

平成28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:カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リスクの  
新規高効率評価手法の開発

分担研究課題名:カーボンナノチューブ吸入暴露による気道クリアランスと  
肺胞マクロファージへの影響

分担研究者	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
研究協力者	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	
	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	
	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
	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

## 研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器に対する急性の細胞障害性を明らかにするため、気道および肺での異物排除機構の中核を担う気道上皮繊毛細胞と肺胞マクロファージに注目した。まず、蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系において、MWCNT 吸入暴露による異物排除機能への影響を解析した。気管クリアランスは、MWCNT 吸入暴露群でも顕著な低下は認められなかった。また、MWCNT 吸入暴露により細気管支が炎症して閉塞するため、肺への異物侵入が少なかった。次に、肺胞マクロファージに対するMWCNTの細胞障害性について解析した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は有意に減少した。一方、MWCNT-Sの肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-Lと比較して弱いことが分かった。MWCNT の大きさや形状が、呼吸器系細胞の障害性を決定する要因であることが示唆された。以上より、MWCNT 吸入暴露による気道上皮繊毛運動や肺胞マクロファージの機能障害は、さらに吸入した異物による炎症の促進や感染症の原因になることが予想される。

## 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は異物として排泄されにくいいため、長期的に気道や肺などの呼吸器官に貯留し、組織障害や発がんを引き起こす。そのため、カーボンナノチューブ暴露の初期における直接的な呼吸器細胞障害を解析することは、その病態分子機構の解明につながると考えられる。これまでに我々は、異物の口腔側への輸送を直接的に担う気道上皮繊毛細胞に着目し、その細胞障害性を定量的に評価できる簡便な気道クリアランス評価系を考案した。本研究では、その気道クリアランス評価系の定量性を確立し、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評価法として活用した。さらに、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージにも注目して、肺胞マクロファージに対するMWCNTの急性作用および細胞障害性を解析した。

## B. 研究方法

1) in vivo 気道クリアランスの測定

粒子径が 3.0  $\mu\text{m}$ 、500 nm、100 nm の蛍光シリカビーズ(Sicstar-redF、Micromod Partikeltechnologie、最大励起波長 569 nm)の各 100  $\mu\text{l}$  を PBS(-)溶液(100  $\mu\text{l}$ )に懸濁し、ラットの気管内に噴霧した。その0、

2、4、8、24 時間後に気管と肺を摘出した。摘出した気管は、内部を洗浄して洗浄液を回収した。肺は、ホモジナイズし、これを洗浄液として回収した。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 時間処理した。次に、20% SDS/50% DMF 溶液に置換し、37°C で 12 時間処理した。その後、メッシュとシリンジフィルターを用いて、組織や細胞の残渣を除去し、遠心機を用いてサンプル量を 100  $\mu$ 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 (励起波長 560 nm、測定波長 590 nm)。

### 2) MWCNT 吸入モデル動物の作製

ラット (雄性、Wistar/ST、8~10 週齢、日本 SLC) に MWCNT-L (直径 150 nm、長さ 10  $\mu$ m、250 ppm、昭和電工)、MWCNT-S (直径 15 nm、長さ 3  $\mu$ m、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) をそれぞれ初回噴霧した。3 日後と 6 日後にも噴霧し、MWCNT 吸入モデル動物とした。カーボンナノチューブの噴霧開始から 7 日目に蛍光ビーズを気管内に噴霧した。その 0、2 時間後に気管と肺を摘出して、蛍光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。

### 3) 肺胞マクロファージの生存率測定

ラットから気管と肺を全摘出し、気管からカニユーレを挿入して PBS(-) を注入し、肺洗浄液とした。肺洗浄液を 4°C、1000 rpm、5 分間遠心して上清を除き、肺胞マクロファージを得た。肺胞マクロファージは、RPMI 1640 培地で 24 時間培養後、10000 細胞/ウェルで 96 穴プレートに播種した。次に、MWCNT-S または MWCNT-L を 10  $\mu$ g/ml 添加し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を MTT 法で測定した。対照群には溶媒 (0.5% PF68 含有生理食塩水) のみを添加した。また、細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイは、Cytotoxic LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、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で承認済である (承認番号: H24-P-13)。

## C. 研究結果

### 1) 簡便な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  $\mu$ m、500 nm、100 nm) を気管内噴霧した。気管内噴霧 0~24 時間後における気管および肺洗浄液の蛍光強度を測定した。気管では、2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 69%、500 nm ビーズが 85%、100 nm ビーズが 94% 排泄された。24 時間後では、3.0  $\mu$ m ビーズが 95%、500 nm ビーズが 97%、100 nm ビーズが 97% 排泄された。一方、肺では、2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 13%、100 nm ビーズが 62% の排泄率だった。24 時間後でも、3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 63%、100 nm ビーズが 67% の排泄率だった。

