

ナノ材料ばく露における生体影響解析

三浦伸彦^{*1} 戸谷忠雄^{*1*2} 久保田久代^{*1}
高田礼子^{*3} 篠原也寸志^{*4} 鷹屋光俊^{*4}

ナノ粒子ばく露による生体影響を細胞実験系及び動物実験系にて評価した。細胞実験系では銀ナノ粒子の生体影響解析を行い、銀ナノ粒子はアポトーシスを伴う細胞障害を示すものの、銀イオンほどの毒性は持たないことを確認した。一方、動物実験系では酸化セリウムナノ粒子の生体影響をラットを用いて評価した。酸化セリウム(11 nm 又は 200 nm)の気管内投与により投与14日後に肺組織での炎症反応や肺胞タンパク症が観察され、その程度はサブミクロンサイズの方が強い(11 nm < 200 nm)ことを観察した。電顕レベルでの観察結果もこれらの結果を支持しており、一次粒子サイズのみでは毒性の度合いを評価できないことを示した。

キーワード: 銀ナノ粒子, 酸化セリウム, 炎症反応, 肺胞タンパク症, 泡沫化, マクロファージ

1 はじめに

ナノ材料を大量に扱う職場で働く労働者は、ナノ粒子にばく露する確率が必然的に高まることが予想される。従って労働者がナノ粒子にばく露した場合に、労働者の体が受ける影響を把握する必要がある。そこでナノ粒子が示す生体影響を、細胞実験系及び動物実験系にて検討した。

細胞実験系ではナノ材料として銀ナノ粒子を選択した。銀ナノ粒子は電気・電子材料や光学材料、或いは色材として工業的に広く利用されているナノ材料であり、市場に出回っている350種類以上のナノ材料で最も一般的なものである。しかし銀ナノ粒子が生殖幹細胞や脳、肝臓由来の細胞に強力な毒性を示すという *in vitro* の報告¹⁾が出始め、銀ナノ粒子が示す生体影響を詳細に解析する必要があると考えた。ヒト培養細胞株を用いた検討により、(1) 銀ナノ粒子は明らかな細胞障害を示すこと、(2) その毒性は硝酸銀(銀イオンとして比較)よりも弱いこと、(3) 細胞障害にはアポトーシスが関与していること、(4) ストレス応答性遺伝子の発現変動から酸化ストレスが惹起されている可能性があることを確認し、原著論文として発信した²⁾。

一方、OECDでは14物質の代表的なナノ材料をリストアップし、それらの物理化学的特性や健康影響や環境影響について情報を収集・整備するスポンサーシッププログラムを進めているが、その代表的なナノ材料の一つに酸化セリウムが挙げられている。そこで動物実験系では酸化セリウムの生体影響解析を行った。本項ではその結果を報告する。

酸化セリウムはガラス研磨剤、自動車排ガス浄化触媒、紫外線吸収ガラス添加剤など多様な用途に使用されている。我々はこれまでに、『機能性材料由来の金属微粒子の分析法と生体影響の研究(研究代表者: 鷹屋光俊)』という研究テーマで、動物実験を用いて呼吸器系への影

響を詳細に検討してきた。酸化セリウムの粒子サイズの違いによる呼吸器系への影響を検討した結果、投与用量(質用量)は同じでも粒子サイズの違いによって肺への障害は大きく異なること、肺病変の程度はミクロンサイズではほとんど認められないが、サブミクロンサイズでは顕著で長期間持続することを見出している³⁾。

そこでこれまでの知見を基に、酸化セリウムの超微粒子であるナノ粒子と、サブミクロン粒子による肺傷害を比較検討し、酸化セリウムナノ粒子の有害性の強さを評価した。

2 材料および方法

被験試料としては、超微粒子酸化セリウム(ϕ 11nm 群: Sigma Aldrich 社, 平均粒径 11 nm)と微粒子酸化セリウム(ϕ 200nm 群: 高純度化学研究所, 平均粒径 200 nm)の二種類の酸化セリウムを用い、PBS(-)に懸濁した。

Wistar ラット(10週齢雄)に ϕ 11nm または ϕ 200nm をそれぞれ0.1, 0.3, 1.0, 3.0 mg/ratの投与量で気管内投与した。対照群にはPBS(-)を気管内投与し、それぞれ1群6匹で行った。なお投与直前にソニケーター(Branson 社製)を用いて超音波処理を5分間行い、酸化セリウム粒子を分散させた。

