

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：34509

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K16148

研究課題名(和文) 大気中の微小粒子状物質による心血管毒性のリスク評価

研究課題名(英文) Risk assessment of cardiovascular toxicity by atmospheric microparticles

研究代表者

小野寺 章 (onodera, akira)

神戸学院大学・薬学部・助教

研究者番号：40598380

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：疫学調査では大気中の微小粒子状物質による呼吸器疾患・心疾患による死亡率の増大が危惧されている。大気中の微小粒子状物質を構成する粒子は、大きいもので約10  $\mu\text{m}$ 、小さいもので100 nm以下であり、心血管毒性は粒径が小さいほど強いと考えられている。

そこで本申請課題は、シリカ粒子と酸化亜鉛粒子をモデル材料として用いた解析により、以下2つの新知見を見出すことに成功した。

シリカ粒子を用いた解析では、直径70 nm以下の粒子がPI3Kシグナルを介し血管を弛緩した。酸化亜鉛ナノ粒子を用いた解析では、直径100 nmの粒子がレニン-アンジオテンシン系を介し高血圧を惹起した。

研究成果の概要(英文)：This epidemiological investigation is concerned with the increase in death rate due to respiratory or cardiac diseases caused by atmospheric microparticles. Atmospheric microparticles can be as large as 10  $\mu\text{m}$  and as small as 100 nm in size. The strength of the cardiovascular toxicity is considered to be inversely proportional to the size of the particle. In the present study, we succeeded in finding two new results by analyses using silica particles and zinc oxide particles as model materials. In the analysis using silica particles, particles less than 70 nm in diameter relaxed blood vessels via the PI3K signaling pathway. In the analysis using zinc oxide particles, particles less than 100 nm in diameter caused high blood pressure via the renin-angiotensin system.

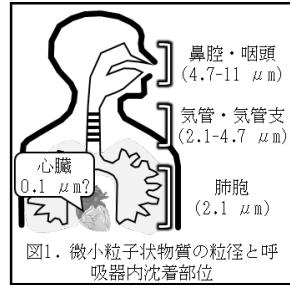
研究分野：ナノ毒性学

キーワード：血管弛緩 カルシウム PI3Kシグナル

### 1. 研究開始当初の背景

疫学調査によると、大気中の微小粒子状物質はヒトの呼吸器疾患・心疾患による死亡率を増大させる危険因子であることが危惧されている。

大気中の微小粒子状物質の大きさは、大きいもので約 10  $\mu\text{m}$ 、小さいもので 100 nm 以下であり、サイズが小さい程体の深部へと移行・沈着する(図 1)。



心血管毒性の惹起においても、粒径が小さくなるほど毒性が強くなると考えられており、様々なモデル粒子を用いた研究が活発に進められている。一方で、どのような粒子が呼吸器疾患・心疾患を惹起するのか?に関する実験的エビデンスが圧倒的に不足しており、粒子の性状と心血管毒性発現との関連を解明することが望まれている。

### 2. 研究の目的

大気中の微小粒子状物質は自然界に存在する多数の元素で構成されている。北京市の都市大気粉塵やゴビ砂漠に含まれる成分であればケイ素の含有率が最も高く、シリカに由来する分析結果であると想定される。また、ヒトが微小粒子状物質を曝露する一日の推定量は数十  $\mu\text{g}$  程度であり、単一の成分と考えればその曝露量は非常に少なく、心血管毒性を惹起する成分は非常に高い触媒活性をもつと想定され、本申請課題では金属粒子に着目した。

そこで本研究は、シリカ粒子、及び金属粒子が心血管毒性のリスク因子となるか否かを明らかにすることを目的に、粒子の性状・毒性発現・作用メカニズムの三者連関の解明を試みた。

