

201133024A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系構築に向けた基礎研究

平成 23 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 伊佐間 和郎

平成 24 (2012) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系構築に向けた基礎研究

平成 23 年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成 24 (2012) 年 3 月

伊佐間和郎	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
吉田 緑	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター病理部 室長
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
花方 信孝	独立行政法人物質・材料研究機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長
河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官
戸塚ゆ加里	独立行政法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 室長
中江 大	東京都健康安全研究センター 医薬品部 部長
渡邊 昌俊	国立大学法人横浜国立大学 工学研究院 教授

目 次

I. 総括研究年度終了報告	
ナノマテリアルの <i>in vitro</i> 評価系構築に向けた基礎研究	3
伊佐間和郎	
II. 分担研究年度終了報告	
1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析	19
河上 強志	
2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析	36
吉田 緑	
3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析	42
宮島 敦子	
4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析	69
花方 信孝	
5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価	88
伊佐間和郎	
6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究	99
戸塚ゆ加里	
7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の <i>in vivo</i> 評価	108
中江 大	
8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究	118
渡邊 昌俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	131
IV. 研究成果の刊行物・別刷	137

I. 総括研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
総括研究年度終了報告書

ナノマテリアルの *in vitro* 評価系構築に向けた基礎研究

研究代表者 伊佐間和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。特に、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されているものの、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っておらず、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が課題となっている。そこで、本研究では、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクタリゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的な手法を検討する。今年度は、次のような成果を得た。注射用水及び培地中での粒径分布及びゼータ電位の測定を行い、基礎データを収集した。経時変化や濃度依存性についても知見を得た。銀を経気道曝露したラット肺の電顕用サンプルを TEM-EDS で観察したところ、肺胞内マクロファージ内のライソソーム内に銀の分布が認められた。酸化亜鉛ナノ粒子を用いて、ヒト由来細胞を用いた *in vitro* 生体影響評価系として A549 細胞が有用であることを確認した。複数の細胞応答に関する指標を用いて種々の酸化金属ナノ粒子の細胞毒性を評価した。酸化銅ナノ粒子の毒性に対するヒト肺上皮細胞の遺伝子応答を DNA マイクロアレイにより調べ、発現量が増加及び減少した遺伝子群を同定した。Gene Ontology 解析を行い、発現量が増加した遺伝子群により p38 経路が活性化され、発現量が減少した遺伝子群により細胞周期が停止することを明らかにした。酸化チタンナノ粒子共存下で塩化アルミニウム、塩化銅及び塩化亜鉛の細胞毒性は変化せず、酸化ケイ素ナノ粒子共存下で塩化アルミニウム及び塩化銅の細胞毒性は増強することを明らかにした。産地の異なるカオリンについて、ICR マウス用いてコメットアッセイを行い、DNA 損傷性を解析した。肺胞上皮細胞及びマクロファージ内への各カオリンの移行率をフローサイトメーターで調べた。磁性ナノ粒子マグネタイトを雄性ラットの気管内に単回投与し、体内動態を検索した。マグネタイトは主として肺に分布し、肺における生物学的半減期は約 7 日であり、排泄は主として糞を介して行われた。磁性体ナノ粒子を用いた *in vitro* 系で研究を行い、細胞毒性及び遺伝毒性のメカニズム、すなわち宿主側に依存した遺伝毒性のメカニズム及び磁性体ナノ粒子は NF κ B 発現に大きく関与する事を明らかにした。

研究分担者

- 吉田 緑 国立医薬品食品衛生研究所
病理部 室長
- 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 室長
- 花方 信孝 (独) 物質・材料研究機構
ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長
- 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所
生活衛生化学部 主任研究官
- 戸塚ゆかり (独) がん研究センター研究所
発がんシステム研究分野 室長
- 中江 大 東京都健康安全研究センター
医薬品部 部長
- 渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院
教授

研究協力者

- 松岡 厚子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 部長
- 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 室長
- 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部
- 多田 幸恵 東京都健康安全研究センター
環境保健部 生体影響研究科
主任研究員
- 齋藤 育江 東京都健康安全研究センター
環境保健部 環境衛生研究科
主任研究員
- 大山 謙一 東京都健康安全研究センター
環境保健部 生体影響研究科
科長
- 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター
環境保健部 部長

A. 研究目的

ナノマテリアルの生体影響については、試験法や評価基準などが定められていないため、現在は断片的な結果の集積に留まっている。そのため、『ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書』では、今後の具体的な対応のひとつとして、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発を挙げている¹⁾。

