(Figure 6B-C)。

Figure 6

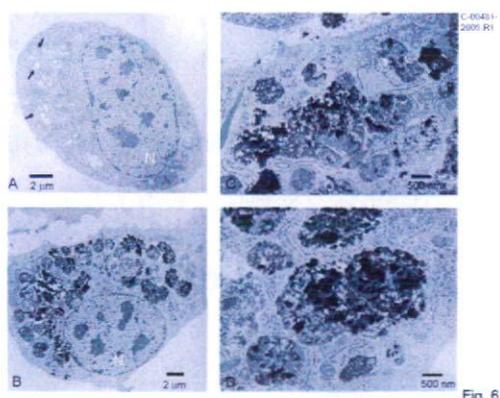


Figure 6. Ultra-structural features of HUVECs treated with C60(OH₂₄). HUVECs were treated without (A; Control) or with 100 µg/ml C60(OH₂₄) (B-D) for 24 h. N; nucleus. Arrows: vacuoles with phagocytotic function. Scale bar: 2 µm (A and B) and 500 nm (C and D).

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 の発現をウェ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

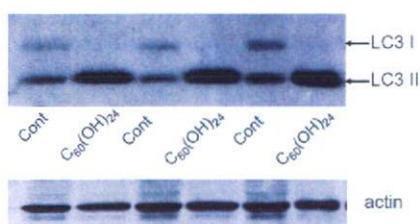


Figure 7. Fullerene induced the formation of autophagosomes in HUVECs. After HUVECs at ~90% confluence were treated with 100 µg/ml C60(OH₂₄) (B-D) for 24 h, total cell lysates were harvested. Autophagosomes were detected using Western blotting with LC(light chain)3 antibody (n=4). Upper band

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 µg/ml and 10 µg/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 µg/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 µg/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)

Figure 8

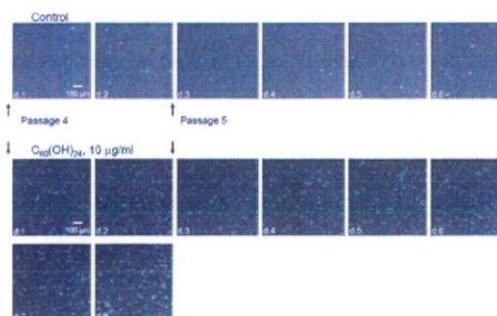


Figure 8. Chronic effects of low dose fullerene on HUVECs. HUVECs were treated without (Control) or with 10 µg/ml C60(OH₂₄) for 8 days. Cells from passage 4-5 were used. Treatment was started soon after splitting cells from passage 3 to 4. culture media containing fullerene were changed every 2

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、高濃度の条件化で細胞障害や細胞死を引き起こした。このような高濃度に曝露されるには特殊な環境であるが、これらの実験結果から産業ナノ粒子、環境ナノ粒子の急性的な毒性は当初の予測ほど強くないと考えられる。しかしながら、低濃度で長期間の曝露が動脈硬化症、虚血性心疾患の発症と進展に関わるか否かは今後の検証が必要である。

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 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) 細胞を水溶性フラーレン (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) 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, 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 µg/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 µg/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.

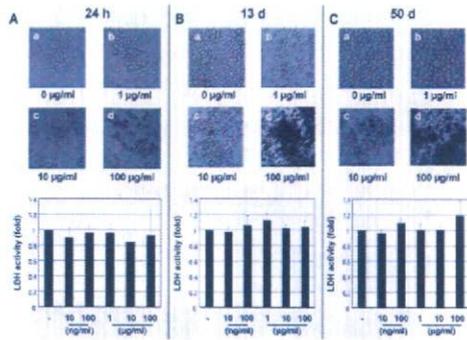


Fig 1. Representative photomicrographs of RAW264.7 cells treated with carbon black (CB). (A) RAW264.7 cells were treated with CB (a, 0 µg/ml; b, 1 µg/ml; c, 10 µg/ml; d, 100 µg/ml) for 24 h, (B) 13 days or (C) 50 days, upper panel ($\times 200$ magnification). CB did not induce cytotoxic injury in RAW264.7 cells. RAW264.7 cells were cultured with CB (0, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml or 100 µg/ml) for (A) 24 h, (B) 13 days or (C) 50 days. Culture medium was then collected. Lactate dehydrogenase (LDH) released into supernatant was measured relative to basal LDH release in controls (control ratio = 1.0) (lower panel).

