

B-5 生物蓄積係数(BAF)の算出法

試験終了時に試験生物中 C_{60} 濃度: $[C_b]$ 、試験底質中 C_{60} 濃度: $[C_s]$ 及び被覆水中 C_{60} 濃度: $[C_w]$ を求めた。さらに次式から、生物蓄積係数 Bioaccumulation factor, BAF) を算出した。

$$\text{生物蓄積係数(BAF)} = [C_b] / [C_s]$$

C. 研究結果

C-1 観察及び測定

試験期間中、試験生物に異常等は認められなかった。槽内温度は $20 \pm 2^\circ\text{C}$ 、pH は $7.2 \sim 7.7$ の範囲であった。

試験底質については、開始前と比較し目視上、大きな変化は認められなかった。被覆水については、開始前は透明であったが、試験生物の投入後、白濁した。

C-2 分析結果

試験開始前及び試験終了時の分析結果は下記のとおりであった。

(1) 試験開始前

試験底質中のフラレーン濃度 $[C_s]$ は平均 9.83×10^{-2} mg/g-dry ($9.72 \times 10^{-2} \sim 9.99 \times 10^{-2}$ mg/g-dry) であり、ほぼ設定値であった。被覆水中のフラレーン濃度 $[C_w]$ については平均 5.38×10^{-3} mg/L ($1.81 \times 10^{-3} \sim 11.6 \times 10^{-3}$ mg/L) であった。

(2) 試験終了時

試験底質中のフラレーン濃度 $[C_s]$ は平均 6.26×10^{-2} mg/g-dry ($4.82 \times 10^{-2} \sim 7.33 \times 10^{-2}$ mg/g-dry) であり、設定値の $48.2 \sim 73.3\%$ であった。被覆水中のフラレーン濃度 $[C_w]$ については平均 3.74×10^{-1} mg/L ($3.06 \times 10^{-1} \sim 4.58 \times 10^{-1}$ mg/L) であった。また、試験生物中のフラレーン濃度 $[C_b]$ は平均 7.62×10^{-4} mg/g-wet ($6.79 \times 10^{-4} \sim 9.11 \times 10^{-4}$ mg/g-wet) であった。

C-3 生物蓄積係数(BAF)

試験生物の生物蓄積係数(BAF) は下記のとおりであった。

$$\text{BAF} = (7.62 \times 10^{-4} \text{ mg/g-wet}) / (6.26 \times 10^{-2} \text{ mg/g-dry}) = 0.0121$$

なお、 $[C_s]$ 及び $[C_b]$ 濃度については、 $n=3$ の平均値を用いた。

D. 考察

試験開始前の試験底質中のフラレーン濃度はほぼ設定値であったことから、土壤中のフラレーンの多くは安定に存在すると考えられた。しかしながら、終了時の濃度は設定値の $48.2 \sim 73.3\%$ であった。HPLC による分析結果より、終了時に変化物と考えられる成分は検出されなかったことから、変化物生成による濃度低下ではないと考えられる。一方、試験底質中のフラレーン濃度の低下の原因として、エアレーション及び試験生物の活動により、底質中の被験物質の一部が脱着して浮遊した可能性がある。被覆水のフラレーン濃度は $3.06 \times 10^{-1} \sim 4.58 \times 10^{-1}$ mg/L であり、このときの被覆水 (250 mL) 中のフラレーン量はおよそ 9.0×10^{-2} mg となる。よって、試験底質 (100 g) 中の設定値のフラレーン量が 1.0×10 mg であることを考慮すると、フラレーンの浮遊が試験底質中のフラレーン濃度の低下の大きな要因ではないと考えられる。

関らは、フラレーンの水生生物における急性毒性試験を行った結果、藻類試験において、 0.051 mg/L 以上の濃度区で統計学的に有意な成長速度 (0-72 時間) の抑制が認められ、成長速度 (0-72 時間) に基づく 72-h NOEC (最大無作用濃度) は 0.0178 mg/L であったとしている。その原因の可能性として、試験期間中の照明によって光励起されたフラレーンの影響を考察している⁽¹⁾。試験終了時の濃度低下原因は不明であるが、今後、光等の環境要因に対する影響や底質の採取方法及び前処理操作の再現性の確認が必要である。

試験生物であるイトミズについては、フラレーンが検出され、その濃度は $6.79 \times 10^{-4} \sim 9.11 \times 10^{-4}$ mg/g-wet であった。試験終了時のイトミズの観察で生物の腸管に沿って黒い線がみられたことから、腸管等の消化器官内にフラレーンが残留したと考えられる。一方、イトミズのような底生生物を捕食する

コイを用いて、フラーレンの蓄積性について流水及び経口法で調べたところ、取込み経路[水(鯉)及び餌]に関わらず、フラーレンの蓄積性は認められなかった⁽²⁾。従って、底生生物へのフラーレンの蓄積性については、排泄試験や腸管等の消化器官の詳細観察等の実施により、その濃縮性を詳細に調べる必要がある。

E. 結論

環境中に放出されたフラーレンは、微生物により生分解されず、土壌への吸着や水中に浮遊することが推測される。さらに、底生生物のフラーレンの消化器官への残留も示唆された。今後、生態系を考慮した総合的なフラーレンの環境動態と生物への影響等を解明していく必要がある。

参考文献

(1) Seki *et al.* Acute toxicity of fullerene C60 in aquatic organisms. 環境科学会誌, 21(1), 53-62 (2008)

(2) 経済産業省委託「平成 16-19 年度化学物質試験方法開発等」報告書

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

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 底質の組成

成分	特性	乾燥重量比
PEATモス	カナダ産 Sphagnum spp.のPEATモス 85°C、48 時間で空気乾燥後粉碎し、孔径 250 μm の篩を通過させたもの	2%
石英砂	Quartz fine granular (MERCK 製) 粒子径が 0.8 mm 以下のものを 40%以上含む	76%
カオリン	はくとう土(試薬級)	22%
ほうれん草粉末	無農薬栽培された、ほうれん草を空気乾燥後粉碎し、孔径 250 μm の篩を通過させたもの	0.5%
炭酸カルシウム	和光純薬(試薬特級)	適宜

