

北上川(宮城県石巻市)
信濃川(新潟県新潟市)
吉野川(徳島県徳島市)
琵琶湖(滋賀県大津市)
広島湾(広島県広島市)
洞海湾(福岡県北九州市)

(2) 採集方法

2006年12月に下水処理場では、返送汚泥を採集し、河川、湖沼及び海では、表層水及び大気と接触している波打際の表土を採集した。

(3) 調製方法

活性汚泥の均一性を保つため、上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液5Lと、約3ヶ月間培養した活性汚泥のろ液5Lとを混合して10Lとし、pHを7.0±1.0に調整して培養槽でばっ気した。

(4) 培養

培養槽へのばっ気を約30分間止めた後、全量の約1/3量の上澄液を除去した。これに脱塩素水道水を加え全量を10Lにして再びばっ気し(30分以上)、添加した脱塩素水道水中での合成下水濃度が0.1%になるように50g/L合成下水を添加した。この操作を毎日1回繰り返す、培養して活性汚泥とした。培養温度は25±2℃とした。

(5) 管理及び使用

活性汚泥の正常な状態を維持するため、培養中、上澄液の外観及び活性汚泥の生成状態を観察するとともに、活性汚泥の沈でん性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し、管理基準(「新規化学物質等に係る試験の方法について」参照)の範囲内であることを確認した。この結果を生データとして保管した。活性汚泥の生物相は適宜光学顕微鏡を用いて観察し、異常のないことを確認した上で試験に供した。また、合成下水を添加してから18時間後の活性汚泥を使用した。

(6) 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて活性汚泥使用開始前に活性度を点検した。なお、活性汚泥使用開始日は、2007年1月16日であった。

B-3 試験の実施

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

活性汚泥の添加量を決定するために、「工場排水試験方法、懸濁物質」(JIS K 0102-1998 の14.1)に準じて懸濁物質濃度を2007年2月19日に測定したところ、活性汚泥の懸濁物質濃度は3620mg/Lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法、生物化学的酸素消費量」(JIS K 0102-1998 の21.)に定められた組成のA液、B液、C液及びD液それぞれ3mLに精製水(高杉製薬製 日本薬局方)を加えて1Lとし、pHを7.0に調整した。

(3) 試験液の調製

試験容器を6個用意し、試験液を下記の方法で調製した。これらの試験液について、(4)の条件で培養を行った。

(a)(水+被験物質)系(1個, 試験容器[1])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に精製水300mL及び供試試料30mgを入れた。供試試料は電子分析天びんで正確にはかりとり添加した。

(b)(汚泥+被験物質)系(3個, 試験容器[2][3][4])

被験物質濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量(2.49mL)を差し引いた量]及び供試試料30mgを入れた。供試試料は電子分析天びんで正確にはかりとり添加した。

(c)(汚泥+アニリン)系(1個, 試験容器[6])

アニリンの濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量(2.49mL)を差し引いた量]及びアニリン29.5μL[添加量30mg=29.5μL×1.022g/cm³(密度)]を入れた。アニリンはマイクロシリンジで分取して添加した。

(d) 汚泥ブランク系(1個, 試験容器[5])

試験容器に基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量(2.49mL)を差し引いた量]を入れた。

(2) 活性汚泥の接種

(b)、(c)及び(d)の試験液にB-2.の条件で調製した活性汚泥を懸濁物質濃度として30mg/Lになるように接種した。

(3) 試験液培養装置及び環境条件

試験液培養装置には、閉鎖系酸素消費量測定装置(恒温槽及び測定ユニット:大倉電気製、データ処理装置:旭テクネイオン製)を使用した。試験容器には、炭酸ガス吸収剤としてソーダライム, Na1 (和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用)を装着した 300mL 用培養瓶(改良型培養瓶)を使用した。

試験液培養温度は 25±1℃の範囲となるように調整し、試験液培養はマグネチックスターラーによる回転撹拌を行いながら遮光下で 28 日間行った。

(4) 観察及び測定

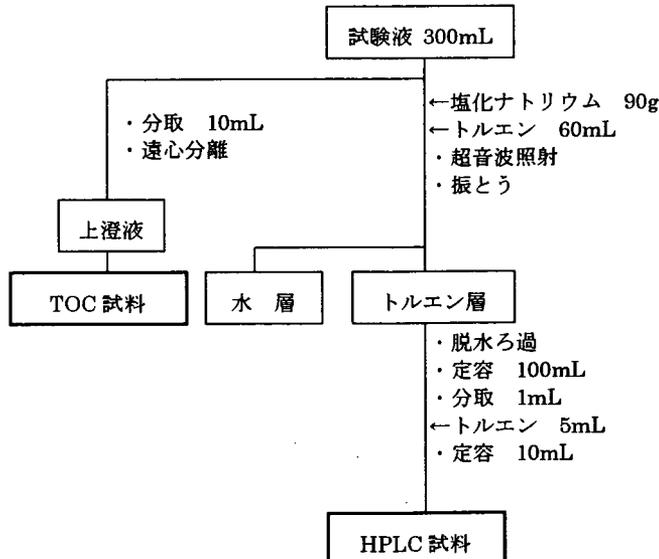
培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察し、装置の作動状況を適宜点検した。また、生物化学的酸素消費量(BOD)の変化を連続的にデータ処理装置で自動記録して測定した。槽内温度は毎日測定記録した。

B-4 試験液の分析

培養期間終了後、試験液中の溶存有機炭素及び被験物質について分析した。なお、(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の試験液の pH を測定した。

(1) 試験液の前処理

(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系及び汚泥ブランク系の試験液について以下のフロースキームに従って前処理操作を行い、溶存有機炭素(DOC)を分析するための全有機炭素分析法(TOC)試料並びに被験物質を分析するための高速液体クロマトグラフィー(HPLC)試料を調製した。



(2) DOC の定量分析

前処理を行って得られた TOC 試料について、全有機炭素計(島津製作所製:TOC-5000A)を用い DOC を分析した。

TOC 試料中の DOC 濃度は、全炭素(TC)濃度から無機炭素(IC)濃度を差し引いて求めた。TC 濃度及び IC 濃度は TC 標準溶液 80.0mgC/L 及び IC 標準溶液 80.0mgC/L と TOC 試料のピーク面積とを比較し比例計算して求めた。なお、TC 標準溶液はフタル酸水素カリウムを精製水に溶解し、IC 標準溶液は炭酸水素ナトリウム及び炭酸ナトリウムを精製水に溶解して調製した。

定量下限濃度は DOC 濃度 1.0mgC/L とした。

(3) HPLC による定量分析

前処理を行って得られた HPLC 試料について、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。HPLC 試料中の被験物質の濃度は、クロマトグラム上で得られた標準溶液 30.0mg/L のピーク面積と HPLC 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた。ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 310000µV・sec(被験物質濃度 1.5mg/L)とした。

ポンプ 島津製作所製 LC-10ADVP

検出器 島津製作所製 SPD-10ADVP

カラム L-column ODS(15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)

カラム温度 40℃

溶離液 トルエン/メタノール(50/50 V/V)

流量 0.2mL/min

測定波長 335nm

注入量 10µL

検出器出力 2V/AU

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。被験物質 100mg を正確にはかりとり、トルエンに溶解して 1000mg/L の被験物質溶液を調製した。これをトルエン/メタノール(6/4 V/V)で希釈し 30mg/L の標準溶液とした。標準溶液の調製と同様にして 15.0、30.0 及び 60.0mg/L の標準溶液を調製した。これらを HPLC の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成し

た。

(4) 回収試験及びブランク試験

B-4(1)の前処理における試験液からの被験物質の回収率を求めるため、B-3(3)に準じて調製した(水+被験物質)系及び(汚泥+被験物質)系の試験液について B-4(1)に従い、回収試験を行った。また、B-3(3)に準じて調製した汚泥ブランク系の試験液について回収試験と同じ操作によりブランク試験を行った。回収試験については各2点、ブランク試験については1点測定した。

