

平成27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)
分担研究報告書

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

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

分担研究者	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	山田 茜	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	
	神藤秀基	名古屋市立大学薬学部薬学研究科	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	助教
	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	准教授

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および発ガン機構解明にあたり、被検物曝露のごく初期に起こる直接的な気道上皮繊毛細胞の細胞障害性とその機構の解明を目指した。気道上皮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の機能低下は、異物排泄の機能低下に直結する。本研究では、気道上皮繊毛運動による異物排泄機能を評価する簡便な気道クリアランス測定法を確立することを目指した。さらに、その測定法を活用して、気道クリアランスにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の影響について解析した。蛍光シリカビーズを用いて気道クリアランスを測定したところ、気管および肺において時間依存的な蛍光シリカビーズの排泄が認められた。MWCNT 吸入モデル動物では、気管クリアランスは低下する傾向にあった。以上の結果は、蛍光シリカビーズを用いた簡便な気道クリアランス評価系が構築できたことを示している。この評価系を用いて、MWCNT は気道上皮繊毛細胞の機能障害を引き起こし、また気管および肺内に沈着することで、気道クリアランスを低下させることが明らかとなった。本研究成果は、MWCNT の人体への影響を予測する上で重要な知見になると考えられる。

A. 研究目的

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および発ガン機構を解明するにあたり、被検物曝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評価することが肝要である。本研究では、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注目し、その細胞障害性を定量的に評価可能な簡便な気道クリアランス評価系を確立することを目指した。さらに、その評価系を活用

し、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を気管内噴霧した際の気道クリアランスを評価することも目的とした。

B. 研究方法

1) 蛍光ビーズを用いた気道クリアランスの測定法

蛍光ポリスチレンビーズ(粒子径、 490 ± 1.5 nm: TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards、Invitrogen:最大励起波長、365 nm、505 nm、560 nm、660 nm)または蛍光シリカビーズ(粒子径、3.0 μ m、

500 nm、100 nm : Sicastar-redF、Micromod Partikeltechnologie : 最大励起波長、569 nm) の各 100 μ l を PBS(-)溶液 (100 μ l) に懸濁し、ラットの気管内に噴霧した。噴霧後、2、4、8、24 時間後に気管および肺を摘出し、2 ml の PBS(-)溶液中に浸した。摘出した気管は、内部を洗浄して洗浄液を回収した。肺はダウンス型ホモジナイザーを使用して肺全体をすり潰し、これを洗浄液として肺組織内の蛍光ビーズを回収した。回収した洗浄液に 1 mg/ml コラゲナーゼ (Worthington Biochemical) を加え、37°C で 5 時間インキュベーションした。さらに、20% SDS/50% DMF 溶液に置換し、37°C で 12 時間インキュベーションした。その後、メッシュおよびシリンジフィルターを用いて、組織および細胞の残渣を除去し、遠心機を用いてサンプル量を 100 μ l までスケールダウンし、マルチラベルカウンター (1420 ARVO、Perkin Elmer) を用いて蛍光強度を測定した。ポリスチレンビーズの蛍光強度は、励起波長 485 nm、測定波長 535 nm で測定した。シリカビーズの蛍光強度は、励起波長 560 nm、測定波長 590 nm で測定した。

2) MWCNT 吸入モデル動物の作製法とその気道クリアランス測定法

ラット (雄性、Wistar/ST、8 ~ 10 週齢 : 日本 SLC) に MWCNT-L (250 ppm : 昭和電工)、MWCNT-S (250 ppm : 昭和電工)、PF68 (0.5%、溶媒対照群) を含有する生理食塩水 (0.3 ml) をそれぞれ初回投与した。3 日後と 6 日後にも噴霧し、MWCNT 吸入モデル動物とした。噴霧開始から 7 日目に実験に使用した。蛍光シリカビーズを気管内に噴霧した 2 時間後に気管および肺を摘出して蛍光シリカビーズを上述した方法で回収し、その蛍光強度を測定した。

(倫理面への配慮)

動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に基づき適正に行った。本実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会承認済である (承認番号 : H24-P-13)。

C. 研究結果

1) 気道クリアランス評価系に適した蛍光ビーズ素材

の検討

以前までに報告した気道クリアランス評価系では、多波長励起・蛍光の特性を有するポリスチレン製の蛍光ビーズ (TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards、Invitrogen : 最大励起波長、365 nm、505 nm、560 nm、660 nm) を使用していた。しかし、その回収率が非常に低かった (3 ~ 24%)。これは、組織洗浄液から蛍光ビーズを回収する際の遠心分離において、十分に回収できていなかったためだと考えられた。そこで、蛍光ポリスチレンビーズ (1 g/ccm) よりも比重が大きい蛍光シリカビーズ (1.8 ~ 2.0 g/ccm) を用いて、同様の実験を行った。その結果、蛍光ビーズの回収率が飛躍的に改善し (70 ~ 91%)、その蛍光強度は 4 ~ 23 倍に増大した。使用した蛍光シリカビーズ (Sicastar-redF、Micromod Partikeltechnologie : 最大励起波長、569 nm) の励起・蛍光波長ともに単波長だが、気道クリアランス評価系の構築に関しては特段の問題はないと考えられる。