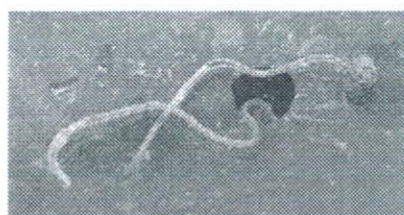


写真1 イトミズ(*tubifex tubifex*)

平成 20 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)
研究分担報告書

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

研究分担課題名: 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

研究分担者 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

本年度は、氷砂糖、HCO-40 らいかい法により溶解化したのフラーレン水分散液を用い、細胞に添加した時の影響を HeLa 細胞ならびにマウス腹腔マクロファージを用いて検証した。その結果、HeLa 細胞に対するフラーレン水分散液の影響については、溶媒中の界面活性剤の細胞毒性はみられたものの、HeLa 細胞の生存率および形態におけるフラーレン自体の毒性は、最終フラーレン濃度:8.7 μ M 以下の濃度ではみられなかった。また、マウス腹腔マクロファージに対する影響を検討した実験では、6.8 μ M までの濃度で、形態変化や炎症性サイトカインの放出性において、顕著な影響を与えないことが示された。

A. 研究目的

ナノマテリアルはナノサイズで構造が制御された物質であり、優れた性能および機能性を兼ね備えた新機能材料として注目を集めている。しかしながら、ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については不明な点が多く、その解明が重要な課題となっている。

我々はこれまで、フラーレン (C60) を含んだリポソームをマウス腹腔マクロファージに投与し、マクロファージの泡沫化や炎症性サイトカイン (TNF- α) の放出に対する影響を調べたが、いずれにおいても影響は見られなかった。本年度は、「財団法人化学物質評価研究機構」において開発された水溶性のフラーレン水分散液を用い、細胞に添加した時の影響を HeLa 細胞ならびにマウス腹腔マクロファージを用いて検証した。

B. 研究方法

フラーレン水分散液の調製: フラーレンに氷砂糖 (鳳冰糖製)をらいかい後、HCO-40(日光ケミカルズ製)を加え、さらにらいかいした。これにイオン交換水或いは基礎培養基を加えフラーレン水分散液とした(財団法人化学物質評価研究機構提供、特許公開 2007-063063、右上図:左チューブを参照。写真は 500 mg/L フラーレン水分散液)。さらにフラーレン水分散液を 0.45 μ m のフィルターにより濾過滅菌した。



1. HeLa細胞に対する水溶解性のフラーレン水分散液の投与:

HeLa細胞を10000 cells /wellで96ウェルプレートに播種し、一晚培養後、0.01%~20%の範囲で段階希釈した500mg/Lフラーレン水分散液を加えた(最終フラーレン濃度:68nM~140μM)。対照群として同様に0.01%~20%の範囲で段階希釈した溶媒を用いた。フラーレン添加後24時間の細胞生存率をMTTアッセイの変法(Cell Counting Kit-8、同仁化学)により測定した。

2. マウス腹腔マクロファージに対する水溶解性のフラーレン水分散液の投与:

マウス(C57BL/6J 12weeks ♂ 日本クレア)にチオグリコレート培地(2.875% w/v 和光純薬工業)を1.5 mL i.p. し、72h後にPBSで腹腔細胞を回収した。これを10% FCS D-MEMに懸濁し、6ウェル及び24ウェルプレートにて培養した(6ウェルは 4×10^6 cells /well、24ウェルは 1×10^6 cells /wellで播種)。2時間後PBSでwashし、未接着の細胞を取り除き、再度10% FCS D-MEMを加えて37℃で一晩培養した。10% FCS D-MEMで0.1%あるいは1% v/vに希釈した500mg/Lフラーレン水分散液(最終フラーレン濃度はそれぞれ680nM、6.8μM)で培養液を置換し、さらに24時間培養を行った(上記の実験より、HeLa細胞に対して溶媒中の界面活性剤による毒性の出ない濃度として、0.1%あるいは1% v/vを選択した)。24時間後に、細胞の形態を観察すると共に培養液を回収し、ELISAによって炎症性サイトカイン(TNF- α 及びIL-6)の放出量を測定した。

C. 研究結果 と D. 考察

1. HeLa細胞に対する水溶解性のフラーレン水分散液の投与:

フラーレン添加後24時間の細胞の生存率をMTT法により評価した結果、フラーレン水分散液、対照群の溶媒ともに2.5%の濃度から細胞死が見られ、10%の濃度ではほとんどの細胞が死滅した(図1)。フラーレンを含まない溶媒のみの添加でも同様の細胞死が観察されたことから、フラーレン自体の毒性ではなく、溶媒に含まれる界面活性剤が影響していると考えられた。界面活性剤により細胞は腫脹することが知られている。フラーレン処理した細胞の顕

微鏡像において、2.5%以上の濃度では腫脹した細胞が観察されたことから、界面活性剤による細胞死であることが確認された(図2)。

溶媒中の界面活性剤の細胞毒性はみられたものの、HeLa細胞の生存率および形態におけるフラーレン自体の毒性は、少なくとも1.25%(最終フラーレン濃度:8.7μM)以下の濃度ではみられなかった(図1、図2)。

2. マウス腹腔マクロファージに対する水溶解性のフラーレン水分散液の投与:

フラーレンを水分散液としてマウス腹腔マクロファージに添加したが、680nM、6.8μMいずれのフラーレン濃度においても、形態的な変化は認められなかった(図3)。また、フラーレンを処理しても炎症性サイトカイン(TNF- α 、IL-6)の放出は検出されなかった。以上の結果から、水分散液、リポソームのいずれをキャリアとしても、フラーレンはマウス腹腔マクロファージに顕著な影響を与えないと考えられる。

E. 結論

HeLa細胞に対するフラーレン水分散液(氷砂糖、HCO-40らいかい法)の影響を検討したところ、溶媒中の界面活性剤の細胞毒性はみられたものの、HeLa細胞の生存率および形態におけるフラーレン自体の毒性は、最終フラーレン濃度:8.7μM以下の濃度ではみられなかった。また、マウス腹腔マクロファージに対するフラーレン水分散液(氷砂糖、HCO-40らいかい法)の影響を検討した実験では、6.8μMまでの濃度で、形態変化や炎症性サイトカインの放出性において、顕著な影響を与えないことが示された。

