

Table 3. LC-MS/MS 解析により同定された蛋白質の一覧表

Code	Calculated pI value	Nominal Mass	血清蛋白質		スルホン化/アミノ酸化蛋白質		Protein name
			Direct ショットガン	Indirect ショットガン	Direct ショットガン	Indirect ショットガン	
AIAT	6.05	46,417	○	○	○	○	α -1-Antitrypsin precursor
A1AG	5.62	23,453	○	○	○	○	α -1-Acid glycoprotein precursor
A2AP	5.45	54,961	○	○	○	○	α -2-Macroglobin precursor
A2MG	5.06	14,597	○	○	○	○	α -2-macroglobulin
ACTB	5.29	52,052	○	○	○	○	Actin
AMBP	7.81	40,122	○	○	○	○	AMBP protein precursor
ALBU	5.82	71,244	○	○	○	○	Serum albumin precursor
ANT3	7.01	52,827	○	○	○	○	Antithrombin-III precursor
APQA1	5.71	30,258	○	○	○	○	Apolipoprotein A-I precursor
APOE	5.55	36,015	○	○	○	○	Apolipoprotein E precursor
APOH	8.53	39,538	○	○	○	○	Apolipoprotein H precursor
B2MG	7.79	13,782	○	○	○	○	β -2-Microglobulin precursor
BLVRR	6.58	22,232	○	○	○	○	Flavin reductase
BPT1	9.16	11,352	○	○	○	○	Pancreatic trypsin inhibitor precursor
BPT2	9.00	11,291	○	○	○	○	Spleen trypsin inhibitor precursor
BRD2	9.10	86,353	○	○	○	○	Bromelain-containing protein 2
CD14	5.37	40,269	○	○	○	○	Monocyte differentiation antigen CD14 precursor
CFAH	6.43	144,959	○	○	○	○	Complement factor H precursor
CH60	5.6	61,240	○	○	○	○	60 kD heat shock protein
CLC1	5.16	27,317	○	○	○	○	Chloride intracellular channel protein 1
COL1A1	5.6	139,880	○	○	○	○	Collagen α -1(I) chain precursor
COL1A2	9.23	129,499	○	○	○	○	Collagen α -2(I) chain precursor
CO3	6.41	188,675	○	○	○	○	Complement C3 precursor
CO4	6.15	103,018	○	○	○	○	Complement C4 precursor
CO7	6.9	86,223	○	○	○	○	Complement C7 precursor
CO8	5.86	63,227	○	○	○	○	Complement component C9 precursor
COF1	8.16	10,792	○	○	○	○	Cerferrin-1
COMP	4.21	49,844	○	○	○	○	Cartilage oligomeric matrix protein
CTRA	8.52	26,220	○	○	○	○	Chymotrypsinogen A
CYTC	9.24	16,483	○	○	○	○	Cystatin-C
ENDP1	5.57	46,289	○	○	○	○	Endopin-1 precursor
ENGA	6.37	47,649	○	○	○	○	α -Enolase
ENOB	7.60	47,409	○	○	○	○	β -Enolase
F1BP1	6.54	37,047	○	○	○	○	Fructose-1,6-bisphosphatase 1
FA5	5.53	249,912	○	○	○	○	Coagulation factor V precursor
FA7	6.03	50,354	○	○	○	○	Coagulation factor VIII precursor
FAB	5.47	46,010	○	○	○	○	Coagulation factor IX precursor
FA10	5.35	55,844	○	○	○	○	Coagulation factor X precursor
FETA	5.92	70,368	○	○	○	○	α -1-fetoprotein precursor
FETUA	5.26	39,193	○	○	○	○	α -2-HS-glycoprotein precursor
FETUB	5.59	43,434	○	○	○	○	β -2-HS-glycoprotein precursor

Table 3. 続き

Code	Calculated pI value	Nominal Mass	血清蛋白質		スルホン化/アミノ酸化蛋白質		Protein name
			Direct ショットガン	Indirect ショットガン	Direct ショットガン	Indirect ショットガン	
FIBA	6.73	67,484	○	○	○	○	Fibrinogen α chain precursor
FIBNO	5.59	252,338	○	○	○	○	Fibrinectin
GRG2	7.77	7,959	○	○	○	○	Guanine nucleotide-binding protein G(I)/G(S)/G(O) γ -2 subunit precursor
GFAP	5.3	49,479	○	○	○	○	Glia fibrillary acidic protein
GPX3	6.84	25,885	○	○	○	○	Glutathione peroxidase 3 precursor
HABP2	6.32	64,452	○	○	○	○	Hyalurinan-binding protein 2 precursor
HBA	8.07	15,175	○	○	○	○	Hemoglobin subunit α -1/E
HBB	7.01	16,001	○	○	○	○	Hemoglobin subunit β
HBBF	6.51	15,563	○	○	○	○	Hemoglobin fetal subunit β
HBE2	7.05	16,638	○	○	○	○	Hemoglobin subunit epsilon-2
HSPB1	5.88	27,438	○	○	○	○	Heat-shock protein β -1
IBP2	7.13	35,076	○	○	○	○	Insulin-like growth factor-binding protein 2 precursor
IGF2	9.11	20,125	○	○	○	○	Insulin-like growth factor II precursor
IFSP	9.40	45,439	○	○	○	○	Plasma serine protease inhibitor precursor
KNG1	6.14	89,930	○	○	○	○	Kringle-1 precursor
KNG2	6.09	69,750	○	○	○	○	Kringle-2 precursor
LBP	6.81	53,892	○	○	○	○	Lipoprotein-binding protein precursor
MIME	5.43	34,530	○	○	○	○	Mimecan precursor (Osteoglycin)
PARK7	6.84	20,194	○	○	○	○	Protein DJ-1
PRDX6	6.00	25,108	○	○	○	○	Peroxidase-6 (Antioxidant protein 2)
PEDF	6.57	46,314	○	○	○	○	Pigment epithelium-derived factor precursor
PLMN	7.68	93,894	○	○	○	○	Plasminogen precursor
PPA	8.34	18,086	○	○	○	○	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase A
PROC	5.71	52,744	○	○	○	○	Vitamin K-dependent protein C precursor
PROS	5.29	77,080	○	○	○	○	Vitamin K-dependent protein S precursor
RETBP	5.44	21,397	○	○	○	○	Plasma retinol-binding protein
RGN	5.54	33,857	○	○	○	○	Raguelin
SCB1G	10.01	7,793	○	○	○	○	Protein transport protein SEC21 subunit γ
SPP24	8.3	23,404	○	○	○	○	Secreted phosphoprotein 24
SYCP3	8.43	26,381	○	○	○	○	Synaptonemal complex protein 3
TAGL2	8.39	22,583	○	○	○	○	Transglutinin-2
TETN	5.47	22,586	○	○	○	○	Tetranectin precursor
TOBR3	5.45	94,326	○	○	○	○	TGF- β receptor type III precursor
THR8	5.97	71,886	○	○	○	○	Prothrombin precursor
TRDMT	6.89	44,940	○	○	○	○	tRNA (cystosine-5-)methyltransferase
TRFE	6.75	79,870	○	○	○	○	Serectransferrin precursor
TSP1	4.74	133,442	○	○	○	○	Thrombospondin-1 precursor
THY	5.81	15,831	○	○	○	○	Transferrin precursor
VA00	4.89	40,759	○	○	○	○	Vacuolar ATP synthase subunit d
VTDB	5.36	54,904	○	○	○	○	Vitamin D-binding protein precursor

