

われている。CNT はマウスのアレルギー性反応を増強するとの報告もされている。CB についてはマクロファージ、気道あるいは肺胞細胞に対して障害を起こすとされているが、ヒトへの健康影響は結論が得られていない。こうした吸入曝露による中長期的な有害性、例えば標的臓器となる肺の障害及び発がん作用の確認には、特殊な実験設備や長期間の試験が必要であり、短期かつ簡便な評価手法の開発が求められている。発がんの初期反応は局所あるいは全身性の炎症、及び免疫反応性の変化と考えられる。よって、種々のカーボンナノマテリアルの免疫修飾作用を明らかにすることは、発がん性等の評価にも有用と考えた。

同じカーボンマテリアルでありながら CNT と CB で差が生じるのは、粒子状と線維状という形状が要因の一つと考えられている。一方で、材料中に残存する金属不純物の影響も示唆されている。そこで本研究では、カーボンナノマテリアルに残存する金属に着目し、それらの炎症及び免疫反応、特にアレルギー反応に対する増強作用の有無を検討した。MWCNT から培地等に溶出する金属を定量するとともに、MWCNT 懸濁液及び抽出液、材料中に検出された金属のイオン及び金属酸化物について、昨年度と同様に、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞の活性化反応に対する効果を調べた。

## B. 研究方法

### 1. 試料

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、MWCNT-M、MWCNT-N、MWCNT-SD1、MWCNT-SD2 を用いた。金属酸化物として、酸化鉄懸濁液 ( $\text{Fe}_2\text{O}_3$ , <100 nm (DLS) particle size, <30 nm avg. particle size (APS))、酸化アルミニウム懸濁液は、 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-X}$  (45 nm) 及び  $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-A}$  (10~20 nm) を用いた。金属塩は、 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{VCl}_3$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  及び

$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  を用いた。

### 2. 細胞

ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞は ATCC から入手した。細胞は 10% 牛胎児血清 (FBS)、1% antibiotic-antimycotic 溶液 (Invitrogen 社) 及び 0.055 mmol/ml 2-mercaptoethanol を含有する RPMI-1640 培地 (FBS-RPMI) を用いて培養した。

### 3. 金属分析

ポリプロピレン製遠心管に MWCNT を 0.05 ~ 0.1 g とり、FBS-RPMI を加えて 10 mg/ml とし、超音波洗浄器に入れて 30 分間処理した。壁面についた MWCNT を遠心 (3500 rpm、5 分間) して落とし、軽くかき混ぜた後、37°C で 24 時間静置し抽出した。3500 rpm で 10 分間遠心して上清をとり、0.20  $\mu\text{m}$  フィルターでろ過したものを溶出液とし、試験まで 4°C で保管した。

溶出液 0.3~1 ml に硝酸 5 ml を加えて密栓し、1600W (100%) のマイクロ波を照射して 25 分で 210°C となるようにし、15 分間保持した。分解液を回収し水を加えて 10 ml に定容し、メンブランフィルターでろ過したものを試料溶液とした。市販の各種金属標準液を混合し、1% 硝酸で希釈して混合標準溶液 (0.01~100 ng/ml, ppb) を調製した。これらを He モードの ICP-MS に導入し、各元素の質量数のピーク強度を測定した。混合標準溶液から作成した検量線を用いて試料溶液の各元素の濃度を求め、MWCNT 10 mg 当たりの溶出量 ( $\mu\text{g}$ ) を計算した。

### 4. 粒度分布の測定

金属酸化物ナノ粒子の懸濁液を、水または生理食塩水で 0.01~0.1% 濃度になるよう希釈し攪拌後、ゼータサイザーナノ (nano-ZS, Malvern 社) で粒度分布を測定した。

### 5. 金属塩及び金属酸化物の適用濃度の決定

THP-1 細胞浮遊液 ( $2 \times 10^6$  cells/ml) を 500  $\mu\text{l}$  ずつ 24 穴プレートに入れ、試験溶液を 500  $\mu\text{l}$  ずつ加えて 24 時間培養した。

金属塩を試験した場合、細胞浮遊液 100  $\mu\text{l}$  をとり WST-1 試薬 10  $\mu\text{l}$  添加して 2~3 時間静置後、450 nm における吸光度を測定し、試験物質を加えずに培養した時の吸光度との比を細胞生存率 (%) とした。

金属酸化物については、細胞浮遊液 20  $\mu\text{l}$  をとり、リン酸緩衝液 (PBS) で 100 倍希釈したものについて、市販測定キット (キッコーマン) を用いて ATP 発光量を測定した。また細胞浮遊液を等量のトリパンブルー試液と混合し、セルカウンターを用いて細胞生存率を求めた。

## 6. 細胞表面抗原の解析

前年度同様に、h-CLAT 法を参考に若干変更して試験した。THP-1 細胞浮遊液及び試験物質を 24 穴プレートの各穴に入れ 24 時間培養後、2,4-dinitrochlorobenzene (DNCB) を加えて更に 24 時間培養した。細胞を BSA-PBS で洗浄後、0.01 % globlins-PBS 溶液でブロッキング処理した。次に FITC 標識抗 CD86 抗体、FITC 標識抗 CD54 抗体または FITC 標識マウス IgG1 でそれぞれ染色し、BSA-PBS に再懸濁後、PI 溶液を加えた。フローサイトメーターを用いて細胞生存率 (%) を求め、10000 個の生細胞について CD54 及び CD86 抗原の平均蛍光強度 (mean fluorescence intensity, MFI) を測定し、試験溶液で処理した時のコントロールに対する相対蛍光強度 (%) を求めた。

## C. 研究結果

### 1. カーボンナノチューブからの溶出する金属の定量

MWCNT-M に細胞培養液を加え 30 分間超音波洗浄器で処理して懸濁後、24 時間静置した。フィルターろ過し、マイクロウェーブ分解したものについて ICP-MS を用いて定量した。MWCNT を添加しない培養液についても同様に操作し、これと比較して増加が認められるものを MWCNT からの溶出金属とした。培養液の濃度変化が認められた金属は

V、Mo、Mn で、うち Mo の増加が最も大きかった。MWCNT-M からは V が溶出し、10 mg 当たり約 0.03  $\mu\text{g}$  であった。

MWCNT-SD2 は Mn と Mo の溶出が認められ、Mn は 0.01~0.03  $\mu\text{g}$ 、Mo は 2~5  $\mu\text{g}$  と計算された。MWCNT 中に比較的多く定量された Fe と Al については、培養液の値と MWCNT 抽出液との値の間に変化はなかった。

### 2. 金属酸化物の粒度分布

MWCNT に残存するとされた金属は酸化物であると仮定し、以下細胞に与える影響を金属酸化物で試験した。比較的大量に含まれる Fe と Al について試験した。酸化鉄については昨年度実施したため、2 種の酸化アルミニウム ( $\text{Al}_2\text{O}_3$ ) を検討した。 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-6}$  (一次粒子径 45 nm) の水希釈時の平均粒子径は 154 nm (PdI 0.145) であった。血清中でも粒子径はほとんど変化ないが、培地中では著しく凝集した。 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-7}$  (一次粒子径は 10~20 nm) も同様の平均粒子径を示した。培地中では分布幅が広がり平均粒子径も大きくなるが (502 nm、PdI 0.454)、 $\text{Al}_2\text{O}_3\text{-6}$  ほどではなかった。