我々は、厚生労働省の平成 20 年度及び平成 21 年度の家用品規制基準調査事業において、家庭用品に使用されるシリカ、銀及び酸化亜鉛ナノ粒子の安全性評価を実施し、各々 100 nm 前後に調製したナノ粒子について、細胞毒性試験、染色体異常試験及びラット気管内投与毒性試験を行った。その結果、*in vitro* では、シリカ < 酸化亜鉛 < 銀の順に強い細胞毒性を示し、酸化亜鉛ナノ粒子のみが染色体の構造異常を示した。また、*in vivo* では、いずれも泡沫細胞集簇や肺胞上皮の増生を伴う肉芽腫性炎症や慢性肺炎が認められ、酸化亜鉛ナノ粒子のみで顕著な慢性肺炎だけでなく気管支上皮の増生を伴う肺の線維化が認められた。また、Karlsson らは、数種の金属酸化物の内、酸化銅ナノ粒子のみがサイズ依存性の細胞毒性を示すことを報告した²⁾。また、Xu らは、半導体酸化物ナノ粒子は絶縁体酸化物ナノ粒子より強い細胞毒性を示すことを報告した³⁾。さらに、Cho らは、金属酸化物ナノ粒子のハザード評価において、可溶性金属イオンの寄与に重大な相違があることを指摘した⁴⁾。

このように、化学組成、サイズ、物性等に依存したナノマテリアルの生体影響が確認されているものの、試料のキャラクタリゼーションが不十分であるため、毒性発現のメカニズム解明には至っていない。そこで、本研究は、単純化された培養細胞系において、十分にキャラクタリゼーションさ

れたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等が細胞応答に及ぼす影響を解明することを目的とする。そのために、金属酸化物等を対象に、物理化学的特徴を把握し、細胞内動態を明らかにした上で、細胞毒性・遺伝毒性、遺伝子発現及び相互作用を総合的に評価する。さらに、有用ナノマテリアルの遺伝毒性を低減化する物理的及び化学的な手法を検討する。

以下に各分担研究の成果の概要を記載するが、詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

一次粒子径がいずれも 50 nm 以下の金属酸化物ナノマテリアル 10 種類 (Al₂O₃、CeO₂、ITO、SiO₂、TiO₂、CuO、SnO₂、Y₂O₃、NiO、ZnO)、11 試料 (ZnO は入手先の異なる 2 種類: Sigma-Aldrich、Alfar Aesar) について、注射用水中および 10% ウシ胎児血清含有 Minimum Essential Medium (10%FBS-MEM) 中におけるそれらの物性解析を目的として、平均粒子径 (流体力学径)、多分散度指数、粒径分布およびゼータ電位を測定した。

2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析

物理化学的特徴を十分に把握した種々のナノマテリアルに暴露された培養細胞における細胞内動態を透過型電子顕微鏡 - エネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて超微形態的に明らかにするための予備検討として、酸化亜鉛ナノ粒子及び銀ナノ粒子を経気道的に反復暴露したラットの肺材料を用いて TEM-EDS 解析を行った。

3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

ナノマテリアルの生体影響評価において、ヒトに対する影響評価に向けて、*in vitro* 生体影響評価系においてもヒト由来細胞を用いた系が有用であると考えられる。そこで、本研究では、まず、ヒト肺由来細胞株 A549 を用いた細胞毒性、遺伝毒性評価系の確立を目指した。さらに最適化した実験系を用いて、CHL 細胞と感受性を比較した。次に、種々の酸化金属ナノマテリアルを対象として、化学組成、一次粒子径、懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位、形状・凝集状態等の物理化学的性質について明らかにすると同時に、最適化した A549 評価系を用いて、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した。

4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析

酸化銅ナノ粒子 (CuO-NPs) は *in vitro* 試験において、肺上皮細胞 A549 に対して強い細胞毒性を示すことが報告されている。そこで、網羅的遺伝子発現解析による CuO-NPs の毒性メカニズムの解明を試みた。

5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

ナノマテリアルは産業界においてすでに様々な用途に使用されているものの、ナノマテリアルの安全性はまだ十分には解明されていない。近年、*in vitro* におけるナノマテリアル単独の毒性は徐々に明らかになりつつあるが、他の化学物質との相互作用は不明である。そこで、本研究では共存する金属塩の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響を調査した。実験には二酸化ケイ素 (SiO₂) 及び二酸化チタン (TiO₂) のナノ粒子を使用した。また、金属塩として、

塩化アルミニウム (AlCl_3)、塩化銅 (II) (CuCl_2) 及び塩化亜鉛 (ZnCl_2) を使用した。ナノ粒子の粒度分布及びゼータ電位は、動的光散乱光度計により測定した。ナノ粒子非共存下及び共存下における AlCl_3 、 CuCl_2 及び ZnCl_2 の細胞毒性は、チャイニーズハムスターV79 肺線維芽細胞を用いたコロニー形成法により評価した。

6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

近年、様々な製品にナノマテリアルが多用され、ナノマテリアルのヒトへの健康影響や安全性に高い関心が集まっている。また、ナノマテリアルの化学的修飾あるいは構造及びサイズ変換、原料の産地やメーカーの違いによってその形状や表面構造等が異なる場合があり、実際には、同じ素材から数種のナノマテリアルが製造されていることになる。そこで、原料の産地やメーカーの違いによる形状や表面構造が異なる同種異型のナノマテリアルに注目し、これらの違いがナノマテリアルの遺伝毒性に及ぼす影響について明らかにするため、Kaolin-K (韓国産) 及び Kaolin-U (アメリカ産) の、①物理化学的性質、②in vivo DNA 損傷性、③細胞への取り込み、④ROS 産生能について調べた。