2. ナノマテリアルの遺伝毒性のリスク アセスメント手法開発

松岡 厚子

ナノマテリアルの遺伝毒性を指標とするリスクアセスメント手法開発

分担研究者：松岡厚子 国立医薬品食品衛生研究所療薬部第三室室長

協力研究者：松田良枝 国立医薬品食品衛生研究所療薬部

伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所療薬部第二室室長

迫田秀行 国立医薬品食品衛生研究所療薬部第三室研究員

研究要旨

ナノマテリアル分散液中の粒子(凝集体)径と細胞毒性の関連について詳細に検討するために、11種のサイズのポリスチレン(PS)粒子を用いて、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 CHL で細胞毒性試験および染色体異常試験を実施した。

平均粒子径 0.1 - 9.2 μm までのサイズ標準 PS 粒子を用いて細胞毒性試験を実施した結果、0.92 - 4.45 μm までの粒子が特に強い細胞毒性を示した。染色体異常試験の結果、染色体数的異常(倍数体)が観察され、特に強い細胞毒性を示した 0.92 - 4.45 μm の PS 粒子が高頻度の倍数体を誘発することが判明した。

走査型電子顕微鏡で 4.45 μm PS 粒子で処理した CHL 細胞を観察したところ、細胞が粒子を多く貪食していることが明らかになった。平均粒子径 4.45 μm とその次に粒子径が大きい 5.26 μm の粒子との間では、僅かな粒子径の違いであるにも関わらず細胞毒性も倍数体誘発頻度も大きく変化した。フローサイトメトリーで PS 粒子取り込み細胞を半定量的に測定したところ、4.45 μm PS 粒子の方が 5.26 μm 粒子に比べて積極的に細胞内に取りこまれていることが判明した。

CHL 細胞は特定の粒子径の PS 粒子を積極的に貪食し、その結果細胞質分裂が阻害され倍数体を誘発し、最終的には細胞死にいたることが示唆された。ナノマテリアルについても同様に粒子径選択的毒性が観察される可能性もあり、試験分散液中の凝集体の大きさの測定は毒性結果を正確に評価するために必要な情報であると考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルは近年、その開発が活発になり様々な分野での応用が考案されてきている。医療分野ではドラッグデリバリーシステム、遺伝子導入ベクター、細胞培養用スキャフォールド等である。製品への応用がすすみ、我々の身の回りでも使用される機会が増えることが予想され、結果としてそれらに暴露されることも多くなる。ナノマテリアルのヒトの健康への影響は未知の部分が多く、その安全性を確認しておくことは、アスベスト被害を経験している日本社会では特に、慎重に対応しなければならない問題だと考えら

れる。毒性に関しては、いまだ議論があるところではあるが、国際機関 (ISO/TC 229) および各国行政当局では、ナノマテリアルの標準化がはすすめられている。国内では、厚生労働省が平成 20 年 2 月 7 日に通知「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」を発出し、平成 20 年 11 月に「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会」が報告書を取りまとめ、現在(平成 21 年 2 月)も環境省が「ナノ材料環境影響基礎調査検討会」で「工業用ナノ材料に関する環境影響防

止ガイドライン（仮称）」を、厚生労働省が「ナノマテリアルの安全対策に関する検討会」で報告書を取りまとめているところである。

ナノマテリアルの安全性については、これまでにも、材料を開発したグループによって実施されてきている場合もあるが、試験法が一定ではなく、さらに、試験に供した分散液中の粒子サイズに関する情報を提供しているものが少なく、結果を材料間で直接比較することが困難な場合が多い。そこで、本研究では、比較的簡便な方法でナノマテリアルの生物活性を測定でき、どのような材料にも応用できる手法を開発し、ナノマテリアル全般の毒性をスクリーニングできる手法を提案したいと考えている。

昨年（初年度）は、入手できた 10 種のナノマテリアルを用いて、主にメノウ乳鉢による粉碎および卓上型超音波洗浄機による分散後、細胞毒性を検討した。その結果、上記の手法では分散が不十分であること、また、そのような分散液でも細胞毒性は検出でき、分散液中の凝集体径と毒性の間に相関が認められることが示唆された。

一般的に不溶性粒子の毒性について、その粒子径との関連はこれまでにも報告されてきた [1, 2] が、サイズ数は限られていた。今後ナノマテリアルの評価系では様々な大きさの凝集体の試験をすることが予想されることから、本年度は使用細胞での粒子（凝集体）径と細胞毒性の関係を明らかにするために 11 種のサイズのポリスチレン(PS)粒子を用いて細胞毒性試験および染色体異常試験を実施した。

A. 研究方法

1. サイズ標準ポリスチレン(PS)粒子

Spherotec Inc. (Lake Forest, IL, USA)より購入した、以下の 11 種のサイズの PS 粒子を用いた。

平均直径±SD: 0.10 ± 0.0024 μm

0.20 ± 0.005 μm

0.51 ± 0.012 μm

0.92 ± 0.023 μm

1.09 ± 0.027 μm

2.07 ± 0.05 μm

3.17 μm

4.45 μm

5.26 μm

6.8 μm

9.2 μm

2. 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた。医薬品をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験に標準的に使用されている細胞株である。細胞は 10% 牛胎児血清添加 MEM 培地で、5% 炭酸ガス、飽湿 37°C 条件下で培養した。

3. 細胞毒性試験（コロニー法）

24-well プレートに 50 細胞/well の CHL 細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加し、そのままさらに 7 日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行なった後カウントした。コントロール群のコロニー数を 100% とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値 ± SD, n=4) で細胞毒性を表示した。

4. 染色体異常試験

直径 60 mm のプラスチックシャーレに 1×10^5 /plate の細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加、24 時間または 48 時間処理後に染色体標本作製した。ギムザ染色後、広がりの良い分裂中期細胞 100 個を観察し、染色体構造異常と数的異常を記録した。

5. フーリエ変換全反射赤外吸収

(FT-IR/ATR) スペクトル測定及びキャピラリー電気泳動分析

PS 粒子の FT-IR/ATR スペクトルは、SPX-200 (日本電子株式会社) に DuraScope (Smiths Detection) を装着して測定した。全反射結晶/フォーカシングレンズには、1 回反射型のダイヤモンド/セレン化亜鉛を用いた。

分散媒のキャピラリー電気泳動分析は、CAPI-3300 システム (大塚電子株式会社) を用いた。泳動条件は、キャピラリー: フェーズドシリカ (内径 75 μm \times 有効長 48 cm、大塚電子株式会社)、緩衝液: 10 mM イミダゾール、5 mM 2-ヒドロキシイソ酪酸、2 mM 18-クラウン-6-エーテル及び 0.2w% 酢酸、電圧: 10.0 kV、温度: 25.0°C、検出波長: 210 nm 並びにサンプル注入: 落差法 (25 mm、30 sec) とした。

6. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

直径 35 mm のプラスチックシャーレに 1×10^4 の細胞を播種し、翌日 PS 粒子を添加し、24 時間処理後、観察用試料とした。具体的には、処理液を除き、PBS でリンス後、2% paraformaldehyde-2.5% glutaraldehyde 液で前固定後、1% osmium oxide で後固定を行った。その後液体窒素で凍結した試料を凍結乾燥させ、金で蒸着後 SEM (日本電子 JSM-5800LV) 観察を行った。

