

環境ナノ粒子による健康影響、カーボンナノ粒子がグラム陽性菌細胞壁成分による肺の炎症反応に及ぼす影響

山元 昭二

独立行政法人国立環境研究所 環境リスク研究センター

1. はじめに

都市大気中の浮遊粒子状物質 (Suspended Particulate Matter; SPM) の濃度上昇は、呼吸器系疾患や心血管系疾患の罹病率や死亡率の増加と関係することが知られ[1, 2]、特に PM2.5 と呼ばれる 2.5 μm 以下の微小粒子状物質は肺の奥深くまで入りやすいため急性または慢性の健康影響のリスク因子として重要と考えられている。SPM の大気中濃度は固定発生源の近くを別とすれば交通量の多い幹線道路沿いで高値を示すため、その発生源として自動車、特にディーゼル車排ガスからの寄与が高いと考えられている[3]。新車に対する国の排出ガス規制の強化や東京都、神奈川県などのいくつかの自治体ではディーゼル車運行規制も行われており、大都市圏では SPM 濃度の低減化に向けてその対策が進行中である。近年、ナノ粒子と呼ばれる 100 nm 以下の超微小粒子による健康影響問題が注目されてきた。ナノ粒子は、サイズや構造がナノスケール (10 億分の 1 メートル) のため、細胞や組織への透過性が高く、 μm レベルの粒子とは異なる影響を与えるのではないかと懸念されている。一般に、吸入された粒子は鼻腔から肺胞にかけての各部位に慣性、沈降、拡散によって沈着するが、ヒトにおける吸入粒子の沈着モデルでは、肺胞領域での沈着効率は 0.1 μm 以上の粒子で 20% 以下、5~10 nm の粒子で約 20~30% であるのに対して、20 nm 付近の粒子では 50% に達するとされており、それより大きい粒子または小さい粒子に比べて肺胞での沈着効率が高いと予測されている[4]。ディーゼル車排ガス中では、100~300 nm の粒子が重量モードの主分画であるのに対して、個数モードでは 3~30 nm の粒子が多いことが知られているが[5]、幹線道路沿い大気中では 20 nm 付近の粒子が個数分布の 90% 以上を占めており、その健康影響の解明が急がれている。

幹線道路沿いの環境ナノ粒子の組成としては、ディーゼル排気微粒子 (Diesel Exhaust Particles; DEP) や他の燃焼由来微粒子の主要構成成分である元素炭素や有機炭素、無機塩類、金属、水等が含まれると推測され、これらの環境ナノ粒子の肺毒性の作用機序は主に粒子表面の物理化学的性

状に起因する酸化ストレスによると考えられている[6, 7]。特に、粒子中の有機炭素や多環芳香族炭化水素の高い含有量は酸化ストレスの誘導と関連することが報告されている。ナノ粒子の体内動態については、¹³C ラベルしたカーボンブラック (carbon black; CB) ナノ粒子の吸入曝露でナノ粒子の一部は肝臓[8]や大脳、小脳、嗅球等[9]にも移行することが確認されるとともに、嗅球への粒子の移行経路として鼻腔の嗅上皮から嗅神経を通して移行する可能性も示唆されている[9, 10]。CB 粒子や二酸化チタン等の模擬ナノ粒子を用いた *in vivo* もしくは *in vitro* 研究は、同様の化学組成で同じ投与量の場合、ナノ粒子の方が μm レベルの粒子に比べて肺毒性が強くなる結果を示している[11]。このことから、粒子径や表面積の広さ (注 ; 同じ投与量の場合、全体の表面積はナノ粒子の方が大きくなる) がナノ粒子による毒性の強さの主な因子と考えられてきた[12]。しかしながら、これ以外にも、重要な因子として粒子の集合体形成 (aggregation) とその分解のポテンシャル、体内移行ポテンシャル、粒子形状、表面の化学的性質や表面電荷等があげられている。