F. 研究発表

1. 論文発表 なし
2. 学会発表 なし

G. 知的所有権の取得状況

なし

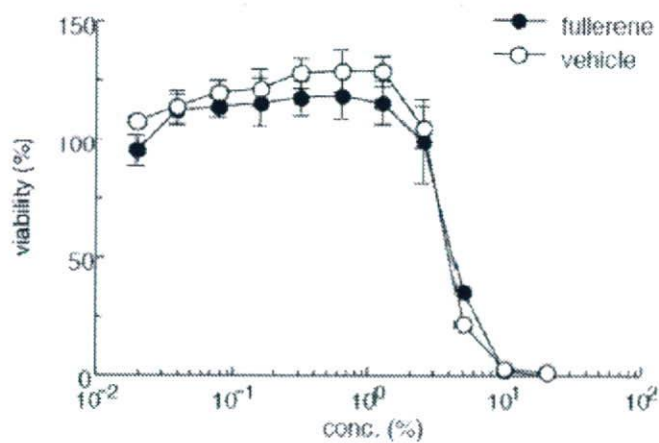


図 1 : フラーレン水分散液の細胞毒性評価 (HeLa 細胞)

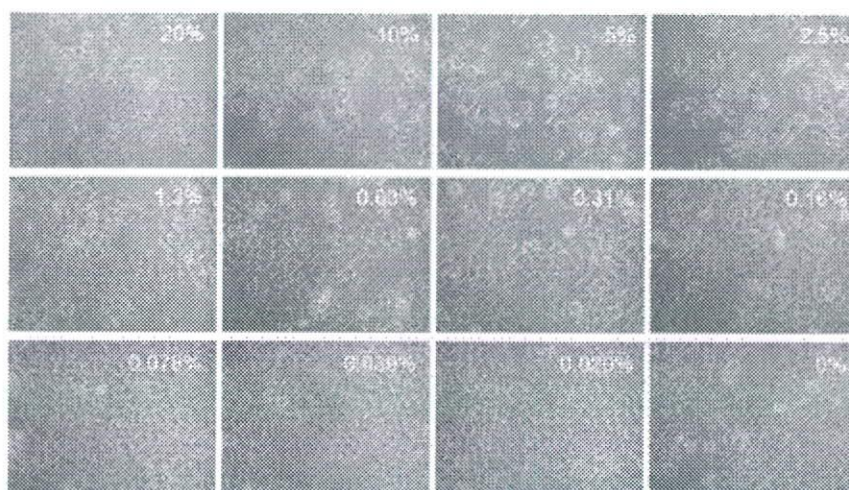


図 2 : フラーレン水分散液添加 24 時間後の HeLa 細胞の顕微鏡像 (明視野)



図 3 : フラーレン水分散液添加 24 時間後のマクロファージの顕微鏡像 (明視野)

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

研究分担課題名：ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的研究

研究分担者： 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
研究協力者： 山影 康次 (財)食品薬品安全センター秦野研究所
中川 ゆづき (財)食品薬品安全センター秦野研究所

研究要旨

ナノ物質の一つである酸化チタン(TiO_2)とフラーレン(C60)について、その *in vitro* 光毒性を評価した。ルチル型、およびアナテート型 TiO_2 と C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、BALB3T3 細胞を用いて定法に従って光毒性試験を行った。照射には、フィルターを装着して太陽光に近い条件にした光照射装置である SOL 500 および SLX-2500V を用いた。1mg/ml の濃度まで試験した結果、アナテート型 TiO_2 で 0.01～1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察された。IC50 (細胞増殖を半減させる濃度) は 0.09mg/ml と計算された。アナテート型 TiO_2 は光触媒反応を持ち、活性酸素を発生させることから光毒性作用はこの光触媒作用に関与するものと考えられる。一方、ルチル型 TiO_2 、C60 には光毒性作用は観察されなかった。

In vivo でのナノ物質の光毒性作用、遺伝毒性、発がん性との相関などが今後の課題である。

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、ナノ物質の一つである酸化チタン(TiO_2)と超微粒子フラーレン(C60)について、その *in vitro* 光毒性を評価した。

B. 研究方法

1. 試験化合物

ナノ化合物として Nanom purple SUH(C60、

ロット番号：7B004-A) および二酸化チタン LU175(ロット番号:011016)を用いた。いずれも、0.5w/v%カルボキシメチルセルロースナトリウム水溶液(CMC Na)に懸濁し、1 vol%添加して処理を行った。また、光毒性作用が知られている化合物として、二酸化チタン p-25(アナテース型、平均粒子サイズ:0.021 μm 、日本アエロジル)とクロロプロマジン塩酸塩(CPZ、ロット番号:048H1403、Sigma)を用いた。p-25 については、0.5w/v%CMC Na に懸濁した調製液を 1 vol%添加し、CPZ については、日局注射用水に溶解した調製液を 1 vol%添加して処理を行った。

2. 細胞

BALB3T3 clone A31 細胞を用いた。培養には、新生仔ウシ血清(ロット番号:AQ24903、Hyclone)を 10 vol%添加したダルベッコ変法イーグル MEM(DMEM)を用いて CO₂ インキュベーター (5% CO₂、37°C) 内で培養した。

3. 光照射装置

光照射には、フィルターを装着して太陽光に近い条件にした光照射装置である SOL 500 (Dr. K. Hönle) および SLX-2500V(セリック)を用いた。光照射する場合には、照射前に UVA の照射照度が約 2.5 mW/cm² となる位置を UVA メーター (UVR-3036/S、トプコン) で調べ、その位置に蓋をした 96 ウェルプレートを置き、室温で光照射を行った。なお、照射照度の測定はセンサー部に蓋をかぶせた状態で行った。