7. フローサイトメトリー

PS 粒子の細胞内取り込みを半定量的に測定するために、PS 処理後の細胞の側方散乱光を測定した。側方散乱光はレーザービームの光軸に対して 90° の角度で検出される光で、細胞の顆粒性状、内部構造にほぼ比例すると考えられている。

C. 研究結果

1. PS 粒子の細胞毒性

平均直径 0.1 – 9.2 μm までの 11 種の PS 粒子の細胞毒性を 31.25 – 500 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で検討した。その結果図 1 に示すように、0.1 – 0.51 μm の小さい 3 種の PS 粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった。より大きな 8 種の PS 粒子はいずれも最高濃度 500 $\mu\text{g/ml}$ では強い細胞毒性を示していたが、4.45 μm の PS 粒子が 11 種のうち最も強い細胞毒性を示した。小さい 3 種の PS 粒子のより高濃度での細胞毒性を確認するために、また、細胞毒性がより強かった 8 種の PS 粒子間の細胞毒性を比較するために特定の処理濃度での細胞毒性試験を実施した。その結果図 2 に示すように、0.1 および 0.2 μm の PS 粒子では、1000 $\mu\text{g/ml}$ で処理してもほとんど細胞毒性を示さないことが判明した。また、100 $\mu\text{g/ml}$ で処理した 8 種の PS 粒子の比較から、最も強い細胞毒性を示すのは 4.45 μm の粒子で、次に 2.07 と 3.17 μm 、その次に 0.92 と 1.09 μm の PS 粒子で、単純に一方方向性に粒子径と細胞毒性の関係があるのではないことが明らかとなった。

2. PS 粒子の表面解析および分散媒の性状

上記毒性試験の結果、図 2 に示すように 4.45 と 5.26 μm の PS 粒子間で細胞毒性に大きな開きが認められた。いずれの粒子も、毒性試験終了時には白い沈殿が細胞を覆うように存在し、また、粒子径の違いも僅かであることから、PS 粒子製造時の表面分子構造の違い、あるいは分散媒の成分の違いがあるのではないかと疑われた。この疑問を解決するために、PS 粒子の表面解析 (図 3 左) および分散媒成分の分析 (図 3 右) を行った。その結果、4.45 と 5.26 μm PS 粒子は表面分子構造も分散媒の成分もほとんど同じで、図 2 でみられた細胞毒性の違いは粒子径の違いに起因することが明らかとなった。分散媒の分析で、 Na^+ が検出されているが、これは保存剤として添加されている 0.02% の NaN_2

に由来するものである。

3. PS 粒子の染色体異常試験

ナノマテリアルの安全性評価で実施する予定の染色体異常試験を、PS 粒子についても実施した。

まず、僅かな粒子径の違いで細胞毒性に大きな違いが認められた 4.45 と 5.26 μm の PS 粒子について、染色体異常試験を実施した。その結果、図 4 のような染色体数的異常（倍数体）が観察され、集計の結果、表 1 および表 2 に示すように、倍数体の誘発で陽性という結果になった。処理濃度および倍数体誘発頻度から、4.45 μm PS 粒子の方が明らかに強い陽性結果を示した。染色体構造異常はほとんど誘発されなかったため、他のサイズの PS 粒子についても倍数体誘発性を確認するために、48 時間処理のみの染色体異常試験を実施した。11 種すべてのサイズの PS 粒子の 48 時間処理後の倍数体出現頻度を図 5 に示す。使用している CHL 細胞の陰性対照での倍数体出現頻度は、平均値約 1%、最大値 4% であることから、10% 以上を陽性と判定している。0.92–4.45 μm の PS 粒子は、実施した複数の濃度すべてで倍数体の誘発において陽性結果を示した。

4. PS 粒子の細胞内への取り込み

昨年度の本研究において、蛍光標識 PS 粒子 (2 μm) の細胞内取り込みを共焦点顕微鏡で観察し、細胞内へ 1 個の粒子が取り込まれている事を示した。共焦点顕微鏡観察では多数の細胞の観察には時間を要するため、本年度は SEM を使って PS 粒子の細胞内への取り込みを観察することにした。図 6 にその画像を示す。これは、最も強い細胞毒性を示し、倍数体誘発性も高かった 4.45 μm PS 粒子で 24 時間処理後、2 回リンスし観察した CHL 細胞の写真である。左側 1000 倍で撮影した写真の一部（点線で囲まれている部分）を 3000

倍で観察したものが右の写真であるが、中央にある 2 つの細胞（上の細胞は 1 個の粒子を、下の細胞は 4 個の粒子を貪食している）をよく見ると、粒子が細胞膜で覆われていることがわかる。左の写真に戻ってみると、裸の粒子（白矢印）と細胞膜で覆われている粒子の識別が可能で、細胞によっては驚くことに 10 個以上もの粒子を貪食していることがわかる。

5. フローサイトメトリーによる PS 粒子取り込み細胞の半定量的測定

SEM 観察の結果、4.45 μm PS 粒子がほとんどの細胞に取り込まれている事が判明し、処理後リンスし位相差顕微鏡で観察した画像とよく一致していることが確認できた。

位相差顕微鏡観察において、4.45 μm と 5.26 μm PS 粒子の細胞内取り込みは、取り込んでいる細胞数、および 1 細胞あたりの取り込み数が大きく異なることはすでに観察していた。この取り込み量の違いを、定量的あるいは半定量的に測定するために、細胞内への粒子の取り込みが、細胞の内部構造の変化としてフローサイトメーターの側方散乱光で識別できないかと考えた。

まず、3.17 μm の PS 粒子を用いて、位相差顕微鏡で観察できる細胞内取り込み状態と、側方散乱光のデータとに相関性があるかを検討した。3.17 μm PS 粒子も、細胞毒性が強く高頻度の倍数体を誘発する粒子である（図 2, 5）。図 7 にその結果を示す。上の写真は PS 粒子 24 時間処理後にリンスして観察した位相差顕微鏡の画像である。Control では細胞の輪郭内に粒子はみられないが、処理群では細胞の輪郭内に粒子が観察される。粒子が観察される細胞数、および 1 細胞内の粒子数は 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処理群の方が多い。下図はそれぞれの細胞を回収してフローサイトメーターで解析した、前方散乱光(FSC-H)と側方散乱光(SSC-H)のデータである。図中のドット一

つが、1細胞の情報を示しており、この図は20,000個の細胞の情報が示されている。3群でFSCの変化はほとんどないが、SSCは処理濃度が高くなるにつれ値が大きくなっている。SSCの変化に対して細胞数をプロットしたものが、下右端のカラーのグラフである。Control (Medium)で観察されるSSCは細胞が本来もっている核や細胞内小器官、顆粒等に由来していると考えられる。ところが、PS粒子処理群では正常な細胞の数は減少し、さらに大きな値のSSCを示す細胞数が増加している。PS粒子の処理濃度に比例してより大きなSSC値の細胞数が増加している。細胞内への粒子取り込みと関連したSSC値の増大、および対応する細胞数の変化がみられることから、この方法で少なくとも取り込み量の相対的比較は可能と考えた。そこで、同じ手法を用いて4.45 μm と5.26 μm PS粒子の取り込み量を比較した。