筆者は、ディーゼル排ガス由来ナノ粒子の健康影響解明のため、現在、ディーゼルエンジンからのナノ粒子をマウスに吸入曝露し、肺における炎症反応への影響について検討を行っているが、本稿では筆者らが以前報告した CB ナノ粒子がグラム陽性菌細胞壁成分による肺の炎症反応に及ぼす影響に関する研究 [13]を中心に環境ナノ粒子の健康影響研究の現状について概説した。

2. CB ナノ粒子の単回気管内投与がグラム陽性菌細胞壁成分による肺の炎症反応に及ぼす影響

本研究では、模擬ナノ粒子として 14 nm 及び 95 nm の二つの粒径の CB 粒子をマウス気管内に単回投与し、粒径の違いが肺の炎症に異なった反応を引き起こすかについて調べるとともに、グラム陽性菌細胞壁成分であるリポテイコ酸 (lipoteichoic acid; LTA, 肺に炎症を惹起することが知られている) を同時に投与し、LTA で誘導される肺の炎症反応への CB 粒子の影響についても検討した。CB 粒子は、環境ナノ粒子の主要構成成分でもある元

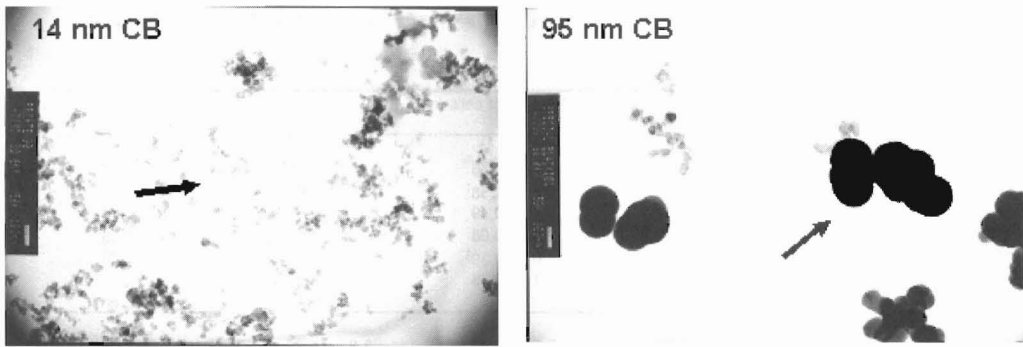


図1. 14 nm 及び 95 nm carbon black 粒子の透過電子顕微鏡像 (古山昭子氏提供)。CB 粒子は 0.05% tween 80 生理食塩水下で超音波破砕機によって分散させた。

表1. 本研究で用いた carbon black ナノ粒子の特性。

Charateristics	Carbon black particle	
	Printex 90	Flammruss 101 (Lamp Black)
Particle size ¹	14 nm	95 nm
Distribution ²	Evenly dispersed	Evenly dispersed
Surface area ¹ (BET-m ² /g)	300 m ² /g	20 m ² /g
Applied mass concentration ³	125 µg/100 µl	125 µg/100 µl
Applied number concentration ³	6.09×10^{13}	8.82×10^{10}
Occupied surface area ³	0.0375 m ²	0.0025 m ²
Particle shape ²	Spherical	Spherical
Surface characteristics ¹	None	None
Surface charge ⁴	Not known	Not known
Degree of aggregration ²	Mostly singlet particle	Mostly singlet particle

¹Based on available information provided by the commercial manufacturer, Degussa, Germany; ²Based on observations of these particles examined by Transmission Electron Microscopy (data not shown) shortly after their supersonic dispersion in solution; ³Experimental values; ⁴Information not available from the commercial manufacturer.

