

学位論文題名

Observation and functional analysis of  
reaction behavior of liver cells

(カーボンナノチューブに対する肝細胞の反応挙動の観察と機能解析)

学位論文内容の要旨

<目的> カーボンナノチューブ (CNT) は近年最も注目されている材料の一つであり、その生体への応用も期待されている。しかしながら生体への影響については未だ知られていない部分が多い。今回、異物の処理を担う最も重要な臓器である肝臓の細胞を用いて、生体防御機構で中心的役割を果たす貪食細胞と比較しながら、CNT が細胞へ与える影響について検討した。また、CNT を用いた温熱療法への可能性から、高温条件下における CNT を取り込んだ細胞の挙動について観察した。

<方法> 多層 CNT (Nano Lab : 径 20~40nm, 長さ 800~1000nm) を大気中 500°C, 90 分の焼成処理を行い不純物を除去したのち、培養液中の分散性を上げるため硝酸による酸化処理を行った。CNT を一定の濃度で添加した細胞培養液中で肝細胞 (Hc cell) を 24 時間培養した後、光学顕微鏡 (OM), 走査型電子顕微鏡 (SEM), 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。肝細胞においては OM によるタイムラプス法を適用して、培養温度を 37°C または 43°C にて 22 時間までの挙動の連続観察を行った。肝細胞がディッシュ上の CNT を掃引するような挙動がみられたことから、その掃引面積を画像解析ソフトを用いて定量化を行った。また、細胞機能を評価するため、Hc cell, 単球細胞 (THP-1) を CNT 添加培養液で 1 時間, 24 時間の培養後に細胞上清を回収し、上清中のサイトカイン TNF- $\alpha$ , IL-10 と Super Oxide Dismutase (SOD) 活性の測定を行った。

<結果> OM, TEM 観察から CNT が Hc cell の細胞質内に取り込まれている様子が観察された。SEM 観察では、CNT 無添加のコントロール群と比較すると、CNT 添加群では周囲の CNT へ伸展させた糸状仮足や細胞表面に発達した多数の突起の形成など特徴的な形態が認められた。細胞動態を観察するために行った 22 時間の連続観察では、細胞は様々な方向へ偽足を伸展させながら移動を行い、細胞質の両端側湾曲による異物包含など様々な細胞の形態を変えながら CNT を取り込む動きがみられた。また、微細な CNT が一様に分散し画像上では灰色状を呈していたディッシュ底面が、肝細胞の通過後透明化し、その面積が時間とともに増加していたことから、観察画面内から代表的な複数の細胞を選択し、それらの細胞による CNT 掃引面積を定量化したところ、細胞に依存して活動度は異なるものの、22 時間まで経時的に直線的な増加関係を示していた。また、観察中に動きを止めた細胞や、細胞死する様子はみられなかった。

通常よりも培養温度を 43°C まで上昇させて行った連続観察では、細胞は観察開始から 1 時間ほどで浮遊し、細胞死が観察された。細胞質内に取り込まれた CNT は細胞死後も細胞内に留まり、排出される様子は観察されなかった。

これまでの観察から肝細胞が食作用に非常によく似た挙動を示したことから、その細胞機能を貪食作用を有する単球 THP-1 と比較したところ、THP-1 では CNT 濃度が高いほど TNF- $\alpha$  産生量が増加したが、肝細胞 Hc cell では低レベルのまま CNT 無添加のコントロール群と添加群の間に大きな差は認められなかった。IL-10 産生量は両細胞ともみられなかった。SOD 活性の測定では、THP-1 ではコントロール群と比較して CNT 添加群で低下がみられたが、Hc cell では両者に大きな差はみとめられなかった。

<考察> 今回、タイムラプス法による連続観察を行ったことで、これまでの SEM、TEM などの静的観察法ではみられなかった長い偽足などの細胞形態を観察することが可能となった。SEM、TEM 観察では試料作製の過程において様々な薬液による処理を行う必要があるために、こうした細胞の動的形態が失われると考えられる。また、経時的な記録により、解析ソフトを用いた細胞による掃引面積を定量化することも可能であった。

CNT とともに培養を行った細胞では、その細胞辺縁がいくつとあり、多数の長い仮足や細胞表面の突起がみとめられたことから、培養液中の CNT の存在が細胞の形態を変化させ、貪食活動を開始する引き金になると考えられる。今回の連続観察では、CNT の凝集体を取り囲むように細胞質を変形させ取り込む様子や、様々な方向へ偽足を伸展させるなどいくつかの特徴的な動きが観察された。細胞が時折移動を止めて丸くなる様子も観察され、この間に細胞辺縁に付着していた CNT の凝集体が細胞内に取り込まれていることから、異物を消化する際にこのような形態をとると考えられる。肝細胞は様々な異物を処理する際に、その異物の大きさなどの特徴に合わせた処理方法を選択している可能性が考えられる。観察中、細胞内の CNT が細胞外に排出される様子はみられなかったことから、さらに多くの CNT を細胞内へ取り込む可能性が示唆された。また肝細胞 Hc cell が CNT に対して貪食によく似た挙動を示したことから、これを肝細胞の偽食作用と呼ぶこととした。

細胞による掃引面積の定量化では、両細胞において経時的にほぼ一定の割合で面積の増加がみとめられた。このことから Hc cell の活動度は観察中絶えることなく進行し、CNT を求めて常に移動する属性を有すること、また、CNT を取り込むことで細胞死をおこしたり、細胞の活動低下を引き起こすことはないことが示唆された。