図8に回収時の細胞と粒子量の様子を、図9にフローサイトメータでの解析結果を示す。4.45と5.26 μm PS粒子の取り込み量は、同じ処理濃度では明らかに5.26 μm の方が少ないことはわかっていたので、いずれも倍数体が誘発される濃度付近での処理を行った。図8から、どちらのサイズのPS粒子でも、低濃度では、一部の細胞内に1個から数個の粒子が観察され、中濃度ではほとんどの細胞内に数個以上の粒子が観察され、高濃度では細胞の形態も丸くなり傷害を受けている様子が観察される。これらの細胞を回収し、20,000個の細胞の解析結果をSSC値に対しての細胞数で示したものが図9である。いずれのサイズでも濃度依存的に正常細胞のSSC値を示す細胞が減少するとともに、SSC値は増大している。5.26 μm PS粒子では、中濃度と高濃度でのグラフの変化が小さく、取り込みが飽和状態に達してきていることが示唆される。4.45 μm PS粒子の方がより低濃度でより大きなSSC値を示す細胞が検出されており、

CHL細胞は4.45 μm 粒子を好んで貪食する傾向が示唆された。

D. 考察

細胞毒性試験において、0.1および0.2 μm のPS粒子はほとんど毒性を示さなかった。これらの分散液は理想的な分散状態を示し、処理終了時にも沈殿はほとんど認められなかった。すなわち、接着細胞にほとんど接していないことが原因である可能性が高い。ナノマテリアルの安全性評価では、どうすれば材料凝集体の分散をよくして細胞に処理できるかを検討しているところであるが、理想的なナノレベルの分散液を調製できた時、同様のことが起きる可能性もあり、注意を要する。

サイズの異なる粒子の生物反応を比較するとき、同じ重量濃度で比較すべきか、同じ粒子数で比較すべきか、あるいは同じ表面積量で比較すべきか、迷うところである。本研究では、一貫して重量濃度で実験データを記載しているが、例えば、図9で示した4.45と5.26 μm の比較を同じ粒子数で行うとすれば、4.45 μm 粒子の200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での粒子数は、5.26 μm 粒子では328 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での粒子数と同じである。図8には、5.26 μm PS粒子の328 $\mu\text{g}/\text{ml}$ での処理細胞の写真は示されていないが、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ よりも明らかに少ないことを確認しており、同じ重量濃度で比較しても、同じ粒子数で比較しても5.26 μm PS粒子の取り込み量は4.45 μm 粒子に比べて明らかに少ないことが観察された。

CHL細胞はこれまで主に化学物質の安全性スクリーニングに使用され、ほとんどの場合溶解する物質が対象であったため、貪食という概念はなかったが、本研究において特定のサイズのPS粒子を積極的に貪食することが判明した。ナノマテリアルは不溶性のものが多く、CHL細胞は貪食機能を有していることからナノマテリアルの評価にも十分

使えることが判明したと考えている。

E. 結論

CHL 細胞は 0.1 から 9.2 μm までの 11 種のサイズの PS 粒子のうち、0.92 から 4.45 μm までの 5 種のサイズの粒子を好んで貪食し、これは細胞毒性、染色体数的異常 (倍数体) 誘発性を示す粒子のサイズと完全に一致していた。このことから、CHL 細胞は何らかのサイズ認識機構をもち、貪食した PS 粒子によって細胞質分裂が阻害され倍数体を誘発し、それが最終的に細胞死につながっていることが示唆された。

ナノマテリアルの安全性評価において、分散が不十分で μm サイズの凝集体で処理する場合もあると考えられるが、本研究で観察されたサイズ依存的毒性発現の可能性も考慮し、何らかの分散状態を示すデータとともに試験結果を慎重に評価する必要があると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表 (1 報)

A. Matsuoka, A. Önfelt, Y. Matsuda, R. Nakaoka, Y. Haishima, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya: Development of an in vitro screening method for safety evaluation of nanomaterials, *Bio-Med. Mater. Engineering*, 2009 in press.

2. 学会発表 (7 件)

A. Matsuoka, Y. Matsuda, R. Nakaoka, Y. Haishima, M. Yudasaka, S. Iijima, T. Tsuchiya: How small aggregates must be prepared in an in vitro safety evaluation system for nanomaterials? International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes"(ISNT2008)(2008 年 6 月、札幌)

松岡厚子、松田良枝、中岡竜介、配島由二、

土屋利江: ポリスチレンサイズ標準粒子の細胞毒性と遺伝毒性

日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008 (平成 20 年 11 月)

松岡厚子、浅倉真澄、中井誠、藤島沙織、松田良枝、湯田坂雅子、飯島澄男、田中勲、土屋利江: ナノ材料の細胞毒性に及ぼす粒子径の影響について

日本バイオマテリアル学会 シンポジウム 2008 (平成 20 年 11 月)

A. Matsuoka, Y. Matsuda, K. Isama, T. Tsuchiya: Cytotoxicity and genotoxicity of eleven size-different polystyrene particles
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)

A. Matsuoka, Y. Matsuda, M. Yudasaka, S. Iijima, I. Tanaka: Development of an in vitro safety evaluation system for nanomaterials - 3 Single-walled carbon nanohorns and multi-walled carbon nanotubes
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)

M. Asakura, T. Sugiyama, K. Nagano, A. Matsuoka, S. Fukushima: Development of an in vitro safety evaluation system for nanomaterials-1-Titanium dioxide
37th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (December, 2008)

松岡厚子: ナノマテリアルの in vitro 安全性評価系の開発と課題

第 3 回ナノマテリアルの環境・健康影響評価および管理技術研究会 (平成 21 年 1 月 27

日)

G. 知的財産権の出願・登録状況
なし

H. 文献

- [1] K. Koshi et al. The toxic effect of the various dusts on the intraperitoneal monocytes in rat, Bull. Nat. Inst. Indust. Health 6 (1961) 10-27.
- [2] H.Yin et al. The effects of particle size and surface coating on the cytotoxicity of nickel ferrite, Biomaterials 26 (2005) 5818-5826.

表1 PS粒子 (4.45 μm)の染色体異常試験

Treatment time (h)	Mass concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Polyploidy (%)	Frequency of cells with structural aberrations (%)*						
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total
24	0	5	1	2	2	0	0	0	4
	50	7	1	0	0	0	0	0	1
	100	12	0	0	0	0	0	0	0
	200	14	1	0	0	0	0	0	1
	300	16	0	0	0	0	0	0	0
	400	14	0	0	0	0	0	0	0
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	50	12	0	0	0	0	0	0	0
	100	15	1	0	0	0	1	0	2
	200	36	1	0	0	0	0	0	1
	300	37	2	4	0	0	0	2	6
	400	23	2	2	0	0	0	0	4

*表2の脚注参照。

表2 PS粒子 (5.26 μm)の染色体異常試験

Treatment time (h)	Mass concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Polyploidy (%)	Frequency of cells with structural aberrations (%)*						
			ctg	ctb	cte	f	csb	cse	total
24	0	5	1	2	2	0	0	0	4
	200	3	0	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	0	0
	600	6	0	0	0	0	0	0	0
	800	6	0	0	0	0	0	0	0
	1000	6	1	1	0	0	0	0	1
48	0	1	0	0	0	0	0	0	0
	200	3	0	0	0	0	0	0	0
	400	5	0	1	0	0	0	1	1
	600	9	1	0	0	0	0	1	2
	800	9	1	0	0	0	0	0	1
	1000	13	0	1	0	0	2	0	4

*The structural aberrations were classified as follows; ctg, chromatid and chromosome gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; f, fragmentation; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges. Red figures indicate positive response.