### 3. 研究の方法

#### 3 - 1. 血管の弛緩収縮機能へのシリカ粒子の影響評価

5週齢のWistar系雄性ラットから胸部大動脈を摘出し、幅約 3 mm の血管リング標本を 1 匹あたり 4 つ作製した。血管リング標本は、マグヌス装置にセットし Krebs-Henseleit 緩衝液で平衡化の後、各種解析に用いた。血管収縮の解析は、各血管リング標本へ 3 種類のシリカ粒子 (70 nm, 300 nm, 1000 nm) または 1 種類の酸化亜鉛ナノ粒子 (100 nm) を処置し、収縮作用を測定した。なお、陽性コントロールは 1  $\mu\text{M}$  のフェニレフリンを用いた。血管弛緩の解析は、1  $\mu\text{M}$  のフェニレフリンで強制的に収縮させ血管へ 3 種類のシリカ粒子 (70 nm, 300 nm, 1000 nm) または 1 種類の酸化亜鉛ナノ粒子 (100 nm) を処置し、弛緩作用を測定した。なお、陽性コントロールには 1  $\mu\text{M}$  のアセチルコリンを用いた。

#### 3 - 2. シリカナノ粒子による血管弛緩メカニズムの解明

マグヌス装置にセットされた血管リング標本へプロスタサイクリン ( $\text{PGI}_2$ ) シグナル、PI3 キナーゼ (PI3K) シグナルの阻害剤を予め処置し、70 nm のシリカ粒子による血管弛緩への影響を測定した。 $\text{PGI}_2$  シグナルは、シクロオキシゲナーゼ (COX) を Diclofenac で阻害した。PI3K シグナルは PI3K を Wortmannin で阻害し、さらに内皮型一酸化窒素合成酵素 (eNOS) を L-NAME で阻害した。阻害剤の処置後、1  $\mu\text{M}$  のフェニレフリンで血管を収縮させ、70 nm のシリカ粒子による血管弛緩を測定した。

#### 3 - 3. 酸化亜鉛ナノ粒子の心機能への影響評価

4週齢の BALB/c 雄性マウスへ 100 nm の酸化亜鉛ナノ粒子を腹腔内へ単回投与し、24・48 及び 168 時間後の血圧と心拍数を Tail-cuff 法で測定した。

#### 3 - 4. 酸化亜鉛ナノ粒子による血圧上昇メカニズムの解明

4週齢の BALB/c 雄性マウスへ 100 nm の酸化亜鉛ナノ粒子を腹腔内へ単回投与し、24・48 または 168 時間後に血液を採取した。血清を分離し、血清中のレニン活性をラジオイムノアッセイ (RIA) 法により測定した。

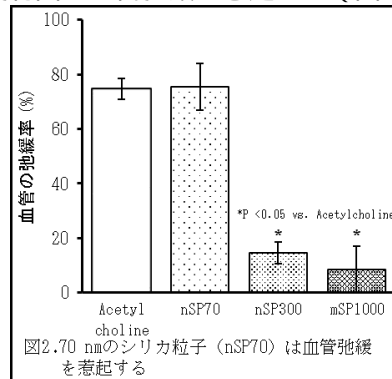
### 4. 研究成果

#### 4 - 1. 70 nm のシリカナノ粒子は血管弛緩を惹起する

心血管毒性は細胞障害による影響を除くと心機能・血管機能へなんらかの影響を与えることで症状が現れると考えられる。本申請課題は、粒子自体の作用を明らかにすることが目的であるため、細胞障害や臓器障害が観察されない処置濃度を予試験により決定し、まず血管の弛緩収縮への影響を解析した。

そこで本解析は、ラットより採取した胸部大動脈を用い血管の弛緩や収縮を粒子が惹起するか否かを追求した。

まず血管弛緩への影響は、直径 70 nm (nSP70) シリカ粒子のみが 30-300 ng/mL の濃度範囲で血管弛緩を惹起した(図 2)。



一方、300・1000 nm のシリカ粒子や 100 nm の酸化亜鉛ナノ粒子は、血管を弛緩させな

った。

また、血管収縮への影響は、3種のシリカ粒子および酸化亜鉛ナノ粒子いずれにおいても観察されなかった。

#### 4 - 2. 70 nm のシリカナノ粒子はPI3Kシグナルを介し血管弛緩を惹起する

粒子径 70 nm の素材はいわゆるナノマテリアルに分類され、従来の作用メカニズムとは異なる生体作用を示すことが危惧されている。本研究課題で見出した血管弛緩作用もその一つと考えられ、シリカ粒子の微小化により血管機能をかく乱すると考えられた。