7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の in vivo 評価

ナノマテリアルの遺伝毒性低減化のための in vivo 評価を目的とした。磁性ナノ粒子マグネタイトは、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、広く利用され、さらに、医療・バイオテクノロジー分野での応用展開が図られているが、安全性に関する情報が限られており、早急な安全性評価が求められている。本研究の先行研究はマグネタイトの急性及び慢性毒性の評

価を行ったが、本年度はマグネタイトの体内動態及び排泄について検索した。試験は、F344/DuCr1Cr1j 系ラット (10 週齢) に、マグネタイトを 0 (対照群) 及び 15.0 mg/kg 体重 (投与群) の用量でスプレー投与器により 1 回気管内投与し、その 1、3、7、21、50 日後に代謝ケージで 24 時間尿及び糞を採取し、エーテル麻酔下で採血後、肝、腎、肺及び脳を摘出した。試料中のマグネタイト量は、誘導結合プラズマ質量分析装置により分析したマグネタイト由来の鉄の濃度を指標として評価した。

8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

細胞株を利用した in vitro 系での各種ナノ粒子の細胞毒性及び遺伝毒性を解析することにより、その機構の解明を目指してきた。同一粒子であっても、細胞株により細胞毒性及び遺伝毒性の程度は異なり、それはナノ粒子の種類と細胞種による活性酸素種 (ROS) 産生、代謝・修復機構の差異によるものと推測された。そこで、今後の実験に備えて、上記結果について、再評価及び表面修飾ナノ粒子を利用して細胞毒性及び遺伝毒性について解析を行った。ナノ粒子として Fe_3O_4 ($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$) 及びカルボキシル基で修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を使用して、in vitro 系で曝露実験を行った。実験内容は、8-OHdG 生成の測定、細胞生存率、ROS の測定、細胞周期及び apoptosis の解析である。

C. 研究結果及び考察

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

注射用水中では各金属酸化物ナノマテリアルは主に二次粒子として存在し、平均粒子径は CeO_2 、ITO、 TiO_2 および ZnO (Sigma-Aldrich) が 100 nm 以下、その

他は NiO の 256.8 nm が最大であった。SnO₂ は注射用水中で速やかに凝集したが、10%FBS-MEM 中では平均粒子径が 1000 nm を超えたが分散を保っていた。ZnO (Alfar Aesar) を除く全ての金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径が、10%FBS-MEM 中では注射用水中よりも大きくなった。各金属酸化物の注射用水中のゼータ電位は、SiO₂ および ZnO (Alfa Aesar) は負の値を示し、その他の金属酸化物ナノマテリアルは正の値を示した。一方、10%FBS-MEM 中ではタンパク質等の影響を受けて全ての金属酸化物ナノマテリアルでゼータ電位は負の値を示し、ZnO (Alfa Aesar) 以外の金属酸化物ナノマテリアルでその絶対値は小さくなった。そのため、10%FBS-MEM 中では金属酸化物ナノマテリアル表面の電氣的反発力が小さくなり凝集したと考えられた。一方で、一部の金属酸化物ナノマテリアルについては、血清が分散剤としても作用していると考えられた。CuO、NiO および 2 種類の ZnO について、10%FBS-MEM 中での希釈の影響および経時変化を検討した。その結果、これらの金属酸化物ナノマテリアルに対して希釈の影響は認められなかった。そして、これら金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液調製後、一日経過した段階では各物性値にほとんど変化は無かった。これらのデータは培養細胞試験にとって有用な情報となり得るものと考えられた。

2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析

酸化亜鉛ナノ粒子及び銀ナノ粒子とも光学顕微鏡では顕著な肺の炎症性変化が観察されたが、投与物質の細胞内局剤について、銀では肺胞マクロファージ内の局在が確認できたが、酸化亜鉛をマクロファージ内のライソゾーム内に検出ことはできなかった。しかし、細胞に直接曝露する *in vitro* 培養

系においては細胞の局在性は *in vivo* より把握しやすいと考えられるが、短時間の固定など標本作製条件に留意する必要があると考えられた。

3. ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

A549 細胞を用いたナノマテリアルの生体影響評価系として、細胞毒性及び遺伝毒性評価系を確立した。A549 細胞と CHL 細胞のナノマテリアルに対する細胞毒性試験及び遺伝毒性試験（小核試験）における感受性について比較検討した結果、コロニー法、MTT 法、両細胞毒性試験において、感受性に相違は認められず、小核試験においては、A549 細胞では未処理群の小核保有細胞の出現率が若干高かったものの、両細胞間の試験結果に大きな相違は認められなかった。ヒトへの影響を評価する観点から、A549 細胞を用いたナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性評価系は有用であり、今後データ蓄積が必要であると考えられた。10 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、物理化学的性質を明らかにすると同時に、A549 細胞をこれらのナノマテリアルに暴露し、細胞毒性試験を行った結果、コロニー法において ITO、CuO、Y₂O₃、ZnO、NiO が、MTT 法において CuO、ZnO、NiO が、それぞれ細胞毒性を示した。CuO は、どちらの試験法においても強い毒性を示し、NiO と ZnO は中程度、ITO と Y₂O₃ はコロニー法においてのみ弱い毒性を示した。これらの結果は、各試験法の特異性及び感受性の差によるものと考えられた。また、ZnO は 2 社の分散製品で、細胞毒性が異なっていた。両 ZnO 分散製品は、注射用水中でのゼータ電位が異なり、注射用水と血清培地、両懸濁液中での粒子径の変化が異なったことから、物理化学的性質が細胞毒性の差に関わっている