投与14日後に肺右葉から気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取し、また肺右葉の一部を遺伝子解析に用いた。BALF中の浮遊細胞数は自動血球計測装置(Sysmex F-800)により計測した。各種炎症細胞数はサイトスピンを用いて塗抹標本作製後、May-Grunwald Giemsa染色を行い顕微鏡下で計数した。BALF遠心上清の生化学的検索として、総タンパク量(TP)、乳酸脱水素酵素活性(LDH)、アルカリ性ホスファターゼ活性(ALP)及びリン脂質量を測定した。

遺伝子解析は、肺右葉からtotal RNAを抽出して逆転写反応を行ったサンプルを鋳型とし、リアルタイムPCR法(Roche LightCycler 480)により肺線維化指標であるコラーゲン1A1(COL1A1)及び、酸化ストレス指標であるheme oxygenase-1(HO-1)のmRNA量を測定した。

*1 健康障害予防研究グループ

*2 日本バイオアッセイ研究センター

*3 聖マリアンナ医科大学予防医学教室

*4 環境計測管理研究グループ

微細形態学的検索は、肺組織をグルタルアルデヒド・パラフォルムアルデヒドの混合固定液で固定し定法に従い電子顕微鏡標本を作製して、透過型電子顕微鏡 (FEI Tecnai G² spirit および LEM2000) を用いて形態観察を行った。

3 結果と考察

1) 細胞学的・生化学的検索

本検討では酸化セリウムの急性期における生体影響を解析することを目的とし、投与 14 日後に肺右葉から BALF を得、それぞれの酸化セリウム粒子が示す生体影響について、多角的に生化学的検索を行った。表 1 に測定項目をまとめた。

表 1 試料, 対象, 測定指標

試料	対象	測定指標
BALF	炎症反応	好中球数, 白血球数, リンパ球数
		肺障害
	TP (血管透過性)	
	LDH (細胞膜障害)	
	ALP (II 型肺胞上皮活性化)	
	リン脂質 (II 型肺胞上皮活性化)	

BALF 中の細胞数を計測した結果、酸化セリウムのばく露量に依存して総細胞数が増加し、その数は $\phi 11\text{nm}$ 群より $\phi 200\text{nm}$ 群で多いことを観察した。

BALF 中に滲出した細胞群を May-Grunwald Giemsa 染色により分画したところ、マクロファージ数のばく露による増加は観察されなかったものの、好中球で著しい変化が認められ、非ばく露群 (PBS (-) 投与群) で殆ど見出されなかった好中球が酸化セリウムばく露により投与量依存的に増加した (図 1)。さらにその増加は $\phi 11\text{nm}$ 群よりも $\phi 200\text{nm}$ 群の方が大きく、一次粒子サイズの大きさに生体影響が異なることが示唆された。また総白血球数及びリンパ球の割合も好中球と同様に酸化セリウムばく露で増加し、これら血球成分の増加割合も $\phi 11\text{nm}$ 群 < $\phi 200\text{nm}$ 群であった。このことから、ばく露 14 日後においても肺内に酸化セリウム粒子が残存し、主に好中球が異物排除を行っていること、また $\phi 11\text{nm}$

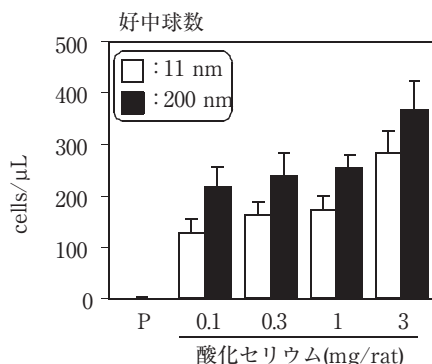


図 1 酸化セリウムばく露による好中球数の増加

群より $\phi 200\text{nm}$ 群において好中球による異物排除作用が旺盛である可能性が考えられる。

次に TP, LDH, ALP 及びリン脂質量について生化学的解析を行った。なお TP は炎症反応による肺胞-毛細血管透過性の亢進の指標, LDH は肺胞細胞膜傷害性指標, ALP は II 型肺胞上皮細胞の傷害指標, そしてリン脂質は II 型肺胞活性化により産生されるサーファクタント量の指標として測定した。その結果、それぞれの測定値は細胞分画の結果と同様、非ばく露群に比べて酸化セリウムばく露群で有意に高いこと、またそれぞれの値は $\phi 11\text{nm}$ 群よりも $\phi 200\text{nm}$ 群の方が有意に高値を示すことを確認した。これらの結果は、(1) 酸化セリウムのばく露により炎症反応が亢進すること、(2) 投与後 14 日が経過しても肺胞内炎症細胞の誘導と細胞障害は継続すること、(3) II 型肺胞上皮細胞の活性が高くサーファクタントの産生が亢進、すなわち肺胞タンパク症が生じていること、(4) 肺胞細胞障害と II 型肺胞上皮細胞の活性化は $\phi 11\text{nm}$ 群より $\phi 200\text{nm}$ 群の方が顕著であることを示している。

