

銀

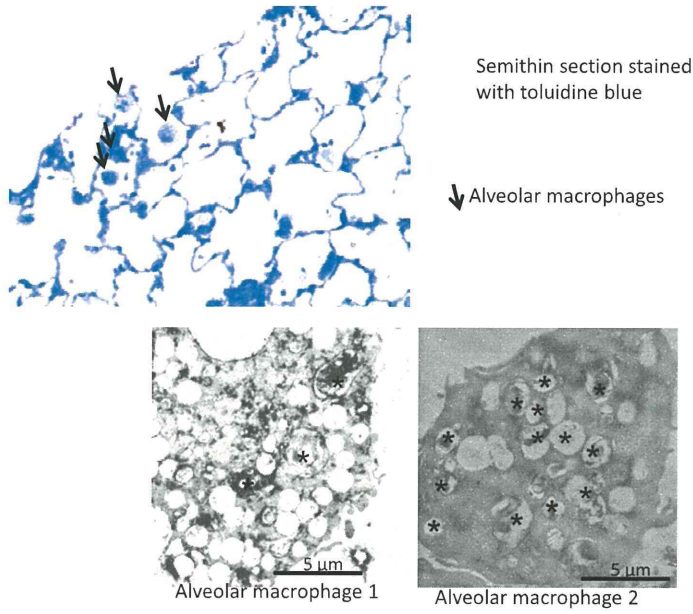


Fig. 5 肺胞内のマクロファージ(上図矢印 準超薄切片 トルイジンブルー染色)。マクロファージ内には多くのライソゾームが観察される

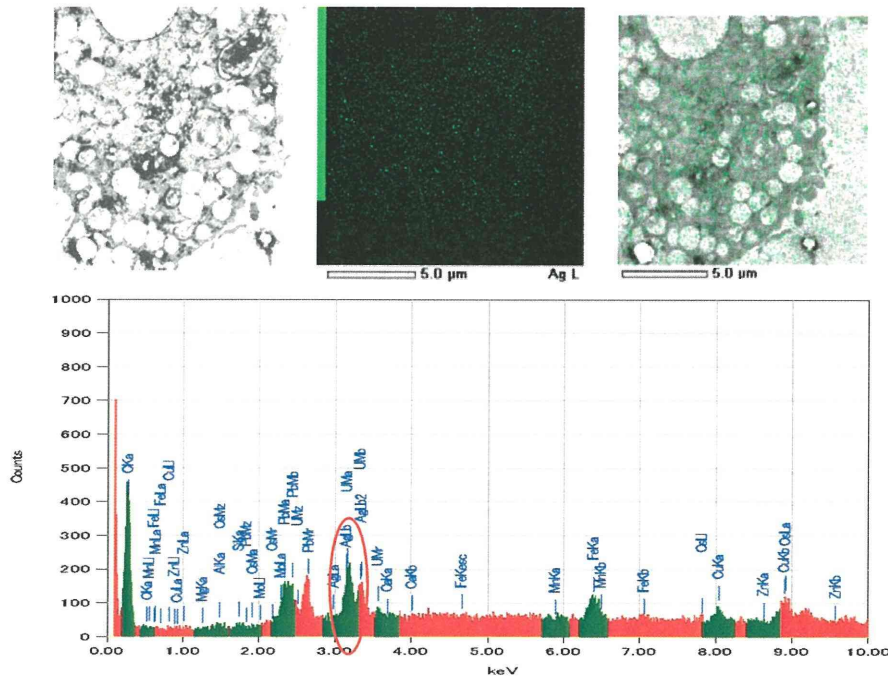


Fig. 6 肺胞マクロファージ電顕写真および細胞全体内 EDS 解析結果 Ag のピーク(○で囲んだ部分)が認められた。

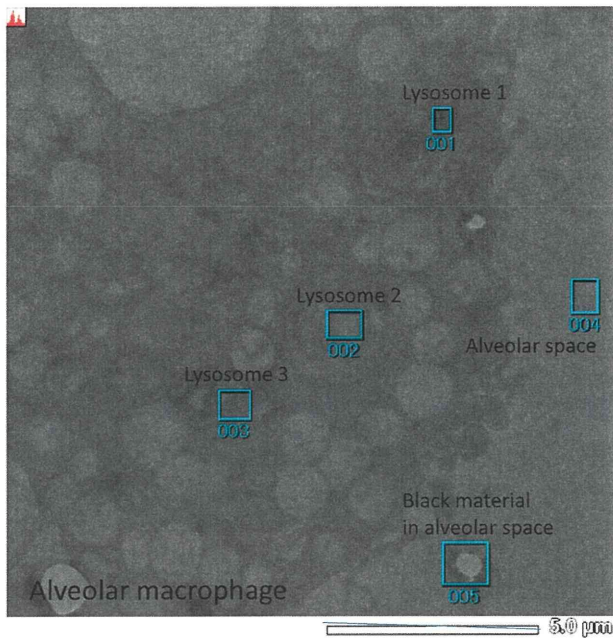


Fig.7 肺泡マクロファージ電顕写真。ライソゾーム(001, 002, 003)および細胞外(004, 005)を囲んで解析した(Fig.8 参照)。

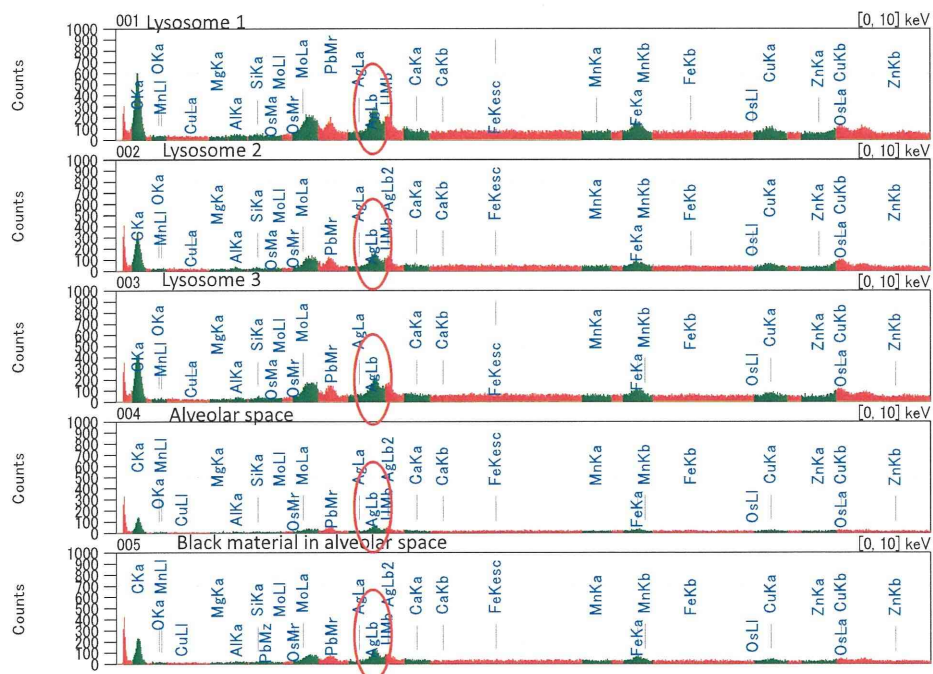


Fig.8 ライソゾーム内(001~003)には Ag が検出されたが(○で囲んだ)、細胞外(004,005)には検出されなかった。

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

ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

研究分担者	宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
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
研究協力者	河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生化学部
研究協力者	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部
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

研究要旨

ナノマテリアルの生体影響の評価については、試験法や評価基準などが定められていない。本研究では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、ヒト由来細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系構築を目指すと共に、ナノマテリアルの細胞応答に及ぼす影響を解明するための基礎的検討を行った。本年は、まず初めに、ナノマテリアル *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト肺がん由来細胞株である A549 細胞を用いた細胞毒性及び遺伝毒性評価系を確立させ、その有用性について確認した。次に、10 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した。このスクリーニング結果を元に、今後、遺伝毒性についての検討、遺伝子発現解析、細胞内動態の解析を進める。