可能性が考えられた。

4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析

CuO-NPs は培地中に Cu を溶出するが、この溶出 Cu は、CuO-NPs の細胞毒性に対して最大で 30%程度寄与する。CuO-NPs はミトコンドリアに損傷を与えるが、CuO-NPs によるミトコンドリアの損傷は、部分的に培地中に溶出した Cu によってもたらされる。また、CuO-NPs は細胞死を誘導するが、溶出 Cu は細胞死を誘導しない。CuO-NPs の曝露により生存した細胞は、PCNA、CDC2、CCNB1、TPX2、AURKA 及び AURKB の発現を抑制することによって細胞周期の停止を導き、また NR4A1、NR4A3、GADD45B 及び GADD45G の発現を誘導することによって細胞死を回避していた。CDC2、CCNB1、TPX2、AURKA 及び AURKB の発現抑制は、G2 期での cell cycle arrest に関与すると考えられるが、これらの遺伝子発現の抑制は培地中に溶出した Cu に起因していた。また、NR4A1 及び NR4A3 の発現誘導も、培地中に溶出した Cu によってもたらされた。PCNA の発現抑制は G1 期での細胞周期停止に関与すると考えられるが、この遺伝子の発現抑制は溶出した Cu ではなく、CuO-NPs そのものに起因していた。GADD45B 及び GADD45G の発現は、p38 及び JNK 経路を活性化することが知られているが、CuO-NPs に曝露した細胞では、p38 経路のみが細胞死の回避に関与していた。GADD45B 及び GADD45G の発現誘導は、培地中に溶出した Cu では認められず、CuO-NPs に曝露した細胞で認められたが、これらの遺伝子は培地中に CuCl₂ を高濃度で添加したときにも発現が誘導されたことから、細胞内に取り込まれた CuO-NPs から溶出した

Cu に起因していると考えられる。CuO-NPs に曝露された細胞において、このような分子応答ができた細胞は生存し、できなかった細胞は死に至ると推測される。

5. ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

ナノ粒子の単独曝露条件で、100 µg/ml 以下の濃度の SiO₂ ナノ粒子は細胞毒性を示さなかったが、25 µg/ml 以上の濃度の TiO₂ ナノ粒子は弱い細胞毒性を示した。そこで、100 µg/ml の濃度の SiO₂ ナノ粒子並びに 10 µg/ml 及び 100 µg/ml の濃度の TiO₂ ナノ粒子の共存による AlCl₃、CuCl₂ 及び ZnCl₂ の細胞毒性の変化を調べた。その結果、100 µg/ml の濃度の SiO₂ ナノ粒子共存下で、ZnCl₂ の細胞毒性は変化しなかったが、AlCl₃ 及び CuCl₂ の細胞毒性は増強した。一方、10 µg/ml 及び 100 µg/ml の濃度の TiO₂ ナノ粒子共存下で、3 種の金属塩の細胞毒性は変化しなかった。本研究により、SiO₂ ナノ粒子は共存する一部の金属塩の細胞毒性を増強させることが明らかになった。

6. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

物理化学的性質においては、Kaolin-K と Kaolin-U の粒子表面構造とゼータ電位に違いがあることがわかった。また、これら Kaolin を気管内投与したマウス肺において、Kaolin-U がより強い DNA 損傷性を示すことが明らかとなった。一方、培養細胞を用いた実験において、Kaolin-K に比べて Kaolin-U のほうが、実質細胞 (A549) 及びマクロファージ (RAW264) のいずれの細胞内にも取り込まれやすい傾向がみられた。更に、ROS 産生能について検討してみたところ、A549 ではどちらの Kaolin においても

ROS を産生している細胞はほとんどみられなかったのに対し、RAW264 では、細胞内への Kaolin の取込み量に相関して、ROS を産生している細胞が増加していた。これらのことから、Kaolin-K と Kaolin-U のマウス肺に対する DNA 損傷性の違いは、マクロファージへの取り込みされ易さに起因することが示唆された。

7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の in vivo 評価

肺の鉄濃度は、1 日に最高値を検出した後、7 日まで比較的速やかに減少し、21-50 日にピーク時のほぼ 3 分の 1 の濃度でプラトーに推移した。肺でのマグネタイトの生物学的半減期は、ほぼ 7 日間であると推定された。血液、肝、腎及び脳鉄濃度は、肺よりきわめて低値ながら、1 日から 50 日まで継続して増加する傾向を示した。一方、肉眼観察においては投与群のラットの肺及びリンパ節が灰黒色を呈する変化が見られ、組織病理学的観察によつては当該部位に黄褐色の顆粒を貪食したマクロファージの浸潤及び黄褐色顆粒の沈着が認められた。この顆粒は、マグネタイトの肺への沈着及びリンパ節への移行を示唆する所見であった。マグネタイトの体外への排泄は、尿と比較して糞による経路が主体であり、50 日においても排泄が続いていた。