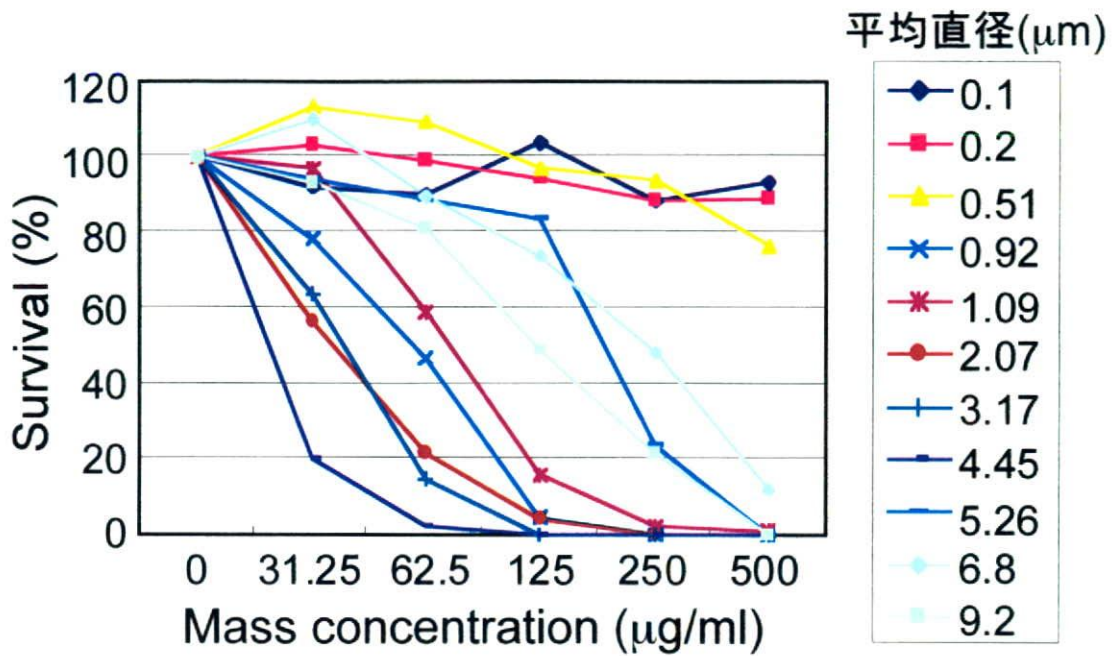


図1 PS粒子の細胞毒性

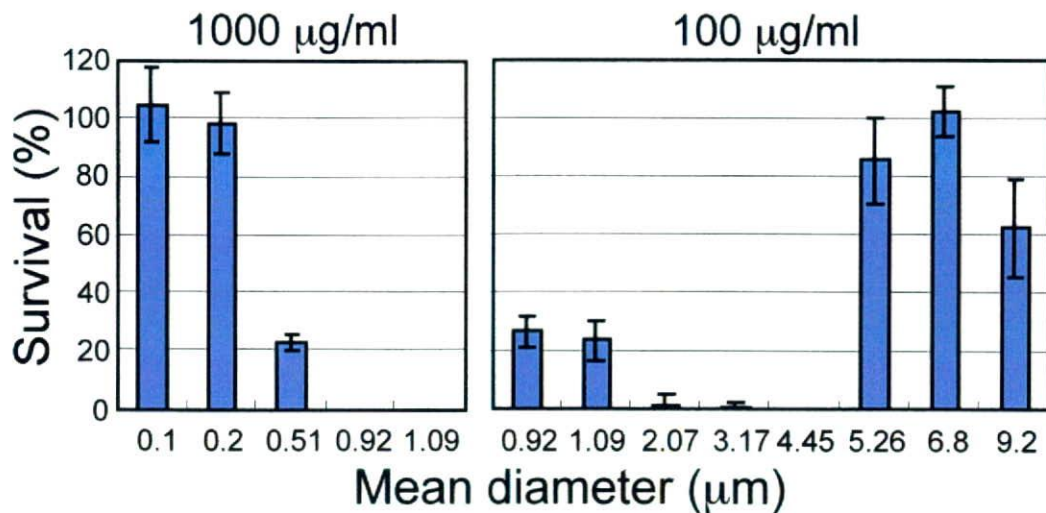
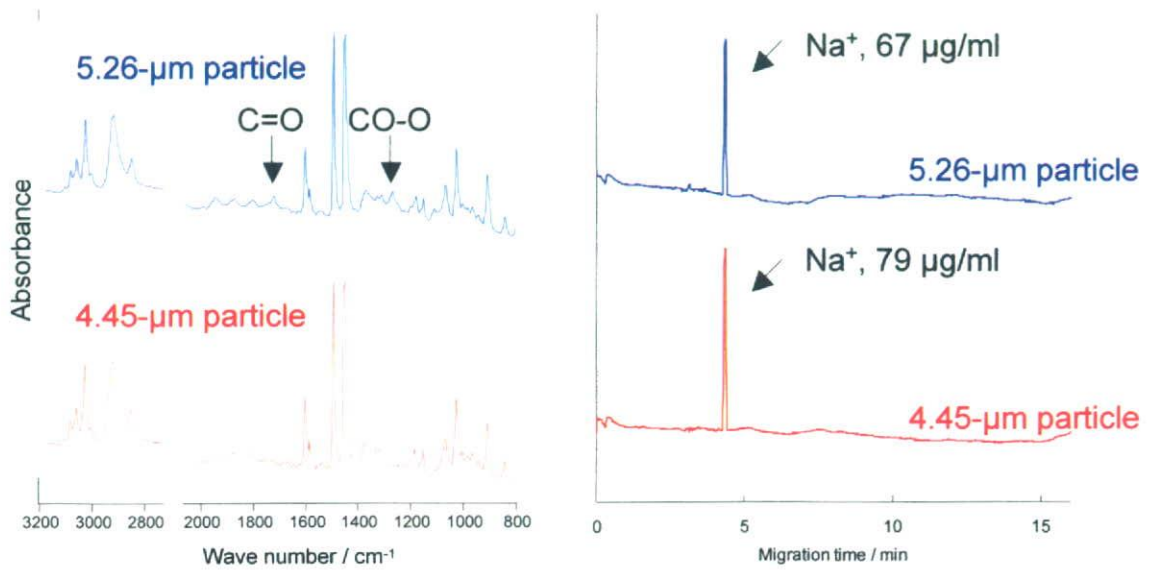