素状炭素から成り、模擬ナノ粒子として最適と考えの比較検討が主であり、100 nm 以下の粒径間で比較した報告は少ない。

動物は8週齢の SPF Jcl BALB/cA 雄マウスを用いた。気管内投与に用いる 14 nm (Printex 90, Degussa) 及び 95 nm (Flammruss 101, Degussa) の CB 粒子は、使用前に粒子中に附着しているかもしれないエンドトキシンや有機物質の除去および酸素の結合を防ぐために純粋窒素ガス下で高温加熱処理 (200°C 120 分間) を行った。使用に際しては、溶媒として 0.05% Tween 80 を加えた生理食塩水を用い、超音波破砕機で CB 粒子を分散させた (図1)。表1にはCB ナノ粒子の特性を示したが、1 g 重量当たりの 14 nm 粒子の表面積は 95 nm 粒子の約 15 倍の大きさであった。肺での炎症反応を

惹起するためのグラム陽性菌細胞壁成分としては、黄色ブドウ球菌由来の LTA を (Sigma-Aldrich) を用いた。

実験群は Vehicle (0.05% Tween 80 生理食塩水) 投与群、14 nm CB 125 µg 投与群、95 nm CB 125 µg 投与群、LTA 10 µg (又は 50 µg) 投与群、LTA+14 nm CB 投与群、LTA+95 nm CB 投与群の6群に分け、各群5匹とした。Vehicle や CB、LTA の気管内投与は、3%ハロタン吸入麻醉下でポリエチレン細管のカニューレを通して 0.1 ml の分量をマウス気管内に注入した。なお、CB 粒子と LTA とのマウス気管内に注入した。なお、CB 粒子と LTA との併用群ではそれらの混合溶液を投与した。4 時間後および 24 時間後にネンプター麻酔下で解剖し、気管支肺胞洗浄 (bronchoalveolar lavage;

表2. Carbon black ナノ粒子および LTA 投与4時間後、24 時間後における気管支肺胞洗浄液中の白血球系細胞数の変化。

		Number of cells ($\times 10^4$ /lung)			
		Total cells	AMs	PMNs	Lymphocytes
4 h	Vehicle	6.7 \pm 0.93	4.7 \pm 0.86	1.5 \pm 0.58	0.5 \pm 0.23
	14 nm CB	11.5 \pm 5.06	6.5 \pm 1.58 [‡]	5.6 \pm 3.82	0.4 \pm 0.12
	95 nm CB	10.9 \pm 3.12	3.4 \pm 0.49	7.0 \pm 3.38	0.3 \pm 0.11
	LTA	25.0 \pm 3.12	2.0 \pm 0.08	20.8 \pm 3.09*	2.1 \pm 0.16* [†]
	14 nm CB+LTA	56.0 \pm 5.61* ^{†‡¶}	1.8 \pm 0.39 [†]	53.0 \pm 5.57* ^{†¶}	1.2 \pm 0.28
	95 nm CB+LTA	29.7 \pm 4.60* [†]	2.1 \pm 0.38	26.1 \pm 4.42* [†]	1.4 \pm 0.14* [†]
24 h	Vehicle	13.7 \pm 1.72	9.5 \pm 0.96	3.8 \pm 1.20	0.1 \pm 0.08
	14 nm CB	37.9 \pm 6.89	10.2 \pm 1.38	27.0 \pm 6.13	0.4 \pm 0.15
	95 nm CB	20.4 \pm 4.66	8.9 \pm 1.41	10.5 \pm 3.43	0.8 \pm 0.14
	LTA	32.9 \pm 4.42	9.5 \pm 1.23	22.3 \pm 3.51	1.0 \pm 0.22
	14 nm CB+LTA	82.2 \pm 8.53* ^{†¶}	7.7 \pm 1.26	73.4 \pm 8.55* ^{†¶}	1.1 \pm 0.49
	95 nm CB+LTA	42.5 \pm 1.93*	7.7 \pm 0.40	32.9 \pm 2.32*	1.9 \pm 0.36*
24 h	Vehicle	5.9 \pm 0.58	4.9 \pm 0.42	0.8 \pm 0.39	0.2 \pm 0.05
	14 nm CB	51.7 \pm 3.25	10.3 \pm 1.56	40.6 \pm 4.08	0.8 \pm 0.27
	95 nm CB	33.9 \pm 6.51	8.7 \pm 1.08	24.0 \pm 5.61	0.8 \pm 0.22
	LTA	113.4 \pm 11.95* [†]	9.1 \pm 1.68	101.0 \pm 11.38* [†]	2.6 \pm 0.57* [†]
	14 nm CB+LTA	160.1 \pm 14.82* ^{†¶}	6.4 \pm 1.44	151.7 \pm 15.71* ^{†¶}	1.3 \pm 0.46
	95 nm CB+LTA	89.0 \pm 13.60* [†]	8.2 \pm 0.81	78.5 \pm 13.01* [†]	1.8 \pm 0.14*