4. 処理方法

96ウェルプレートのウェルに細胞を播種(10⁴細胞/ウェル)し、約24時間培養後に化合物調製液を添加したアールの平衡塩緩衝液(EBSS)と交換し、CO₂ インキュベーターで 60 分間前処理を行った。前処理終了後、2.5 mW/cm² の UVA で 50 分間光照射(総照射線量:7.5 J/cm²)を行った。非照射群については、遮光してクリーンベンチ内に 50 分間放置した。処理終了後、EBBS で細胞を洗い、培養液を加えて培養した。約 17 時間培養後、Neutral Red (NR)を含む培養液(NR の最終濃度:50 µg/mL)と交換し、3 時間培養した。培養終了後、NR を含む培養液を捨て、1%CaCl₂-1%ホルマリン溶液を添加し、細胞を固定すると同時に NR を抽出し、NR 抽出液の吸光度(540 nm)を

マイクロプレートリーダーで測定した。コントロール群に対する相対生存率を算出し、50%の相対生存率を挟む 2 濃度の値を用いて、50%の細胞増殖抑制濃度(IC₅₀)を算出した。

(倫理面への配慮)

本研究ではいかなるヒト生物材料を使用しておらず、また実験動物も使用していないため倫理上問題はない。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) 酸化チタン(TiO₂)

ルチル型、およびアナテート型酸化チタンの光毒性試験結果を表 1 に示す。1mg/ml の濃度まで試験した結果、アナテート型 TiO₂ で 0.01~1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察された。IC₅₀ (細胞増殖を半減させる濃度)は 0.09mg/ml と計算された。一方、ルチル型 TiO₂ の光毒性作用は観察されなかった。

2) フラーレン (C60)

C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、光毒性試験を行った結果を表 2 に示す。光の有無にかかわらず C60 は 1.0mg/ml までの濃度で BALB3T3 細胞に対して細胞毒性を示さず、また光毒性作用も観察されなかった。

D. 考察

ナノマテリアルは、その大きさや形状が、アスベストと類似していることから生体毒性、特に発がん性が懸念されている。しかしながら、ナノマテリアルの多くは不溶性

であり、その生体影響に関する試験が極めて困難である。今回 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、光毒性を検討したが、比較的分散性は良かった。しかしながら顕微鏡観察下で形状は主として μm であり、ナノに相当する成分は数%程度と考えられた。

昨年度の本研究においてはこの 0.5%カルボキシメチルセルロース-C60 懸濁物を CHL 細胞と共に培養すると、用量依存的に細胞毒性が観察され、染色体の構造異常の誘発は認められなかったが、倍数体細胞の有意な増加が観察したことを報告した。C60 の倍数性誘発機構として物理的要因による細胞質分裂阻害の可能性が考えられるため、C60 の調整法、分散法により倍数性の誘発の程度が異なるのかもしれない。いずれにせよ細胞表面との接触が何らかの細胞機能を変化させる可能性が指摘された。

今回、同じサンプルについて BALB3T3 細胞で *in vitro* 光毒性を検討したが、毒性は観察されなかった。これまでヒト皮膚角化細胞へ可視光を照射する光毒性試験、ならびにメラノサイト細胞に紫外線を照射した際の DNA 切断を評価する試験も実施され、いずれも問題ないことが確認されており、今回の結果は C60 が光毒性を示さないことを支持する結果となった。C60 はむしろ活性酸素やラジカルを消去する作用により、美肌効果や肌の老化防止効果があるとされており、美容液やローションなどに配合されている。

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 TiO₂

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 TiO₂ はヒト、および動物では生物学的に不活性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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ は遺伝毒性物質と考えられる。これまでの我々の研究結果もこれら報告を支持するものである。

TiO₂ 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。TiO₂ 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。

TiO₂ 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とから今回光毒性試験を実施した。その結果、アナテート型 TiO₂ で 0.01~1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察された。IC50 (細胞増殖を半減させる濃度) は 0.09mg/ml と計算された。一方、ルチル型 TiO₂、C60 には光毒性作用は観察されなかった。

アナテート型 TiO₂ の光毒性についてはこれまで中川らによって報告されている。この光毒性はカタラーゼや、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。産業的にアナテート型 TiO_2 は光触媒反応を持ち、活性酸素を発生させる。建物などのコーティング剤として既に実用化されており、粉塵などの付着の抑制、抗菌作用、大気中オキシダントの無毒化等の効果が期待されている。一方、その安全性に関しては懸念はされているが、*in vivo* での影響（急性毒性や発がん性）については報告が少ない。IARC（国際がん研究機関）の発がん性分類では 2B（ヒトに対する発がん性について十分なデータがない）となっている。

E. 結論

ナノ物質の一つである酸化チタン(TiO_2)とフラーレン(C60)について、その *in vitro* 光毒性を評価した。ルチル型、およびアナテート型 TiO_2 と C60 に関して光毒性試験を行った。1mg/ml の濃度まで試験した結果、アナテート型 TiO_2 で 0.01～1.0mg/ml の濃度域で用量依存的な光毒性が観察された。アナテート型 TiO_2 は光触媒反応を持ち、活性酸素を発生させることから光毒性作用はこの光触媒作用に関与するものと考えられる。一方、ルチル型 TiO_2 、C60 には光毒性作用は観察されなかった。*In vivo* でのナノ物質の光毒性作用、遺伝毒性、発がん性との関連などが今後の課題である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Yatagai, F., Umebayashi, Y., Honma, M., Sugawara, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F.

Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)

Yasui, M., Suenaga, E., Koyama, N., Masutani, C., Hanaoka, F., Gruz, P., Shibutani, S., Nohmi T., Hayashi, M., and Honma, M. Miscoding properties of 2'-deoxyinosine, a nitric oxide-derived DNA Adduct, during translesion synthesis catalyzed by human DNA polymerases. *J Mol Biol*, 377, 1015-1023 (2008)

Yatagai, F., Suzuki, M., Ishioka, N., Ohmori, H., Honma, M. Repair of I-SceI Induced DSB at a specific site of chromosome in human cells: influence of low-dose, low-dose-rate gamma-rays. *Radiat Environ Biophys* 47, 439-44 (2008)

Nohmi, T., Toyoda-Hokaiwado, N., Yamada, M., Masumura, K., Honma, M., and Fukushima, S. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds. *Genes and Environment*, 30, 101-107 (2008)

本間正充；遺伝毒性物質に閾値はあるのか？*ファルマシア* 45, 143-148 (2009)

2. 学会発表

本間正充：医薬品に不純物として含まれる遺伝毒性物質の分類と許容量 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会(2008.6)

本間正充：ICH における新しい遺伝毒性試験ガイドライン (S2R1) と試験実施タイミング 第 35 回日本トキシコロジー学会学

術年会(2008.6)

Honma, M. Ultimate Threshold and Genetic Consequence of A Single Double Strand Break in Human Cells. International Symposium on Genotoxic and Carcinogenic Thresholds (2008.7)

Honma, M. Genome Mapping of Damaged Chromosome Regions Induced by Ionizing Irradiation Using DNA Microarray Analysis. 38th European Environmental Mutagen Society (2008.9)

鈴木孝昌、小木美恵子、小原有弘、本間正充、田邊思帆里、山口照英：SNP および CGH マイクロアレイを用いた c-myc 遺伝子増幅に関する詳細解析 第 67 回日本癌学会総会(2008.10)

谷田貝文夫、菅澤薫、榎本秀一、本間正充：DSB 修復効率からの適応応答の追求 日本放射線影響学会第 51 回大会(2008.11)

本間正充：DNA 二本鎖切断修復と遺伝的不安定性 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

安井 学、本間正充：ヒトリンパ球細胞のゲノム内に導入させた 8-オキシグアニン 1 分子の突然変異誘発能 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充：ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価 日本環境変異原学会第 37 回大会

(2008.12)

斉藤美香、松藤寛、千野誠、林真、本間正充、山形一雄：過酸化水素によって誘導されたヒトリンパ芽球細胞 TK6 の細胞増殖と遺伝毒性に対する天然抗酸化物質の保護効果 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

木村葵、坂本浩子、西郷和彦、洲加本孝幸、本間正充：*In vitro* コメットアッセイプロトコールの検証 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

Wang, J., Sawyer, J., Honma, M., Chen, T., and Moore, M. The Mouse Lymphoma Assay detects recombination, deletion, and aneuploidy. 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

谷田貝文夫、高橋昭久、本間正充、鈴木ひろみ、大森克徳、関真也、橋爪藤子、島津徹、榎本秀一、大西武雄、石岡憲昭：宇宙実験：放射線影響の LOH 検出系による解析 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

鈴木孝昌、小泉朋子、本間正充、中嶋圓、濱田修一、渡辺貴志、降旗千恵：トキシコゲミクスに関する JEMS/MMS 共同研究 II：遺伝子傷害性発癌物質の迅速スクリーニング系としての TaqMan Low Density Array の評価 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

本間正充、櫻庭真弓、汲田和歌子、林 真：DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

中嶋圓、鈴木雅也、田中仁、本間正充、林真：*In vitro* コメットアッセイ国際バリデーションデータ解析に関する一考察 日本環境変異原学会第 37 回大会(2008.12)

G. 知的所有権の取得状況

なし

安井学、Suzuki, N.、本間正充、Shibutani, S. : 一酸化窒素によって形成する DNA 付加体の誤塩基対形成メカニズム 第 31 回分子生物学会(2008.12)

表1 酸化チタンの光試験結果

Chemical	Phtoirradiation	Concentration (mg/mL)	OD ₅₄₀ (-blank)	% of control	IC ₅₀	
					Chemical	CPZ
Titanium dioxide ルチル型(LU175)	Without	0	0.447	100.0		
		0.0078	0.383	85.7		
		0.016	0.438	98.0		
		0.031	0.449	100.4		
		0.063	0.403	90.2	>1.0 mg/mL	16.7 g/mL
		0.13	0.486	108.7		
		0.25	0.421	94.2		
		0.50	0.459	102.7		
	1.0	0.396	88.6			
	With	0	0.442	100.0		
		0.0078	0.417	94.3		
		0.016	0.406	91.9		
		0.031	0.461	104.3		
		0.063	0.475	107.5	>1.0 mg/mL	0.67 g/mL
0.13		0.440	99.5			
0.25		0.387	87.6			
0.50		0.383	86.7			
1.0	0.315	71.3				
Titanium dioxide アナテート型(P25)	Without	0	0.228	100.0		
		0.0078	0.287	125.9		
		0.016	0.321	140.8		
		0.031	0.315	138.2		
		0.063	0.316	138.6	>1.0 mg/mL	13.7 g/mL
		0.13	0.307	134.6		
		0.25	0.283	124.1		
		0.50	0.322	141.2		
	1.0	0.306	134.2			
	With	0	0.232	100.0		
		0.0078	0.235	101.3		
		0.016	0.213	91.8		
		0.031	0.183	78.9		
		0.063	0.145	62.5	0.09 mg/mL	0.46 g/mL
0.13		0.064	27.6			
0.25		0.034	14.7			
0.50		0.021	9.1			
1.0	0.050	21.6				

表2 Nanom purpleの光試験結果

Chemical	Phtoirradiation	Concentration (mg/mL)	OD ₅₄₀ (-blank)	% of control	IC ₅₀	
					Chemical	CPZ
Nanom purple SUH	Without	0	0.304	100.0		
		0.0078	0.314	103.3		
		0.016	0.326	107.2		
		0.031	0.310	102.0		
		0.063	0.342	112.5	>1.0 mg/mL	11.5 g/mL
		0.13	0.330	108.6		
		0.25	0.308	101.3		
		0.50	0.344	113.2		
		1.0	0.285	93.8		
	With	0	0.280	100.0		
		0.0078	0.347	123.9		
		0.016	0.292	104.3		
		0.031	0.313	111.8		
		0.063	0.346	123.6	>1.0 mg/mL	0.54 g/mL
		0.13	0.324	115.7		
		0.25	0.328	117.1		
		0.50	0.293	104.6		
1.0		0.292	104.3			