### 3. 細胞毒性

各金属塩及び  $\text{Al}_2\text{O}_3$  懸濁液を培地で希釈し最終濃度が 1~100  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度となるように細胞に加えた。金属塩については WST-8 吸光度法、金属酸化物については妨害があるため ATP 発光法またはトリパンブルー染色法により評価した。 $\text{Al}_2\text{O}_3$  については 1000  $\mu\text{g}/\text{ml}$  まで濃度を上げてても細胞毒性は認められなかった。Fe(II)及び Fe(III)、Al 及び Mo 塩の細胞毒性は弱く、Mn や V とは大きな差が認められた。 $\text{AlCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 、 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 、及び  $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  は 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{VCl}_3$  は 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、 $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  は 0.01 及び 0.1  $\mu\text{g}/\text{ml}$  では著しい細胞毒性を示さないことから、この濃度を各金属の前処理濃度とした。

### 4. 細胞表面抗原発現に及ぼす影響

THP-1 細胞に上記試験で得られた細胞毒性のない濃度で各金属酸化物を添加して 24 時間培養後、DNFB が最終濃度 3.5 または 4  $\mu\text{g/ml}$  となるよう加え、更に 24 時間培養した。金属及び DNFB を加えず培養した時（コントロール）の細胞表面抗原 CD54 及び CD86 の発現量を 100 としたときの相対率（%）を求めた。

金属酸化物ナノ粒子  $\text{Al}_2\text{O}_3$  で処理しても CD86 及び CD54 の発現量は増加せず、DNFB によるこれらの表面抗原の発現率の増加に対しても影響なかった。次に、各金属塩で細胞を前処理した後、DNFB を適用した。 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{VCl}_3$  及び  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  は DNFB の反応を増強することはなかった（図 2）。

各種 MWCNT 抽出物について同様に前処理の効果を調べた。CD54 の発現率には影響なかった。CD86 の発現率がコントロールの 150%を超えるものがあるが、DNFB による発現率が MWCNT 抽出物によって増強されるようなことはなかった（図 3）。

#### 4. ケモカイン産生に及ぼす影響

金属塩の感作誘導反応の増強効果を試験した培養上清について、ケモカイン及びサイトカイン濃度を測定した。コントロールと比べて明確な増加が認められたものは IL-8 であった。IL-8 産生量を指標として、 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$  または  $\text{MnCl}_2$  の前処理による効果について調べたが、一部を除き増強はなかった（図 4）。

#### D. 考察

MWCNT はアーク放電法、レーザー蒸発法、化学的気相成長法によって製造されており、その伸長のため金属触媒（Fe、Co、Ni、Co 等）が用いられる。こうした金属触媒は製造後酸処理などにより除去されるが、精製が不十分な場合は CNT に残留することがある。昨年度までの検討で、Fe はほとんどの MWCNT に残存していることがわかった。Fe は酸化剤として作用しフリーラジカルを

生成する。フリーラジカルは DNA やタンパク質、および脂質に傷害を与えることから、材料に残存する Fe 等が MWCNT の生体影響の原因の一つではないかと考えた。ある種の CNT を暴露したマウスでは OVA に対する免疫反応が増強したと報告されている。また *in vitro* の皮膚感作誘導反応に活性酸素種が関与するとの報告がある。

我々は種々のカーボンナノマテリアルの免疫作用を *in vitro* で検討している。MWCNT を培養液に超音波処理して分散した後、24 時間静置したときの溶出金属量を ICP-MS で分析した。MWCNT の混和により培養液中の増加が認められた金属は V、Mo 及び Mn で、うち Mo の増加量が最も大きかった。MWCNT の種類によって、溶出する金属の種類と量が異なった。MWCNT-M からは V が溶出し、MWCNT-SD2 は Mn と Mo の溶出が認められた。MWCNT 中に比較的多く定量された Fe と Al については、培養液の濃度変化を検出することができなかった。培養液以外の水を用いた試験では溶出が認められることから、Fe 等は溶出しているのにも関わらず検出できなかった。培養液中の成分として同金属が一定量存在し、これに比べて溶出量がわずかであること、及び ICP-MS でのこれら金属の検出感度が低いことが、原因として考えられる。

MWCNT の金属は表面に酸化物として存在し、これが生体影響に関与すると仮定した。定量値が高い金属酸化物のうち、ナノサイズの粒子の懸濁液として入手可能であった Fe と Al の酸化物について感作性反応への増強効果を調べることとし、本年度は  $\text{Al}_2\text{O}_3$  について検討した。 $\text{Fe}_2\text{O}_3$  同様に  $\text{Al}_2\text{O}_3$  が感作性陽性を示すことはなかった。DNFB に対する THP-1 細胞の CD86 及び CD54 の発現量は、 $\text{Al}_2\text{O}_3$  で前処理、共存下でも増加しなかった。金属は酸化物の形では感作性反応を増強する効果はないと判断した。

次に MWCNT 中の金属はイオンとして溶

出し、反応性に影響を及ぼすと考えた。各金属塩で細胞を前処理した後、DNCBを適用した。しかしFeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>、VCl<sub>3</sub>及びNa<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>はDNCBによるTHP-1細胞のCD54及びCD86発現を増強することはなかった。またFeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>またはMnCl<sub>2</sub>の培養上清中のIL-8産生量を測定したが、前処理による増加はほとんどなかった。

MWCNT抽出物はろ過して調製していることから、MWCNTそのものではなく溶解している、すなわち溶出した金属イオンが作用すると考えられる。すべてのMWCNT抽出物はCD54の発現率には影響なかった。CD86の発現率がコントロールの150%を超えるものがあるが、DNCBによる発現率がMWCNT抽出物によって増強されることはなかった。

以上、MWCNTから溶出する金属はいずれも量が少ないこと、及びこれら金属の濃度では感作性物質による反応を増強しなかったことから、MWCNTの発がんや炎症作用に対する金属の影響は極めて少ないことが示唆された。

## E. 結論

MWCNTに残存する金属が感作誘導反応を増強する作用を有するかどうか検討した。MWCNTを懸濁した培養液で濃度変化が認められた金属はV、Mo、Mnであった。ヒト単球由来細胞株THP-1細胞にDNCBを適用

したときのCD54及びCD86抗原発現量は、各金属塩共存下でも変化しなかった。各培養上清中のIL-8産生量を調べたが、いずれも減少した。金属酸化物についても同様に影響しなかった。以上、MWCNTから溶出する金属量は少ないこと、及びこれら金属の感作誘導反応の増強作用を観察することができなかったことから、MWCNTで誘発される発がんや炎症への金属の関与はほとんどないことが示唆された。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

なし

### 2. 学会発表

1) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治. ICP-MSによるカーボンナノマテリアルの金属の分析. 第39回日本トキシコロジー学会学術年会(2012.7)