(Yamamoto S. et al., 2006)

Mean \pm SEM. (n=5), *p<0.05 vs vehicle, †p<0.05 vs 14 nm or 95 nm CB, ‡p<0.05 vs LTA, ¶p<0.05 vs 95 nm CB + LTA

BAL) 液を回収して白血球系細胞数を算定するとともに上清中のサイトカイン (TNF- α , IL-6)、ケモカイン (MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3) 産生量を ELISA 法によるマウス用サイトカイン測定キットを用いて測定した。肺のケモカイン mRNA の発現はリアルタイム RT-PCR 法によって解析した。本実験に先立ち、CB 粒子および LTA の気管内投与量決定のため、肺での用量反応関係について BAL 液中の炎症性細胞数およびサイトカイン、ケモカイン産生量を指標に予備的検討を行った。その結果、特に 95 nm CB 粒子では、投与 24 時間後に炎症性細胞である多形核好中球 (polymorphonuclear neutrophils; PMNs) 数や前炎症性サイトカイン IL-6, TNF- α 、ケモカイン CCL2, CCL3 の産生が用量依存的に増加した (図なし)。しかしながら、14 nm 粒子では CCL2, CCL3 の産生以外の指標は必ずしも用量依存的でなかった。LTA では、投与 24 時間後に PMN 数およびサイトカイン、ケモカイン産生のいずれも用量依存的に増加した (図なし)。これらの結果から、本実験での CB 粒子の用量は軽度の炎症反応を呈する 125 μ g に決定し、又、LTA の用量は中度 (PMN 数が Vehicle 群の 13 倍) および高度 (PMN 数が Vehicle 群の 41 倍) の炎症反応を呈する 10 μ g, 50 μ g に決定した。

表 2 には本実験での CB 粒子および LTA の気管内投与 4 時間後、24 時間後における BAL 液中の白血球系細胞数を示した。一般に炎症性細胞の肺への流入量は CB 粒子投与 18 時間後から 24 時後に

かけてピークになることが知られているが、投与 24 時間後における 14 nm CB 粒子と 95 nm CB 粒子の PMN 数を比較すると、前者の方が多い傾向が示された。10 μ g 又は 50 μ g の LTA 単独投与によって PMN 数が増加するが、14 nm CB 粒子との併用によってその PMN 数は相加的あるいは相乗的に増加した。このように 100 nm 以下の粒子間での比較においても、CB 粒子単独または LTA との併用で、小さい粒子の方が大きい粒子に比べて肺に PMNs を強く誘導することが明らかになった。

次に、図 2 に BAL 液中のサイトカイン、ケモカイン産生の結果について示す。通常、前炎症性サイトカインやケモカインの産生量は炎症性細胞の肺への流入に先行し、CB 粒子投与数時間後にピークになることが知られている。投与 4 時間後における 14 nm CB 粒子と 95 nm CB 粒子のサイトカイン、ケモカインの産生量を比較すると TNF- α と CCL3 については 95 nm 粒子の方が高い傾向を示したが、IL-6, CCL2 については両群間で差は見られなかった。一方、CB 粒子と 10 μ g LTA との併用では IL-6, TNF- α , CCL2 の相加的あるいは相乗的な増加がみられ、特に 14 nm CB + LTA 群で顕著であった。以上、CB 粒子単独投与では、二つの粒径間でそのサイトカイン、ケモカイン産生量に顕著な差はなかったが、LTA との併用では PMN 数と同様に小さい粒子の方が大きい粒子に比べて一部のサイトカイン、ケモカイン産生を高めることが明らかになった。

