

[原 著]

微粒子を含む月レゴリスシミュラントの細胞影響の評価

堀江 祐範^{1,2*}, 三木 猛生³, 本間 善之³, 青木 滋³, 森本 泰夫¹¹産業医科大学 産業生態科学研究所 呼吸病態学²独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門³独立行政法人 宇宙航空研究開発機構 (JAXA)

要 旨: アメリカ航空宇宙局による有人月面探査構想が発表され, 我が国も参加を表明している. 月面には, 月レゴリスと呼ばれる微粒子を含む表土が堆積しており, 月面での活動によって月レゴリスが舞い上がり, 宇宙船内に持ち込まれて吸入する可能性がある. 月面探査に先立ち, 月レゴリスの有害性評価が必要であることから, 本研究では月レゴリスの化学組成と粒径に着目し, 細胞に対する影響を検討した. アポロが持ち帰った月レゴリスと同様の組成を持つ月レゴリスシミュラントを用い, 液相沈降法により粒径が10 μm 以下, 25 μm 以下および10~25 μm となるように分画した. さらに, 平均粒子径5.10 μm の微粒子からなる月レゴリスシミュラントを用い, 0.1および1.0 mg/mlの濃度でヒト肺胞上皮腺癌由来のA549細胞およびマクロファージ様に分化させたヒト単球由来のTHP-1細胞に投与し, 24時間後に, 細胞傷害, 酸化ストレス誘導および炎症誘導性を評価した. 濃度1.0 mg/mlのときには, 細胞膜の損傷とミトコンドリア活性の低下と, インターロイキン-8 (IL-8)の分泌および遺伝子発現の上昇が認められたが, 0.1 mg/mlではこれらの影響はないか, ごく小さく, 陽性対照とした結晶性SiO₂に比べても影響は小さかった. THP-1細胞において, 濃度1.0 mg/mlでは培養上清中にIL-1 β および腫瘍壊死因子- α (TNF- α)の分泌がみられたが, 24時間の時点でIL-1 β およびTNF- α 遺伝子の上昇はみられなかった. また, 細胞内酸化ストレスの上昇も小さかった. 細胞膜損傷, 酸化ストレス誘発あるいは炎症誘発性といった細胞影響は<10 μm の画分で強い傾向があったが, 顕著な違いはなかった. 以上の結果から, *in vitro*の試験において化学組成の面からの細胞影響は小さく, 粒子径の影響もそれほど大きくないことが示された.

キーワード: 月レゴリスシミュラント, 微粒子, 細胞傷害, 酸化ストレス, 炎症.

(2014年11月28日 受付, 2015年4月30日 受理)

はじめに

月面には, 月レゴリスと呼ばれる表土が存在する. 月レゴリスは月面への隕石の衝突や宇宙風化作用によって月の岩盤が破碎され, 砂礫や微粒子となり, 月面に堆積したもので, 月の表面を数センチ~数十センチの厚さで覆っている. アポロ11号が月面に到達して以来, 人類は月での活動を想定しさまざまな計画が立てられてきた. 2006年にはアメリカ航空宇宙局(NASA)により有人月面探査構想が発表され, 我が国の宇宙航

空開発機構(JAXA)も参加を表明している. 月面探査の際には, 月レゴリス上を歩行あるいは月面車により走行することで, 月レゴリスが舞い上がる. レゴリスには, ナノ粒子(直径が1~100 nmの粒子)を含む微細な粒子が含まれること, 月の重力は地球の約1/6であることから, 舞い上がった月レゴリスは長く空中にとどまる. これらの月レゴリスは, 静電気などによって宇宙服に付着し, 宇宙船内に持ち込まれて人が吸入する可能性を生じる. 実際に, アポロ15号では宇宙船のエアロック内で宇宙服を脱いだ際に火薬のようなにおい

*対応著者: 堀江 祐範, 独立行政法人 産業技術総合研究所 健康工学研究部門, 〒761-0395 香川県高松市林町2217-14, Tel: 087-869-4197, E-mail: masa-horie@aist.go.jp

感じたとの報告や、アポロ17号では宇宙服を脱ぐ際に月レゴリスを吸入したとの報告がある[1]。従って、月面での有人探査に当たって、月レゴリスのヒトの呼吸器に対する有害性を評価することが必要である。

吸入による呼吸器への影響を考えた場合、鼻腔や気管で捕らえられずに、肺胞まで到達する観点から、空気動力学径 $10\ \mu\text{m}$ を、有害性を判断する閾値と考えることができる。大気中に浮遊する粒子状物質(Particulate Matter, PM)のうち、捕集効率が50%となる空気動力学径が $10\ \mu\text{m}$ のものを、PM10と呼ぶ。PM10の吸入により、多くの健康影響の可能性が報告されている[2, 3]。我が国においては、環境基本法に基づき環境省によって、大気中に浮遊する粒子状物質で、粒径が $10\ \mu\text{m}$ 以下のもの(すなわち、捕集効率が100%となる空気動力学径が $10\ \mu\text{m}$)は浮遊粒子状物質(Suspended Particulate Matter, SPM)と定義されて、大気汚染物質として環境基準が定められている。PM10とSPMは定義が異なるが、小さい粒子ほど肺胞深部に到達し、呼吸器に影響を及ぼすとされる。月面では地球上よりもより大きな粒子も空中にとどまることから、地球上では吸入しないような大きな粒子を吸入する機会が増加する。月の重力を考慮した場合、約2.5倍の粒子径を持つ粒子が吸入対象となる[4]。月面においても肺深部へ到達可能な粒径に変化はないと考えられるが、より大きな粒径を持つ粒子を吸入した場合の影響は明らかでない。