## I. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

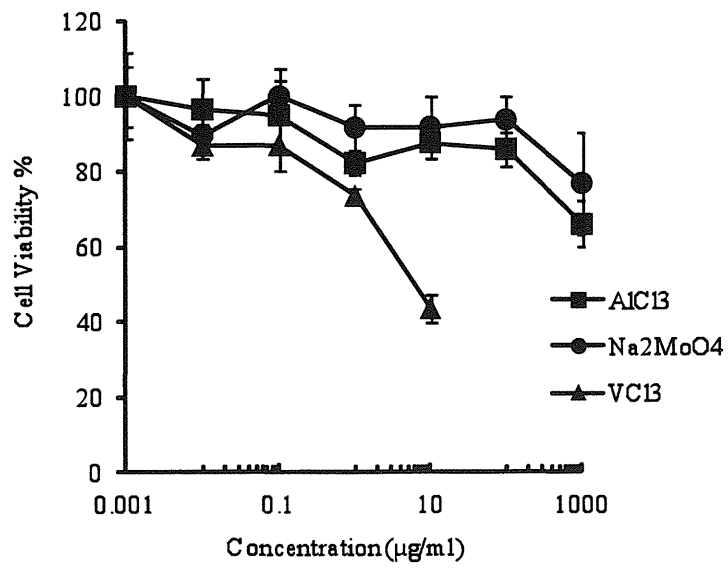
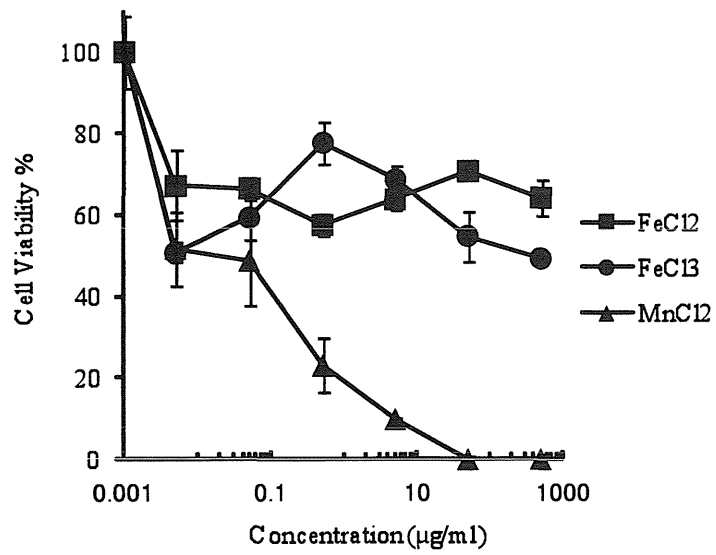
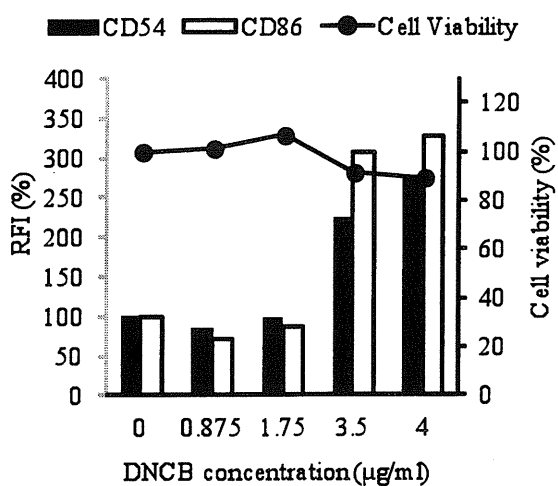
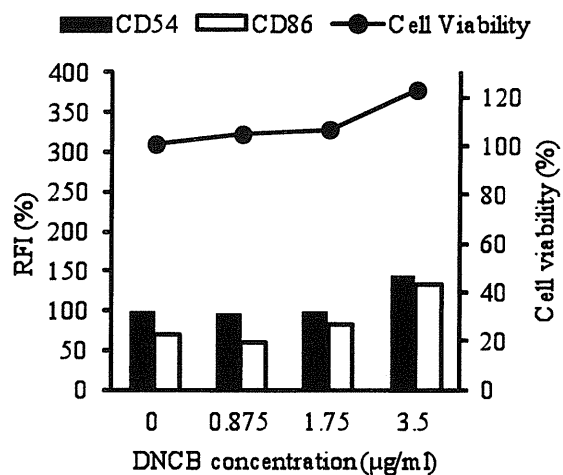


図 1. 金属塩の細胞毒性

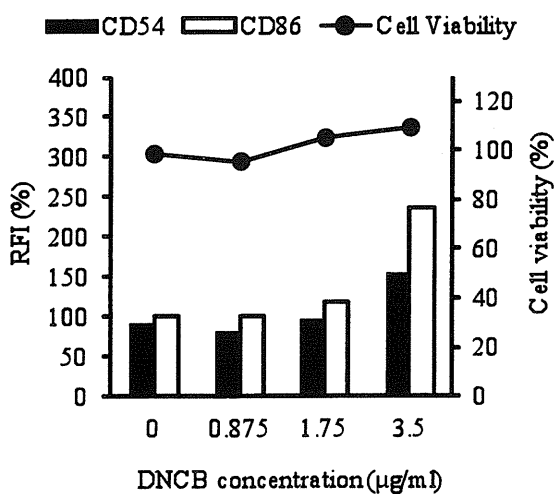
(a) Control



(b) FeCl<sub>3</sub>



(c) MnCl<sub>2</sub>



(d) Na<sub>2</sub>Mo<sub>4</sub>

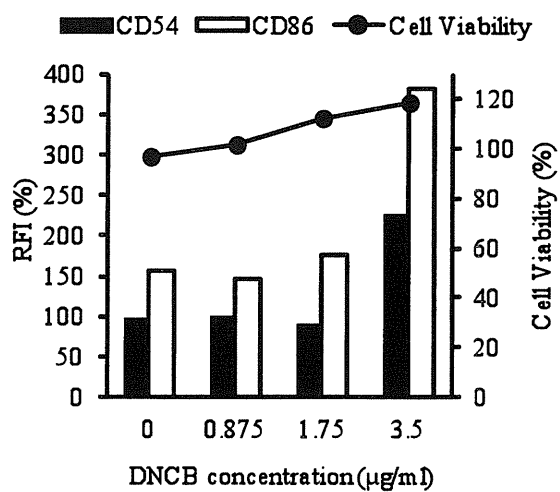


図3. DNCBによるTHP-1細胞の細胞表面抗原発現率に対する金属塩の影響

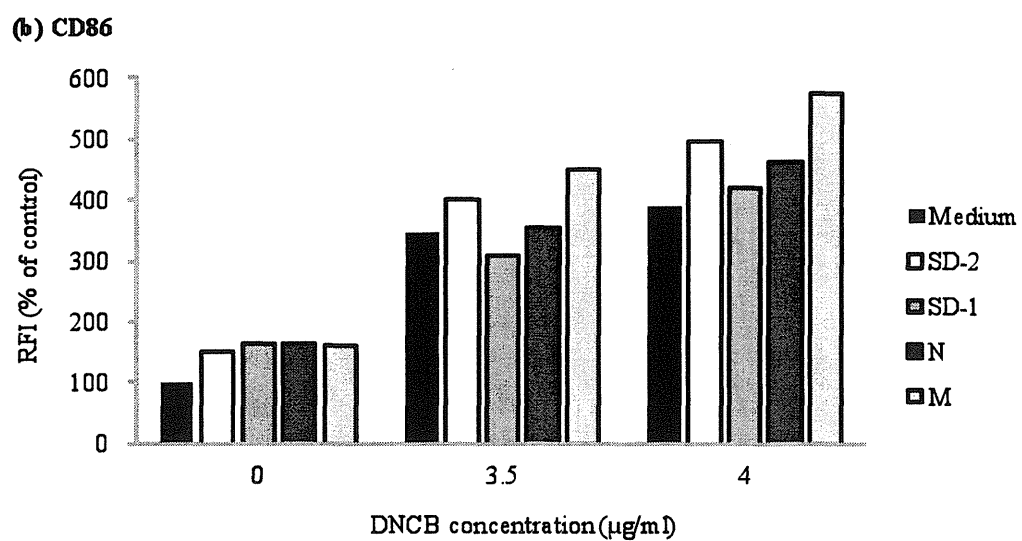
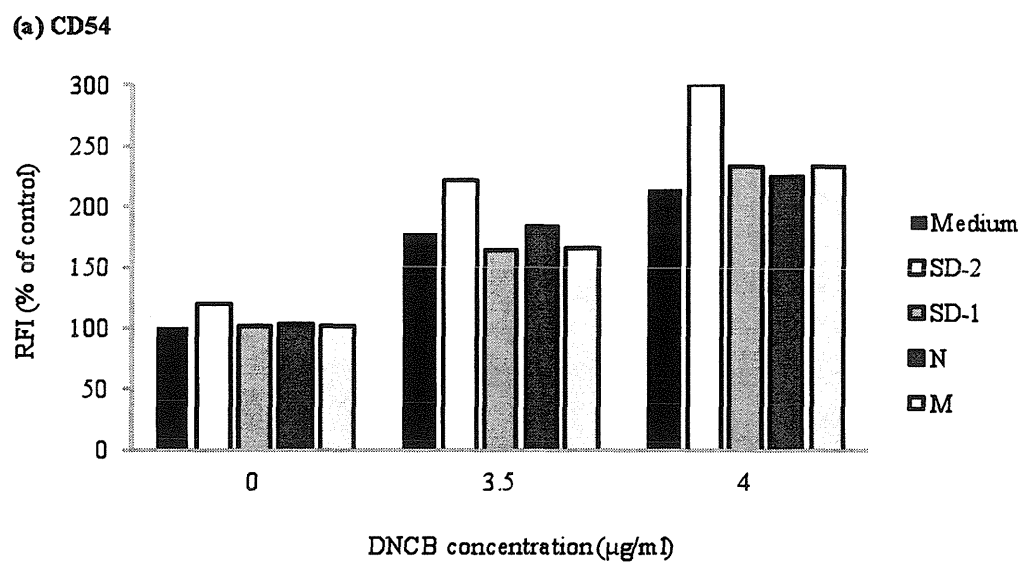


