

主論文の要旨

Asbestos and multi-walled carbon nanotubes generate distinct oxidative responses in inflammatory cells

〔 アスベストおよび多層カーボンナノチューブの刺激による炎症細胞の活性酸素生成には相違がある 〕

名古屋大学大学院医学系研究科 機能構築医学専攻
病理病態学講座 生体反応病理学分野

(指導：豊國 伸哉 教授)

舟橋 諭美

【緒言】

アスベストは天然の繊維状鉱物であり、安価で耐久性・耐熱性に優れたことから建築材料などに広く使用されてきた。しかし、アスベストを吸入すると、慢性炎症反応や鉄過剰病態による酸化ストレスと、それによるゲノム損傷によって生じる肺線維症や悪性中皮腫といった疾患を引き起こすことが明らかになり、先進国では製造、使用が禁止されている。その潜伏期間は 20～40 年と長く、日本での悪性中皮腫の患者数は年々増えており、2025 年をピークとして、今後 40 年間に新たな患者数が約 10 万人に達すると予測されている。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、炭素によって作られたシート状の六員環 (グラフェンシート) が単又は多層の同軸管状に並んだ物質であり、現在では主に半導体や燃料電池の構造材料、あるいは薬剤を体内に運ぶためのナノベクターの一つとして広く使用されている。カーボンナノチューブの直径は数ナノメートルから数百ナノメートル程度であり、長さは数マイクロメートルから数十マイクロメートル程度で、この繊維の長さとの比率はアスベストと類似している。このことが、アスベストによって引き起こされる肺線維症や悪性中皮腫といった疾患の発生原因になると考えられている。これまでに炎症細胞における多層カーボンナノチューブの活性酸素の生成反応については明らかになっていない。

本研究では、アスベストまたは多層カーボンナノチューブの刺激が、好中球とマクロファージ細胞の活性酸素生成能に及ぼす影響について、悪性中皮腫の発生における炎症の観点から検討した。

【材料と方法】

1. 好中球におけるアスベストおよび MWCNT の活性酸素生成量の測定

15 週齢の雄性 SD (Sprague-Dawley) ラットをヘパリン処理にて採血を行った。アスベスト (UICC) は crocidolite, amosite, chrysotile の 3 種類、MWCNT (昭和電工) は CNT-50、CNT-115、CNT-145、CNT-tngl の 4 種類の懸濁液を用いた。Tngl とは Tangled の略で、細い繊維が絡まって塊状となったものを表す。発光試薬にヘパリン処理した全血、グルコースとアスベストまたは MWCNT を添加し、近赤外光対応のルミノメーター AB-2280 (アトー株式会社) を用いて化学発光法による活性酸素の生成量の測定および活性酸素種の測定を行った。発光試薬は、L-012 (8-amino-5-chloro-7-phenylpyrido[3,4-d]pyridazine-1,4-(2H,3H) dione sodium salt; 和光純薬株式会社) を用いた。L-012 は活性酸素種の中でも特に hydroxyl radical (HO \cdot) による発光強度が強く、O $_2$ の他に過酸化水素や hypochlorite (ClO \cdot) などと反応して化学発光を示す。

2. マクロファージ細胞におけるアスベストおよび MWCNT の活性酸素生成量の測定

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 を用い、好中球と同様にアスベスト 3 種類、MWCNT 4 種類の懸濁液を添加し、近赤外光対応のルミノメーター AB-2280 (アトー株式会社) を用いて化学発光法による活性酸素の生成量の測定を行った。発光試薬は

L-012 (和光純薬株式会社) を用いた。

3. 抗酸化剤および抗酸化酵素添加による活性酸素生成の阻害反応

好中球およびマウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 にアスベスト、MWCNT を添加した際に同時に抗酸化剤、抗酸化酵素の Cu,Zn superoxide dismutase (SOD1; EC1.15.1.1)、catalase (EC1.11.1.6)、sodium azide (NaN₃)、apocynin (APO) または鉄キレート剤の Deferoxamine mesylate (DFO)、ニトリロ三酢酸(NTA) を添加し、近赤外光対応のルミノメーター AB-2280 (アトー株式会社) を用いて化学発光法による活性酸素生成の阻害反応について測定を行い、活性酸素種を明らかにした。発光試薬は L-012 (和光純薬株式会社) を用いた。

4. アスベストおよび MWCNT の溶血反応の測定

全血にアスベストおよび MWCNT を添加し、4 時間のインキュベート後に吸光度を測定し、溶血反応の測定を行った。

5. アスベストおよび MWCNT のマクロファージ細胞への取り込みの経時変化

マウスマクロファージ様細胞 RAW264.7 におけるアスベストおよび MWCNT の取り込みの経時変化を 37°C、CO₂ 5% 下で BZ-9000 (株式会社キーエンス) を用いて 5 時間観察を行った。

6. 統計処理

すべての統計処理には GraphPad Prism 5 を使用し、一元配置分散分析と多重比較検定を行い、有意水準は 5% とした。

【結果】

1. 好中球におけるアスベストおよび MWCNT の活性酸素生成

好中球にアスベストを添加すると、crocidolite、amosite、chrysotile において有意に活性酸素の生成量が増加し、そのピークは 10 分以内であった (Figure1)。活性酸素の生成量は amosite > crocidolite >>> chrysotile であったが、MWCNT はいずれの太さの繊維においても、アスベストと同様の条件下で活性酸素の生成量は有意に増加しなかった。さらに、アスベスト添加と同時に抗酸化剤および抗酸化酵素を添加すると、活性酸素の生成を阻害し、O₂ や H₂O₂、cytochrome oxidase、NADPH oxidase の関与が示唆された。