B-5 分解度の算出法

分解度は下記の式に基づき算出し、小数点以下1ケタ目を丸めて整数位で表示した。なお、数値の丸め方は、JIS Z 8401:1999 規則Bに従った。

(1) BOD 分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{BOD} - \text{B}}{\text{TOD}^{*5}} \times 100$$

BOD : (汚泥+被験物質)系の BOD(mg)

B: 汚泥ブランク系の BOD(mg)

TOD: 被験物質が完全に酸化された場合に必要とされる理論的酸素消費量(計算値)(mg)

		(水+被験物質)系		(汚泥+被験物質)系		理論量
		[1]	[2]	[3]	[4]	
BOD	mg	1.0	3.4	3.4	2.8	79.8
DOC 検出量及び検出率	mgC	0	0	0.4	0	30.0
	%	0	0	1	0	-
被験物質残留量及び残留率(HPLC)	mg	28.9	29.3	28.1	28.7	30.0
	%	96	98	94	96	-

(2) 被験物質分解度

$$\text{分解度 (\%)} = \frac{\text{Sw} - \text{Ss}}{\text{Sw}} \times 100$$

Ss: (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値)(mg)

Sw: (水+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値)(mg)

C. 研究結果

C-1 観察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した結果、装置の作動状況に異常はなかった。槽内温度は 25±1℃の範囲であった。

C-2 試験液の状況

試験液の状況は下記のとおりであった。

培養開始時では、被験物質は溶解せず、試験液は無色であった。培養終了時では、(水+被験物質)系には不溶物が認められ、試験液は無色のままであった。pHは6.7であった。(汚泥+被験物質)系にも汚泥以外の不溶物が認められた。3点のうち1点のみ褐色に着色していた。pHは3点とも7.2であった。

C-3 回収試験及びブランク試験

ブランク試験においてクロマトグラム上、被験物質ピーク位置にはピークは認められなかった。分析操作における各2点の回収率及び平均回収率は下記のとおりであり、平均回収率を試験液中の被験物質濃度を求める場合の補正值とした。

(水+被験物質)系回収率

97.6%, 98.7% 平均 98.1%

(汚泥+被験物質)系回収率

94.8%, 99.4% 平均 97.1%

C-4 分析結果

28日後の分析結果は下記のとおりであった。

なお、(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に被験物質はほぼ理論量残留し、HPLCクロマトグラム上に被験物質以外のピークは認められなかった。よって、変化物は生成しなかったと判断された。

C-5 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

BODによる分解度は、-2%, -2%, -2%(平均)

-2%)であり、HPLC による被験物質の分解度は、-1%、3%、1%(平均 1%)であった。

D. 考察

(汚泥+被験物質)系 3 点のうち 1 点のみ褐色に着色していた。pH は 3 点とも 7.2 であり、また、HPLC クロマトグラムのパターンにも差異はなかった。更に TOC 分析より、水溶性の変化物の存在も認められなかった。目視観察による相異はあったものの、直接分析の結果より、一部変化した様子は認められなかったことから、目視観察の相異は極微量の状態の変化によるものと考えられる。

本試験条件は、OECD テストガイドライン 301C に準拠したものであり、使用した活性汚泥は、国内の限定された地域の環境条件を均質にしたものであり、処理場汚泥などを使用した場合の本質的な生分解の有無を結論付けるものではないと考えられる。よって、更に異なる環境条件での試験を実施し、確認することが望まれる。特に、光による変化の有無についても調査する必要があるであろう。

E. 結論

本試験条件下において、フラーレン(C60)は微生物により分解されなかった。今後、他の環境条件を考慮した試験や他のナノマテリアルについて体系的な環境運命調査が必要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの脂質二重膜との相互作用および
細胞内導入に関する基礎的研究

分担研究者 新井洋由 東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学 教授

研究要旨

ナノマテリアルの物性を適切に考慮した健康影響評価研究を確立する為には、まずナノマテリアルの生体成分との相互作用に関する基本的な性質等を把握しておく必要がある。そこで、まず代表的なナノマテリアルとしてフラーレンに焦点をあて、生体成分である脂質二重膜との相互採用や細胞内導入に関する生化学的特性を明らかにすることを目的として研究を行った。本年度は、フラーレン C60 を内包したリポソームを作成し、培養腹腔マクロファージに添加し、C60 の細胞内導入を試みた。その結果、細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が引き起こされることが示されたが、細胞増殖性に関する急性毒性は認められなかった。

A. 研究目的

フラーレンやカーボンナノチューブに代表されるナノサイズの新素材であるナノマテリアルは薬物輸送を含む医療への展開を初めとした各種の応用が急速に進んでいる。他方、ナノマテリアルそのもの生体影響については、多くの点で未知であり、近年、神経系や免疫系への影響や DNA 障害などの懸念を示す報告はされているものの、その物性を適切に考慮した健康影響評価研究はほとんど行われていない状況である。しかし、物性を適切に考慮するためには、ナノマテリアルの生体成分との相互作用に関する基本的な性質等を把握しておく必要がある。本研究では、まず代表的なナノマテリアルとしてフラーレンに焦点をあて、生体成分である脂質二重膜との相互採用や細胞内導入に関する生化学的特性を明らかにすることを目的としている。

B. 研究方法

フラーレンは水にほとんど溶けないばかりでなく、

有機溶媒にも非常に溶けにくい性質をもつ。このため、特に水を基本環境に持つ生物に対するフラーレンの効果を調べるには大きな障害がある。一方生体膜を構成するリン脂質は、生体膜において二重層構造をとっているが、その厚さとフラーレンの直径から考えるとその脂肪酸鎖よりなる疎水環境にフラーレンが入り込む可能性が十分考えられる。そこで本年度の研究において、まず、有機溶媒に溶かしたフラーレンをリン脂質人工膜(リポソーム)に組み入れられるかの実験を試みた。さらに我々はこれまでの実験からリン脂質の一つであるホスファチジルセリンを含むリポソームが培養マクロファージに効率よく取り込まれることを実験的に明らかにしてきたので、このアッセイ系を用いて、リポソームに組み込まれたフラーレンが培養マクロファージに対してどのような影響を及ぼすか予備的検討を行った。1) フラーレンサンプル Nanom purple KN 100mg をキシレン 10ml に溶解したところ、30-40 %程度が溶解した(図1)。クロロホルム、ベンゼンではほとんど溶解性を示さなかった。キシレン溶解

液を濾過し、 -20°C 保存したものを以下の実験に用いた。

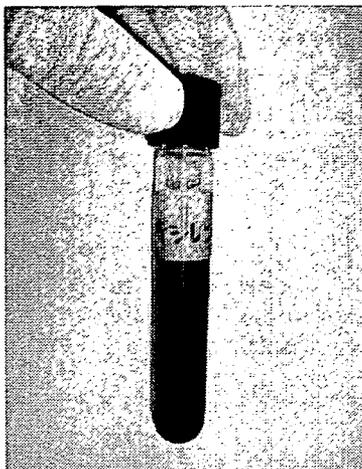


図1:100mg/10ml キシレンでは完全に溶解しない。
(50%も溶解していない)
そのため、ろ紙で濾過後使用した。

2) 多重層(マルチラメラ)リポソームの調整は以下のように行った。卵黄由来ホスファチジルコリン、牛脳由来ホスファチジルセリン、コレステロール(1:1:0.5、モル比)(以上の脂質はクロロホルム:メタノール、2:1に溶解しておいたもの)、およびキシレンに溶解したフラーレン溶液を、ナスコルベンにとりロータリーエバポレーターにて有機溶媒を完全に留去する。次に、褐色デシケーター中にて1時間以上、真空ポンプにて減圧し、さらに完全に溶媒を除く。クリーンベンチ内にて滅菌した0.3M グルコース溶液を加え、Vortex mixer を用いて激しく攪拌し、多重層リポソームを調整した。