図2 特定濃度でのPS粒子の細胞毒性



FT-IR/ATR spectra of the particles

Capillary electropherograms of the dispersion vehicles

図3 PS粒子の表面解析および分散媒の性状

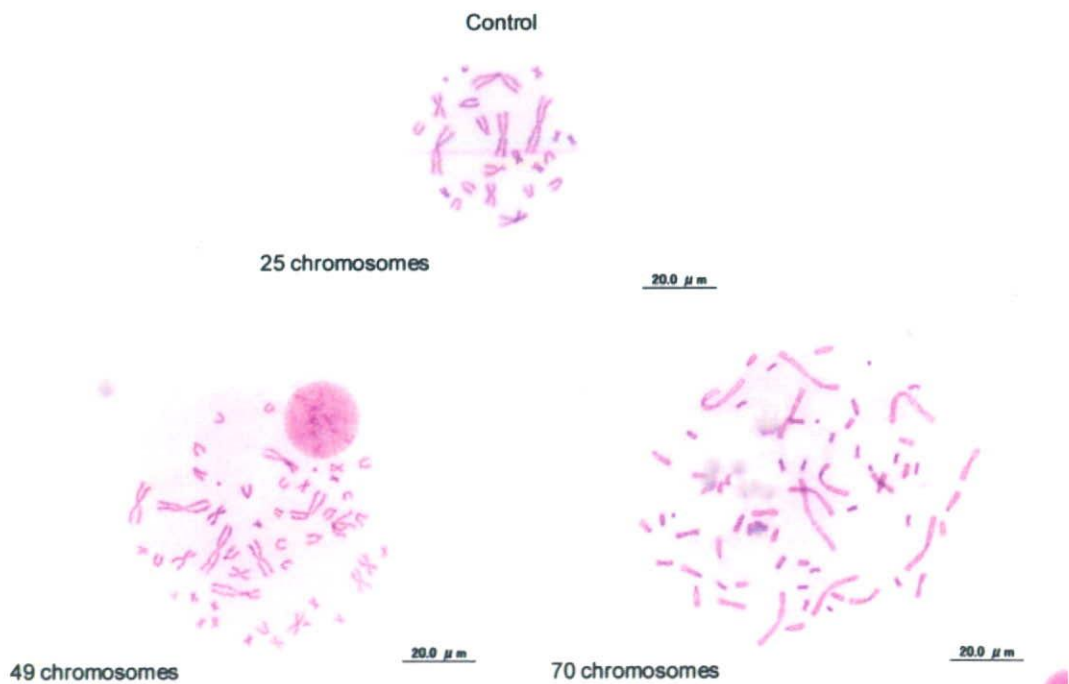
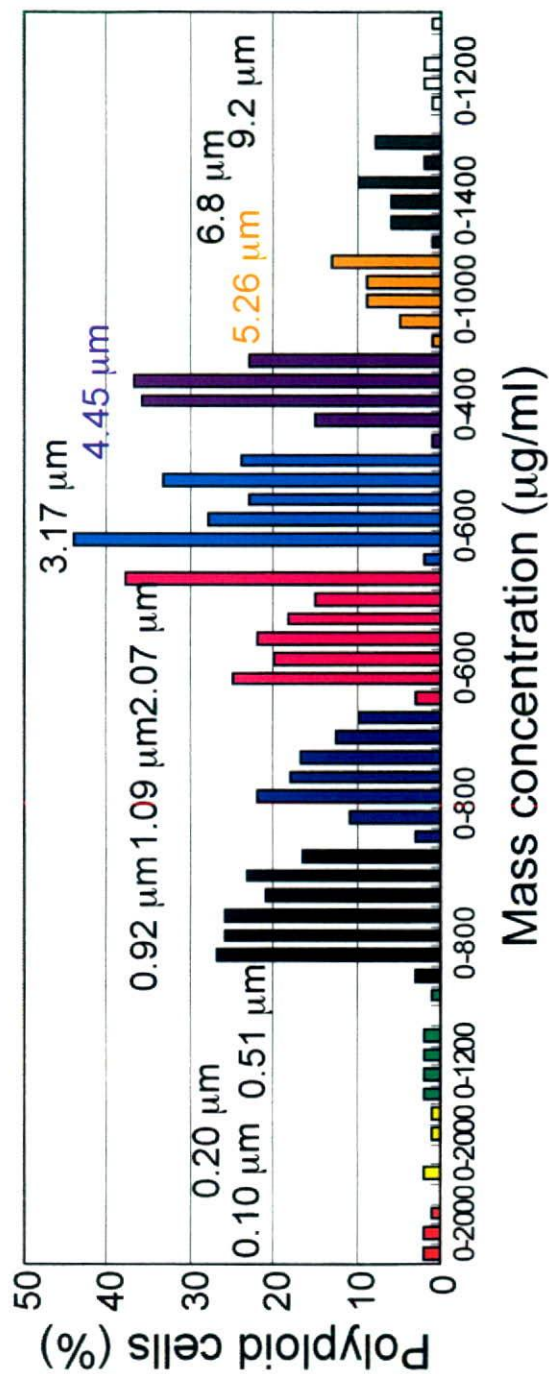
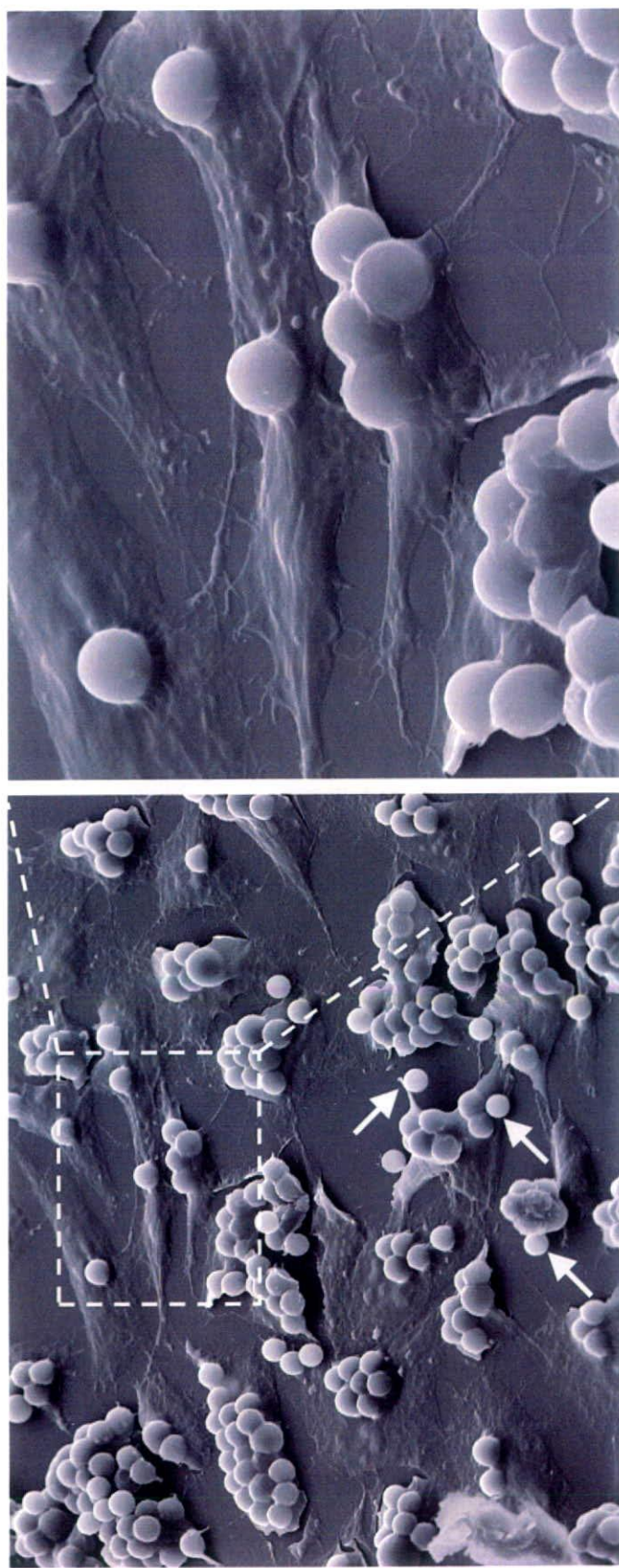