### 2) MWCNT 吸入暴露による気道クリアランスへの影響

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ビーズを気管内噴霧し、0 および 2 時間後の気道クリアランスを測定した。気管内噴霧直後に気管内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、その粒子径に関わらず同程度だった。2 時間後には、蛍光ビーズの 80% 以上が排泄され、MWCNT-L や MWCNT-S 吸入暴露群の気管クリアランスも溶媒群と比較して顕著な低下は認められなかった。一方、気管内噴霧直後に肺内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、溶媒群と比較して、MWCNT-L および MWCNT-S 群ともに約 50% 低下していた。

### 3) MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージへの影響

ラットから単離した肺胞マクロファージに MWCNT-L、MWCNT-S、PF68 (溶媒対照群) をそれぞれ暴露し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を

MTT 法で測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は、2 時間後から時間依存的に減少した(2 時間後 52%、1 日後 80%、7 日後 84%の減少)。一方、MWCNT-S も肺胞マクロファージに対して毒性を示した(2 時間後 24%、1 日後 49%、7 日後 8%の減少)が、MWCNT-L と比較して、その効果は弱かった。また、同様の結果が LDH アッセイによっても認められた。

#### D. 考察

気道クリアランスは、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や喘息などの気道炎症時に低下することが知られている。しかし、これまで報告されている気道クリアランス評価系は、放射性物質や X 線撮影などの専門的な技術が要求される手法が主だった。これまでに我々は、シリカ製の蛍光ビーズを使用し、より簡便な気道クリアランス評価系を考案した。本研究では、まず、その気道クリアランス評価系の定量性を確立することを目指した。気管では、蛍光ビーズの噴霧 2 時間後に 70~90%の蛍光ビーズが排泄され、24 時間後に 95%以上が排泄されたことから、気管に侵入した蛍光ビーズは、主に咳嗽により速やかにクリアランスされることが示された。一方、肺では、24 時間が経過しても、30%以上の蛍光ビーズが貯留していたことから、肺に侵入した異物のクリアランスには、咳嗽のみでは不十分であり、さらに長期間を要し、肺胞マクロファージによる貪食や輸送が必要であることが示唆された。

本研究では、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、ウイルスなどを想定して、それぞれ 3.0  $\mu\text{m}$ 、500 nm、100 nm の粒子径の蛍光ビーズを使用した。気管および肺ともに粒子径が小さい蛍光ビーズの方が早期にクリアランスされた。特に肺では、その傾向が顕著だった。すなわち、肺において、3.0  $\mu\text{m}$  ビーズは噴霧 24 時間後も殆ど排泄されなかったが、500 nm ビーズは 60%、100 nm ビーズは 70%が 24 時間以内にクリアランスされた。

MWCNT の気管内噴霧は、気道上皮細胞に炎症や障害を引き起こすことが知られている。我々は以前に、MWCNT が気道上皮繊毛細胞を脱落させることや運動性を阻害することを報告した。しかし、気管クリ

アランスは、MWCNT 吸入暴露群でも顕著な低下は認められなかった。その原因として、気管クリアランスが主に咳嗽により行われ、上皮細胞による排泄輸送は補助的であることが推測される。一方、MWCNT 群で肺内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、溶媒群の半分程度だった。MWCNT 吸入暴露群では、肺内に肉芽形成などの炎症や障害が生じた結果、細気管支が狭窄または閉塞するため、蛍光ビーズが肺の奥まで侵入しなかったものと考えられる。

蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系構築の過程で、肺に侵入した異物のクリアランスには、肺胞マクロファージによる貪食や輸送が必要であることが示唆された。したがって、肺胞マクロファージに対するカーボンナノチューブの毒性や障害性を評価し、肺クリアランスの指標とすることを検討した。MTT 法の結果、MWCNT-L は肺胞マクロファージの生存率を顕著に抑制することが示された。一方、MWCNT-S の肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-L と比較して弱かった。同様の結果が、細胞障害性の指標である LDH アッセイによっても認められた。したがって、MWCNT の大きさや形状は、呼吸器系細胞の障害性およびその程度を決定する因子であることが示唆された。

#### E. 結論

蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系を構築し、気管と肺における蛍光ビーズの時間と粒子径に依存するクリアランスを評価することができた。したがって、簡便な気道クリアランス評価系の基礎が構築できたと考えられる。また、MTT 法と LDH アッセイの結果、MWCNT の形状が、呼吸器系細胞の障害性を決定する要因であることが分かった。以上より、MWCNT 吸入暴露による気道上皮繊毛運動や肺胞マクロファージの機能障害は、MWCNT の気管内および肺内の沈着を維持することが予想される。この結果、さらに吸入した異物により、さらなる炎症の促進や感染症の発症が起ると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

## 2. 学会発表

- 1) 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス気管支平滑筋における  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネル修飾サブユニット $\gamma 1$  の生理機能解明。生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 25-26 日、仙台。
- 2) 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2ポアドメイン  $\text{K}^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 17 日、名古屋。
- 3) 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。気管支平滑筋細胞における  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  チャネル $\gamma 1$  サブユニットの生理機能解明。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎。
- 4) 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2ポアドメイン  $\text{K}^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎。

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

- 1) 今泉祐治、山村寿男、鈴木良明、川崎桂輔、成田寛。イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用。特願 2016-214685、2016 年 11 月 1 日。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。