8. 遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究

遺伝毒性の指標として 8-OHdG の測定を行い、表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の曝露濃度依存的な 8-OHdG 生成の増加及び細胞腫により異なることを認めた。さらに、表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ は、濃度依存的に ROS 産生の増加、細胞生存率の低下及び apoptosis の誘導が認められた。しかし、細胞の種類によりその程度は変化する、

すなわち細胞特異性があると考えられる。その細胞の抗酸化能及び修復能が重要な因子と考えられる。一方、カルボキシル基で修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の曝露による細胞生存率については、表面修飾の無い $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ほどの低下は認められなかった。今後さらにその機構を含めて解析を行う予定である。

D. 結論

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析では、注射用水及び培地中での粒径分布及びゼータ電位の測定を行い、基礎データを収集した。経時変化や濃度依存性についても知見を得た。ナノマテリアルの細胞内動態の解析では、銀を経気道曝露したラット肺の電顕用サンプルを TEM-EDS で観察したところ、肺胞内マクロファージ内のライソソーム内に銀の分布が認められた。ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析では、酸化亜鉛ナノ粒子を用いて、ヒト由来細胞を用いた in vitro 生体影響評価系として A549 細胞が有用であることを確認した。複数の細胞応答に関する指標を用いて種々の酸化金属ナノ粒子の細胞毒性を評価した。ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析では、酸化銅ナノ粒子の毒性に対するヒト肺上皮細胞の遺伝子応答を DNA マイクロアレイにより調べ、発現量が増加及び減少した遺伝子群を同定した。Gene Ontology 解析を行い、発現量が増加した遺伝子群により p38 経路が活性化され、発現量が減少した遺伝子群により細胞周期が停止することを明らかにした。ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価では、酸化チタンナノ粒子共存下で塩化アルミニウム、塩化銅及び塩化亜鉛の細胞毒性は変化せず、酸化ケイ素ナノ粒子共存下で塩化アルミニウム及び塩化銅の細胞毒性は増強す

ることを明らかにした。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究では、産地の異なるカオリンについて、ICR マウス用いてコメットアッセイを行い、DNA 損傷性を解析した。肺胞上皮細胞及びマクロファージ内への各カオリンの移行率をフローサイトメーターで調べた。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価では、磁性ナノ粒子マグネタイトを雄性ラットの気管内に単回投与し、体内動態を検索した。マグネタイトは主として肺に分布し、肺における生物学的半減期は約 7 日であり、排泄は主として糞を介して行われた。遺伝毒性低減化を目指したナノマテリアルの修飾に関する研究では、磁性体ナノ粒子を用いた *in vitro* 系で研究を行い、細胞毒性及び遺伝毒性のメカニズム、すなわち宿主側に依存した遺伝毒性のメカニズム及び磁性体ナノ粒子は NF κ B 発現に大きく関与する事を明らかにした。

E. 健康危険情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys. Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials, Medimond S.r.l., pp.57-60 (2012)
- 2) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A: Toxicological studies of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide. Proceedings of 24th European Conference on Biomaterials, Medimond S.r.l., pp.87-90 (2012)
- 3) Hanagata N, Zhuang F, Connolly S, Li J, Ogawa N, Xu M: Molecular Responses of human lung epithelial cells to the toxicity of copper oxide nanoparticles inferred from whole genome expression analysis. ACS Nano, 5(12), 9326-9338 (2011)
- 4) Wei M, Wanibuchi H, Nakae D, Tsuda H, Takahashi S, Hirose M, Totsuka Y, Tatematsu M, Fukushima S: Low-dose carcinogenicity of 2-amino-3-methylimidazo[4,5-f]quinoline in rats: Evidence for the existence of no-effect levels and a mechanism involving p21Cip/WAF1. Cancer Sci., 102, 88-94 (2011)
- 5) Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Ishino K, Matsumoto Y, Goto S, Kawanishi M, Yagi T, Wakabayashi K: In vitro and in vivo genotoxicity induced by fullerene (C60) and kaolin. Genes Environ., 33, 14-20 (2011)
- 6) Kato T, Totsuka Y, Hasei T, Watanabe T, Wakabayashi K, Kinai N, Masuda S: In vivo examination of the genotoxicity of the urban air and surface soil pollutant, 3,6-dinitrobenzo[e]pyrene, with intraperitoneal and intratracheal administration. Environ., Mutagen., in press.