図4 PS粒子 (4.45 μm)によって誘発された倍数体



Mass concentrations indicate their range tested. Details are as follows:
 0, 1500, 1750, and 2000 µg/ml for the 0.10- and 0.20-µm particles
 0, 400, 600, 800, 1000, and 1200 µg/ml for the 0.51- and 9.2-µm particles
 0, 300, 400, 500, 600, 700, and 800 µg/ml for the 0.92- and 1.09-µm particles
 0, 100, 200, 300, 400, 500, and 600 µg/ml for the 2.07-µm particles
 0, 200, 300, 400, 500, and 600 µg/ml for the 3.17-µm particles
 0, 100, 200, 300, and 400 µg/ml for the 4.45-µm particles
 0, 400, 600, 800, and 1000 µg/ml for the 5.26-µm particles
 0, 600, 800, 1000, 1200, and 1400 µg/ml for the 6.8-µm particles

図5 PS粒子の倍数体誘発頻度



SEM (X3000)

SEM (X1000)

図6 PS粒子(4.45 μm)を貪食したCHL細胞

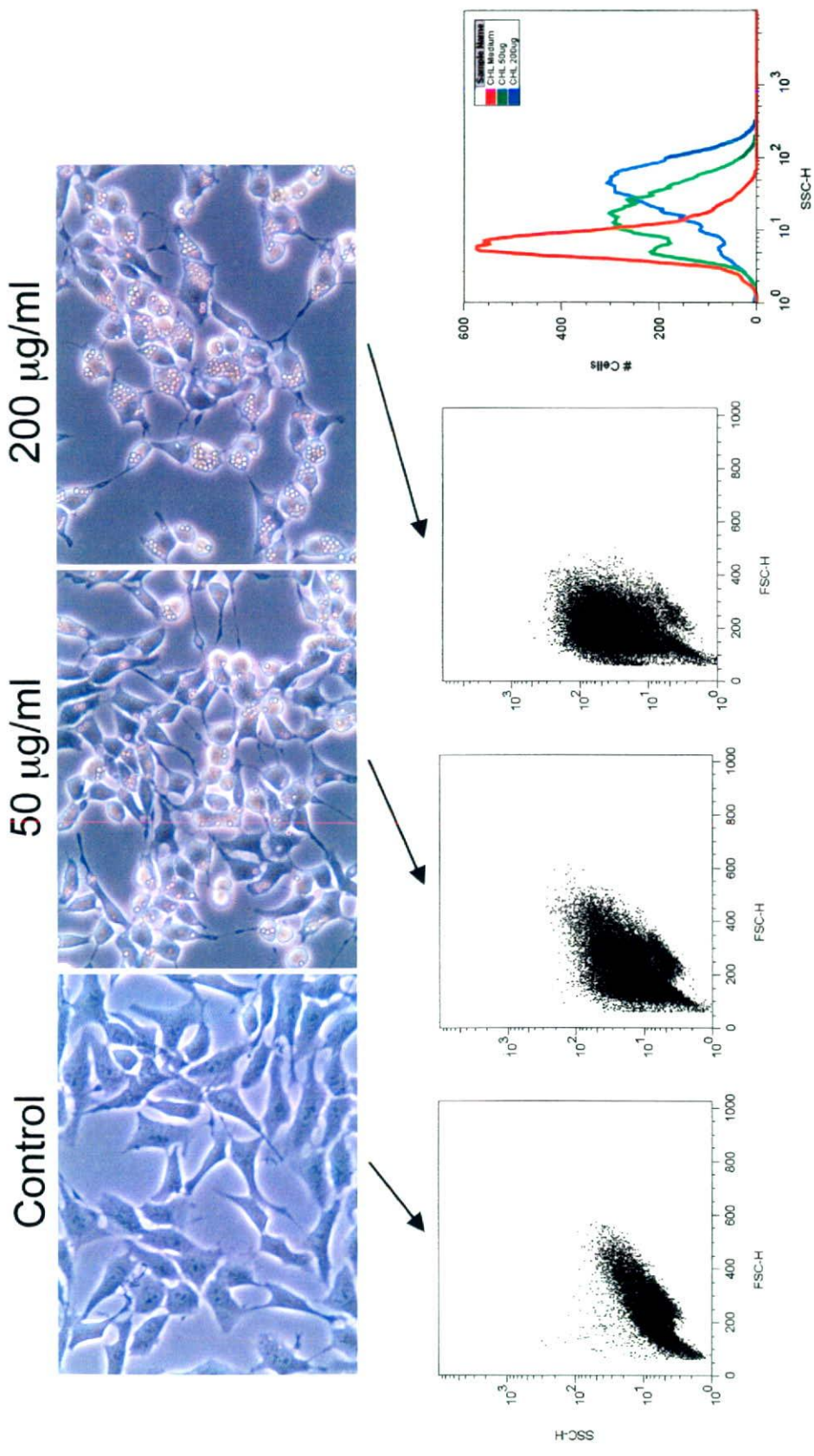


図7 PS粒子(3.17 µm)取り込みの様子とフローサイトメーター解析

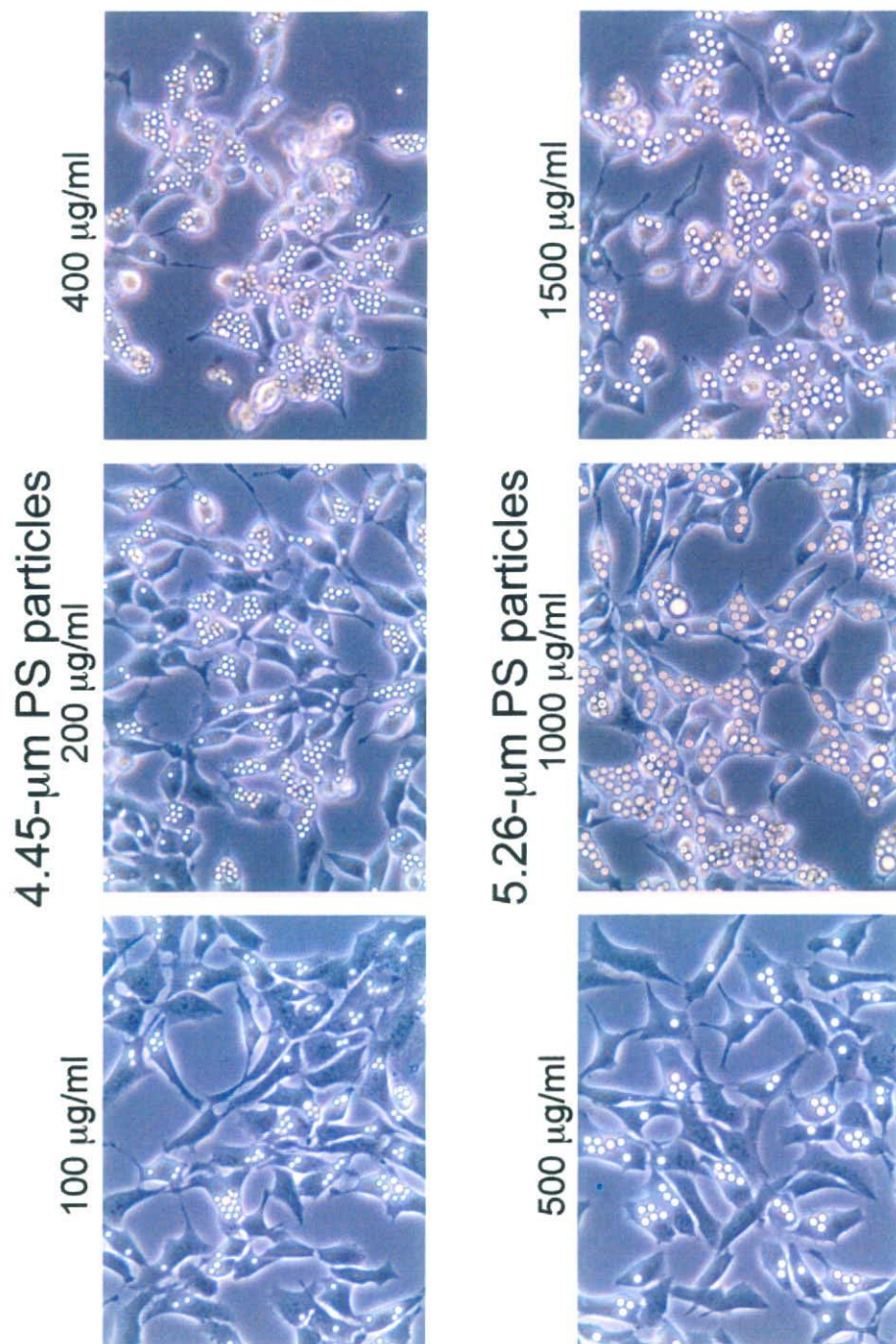


図8 PS粒子取り込みの様子

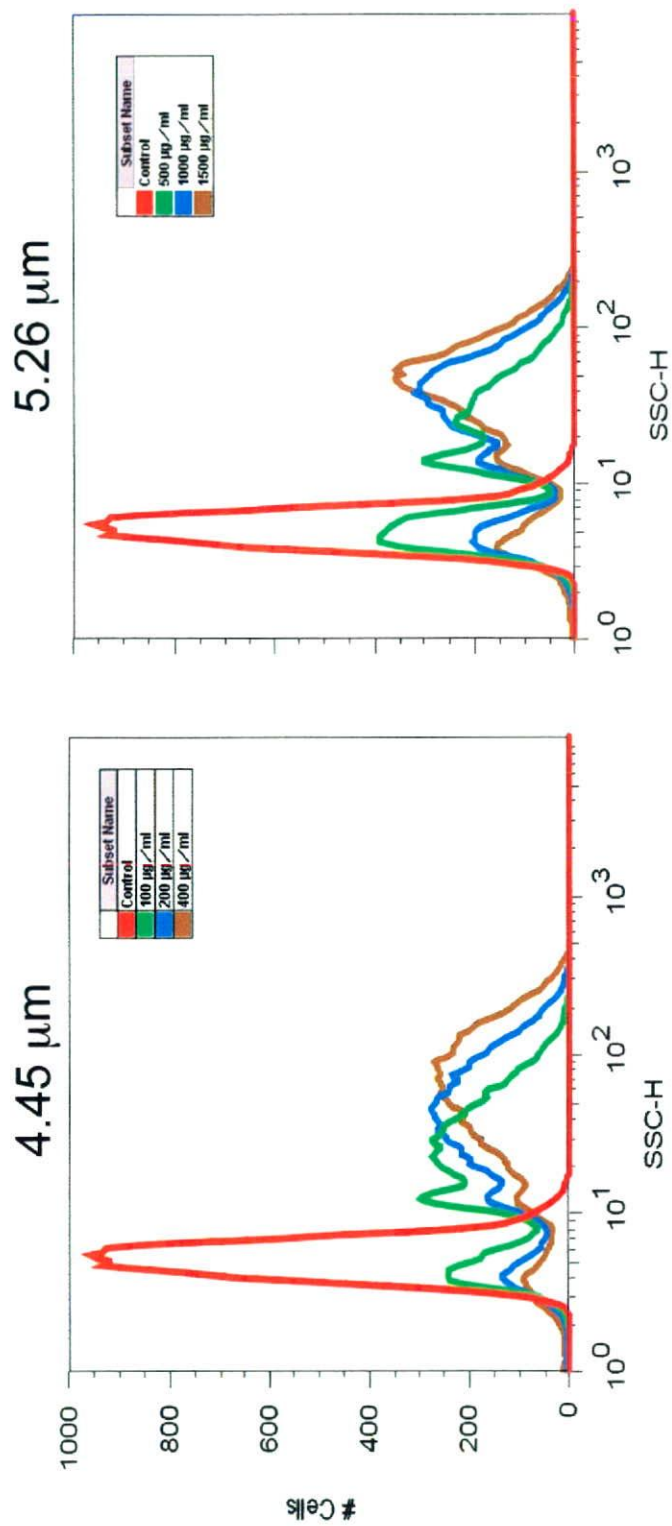


図9 フローサイトメトリによるPS粒子取り込み細胞の半定量化

3. 骨系材料の骨結合能による リスクアセスメント手法開発

伊佐間和郎

骨系材料の骨結合能によるリスクアセスメント手法開発

分担研究者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所療品部第二室長