図 3. DNCB による THP-1 細胞の細胞表面抗原発現率に対する CNT 抽出物の影響

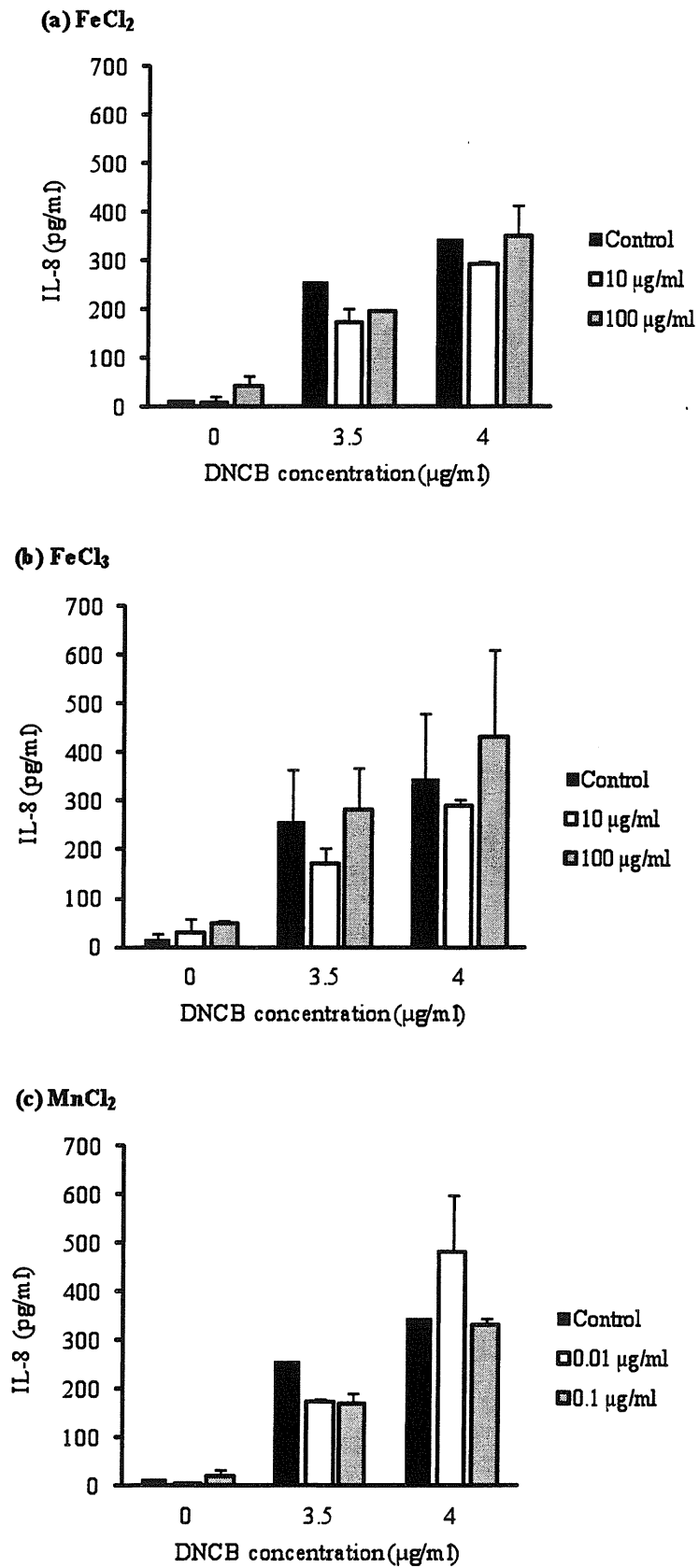


図 4. THP-1 細胞の DNCB による IL-8 産生に対する金属塩前処理の影響



平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
研究分担報告書

研究課題名:カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

研究分担課題名: 呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

研究分担者 今泉祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野 教授  
研究協力者 澤田英士 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野  
大羽輝弥 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野  
鈴木良明 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野  
山村寿男 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野  
大矢 進 名古屋市立大学大学院薬学研究科 細胞分子薬効解析学分野

**研究要旨** カーボンナノマテリアルの呼吸器に対する毒性・発ガン機構解明にあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な気道上皮繊毛細胞における細胞障害性とその機構の解明を目指した。気道繊毛細胞は異物の口腔側への輸送を直接的に担っているため、細胞障害による繊毛運動機能低下は、異物排泄機能低下に直結する。マウス気道上皮組織から単離した初代培養繊毛細胞を用いて、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度と膜電位および繊毛運動の関係について明らかにした。また初代培養繊毛細胞へカーボンナノチューブ懸濁液を適用すると細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度が上昇し、繊毛への吸着や繊毛運動の低下、細胞障害の生じることを明らかにした。本結果は、気道内へ取り込まれたカーボンナノチューブが気道上皮繊毛細胞の繊毛に付着し、繊毛細胞の機能低下・細胞障害を引き起こすため、排泄されることなく貯留し、他の上皮細胞への障害性を発揮することを示唆している。

#### A. 研究目的

分担研究課題名:呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブの呼吸器に対する毒性・発ガン機構を解明するにあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な呼吸器細胞障害を生化学的・生理学的・薬理学的手法を駆使して解析することを目的とした。特に異物の口腔側への輸送を直接的に担っている気道上皮繊毛細胞に対する細胞障害性の評価系を確立する。

#### B. 研究方法

B-1 [初代培養マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動評価、細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度測定、イオンチャンネル機能解析] マウス気道上皮組織から、コラ

ゲナーゼ処理により細胞を単離し初代培養を行った。細胞は各種の上皮細胞が混ざっている状態で培養された。顕微鏡下、繊毛運動の見られる繊毛細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電流を解析した。また細胞内  $\text{Ca}^{2+}$ 濃度を  $\text{Ca}^{2+}$ 蛍光色素 fura2 あるいは fluo3 を用いることにより、膜電位は電位感受性蛍光色素 DiBAC<sub>4</sub>(3)を用いることにより、それぞれ測定した。繊毛運動は高速デジタルビデオカメラで画像として取り込み、繊毛運動を定量的に解析した。カーボンナノチューブ懸濁液を初代培養繊毛細胞へ適用し、画像解析を行った。

B-2. [In vivo でのカーボンナノチューブ噴霧による気道上皮組織機能への影響及び細胞障害性の評価] 気道内へチューブを挿入しカーボンナノチューブを噴霧・吸引させ、7日後に気道上皮組織を摘出し非固定のままチャンバー内でカー