A. 研究目的

近年ナノマテリアルが我々の周りで広く使われるようになってきた。しかしながら、新規材料であるためその安全性は未知の部分が多く、生体影響の評価については、試験法や評価基準などが定められていない。本研究では、培養細胞を用い、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、ヒト由来細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系構築を目指すと共に、ナノマテリアルの細胞応答に及ぼす影響を解明するための基礎的検討を行った。

当研究室においては、既に、医用材料を

はじめとする化学物質やナノマテリアルに対する *in vitro* 生体影響評価系として、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 CHL 細胞を用いた細胞毒性及び遺伝毒性評価系を確立させている。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。

今後、さらにこのスクリーニング結果を元に、遺伝毒性、細胞内動態についての検討を行い、細胞毒性・遺伝毒性発現メカニズム、バイオインフォマティクスによる遺伝子発現及び共存化学物質との相互作用による細胞機能影響について解析を進める予定である。

B. 研究方法

1) 材料

CHL 細胞及び A549 細胞を用いたナノマテリアルに対する感受性の比較においては、ナノマテリアルとして、

- ・酸化亜鉛 ZnO (183.8nm) (NanoTeK, Alfa Aesar, A Johnson Matthey Company),

- ・シリカコロイド SiO₂ (54.2nm) (SNOWTEX®AK, (Nissan Chemical Industries, Ltd.),

- ・ポリスチレン(PS) (70.0nm)(SPHERO™ Polystyrene Particles, PP-008-10, Spherotech Inc.)

を用いた。また陽性対照物質として、硫酸カドミウム CdSO₄ (Cadmium sulfate hydrate (3/8) (Sigma-Aldrich)を用いた。

A549 細胞を用いた、酸化金属ナノマテリアルの細胞毒性評価においては、酸化アルミニウム Al₂O₃, 酸化セリウム CeO₂, 酸化インジウムスズ ITO, 酸化ケイ素 SiO₂, 酸化チタン TiO₂, 酸化銅 CuO, 酸化スズ SnO₂, 酸化イットリウム Y₂O₃ (以上 CIK NanoTeK), 酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び NanoTeK, Alfa Aesar), 酸化ニッケル NiO (Sigma-Aldrich)を用いた。また、Sigma-Aldrich 社の ZnO ナノマテ

リルの分散剤として報告されている 3-Aminopropyl-triethoxysilane (APTS) (Sigma-Aldrich)についても検討した。酸化金属ナノマテリアル懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位は、動的光散乱光度計 (大塚電子 ELSZ-2NPA)により測定した。(分担研究者・河上の報告参照。)

2) 細胞株及び培養方法

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 CHL は、国立衛研において樹立された細胞株で基盤研の JCRB 細胞バンク(吹田)、American Type Culture Collection (ATCC) (USA)にも登録され、遺伝毒性試験に汎用されている。A549 はヒト肺由来細胞株で、JCRB 細胞バンク(吹田)より購入して使用した。CHL 細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO)にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。A549 細胞は、10% 非働化 FBS, 1% non-essential amino acid (NEAA) を含む MEM にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。各細胞株は、3-4 日ごとに継代した。

3) 細胞増殖試験

6-well プレートに、A549 細胞を播種し (2 × 10⁴ cells/2mL)、10% 非働化 FBS 添加 MEM 培地にて培養し、1 週間に渡って細胞数をカウントした。

4) 細胞毒性試験・コロニー法

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、50 個/well の CHL 細胞または A549 細胞を 24-well プレートに播種し、翌日ナノマテリアル液 (被験液) を添加し、さらに 7 日間または 10 日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを数え、

陰性対照群のコロニー数に対する割合（コロニー形成率）を算出した。

5) 細胞毒性試験・MTT法

CHL細胞またはA549細胞を、96-wellプレートに播種し（ 10×10^3 cells/well 及び 5×10^3 cells/well）、24時間後に被験液を添加し、4時間または6時間、24時間及び48時間培養した。培地を除去後、100 μ l の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μ l の CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬, Promega) を添加し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、1時間反応した。生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー(490 nm)で測定した。