一方で、小さな粒子は肺の深部に到達するものの、有害性は粒径のみによって決定されるものではない。粒子状物質の呼吸器に対する有害性は粒径のほか、粒子形状、化学組成も重要である。

月レゴリスの有害性評価は、アポロが持ち帰った月レゴリスを用いることがもっとも適しているが、その量に限りがある。月レゴリスの研究には、月レゴリスの組成分析の結果[5]を参考に、火山灰など地球の土壌を材料として、月レゴリスと同様の組成となるように調製した月レゴリスシミュラントが多く用いられている。

本研究では、2種類の月レゴリスシミュラントを用い、化学組成と粒径の観点から、培養細胞に対する影響を検討した。培養細胞として、月レゴリスを吸入した際に、初めに接触すると考えられる肺胞上皮細胞のモデルとして、ヒト肺胞上皮腺癌由来A549細胞を用いた。さらに、肺胞マクロファージによる除去を考慮し、マクロファージ様に分化させたヒト急性単球性白血病由来THP-1細胞を用いた。粒径は $10\ \mu\text{m}$ およびその2.5倍の $25\ \mu\text{m}$ で分画した月レゴリスシミュラントを用いた。さらに平均粒子径 $5\ \mu\text{m}$ の月レゴリスシミュ

ラントを用い、細胞影響を評価した。

材料および方法

月レゴリスシミュラント

本研究では2種類の月レゴリスシミュラントFJS-1(JAXAと清水建設の共同開発による)およびJSC-1AVF(NASAにより開発、以下fineと記す)を用いた。FJS-1およびJSC-1AVFはJAXAより入手した。FJS-1は、液相沈降法により空気動力学径 $10\ \mu\text{m}$ 以下(<10)、同じく $25\ \mu\text{m}$ 以下(<25)および $10\sim 25\ \mu\text{m}$ の3種類の粒子径を含む画分に分画した[4]。結晶性シリカMin-U-Sil 5はU.S.Silicaから購入した。各月レゴリスシミュラントおよび画分は、 180°C 、2時間の乾熱滅菌処理をしたのち、超音波槽を用いて $10\ \text{mg/ml}$ の濃度で滅菌蒸留水中に分散した。蒸留水分散液を、細胞用培地で10倍ずつ段階希釈し、培地分散液を調製した(以後、本月レゴリスシミュラントの培地分散液を「レゴリス分散液」と称する)。月レゴリスシミュラントはレゴリス分散液中で重力沈降するため、培地分散液は使用直前に調製し、転倒混和したのち細胞に投与した。また、各月レゴリスシミュラントおよび画分について、 120°C 、8時間真空脱気処理ののちBET法により比表面積を、アルカリ融解ののち、誘導結合プラズマ発光分光分析法(ICP-AES)によりSi, Ti, Al, Feについて含量の測定を行った。これら元素の含量(wt%)は、定量値から酸化物換算として算出した。JSC-1AVFについては、粒径分布を測定した。試料をヘキサメタリン酸Na溶液中に分散し、ホモジナイザで10分間攪拌したのち、マイクロトラック粒度分析計(日機装 MT-3300EX II)により粒径分布を測定した。

細胞毒性試験

細胞毒性は、乳酸脱水素酵素(LDH)漏出による細胞膜損傷とWST-1アッセイによるミトコンドリア活性の測定によって評価した。A549細胞および急性単球性白血病細胞株THP-1細胞は、理化学研究所バイオリソースセンターより入手した。A549細胞は10%牛胎児血清添加ダルベッコ変法イーグル培地(DMEM, ライフテクノロジー)中、THP-1細胞は10%牛胎児血清添加Roswell Park Memorial Institute 1640 (RPMI1640)培地(ナカライテスク)中で 37°C 、5% CO_2 条件下で培養した。A549細胞は、 2×10^5 個/mlの濃度で播種し、24時間後に実験に用いた。THP-1細胞はPhorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, シグマアルドリッチ)の添加によりマクロファージ様に分化させた。 2×10^5

個/mlの濃度で播種したTHP-1細胞に終濃度60 ng/mlとなるようにPMAを添加し、48時間培養後細胞が接着したことを確認し、1日ごとに3回培地交換を行い、実験に用いた。細胞膜損傷は、細胞に0.1および1.0 mg/mlの濃度でレゴリス分散液を投与し、24時間後に培養上清を回収、13,000 rpm、10分間の遠心により混在する粒子を除去した後、細胞傷害性検出キットPLUS(LDH)(ロシュ・アプライドサイエンス)によって測定した。細胞膜損傷は、メーカーのプロトコルに従い、細胞傷害性(Cytotoxicity)として以下の式により算出した。

$$\text{細胞傷害性(\%)} = (\text{実測値} - \text{低コントロール}) / (\text{高コントロール} - \text{低コントロール}) \times 100$$

ここで、低コントロールは無処理細胞、高コントロールはキット添付の細胞溶解試薬により全細胞を溶解させた上清をいう。

WST-1アッセイは、細胞にレゴリス分散液を投与、24時間後にその分散液を細胞用培地で10倍希釈したPremix WST-1 cell proliferation reagent(タカラバイオ)に交換し、さらに37°C、1時間培養したのち、440 nmの吸光を測定した。