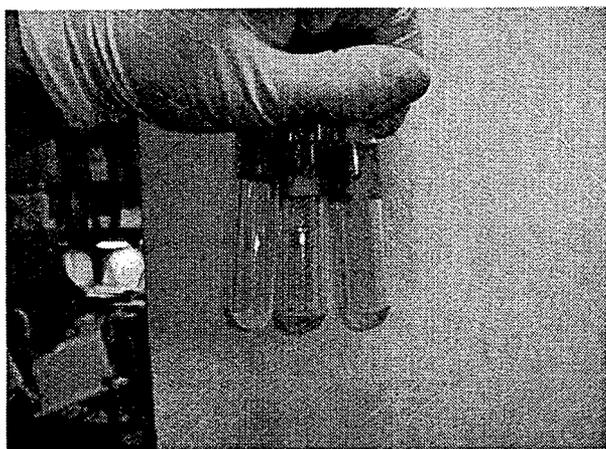


図2:リピッドフィルムをグルコース溶液で Sonication した後

のリポソーム溶液。左から、PC/PS リポソーム、PC/PS/フラーレンリポソーム、フラーレンの順

3) マウス腹腔マクロファージは以下のように調整した。ICR マウス(8~12週齢)の腹腔中にHBSS バッファーを注射し腹部をよくマッサージした後、シリンジもて腹腔液を集め、遠心(1,200rpm 5分)後、RPMI1640 メディウム(10%FCS,100U ストレプトマイシン、ペニシリンを含む)にサスペンドする。この細胞懸濁液をシャーレにまき、2時間、CO₂ インキュベーター内にて放置後、HBSSにて、浮遊細胞を3回洗浄し、付着細胞を得る。この付着細胞の90%以上がマクロファージである。これに RPMI1640 メディウムを加え、CO₂ インキュベーター内で培養した。

しばらく置いておくと沈殿物ができること、大きな固まりが混入してしまうことから0.45 μm のフィルターで通過したものを M₀ に添加した。

C. 研究結果

コントロールを含め、1:グルコース溶液のみ、2:フラーレンのみ、3: PC/PS/リポソーム、4:PC/PS/フラーレンリポソームをマクロファージに添加し、細胞形態を観察した(図3)。1日後、1、2の添加条件では泡沫化は観察されず目立った変化はなかった。一方、3、4の添加条件では細胞内に脂質ドロプレットが観察され泡沫化が起こっていた。次に上記と同様の条件で細胞毒性を調べた。細胞毒性は Cell Counting Kit (同仁化学)を用いて経時的に評価した(図4)。リポソーム添加後、1-7日後までの毒性を調べたところ、1、2の添加条件では無添加時とほとんど変化がなかった。一方、リポソーム添加群の3、4でも毒性は見られず、むしろ細胞の増殖が観察された。しかしながらこれはフラーレンの有無で有為な差は見られず、細胞毒性は観察されなかった。

D. 考察

今回、フラーレンを内包したリポソームをマクロファージに添加した結果、マクロファージ内にフラーレンが取り込まれる様子が観察された。更にこれらフラーレンを取り込んだマクロファージにおいて急性毒性は

観察されなかった。しかしながらマクロファージに取り込まれたフラレンの量が明らかでない。フラレンの定量系を構築し、調整したリポソームにおけるフラレン、マクロファージに取り込まれたフラレンを定量する必要がある。

E. 結論

フラレン C60 を内包したリポソームを作成し、培養腹腔マクロファージに添加し、C60 の細胞内導入を試みたところ、細胞内に脂質ドロップレットが観察され泡沫化が引き起こされることが示されたが、細胞増殖性に関する急性毒性は認められなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

