

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 20 日現在

機関番号：32202

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03935

研究課題名（和文）繊維状物質による心血管系へのストレス応答機構の解明とリスク評価法の開発

研究課題名（英文）Development of the evaluation system for cardiovascular effects of fiber materials

研究代表者

市原 佐保子（Sahoko, Ichihara）

自治医科大学・医学部・教授

研究者番号：20378326

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,700,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、今後その応用が期待されているカーボンナノチューブを含む繊維状物質に注目し、心血管系に対する影響を実験的に明らかにすると同時に、国内の炭素繊維加工工場の作業環境測定を実施した。その結果、カーボンナノチューブのマウスへの高濃度曝露は、動脈硬化巣形成を誘発し、その作用機序として、インフラマソームによる炎症誘導機構が関与していると示唆された。また、工場調査で、高アスペクト比の潜在的に危険な繊維が炭素繊維加工中に発生することを確認した。作業環境の安全を確保するには、研磨後に発生する炭素繊維破片のリスク評価が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ナノテクノロジーは、新材料創出、医療応用、地域温暖化防止に関係する環境技術等に应用可能であり、社会への貢献が期待される。反面、新たな物性を持つため、ナノレベルの材料は従来の測定法では有害性の定量評価が出来ず、ヒトに対する未知の有害性リスクを有する可能性が懸念され、生体影響に関するリスク評価が求められている。本研究により、産業技術の発展や新しいイノベーションの創造に期待されるナノテクノロジーにおいて、重大なリスクを回避して有効利用を可能にするために、並行して、安全性評価の実施が必要であることが明らかになった。

研究成果の概要（英文）：In the present study, we focused on the health effects of fibrous materials containing carbon nanotubes, which are expected to be applied in the various fields. We experimentally investigated their effects on the cardiovascular system, and carried out work environment measurements at carbon fiber processing factory in Japan. As a result, high-concentration exposure to carbon nanotubes induced arteriosclerotic plaque formation in mice, suggesting that the inflammation induced by inflammasomes was involved as the mechanism. Moreover, factory survey confirmed that respirable fibers with high aspect ratios are generated during carbon fiber processing. In order to ensure the safety of the working environment, it is important to confirm the appropriate use of local exhaust ventilation and a risk assessment of carbon fiber debris generated after grinding of carbon fibers.

研究分野：衛生学

キーワード：ナノ素材 炭素繊維 血管内皮細胞 動脈硬化 炎症反応

1. 研究開始当初の背景

2000年代になり、ナノサイズ(100ナノメートル以下)に物質のサイズを制御することが可能となり、新規の物質・材料としてその応用性が期待されている。反面、新たな物性を持つため、ナノレベルの材料は従来の測定法では有害性の定量評価が出来ず、ヒトに対する未知の有害性リスクを有する可能性が懸念されている。工業的ナノ素材による重大なリスクを回避し有効利用するためにも、早期の安全性評価の実施が必要である。工業的ナノ素材の中で、カーボンナノチューブは今後、産業界において更なる応用が期待されているが、アスベストに似た毒性や炎症反応を示す可能性が報告されている。現在、国内外の橋梁・トンネルや家屋等の建設現場に、ひび割れたコンクリートを補強する目的で、炭素繊維やカーボンナノチューブをコンクリートに混ぜた『繊維補強コンクリート』が導入され出している。今後、建設および解体時にそれらの繊維状物質がヒト健康に影響を及ぼす可能性が懸念されるため、その安全性を検討し、初期段階でのリスクを予測する方法を確立しておく必要がある。

本研究代表者は、酸化金属ナノ粒子の血管内皮細胞に対する影響をこれまでに明らかにした。また、動脈硬化モデルマウスを用い、カーボンナノチューブがアテローム性動脈硬化症の進行を増強することを示した。線維状物質による肺への健康影響を左右する因子として、細く長く、溶け難く、表面活性を持つ性質が、腫瘍を発生させやすいと報告されている。繊維状物質のリスク評価に関して、多くの国内外の研究課題は、吸入曝露装置開発やアスベストによる中皮腫発症の問題を対象とし、主に肺および気管支への影響に特化しているため、本研究では、繊維状物質の心血管系への影響に対するリスク評価とその作用機序の解明に焦点を当てる。また、炭素繊維取り扱い工場における繊維状物質の曝露状況を調査する。繊維状物質による生体影響における炎症・ストレス応答転写因子の制御機構の解明は、広く環境因子による心血管疾患の発症や病態の理解に貢献する。また、心血管系に及ぼす分子メカニズムを解明し、健康影響や病態進展を予測するバイオマーカーを同定することは、環境要因による心血管疾患の病態解明や発症予防法の確立に寄与すると考える。