細胞内活性酸素種(reactive oxygen species, ROS)レベルの測定細胞内ROSレベルの測定は、2',7'-dichlorofluorescein (DCFH)法により行った。細胞にレゴリス分散液を投与し、24時間後にその分散液を10 μMの2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA, シグマアルドリッチ)を含み、血清を含まない培地に交換した。37°Cで30分培養後、トリプシン処理により細胞を回収し、リン酸緩衝生理食塩水(PBS)で3回洗浄した。PBSに再懸濁し、フローサイトメーターにより励起488 nm、蛍光520 nmで5,000個の細胞を測定した。測定値は、レゴリス非投与細胞の蛍光レベルを1とした時の相対値で示した。

分泌サイトカインの濃度測定

細胞にレゴリス分散液を投与し、24時間後に上清を回収、13,000 rpm、10分間の遠心により混在する粒子を除去した後、上清中のインターロイキン-8(IL-8)、インターロイキン-1β(IL-1β)および腫瘍壊死因子-α(TNF-α)濃度を各々Human IL-8 ELISA Ready-SET-Go!, Human IL-1 beta ELISA Ready-SET-Go!およびHuman TNF alpha ELISA Ready-SET-Go!(eBioscience Inc.)を用いて測定した。

ストレス応答およびサイトカイン遺伝子発現の測定

遺伝子発現はリアルタイム polymerase chain reaction (PCR)により評価した。細胞にレゴリス分散液を投与し、24時間後に上清を除去、PBSで1回洗浄しRNeasy Mini Kit(キアゲン)によりmRNAを回収した。RNAはHigh Capacity cDNA Revers Transcription kit (Applied biosystems)によりcDNAとしたのち、TaqMan® Gene Expression Assays (Applied biosystems)を用いたリアルタイムPCR法によりβ-アクチン遺伝子を内部標準としてヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)、メタロチオネイン1(MT1)、IL-8、IL-1βおよびTNF-α遺伝子の発現を解析した。標的遺伝子のTaqMan®プローブはApplied biosystems から購入した。Assay IDを以下に示す。HO-1: Hs01110250_m1, MT1H: Hs00823168_g1, IL-8: Hs00174103_m1, IL-1β: Hs01555410_m1, TNF-α: Hs01113624_g1。

統計解析

各々の図は独立した3群(n=3)の実験値の平均値とし、それぞれについての標準偏差(SD)をエラーバーで示した。有意差は、レゴリス分散液非投与群に対し、分散分析(ANOVA)でDunnnett法により検定を行った。

結果

月レゴリスシミュラントの物理的性状

2種類の月レゴリスシミュラントのうち、FJS-1については、空気動力学径10 μm以下(<10)、同じく25 μm以下(<25)および10~25 μmの3種類の粒子径を含む画分に分画した。走査型電子顕微鏡による観察では、これらの粒子はいずれも不定形で、針状ではないが、鋭角を持つものも存在した。分画による形状の差は見られなかった。このうち、<10および<25の月レゴリスシミュラントについて、月レゴリスの主成分であるSiO₂、TiO₂、Al₂O₃およびFeOについて組成分析を行った(Table 1)。分画による組成の変化は認められず、FJS-1とJSC-1AVFの間にも組成の大きな違いはなかった。ほぼ50%をSiO₂が占めており、アポロ14号が持ち帰った月レゴリスとほぼ同様の組成であった[5]。比表面積は、<25 μm画分よりも<10 μm画分で大きく、<10 μm画分により小さな粒子が含まれることを示唆した。Fineの中心粒径(D50%)は5.10 μmで、0.7-37 μmの範囲に正規分布しており、比表面積はFJS-1の分画画分よりも小さかった。結晶性シリカは、中心粒径1.8 μmであった[9]。

Table 1. Components and specific surface area of the lunar regolith simulants

	Component (wt%)				Specific surface area (m ² /g)
	SiO ₂	TiO ₂	Al ₂ O ₃	FeO	
Fine	47	1.8	18	10	3.9
< 10	45	0.7	18	6.0	23.2
< 25	49	0.9	19	7.4	12.4
SiO ₂	99.7	0.01*	0.27*	NT	6.1

*These data are referred from product data of SiO₂(MinU-Sil 5) obtained from U.S. Silica Company[9].

月レゴリスシミュラントの細胞傷害性

0.1および1.0 mg/mlの濃度のレゴリス分散液を細胞に投与し、24時間後の細胞膜傷害性を検討した(Fig. 1). 陽性対照として、呼吸器に対する傷害性が知られている結晶性シリカでも月レゴリスシミュラント同様の試験を行った。細胞膜の傷害性は、A549細胞、THP-1細胞ともに陽性対照とした結晶性シリカでもっとも大きかった。レゴリス分散液を投与した細胞では、THP-1細胞のFineを除き、0.1 mg/mlは細胞膜の損傷は認められなかった。A549細胞では分画による傷害性の差は見られなかったが、<10でやや傷害性が強い傾向がみられた。THP-1細胞では、Fineおよび1.0 mg/ml

の<10のみで細胞膜傷害性が認められた。ミトコンドリア活性を指標とした、細胞生存率への影響は小さく、もっとも生存率の減少がみられた1.0 mg/ml、<10 μm画分でも減少率は20%程度であった(Fig. 2)。分画による細胞生存率への影響は認められなかった。

月レゴリスシミュラントによる酸化ストレス誘導

肺由来の腺癌細胞であるA549細胞にレゴリス分散液を投与し、24時間後に細胞内のROSレベルを測定した。細胞内ROSレベルは、<10 μm投与画分でのみ、非投与細胞に比べ1.3倍程度増加した(Fig. 3A)。さらに、投与24時間後に酸化ストレス応答タンパク質HO-1の遺伝子発現を調べたところ、濃度1.0 mg/mlにおいてfineおよび<10 μm画分で最大2倍程度の発現の上昇が認められた(Fig. 3B)。