なし

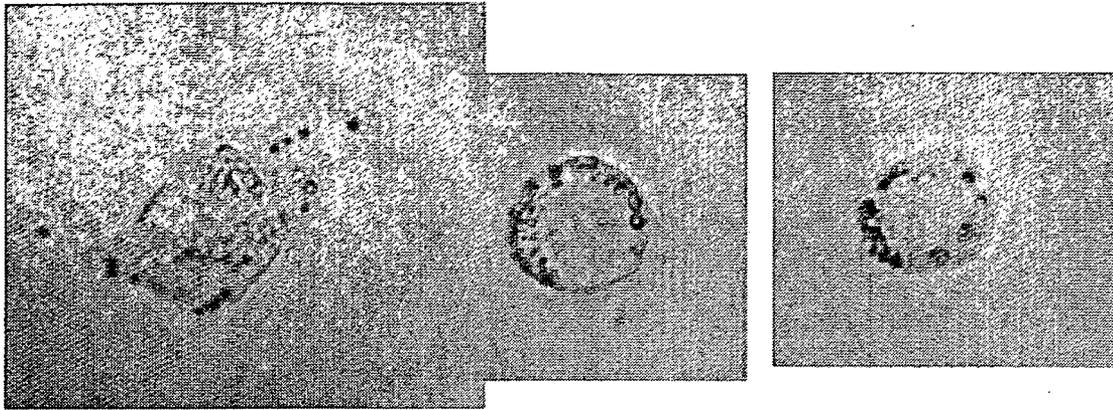


図3:PC/PS/フラベレンリポソームを添加1日後の Mφ を撮影したもの

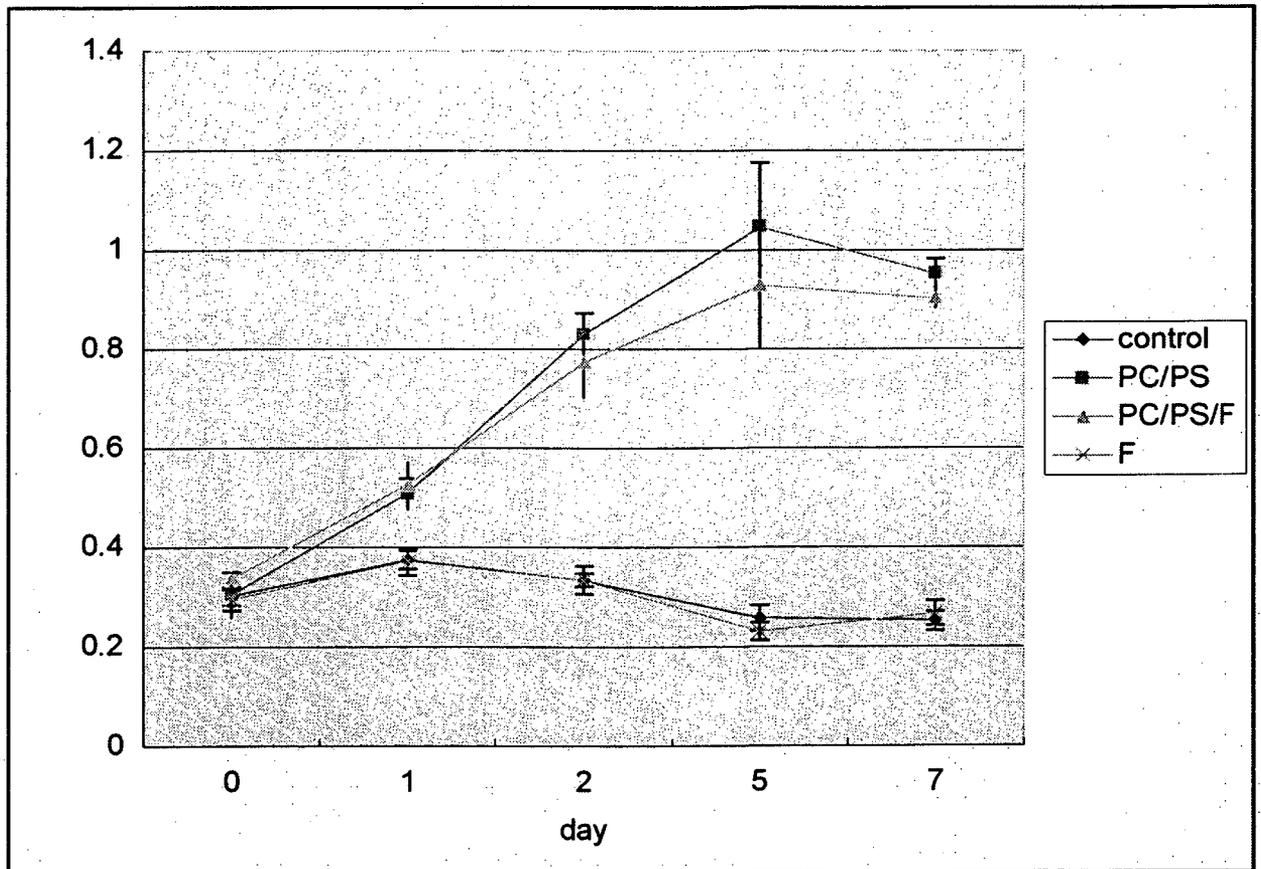


図4:PC/PS/フラベレンリポソームを添加後、MTT assay により Mφ の生存率を測定した。
(0、1、2、5、7日、それぞれ N=4)

リポソームを添加した群では、有為に細胞数の増加が見られた。
一方、リポソームを添加していない群では大きな細胞数の変化は見られなかった。
いずれの群においてもフラベレンの有無による生存率の違いは僅かであった。

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名:ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための遊戯性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名:ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的研究

分担研究者:本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

ナノ粒子の一つである超微粒子酸化チタン(TiO_2)について、その *in vitro* 遺伝毒性を評価した。 TiO_2 をチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞で 72 時間処理したところ、強い細胞毒性と、小核の誘発が観察された。また、ヒトリンパ芽球 TK6 細胞で 48 時間処理したところ、コメット試験による DNA の損傷と、小核の誘発が観察された。その後、TK 突然変異の誘発も用量依存的に観察された。全ての遺伝毒性エンドポイントで陽性を示したことから、 TiO_2 は *in vitro* において遺伝毒性を有すると考えられる。しかしながら、その用量と反応の程度を考慮すると、その強さは大きくはない。培養液中で TiO_2 は凝集しナノ状ではないこと、 TiO_2 の毒性は光照射により増強されるとの報告があることを考慮すると、ナノ物質としての TiO_2 の遺伝毒性評価にはさらなる検討が必要である。

キーワード;ナノ粒子、酸化チタン(TiO_2)、遺伝毒性、DNA 損傷、突然変異

A. 研究目的

ナノテクノロジーの中心的役割を担い、且つ今後その利用が広範になると思われるナノサイズ物質が、生体内に侵入した場合の有害性を予測・評価する一環として、その遺伝毒性、細胞毒性に着目して研究をおこなう。本年度は、超微粒子酸化チタン(TiO_2)について、その *in vitro* 遺伝毒性を評価した。

B. 研究方法

1) 試験化合物

超微粒子酸化チタン (TiO_2 ; LU175)は石原産業株

式会社から提供を受けた。平均一次粒子径 20 nm。ルチル型。表面処理は施されていない。 TiO_2 を細胞培養液に懸濁し、試験化合物とした。

2) CHL 細胞による試験

チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞を TiO_2 で 72 時間処理し、処理期間中の細胞増殖と、その後の小核誘発を検討した。

3) TK6 細胞による試験

ヒトリンパ芽球細胞 TK6 細胞を TiO_2 で 48 時間処理し、生存率、コメット試験による DNA 損傷性、小核誘発性を検討した。また、72 時間の発現時間を置い

た後、チミジンキナーゼ(TK)遺伝子をターゲットとした遺伝子突然変異の検討のため、細胞を選択薬剤下で再はん種した。

(倫理面への配慮)

本研究で使用したヒト細胞は米国 American Type Culture Collection (ATCC)に登録済みの株化細胞で、国際的に広く普及している細胞であり、倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) CHL 細胞による試験

10⁴/5ml dish で調整した CHL 細胞に TiO₂ 懸濁液を 0.3125、0.625、1.25、2.5 mg/ml になるように添加し、72 時間培養後、その細胞増殖性と、小核誘発性を検討した(図1)。最低用量の 0.3125mg/ml で細胞毒性が現れ、0.625mg/ml まで用量依存性のある小核の誘発が観察された。それ以上の濃度では、細胞毒性のため小核頻度は逆に下がった。小核の最大誘発頻度は無処理の約 2 倍程度であった。

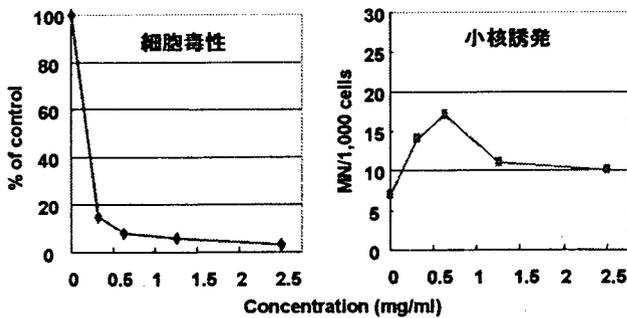


図 1

2)TK6 細胞による試験

10⁶/5ml flask で調整した TK6 細胞に TiO₂ 懸濁液を 0.3125、0.625、1.25、2.5 mg/ml になるように添加し、48 時間培養後、生存率、コメット試験による DNA 損傷性、小核誘発性を検討した(図2)。用量依存的な細胞毒性と、DNA 損傷が観察されたが、その程度は軽微であった。また、小核の誘発も観察されたが、その程度は低かった。その後行った TK 突然変異試験においても、用量依存的な突然変異の増加が観察さ

れた(図2)。最高用量での突然変異の増加は、無処理対照群の約 5 倍であった。

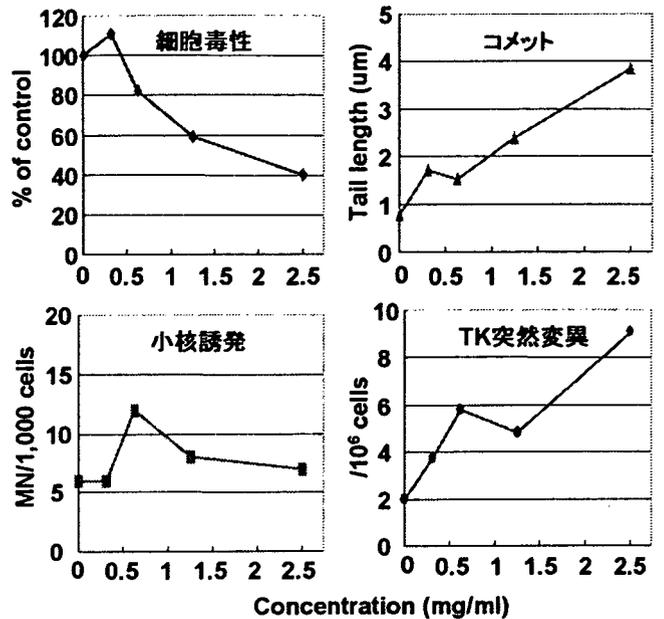


図 2

3) 細胞処理時の TiO₂ の状態

TK6 細胞を TiO₂ で処理した際の状態を顕微鏡で観察した。細胞は CFP でラベルした HistoneH3 タンパクを発現するため、核が青色を呈する。細胞の大きさを考慮すると、TiO₂ 懸濁物は約 1um の直径をもつ(図3)。