6) 遺伝毒性試験・小核試験

CHL細胞またはA549細胞（ 1×10^5 cells）を ϕ 60 mm プレートに播種し、翌日被験液を添加して24時間及び48時間培養した。その後トリプシン処理による剥離と遠心により細胞を回収し、生細胞数をカウントした。CHL細胞の小核観察用標本作製は、低張処理（0.075M KCl, 10分）、カルノア液（酢酸:メタノール = 1:3）による半固定後、カルノア液固定処理(15分)を2回行い、1%酢酸メタノールに懸濁した。A549細胞では、低張処理（0.075M KCl, 5分）、カルノア液による半固定後、カルノア液固定処理(15分)を2回行い、1%酢酸メタノールに懸濁し、小核観察用標本作製した。

標本はアクリジン オレンジで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin)を用いた。

（倫理面への配慮）
該当なし。

C. 研究結果

1) A549細胞を用いた細胞毒性及び遺伝毒性評価系の確立

当研究室においては、既に、医用材料をはじめとする化学物質やナノマテリアルに対する *in vitro* 生体影響評価系として、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 CHL 細胞を用いた細胞毒性及び遺伝毒性評価系確立させており、データの蓄積がある。ナノマテリアルの生体影響評価において、細胞毒性・遺伝毒性発現メカニズム解析、バイオインフォマティクスによる遺伝子発現遺伝子発現解析を含めたヒトに対する評価を行うためには、*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、有用性について確認した。

JCRB細胞バンクより入手したA549細胞株について、細胞の状態及び増殖を確認したところ（図1）、A549細胞の倍加時間は18.6時間であった。次に、細胞毒性試験及び遺伝毒性試験法における試験条件の最適化を行った。コロニー法においてCHL細胞を用いた場合は、培養期間8日目で固定、染色を行っている。A549細胞について、コロニー形成を行う培養期間の検討を行った結果（図2）、11日間が最適であった。MTT法では、96-wellプレートに播種する細胞数について検討した。CHL細胞では 10×10^3 cells/well としているがA549細胞を $5, 10, 15, 20 \times 10^3$ cells/well で播種して検討した結果、 5×10^3 cells/well で播種するのが適当であった（図3）。小核試験においてA549細胞からの小核観察用標本の作製をCHL細胞と同様の方法で行ったところ、核の変形及び細胞質のにじ

みが起こり、観察に適さなかった。そこで低張処理、半固定、固定処理の条件について検討した。その結果、低張処理の時間を短くすることにより、小核の観察がしやすくなることが分かった（図 4）。以上より、3 試験法において、条件を最適化し試験法を確立した。

2) ナノマテリアルの安全性評価における A549 細胞と CHL 細胞の感受性の比較

次に、ナノマテリアルとして、酸化亜鉛 ZnO (Alfar Aesar), シリカコロイド SiO₂, ポリスチレン(PS), 陽性対照として硫酸カドミウム CdSO₄ を用いて、細胞毒性試験(コロニー法, MTT 法)及び遺伝毒性試験(小核試験)を行い、両細胞の感受性について比較した。その結果、細胞毒性試験では、SiO₂, PS は共に 100 µg/ml においても毒性が観察されず、毒性が観察された ZnO については、CHL と A549 の両細胞間の感受性に大きな相違は認められなかった（図 5, 6）。CdSO₄ に対しては、A549 細胞の方が若干低い感受性を示し、コロニー法と MTT 法のいずれにも同様の傾向が認められた。また、コロニー法と MTT 法間で、濃度依存性曲線の形に大きな相違は認められなかった。細胞毒性が確認された ZnO について、*in vitro* 小核試験を実施した（図 7, 8）。その結果、両細胞ともに、小核の出現頻度が ZnO の濃度に応じて上昇した。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が、両細胞間の試験結果に大きな相違は認められなかった。CHL 細胞と A549 細胞の比較において、培養・操作の容易さ、ナノマテリアルに対する感受性等の観点からは特に差が認められなかったため、ナノマテリアルの評価に用いる細胞として、両細胞は共に有用であると考えられた。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今後多用されると予測されるが、今後 A549 細胞によるデータの蓄積が必要であると考えられた。

3) 酸化金属ナノマテリアルを対象とした A549 細胞による細胞毒性評価

A549 細胞について確立した細胞毒性評価系を用い、10 種類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、細胞毒性について、コロニー法及び MTT 法により検討した。（酸化金属ナノマテリアル溶液の調製及び物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。）