月レゴリスシミュラントによる炎症誘導性

月レゴリスシミュラントによる炎症誘導性を検討するため、サイトカイン分泌を評価した。レゴリス分散液を投与したA549細胞では、<10、<25および10-25画分において濃度1.0 mg/mlでIL-8の分泌が増加した(Fig. 4)。<25画分では0.1 mg/mlでも上昇が認められた。24時間後におけるIL-8遺伝子発現も分泌されたIL-8タンパク質と同様の結果を示した。THP-1細胞に

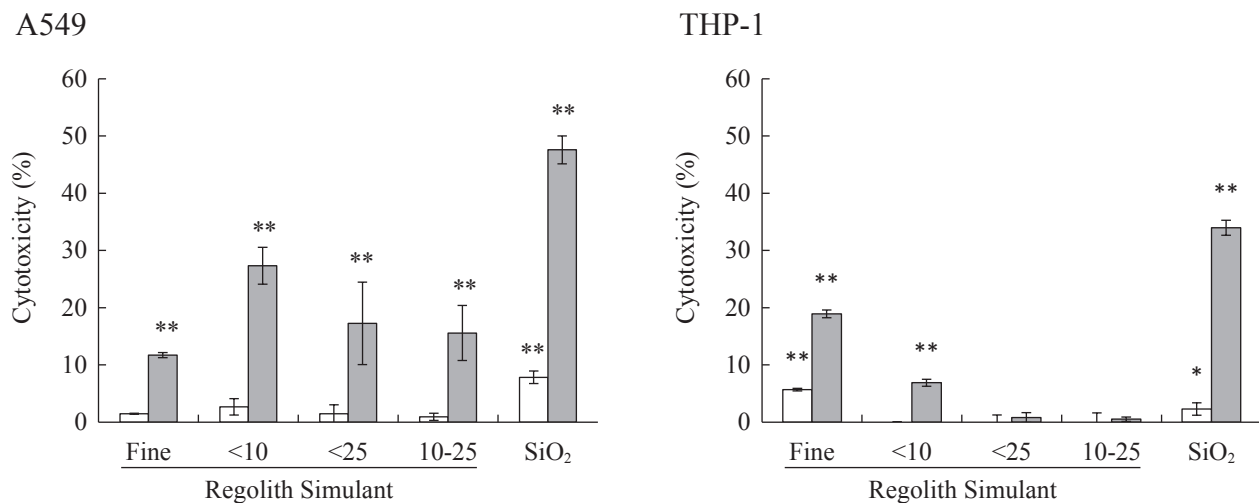


Fig. 1. Effect of dispersion of lunar regolith simulant on cell membrane damage. The regolith simulant dispersions were applied to A549 and THP-1 cells at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. After incubation for 24 h, cell membrane damage was measured by LDH assay. The method for calculating cytotoxicity is described in the "Materials and Methods" section, **: $P < 0.01$, *: $P < 0.05$ vs. unexposed cells, Dunnett, ANOVA, LDH: lactate dehydrogenase, □: 0.1 mg/ml, ■: 1.0 mg/ml.

においても 1.0 mg/ml のレゴリス分散液の投与によって、上清中への IL-8 の分泌と遺伝子発現の上昇が認められた。さらに、THP-1 細胞において、濃度 1.0 mg/ml の月レゴリスシミュラントを投与し、炎症性サイトカイン

IL-1 β および TNF- α の発現を検討した (Fig. 5)。IL-1 β 、TNF- α ともに培養上清中で有意に上昇した。一方で、投与 24 時間後の時点では、レゴリス分散液の投与による遺伝子発現の上昇は見られなかった。

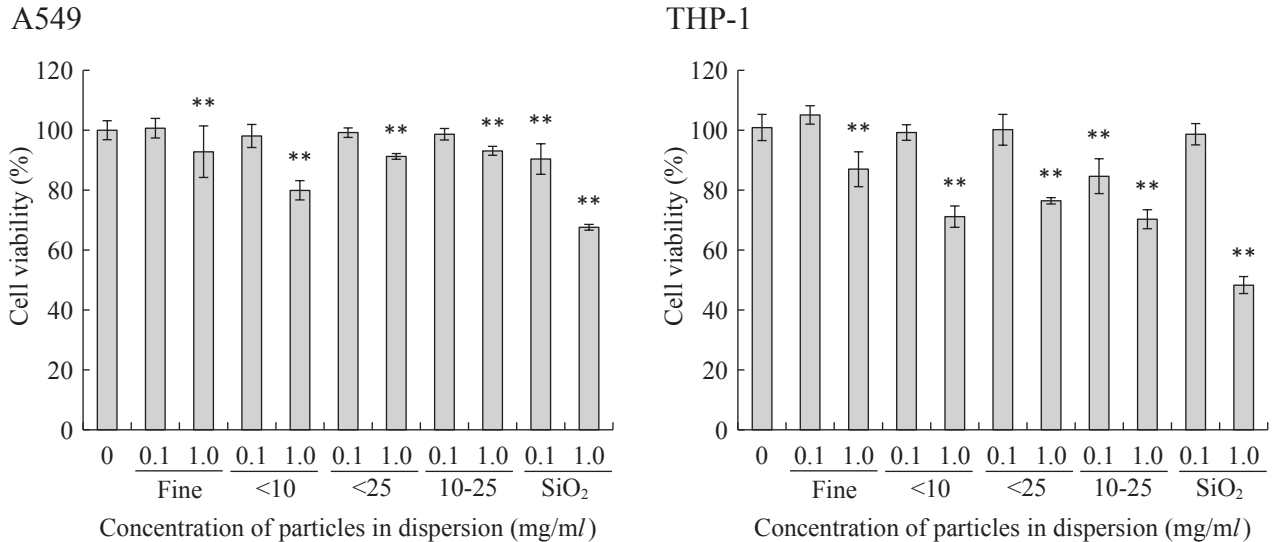
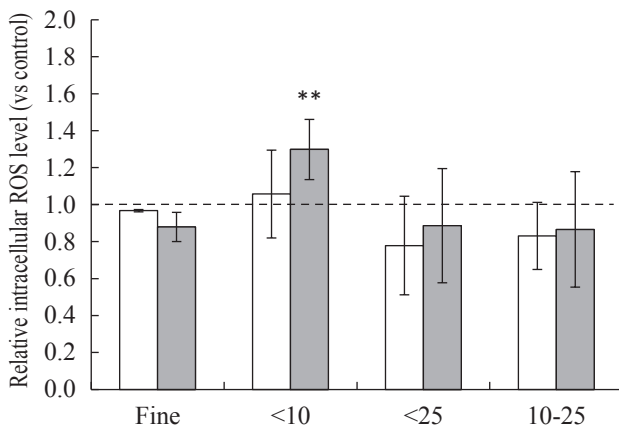