- 7) Matsubara S, Takasu S, Tsukamoto T, Mutoh M, Masuda S, Sugimura T, Wakabayashi K, Totsuka Y: Induction of Glandular Stomach Cancers in Helicobacter pylori-infected Mongolian Gerbils by 1-Nitrosoindole-3-acetonitrile. *Int J Cancer*, 130, 259-266 (2012)
 - 8) 広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江大、樋野興夫、菅野純：ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、*薬学雑誌*、131、195-201 (2011)
 - 9) Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice, *J Toxicol Sci*, 37, 81-89 (2012)
 - 10) Yamaguchi A, Fujitani T, Ohyama K, Nakae D, Hirose A, Nishimura T, Ogata A: Effects of sustained stimulation with multi-wall carbon nanotube on immune and inflammatory responses in mice, *J Toxicol Sci*, 37, 177-189 (2012)
 - 11) Kami D, Takeda S, Itakura Y, Gojo S, Watanabe M, Toyoda M: Application of the Magnetic Nanoparticles to Gene Delivery. *Int. J. Mole. Sci.*, 12(6), 3705-3722 (2011)
 - 12) Kurioka D, Takagi A, Yoneda M, Hirokawa Y, Shiraishi T, Watanabe M: Multicellular spheroid culture models: Applications in prostate cancer research and therapeutic. *J. Cancer Sci and Ther*, 3(3), 60-65 (2011)
 - 13) Kami D, Takeda S, Hatsune M, Toyoda M, Itakura Y, Gojo S, Kyo S, Umezawa A, Watanabe M: Efficient transfection method using deacylated polyethylenimine-coated magnetic nanoparticles. *J. Artif. Organs*, 14(3), 215-222 (2011)
 - 14) 一町直樹、栗岡大輔、河井一明、葛西宏、松本幹治、渡邊昌俊：各種ナノ粒子の細胞への影響：細胞特異性とその応用、*粉体工学会誌*、48(3)、145-151 (2011)
 - 15) 一町直樹、佐藤明子、栗岡大輔、米田操、広川佳史、白石泰三、渡邊昌俊：前立腺癌化学療法における磁性体ナノ粒子の併用効果の基礎研究（総説）、*泌尿器外科*、24(8)、1267-1269 (2011)
2. 学会発表
 - 1) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A: In vitro and in vivo toxicity studies of nanomaterials used in household products. *International Conference on Materials for Advanced Technologies (Singapore, 2011.6)*
 - 2) 伊佐間和郎、河上強志、児玉幸夫、中嶋富士雄、吉田緑、井上薫、西川秋佳、松岡厚子：家庭用品に用いられるナノ粒子の安全性評価、第38回日本トキシコロジー学会学術年会（横浜市、2011.7）
 - 3) Isama K, Kawakami T, Tsuchiya T, Matsuoka A: Osteoblast compatibility of calcium-incorporated Ti-Zr-Nb alloys, *24th European Conference on Biomaterials (Dublin, 2011.9)*

- 4) Matsuoka A, Kodama Y, Yoshida M, Isama K, Inoue K, Kawakami T, Nishikawa A: Toxicological studies of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide. 24th European Conference on Biomaterials (Dublin, 2011.9)
- 5) Isama K, Kawakami T, Matsuoka A: Adsorption behavior of ions on calcium-incorporated titanium in simulated body fluid, The 3rd Asian Biomaterials Congress (Busan, 2011.9)
- 6) 宮島敦子、加藤玲子、酒井恵子、松岡厚子：チタン系金属、合成高分子等の医用材料上で培養した CHL 細胞の細胞毒性および遺伝毒性、第 33 回バイオマテリアル学会（京都、2011.11）
- 7) 酒井恵子、宮島敦子、加藤玲子、岡田恵里、尾崎正康、松岡厚子：ナノ材料の安全性評価における A549 細胞と CHL 細胞の感受性の比較、日本環境変異原学会第 40 回大会（東京、2011.11）
- 8) Miyajima-Tabata A, Kato R, Sakai, K, Okada E, Matsuoka A: Cytotoxicity studies in A549 cells cultured on 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers. The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Francisco, 2012.3)
- 9) 宮島敦子、酒井恵子、河上強志、加藤玲子、松岡厚子、尾崎正康、宇佐見誠、伊佐間和郎：A549 細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系の検討、日本薬学会第 132 年会（札幌市、2012.3）
- 10) Totsuka Y, Kato T, Ishino K, Nakae D, Tada Y, Oyama K, Ogata A, Kawanishi M, Yagi T, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Genotoxicity induced by nanomaterials, 41th European Environmental Mutagen Society Annual Meeting (Barcelona, 2011.7)
- 11) 戸塚ゆかり：ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性、レドックスシンポジウム（東京都、2012.3）
- 12) Totsuka Y, Kato T, Wakabayashi K, Watanabe T, Nakagama H: Genotoxicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative formed from tryptophan and glucose by Maillard reaction, 日本癌学会第 70 回大会（名古屋市、2011.10）
- 13) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Watanabe M, Wakabayashi K, Nakagama H: Differences in DNA damaging potency of differently-originated kaolins, 日本癌学会第 70 回大会（名古屋市、2011.10）
- 14) Ishino K, Totsuka Y, Kato T, Nakagama H: A comprehensive analysis of DNA adducts in mice exposed to nanomaterials, 日本癌学会第 70 回大会（名古屋市、2011.10）
- 15) Morohashi A, Sato A, Kawai K, Kasai H, Totsuka Y, Watanabe M: Cytotoxicity and genotoxicity of magnetic nanoparticles in human lung cancer cell line, A549, 日本癌学会第 70 回大会（名古屋市、2011.10）