そこで本研究は、nSP70 による血管弛緩が既知のシグナル経路と関連するかどうかについて追及した。

血管弛緩の主要なシグナルの1つに、アラキドン酸カスケードの  $PGI_2$  シグナルが知られている。このシグナルを Dichlofenac により阻害したが、nSP70 による血管弛緩を抑制することはできなかった (図3)。

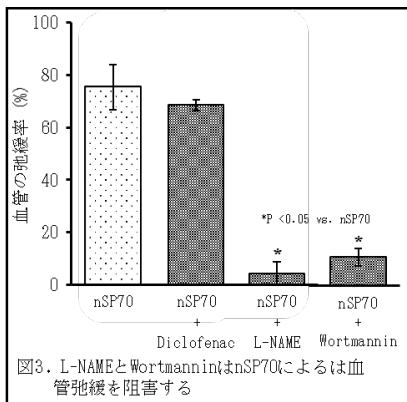


図3. L-NAMEとWortmanninはnSP70による血管弛緩を阻害する

次にPI3KシグナルをWortmanninまたはL-NAMEにより阻害したところ、nSP70による血管弛緩が劇的に抑制された (図3)。

すなわち、nSP70による血管弛緩は、PI3Kシグナルを活性化することで惹起されるものと考えられた。

#### 4 3. 酸化亜鉛ナノ粒子は高血圧の原因となる

酸化亜鉛ナノ粒子の心機能への影響を明らかにするため、マウスの腹腔内へ単回投与し、24・48および168時間(7日)後の収縮期血圧をTail-cuff法で測定した。

24時間後では、酸化亜鉛ナノ粒子の投与濃度の増加に伴い収縮期血圧が増加し、12

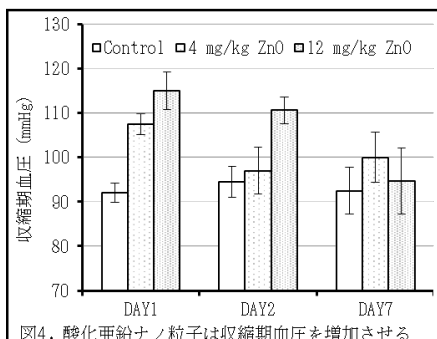


図4. 酸化亜鉛ナノ粒子は収縮期血圧を増加させる

mg/kg ZnOの処置条件においては48時間後も血圧が上昇しており、短期的な持続性を示す高血圧の原因となると考えられた (図4)。

一方で、心拍数の増減は観察されておらず、心機能とは関連しない高血圧であると考えられた (図5)。

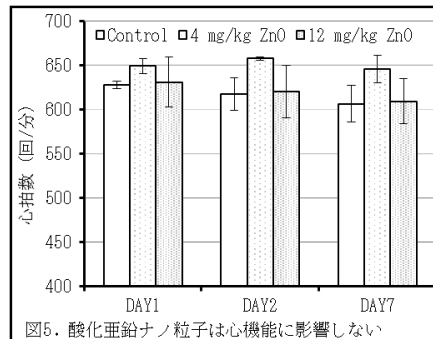


図5. 酸化亜鉛ナノ粒子は心機能に影響しない

#### 4 - 4. 酸化亜鉛ナノ粒子は、レニン活性を増加させることで血圧を増加する。

血圧の増加は、血管の収縮や拍動の増加など、心血管機能が正常に機能しない場合に生じると考えられる。一方で、酸化亜鉛ナノ粒子は心臓・血管系に作用することなく血圧を上昇させることが前項までの解析により明らかとなった。このような症状は、ヒトの降圧薬治療の第一選択薬であるアンジオテンシン変換酵素 (ACE) 阻害薬を必要とする血圧の上昇メカニズム (レニン-アンジオテンシン系: RA系) と酷似していると考えられた。

RA系による血圧の調節は、まず肝臓で合成されるアンジオテンシノーゲンが、腎臓で産生されるレニンによってアンジオテンシンIへと変換される。次に、アンジオテンシンIがACEによってアンジオテンシンIIへ変換され、これが血圧上昇の原因となるアルドステロン分泌や血管収縮・水・Naの再吸収を促している。