2) 遺伝子解析

酸化セリウムが示す生体影響を、数種のストレス応答遺伝子の発現量 (mRNA 量) を指標に検討した。肺右葉から RNA を抽出しリアルタイム PCR 法により *COL1A1* 遺伝子及び *HO-1* 遺伝子の発現量を調べたところ、線維化反応の一つの指標である *COL1A1* の発現量は非ばく露群とばく露群で有意な差を認めなかった。一方、最近労働衛生分野でも酸化ストレス指標⁴⁾として取り入れ始められている *HO-1* 遺伝子の発現量は、非ばく露群に比べて酸化セリウムばく露群で有意に上昇しており、またその程度は“生化学的検索”の項に示した結果と同様、 $\phi 11\text{nm}$ 群 < $\phi 200\text{nm}$ 群であった (図 2)。この結果は酸化セリウムばく露により投与 14 日後でも肺組織で酸化ストレスが惹起されており、その程度は $\phi 200\text{nm}$ 群でより強いことを示している。

3) 微細形態学的検索

酸化セリウムばく露後の BALF 中細胞を観察したとこ

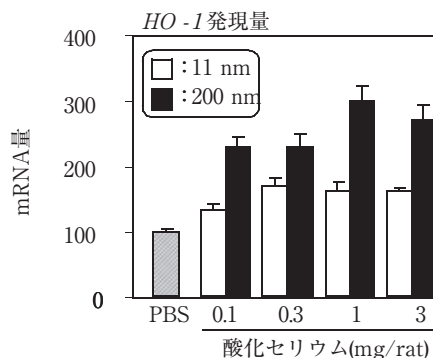


図 2 酸化セリウムばく露による酸化ストレス応答遺伝子 (*HO-1*) の発現上昇
mRNA 量は PBS 投与群を 100% として示した

ろ、好中球は細胞質に少数の小胞を呈する程度の変化を示すだけであったが、マクロファージの著しい泡沫化を認め、その程度は $\phi 11\text{nm}$ 群より $\phi 200\text{nm}$ 群の方がより顕著であった(図3)。また投与された酸化セリウム粒子がマクロファージや好中球に取り込まれた形で残存していることを観察した(図4)。

生化学的解析から肺サーファクタント量が有意に増加することを見出したが、肺サーファクタントはII型肺胞上皮細胞の活性化に伴って産生量が増加する。そこでII型肺胞上皮細胞を観察したところ、ばく露群で細胞数の増加、細胞の大型化、微絨毛の発達および層板小体の増数・大型化が認められ、さらにこの変化は $\phi 11\text{nm}$ 群

よりも $\phi 200\text{nm}$ 群で顕著であった(図5)。

これらの結果から、投与後14日が経過しても肺胞内に酸化セリウム粒子が残存し、マクロファージや好中球による排除が継続していること、及びII型肺胞上皮細胞の活性化が持続していることが考えられる。またその程度が $\phi 11\text{nm}$ 群に比べて $\phi 200\text{nm}$ 群で顕著であることを観察したが、上記生化学的検索及び遺伝子解析の結果を支持するものと思われる。