- 16) Ootsuka K, Totsuka Y, Wakabayashi K, Nunoshiba T, Watanabe T, Nakagama H: In vivo mutagenicity of aminobenzoazepinoquinolinone derivative (ABAQ) formed from L-tryptophan and glucose by the Maillard reaction, 日本環境変異原学会第40回大会 (東京都、2011.11)
- 17) Ishino K, Kato T, Matsuda T, Totsuka Y, Nakagama H: A comprehensive analysis of DNA adducts in lungs of mice exposed to nanomaterials using nanoLC-QToF MS, 日本環境変異原学会第40回大会 (東京都、2011.11)
- 18) Kato T, Ishino K, Toyooka T, Ibuki Y, Watanabe M, Wakabayashi K, Masuda S, Totsuka Y, Nakagama H: Differences in DNA damaging potency and incorporation rate into cultured mammalian cells of differently-originated kaolins, 日本環境変異原学会第40回大会 (東京都、2011.11)
- 19) Yamada M, Shimamura Y, Totsuka Y, Inaba N, Coulibaly S, Tamura Y, Hasei T, Watanabe T, Masuda S: Formation of a novel mutagen, ABAQ under diabetic condition in vivo, 日本環境変異原学会第40回大会 (東京都、2011.11)
- 20) Ikemoto M, Kawanishi M, Totsuka Y, Wakabayashi K, Yagi T: Contribution of homologous recombination to nanomaterial-induced micronucleus induction, 日本環境変異原学会第40回大会 (東京都、2011.11)
- 21) 坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、大山謙一、中江大: 腹腔内投与によるラット中皮腫の誘発性に対して多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の性状が及ぼす影響、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜市、2011.7)
- 22) 山口敦美、藤谷知子、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、小縣昭夫、中江大: 多層カーボンナノチューブの投与による鉛法免疫系への影響 (II)、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜市、2011.7)
- 23) 高橋 省、坂本義光、大山謙一、小縣昭夫、中江 大、広瀬明彦、西村哲治: 多層カーボンナノチューブ腹腔投与マウスにおける急性的酸化ストレス、第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (横浜市、2011.7)
- 24) 山本行男、大貫 文、坂本義光、大山謙一、中江 大、小縣昭夫: 多層カーボンナノチューブ投与ラットの血清におけるプロテオーム解析、第84回日本生化学会大会 (京都市、2011.9)
- 25) Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D: Influence of the product level physic-chemical property on the carcinogenicity of multi-wall carbon nanotube in rats, 第70回日本癌学会学術総会 (名古屋市、2011.10)
- 26) 鈴木俊也、小杉有希、富士栄聡子、保坂三継、中江 大、小縣昭夫: 水試料中のカーボンナノチューブの分析法、第48回全国衛生化学技術協議会年会 (長野市、2011.11)

- 27) 富士栄聡子、鈴木俊也、小杉有希、保坂三継、小縣昭夫、中江 大：水試料中のフラーレンの分析法、第 48 回全国衛生化学技術協議会年会（長野市、2011.11）
- 28) 多田幸恵、齋藤育江、矢野範男、高橋博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、大山謙一、小縣昭夫、中江大：気管内注入による磁性ナノ粒子マグネタイトの体内動態及び排泄について、第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会（東京都千代田区、2012.2）
- 29) 坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、大山謙一、中江大：ラットにおける多層カーボンナノチューブの発がん性に対して製品レベルの物理化学的特性が及ぼす影響、第 28 回日本毒性病理学会年次学術集会（東京都千代田区、2012.2）
- 30) Watanabe M, Takagi A, Hirokawa Y, Shiraishi T: A prostate cancer spheroid related gene and chemotherapy, 102nd Annual Meeting of American Association for Cancer Research, Orange Country Convention Center (Orland, 2011.4)
- 31) Watanabe M, Kurioka D, Hamanaka Y, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Shiraishi T: Tumor microenvironment and prostate cancer: Effects of adipocytes on prostate cancer development and progression, An AACR International Conference on New Horizons in Cancer Research: Biology to prevention to therapy (Delhi, 2011.12)
- 32) Watanabe M, Watanabe N: Nanomedicine for targeted prostate cancer therapy (Invited Lecture), INSA, Recent updates on mutation and cancer research (Chandigarh, 2011 12)
- 33) 渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三：3 次元培養におけるヒト前立腺癌細胞の抗癌剤抵抗性の獲得機構について、第 100 回日本病理学会総会（横浜市、2011.4）
- 34) 渡邊昌俊：動物組織切片を利用した前立腺癌細胞の挙動の解析、第 100 回日本病理学会総会（横浜市、2011.4）
- 35) 佐藤明子、諸橋彩香、米田操、白石泰三、渡邊昌俊：磁性体ナノ粒子の前立腺癌におけるドセタキセルによる治療への効果、第 70 回日本癌学会学術総会（名古屋市 2011.10）
- 36) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：前立腺癌細胞と細胞切片基質の相互作用 第 70 回日本癌学会学術総会（名古屋市、2011.10）
- 37) 土屋直人、栗岡大輔、緒方広子、渡邊昌俊、中釜斉：がん抑制因子 miR-22 による、p53 非依存的細胞周期停止誘導機構、第 70 回日本癌学会学術総会（名古屋市、2011.10）
- 38) 渡邊昌俊、白石泰三：脂肪細胞由来液性因子の前立腺癌細胞への影響の基礎的解析、第 58 回日本臨床検査医学会学術集会（岡山市、2011.11）
- 39) 渡邊昌俊：腫瘍と腫瘍微小環境、化学工学会第 43 回秋季大会シンポジウム（名古屋市、2011.9）