Fig. 2. Effect of dispersion of lunar regolith simulant on mitochondrial activity. The regolith simulant dispersions were applied to A549 and THP-1 cells at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. After incubation for 24 h, WST-1 assay was conducted. The percentage of WST-1 was normalized to the standardized unexposed cells (100%), ** $P < 0.01$ vs. unexposed cells, Dunnett, ANOVA.

A. Intracellular ROS level



B. HO-1 gene expression

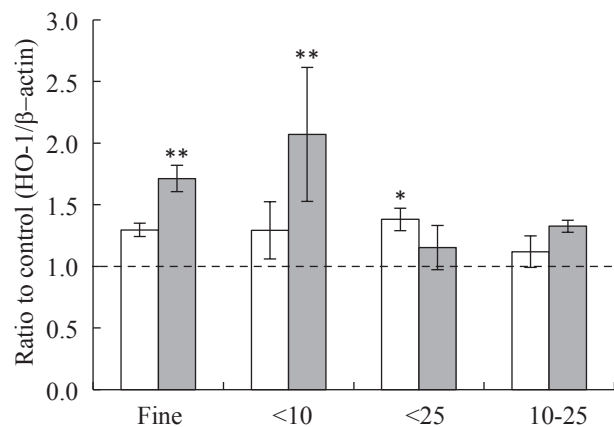
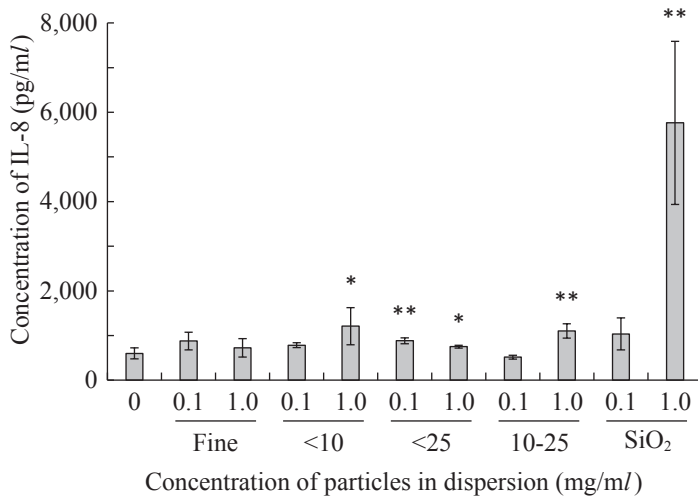


Fig. 3. Effect of dispersion of lunar regolith simulant on cellular oxidative stress. A549 cells were exposed to the lunar regolith simulant for 24 h at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. A: Intracellular ROS level in cells exposed to dispersions of lunar regolith simulant. The intracellular ROS level was measured using DCFH-DA. DCF fluorescence in cells was measured by flow cytometry. The value of DCF fluorescence-standardized untreated cells was 1. B: Gene expression of HO-1. The HO-1 gene expression was determined by real-time PCR. *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$ vs. unexposed cells, Dunnett, ANOVA, ROS: reactive oxygen species, PCR: polymerase chain reaction, □: 0.1 mg/ml, ■: 1.0 mg/ml.

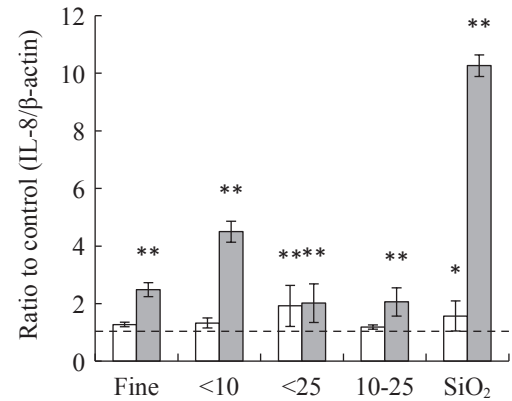
A. IL-8 protein concentration in culture medium