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

研究分担課題名: 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

研究分担者: 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部

研究協力者: 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第一室長

研究要旨

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経系機能蛋白質に対する潜在的影響について *in vitro* 実験系を用いた評価を試みている。本年度はカーボンナノチューブ (CNT) のグルタミン酸 (L-glu) トランスポーター (GLAST) 機能 ならびに ATP 受容体 (P2X2 受容体) 機能に対する影響評価を、複数の異なるメーカーのサンプルを用いて試みた。CNT は培養アストロサイトの MTT reduction を減少させること、一部の CNT がアストロサイトに対し細胞毒性を示すこと、GLAST 機能を亢進することを見いだした。また、CNT は アフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた P2X2 受容体を介したイオン電流を抑制する傾向があった。以上の結果より、GLAST 機能評価系ならびに P2X2 受容体機能測定系が CNT の *in vitro* 評価系として使用しうることが示された。ここで検出された CNT の作用と CNT の直径、壁厚、長さとの関連についてはさらなる検討を要する。

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、神経細胞等の機能蛋白質に対する潜在的影響について *in vitro* 実験系を用いた評価を試みることを目的とする。本年度はカーボンナノチューブ (CNT) の L-glu トランスポーター機能 ならびに ATP 受容体機能に対する影響評価を、複数の異なるメーカーのサンプル 0~4 を用いて試みた。サンプルの直径、壁厚、長さはそれぞれ異なっている。

mg/ml); サンプル 2 (Aldrich-sigma, 1.002 mg/ml); サンプル 3 (Aldrich-sigma, 1.004 mg/ml). 各サンプルの詳細は表 1 の通りである。

ラベルNo.	頒布元	品目	OD (nm)	ID (nm)	Length (μm)	Lot No.	Conc. (mg/ml in FBS)
0	MITSUI	MWCNT				0601250-01k	1.004
1	Aldrich-Sigma	MWCNT, short	40-70	5-40	0.5-2	04519DC	1.006
2	Aldrich-Sigma	MWCNT	10-15	2-6	0.1-10	12127PE	1.002
3	Aldrich-Sigma	MWCNT	110-170		5-9	03121TH	1.004

<表 1 実験に用いた CNT>

B. 研究方法

0. CNT 調整

CNT はプラスチック等に非常に吸着しやすいため FBS に溶解した: サンプル 0 (Mitsui, 1.004 mg/ml); サンプル 1 (Aldrich-sigma, 1.006

1. L-glu トランスポーターに対する影響評価系の検討

生後 3 日令ラット脳大脳皮質を 0.25% トリプシン及び 0.01% DNase 処理し、得られた細胞を 10% FBS 含有改変 DMEM 培地でコンフルエントになるまで 10-15 日間培養した。フラスコを振とうし、培養細胞からアストロサイト以外の細胞を除去し、再度コンフルエントになるまで 7 日間培養した。0.1% トリプシン 1 mM EDTA を用いてアストロサイトを 96 穴プレートに再播種しさらに 7 日間培養した。CNT は 1-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間適用した。培地中 FBS 濃度は常に 10% となるように調整した。L-glu トランスポーターに対する作用は、培地に 100 μM の L-glu を添加し、1 時間後の培地中 L-glu 残存量により算出した (L-glu クリアランスとして表記)。このとき、MTT/LDH 同時測定法により被験物質の細胞毒性についても合わせて検討した。

2. P2X2 受容体機能に対する影響評価系の検討

ATP 受容体チャネル (P2X2 受容体) の cDNA を pcBluescript II SK(-) にサブクローニングしたプラスミド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 NotI 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 を注入し、18°C で 3-6 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。P2X2 受容体チャネルを介するイオン電流は卵母細胞を -50 mV に保持し、-80 mV へ周期的なステップパルスを加えた状態で、30 μM ATP を用いて誘発した。CNT は FBS により約 1 mg/ml の濃度で調整されたストックを希釈し 1-100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間処理とした。同時に FBS 0.1-10% の P2X2 電流への影響も前もって確認した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱いには「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法) および国立医薬

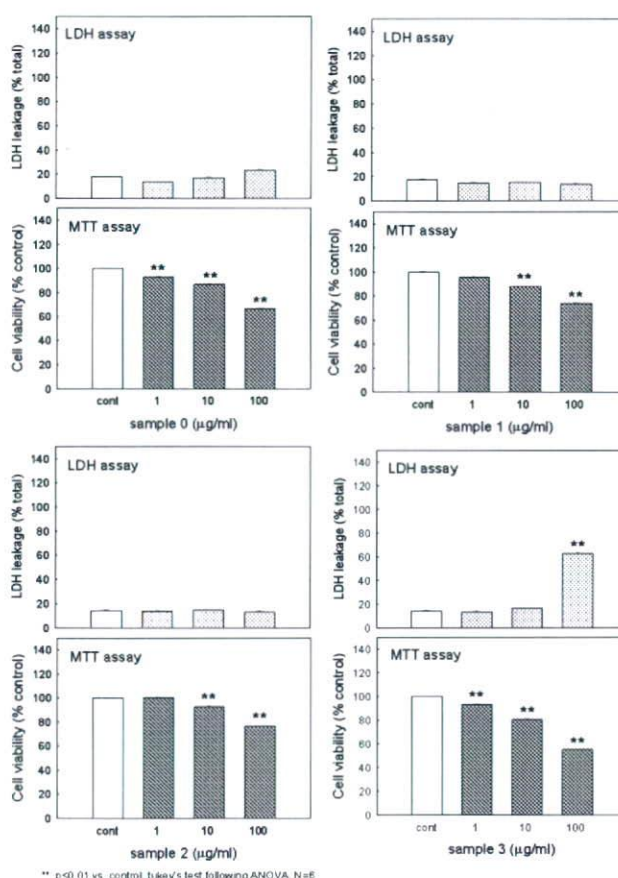
品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