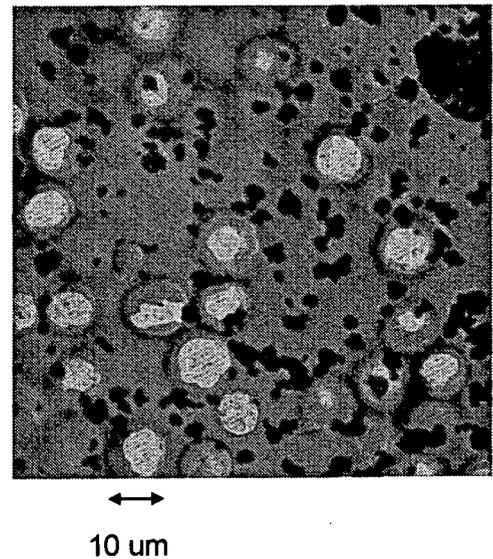


図 3

D. 考察

TiO₂ は難溶性の粒子物質で白色色素として、ペン

キ、紙、プラスチック、溶接棒のコーティング物質、食品着色料等に広く用いられている。また、近年ナノサイズの TiO_2 は化粧品や、医薬品等に使用されるようになった。通常、またはナノサイズの TiO_2 はヒト、および動物では生物学的に不活化物質とされている。しかしながら最近、動物実験や疫学的研究からナノサイズの TiO_2 の暴露により、肺の炎症、繊維化、さらには肺ガンの発生等が起こることが指摘されている。

細胞レベルにおいてもナノサイズ TiO_2 は線維芽細胞、リンパ球細胞において、細胞毒性を示し、小核や、姉妹染色体交換、遺伝子突然変異を誘発することが報告されている。これら遺伝毒性の程度は強くないが、再現性があるため、弱いながらも TiO_2 は遺伝毒性物質と考えられる。

今回の我々の研究結果もこれら報告を支持するものである。DNA 損傷性、小核誘発性、TK 遺伝子突然変異は全て陽性を示した。CHL では低濃度から毒性を示したが、それはおそらく TiO_2 の凝集物が細胞表面を圧迫するため、物理的損傷による影響と考えられる。しかしながら、低濃度領域では濃度依存的に小核の誘発が観察されたことから、小核誘発の遺伝毒性は細胞毒性の影響だけとは思われない。ナノ物質のような不溶性物質の *in vitro* 試験にはリンパ球のような浮遊性細胞の方が適しているのかもしれない。

細胞処理時の TiO_2 を観察したが、そのほとんどは凝集し、約 1 μm の直径をもつ不溶物であった。従って、厳密にはこれら試験結果はナノサイズの TiO_2 を評価したものでではない。懸濁方法の検討や、フィルター濾過等により、細胞処理レベルでナノサイズ TiO_2 の評価が必要と考える。

TiO_2 の遺伝毒性のメカニズムに関してはほとんどわかっていない。直接的 DNA 損傷作用は存在するが、極めてよわいため非遺伝毒性的作用によるのかもしれない。 TiO_2 は細胞増殖を抑制することから、細胞分裂装置に影響を与え、染色体の非分離を介して小核を誘発するとの説もある。

一方、 TiO_2 は光を照射することにその毒性が増強することが報告されている。この反応は、カタラーゼや、SOD の処理によって抑制されることから、損傷に

は過酸化水素や、活性酸素の産生が関与するものと考えられる。 TiO_2 は化粧品等に使用されていることから、光によるその毒性の影響を検討することは重要な課題である。*In vitro* 遺伝毒性試験で、光照射の影響を検討することが時期のテーマである。

E. 結論

ナノ粒子の一つである超微粒子酸化チタン(TiO_2)について、その *in vitro* 遺伝毒性を評価した。 TiO_2 をチャイニーズハムスター由来 CHL 細胞で 72 時間処理したところ、強い細胞毒性と、小核の誘発が観察された。また、ヒトリンパ球 TK6 細胞で 48 時間処理したところ、 comet 試験による DNA の損傷と、小核の誘発が観察された。その後、TK 突然変異の誘発も用量依存的に観察された。全ての遺伝毒性エンドポイントで陽性を示したことから、 TiO_2 は *in vitro* において遺伝毒性を有すると考えられる。しかしながら、その用量と反応の程度を考慮すると、その強さは大きくはない。培養液中で TiO_2 は凝集しナノ状ではないこと、 TiO_2 の毒性は光照射により増強されるとの報告があることを考慮すると、ナノ物質としての TiO_2 の遺伝毒性評価にはさらなる検討が必要である。

F. 健康危機情報

特になし

G. 研究発表

I. 論文発表

Koyama, N., Sakamoto, H., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Hayashi, M., Matsufuji, H., Yamagata, K., Masuda, S., Kinae, N., and Honma, M. Genotoxicity of acrylamide and glycidamide in human lymphoblastoid TK6 cells. *Mutat. Res.*, 603, 151-158 (2006)

Oka, H., Ikeda, K., Yoshimura, H., Ohuchida, A., Honma, M. Relationship between p53 status and 5-fluorouracil sensitivity in 3 cell lines. *Mutat. Res.*, 606, 52-60 (2006)

Umebayashi, Y. Honma, M., Abe, T., Ryuto, H. Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M., Yatagai, F. Mutation induction after low-dose carbon-ion beam irradiation of frozen human cultured cells. *Biological Sci. in Space*, 19, 237-241 (2005)

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the in vivo Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)

Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge, E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)

Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)

Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 248-257 (2007)

2. 学会発表

本間正充 *In vitro* コメット試験は遺伝毒性のエビデンスになりうるか？日本環境変異原学会 MMS 研究会 第 49 回定例会 (2006.5)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Error-prone and error-free nonhomologous end-joining for repairing DNA double strand breaks in human cells. 36th Annual Meeting of the European Environmental Mutagen Society (2006.7)

Honma M., Yamakage K. *In vitro* Comet assay—A possible candidate as a member of the standard test battery. JaCVAM/MMS Joint Seminar—Pros & Cons of Comet Assay— (2006.8)

本間正充、高島良生、安井学、谷田貝文夫、鈴木雅雄、林 真 低放射繊維による相同組換え修飾効果 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

谷田貝文夫、梅林志浩、本間正充、阿部知子、鈴木ひろみ、島津徹、石岡憲昭、岩本正哉 ISS 利用実験計画：宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

高島良生、櫻庭真弓、小泉朋子、坂本浩子、安井学、林 真、本間正充 ヒト細胞に誘導された DNA 二重鎖切断修復とその細胞周期依存性 日本放射線影響学会第 46 回大会 (2006.9)

Kohara A., Ozawa Y., Ohtani A., Shioda S., Takeuchi K., Morita K., Hirano T., Honma M., Suzuki T., Masui T., Mizusawa H. High resolution genomic analysis of immortal human cells and tumor cells using array-based comparative genomic hybridization. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Luan Y., Honma M., Suresh T., Kogi M., Yamaguchi T., Suzuki T. CGH and SNP array are powerful tools for chromosome analysis. Environmental Mutagen Society 37th Annual Meeting (2006.9)

Matsufuji H., Chino M., Hayashi M., Honma M., Yamagata K. Genotoxicity of quercetin in the presence of reactive oxygen species using human lymphoblastoid TK6 cells. Environmental Mutagen

Society 37th Annual Meeting (2006.9)

本間正充、鈴木雅雄、谷田貝文夫 染色体切断に対する放射線影響の検討 日本宇宙生物科学会第20回大会(2006.9)

梅林志浩、菅澤薫、本間正充、島津徹、鈴木ひろみ、石岡憲昭、岩本正哉、谷田貝文夫 放射セン適応応答による突然変異の抑制 ISS 利用実験計画:宇宙環境の突然変異に及ぼす影響の推定 日本宇宙生物科学会第20回大会(2006.9)

Honma M., Sakuraba M., Koizumi T., Takashima Y., Sakamoto H. and Hayashi M., Requirement of p53 for maintenance of chromosome integrity against DNA double strand breaks. DNA Repair 2006 (2006.9)