Figure 2.

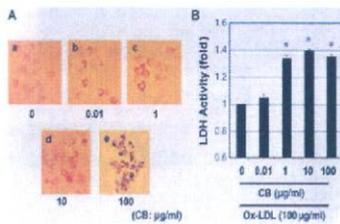


Fig 2. Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)-induced cytotoxic injury in carbon black (CB)-treated RAW264.7 cells. (A) After RAW264.7 cells were cultured with CB (a, 0 µg/ml; b, 0.01 µg/ml; c, 1 µg/ml; d, 10 µg/ml; e, 100 µg/ml) for 48 days, and were then co-treated with Ox-LDL (100 µg/ml) for a further 48 h. Cells were fixed with 4% paraformaldehyde neutralized buffered solution, and were then stained with Oil Red O (a-e). (B) RAW264.7 cells were cultured with CB (0, 10 µg/ml, 100 µg/ml, 1 µg/ml, 10 µg/ml or 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) was measured relative to basal LDH release in controls (CB and Ox-LDL all µg/ml) (control ratio = 1.0). * $p < 0.05$ vs controls.

2) 長期間低濃度水溶性フラーレン [C60(OH)₂₄] 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(OH)₂₄ 処置ともに変化、差異は見られなかったが、10 日間の C60(OH)₂₄ 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(OH)₂₄ 特異的に確認された (Figure 3 B-b, arrow heads)。

Figure 3

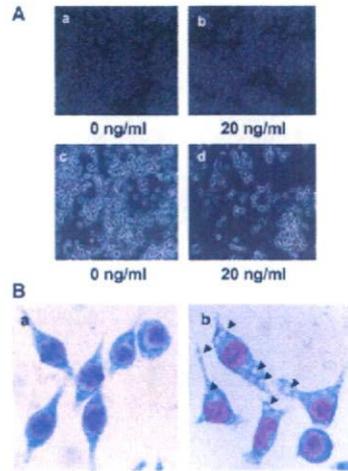


Fig 3. Water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄) induced phagosome formation in RAW264.7 cells. (A) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄ (a, 0 ng/ml; b, 20 ng/ml) for 24 h or 10 days (c, 0 ng/ml; d, 20 ng/ml), and cell morphology was then visualized ($\times 200$ magnification). (B) Cells were treated with C₆₀(OH)₂₄ (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 ($\times 1,000$ magnification). Arrowheads 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。水溶性フラーレン処置後 8 日間目に酸化 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(OH)₂₄ 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(OH)₂₄ 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(OH)₂₄ 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(OH)₂₄ 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(OH)₂₄ (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(OH)₂₄ 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