ボンナノチューブの貯留を観察する。他のナノマテリアル（球形マイクロスフェアなど）を噴霧・吸引した場合の貯留を定量的に比較する方法を開発し、気道での異物クリアランス評価法として

### C. 研究結果

① マウス呼吸器系器官（気管・気管支）より急性単離した上皮繊毛細胞から膜電流を測定したところ、ATP感受性 $K^+$  ( $K_{ATP}$ )チャンネル開口薬のdiazoxideで活性化され、阻害薬のglibenclamidで抑制される電流成分の存在を認めた。繊毛細胞を用い、主に $K^+$ チャンネルに関して網羅的にRT-PCR解析したところ、上記電流成分に対応したKir6.2チャンネルと修飾分子であるSUR2.1の発現が見出された。

② 膜電位と細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度および繊毛運動の関係を明らかにするために、パッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから $Ca^{2+}$ 感受性蛍光色素fluo3を細胞内へ導入し、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度を測定した。その結果、膜電位を過分極させることにより、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇し、この上昇は外液中の $Ca^{2+}$ 除去により消失することを発見した。さらに膜電位固定化下での過分極時に繊毛運動が増強されることを明らかにした。

③  $K_{ATP}$ チャンネル開口薬のdiazoxideの適用により繊毛細胞に過分極が生じ、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇すること、また繊毛運動も増大することを見出した。これらはglibenclamidにより抑制された。

④ 単離繊毛細胞にカーボンナノチューブの懸濁液を灌流したところ、細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度が上昇した。また一定時間洗浄後にも、ナノチューブの繊毛への貯留が認められた。一方、直径1ミクロン程度の蛍光球形ビーズを同様に適用したところ、顕著な $Ca^{2+}$ 濃度変化はなく、また洗浄後の繊毛中への貯留は認められなかった。

⑤ 繊毛細胞培養液中にカーボンナノチューブ懸濁液を加えて数日間培養したところ、vehicleのみを加えた群に比べ、半日後には有意に繊毛運動を停止している繊毛細胞の割合が増加した。また18時間後にはカーボンナノチューブ適用群において、繊毛細胞の割合が有意に減少した。

の確立を目指した。

（倫理面への配慮）実験動物に関する名古屋市立大学の実験倫理指針に従って実験を行った。

### D. 考察

繊毛細胞は電位依存性の $Na^+$ や $Ca^{2+}$ チャンネル発現がない典型的な非興奮性細胞であり、過分極誘発性 $Ca^{2+}$ 濃度上昇は、電位非依存性・非選択性陽イオンチャンネルを介する流入と考えられた。繊毛細胞には $K_{ATP}$ チャンネルが機能発現していることを初めて明らかにした。 $K_{ATP}$ チャンネル開口薬投与は過分極を引き起こし $Ca^{2+}$ 流入増大を介して繊毛運動増強を生じさせたことから、 $K_{ATP}$ チャンネル開口薬を気道閉塞性疾患（喘息やCOPD）の治療薬や去痰薬として用いる可能性を示唆する結果を得たと考える。また繊毛運動に対するカーボンナノチューブの影響に関する評価系として、*in vitro*系の確立に成功しつつある。高速画像解析法による繊毛運動解析や細胞内 $Ca^{2+}$ 濃度測定などにより、今後、さらに定量性の高い評価系の確立を目指すことができよう。

### E. 結論

カーボンナノマテリアルによる繊毛細胞機能への影響や繊毛細胞障害性を検討する上で、繊毛運動の制御機構について、十分な知見を得ることがまず必要であった。本成果は繊毛細胞での繊毛運動の新たな調節機構を明らかにするとともに、気道閉塞性疾患における新たな治療薬ターゲットを提案した。その基盤に立って、少なくとも*in vitro*の系では、ナノマテリアル吸入による繊毛細胞障害評価系の確立に向けて確実な一步を刻むものとなった。

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

$Ca^{2+}$  influx facilitated by membrane hyperpolarization due to ATP-sensitive  $K^+$  channel openers enhances ciliary beating in mouse airway ciliated cells.

Ohba t, Sawada E, Suzuki Y, Yamamura, H, Ohya S & Imaizumi Y. J Pharmacol Exp Ther 投稿、改訂中。

Interference of carbon-nanotubes on functional activities in primary cultured airway ciliary cells of the mice

Ohba t, Xu J, Sawada E, Suzuki Y, Tsuda H & Imaizumi Y. 投稿準備中

## 2. 学会発表

大羽輝弥、澤田英士、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉祐治 「マウス気道上皮繊毛細胞運動の細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度及び膜電位へのATP依存性K<sup>+</sup>チャンネル開口薬の作用」 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム2012, 2012年9月1日(神戸)

大羽輝弥、澤田英士、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉祐治 「K<sub>ATP</sub>チャンネル開口薬によって引き起こされる膜電位の変化による繊毛運動への影響」 第86回日本薬理学会年会 平成25年3月23日(福岡)

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

研究課題名:カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

分担研究課題名:発がんに関与する肺マクロファージの *in vitro* および *in vivo* 作用機序解析

分担研究者 酒々井眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学分野 教授  
研究協力者 深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学分野 助教

## 研究要旨

本分担研究の目的は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作用機序解析モデル構築である。平均長の異なる MWCNT-N の肺内投与後の短期および長期での炎症、線維化、過形成などの肺障害性および遺伝子発現プロファイルの検討の目的で、ふるい板を使い MWCNT を分画化し各分画での肺障害性および遺伝子発現への影響を検討した。濾過(FT 分画, 平均長 2.6  $\mu\text{m}$ )、非濾過(R 分画, 高密度の為平均長測定不可)、原液(W 分画, 平均長 4.2  $\mu\text{m}$ )を雄 F344 ラットに 2 週間で計 1.0 mg を肺内噴霧し、短期試験では曝露後 2 週目、長期試験では 52 週目で剖検し肺での組織学的変化およびサイトカイン系遺伝子発現を調べた。短期試験では炎症細胞浸潤および異物肉芽腫の形成を伴いマクロファージが MWCNT を貪食している像を認めた。FT 分画での炎症面積は溶媒対象群および他の 2 分画と比較して有意に増加していた。長期試験では 3 分画曝露は共に MWCNT を貪食したマクロファージ、炎症細胞浸潤を伴う異物肉芽組織、肺胞上皮細胞の過形成、肺胞間質の線維化および肥厚を認めた。3 分画での炎症面積および線維化の数は溶媒対象群と比較して有意に増加した。分画間での差はなかった。短期および長期試験において腫瘍性病変は認めなかった。培養肺マクロファージに MWCNT を曝露しマイクロアレイ解析にて発現増加したサイトカイン系遺伝子として Csf3、IL6、Ccl4 および Cxcl2 がヒットした。これらについて短期および長期試験での肺でのタンパク発現を調べた。短期試験では、Csf3 および IL6 では W と FT 分画でのタンパク発現が増加した。短期および長期試験で Cxcl2 および Ccl4 は 3 分画でのタンパク発現が共に増加した。以上より、平均長が 2.6  $\mu\text{m}$  以上の MWCNT 繊維は、炎症、肺胞間質の線維化、肺胞上皮細胞の過形成を含む肺障害性がある。肺内投与後 1 年経過後も繊維は肺内および胸郭に存在した。MWCNT の肺内曝露によりタンパク発現が誘導されるマクロファージに関連する遺伝子(Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4)がある。MWCNT と腫瘍性病変との関連は 104 週間試験(現在経過中)の結果を考慮する必要がある。本研究成果はヒトに外挿可能な作用機序解析モデル構築のためのエビデンスになると考えられる。