A549

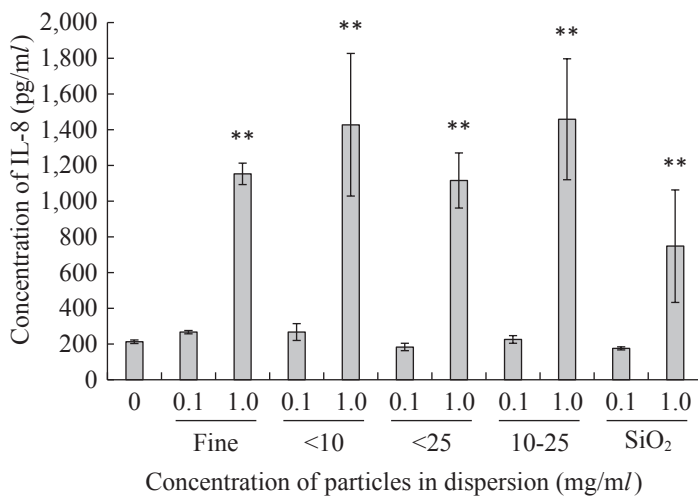


B. IL-8 gene expression

A549



THP-1



THP-1

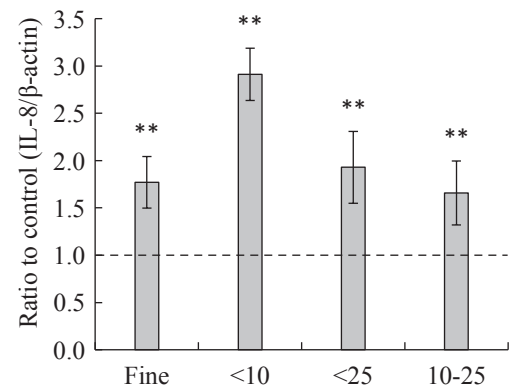
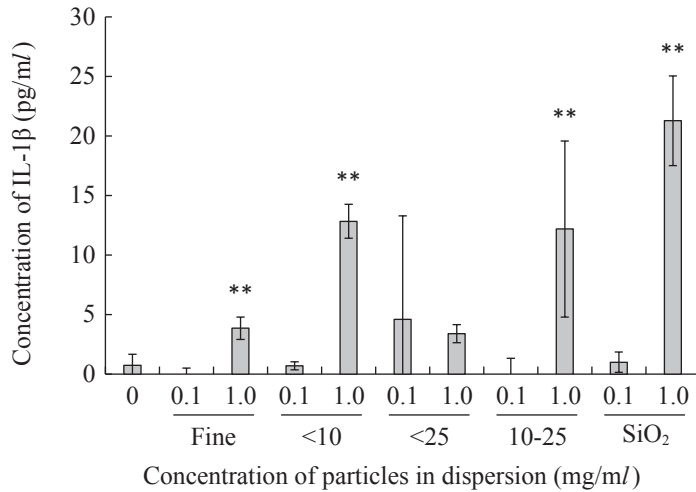


Fig. 4. Effect of dispersion of lunar regolith simulant on production of IL-8. A549 and THP-1 cells were exposed to the lunar regolith simulant for 24 h at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. A: IL-8 protein concentration in the culture medium. Concentration of IL-8 was determined by ELISA. B: Gene expression of IL-8. The IL-8 gene expression was determined by real-time PCR. *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$ vs. unexposed cells, Dunnett, ANOVA, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay, PCR: polymerase chain reaction, □: 0.1 mg/ml, ■: 1.0 mg/ml.

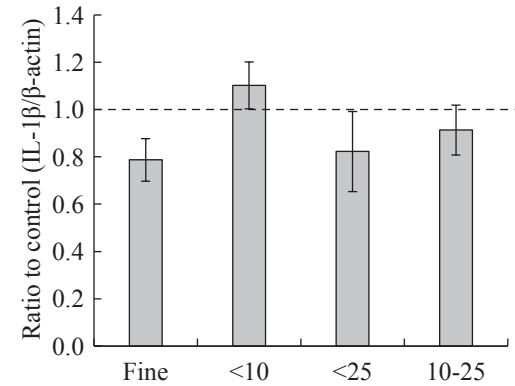
A. Protein concentration in culture medium

IL-1 β

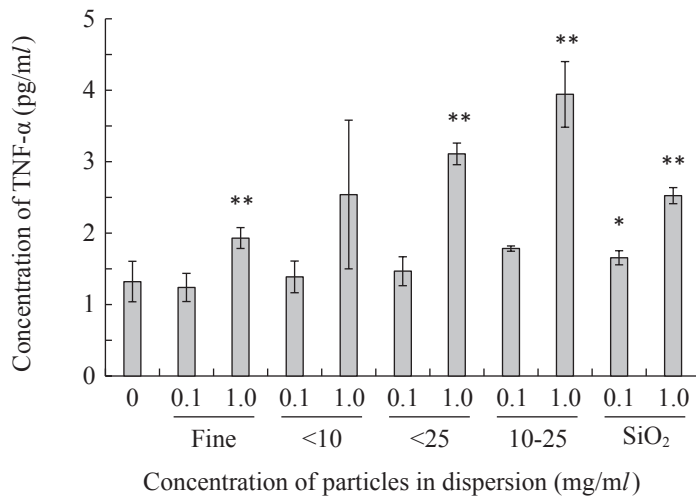


B. Gene expression

IL-1 β



TNF- α



TNF- α

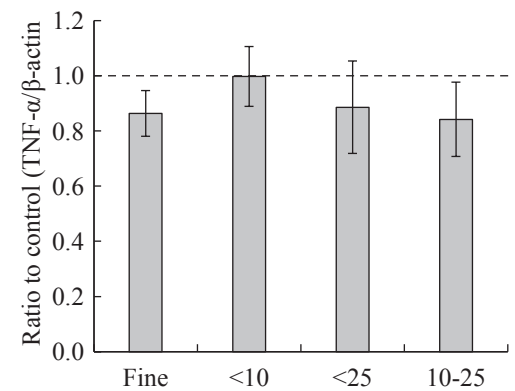


Fig. 5. Effect of dispersion of lunar regolith simulant on production of IL-1 β and TNF- α . THP-1 cells were exposed to the lunar regolith simulant for 24 h at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. A: IL-1 β and TNF- α protein concentration in the culture medium. Concentration of IL-1 β and TNF- α was determined by ELISA. B: Gene expression of IL-1 β and TNF- α . The IL-1 β and TNF- α gene expression were determined by real-time PCR. *: $P < 0.05$ and **: $P < 0.01$ vs. unexposed cells, Dunnett, ANOVA, PCR: polymerase chain reaction, ELISA: enzyme-linked immunosorbent assay.