C. 研究結果

1. L-glu トランスポーターに対する影響評価系の検討

1-1 CNT のアストロサイトに対する細胞毒性

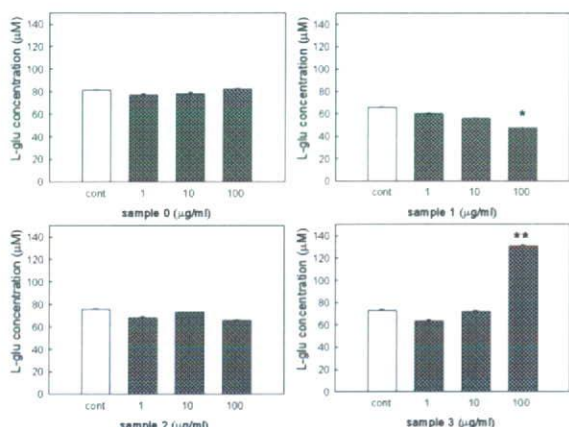
サンプル 0, 1, 2 は LDH leakage に影響を与えることなく MTT reduction を減少させた。サンプル 3 は 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で LDH leakage を上昇させ、MTT reduction を減少させた。すなわち、明らかな細胞毒性を示した。(図 1)



<図 1 CNT のアストロサイトへの細胞毒性>

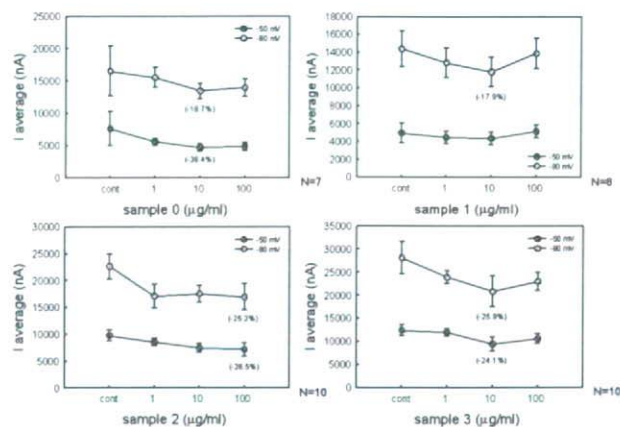
1-2 CNT の L-glu トランスポーターに対する作用(図 2)

サンプル 1 は 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で L-glu クリアランスを有意に促進した。サンプル 3 は 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で L-glu クリアランスを有意に阻害した。その他のサンプルは何ら影響を与えなかった。



*: p<0.05, **: p<0.01 vs. control, tukey's test following ANOVA. N=6

<図2 CNTのL-glu トランスポーターへの作用>



<図3 CNTのP2X2 電流に対する作用>

2. P2X 受容体機能に対する影響評価系の検討

2-1 FBS の P2X2 受容体を介する電流に対する影響

FBS 0.1-10% の P2X2 受容体を介する電流への影響を検討したところ、この濃度では何ら影響を与えなかった。

2-2 CNT の P2X2 受容体を介する電流に対する影響(図3)

サンプル 0 は -50 mV および -80 mV において 1-100 μg/ml の濃度で P2X2 受容体を介する電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。100 μg/ml による抑制率は -50 mV で 38.4%, -80mV で 18.7% であった。サンプル 1 は -80 mV において、1-10 μg/ml の濃度で P2X2 受容体を介する電流を抑制する傾向を示した。10 μg/ml による抑制率は 17.9% であった。-50 mV においてはこのような作用は見られなかった。サンプル 2 は -50 mV および -80 mV の両者において 1-100 μg/ml の濃度で P2X2 受容体を介する電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。100 μg/ml での抑制率は -50 mV で 26.5%, -80mV で 25.2% であった。サンプル 3 は -50 mV と -80 mV の両者において 1-10 μg/ml の濃度で P2X2 受容体を介する電流を濃度依存的に抑制する傾向を示した。10 μg/ml での抑制率は -50 mV で 24.1%, -80mV で 25.9% であった。

D. 考察

生体においてアストロサイトは GLAST および GLT-1 という二種の L-glu トランスポーターを発現しているが、前実験により本条件で培養したアストロサイトには GLT-1 は発現しておらず GLAST が占有的であることを確認した。従って、本実験で L-glu を取り込んでいる機能蛋白質は GLAST である。培養アストロサイトにおいて、サンプル 0, 1, 2 は LDH leakage に影響を与えることなく MTT reduction を減少させた。これは、これらのサンプルがミトコンドリア酵素活性に影響を与えていることを示唆している。サンプル 3 は 100 μg/ml の濃度で細胞毒性を示した。サンプル 1 は 100 μg/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に促進したが、サンプル 3 は 100 μg/ml の濃度で L-glu クリアランスを有意に阻害した。サンプル 1 は 100 μg/ml の濃度で細胞毒性を示さなかったことから、L-glu トランスポーターの活性もしくは発現を促進したことが示唆される。サンプル 3 は 100 μg/ml の濃度で明らかな細胞毒性が観察されたことから、この濃度で見られた L-glu クリアランスの抑制は死細胞からの L-glu の漏出に由来すると考えられる。サンプル 3 で見られた細胞毒性や サンプル 1 で見られた L-glu トランスポーター機能亢進作用と CNT の直径、壁厚、長さとの関連についてはさらなる検討を要する。

サンプル 0 は -50 mV および -80 mV の両者

において抑制傾向を示したが、-50 mV における抑制率が明らかに高いことから電位依存的な作用であることが示唆された。サンプル 1 は -80 mV において、P2X2 受容体を介する電流を抑制する傾向を示したが、-50 mV ではこのような作用が見られなかった。よって、この作用も電位依存的であると示唆された。サンプル 2 および 3 は-50 mV および -80 mV の両者において P2X2 受容体を介する電流を濃度依存的に抑制する傾向を示し、両電位における抑制率がほぼ等しかったことから、電位非依存的な作用であることが示唆された。CNT は多数の不飽和結合から成り、電子が過密状態であるため、電気的には負の極性を有すると考えられる。もし、CNT が P2X2 受容体のチャネル孔を塞ぐのであれば、過分極状態では負の極性同士から抑制が減弱されることが予想される。サンプル 0, 1 による電位依存的抑制はこのような機序が関与している可能性が考えられる。サンプル 2, 3 との作用の違いは、各 CNT の直径、壁厚、長さ、分子内極性などの物理的性質と関連するのかもしれないが、これについてはさらなる検討を要する。