2. 研究の目的

環境中の微小粒子状物質(PM_{2.5})やタバコ煙の粒子成分の肺への影響と同時に心血管系への影響の重要性も疫学研究で明らかになっている。さらに、ナノサイズの物質は肺胞を取り囲む毛細血管内皮細胞と基底膜で形成される血液空気関門を通過し、血液循環に到達することが明らかになったため、ナノ素材の血管系への影響に対するリスク評価とその作用機序の解明が待たれている。アスベストやケイ素等による肺の炎症反応においてインフラマソームが重要な役割を果たし、インフラマソームは動脈硬化の形成にも関与していることが明らかになった。本研究では、カーボンナノチューブを含む繊維状物質による心血管系に対する炎症作用に注目し、惹起される血管内皮障害に関連するインフラマソームの役割とストレス応答転写因子による制御機構を解析し、インフラマソーム構成タンパクを介した血管における炎症誘導機構を明らかにし、血管内皮細胞障害に寄与する標的分子マーカーを同定し、初期影響評価マーカーとしての有効性を検証することを目的とする。また、炭素繊維加工工場の作業環境測定を実施し、炭素繊維加工現場における繊維状物質の曝露状況を調査することも目的とする。

3. 研究の方法

(1) 動脈硬化モデル動物を使用したカーボンナノチューブの影響評価

繊維状物質による血管への影響を検討するために、12週齢の動脈硬化モデル動物である ApoE 遺伝子欠損マウスに、カーボンナノチューブを咽頭内投与(aspiration)し、10日後に大動脈弓部を採取後、動脈硬化性プラーク病変の程度を解析した。腹部大動脈から RNA を抽出し、インフラマソーム構成タンパクである NLRP3 遺伝子の発現とカスパーゼ 1 およびインターロイキン 1-beta の活性を分析した。また、血管内皮細胞 (HUVECs) を培養し、カーボンナノチューブを投与し、インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC を蛍光色素で免疫染色し、ASC スペック形成への影響を検討した。また、ストレス応答に關与する転写因子:Nrf2 が、インフラマソームの活性化に關与していると報告されたため、12週齢の動脈硬化モデル動物である ApoE 遺伝子欠損マウスと Nrf2-ApoE 二重遺伝子欠損マウスに、カーボンナノチューブを咽頭内投与 (aspiration) し、大動脈弓部で動脈硬化性プラーク病変の程度を解析した。腹部大動脈から RNA およびタンパク質を抽出し、インフラマソーム構成タンパクである NLRP3 遺伝子の発現とカスパーゼ 1 およびインターロイキン 1-beta の活性を分析した。

(2) 炭素繊維加工工場に飛散する繊維状物質の評価

国内にある炭素繊維加工工場の作業環境測定として、CPC (Condensation Particle Counter) と OPC (Optical Particle Counter) により粒子数を計測した。また、SMPS (Scanning Mobility Particle Sizer Spectrometer) で、ナノサイズの粒子の表面積を計測した。工場労働者に粉塵分流量サンプラーを装着し、労働環境における繊維状物質の曝露評価をした。また、労働環境中に飛散する繊維状物質をフィルター上に捕集し、電子顕微鏡でその形状と長さを評価した。

4. 研究成果

2層カーボンナノチューブの高濃度投与にて、ApoE 遺伝子欠損マウスの大動脈弓における粥腫面積が増加した。また、インフラマソームの中心的構成因子である NLRP3 の発現と、炎症性因子 (VCAM-1, ICAM-1) サイトカイン (MCP-1) の発現は、長さのより長い 2層カーボンナノチューブの高濃度投与群で有意に増加していた。培養細胞の実験では、2層カーボンナノチューブの高濃度投与で、インターロイキン 1-beta のレベルが有意に上昇した。また、インフラマソームのアダプタータンパク質である ASC の蛍光色素での免疫染色で、2層カーボンナノチューブの ASC スペック形成が確認された。上記の結果より、2層カーボンナノチューブの高濃度曝露は、動脈硬化巣形成を誘発し、その作用機序として、インフラマソームによる炎症誘導機構が關与していると示唆された。