2) 気道クリアランス評価系の構築

ラットに粒子径の異なる 3 種類の蛍光シリカビーズ (粒子径 : 3.0 μ m、500 nm、100 nm) を気管内噴霧した。蛍光シリカビーズの粒子径は、体外から侵入する異物の代表例として、花粉、タバコの煙に含まれる粒子、ウイルスなど想定して選択した。気管内噴霧し、2 ~ 24 時間後の気管および肺の洗浄液の蛍光強度を測定した。蛍光ビーズは、気管では時間依存的に体外へと排泄された (24 時間後の排泄率 : 約 80%)。肺でも時間依存的に排泄されたが、その速度は気管と比較するとかかなり遅く、24 時間後でも約 50% 程度の蛍光強度を示した。

3) MWCNT の気道クリアランスに対する影響

MWCNT-L、MWCNT-S、PF68 (溶媒対照群) をそれぞれ投与したラット群に蛍光シリカビーズを気管内噴霧し、2 時間後の気道クリアランスについて解析した。気管では、MWCNT 群において、蛍光強度が増加 (1.3 ~ 3 倍)、すなわち異物排泄率が低下する傾向にあった。一方、肺においては、MWCNT 群の蛍光強度は有意に減少した (0.2 ~ 0.7 倍)。また、MWCNT-L と MWCNT-S では、気道クリアランスに対する影響の程度が一部異なっていた。

D. 考察

従来使用していた蛍光ポリスチレンビーズを蛍光シリカビーズに変更することによって、より正確で感度の高い気道スクリーニング系を構築することができた。さらに、構築した気道クリアランス評価系を用いて、気管内噴霧した蛍光シリカビーズの気管および肺における排泄の経時変化を示すことができた。気管では蛍光シリカビーズ噴霧後、数時間以内に殆どの蛍光ビーズが組織内より排泄された。一方、気管と比較して肺での排泄速度は遅く、蛍光シリカビーズ噴霧 24 時間後でも、蛍光シリカビーズの半数程度が肺組織内に貯留したままだった。これは、蛍光ビーズが肺胞マクロファージに貪食された後に気管支終末へと輸送される、また排泄されなかった蛍光ビーズは肺胞壁などに沈着して貯留するためだと推測される。

MWCNT 吸入モデル動物において、蛍光シリカビーズに対する気道クリアランスを測定した。その結果、MWCNT 吸入モデルラットの気管クリアランスは低下していた。これは、噴霧した MWCNT によって気道上皮に炎症が生じるためだと考えられる。一方、MWCNT 吸入モデルラットの肺クリアランスは増加しているような結果が得られたが、炎症により細気管支が狭窄し、蛍光ビーズが肺の深部まで到達しなかったためではないかと推測される。また、MWCNT の形状(MWCNT-L は針状の形態、MWCNT-S は綿飴状の凝集体)によって気道クリアランスに対する影響の程度が一部異なっていたが、形状と気道クリアランスに対する影響の相関関係については今後の検討課題である。

E. 結論

MWCNT は既に様々な分野で使用されており、今後さらにその使用量および応用分野は拡大されていくと考えられている。しかし、その形状からアスベスト様の症状を起こすことが報告されている。肺組織への投与では炎症や酸化ストレスなどを引き起こし、腹腔内投与などにより中皮腫が生じ、マクロファージへ

の毒性も多数報告されている。そのため、本研究では蛍光シリカビーズを用いた簡便な気道クリアランス評価系を確立し、MWCNT が気道クリアランスにおよぼす影響を評価した。MWCNT は気道上皮繊毛細胞の機能障害や気管および肺組織内に沈着することによって、気道クリアランスを低下させることが分かった。気道クリアランスの低下は、さらに侵入した異物によるさらなる炎症の促進や感染症の誘発につながると考えられる。本研究成果は、MWCNT の使用方法や人体への影響を予測する上で重要な知見と考えられる。

F. 健康危機情報

特にありません。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

山田茜, 大羽輝弥, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動制御に対する Cl⁻チャネル活性の寄与. 第 89 回日本薬理学会年会, 2016 年 3 月 9 日(横浜).

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。