本間正充 DNA2 本鎖切断修復によるゲノム安定化機構 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

斉藤美香、高島良生、坂本浩子、林 真、松藤寛、山形一雄、本間正充 簡便な in vitro コメット試験法の確立とその評価 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

小山直己、加藤竜也、本間正充、林 真、増田修一、木苗直秀 ヒトリンパ芽球トランスジェニック細胞を用いたアクリルアミドおよびグリシダミドの遺伝毒性試験 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

谷田貝文夫、梅林志浩、鈴木雅雄、岩本正哉 染色体特定部位 DSB の修復:低線量/低線量率ガンマ線照射による影響 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、林 真、本間正充 ライブセルイメージングによる小核の運命の追跡 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

松藤寛、千野誠、本間正充、林 真、山形一雄 ヒトリンパ芽球細胞株 TK6 を用いた亜硝酸ナトリウムと酸化剤の複合遺伝毒性 日本環境変異原学会第35回大会(2006.11)

Honma M. DNA double strand break inducing chromosome instability and its genetic consequences. International Conference on Biomarkers in Health and Environmental Management & XXXII Annual Meeting Environmental Mutagen Society of India (2007.1)

Honma M. DNA double strand breaks inducing chromosome instability in p53-deficient human cells. Key Stone Symposia -Genome Instability and Repair (2007.1)

H. 知的所有権の取得状況(予定を含む)

特になし

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの神経細胞機能影響における基礎的研究

分担研究者: 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長

研究協力者: 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・主任研究官

研究要旨

ナノマテリアルの神経等の細胞機能に対する影響について評価する方法を検討した。種々の細胞のタンパク質を発現することが可能なアフリカツメガエルの卵母細胞を利用して、フラレーン(C60)の影響の評価に適するかどうか、検討を加えた。C60 は γ -シクロデキストリンで可溶化した。このように調製した C60 溶液は、卵母細胞に発現させたヒトの神経型アセチルコリン受容体チャンネルを介するイオン電流を抑制したが、その度合いは先に報告した神経型 ATP 受容体チャンネルに対する抑制作用よりかなり弱かった。C60 を神経型 ATP 受容体チャンネルをコードする cRNA と共に卵母細胞注入した場合でも、ATP 受容体チャンネルの発現は認められた。以上のことから、C60 は神経型アセチルコリン受容体チャンネルに強い作用を示さないこと、神経型 ATP 受容体チャンネルの翻訳を含む発現過程に大きな影響を示さないことが明らかとなった。

A. 研究目的

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経等の細胞機能に対する影響を評価する系について検討を加えることを目的とする。ナノマテリアルは分子量が大きく、通常の方法では水溶化することが困難である。ナノマテリアルという分子サイズに特徴を持つ物質の特性を活かした水溶化の方法の探索を第一歩とし、探索ののち、細胞を利用した系を用いてその有用性を探る。細胞に発現させるタンパク質としては、中枢・末梢神経に存在するヒトニコチン様アセチルコリン受容体チャンネル、および ATP 受容体チャンネル(P2X 受容体)を用いた。

B. 研究方法

ヒトニコチン様アセチルコリン受容体チャンネルの $\alpha 3$ および $\beta 4$ サブユニットをコードする cDNA をサブクロー

ニングしたプラスミド (pcDNA I または pSP64 poly(A+)) を大腸菌を用いて増幅した。増幅したプラスミドを抽出し、これを *Bam*HI または *Xho*I で直鎖化した。直鎖化した DNA を鋳型として、RNA (cRNA) をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、cRNA を $\alpha 3$ サブユニットと $\beta 4$ サブユニットの組み合わせで注入し、18°C で 4 - 6 日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。ATP 受容体チャンネルの cDNA は pcBluescript II SK(-) にサブクローニングされており、これを *Nod* I により直鎖化し、以下、ニコチン様アセチルコリン受容体チャンネルと同様にアフリカツメガエル卵母細胞に発現させた。

C60 をはじめとするナノマテリアルはサイズ(分子

量)が通常の化学物質よりかなり大きく、極性のある官能基が特に多くない限りは、水溶性に乏しい。細胞に対する影響を調べるためには、可溶化が必須であるが、工夫が必要となる。γ-シクロデキストリンは糖の1種であり、C60を2分子で包接することにより可溶化することが知られている。よって、この物質による可溶化を試みた。C60とγ-シクロデキストリンをモル比で1:2となるよう量り取り、近藤の方法に従って、これを乳鉢ですりつぶした。これに水溶液を加え、1,500rpmで10分間遠心し、上清を採取した。この上清を孔径0.8 μmのフィルターで濾過し、ろ液をさらに0.22 μmのフィルターで濾過した。このろ液を吸光度測定したところ、C60とされる259 nmの吸光が認められた。これがC60のモノマー(の錯体)であると仮定するとその濃度は約10 μMであった。なお、C60のみ、あるいは、γ-シクロデキストリンのみを乳鉢ですりつぶしこれを水溶液とした場合には吸光は全く認められなかった。

(倫理面への配慮)

特になし。

C. 研究結果

α3およびβ4サブユニットの組み合わせで発現させたヒトアセチルコリン受容体チャンネルを介するイン電流を、γ-シクロデキストリンを用いて可溶化したC60は、約10%減少させた。γ-シクロデキストリン単独ではこのような作用はみられなかった。アセチルコリン受容体チャンネルを抑制する有名な物質として、クラレアルカロイドのd-ツボクラリン(d-TC)がある。d-TCとC60はいずれも分子量が約700であり、作用点において競合する可能性が考えられた。よって、この2つの物質の作用について検討を加えた。d-TCは単独でアセチルコリン受容体チャンネルを介する電流を約40%減少させた。一方、C60存在下では、d-TCはほとんど抑制作用を示さなかった。

RNAからタンパク質が発現される過程への影響を調べる目的で、C60をATP受容体チャンネルのcRNAと共にアフリカツメガエル卵母細胞に注入した。ATP受容体チャンネルのcRNA単独の場合と比べ、C60存

在下ではATPにより誘発されるイオン電流の大きさは約半分であったが、卵母細胞間でばらつきが大きく、有意な差ではなかった。また、C60を注入した卵母細胞の形状、外見、あるいは電気的性質については、注入していない卵母細胞と特に差は見られなかった。

D. 考察

C60を、これを包接すると予想されているγ-シクロデキストリンを用いることにより、可溶化した。可溶化されたC60すべてがモノマー(の錯体)となっているとは限らないが、0.22マイクロメートル(220ナノメートル)で濾過しており、これより小さな粒子から成ると考えられる。

このようにし可溶化したC60により、アセチルコリン受容体チャンネルの活性は約10%低下した。以前に検討したATP受容体チャンネルに対しては、C60は活性を約50%低下させており、これに比べて作用はかなり弱いと考えられる。

C60はd-TCのアセチルコリン受容体チャンネルに対する抑制作用をほぼ消失させた。このことは、C60がd-TCの作用点(おそらくはチャンネル孔)において、競合的に阻害する可能性を示唆している。

C60はATPのcRNAの発現に強い影響を示さなかった。このことは、翻訳を含むタンパク質の発現過程にC60は明確な作用を持たないことを示している。

以上の検討を通じ、この発現系はC60の神経等の細胞機能への影響を評価するのに有用であることが示された。

E. 結論

発現系を用いてナノマテリアルの神経細胞機能に対する影響を評価する系について検討を行ない、γ-シクロデキストリンで可溶化されたC60がヒトニコチン様アセチルコリン受容体に対して弱い抑制作用を示すこと、ATP受容体チャンネルの発現過程に明確な作用を示さないことが明らかとなった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicology In Vitro* 21, 521-526(2007)

Sato, K., Nakazawa, K. β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.* 1150, 108-120(2007)

山越葉子, 中澤憲一, 土屋利江:原子間力顕微鏡 (AFM)によるタンパク質のイメージング, *日本臨床* 65:270-277(2007)