炭素繊維加工工場の作業環境測定の結果、『研磨作業場』における炭素繊維強化プラスチックパイプの切断・研磨作業で、ナノサイズの粒子を含む微小粒子が最も多く飛散していることを確認した。局所排気装置が設置されている『切断作業場』での同作業時と比較し、約 10 倍の微小粒子の飛散が見られたため、『研磨作業場』に局所排気装置が設置されていないことに起因すると考えられた。また、『切断作業場』と『工場中央』も、工場外と比較すると微小粒子が多く飛散していることを確認した。また、労働環境中に飛散する繊維状物質をフィルター上に捕集し、電子顕微鏡にて観察した結果、収集された繊維は主に、繊維の長軸で横方向に破壊された原料の

炭素繊維であった。しかし、世界保健機構(WHO)において呼吸性繊維の定義と形態学的に適合する微小の炭素繊維(長さ: > 5 μm、幅: < 3 μm、長さ/幅の比: > 3:1)も確認された。工場内の6つの測定エリアにおいて、同工場内の局所排気装置が使用された標準的な作業条件下における微小の呼吸性繊維濃度は、大気汚染防止法に基づくアスベスト粉じん発生基準値である10本/Lを下回っていた。上記の結果より、炭素繊維加工工場で、高アスペクト比の潜在的に危険な繊維が炭素繊維加工中に発生することを確認した。作業環境の安全を確保するには、局所排気装置等の設備の適切な使用状況の確認と、その指導が重要であると同時に、研磨後に発生する炭素繊維破片の定期的なリスク評価が必要であると考えられた。

産業技術の発展や新しいイノベーションの創造に期待されるナノテクノロジーにおいて、重大なリスクを回避して有効利用を可能にするために、並行して、安全性評価の実施が必要であることが明らかになった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takizawa R, Ichihara S, Zong C, Kinoshita K, Sakurai T, Ikegami A, Mise N, Ichihara G.	4. 巻 349
2. 論文標題 1,2-Dichloropropane induces γ -H2AX expression in human cholangiocytes only in the presence of macrophages.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Toxicology Letters	6. 最初と最後の頁 134-144
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.toxlet.2021.06.009.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Suzuki Y, Ichihara G, Kawada S, Miyazawa K, Furutani T, Hayashida A, Watanabe E, Zong C, Tran L, Ikegami A, Ichihara S.	4. 巻 20
2. 論文標題 Effects of physiochemical characteristic of nano-sized TiO ₂ on the adhesion of monocytes to endothelial cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 NanoImpact	6. 最初と最後の頁 100257
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.impact.2020.100257.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Zhang X, Morikawa K, Mori Y, Zong C, Zhang L, Garner E, Huang C, Wu W, Chang J, Nagashima D, Sakurai T, Ichihara S, Oikawa S, Ichihara G.	4. 巻 94
2. 論文標題 Proteomic analysis of liver proteins of mice exposed to 1,2-dichloropropane.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Archives of Toxicology	6. 最初と最後の頁 2691-2705
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00204-020-02785-4.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Tada-Oikawa S, Eguchi M, Yasuda MT, Izuoka K, Ikegami A, Vranic S, Boland S, Tran L, Ichihara G, Ichikawa S.	4. 巻 33
2. 論文標題 Functionalized surface-charge SiO ₂ nanoparticles induce pro-inflammatory responses, but are not lethal to Caco-2 cells.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Chemical Research of Toxicology	6. 最初と最後の頁 1226-1236
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1021/acs.chemrestox.9b00478.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kitamura Y, Mise N, Mori Y, Suzuki Y, Ohashi T, Tada-Oikawa S, Tokisu M, Zong C, Oikawa S, Ichihara S.	4. 巻 10
2. 論文標題 Proteomic identification of the proteins related to cigarette smoke-induced cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 18825
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75429-3.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

[学会発表] 計13件(うち招待講演 0件/うち国際学会 6件)