コロニー法において、ITO, CuO, Y₂O₃, ZnO, NiO は細胞毒性を示し、Al₂O₃, CeO₂, SiO₂, TiO₂, SnO₂ は細胞毒性を示さなかった（図 9）。Sigma-Aldrich の酸化亜鉛ナノマテリアルの分散剤として報告されている 3-Aminopropyltriethoxysilane (APTS) についても、ZnO ナノマテリアルの分散に含まれている濃度（ZnO 50 重量%溶液に対して APTS 2%含有）に準じて細胞毒性試験を行ったが、毒性は観察されなかった。細胞毒性を示した酸化金属ナノマテリアルでは、CuO が強い細胞毒性を示し、以下 NiO, ZnO, ITO, Y₂O₃ の順であった。

MTT 法において、CuO, ZnO, NiO は細胞毒性を示し、Al₂O₃, CeO₂, ITO, SiO₂, TiO₂, SnO₂, Y₂O₃, APTS は細胞毒性を示さなかった（図 10）。細胞毒性を示した酸化金属ナノマテリアルでは、CuO が強い毒性を示し、NiO, ZnO が中程度の毒性を示した。

CuO は、どちらの試験法においても強い毒性を示し、NiO, ZnO は中程度、ITO, Y₂O₃ はコロニー法においてのみ弱い毒性を示した。ZnO は Sigma-Aldrich 及び Alfa

Aesar から分散製品が市販されている。細胞毒性試験における IC₅₀ 値は、コロニー法においては同程度の値であったが、MTT 法では Sigma-Aldrich の方が Alfa Aesar に比べて強い毒性を示した。

D. 考察

A549 細胞株を用いて、細胞毒性試験及び遺伝毒性試験法における試験条件の最適化を行った。CHL 細胞と倍加時間や細胞の形態が異なるため、コロニー法における培養期間、MTT 法における播種細胞数、小核観察用標本の調製に関しては、観察に適した標本作製するための、低張処理、半固定、固定処理の条件について検討した。コロニー法において培養期間の検討を行った結果、11 日間が最適であったが、A549 細胞ではコロニーの大きさに大小があった

(図 2)。A549 細胞を顕微鏡下で観察すると、一核だけでなく二核の細胞が観察され、また細胞の染色体数を数えたところ、61, 62 本を中心として 54 本から 64 本までばらつきがあり (data not shown)、これがコロニーの大きさに影響しているのではないかと考えられた。そこで、A549 細胞を希釈法及びコロニー分離法によりクローニングし、解析に用いる準備を進めている。

A549 細胞について確立した細胞毒性評価系を用い、10 種類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、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した結果を、表 1 にまとめた。IC₅₀ 値は、2 回または 3 回の細胞毒性試験の平均値より算出した。コロニー法において、ITO, CuO, Y₂O₃, ZnO, NiO は細胞毒性を示し、その毒性は CuO, NiO, ZnO, ITO, Y₂O₃ の順であっ

た。MTT 法においては、CuO, ZnO, NiO が細胞毒性を示し、CuO が強い毒性を示し、NiO, ZnO が中程度の毒性を示した。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。

ZnO は Sigma-Aldrich 及び Alfa Aesar から分散製品が市販されており、今回両 ZnO 分散製品について細胞毒性試験を実施した。細胞毒性試験における IC₅₀ (48h) 値は、コロニー試験では、それぞれ 10.5 µg/ml (Sigma), 16.7 (Alfa)、MTT 試験では、31.7 (Sigma), 72.5 (Alfa) で、コロニー法では IC₅₀ 値がほぼ同程度であったのに対して、MTT 試験では、Sigma-Aldrich の方が毒性が強かった。懸濁液中での粒径分布を比較してみると、ZnO (Alfa) は、注射用水中と 10% FBS-MEM 培地中で粒子径がほとんど変化していないが、他の酸化金属ナノマテリアルは培地中で凝集して粒子径が増していた。また、ゼータ電位については、多くの酸化金属ナノマテリアルが注射用水中でプラスであるのに対して、SiO₂, ZnO (Alfa) のみがマイナスを示していた。それぞれの酸化金属ナノマテリアルのゼータ電位は、培地中では、-10.7 から -22.7 mV で同程度の値を示し、培地のみ値 (-9.6 mV) に近く、培地中の成分と相互作用 (pH, 塩濃度の変化, チャージの変化, 蛋白結合など) していると考えられた。ZnO (Sigma) の注射用水中のゼータ電位がプラスだったのに対して、ZnO (Alfa) はマイナスであった。10% FBS-MEM 培地中では、ZnO の粒子径、ゼータ電位に大きな差はなかった。MTT 試験において細胞毒性に差が観察されたことから、ZnO の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、興味深い。今後さらに詳細な解析を進