そこで本研究は、この一連の血圧上昇メカニズムの引き金となる、レニン活性をRIA法により測定した。

酸化亜鉛ナノ粒子の投与24時間後では、投与濃度の増加に伴いレニン活性が増加した (図6)。48時間後においてもレニン活性は増加しており、短期的な持続性を示す高血圧がレニン活性の増加によるものと考えられた (図6)。

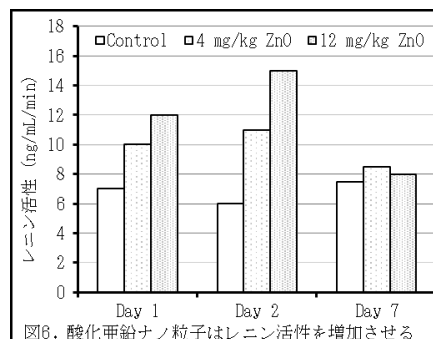


図6. 酸化亜鉛ナノ粒子はレニン活性を増加させる

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計3件)

1. Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Hideto Morosawa, Yukina Ishii, Yasuo Tsutsumi and Yuichi Kawai. Reduction of calcium flux from the extracellular region and endoplasmic reticulum by amorphous nano-silica particles owing to carboxy group addition on their surface. *Biochemistry and biophysics reports*. 9:330-334. 2017年3月 査読有
2. Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Atsushi Tanaka, Hideto Morosawa, Takuya Furuta, Naoya Takeda, Kisa Kakiguchi, Shigenobu Yonemura, Itaru Yanagihara, Yasuo Tsutsumi and Yuichi Kawai. Amorphous nanosilica particles evoke vascular relaxation through PI3K/Akt/eNOS signaling. *Fundamental and clinical pharmacology*. 30(5):419-428. 2016年10月 査読有
3. Akira Onodera, Fumiko Nishiumi, Kisa Kakiguchi, Atsushi Tanaka, Nami Tanabe, Aki Honma, Katsutoshi Yayama, Yasuo Yoshioka, Kumiko Nakahira, Shigenobu Yonemura, Itaru Yanagihara, Yasuo Tsutsumi and Yuichi Kawai. Short-term changes in intracellular ROS localization after the silver nanoparticles exposure depending on particle size. *Toxicology reports*. 2:574-579. 2015年4月 査読有

〔学会発表〕(計16件)