4 結論および考察

一次粒子サイズの異なる酸化セリウム粒子(11 nm 及び 200 nm) が示す呼吸器系への影響を調べたところ、

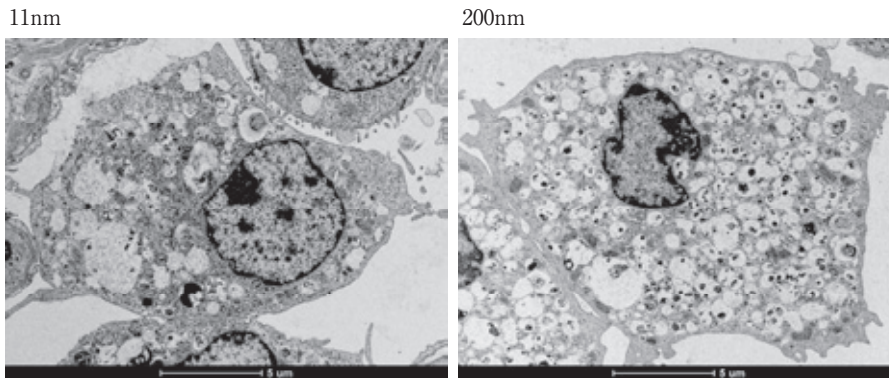


図3 泡沫化したマクロファージ(0.1mg/rat群)
泡沫化は200nm群でより重篤であった

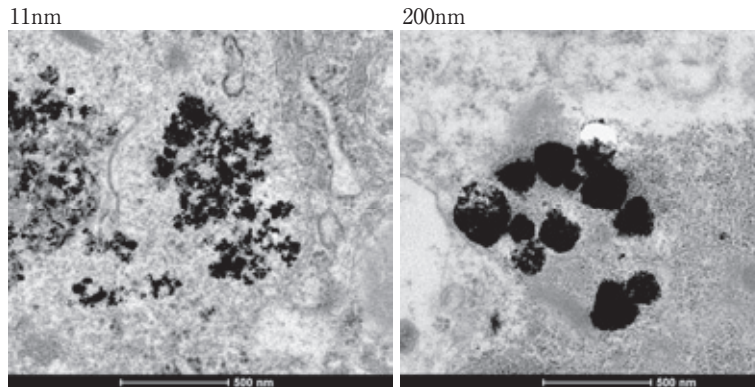


図4 肺胞マクロファージに取り込まれた酸化セリウム粒子(0.1mg/rat群)

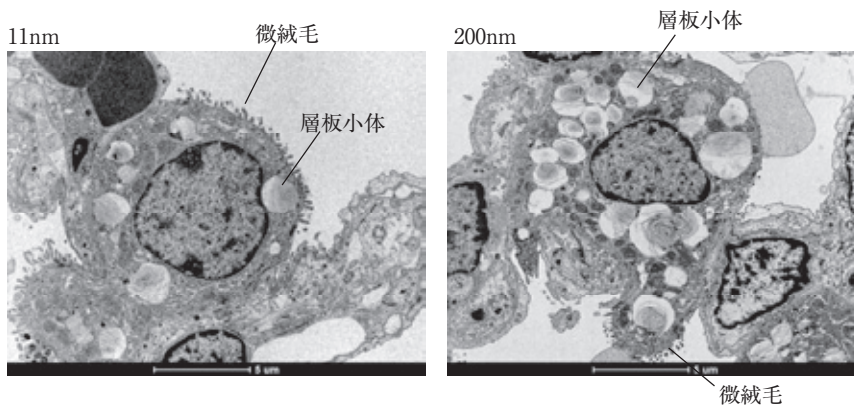


図5 II型肺胞上皮細胞
ばく露群(0.1mg/rat群)では、層板小体が大きく微絨毛もよく発達していた。
200nm群では層板小体の数も多く観察された。

炎症反応性 (BALF 中に滲出した好中球数・白血球数, リンパ球数) や肺障害の指標値 (BLAF 中 TP 値, LDH 値, ALP 値の上昇), さらに酸化ストレス応答遺伝子 (*HO-1*) の発現量上昇程度は, $\phi 11\text{nm}$ 群に比べて $\phi 200\text{nm}$ 群で有意に高いことを見出した. 電顕レベルでの観察はこの現象を支持している.

これらの結果は, 一次粒子サイズの大きさだけで生体影響を考えるのではなく, 検査対象とする物質の化学的特性, 分散状態, 組織内分布など多くのファクターで考慮する必要があることを示している.

5 参考文献

- 1) Braydich-Stolle, L., Hussain, S., Schlager, J. J., Hofmann, M. C. (2005) In vitro cytotoxicity of nanoparticles in mammalian germline stem cells. *Toxicol. Sci.*, **88**, 412-419.
- 2) Miura N, Shinohara Y., (2009) Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun.*, **390**, 733-737.
- 3) Toya T, Takata A, Otaki N, Takaya M, Serita F, Yoshida K, Kohyama N. (2010) Pulmonary toxicity induced by intratracheal instillation of coarse and fine particles of cerium dioxide in male rats. *Ind Health.*, **48**, 3-11.
- 4) Joseph P, He Q, Umbright C (2008) Heme-oxygenase 1 gene expression is a marker for hexavalent chromium-induced stress and toxicity in human dermal fibroblasts. *Toxicol Sci* **103**, 325-334

(平成 22 年 9 月 17 日受理)