今回用いた LTA はグラム陽性菌の表面抗原であ

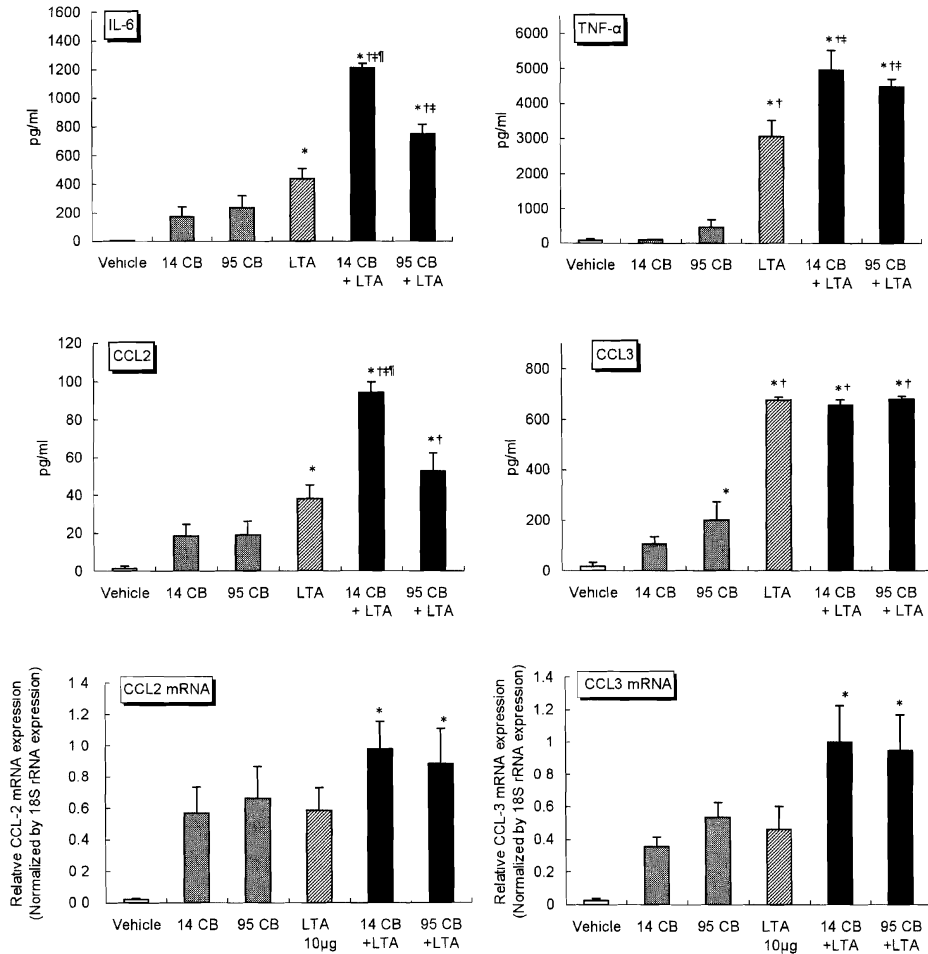


図2. CB ナノ粒子およびLTA 投与4時間後における気管支肺胞洗浄液中のサイトカイン・ケモカイン産生および肺でのケモカイン mRNA の発現 (Yamamoto S. et al., 2006).