細胞機能性試験では、TNF- $\alpha$  が炎症の主要なメディエーターであり、また、貪食作用にも密接に関係していることから、細胞の TNF- $\alpha$  放出量測定を行った。THP-1 では濃度に依存して TNF- $\alpha$  の産生量が多くなっていったが、Hc cell ではコントロール群との間に大きな差がみとめられなかった。SOD 活性の測定においても Hc cell ではコントロール群との間に明らかな差はみとめられなかった。これらの結果より、Hc cell は CNT に対する偽食作用を有するが、炎症を引き起こすことなく貪食活動を行う点で本来の貪食細胞とは異なるメカニズムを有することが示唆された。

また CNT の細胞に対する為害性については、THP-1 から放出された TNF- $\alpha$  量は LPS による刺激と比較し格段に少量であったことから、CNT は細胞に対し刺激性を有するが毒性は非常に低く、細胞機能に対する急性の障害や細胞死を引き起こすことはないことが示唆された。

これらの結果より，ヒト肝細胞は外来性異物に対して食細胞のような炎症作用を誘導する機能は有せず偽食作用に機能を限定して活動すること，CNT は細胞に対してごく微小の刺激を与えるが細胞死を誘導するなどの急性毒性はないことが示唆された。

# 学位論文審査の要旨

主 査 教 授 八 若 保 孝  
副 査 教 授 亘 理 文 夫  
副 査 教 授 進 藤 正 信

学 位 論 文 題 名

## Observation and functional analysis of reaction behavior of liver cells

(カーボンナノチューブに対する肝細胞の反応挙動の観察と機能解析)

カーボンナノチューブ (CNT) は近年最も注目されている材料の一つであり、その生体への応用も期待されている。しかしながら生体への影響については未だ知られていない部分が多い。今回、異物の処理を担う最も重要な臓器である肝臓の細胞を用いて、生体防御機構で中心的役割を果たすマクロファージと比較しながら、CNT が細胞へ与える影響について検討した。

Multi-walled CNT を添加した細胞培養液中で肝細胞 (Hc)、マクロファージ (THP-1) を 24 時間培養した後、光学顕微鏡 (OM)、走査型電子顕微鏡 (SEM)、透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察を行った。肝細胞においては OM によるタイムラプス法を適用して 22 時間までの挙動の連続観察を行った。また、細胞機能を評価するため、サイトカイン TNF- $\alpha$ 、IL-10 の産生と活性酸素消去酵素活性 (SOD) の測定を行った。

OM、SEM、TEM 観察より CNT が細胞質内へ取り込まれていること、CNT 無添加のコントロール群と比較すると、周囲の CNT へ伸展させた糸状仮足や細胞表面に発達した多数の突起の形成など特徴的な形態が認められた。細胞動態の連続観察では、CNT 凝集体へ向けた偽足の伸展や両端側湾曲による異物包含など様々に細胞の形態を変えながら CNT を取り込む動きがみられた。また、微細な CNT が一様に分散し画像上では灰色状を呈していたディッシュ底面が、肝細胞の通過後透明化し、食活動を行っていることが示された。細胞による CNT 掃引面積を解析ソフトを用いて定量化すると、22 時間まで経時的に直線的な増加関係を示したことから、肝細胞の活動度は観察中ほぼ一定で進行し、CNT を求めて常に移動する属性を有することが示唆された。観察中に動きを止めた細胞や、細胞死する様子はみられなかった。

細胞機能性試験では、マクロファージでは CNT 濃度が高いほど TNF- $\alpha$  産生量が増加した

が、肝細胞では低レベルのまま CNT 無添加群と添加群の間に大きな差は認められなかった。一方 IL-10 はいずれでも検出限界以下であり、マクロファージについては炎症を活性化する M1 と組織再生に働く M2 のフェノタイプのうち、CNT はマクロファージに対して M1 に誘導することが示唆された。また、SOD 活性測定から、マクロファージではコントロール群と比較して CNT 添加群では活性酸素消去能が低下したが、肝細胞では大きな差異は認められなかった。

これらの結果より、ヒト肝細胞は外来性異物に対してマクロファージなどの食細胞のような炎症作用を誘導する機能は有せず偽食作用に機能を限定して活動すること、CNT は細胞に対してごく微小の刺激を与えるが細胞死を誘導するなどの急性毒性はないことが示唆された。

学位申請者に対して論文内容に関連する質問が行われた。主な質問内容を以下に記す。

1. CNT の酸処理について
  - 1) 用いた酸の種類
  - 2) 処理後の CNT 構造の変化について
  - 3) 処理後の培養液中における CNT の分散性について
2. 肝細胞の構造について
  - 1) CNT を取り込んだ後の肝細胞構造の変化について
  - 2) 細胞内の CNT の位置について
  - 3) 肝ライソゾームの働きについて
  - 4) CNT の細胞外への排出について
3. CNT 添加後の細胞数の変化について
4. タイムラプスによる連続観察について
  - 1) 本方法を用いることとした理由について
  - 2) 利点・欠点について
  - 3) 観察中の細胞の挙動について
5. 肝細胞と食細胞の比較の意義について
  - 1) 食食能の相違について
  - 2) サイトカイン放出について
6. マクロファージフェノタイプについて
7. 今後の展望について

これらの質問に対し、それぞれ適切な回答が得られた。また、申請者は幅広い知識を有しており、本研究の発展を見据えた今後の展望について、具体的な提示が申請者より示された。

以上のことから、本研究が学位論文に十分に値し、学位申請者は博士（歯学）の学位授与に相応しい者と認められた。