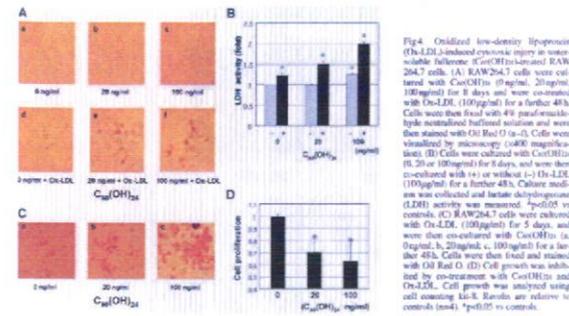


Fig 4. Oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL)-induced cytotoxic injury in water-soluble fullerene. RAW264.7 cells were cultured with Cu(OH)₂ (0 ng/ml, 20 ng/ml, 100 ng/ml) for 5 days and were co-treated with Ox-LDL (100 µg/ml) for a further 48 h. Cells were then fixed with 4% paraformaldehyde neutralized histological solution and were stained with Oil Red O (a-c). Cells were visualized by microscopy (×400 magnification). (B) Cells were cultured with Cu(OH)₂ (0, 20 or 100 ng/ml) for 5 days, and were then co-treated with (+) or without (-) 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 controls. (C) RAW264.7 cells were cultured with Ox-LDL (100 µg/ml) for 5 days, and were then co-treated with Cu(OH)₂ (a, 20 ng/ml, b, 20 ng/ml, c, 100 ng/ml) for a further 48 h. Cells were then fixed and stained with Oil Red O. (D) Cell growth was inhibited by co-treatment with Cu(OH)₂ and Ox-LDL. Cell growth was analyzed using cell counting kit-8. Results are relative to controls (n=4). *p<0.05 vs controls.

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) (20 ng/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 (5 µg/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

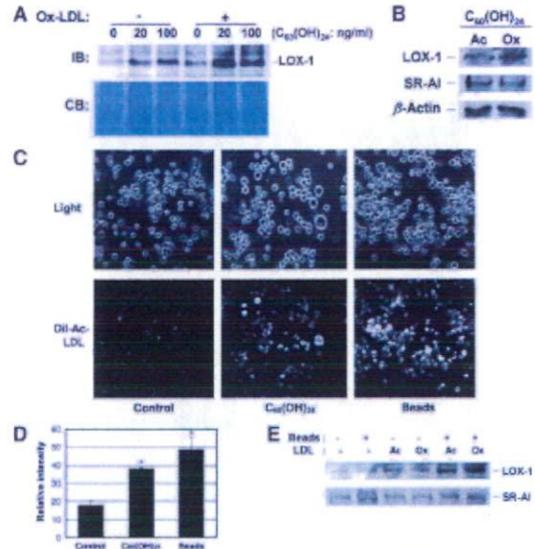


Fig 5. Water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄) and 6-µm bead-induced LOX-1 expression in RAW264.7 cells. Cells were cultured with Cu(OH)₂ (0, 20 or 100 ng/ml) for 5 days, co-treated with (+) or without (-) oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) (100 µg/ml) for a further 48 h and harvested. Whole cell extracts were prepared for sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE). Samples (10 µg/lane) were loaded on reducing SDS-PAGE gels (10%) electrophoretic, and were transferred to membranes for immunoblotting. (A) Ox-LDL (100 µg/ml), scavenger receptor type AI (SR-AI) (2 µg/ml), LOX-1 protein or SR-AI protein expression was visualized by immunoblotting. (B) Equal amounts of protein for Western blotting were confirmed by Coomassie blue staining or β-actin as control. (C, D) Ox-LDL (100 µg/ml) or acetylated low-density lipoprotein (Ac-LDL) (5 µg/ml) immunoprecipitation was investigated by pre-treatment with Cu(OH)₂ for 5 days at 6 µm beads for 3 days (Beads), or no pre-treatment (control), after which Ox-LDL (100 µg/ml) was added to RAW264.7 cells. Cells were stained by fluorescence microscopy (×200 magnification). (E) The Ox-LDL (100 µg/ml) immunoprecipitated macrophages were captured directly from RAW264.7 cells attached to the microscope and displayed on Adobe Photoshop CS2 to quantify the quantity of fluorescence in macrophages. *p<0.05 vs controls. (F) Cells were treated with 6-µm beads for 3 days. Ox-LDL or acetylated-LDL was added to the cells, and cells were harvested. Whole cell extracts were prepared for SDS-PAGE. Samples (10 µg/lane) were loaded on reducing gels (10%), and were then transferred to membranes for 20 (LOX-1) or 50 (SR-AI) kDa. Beads expression was visualized by ECL. (G) CB, carbon black.

