

平成29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	
	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)の呼吸器に対する毒性および発がん機構を解明する上で、被検物暴露の初期における直接的な細胞障害性を明らかにすることは重要である。そのため、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、機能解析を進めている。本年度は、ラットから単離した肺胞マクロファージを用いて、カーボンナノチューブの急性的な細胞障害による細胞死の様式を解析した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は時間依存的に減少した。一方、MWCNT-Sの肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-L と比較して弱かった。MWCNT の大きさや形状が、呼吸器系細胞の障害性に影響することが分かった。ただし、MWCNT 暴露による肺胞マクロファージの細胞死は、アポトーシスによらないことが推測された。以上より、MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージの機能障害は、アポトーシス以外の細胞死の様式が関与することが示唆された。

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。

本研究では、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージに注目して、機能解析を進めている。本年度は、ラットから単離した肺胞マクロファージを用いて、MWCNT の急性的な細胞障害による細胞死の様式とその分子メカニズムを解析した。

B. 研究方法

1) 肺胞マクロファージの生存率測定

ラット(雄性、Wistar/ST、8~12週齢、日本SLC)から気管と肺を摘出し、気管からカニューレを挿入して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。単離した肺胞マクロファージを RPMI 1640 培地で 24 時間培養後、10000 細胞/ウェルになるように 96 穴プレートに播種した。次に、カーボンナノチューブである MWCNT-S (直径 15 nm、長さ 3 μ m、250 ppm、昭和電工) または MWCNT-L (直径 150 nm、長さ 10 μ m、250 ppm、昭和電工) を 10 μ g/ml 添加し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を MTT 法 (Sigma-Aldrich) を用いて測定した。対照群には、溶媒である 0.5% PF68 を含有する生理食塩水を添加した。

2) 肺胞マクロファージの細胞障害性解析

細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイは、MWCNT を添加した 2 時間、1 日、7 日後に Cytotoxic LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて行った。

3) 肺胞マクロファージのアポトーシス解析

アポトーシスを検出するカスパーゼ 3/7 アッセイは、MWCNT を添加した 2 時間、1 日、7 日後に Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) 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) MWCNT 暴露による肺胞マクロファージの生存率低下

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 (0 h, 0.83 ± 0.11 , $n=12$, $p>0.05$ vs. 1.00 ± 0.12 of vehicle, $n=12$; 2 h, 0.53 ± 0.12 , $n=12$, $p>0.05$ vs. 0.78 ± 0.17 , $n=12$; 1 d, 0.29 ± 0.08 , $n=12$,

$p<0.05$ vs. 0.75 ± 0.16 , $n=12$; 7 d, 0.53 ± 0.11 , $n=13$, $p<0.05$ vs. 0.88 ± 0.08 , $n=13$)。一方、MWCNT-S も肺胞マクロファージの生存率を低下させた (0 h, 0.86 ± 0.11 , $n=12$, $p>0.05$ vs. vehicle; 2 h, 0.67 ± 0.17 , $n=12$, $p>0.05$; 1 d, 0.46 ± 0.10 , $n=12$, $p>0.05$; 7 d, 0.50 ± 0.06 , $n=13$, $p<0.05$)。しかし、その効果は、MWCNT-L と比較して弱いことが分かった。

2) MWCNT 暴露による肺胞マクロファージの細胞障害

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 日後の細胞障害性を LDH アッセイで測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージは障害された (2 h, 0.04 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$ vs. 0.03 ± 0.02 of vehicle, $n=4$; 1 d, 0.03 ± 0.02 , $n=4$, $p>0.05$ vs. 0.04 ± 0.02 , $n=4$; 7 d, 0.18 ± 0.01 , $n=4$, $p<0.05$ vs. 0.11 ± 0.01 , $n=4$)。一方、MWCNT-S による肺胞マクロファージへの細胞障害性は高くなかった (2 h, 0.09 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$ vs. vehicle; 1 d, 0.07 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$; 7 d, 0.07 ± 0.02 , $n=4$, $p>0.05$)。

3) MWCNT 暴露による肺胞マクロファージのアポトーシス解析

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 日後の細胞死を観察した。アポトーシス解析には、カスパーゼ 3/7 アッセイを用いた。スタウロスポリンによって誘導されるアポトーシスを陽性対照群とした (100%, $n=3$)。一方、MWCNT-L および MWCNT-S の 7 日間暴露によっては、顕著なアポトーシスは検出されなかった (MWCNT-L, $3.53 \pm 2.62\%$, $n=4$; MWCNT-S, $5.60 \pm 0.44\%$ vs. $2.45 \pm 2.75\%$ of vehicle, $n=4$)。

D. 考察

本年度は、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージに注目し、それ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

標とすることを目指した。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の一つであることが明らかになった。

また、カーボンナノチューブによる肺胞マクロファージの細胞死の様式は、当初アポトーシスであることが推測された。しかし、本研究によるカスパーゼ 3/7 アッセイの結果、その細胞死はアポトーシスによらないことが示唆された。今後、アネキシン V/PI 染色などを行うなど、カーボンナノチューブによる肺胞マクロファージの細胞死の様式については、様々な観点からの検討が必要であると考えられる。

E. 結論

MWCNT が肺胞マクロファージに直接的に細胞障害を与えることが明らかになった。また、その障害の程度は、MWCNT-SよりもMWCNT-Lの方が高いことも分かった。さらに、カーボンナノチューブによる肺胞マクロファージの細胞死には、アポトーシス以外の細胞死の様式が関与していることが示唆された。以上より、MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージの機能障害は、MWCNT の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こればと考えられる。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 鈴木良明、野田さゆり、山村寿男、今泉祐治。
大コンダクタンス Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル新規修

飾サブユニットによる気管支平滑筋機能の制御。第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年 8 月 25 日、福岡。

- 2) 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。気管支平滑筋における γ サブユニットによる BK_{Ca} チャンネル活性制御機構の解明。次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、2017 年 8 月 26 日、京都。
- 3) 前田和輝、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス骨髄マクロファージ機能に対する Kir2.1 の役割。第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 11 月 24 日、大阪。

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。