めて行きたいと考えている。

ナノマテリアル処理 24 時間後の A549 細胞の形態について写真を図 10 に示したが、CuO, ZnO, NiO 処理において、毒性を示す際の細胞の形態が異なっていた。Y₂O₃ は MTT 試験においては細胞毒性を示さなかったが、処理後 24 時間、48 時間時間で、A549 細胞内に球状のものが幾つか観察された。顕微鏡観察では、球状内が空胞状態であるのか、何かが溜め込まれているのか（例えば油滴）判断できなかった。今後、Oil Red O 染色を行い、Y₂O₃ による細胞応答について解析を進める予定である。

3 種類の酸化金属ナノマテリアル CuO, NiO, ZnO の粒径分布、ゼータ電位について、10% FBS-MEM 培地中での希釈の影響及び経時変化を検討した結果、CuO, ZnO (Alfa) は希釈により粒子径、ゼータ電位に大きな変化はなかったが、ZnO (Sigma) では濃度変化により粒子径に変化が観察されている。経時変化については、室温で 1 日経過した場合でも、懸濁液中の粒径分布、ゼータ電位にほとんど変化はなく、凝集状態に変化はなかった。37°C の培養液中においても同様であると想像され、酸化金属ナノマテリアルは 10% FBS-MEM 培地で最初に希釈した際に、その状態が変化し、その後培養液中ではその状態が保たれていると考えられた。このことは、今後、酸化金属ナノマテリアルの細胞毒性評価を進める上で、重要な知見であると考えられた。

本研究において細胞毒性が観察された酸化金属ナノマテリアルについて焦点をあて、遺伝毒性、遺伝子発現等の細胞応答、細胞内動態について、詳細な解析を行う予定である。また、ナノマテリアルの調製法についても検討し、物理化学的性質と細胞応答の関連について解析を進めたいと考えている。

E. 結論

本研究において、

1) 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。

2) 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。

3) 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、MTT 法において、CuO, ZnO, NiO が細胞毒性を示した。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。

・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。

今後、細胞毒性が観察されたナノマテリアルについて焦点をあて、遺伝毒性、遺伝

子発現等の細胞応答、細胞内動態について、詳細な解析を行う予定である。また、ナノマテリアルの調製法についても検討し、物理化学的性質と細胞応答の関連について解析を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Miyajima A., Sunouchi M., Goda Y. : Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. Anal Bioanal Chem, 400, 165-174 (2011).

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, 87-90 (2011)

2. 学会発表

1) Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A. : In Vitro and Vivo Toxicity Studies of Nanomaterials Used in Household Products., ICAMT 2011 (Singapore, 2011.6)

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.,

24th European Conference on Biomaterials (Dublin, 2011.9)

3) 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)

4) 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)

5) 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)

6) 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、2012.3)