2. マクロファージ細胞におけるアスベストおよび MWCNT の活性酸素生成

一方、マクロファージ細胞においてはいずれのアスベスト種類においても活性酸素の生成量が増加した (Figure2)。アスベストの種類によってピークの時間が異なり、crocidolite は 3 時間後、amosite は 2 時間後、chrysotile は 5 時間後であった。同様に MWCNT においても活性酸素の生成量が増加し、アスベストと比較してピークの時間は早く、CNT-50 および CNT-115 は 1.5 時間後、CNT-145 は 0.5 時間後、CNT-tngl は 1 時間後であった。

3. Chrysotile の溶血反応

アスベストおよび MWCNT それぞれの種類のうち、アスベストの一種である

chrysotile のみ 75% の溶血反応が有意にみられた。

4. アスベストと MWCNT ではマクロファージ細胞の繊維の取り込み方が異なる

アスベストでは経過時間とともに細胞が凝集しながら線維を取り込むが、MWCNT では細胞の動きの変化は観察されなかった (Figure3)。

【考察】

本研究において、アスベストと MWCNT では炎症細胞における活性酸素の生成反応が異なることを示した (Figure4)。これはこれまでの報告を支持する。

我々は好中球とマクロファージ細胞に対するアスベストおよび MWCNT による活性酸素の生成反応についてルミノメーターを用いて測定し、アスベストと MWCNT では炎症細胞における活性酸素の生成反応が異なり、アスベストと比較して MWCNT は早期に反応することを初めて示した。

アスベストは好中球で活性酸素の生成反応がみられたのに対し、MWCNT では直径による差異も乏しく、有意な増加は観察されなかった。これはアスベストがケイ素、酸素、金属 (特に鉄) が成分に含まれているのに対し、MWCNT は 95% 以上が炭素で構成されていることが関係していると考えられる。つまり、鉄が活性酸素の生成反応に影響していることが示唆された。実際、好中球はすべての種類のアスベストの添加から 10 分後以内に活性酸素の生成反応が観察された。また、各アスベストの種類によって活性酸素の生成反応は異なり、crocidolite、amosite の活性酸素の生成反応は chrysotile と比較して高く、フェントン反応の触媒作用に起因することが示唆された。crocidolite と amosite は鉄を多く含むのに対し、chrysotile は溶血反応を有意に引き起こす。鉄が含まれていることにより、活性酸素の生成反応が促進された。さらに抗酸化剤および抗酸化酵素を添加することにより検討を行ったところ、活性酸素生成反応が阻害され、cytochrom oxidase や NADPH oxidase に関連していることが示唆された。また、鉄キレート剤を添加したところ、DFO は活性酸素生成を阻害し、NTA は活性酸素生成を促進した。これは、触媒鉄が好中球由来の活性酸素にも含まれていることを示している。

白血球の中で最も遊走能の高い好中球は、体内に侵入した異物に対する炎症反応の極めて早い段階で作用し、貪食を行う。アスベストと比較して MWCNT 添加の peak time は 1.5 時間以内の早期段階であった。この結果は異なる繊維物質の存在を感知するメカニズムが存在することを示唆する。

抗酸化酵素・物質 (SOD、apocynin) の添加により、アスベストや MWCNT 刺激による活性酸素の生成反応を阻害し、NADPH oxidase と O_2^- は持続的に関与していた。これはナノマテリアルによる NLRP3 inflammasome 活性化の関与に関する報告と一致する。 H_2O_2 と関与する catalase は、いずれの太さの MWCNT においても活性酸素の生成反応は観察されなかった。また、鉄キレート剤である DFO は crocidolite と CNT-115 に働き、NTA は CNT-50 のみにおいて活性酸素生成を促進した。アスベストと MWCNT の取り込みのメカニズムが異なることが関係している。アスベストと

MWCNT でマクロファージ細胞における活性酸素生成反応の時間は異なった。今回の結果に関連した好中球やマクロファージ細胞の分子の同定は今後検討する必要がある。

以前、ラットにおける中皮腫発がんについて、CNT-50 は強い発がん性があることが報告された。アスベストは、好中球およびマクロファージ細胞いずれにおいても活性酸素の生成反応が観察された。一方、MWCNT においては、好中球には活性酸素の生成反応は観察されなかったが、マクロファージ細胞には反応することが観察された。アスベストと多層カーボンナノチューブ両者の作用機序の違いが影響していることが示唆された。よって、中皮細胞の傷害は繊維により誘発される中皮腫において好中球やマクロファージ細胞の反応よりも重要な指標であると思われる。

本研究では全血で活性酸素生成反応を簡易に測定できる方法として近赤外光対応のルミノメーターを使用した。本研究結果を踏まえ、今後臨床的に応用が期待されると考えている。

【結論】

本研究において、アスベストと MWCNT では炎症細胞における活性酸素生成反応が異なり、MWCNT のほうがマクロファージ細胞に早期に反応することから、好中球やマクロファージ細胞などの炎症細胞に対する活性酸素生成反応を測定することは、空気曝露による炎症反応のマーカーの一つに成り得ることが示唆された。工業が盛んになり、私たちの生活を豊かにする物質が増えている。MWCNT 製造に携わっている人は、アスベストと同様に中皮腫を発症する可能性があるため、注意していく必要がある。アスベストおよび MWCNT 曝露による悪性中皮腫の発生は潜伏期間が長いことから、酸化ストレスを減らすことは、予後改善につながる可能性があると考えられた。