1. 森田 茜, 小野寺 章, 井上 雅己, 大前 拓也, 古来 明沙香, 三宅 亜紀穂, 森澤 弥桜, 屋山 勝俊, 角田 慎一, 河合 裕一. 胎児の脳形成期における自動車排出粒子の曝露は仔マウスの学習・記憶を低下させる. 2017年3月. 日本薬学会第147年会(仙台).
2. 大前 拓也, 小野寺 章, 井上 雅己, 古来 明沙香, 三宅 亜紀穂, 森澤 弥桜, 森田 茜, 屋山 勝俊, 角田 慎一, 河合 裕一. 自動車排出粒子に対する鼻粘膜防御・免疫の役割. 2017年3月. 日本薬学会第147年会(仙台).
3. 古来 明沙香, 小野寺 章, 井上 雅己, 大前 拓也, 森田 茜, 三宅 亜紀穂, 森澤 弥桜, 屋山 勝俊, 角田 慎一, 河合 裕一. ヒト鼻腔上皮細胞による自動車排出粒子の細胞内取込みと細胞外排出の検討. 2017年3月. 日本薬学会第147年会(仙台).
4. 小野寺 章, 森川 ありさ, 川崎 真司, 谷口 甲介, 屋山 勝俊, 河合 裕一. ヒト鼻腔上皮細胞によるサイトカイン産生への自動車排出粒子の細胞内取込みの影響. 2016年9月. 第23回日本免疫毒性学会学術年会(小倉).
5. 小野寺 章, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を介しマウスの高血圧を惹起する. 2016年5月. 第86回日本衛生学会学術総会(旭川).
6. 谷口甲介, 小野寺 章, 森川 ありさ, 井崎 泰徳, 川崎 真司, 藤井 綾子, 松田 慎也, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 自動車排出粒子によるヒト鼻腔上皮細胞からのサイトカイン産生に関する解析. 2016年5月. 第86回日本衛生学会学術総会(旭川).
7. 井崎泰徳, 小野寺 章, 川崎真司, 谷口 甲介, 藤井 綾子, 松田 慎也, 森川ありさ, 屋山 勝俊, 河合裕一. 自動車排出粒子はマウスの攻撃行動を低下させる. 2016年5月. 第86回日本衛生学会学術総会(旭川).
8. 森川ありさ, 小野寺 章, 川崎 真司, 藤井 綾子, 井崎 泰徳, 松田 慎也, 谷口 甲介, 屋山 勝俊, 河合裕一. 自動車排出粒子の細胞内取込みとサイトカイン産生についての検討. 第86回日本衛生学会学術総会(旭川).
9. 井崎泰徳, 小野寺 章, 川崎 真司, 谷口 甲介, 藤井 綾子, 松田 慎也, 森川ありさ, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 自動車排出粒子はマウスの攻撃行動を低下させる. 2016年3月. 日本薬学会第136年会(横浜).
10. 谷口 甲介, 小野寺 章, 森川 ありさ, 井崎 泰徳, 川崎 真司, 藤井 綾子, 松田 慎也, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 2016年3月. 日本薬学会第136年会(横浜).
11. 川崎 真司, 小野寺 章, 井崎 泰徳, 谷口甲介, 藤井綾子, 松田慎也, 森川ありさ, 屋山勝俊, 河合裕一. 自動車排出粒子の経鼻投与によるマウスの学習・記憶への影響. 2016年3月. 日本薬学会第136年会(横浜).
12. 森川 ありさ, 小野寺 章, 川崎 真司, 藤井 綾子, 井崎 泰徳, 松田 慎也, 谷口 甲介, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 自動車排出粒子の細胞内取込みとサイトカイン産生についての検討. 2016年3月. 日本薬学会第136年会(横浜).
13. 小野寺 章, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を活性化し高血圧を惹起する. 2015年9月. フォーラム2015 衛生薬学環境トキシコロジー(神戸).
14. 谷口 甲介, 小野寺 章, 森川 ありさ, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 非晶質ナノシリカはPI3K シグナルを介した血管の弛緩反応を惹起する. 2015年6月. 第62回日本生化学会近畿支部大会(滋賀).
15. 森川 ありさ, 小野寺 章, 谷口 甲介, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 銀ナノ粒子による細胞毒性はミトコンドリアからの

- ROS 産生に関連する. 2015 年 6 月. 第 62 回日本生化学会近畿支部大会(滋賀).  
16. 小野寺 章, 屋山 勝俊, 河合 裕一. 酸化亜鉛ナノ粒子はレニン-アンジオテンシン系を活性化し高血圧を惹起する. 2015 年 6 月. 第 62 回日本生化学会近畿支部大会(滋賀).

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等  
<http://kobegakuin-yakugaku.jp/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

小野寺 章 (Onodera Akira)  
神戸学院大学・薬学部・助教  
研究者番号: 40598380

### (2) 研究分担者

( )

研究者番号:

### (3) 連携研究者

( )

研究者番号:

### (4) 研究協力者

河合 裕一 (Kawai Yuichi)  
神戸学院大学・薬学部・教授  
研究者番号: 00102921

屋山 勝俊 (Kawai Yuichi)  
神戸学院大学・薬学部・教授

研究者番号: 30248108

谷口 甲介 (Taniguchi Kosuke)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

森川 ありさ (Morikawa Arisa)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

川崎 真司 (Kawasaki Masashi)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

井崎 泰徳 (Isaki Yasunori)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

藤井 綾子 (Fujii Ayako)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

松田 慎也 (Matsuda Shinya)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

森田 茜 (Morita Akane)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

大前 拓也 (Ohmae Takuya)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

古来 明沙香 (Korai Asaka)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

三宅 亜紀穂 (Miyake Akiho)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし

森澤 弥桜 (Morisawa Mio)  
神戸学院大学・薬学部・学部学生  
研究者番号: なし