考 察

本研究では、肺胞上皮細胞が初めに月レゴリスに曝露されると考えられることから、上皮細胞であるA549細胞について詳細な反応を検討した。また、免疫細胞であるTHP-1については、炎症誘発に焦点を絞り、特に炎症性サイトカインの分泌について検討した。レゴリス分散液は細胞膜損傷と細胞生存率の低下を示したが、この時の濃度は1.0 mg/mlで、0.1 mg/mlではこれらの影響は見られないか、非常に小さかった。さらに、細胞膜損傷は有害性が知られている結晶性シリカに比べ、小さかった。濃度1.0 mg/mlにおいては、レゴリス分散液中の月レゴリスシミュラントは、重力沈降によって細胞上に堆積しており、実際には細胞の曝露濃度はさらに高かったと考えられる。細胞に対して毒性を示す粒子は、細胞に酸化ストレスを生じることが多い[6]。レゴリス分散液を投与したA549細胞では、24時間後に1.0 mg/mlの<10画分のみで細胞内ROSレベルの上昇が認められたが、非投与細胞に比べ1.3倍程度であった。また、投与24時間時点での酸化ストレス応答タンパク質HO-1遺伝子の発現も上昇していた。これらの結果は、より小さい粒子を含むレゴリス分散液で、細胞に若干の酸化ストレスが生じたことを示唆する。さらに、濃度1.0 mg/mlのレゴリス分散液の投与では、A549, THP-1双方においてIL-8の分泌の上昇が認められた。炎症性サイトカインIL-1 β およびTNF- α は主にマクロファージによって分泌されることから、THP-1細胞においてレゴリス分散液投与によるIL-1 β およびTNF- α 分泌への影響を検討した。THP-1細胞においては、レゴリス分散液投与によりIL-8の分泌が認められたほか、IL-1 β とTNF- α の分泌も1.0 mg/mlで上昇した。一方で、投与24時間後の時点ではIL-1 β およびTNF- α 遺伝子の発現は非投与細胞と差がなかった。遺伝子発現はレゴリス分散液投与24時間後の時点の影響であるのに対し、上清中のタンパク質は24時間の間の蓄積を反映していることから、レゴリス分散液投与によって、炎症性サイトカインの分泌が上昇する可能性があるものの、24時間後には回復すると考えられた。レゴリス分散液の投与によって、上皮細胞およびマクロファージで細胞膜損傷、ミトコンドリア障害、酸化ストレス負荷およびサイトカインの分泌が認められたが、いずれも1.0 mg/mlの高濃度条件下であった。特に細胞内ROSレベルについては、1.0 mg/mlでもほとんど上昇は見られなかったことから、酸化ストレスが生じたとしても、HO-1の発現など抗酸化系の活性化によって、酸化ストレス状態には至っていないと考えら

れた。

以上の結果から、*in vitro*の系では月レゴリスの細胞に対する影響は小さいと考えられた。

一方、影響は小さいものの、細胞膜損傷や酸化ストレス負荷では、粒径の小さな粒子が含まれる画分で細胞影響がより強い傾向があった。すなわち、顕著ではないものの、<25画分よりも<10画分で細胞膜損傷や細胞内ROSレベルの上昇がより大きく、小さな粒子を含まない10-25画分では影響がもっとも小さい傾向があった。BET法による比表面積は、FJS-1の分画による<10画分で23.2 m²/g、<25画分で12.4 m²/gとおおよそ1.8倍程度の差があり、<10画分により小さな粒子径を持つ粒子が含まれると考えられた。一方で、JSC-1AVFの平均粒子径は5.10 μ mであったが、比表面積は<10よりも小さかった。<10の比表面積はJSC-1AVFの6倍程度であり、細胞影響の結果を単純に大きさのみで議論することは適切でない。粒子径が小さければ、単位重量当たりの粒子数が多くなることから、単純に曝露個数の影響かもしれない。

アポロとルナが持ち帰った月レゴリスの化学組成は、おおよそ40~50%をSiO₂が占める。本研究で用いた月レゴリスシミュラントFJS-1およびJSC-1AVFは、アポロ14号が持ち帰った月の土壌(Sample 14163)と類似の組成を持つ(Papike and Simon)。Sample 14163の主な組成はSiO₂ 47.3%、TiO₂ 1.6%、Al₂O₃ 17.8%、FeO 10.5%で、そのほかMgO 9.6%、CaO 11.4%などを含む。FJS-1とJSC-1AVFの間では、TiO₂とFeOで若干の相違があるものの、組成はおおむね同じであった。また、分画による組成の変化も見られなかった。さらに、粒子形状は分画の画分にかかわらず、いずれも不定形であった。このことから、本研究においては粒子形状の影響は考慮しなくてもよいと考えられるが、今後実際の月レゴリスの形状の比較検討が必要であろう。本研究では、月レゴリスと同様の組成を持つ月レゴリスシミュラントによる細胞影響を検討した結果、化学組成の面からの細胞影響は小さく、粒子径の影響もそれほど大きくないことが示された。しかし、月レゴリスの組成の50%近くをSiO₂が占めることは留意すべきである。今回用いた月レゴリスシミュラントに含まれるSiO₂の結晶型の決定は行っていないが、実際に月レゴリスに含まれるSiO₂の結晶型を決定することが必要だろう。