2. 学会発表

Sato K, Ohno Y, Goldman JE, Nakazawa K: The establishment of the organotypic slice culture of postnatal rat forebrain involving neural progenitors labeled by eGFP-encoding retrovirus. Annual meeting of society for neuroscience 2006. 10 (Atlanta, USA)

佐藤 薫, 大野泰雄, James E. Goldman, 中澤憲一. 神経系前駆細胞の遊走および分化の薬理学的検討に適した実験系の確立. 第 80 回 日本薬理学会年会 2007. 3(名古屋市)

平成 18 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価
および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの血漿リポタンパク質や細胞との相互作用に関する基礎的研究

分担研究者: 最上知子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 室長
協力研究者: 重本-最上由香里 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部
内野 正 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部 主任研究官

研究要旨

腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用い、酸化チタン粒子の透過を検討した。Apical 側の培地に酸化チタン粒子 LU175(平均一次粒子径 20 nm、ルチル型)あるいは LU205(平均一次粒子径 250 nm、ルチル型)を分散すると、両粒子とも細胞に凝集して存在する様子が観察された。両粒子ともに、細胞毒性を示さず、単層膜の安定性や、細胞のトランスサイトシス活性には影響を与えずに、basolateral 側への透過が認められた。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの根幹をなす産業用ナノマテリアルについて、粒径に基づく物理化学的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。ナノマテリアルの多くは難溶性で凝集しやすい性質を持ち、生体影響は投与経路・形態や分散方法により大きく異なることが予想される。また、体内に取り込まれた後には、血漿タンパクなどの相互作用が、体内動態や生理機能に大きく影響していると考えられる。本研究においては、ナノマテリアルの分散方法や血漿リポタンパクとの相互作用が細胞機能や体内動態に及ぼす影響を探ることを目的とする。

消化管においては、ナノ粒子はリンパ組織であるパイエル板を通して吸収されるが、腸管細胞からの吸収も知られている。本年度は、小腸からの吸収過程について、in vitro での評価系である Caco-2 細胞単層膜を用いた検討を行った。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来細胞株であり、自発的に分化して小腸上皮細胞様の形態機能を示し、薬物等の吸収評価に広く

使用される。また、吸収した脂質をリポタンパクとして分泌する機能を有しており、ナノマテリアルが吸収された後の血漿リポタンパクとの相互作用の解析に利用可能である。今年度は、平均一時粒径 20nm および 250nm の酸化チタン粒子の吸収が認められるか検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

酸化チタン粒子は、超微粒子酸化チタン LU175(平均一次粒子径 20 nm、ルチル型)および顔料用酸化チタン LU205(平均一次粒子径 250 nm、ルチル型)を用いた。いずれも酸化チタンの表面処理が施されていない。ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞は ATCC より購入し、MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 試薬は Chemicon 社のものを用いた。

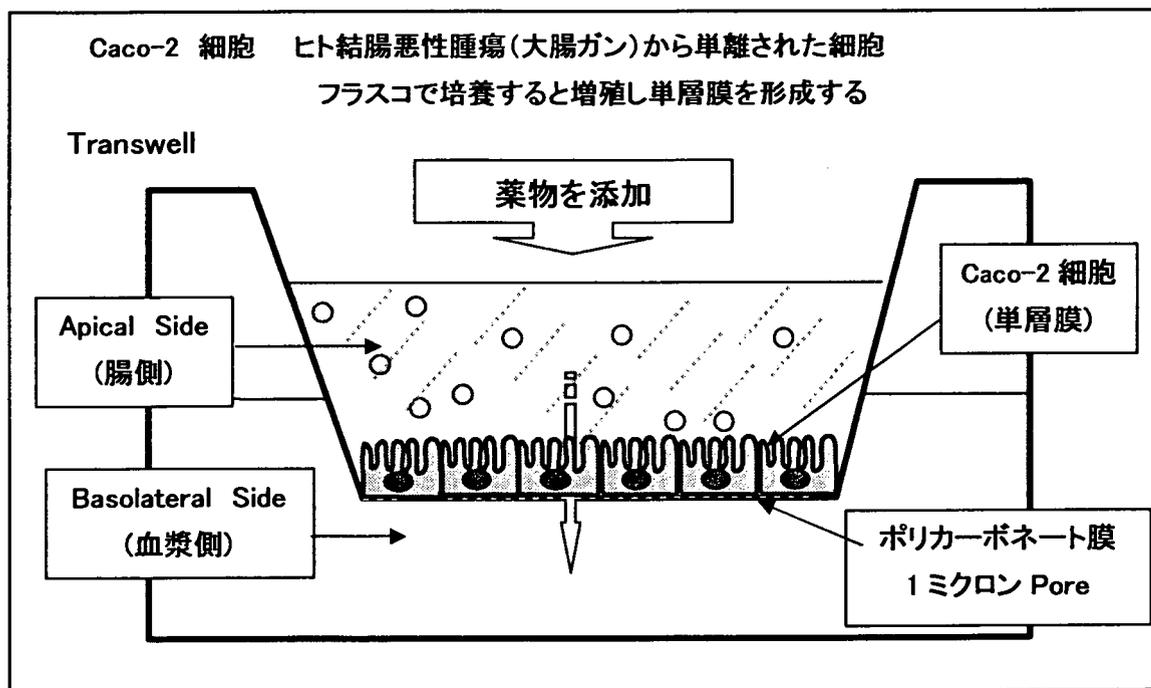
2. 酸化チタンの細胞毒性評価

Caco-2 細胞 5×10^5 cells/ml をウェルマイクロプレートに 0.1 ml ずつ播種し、37 °C 1 日培養した後、LU175、LU205 を分散した培地 (DMEM 10 %FBS) 0.1 ml を添加し 24 時間培養した。その後上清を取り除き PBS(-) で 2 回洗浄した後 MTT 反応試薬および DMEM 0.1 ml を加え、4 時間反応した。反応停止液を加え混和後 550 nm の吸光度を測定した。

3. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) の形成

Caco-2 細胞による腸管膜透過モデルは Becton Dickson and Company の BioCoat HTS Caco-2 Assay System を用いて、プロトコールどおりに作成した。Caco-2 細胞は Basal Seeding Medium 中で 4×10^5

cells/ml に調整し、上部インサートに播種する。下部ウェルに 35 ml の Basal Seeding Medium を加えて 20 - 24 時間培養する。その後培地を分化誘導メディアム (Entero-STIM Medium) に切り替えさらに 44 - 48 時間培養する。培養後の細胞を上部インサートごと Falcon の 24 ウェルプレートに移し、アッセイに用いた。単層膜形成は、apical 側の DMEM に含まれるフェノールレッドが basolateral 側に漏出しないことを確認し判定した。Basolateral 側にはフェノールレッド無しの DMEM (PR(-)DMEM) を添加し、フェノールレッドの漏出を 550nm の吸光度で測定した。



4. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) におけるトランスサイトーシスに及ぼす酸化チタン粒子の影響

Caco-2 細胞単層膜におけるトランスサイトーシスの測定は、Texas Red 蛍光標識デキストラン (MW 3000; 0.04 % 溶液) の basolateral 側 (下部ウェル) への透過を測定した。一定時間後に basolateral 側 (下部ウェル) の培養液を採取し、蛍光プレートリーダーで Ex; 560 nm Em, 590 nm の蛍光値を測定した。

5. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) における酸化チタン粒子の透過実験

酸化チタン粒子をフェノールレッド入りの DMEM (PR(+))DMEM に 0.01 ~ 0.5% の濃度に分散し、Caco-2 細胞単層膜の apical 側 (上部インサート) に 0.5ml 添加し、basolateral 側 (下部ウェル) 1.0ml への透過を検討した。37 °C で培養を開始し、一定時間ごとに basolateral 側 (下部ウェル) の培養液を採取した。採取した培養液 (0.2ml) に濃硝酸を最終濃度 7 % となるように添加し、HP-4500 型 ICP-MS 装置で酸化チタンの含量を測定した。