1. 発表者名 雲井 純、池上 昭彦、藤谷 雄二、市原 学、矢野 竹男、市原 佐保子
2. 発表標題 炭素繊維強化プラスチック製造加工現場の繊維状物質
3. 学会等名 第94回日本産業衛生学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sehsah R, Wu W, Ichihara S, Hashimoto N, Hasegawa Y, Zong C, Yamazaki K, Sato H, Itoh K, Yamamoto M, Ali Elsayed A, El-Bestar S, Kamel E, Ichihara G
2. 発表標題 Effect of Nrf2 deletion on inflammatory response in lung of female mice exposed to zinc oxide nanoparticles
3. 学会等名 NanoTox2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato H, Zong C, Devineau S, McCord C, Ichihara S, Brookes O, Ekuban F, Itoh K, Yamamoto M, Boland S, Baeza-Squiban A, Ichihara G
2. 発表標題 Pulmonary effects of Fe3O4-PEG-PLGA nanoparticles in human bronchial epithelial cells and in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration
3. 学会等名 NanoTox2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato H, Zong C, Devineau S, McCord C, Ichihara S, Brookes O, Ekuban F, Itoh K, Yamamoto M, Boland S, Baeza-Squiban A, Ichihara G
2. 発表標題 Pulmonary effects of Fe304-PEG-PLGA nanoparticles in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration
3. 学会等名 第48回日本毒性学会学術年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池上 昭彦、雲井 純、藤谷 雄二、矢野 竹男、市原 学、市原 佐保子
2. 発表標題 炭素繊維強化プラスチック製造工場現場の微小粒子
3. 学会等名 第48回産業中毒・生物学的モニタリング研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤春恵, 宗才, Stephanie Devineau, Claire McCord, 市原佐保子, Oliver Brookes, 伊東健, 山本雅之, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, 市原学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGA ナノ粒子の経気道曝露が肺にもたらす影響とNrf2 の役割
3. 学会等名 フォーラム2021 衛生薬学・環境トキシコロジー
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Akihiko Ikegami, Jun Kumoi, Yuji Fujitami, Gaku Ichihara, Takeo Yano, Sahoko Ichihara
2. 発表標題 Debris from carbon fiber reinforced plastics (CFRP) in an occupational setting
3. 学会等名 33rd International Congress on Occupational Health (ICPH 2022) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 雲井純、池上昭彦、藤谷雄二、森川浩太、市原学、濱口隼人、矢野竹男、市原佐保子
2. 発表標題 炭素繊維強化プラスチックの製造加工現場で発生する微小粒子の個人曝露評価
3. 学会等名 第93回日本産業衛生学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤春恵、宗才、市原佐保子、伊東健、山本雅之、Sonja Boland、Armelle Baeza、市原学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGA経気道曝露による野生型およびNrf2欠損マウスの肺への影響
3. 学会等名 第15回ナノ・バイオメディカル学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Harue Sato, Cai Zong, Sahoko Ichihara, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, Gaku Ichihara
2. 発表標題 Pulmonary effect of exposure to Fe304-PEG-PLGA nanoparticles via pharyngeal aspiration in wild type and Nrf2 knockout mice.
3. 学会等名 9th NANO Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Akihiko Ikegami, Jun Kumoi, Yuji Fujitani, Takeo Yano, Gaku Ichihara, Sahoko Ichihara
2. 発表標題 Exposure assessment of debris from carbon fiber reinforced plastics in an occupational setting.
3. 学会等名 9th NANO Conference (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤 春恵、宗 才、Stephan ie Devineau, Claire McCord、市原 佐保子、Oliver Brookes、Frederick Adams Ekuban、伊東 健、山本 雅之、Sonja Boland、Armelle Baeza Squiban、市原 学
2. 発表標題 Fe304-PEG-PLGA曝露によるヒト気管支上皮細胞と野生型および Nrf2欠損マウスの肺への影響
3. 学会等名 第20回分子予防環境医学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Harue Sato, Cai Zong, Stephan ie Devineau, Claire McCord, Sahoko Ichihara, Oliver Brookes, Ken Itoh, Masayuki Yamamoto, Sonja Boland, Armelle Baeza-Squiban, Gaku Ichihara
2. 発表標題 Pulmonary effect of Fe304-PEG-PLGA nanoparticles in human bronchial epithelial cells and in wild type and Nrf2 knockout mice following pharyngeal aspiration.
3. 学会等名 Society of Toxicology 60th Annual Meeting (SOT2021) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	三瀬 名丹 (Nathan Mise) (00360644)	自治医科大学・医学部・准教授 (32202)	
研究分担者	池上 昭彦 (Akihiko Ikegami) (60748739)	自治医科大学・医学部・助教 (32202)	
研究分担者	市原 学 (Gaku Ichihara) (90252238)	東京理科大学・薬学部薬学科・教授 (32660)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
英国	Institute of Occupational Medicine			
フランス	Universite de Paris			