### A. 研究目的

本研究の目的は多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺障害性についてヒトへ外挿可能な作

用機序解析モデル構築である。平均長の異なる MWCNT-N の肺内投与後の短期および長期での炎症、線維化、過形成などの肺障害性およびサイトカイ

ン発現プロファイルの検討を行った。現状では、MWCNT をヒトが吸入した後、長期間経過後の健康影響についてはエビデンスがなく、動物試験でも長期経過後の肺障害の程度には一定の結論が出ていない。本研究では、被検物質として MWCNT-N を用い、マクロファージが貪食可能なサイズを考慮して 25  $\mu\text{m}$  篩板にて分画化したものをラット肺内に投与した。

## B. 研究方法

### B-1: 肺障害性プロファイル検討

MWCNT-N を 1.0 mg の量で雄 F344 ラットの肺内に投与後、2 週目(短期試験)および 52 週目(長期試験)に犠牲死させ肺、胸郭および主要臓器を取り出し解析用試料とした。各臓器の肉眼所見、組織を HE 染色後に炎症、線維化、過形成および腫瘍性病変の有無を検討した。偏光顕微鏡にて MWCNT の存在を確認した。各 HE スライドを IPAP イメージングシステムにて取り込み炎症細胞浸潤の面積を計算した。炎症面積 ( $\text{mm}^2$ ) をスライド上の肺組織全体の面積 ( $\text{mm}^2$ ) で割ることにより平均炎症面積 (%) を算出した。コンピュータが認識した炎症像を光学顕微鏡での肉眼像と比較することで正確に炎症を評価した。各 HE スライドを光学顕微鏡にて観察することで線維化の数をカウントし、得られた値をスライド上の肺組織全体の面積で割ることにより線維化の平均個数を算出した ( $\text{個}/\text{mm}^2$ )。肺の臓側胸膜表面に中皮細胞が増生した像を認めたので、その数をカウントした。カウント値を肺の臓側胸膜周長で割ることにより平均増殖性病変数を算出した ( $\text{個}/\text{cm}$ )。

### B-2: サイトカインタンパク発現プロファイル検討

犠牲死させたラット肺組織よりタンパクを抽出し、マイクロアレイ解析にて発現上昇がみられたサイトカイン遺伝子 Csf3 (9 倍)、IL6 (11 倍)、Cxcl2 (7 倍)、Ccl4 (6 倍) のタンパク発現をウエスタンブロット法にて検討した。短期および長期試験での変化を検討した。

(倫理面への配慮)

我が国の「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)並びに「動物の飼育及

び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)を遵守し、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った (H22-M19)。

## C. 研究結果

### C-1: 肺障害性プロファイル検討

短期試験の肺組織では、マクロファージが MWCNT を貪食した像、MWCNT が組織中に沈着した像を認めた。各分画共に上記所見を呈していた。3 分画共に炎症細胞浸潤、異物肉芽腫を惹起した。FT 分画での炎症面積 ( $57 \pm 9\%$ ) は溶媒対象群 ( $29 \pm 18\%$ ) および他の 2 分画 (R:  $36 \pm 13\%$ 、W:  $37 \pm 10\%$ ) と比較して有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は 3 分画で溶媒対象と比較して増加傾向にあったが有意差は認めなかった。また、横隔膜における中皮細胞は限局性に増生し層状を呈していた。増生した組織中に MWCNT 繊維の沈着を認めた。

長期試験の肺組織では、肺胞間質での MWCNT の沈着、マクロファージが MWCNT を貪食した像を認めた。肺胞壁の線維化、肺胞上皮細胞の過形成、限局的な横隔膜中皮細胞の増生を認めた。増生した組織中に MWCNT 繊維の沈着を認めた。3 分画での炎症面積 (FT:  $46 \pm 11\%$ 、R:  $39 \pm 17\%$ 、W:  $52 \pm 12\%$ ) は溶媒対象群 ( $3.0 \pm 1.4\%$ ) と比較して有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。3 分画での線維化の数 ( $9 \sim 11 \text{ 個}/\text{mm}^2$ ) は溶媒対象群 ( $0.1 \text{ 個}/\text{mm}^2$ ) と比較して有意に増加した。分画間での差はなかった。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は溶媒対象 ( $0.02 \pm 0.05 \text{ 個}/\text{cm}$ ) と比較して 3 分画共に (FT:  $0.47 \pm 0.32 \text{ 個}/\text{cm}$ 、R:  $0.28 \pm 0.22 \text{ 個}/\text{cm}$ 、W:  $0.23 \pm 0.16 \text{ 個}/\text{cm}$ ) 有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。炎症細胞浸潤は短期試験と長期試験共に 100% の頻度で誘発された。線維化は、短期試験では認めなかったが、長期試験では 100% の頻度で誘発された。肺胞上皮細胞の過形成も短期試験では認めなかったが、長期試験では 80~100% の頻度で誘発された。

C-2: サイトカインタンパク発現プロファイル検討  
培養肺マクロファージに各分画を曝露した後、total RNAをサンプルとしたマイクロアレイ解析ではサイトカイン遺伝子 Csf3 (9 倍)、IL6 (11 倍)、Cxcl2 (7 倍)、Ccl4 (6 倍)の発現が上昇していた。次に RT-PCR アッセイにて mRNA 発現レベルを検討した結果、Csf3 で 19 倍、IL6 で 6 倍、Cxcl2 で 3 倍、Ccl4 で 3 倍の有意な発現上昇がみられた ( $P < 0.05$ )。Pathway 解析にて 4 遺伝子共にマクロファージに関連したものであることを確認した。短期試験および長期試験での複数個体の肺組織からタンパクを抽出し、ウエスタンブロット法にてタンパク発現レベルを検討した。短期試験では Csf3 および IL6 の FT および W 分画での発現レベルが上昇していた。Csf3 および IL6 の R 分画では長期試験での発現レベルは短期試験の発現レベルより上昇傾向にあった。一方、短期試験および長期試験において Cxcl2 および Ccl4 では 3 分画共に発現レベルが高い傾向にあった。

#### D. 考察

今回の研究では、MWCNT の平均長に依存した肺障害性の有無と遺伝子発現への影響を調べた。Mitchell らの報告では平均長 5~15  $\mu\text{m}$  で平均直径 10~20 nm の MWCNT を肺内投与した結果、炎症は惹起されなかった。Aiso らの報告では、平均長が 1.7  $\mu\text{m}$  の MWCNT を 0.04 mg および 0.16 mg/rat の用量で肺内投与し、91 日後に肺病変を調べた結果、濃度依存性のマクロファージ浸潤、II 型肺上皮細胞の誘導、肉芽腫形成、線維化を認めた。Nagai らは、平均長 5  $\mu\text{m}$  の MWCNT を腹腔内に投与した結果、100% の頻度で悪性中皮腫を認めたと報告している。今回の我々の実験では、篩で分画化した FT は平均長 2.6  $\mu\text{m}$ 、W は平均長 4.2  $\mu\text{m}$  の繊維であり、R (篩上に残った分画) は測定不可であったが平均長 2.6  $\mu\text{m}$  以上の繊維と考えられる。炎症については、FT が 2 週間試験で炎症の程度が強く、52 週間試験では 3 分画共に炎症を惹起した。これらの結果と我々の結果を合わせると、少なくとも現時点では平均長が 2.6  $\mu\text{m}$  以上の MWCNT 繊維は、炎症を含む肺障害性があると考えられる。52 週時点では炎症反応に伴う肺

胞上皮細胞の過形成がみられた。腫瘍性病変は 52 週では確認できなかったが、臓側胸膜および横隔膜中皮細胞の増生を認め、肺内に投与した繊維が 52 週間経過後も肺内に留まり、胸郭内に存在したという所見より、繊維による中皮の細胞増殖への影響は否定できない。培養肺マクロファージに MWCNT を曝露し、その培養液を使ってヒト肺がん細胞株 A549 を培養した結果、増殖率が 18~20% 増加した。この所見は MWCNT の増殖シグナルへの関与を示唆する。