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, 100 ng/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

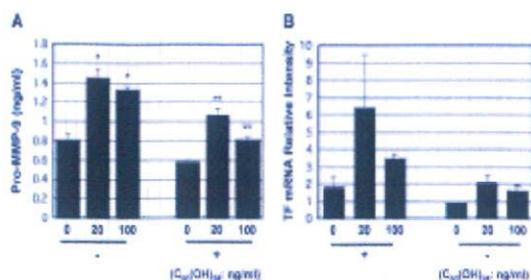


Fig. 6. Water-soluble fullerene (C₆₀(OH)₂₄)-induced pro-matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) secretion and tissue factor (TF) mRNA expression. Cells were cultured with C₆₀(OH)₂₄ at 20 or 100 ng/ml for 8 days and were then co-cultured with (+) or without (-) oxidized low-density lipoprotein (Ox-LDL) (200 μg/ml) for a further 48 h, after which culture medium was collected for pro-MMP-9 enzyme-linked immunosorbent assay (n=6) (A), and total RNA was extracted from the cells for TF mRNA transcription-polymerase chain reaction experiments (n=5) (B). *p<0.05 vs controls (light).

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するものである。マクロファージ実験で使用したナノ粒子の濃度は内皮細胞の濃度よりも約 1/1000 であり、細胞への直接的な影響も考えられた。

4. 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 30 %以上血小板凝集反応が抑制されたが

Figure 1

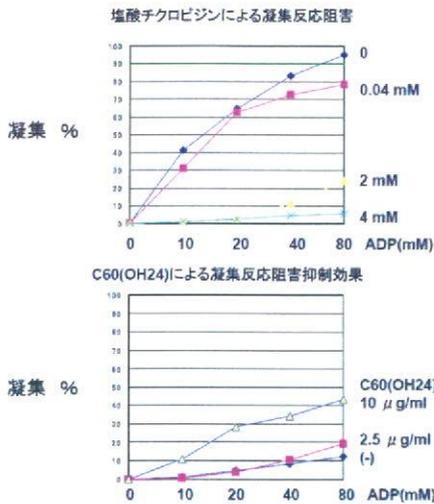
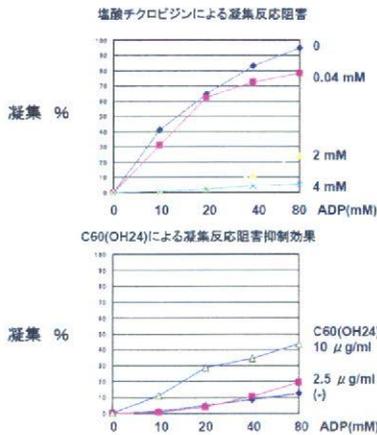


Figure 2



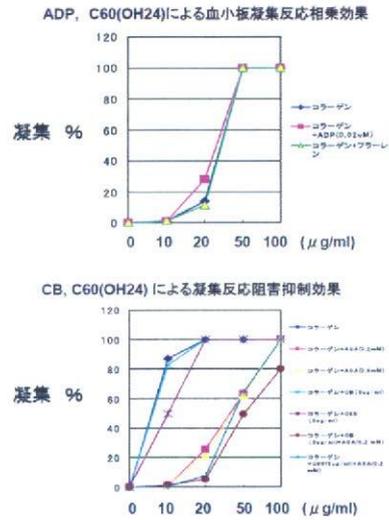
(Figure 2 上図)、C60(OH₂₄) (2.5, 10 μg/ml) で前処理すると塩酸チクロピジン(2 mM)の阻害効果が約 30 %減少することが判明した (Figure 2 下図)。

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)。

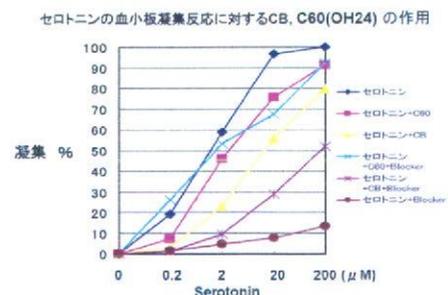
Figure 3



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を有することが判明した。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、動脈硬化発症と血栓形成に関与する可能性を示唆したが、血小板に対する作用濃度が高濃度であり、直接的な影響は少ないと考えられた。

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。

本研究は、Circulation Journal 2008, 72 (1)144-149 に掲載済である。

(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 (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