E. 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

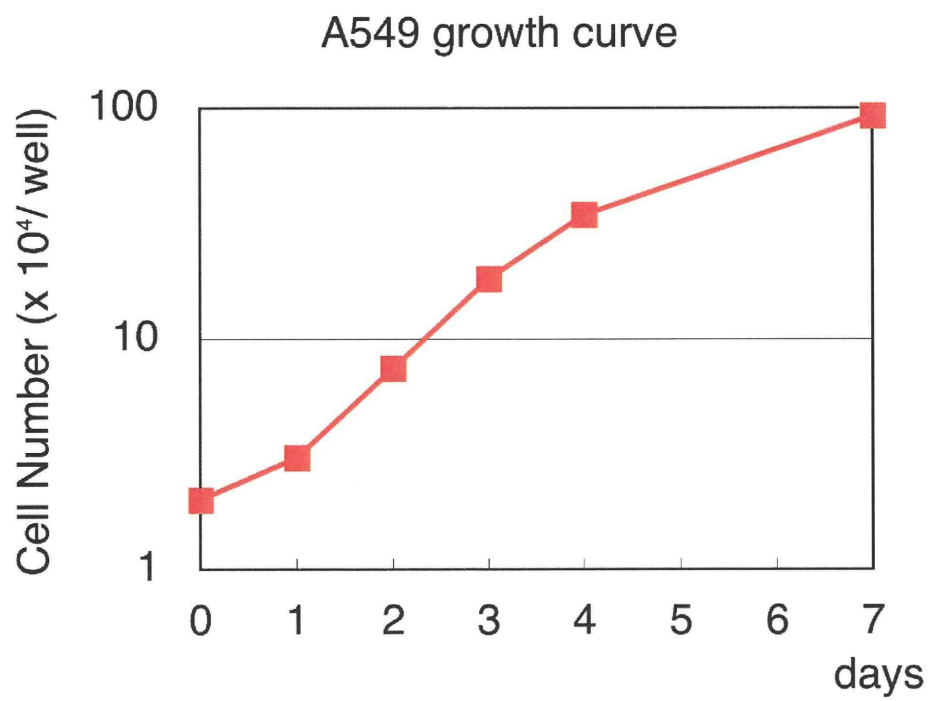
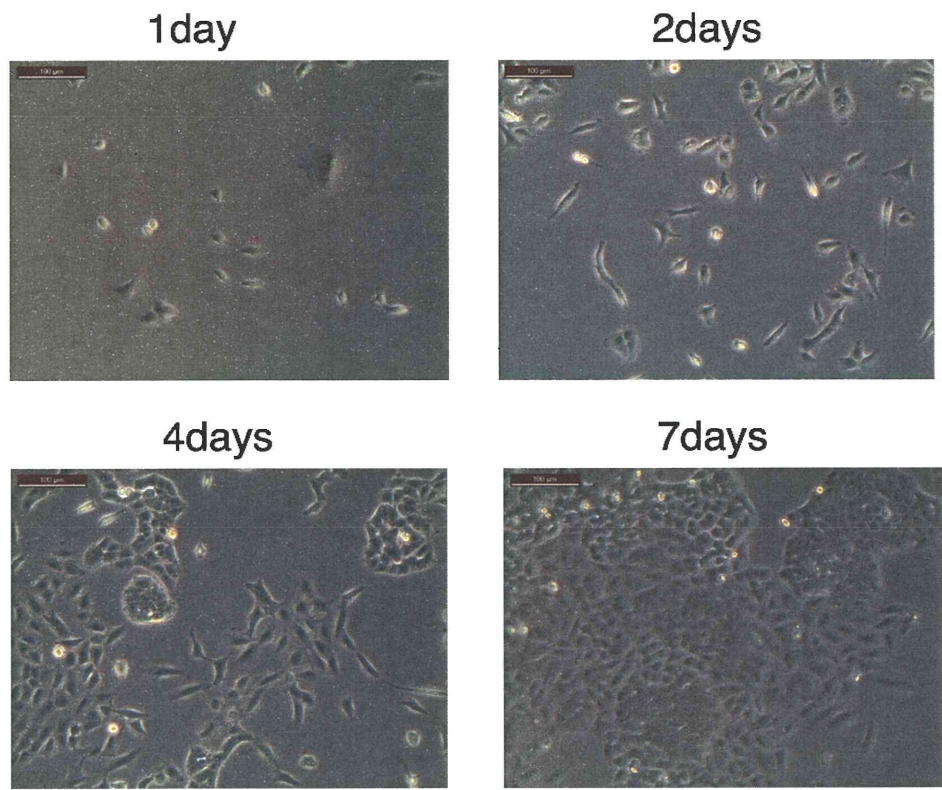