3. その他

- 1) 渡邊昌俊：癌治療用組成物-抗癌剤の副作用の軽減と新しい集学的治療を目指して、横浜国立大学・東海大学・横浜市立大学 新技術説明会、科学技術振興機構 JST 東京別館ホール (2012.1.17)
- 2) 渡邊昌俊：抗がん効果、酸化鉄で増す、日経産業新聞 (2012.2.15)

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

参考文献

- 1) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会：『ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書』、<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano/nanopdf/houkoku.pdf> (2009)
- 2) Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L: Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.*, 188, 112-118 (2009)
- 3) Xu M, Fujita D, Kajiwara S, Minowa T, Li X, Takemura T, Iwai H, Hanagata N: Contribution of physicochemical characteristics of nano-oxides to cytotoxicity. *Biomaterials*, 31, 8022-8031 (2010)
- 4) Cho WS, Duffin R, Poland CA, Duschl A, Oostingh GJ, Macnee W, Bradley M, Megson IL, Donaldson K: Differential pro-inflammatory effects of metal oxide nanoparticles and their soluble ions in vitro and in vivo; zinc and copper nanoparticles, but not their ions, recruit eosinophils to the lungs. *Nanotoxicology*, 6, 22-35 (2012)

II. 分担研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究年度終了報告書

ナノマテリアルの in vitro 評価系構築に向けた基礎研究

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

研究分担者 河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 主任研究官
研究協力者 伊佐間 和郎 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長
研究協力者 宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
研究協力者 酒井 恵子 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部

一次粒子径がいずれも 50 nm 以下の金属酸化物ナノマテリアル 10 種類 (Al_2O_3 、 CeO_2 、ITO、 SiO_2 、 TiO_2 、CuO、 SnO_2 、 Y_2O_3 、NiO、ZnO)、11 試料 (ZnO は入手先の異なる 2 種類: Sigma-Aldrich、Alfa Aesar) について、注射用水中および 10%ウシ胎児血清含有 Minimum Essential Medium (10%FBS-MEM) 中におけるそれらの物性解析を目的として、平均粒子径 (流体力学径)、多分散度指数、粒径分布および Zeta 電位を測定した。注射用水中では各金属酸化物ナノマテリアルは主に二次粒子として存在し、平均粒子径は CeO_2 、ITO、 TiO_2 および ZnO (Sigma-Aldrich) が 100 nm 以下、その他は NiO の 256.8 nm が最大であった。 SnO_2 は注射用水中で速やかに凝集したが、10%FBS-MEM 中では平均粒子径が 1000 nm を超えたが分散を保っていた。ZnO (Alfa Aesar) を除く全ての金属酸化物ナノマテリアルの平均粒子径が、10%FBS-MEM 中では注射用水中よりも大きくなった。各金属酸化物の注射用水中の Zeta 電位は、 SiO_2 および ZnO (Alfa Aesar) は負の値を示し、その他の金属酸化物ナノマテリアルは正の値を示した。一方、10%FBS-MEM 中ではタンパク質等の影響を受けて全ての金属酸化物ナノマテリアルで Zeta 電位は負の値を示し、ZnO (Alfa Aesar) 以外の金属酸化物ナノマテリアルでその絶対値は小さくなった。そのため、10%FBS-MEM 中では金属酸化物ナノマテリアル表面の電気的反発力が小さくなり凝集したと考えられた。一方で、一部の金属酸化物ナノマテリアルについては、血清が分散剤としても作用していると考えられた。CuO、NiO および 2 種類の ZnO について、10%FBS-MEM 中での希釈の影響および経時変化を検討した。その結果、これらの金属酸化物ナノマテリアルに対して希釈の影響は認められなかった。そして、これら金属酸化物ナノマテリアルの懸濁液調製後、一日経過した段階では各物性値にほとんど変化は無かった。これらのデータは培養細胞試験にとって有用な情報となり得るものと考えられた。

A. 研究目的

一般的にナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と定義されており¹⁾、様々な種

類のナノマテリアルが開発され、工業製品、化粧品、触媒、塗料など様々な製品に使用されるようになってきた。そして、これら