協力研究者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所療品部研究員

アパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合でき、リスクの少ない骨系医療機器への応用が期待できる。我々は、表面処理したチタン合金をハックス平衡塩溶液に浸漬し、フーリエ変換赤外光音響分光法（FT-IR/PAS）を用いてアパタイト形成能を評価した。FT-IR/PAS法は、材料表面に形成したアパタイト量を定量的に解析することが可能であった。Ti-Zr、Ti-Zr-4Nb、Ti-6Al-4V 及び Ti は、NaOH 処理、NaOH + CaCl₂ 処理、NaOH + Ca(OH)₂ 処理の順にアパタイト形成能が高くなった。また、Ti-Zr-8Nb 及び Zr は、NaOH + Ca(OH)₂ 処理においてのみアパタイトを形成した。我々が考案した NaOH + Ca(OH)₂ 処理は、チタン合金に高いアパタイト形成能を付与する方法として有望である。アパタイト形成能の定量的評価は、骨系医用材料のリスクアセスメントに有用であり、アパタイト形成能が高く、骨結合性を有する材料の開発が期待できる。

A. 研究目的

整形外科領域で使用される骨系埋植医療機器には、骨スクリュー、骨プレート、CHS、 γ ネイル、髄内釘、人工関節などがある。高齢者人口の増加などによってこれら骨系医療機器の使用は年々増加しており、構造の複雑化や使用期間の長期化などの要因によって不具合の報告件数も増加傾向にある^{1,2)}。特に、埋植初期に見られる機器の破損や埋植部位近傍の骨折は、埋植した機器と骨との接着不足が原因であるとされており、埋植早期に生体骨と強く結合するような性質を付与した材料が開発されている。その代表例として、アルカリ加熱処理を施したチタ

ン合金が開発され、これを実用化した人工股関節は平成 19 年 10 月に製造販売承認された³⁾。骨系医用材料の骨結合能は、主に動物実験によって評価されているが、費用や時間、動物愛護などの観点で問題がある。したがって、動物実験に頼らず、臨床実態を反映するような骨系医用材料の骨結合能の評価法の確立が強く望まれている。

骨と直接結合するような性質の医用材料は、体液や擬似体液中で材料表面にアパタイトを形成する。擬似体液中でアパタイト形成能が高い材料は、生体骨と早期に直接結合することが期待できる^{4,5)}。擬似体液を用いる医用材料のアパタイト