Mean \pm SEM. (n=5~8), * p <0.05 vs vehicle, † p <0.05 vs CB, ‡ p <0.05 vs LTA, †† p <0.05 vs 95 nm CB + LTA

り、細菌の宿主細胞への付着にも関与することが知られている[14]。複合糖質から成るこのLTAは、微生物由来分子パターン (PAMPS) とも呼ばれ、パターン認識レセプター群である Toll 様受容体 (toll-like receptors; TLRs) ファミリーを介して自然免疫系を活性化する[15]。TLR ファミリーによる自然免疫系活性化のメカニズムとして、例えば、TLR4 はグラム陰性菌のリポ多糖を認識し、TLR2 はグラム陽性菌の細胞壁成分を認識することが知られている。TLR2 ではアダプター分子 MyD88、TIRAP を介した細胞内シグナル伝達により転写因子 NF- κ B が活性化され、炎症性サイトカイン遺伝子の発現が誘導される[16]。一方、粒子表面の物理化学的性状によっては細胞に酸化ストレスを引き起こす。この酸化ストレス経路での細胞内シグナル伝達による NF- κ B の活性化も炎症性サイト

カイン遺伝子の発現を誘導する[8]。これらのことから、本研究でのCB粒子とLTAとの併用による肺での炎症反応は、主にCB粒子による酸化ストレスとTLRの二つの経路によって誘導されたものと考えられる。

3. あとがき

都市大気中のSPMの起源、特に燃焼に由来するものには、ディーゼル排出粒子や溶接のときに発生するヒューム、石炭・石油燃焼時のフライアッシュ、重油燃焼時のスス等[9]があるが、その物理化学的性状はそれぞれの粒子によって異なるため、毒性発現の強度は粒子の粒径や表面積だけでは説明できない。交通量の多い幹線道路付近で観測される環境ナノ粒子の多くはディーゼル車排ガスに

由来すると考えられているが、その環境動態や物理化学的性状、体内動態、毒性影響のいずれも未解明の部分が多い。そのため、独立行政法人国立環境研究所では、2005年度よりナノ粒子健康影響実験棟内にディーゼル車排ガス由来ナノ粒子の吸入曝露チャンバーを設置して、ナノ粒子の体内動態や肺での炎症反応、循環機能などに及ぼす影響研究を行っている。

本稿では、これまでの研究成果の一部[13]について、その概要を報告したが、これ以外にも筆者の所属する研究室では14 nm CB粒子は95 nm CB粒子に比べて縦隔リンパ節での沈着量が高いこと[17]や脳の嗅球での炎症性サイトカイン、ケモカインの mRNA の発現レベルが高いこと[18]等を明らかにしている。小さい粒子の方が大きい粒子に比べてリンパ節移行が多くなることや脳での炎症反応がより強くみられることから、ナノ粒子の毒性の強さは同じの化学組成の場合に、表面積の大きさや粒径に関係するという従来からの提言を支持する結果が得られている。これらの結果はあくまでも CB 粒子での結果であり、物理化学的性状の異なる他の粒子でも粒径、表面積と毒性の強さとの同様の関係が成立するか否かは個別に検討しなければならぬと考える。

一方、化粧品やエレクトロニクス、医薬品等への応用が期待される酸化チタン、カーボンナノチューブ、フラーレンなどのナノマテリアルについてもその安全性確認のための影響評価研究が国内外において開始されている。カーボンナノチューブについては、*in vivo*での肺毒性、皮膚毒性、体内移行、組織学的解析、や*in vitro*での肺や皮膚の細胞毒性、ニューロン毒性等に関する知見が集まりつつある[19]。ナノ粒子といっても、燃焼由来のものからナノマテリアルまで多種多様のため、個々の粒子の形態や物理化学的性状に留意しながら、影響評価研究を進めなければならない。これらのナノ粒子が環境中に増加する可能性もあり、健康への影響が心配される。したがって、これらの研究は益々重要になってくると考えている。

要 約

大気中浮遊粒子状物質は呼吸器系や心臓血管系に悪い影響を及ぼすことが知られているが、環境ナノ粒子の健康影響に関する科学的知見は不足している。本研究では環境ナノ粒子がグラム陽性菌性の肺の炎症反応に及ぼす影響を明らかにするために、模擬ナノ粒子である14 nm、94 nmのカーボンブラック (CB) 粒子とグラム陽性菌細胞壁成分