少なくとも Rat oligo 20k で解析可能な 2 万遺伝子中には FT、R および W のサイズに依存して発現変化する遺伝子はないと思われる。しかし、2 週間試験および 52 週間試験の肺組織での発現解析を考慮すると、少なくとも現状では MWCNT の肺内曝露による炎症の惹起にはこれら 4 遺伝子 Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4 のタンパク発現増加が関与していると考えられる。細胞増殖との関連については、肺胞上皮細胞の proliferating cell nuclear antigen (PCNA) 陽性率、2 年間試験 (104 週間試験) での過形成性病変および腫瘍性病変との関連をみてゆく必要がある。

MWCNT のようなナノ材料は粒子径が小さいため、単位面積当たりの表面積が増加することによって従来の材料とは異なる物理化学的特性や形状を持ち、場合によっては粒子径が生体内高分子に近いこと、高い表面活性のために凝集しやすいことで生体内での挙動が変わることが予想される。表面積の増加は、細胞への接触頻度増加につながり、結果的に炎症強度が増すことが考えられる。実際に、2 週間試験での肺の炎症面積は、長さの短い分画である FT 曝露の場合に炎症面積の割合が他の 2 分画より高かった。

#### E. 結論

平均長が 2.6  $\mu\text{m}$  以上の MWCNT 繊維は、炎症、肺胞間質の線維化、肺胞上皮細胞の過形成を含む肺障害性がある。肺内投与後 1 年経過後も繊維は肺内および胸郭に存在した。MWCNT の曝露によりタンパク発現が誘導されるマクロファージに関連する遺伝子 (Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4) がある。MWCNT と腫瘍性病変との関連は 104 週間試験 (現在経過中) の結果を考慮する必要がある。

## F. 健康危機情報

なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

吉岡智史, 西村一彦, 高村岳樹, 酒々井眞澄, 津田洋幸, 板橋豊. キラル高速液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法によるグリシドール脂肪酸エステルの光学異性体分析. 分析化学 61: 783-790, 2012.

Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *Oncol Rep*, in press.

Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis* 51: 268-74, 2013.

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, in press.

Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, in press.

Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol* 7: 14-28, 2012.

Xu J, Futakuchi M, Alexander DA, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Food Chem Toxicol*, in press.

Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H. Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci* 103: 2045-50, 2012.

Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H. Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem Cell Biol* 90: 279-306, 2012.

Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Sumida K, Deguchi Y, Sukata T, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Tsuda H. Circulating MicroRNAs in Serum of Human K-ras Oncogene Transgenic Rats With Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Pancreas* 41: 1013-8, 2012.

Sagawa Y, Futakuchi M, Xu J, Fukamachi K, Sakai Y, Ikarashi Y, Nishimura T, Suzui M, Tsuda H, Morita A. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *J Toxicol Sci* 37: 317-27, 2012.

### 2. 学会発表

M. Suzui, T. Numano, M. Futakuchi, K. Fukamachi. Evaluation of carcinogenic effect of multiwall carbon

nanotubes on the rat lung at 2 and 52 weeks after pulmonary instillation. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.

T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, F. Furukawa, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.

柴田耕治、辻厚至、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. Kras トランスジェニックラット腫がんモデルにおける画像診断の試み. 個体レベルのがん研究による相乗効果; 琵琶湖: 2013 年 2 月 7 日

酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの肺ばく露 2 週間および 52 週間経過後の影響. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013 年 1 月 31 日

二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノ材料の吸入暴露後、長時間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013 年 1 月 31 日

深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013 年 1 月 31 日

沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、酒々井眞澄、津田洋幸. アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタニウムの肺組織および培養マクロファージへの影響. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 19 日

池永周平、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. カーボンナノチューブのラット肺組織、細胞増殖、遺伝子発現の影響. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 19 日

坂井勇斗、深町勝巳、二口充、林秀敏、酒々井眞澄. マウス乳がん細胞株を用いた pseudokinase TRB3 の機能解析. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 20 日

深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012 年 9 月 20 日

酒々井眞澄、池永周平、深町勝巳、二口充、徐結苟、津田洋幸. カーボンナノ材料の肺障害性の検討. 第 27 回発癌病理研究会; 修善寺: 2012 年 8 月 28 日

酒々井眞澄、徐結苟、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 長さの異なる多層カーボンナノチューブの肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 17 日

二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノサイズカーボンブラッグの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 18 日

沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、清水秀夫、古川文夫、酒々井眞澄、津田洋幸. アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタニウムの肺組織及び培養マクロファージへの影響—ルチル型との比較検討—. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012 年 7 月 18 日

深町勝巳、徐結苟、二口充、橋爪直樹、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. フラーレンの肺内噴霧による肺発がんプロモーション作用の



検討. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012  
年 7 月 18 日

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし。

2. 実用新案登録

なし。

3. その他

なし。

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノ材料の噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる  
肺組織の検索

分担研究者 二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 准教授  
研究協力者 吉本恵理 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 技術職員

### 研究要旨

アスベストによる健康被害は、曝露後長期間を経て発生することから、ナノ材料の吸入曝露による健康被害も同様に長期間を経て発生するのではと危惧されている。我々は、アスベストと構造の類似した繊維状ナノ材料の噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクを検索する目的で、噴霧直後および長期間経過した時点のそれぞれにおいて、肺における炎症反応、誘導されたマクロファージの数およびそのタイプの変化を検索した。日機装製単層および多層カーボンナノチューブ（SWCNT-N, MWCNT-N）、三井製多層カーボンナノチューブ（MWCNT-M）およびアスベストであるクロシドライト（CRO）を、250ug/ml の濃度で生理食塩水/0.05%Tween20 に懸濁し、10 週齢の雌 SD ラットに肺内噴霧ゾンドを用いて 1 回あたり 0.5ml 噴霧した。9 日間に合計 5 回噴霧し、最終噴霧から 6 時間後および 30 日後に屠殺剖検し肺を組織学的に検索した。噴霧直後の肺組織では、いずれの群でも多数のマクロファージと比較的強い炎症を伴う像が観察されたが、噴霧後 30 日経過すると炎症性変化はほとんど観察されなかった。肺野に誘導された CD68 陽性マクロファージの数は、いずれの噴霧群でも曝露後 30 日経過した時点では曝露直後の 40%-60%にまで減少した。M2 型マクロファージである CD204 陽性マクロファージの数は、いずれの噴霧群でも噴霧直後では多数誘導されていたが、噴霧後 30 日経過した時点では対照群のレベルにまで減少した。CRO 群のみ、噴霧直後に IL-1 $\beta$  陽性マクロファージが多数観察されたが、30 日経過した時点ではほとんど観察されなかった。これらの結果から、曝露後長期間経過した時点では噴霧直後に比べてマクロファージの反応は大きく異なり、曝露直後のリスク評価のみならず曝露後長期間経過した時点でのリスク評価の必要性が示唆された。

#### A. 研究目的

ナノ材料であるカーボンナノチューブ(CNT)は、ポストシリコンの半導体の素材として期待され、軽量、高強度でかつしなやかな弾性力を持ち、幅

広く用いられている。一方 CNT にはその形態がアスベストと酷似しているものがあることから、アスベストと同様に肺がん、肺線維症、中皮腫を発症するのではないかと危惧されている。我々は、