月面における月レゴリスと地球上の粒子のもっとも大きな相違は、重力の違いによる浮遊粒子の粒径のほか、表面に生物由来の有機物の吸着の有無である。地球上では、黄砂など環境中の粒子はその表面にエンド

トキシンや核酸などのさまざまな生体由来の物質や化学物質を吸着し、これらの吸着物質がアレルギー反応などの生体影響を引き起こすことが報告されている[7, 8]。しかし、月面には生物が存在しないことから、粒子表面への生体由来物質の吸着はない。一方で、月面ではレゴリスは宇宙放射線などの電磁波にさらされている。また、月レゴリスは粒子表面が摩耗しておらず、鋭利な状態のものがある、磁気を持つなどの違いもある。今後、化学組成以外の物理的性質を考慮した有害性評価が待たれる。

謝 辞

本研究は、ホソカワ粉体工学振興財団研究助成「月粉じんの有害性評価法の開発」により行った。

利 益 相 反

なし

引 用 文 献

1. NASA (2005): Don't Breathe the Moondust. NASA SCIENCE: SCIENCE NEWS Science@NASA April 22, 2005
2. Guo L, Zhu N, Guo Z, Li GK, Chen C, Sang N & Yao QC (2012): Particulate matter (PM10) exposure induces endothelial dysfunction and inflammation in rat brain. *J Hazard Mater* 213-214: 28-37
3. Chen T, Jia G, Wei Y & Li J (2013): Beijing ambient particle exposure accelerates atherosclerosis in ApoE knockout mice. *Toxicol Lett* 223: 146-153
4. 堀江祐範, 神原辰徳, 黒田悦史, 三木猛生, 本間善之, 青木滋, 森本泰夫 (2012): 月レゴリスによるアレルギー増悪効果の可能性. *産業医科大学雑誌* 34: 237-243
5. Papike JJ, Simon SB & Laul JC (1982): The lunar regolith: chemistry, mineralogy, and petrology. *Reviews of Geophysics* 20: 761-826
6. Horie M, Fujita K, Kato H *et al* (2012): Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics* 4: 350-360
7. Ichinose T, Yoshida S, Hiyoshi K *et al* (2008): The effects of microbial materials adhered to Asian sand dust on allergic lung inflammation. *Arch Environ Contam Toxicol* 55: 348-357
8. Ren Y, Ichinose T, He M, Song Y, Yoshida Y, Yoshida S, Nishikawa M, Takano H, Sun G & Shibamoto T (2014): Enhancement of OVA-induced murine lung eosinophilia by co-exposure to contamination levels of LPS in Asian sand dust and heated dust. *Allergy Asthma Clin Immunol* 10: 30
9. U.S. Silica Company (2008): Product data, MIN-USIL 5, fine ground silica, mill creek plant. U.S. Silica Company (Berkeley Springs, WV, USA)

Evaluation of Cellular Effects Caused by Lunar Regolith Simulant Including Fine Particles

Masanori HORIE^{1,2}, Takeo MIKI³, Yoshiyuki HONMA³, Shigeru AOKI³ and Yasuo MORIMOTO¹

¹ *Department of Occupational Pneumology, Institute of Industrial Ecological Sciences, University of Occupational and Environmental Health, Japan. Yahata-nishi-ku, Kitakyushu, 807-8555, Japan*

² *Health Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Takamatsu, Kagawa, 761-0395, Japan*

³ *Japan Aerospace Exploration Agency (JAXA), Sengen, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8505, Japan*

Abstract : The National Aeronautics and Space Administration has announced a plan to establish a manned colony on the surface of the moon, and our country, Japan, has declared its participation. The surface of the moon is covered with soil called lunar regolith, which includes fine particles. It is possible that humans will inhale lunar regolith if it is brought into the spaceship. Therefore, an evaluation of the pulmonary effects caused by lunar regolith is important for exploration of the moon. In the present study, we examine the cellular effects of lunar regolith simulant, whose components are similar to those of lunar regolith. We focused on the chemical component and particle size in particular. The regolith simulant was fractionated to $< 10 \mu\text{m}$, $< 25 \mu\text{m}$ and $10\text{-}25 \mu\text{m}$ by gravitational sedimentation in suspensions. We also examined the cellular effects of fine regolith simulant whose primary particle size is $5.10 \mu\text{m}$. These regolith simulants were applied to human lung carcinoma A549 cells at concentrations of 0.1 and 1.0 mg/ml. Cytotoxicity, oxidative stress and immune response were examined after 24 h exposure. Cell membrane damage, mitochondrial dysfunction and induction of Interleukin-8 (IL-8) were observed at the concentration of 1.0 mg/ml. The cellular effects of the regolith simulant at the concentration of 0.1 mg/ml were small, as compared with crystalline silica as a positive control. Secretion of IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) was observed at the concentration of 1.0 mg/ml, but induction of gene expression was not observed at 24 h after exposure. Induction of cellular oxidative stress was small. Although the cellular effects tended to be stronger in the $< 10 \mu\text{m}$ particles, there was no remarkable difference. These results suggest that the chemical components and particle size have little relationship to the cellular effects of lunar regolith simulant such as cell membrane damage, induction of oxidative stress and proinflammatory effect.

Key words: lunar regolith simulant, fine particle, cytotoxicity, oxidative stress, inflammation.