リポテイコ酸 (LTA) を BALB/c 系雄マウスの気管内に同時投与し、投与4時間後、24時間後における肺の炎症反応への影響について粒径間での比較検討を行った。その結果、CB粒子とLTAとの併用は、肺に相加的あるいは相乗的な炎症反応を誘導し、その影響は14 nm粒子の方が強くなる傾向が示された。

文 献

- [1] Pope, C.A.III. (2000). Epidemiology of fine particulate air pollution and human health: biologic mechanisms and who's at risk?. *Environ. Health Perspect.*, 108, 713-723.
- [2] Heinrich, J., Hoelscher, B. and Wichmann, H.R. (2000). Decline of ambient air pollution and respiratory symptoms in children. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, 161, 1930-1936.
- [3] 環境省(2007). 微小粒子状物質曝露影響調査報告書
- [4] ICRP (1994). Human respiratory tract model for radiological protection. *Ann. ICRP*, 24(1-3), ICRP publication 66.
- [5] Kittelson, D.B. (1998). Engines and nanoparticles: a review. *J. Aerosol Sci.*, 29, 575-588.
- [6] Donaldson, K. and Stone, V. (2003). Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann. Ist. Super Sanita*, 39, 405-410.
- [7] Donaldson, K., Tran, L., Jimenez, L.A., Duffin, R., Newby, D.E., Mills, N., MacNee, W. and Stone V. (2005). Combustion-derived nanoparticles: A review of their toxicology following inhalation exposure. *Part. Fibre Toxicol.*, 2:10
- [8] Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. and Cox, C. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J. Toxicol. Environ. Health A*, 65, 1531-1543.
- [9] Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W. and Cox, C. (2004). Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal. Toxicol.*, 16, 437-445.
- [10] Elder, A., Gelein, R., Silva, V., Feikert, T., Opanashuk, L., Carter, J., Potter, R., Maynard, A., Ito, Y., Finkelstein, J. and Oberdörster G. (2006). Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect.*, 114, 1172-1178.
- [11] Oberdörster, G. (2000). Toxicology of ultrafine

- particles: in vivo studies. *Philos. Trans. R. Soc. Lond.*, A 358, 2719-2740.
- [12] Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005). Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, 113, 823-839.
- [13] Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Ahmed S., Kobayashi T. and Fujimaki H. (2006). Effect of ultrafine carbon black particles on lipoteichoic acid-induced early pulmonary inflammation in BALB/c mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 213, 256-266.
- [14] Ohshima, Y., Ko, H.L., Beuth, J., Roszkowski, K. and Roszkowski, W. (1990). Biological properties of staphylococcal lipoteichoic acid and related macromolecules. *Zentralbl. Bakteriol.*, 274, 359-365.
- [15] Takeda, K. and Akira, S. (2005). Toll-like receptors in innate immunity. *Int. Immunol.*, 17, 1-14.
- [16] Takeuchi, O. and Akira, S. (2001). Toll-like receptors; their physiological role and signal transduction system. *Int. Immunopharmacol.*, 1, 625-635.
- [17] Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto, S., Kakeyama, M., Kobayashi, T. and Fujimaki, H. (2005). Effect of intratracheal instillation of ultrafine carbon black on proinflammatory cytokine and chemokine release and mRNA expression in lung and lymph nodes of mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 209, 51-61.
- [18] Tin-Tin-Win-Shwe, Yamamoto, S., Ahmed, S., Kakeyama, M., Kobayashi, T. and Fujimaki, H. (2006). Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol. Letters*, 209, 153-160.
- [19] Helland, A., Wick, P., Koehler, A., Schmid, K. and Som, C. (2007). Reviewing the environmental and human health knowledge base of carbon nanotubes. *Environ. Health Perspect.*, 115, 1125-1131.