経気管肺内噴霧法を用いて、肺内に噴霧投与された二酸化チタニウムはマクロファージに貪食され、このマクロファージから分泌されたケモカインの MIP1 $\alpha$  が肺胞上皮細胞の増殖を促進させることが、肺発がんプロモーション作用機構に関与することを明らかにした。さらに、繊維状ナノ材料である日機装製単層 CNT (SWCNT)、日機装製多層 CNT(MWCNT-N)および三井製多層 CNT (MWCNT-M) を肺内に噴霧すると、いずれもアスベストであるクロシドライト (CRO) と同様に肺胞マクロファージに貪食されること、これらの繊維状ナノ材料を貪食したマクロファージはサイトカインなどの因子を分泌し肺胞上皮の増殖を促進すること、および増殖促進作用に関与する因子は、繊維状ナノ材料の種類によって異なることを明らかにした。

アスベストを吸入曝露して発生する肺がん、中皮腫は、曝露後 20 年以上経過した後に発症することがほとんどである。これまでに行われたナノ材料の噴霧曝露による肺発がんリスクとその機序の検索では、曝露直後に肺を用いて検索しており、組織学的に強い炎症反応と多数のマクロファージが誘導されている。アスベストと構造の類似した繊維状ナノ材料の吸入曝露のリスクにおいてもアスベストと同様に、曝露後長期間を経て健康被害が発生するのではと危惧されている。我々は、異物の曝露後、長期間経過して発生する肺がんにおいても、周囲の炎症反応が消退しても、マクロファージが関与する発がん促進機構が維持され、肺発がん重要な役割を果たすと考えた。

そこで本年度は、噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクを検索する目的で、1) 噴霧直後および2) 噴霧後 30 日経過した時点のそれぞれにおいて、a) 肺における炎症反応の程度を病理組織学的に評価し、b) 肺野に誘導されたマクロファージの数をマクロファージのマーカーである CD68 染色により検索した。また 3) 発がんに関与する報告のある M2 型マクロファージがどの程度誘導されているかを CD204 および CD163 染色を用いて検索した。さらに 4) CRO 噴霧群で発現が上昇した

IL-1 $\beta$  に着目し、免疫染色によって IL-1 $\beta$  を産生するマクロファージの数が時間の経過しても維持されるかどうかを検索した。

## B. 研究方法

1) 被研物質の準備：日機装製単層および多層カーボンナノチューブ (SWCNT-N, MWCNT-N)、三井製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-M) およびアスベストであるクロシドライト (CRO) を 250 $\mu$ g/ml の濃度で生理食塩水/0.05%Tween20 に懸濁した。いずれの懸濁液もオートクレーブ滅菌後、使用 20 分前まで超音波処理を行い、分散状態を維持した。

2) 肺内噴霧／実験プロトコール：イソフルレン浅麻酔下で Micro-sprayer を 10 週齢の雌 SD ラットの気管内に挿入し、1 回あたり 0.5ml 噴霧した。9 日間に合計 5 回噴霧し、最終噴霧から 6 時間後および 30 日後に屠殺剖検した。

3) 肺組織の採取：肺を 4%パラフォルム固定後組織標本を作成し、炎症反応の程度および被検物質がマクロファージに取り込まれているか病理組織学的に検討した。

4) 異物を貪食したマクロファージのタイプの同定：肺組織標本を用い、CD68(マクロファージに共通のマーカー)、CD163, CD204 (いずれも腫瘍促進作用に関与する M2 型マーカー) の免疫染色を行い、どのタイプのマクロファージがどの割合で誘導されているのかを検索した。さらに、CRO を貪食したマクロファージが分泌することが知られている IL1- $\beta$  の免疫染色を行い、IL-1 $\beta$  の分泌が噴霧後 30 日経過しても維持されるか検索した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターで行った。実験計画書は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った(H22-M19)。

## C. 研究結果

## 1) 噴霧直後

1 a) 炎症の程度：噴霧直後の肺組織では、いずれの群でも噴霧したナノ材料を貪食したマクロファージが多数観察され、好中球およびリンパ球浸潤を伴う線維化巣も観察された。

1b) CD68 陽性マクロファージの数：肺野に観察された CD68 陽性マクロファージの数 (個/cm<sup>2</sup>) は、VEH 群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ平均 45, 253 個, 272 個, 316 個および 266 個のマクロファージが観察され VEH 群に比べ有意に増加していた。

1c) CD204/CD163 陽性マクロファージの数：VEH 群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ平均 47, 86, 94, 98 および 96 個で、肺野に誘導されたマクロファージのうち CD204 陽性となるのは 23-49%であった。また CD163 陽性となったマクロファージの数は少なく、いずれの群でも 5%以下であった。

1d) IL-1 $\beta$  陽性マクロファージの数：CRO 噴霧群では 79 個/cm<sup>2</sup> 観察され、CRO 噴霧群では肺野に誘導されたマクロファージのうち 30%が IL-1 $\beta$  を分泌していることが明らかとなった。この他の噴霧群では、1.6~7.3 個と IL1 $\beta$  を分泌するマクロファージはほとんど観察されなかった。

## 2) 噴霧後 30 日経過した時点

2 a) 炎症の程度：噴霧後 30 日経過すると、SWCNT-N および MWCNT-N では軽度の異物反応が遷延していたが、他の噴霧群ではナノ材料を貪食したマクロファージが散見されたのみで炎症性変化はほとんど観察されなかった。

2 b) CD68 陽性マクロファージの数：VEH 群、SWCNT-N 群、MWCNT-N 群、MWCNT-M 群および CRO 群では、それぞれ 68 個, 153 個, 155 個, 129 個および 96 個で、それぞれの群において噴霧直後に観察されたマクロファージの数を 100%とすると、噴霧後 30 日経過時点で観察されたマクロファージの数は 36%-60%と、有意に減少していた。

2c) CD204/CD163 陽性マクロファージの数：噴霧後 30 日経過した時点で観察されたマクロファ

ージのうち CD204 陽性となるのは 30-36%で、その数は VEH 群と同じ程度であった。また CD163 陽性マクロファージはほとんど観察されなかった。

2d) IL1 $\beta$  陽性マクロファージの数：IL1 $\beta$  を分泌しているマクロファージの数は CRO 噴霧群における 2.2 個であり、噴霧後 30 日経過した時点では、いずれの噴霧群でもほとんど観察されなかった。

3) 噴霧直後と噴霧後 30 日経過した時点の比較  
噴霧直後では、いずれの群でも肺野にマクロファージが誘導され炎症像も散見されたが、30 日経過すると炎症は消退し、マクロファージの数も 40%-60%に減少していた。腫瘍促進作用が知られる CD204 陽性マクロファージは、噴霧直後にいずれの噴霧群でも多数誘導されたが、30 日経過するとその数は対照群と同じ程度にまで減少した。CD163 陽性マクロファージは誘導されなかった。クロシドライトを貪食したマクロファージは、噴霧直後に IL-1 $\beta$  を分泌していたが 30 日経過すると分泌像はほとんど観察できなかった。

## D. 考察

肺に到達した異物は様々な炎症細胞浸潤を誘導する。このうち異物を貪食する肺胞マクロファージはその炎症反応を制御しており、異物の分解と共に炎症反応は消退する。異物を分解できないマクロファージには apoptosis が誘導されるが、残った異物は周囲に誘導されたマクロファージにより再び貪食される。我々の検索により、肺内噴霧直後に誘導されたマクロファージの数は、いずれのナノ材料を噴霧した群においても対照群に比べ有意に増加していた。実験前には、ナノ材料はマクロファージが分解するのは困難であるとされているために、噴霧後 30 日経過した時点ではマクロファージは肺野に留まり炎症も持続されると予想していた。しかし結果は、いずれの肺内噴霧群でも炎症が消退することが明らかとなった。本研究の結果から、噴霧直後に誘導され異物を貪食したマクロファージは、噴霧後長期間を経過すると、誘導/Apoptosis が繰り返し起こり、