E. 結論

GLAST 機能評価系ならびに P2X2 受容体機能測定系が CNT の *in vitro* 評価系として利用可能なことが示された。CNT は GLAST を有するアストロサイトの機能、および P2X2 受容体あるいはこれに類似したチャネル形成型膜タンパク質を有する神経細胞機能に影響を及ぼすことが予想されるが、CNT 分子の直径、壁厚、長さ、分子内極性等の物理的性質との関連についてはさらなる検討を要する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 研究発表

1. 論文発表

1. Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T,

Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. *J. Pharmacol. Sci.*, 107, 226-230 (2008)

2. 学会発表

1. Sato K, Saito Y, Oka JI, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of Tamoxifen on L-glutamate transporter. Neuroscience 2008 (2008. 9, Tokyo, Japan)

2. Sato K, Saito Y, Oka JI, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen and the related compounds on L-glutamate transport activity of cultured astrocytes. Neuroscience2008 (2008. 11, Washington D.C., USA)

3. Shigemoto-mogami Y, Nakazawa K, Sato K, Microglia instructs neurogenesis and gliogenesis in the subventricular zone. 日本薬学会第129年会(2009年3月, 京都)

4. Takahashi K, Nakazawa K, Nozawa R, Ohno Y, Takeuchi T, Sato K, Inhibitory effects of NSAIDs on excitatory amino acid transporter EAAT1/GLAST in *Xenopus oocytes* 日本薬学会第129年会(2009年3月, 京都)

5. Sato K, Saito Y, Oka JI, Goldman JE, Nakazawa K, Establishment of the risk assessment system for the brain at an early postnatal stage. 第82回日本薬理学会(2008年3月, 横浜)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成 20 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）
研究分担報告書

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

研究分担課題名：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

研究分担者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部 室長
研究協力者：奥平 桂一郎 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部
：崔 紅艶 国立医薬品食品衛生研究所 機能生化学部

研究要旨

肺サーファクタント脂質であるホスファチジルコリン(PC)およびホスファチジルグリセロール(PG)を用いて MWCNT を分散する方法を確立し、細胞機能を指標に評価を行った。肺サーファクタント主要成分である C16PC/PG (2:1) で分散した MWCNT は、等量の Tween 20 のみで分散した MWCNT と同様に、マクロファージ系 RAW264 細胞において GM-CSF および TNF α 産生を促進した。これに対し、卵由来 PC/PG を用いた MWCNT は分散性により優れるが、サイトカイン産生を促進しなかった。PC の物理化学的性質の違いが MWCNT の形状を変化させ、細胞影響に違いをもたらした可能性が考えられる。

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は、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、血漿タンパクなどとの相互作用が、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。本研究では、ナノマテリアルの分散方法や血漿リポタンパクなど生体内脂質成分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。

昨年度までの研究では、[1]腸管からの酸化チタン粒子やフラーレンの吸収について、*in vitro* で

の評価系である Caco-2 細胞単層膜を用いて検討を行った。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。また、[2] 血漿リポタンパクのモデルとして PS/PC リポソームを用いたナノ粒子の分散方法を検討し、マクロファージ系細胞でのサイトカイン産生に及ぼす影響を調べた。

本年度は、[1]肺サーファクタント脂質を用いて多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の分散を試みるとともに、[2] マクロファージ系細胞でのサイトカイン産生への影響を調べた。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) はナノカーボンテクノロジーズ社 (MWCNT-7, Lot No.

060125-01k)、phosphatidylcholine (PC) は Avanti 社 (卵由来、#840051P)、dipalmitoyl-phosphatidylcholine (C16PC, #P5911) および phosphatidylglycerol (PG, 卵由来#P8318) は Sigma 社、TetraColor One 試薬は生化学工業のものを用いた。サイトカイン測定には Bio-Rad 社の Bio-Plex マウスサイトカイン 8-Plex アッセイキットおよび Bio-Plex サイトカインリージェントキットを用いた。

2. MWCNT の分散

MWCNT は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/ml の濃度で懸濁し、1 分間バス型超音波発生装置で処理を行い分散した。この溶液を、①PBS、または②PC/PG 溶液 (30 mg/ml)、および③ C16PC/PG 溶液 (30 mg/ml) を用いて 0.4 mg/ml に希釈した。Tween 20 の最終濃度は 0.04% である。続いて 5 分間超音波処理を行い、30G の注射針 (O.D.0.31mm) を通してホモジナイズした。PC/PG 溶液はあらかじめ以下のように調製した。PC および PG の 100 mg/ml chloroform 溶液をガラス試験管中で 2:1 の割合で混合し、窒素ガスで溶媒を留去する。フィルム状になったリン脂質に PBS を 30 mg/ml となるよう加え vortex 後、バス型超音波発生装置で 1 分間処理を行いリポソーム様に分散した。

3. 細胞毒性評価

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞およびマウスマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞は 96 ウェルマイクロプレート中 37 °C 1 日培養した後、PBS 懸濁 MWCNT (①)、PC/PG 分散 MWCNT (②)、C16PC/PG 分散 MWCNT (③)、あるいは対照となる溶剤 (Tween 20 を含む) を培地に添加し 24 時間培養した。その後 TetraColor One 試薬を加え、1 時間後に 440 nm の吸光度を測定した。

4. 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ウム (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。

5. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) でのトランスサイトーシスに及ぼす PBS 懸濁 MWCNT 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。Apical 側 (上部ウェル) には PBS 懸濁 MWCNT (①) を分散した Texas Red 蛍光標識デキストラン入りの DMEM を処理し、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。

6. マウスマクロファージ系細胞のサイトカイン産生を指標とした MWCNT 分散方法の評価

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞は 24 ウェルマイクロプレートに播種し、37 °C 1 日培養した後、PBS 懸濁 MWCNT および酸化チタン、PBS (①) および PC/PG 分散 MWCNT (②)、C16PC/PG 分散 MWCNT (③) あるいは対照となる溶剤を添加し 24 時間培養した。陽性対照として、リポポリサッカロイド (LPS) 50 ng/ml