6. Caco-2 細胞の酸化チタン粒子および蛍光標識ポリスチレンナノ粒子取り込みの顕微鏡観察

Caco-2 細胞は 0.1 million/ml の濃度で nunc 社の SonicSeal Slide に播種した。LU175 および LU205 (0.01 %)、あるいは FITC 標識カルボン酸修飾ポリスチレン粒子 (粒径 200 nm、FluoSpheres carboxylate-modified microspheres) を添加し 37°C で 24 時間インキュベートした。その後 4%パラホルムアルデヒドで固定し、PBS で洗浄後、風乾させ、Gel Mount で封入した。細胞の観察は共焦点顕微鏡 (LSM5 Pascal, Carl Zeiss) で行った。

C. 研究結果

1. Caco-2 細胞における酸化チタン粒子の細胞毒性の検討

酸化チタン粒子が Caco-2 細胞に毒性を及ぼすか否か検討を行った。MTT 試薬は細胞中の脱水素酵素により還元されると青色の不溶性ホルマザンを生成し、青色ホルマザン濃度は生細胞数の指標となることが知られる。図1で示すように Caco-2 細胞において LU175 および LU205 は共に 1 % の濃度まで生細胞数を減少させず、明確な毒性を示さなかった。

2. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) におけるトランスサイトーシスに及ぼす酸化チタン粒子の影響

In vitro 腸管膜透過モデルとなる Caco-2 細胞単層膜を構築し、単層膜機能への酸化チタン粒子の影響を検討した。LU175 および LU205 を 0.001–0.5 % の範囲で 24 時間処置しても、basolateral 側へのフェノールレッド漏出は認められず、酸化チタンによる単層膜の破状は認められなかった。

酸化チタンは細胞表面上を被覆し、腸上皮細胞の機能を阻害する可能性が考えられる。そこで我々はトランスサイトーシスによる物質輸送に及ぼす酸化チタンの影響を解析した。単層腸上皮細胞トランスサイトーシスの指標としてテキサスレッド蛍光デキストラン (分子量 3,000) の apical 側 (上部) から basolateral 側 (下部) への透過を測定した。図2 i に示すように、37 °C で培養すると、処置後 6–24 時間には蛍光デ

キストランの basolateral 側 (下部) への透過が認められる。その後細胞を 4 度に冷却すると、透過は認められず、蛍光デキストランの透過が細胞機能によって行われていることが確認された。この条件下、酸化チタン粒子を 0.01–0.1 % の濃度で混在させ、トランスレートに及ぼす効果を検討したところ、LU175 および LU205 は共に蛍光デキストランの透過に影響を及ぼさなかった (図2 ii)。以上の結果より、LU175 および LU205 は、Caco-2 細胞におけるトランスサイトーシス機能に影響を及ぼさないことが明らかになった。

3. Caco-2 細胞の酸化チタン取り込み観察

Caco-2 細胞への酸化チタンの取り込みの様子を顕微鏡で観察した。LU175 (平均粒径 20 nm) および LU205 (平均粒径 250 nm) 共に、細胞に凝集して存在している様子が観察された (図3)。特に LU205 は細胞への取り込みが多く、細胞内部で凝集して存在している様子が観察された。FITC 蛍光標識ポリスチレン粒子 (粒径 200 nm) を培地に添加した際にも、細胞への取り込みが認められ、その様子は LU205 の細胞内部での局在と良く類似していた。

4. Caco-2 細胞単層膜における酸化チタン粒子の細胞透過実験

酸化チタン粒子が Caco-2 細胞単層膜を透過するか否か検討を行った。Apical 側 (上部インサート) に酸化チタン粒子を 0.01–0.5% に分散した培地を添加し、basolateral 側 (下部ウェル) への透過を検討した。図4に示すように LU175、LU205 共に腸上皮細胞単層膜を透過することが明らかになった。特に LU205 に関しては濃度依存的な透過が確認された。透過率は LU175 (0.1 %) の場合に約 0.2 %、LU205 (0.1 %) では 0.1 % であった。

D. 考察

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞に対して、酸化チタン粒子 LU175 (平均粒径 20 nm) および LU205 (平均粒径 250 nm) は 1% の高濃度まで細胞毒性を示さなかった。CHO 細胞に対しては両者とも、A431 細胞に対しては LU175 が毒性を示すことが報告されている

ことから(厚生労働科学研究費補助金:ナノマテリアルの安全性確認における健康影響評価手法の確立に関する研究 平成 17 年度分担研究報告書:生体資料中のナノマテリアル測定法の開発に関する研究 徳永裕司)、これは意外な結果であった。さらにメンブランフィルター上に細胞単層膜を形成させた場合にも、膜の安定性には影響を与えず、上部インサートから下部ウェルへのフェノールレッド色素の漏出は認められなかった。

さらに、顕微鏡により観察すると、酸化チタン粒子は Caco-2 細胞に凝集して存在している様子が認められた(図3)。酸化チタン粒子(50nm)は、タイプ II 肺上皮細胞において、凝集塊として貪食されることが報告されている(Sterns RC et al., Am J Respir Cell Mol Biol, 24, 108-115, 2001)。

Caco-2 細胞は apical 側 から basolateral 側へと平均分子量 3,000 の蛍光標識デキストランを温度依存的に輸送した(図 2)。この現象は、エンドサイトーシス・エキソサイトーシスによる積極的な輸送であり、トランスサイトーシスと呼ばれる。小腸上皮を用いて 80-160nm のナノ粒子の吸収を評価した研究において、粒子表面にグルコース輸送担体に結合可能なグルコース残基を有する場合には、デキストランのトランスサイトーシスが亢進する現象が報告されている(Nakamura et al., J Pharm Sci, 92,311-318, 2003)。酸化チタン粒子の場合には、トランスサイトーシスが亢進しなかったが、阻害もしなかった。

しかしながら、どちらの粒子を添加した場合にも、下部ウェルにチタンが検出された(図4)。LU205 の場合には濃度依存性が認められた。トランスサイトーシスによる蛍光標識デキストランの透過率は 1.2~1.4% であったのに対し(図2)、酸化チタンの透過率は 0.1~0.2%であった。したがって、Caco-2 細胞は、酸化チタン粒子を apical 側 から basolateral 側へと積極的に輸送していると推定される。

今年度観察された酸化チタン粒子の Caco-2 細胞

単層膜透過が、細胞による積極的な輸送であるのか否かを明らかにするためには、今後、温度やエネルギー依存性を検討する必要があると考えている。また、今年度確立した腸管吸収評価モデルは、フラレン C60 やカーボンナノチューブの吸収評価にも有用であると考えられ、脂質ミセル分散法の効果を含め検討を行う予定である。

E. 結論

腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜を用い、酸化チタンの透過を検討した。Apical 側に LU175(平均粒子径 20 nm)あるいは LU205(平均粒子径 250 nm)を添加すると、basolateral 側にチタンが検出されることが判明した。両粒子とも細胞に凝集して存在する様子が観察されたが、細胞毒性を示さず、細胞単層膜の安定性や、細胞のトランスサイトーシス機能には影響を与えなかった。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
 1. T. Nishimaki-Mogami, Y. Kawahara, N. Tamehiro, T. Yoshida, K. Inoue, Y. Ohno, T. Nagao, M. Une Identification of 5 α -bile alcohols as farnesoid X receptor antagonists 20th IUBMB International Congress of Biochemistry and Molecular Biology (2006.6)
 2. 為広紀正、河原陽介、吉田武美、植田和光、横山信治、鈴木和博、長尾拓、最上(西巻)知子 VerapamilによるABCA1発現誘導機構 第38回日本動脈硬化学会総会・学術集会(2006.7)