圖1 A549細胞增殖曲線

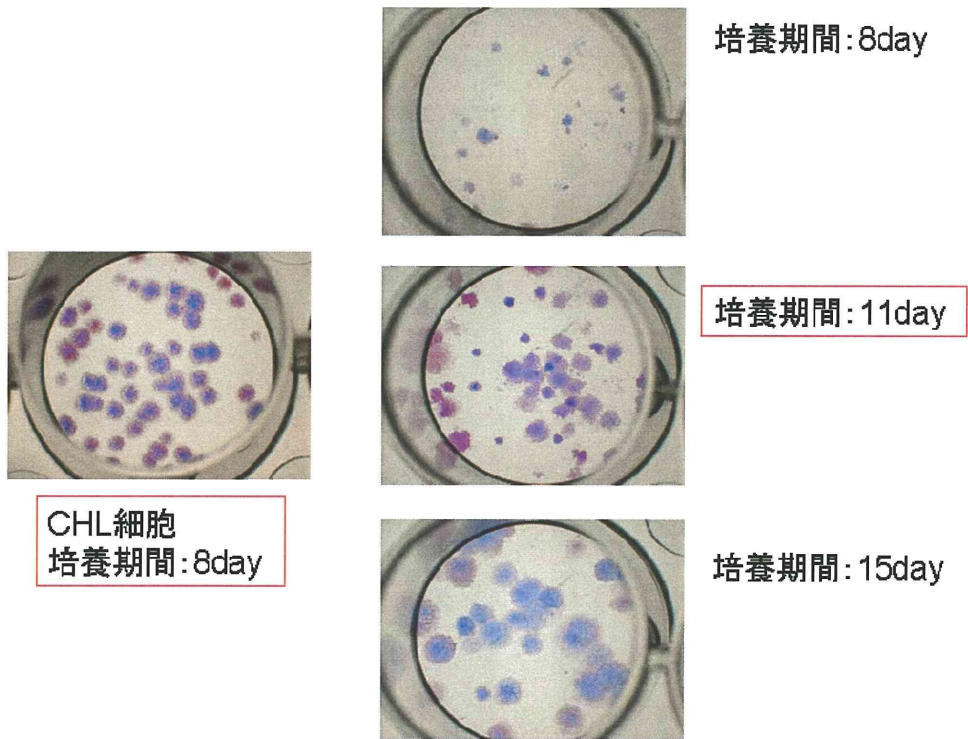


図2 A549細胞 コロニー法における培養日数の検討

Abs 490nm

平均	0.5	1	1.5	2
6h	0.925	1.580	1.854	2.077
	0.975	1.603	1.906	2.114
	0.950	1.592	1.880	2.096
24h	1.517	1.879	2.050	2.064
	1.449	1.856	2.022	2.231
	1.483	1.868	2.036	2.148

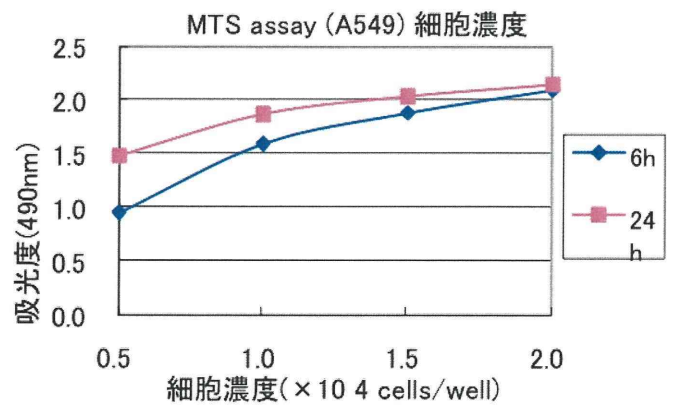
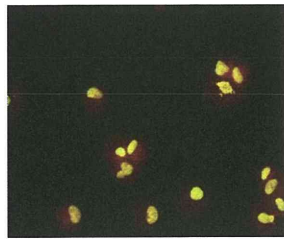
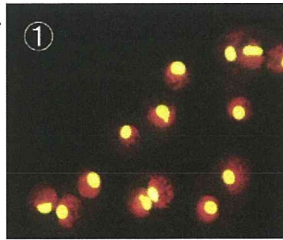


図3 A549細胞 MTT法における細胞濃度の検討

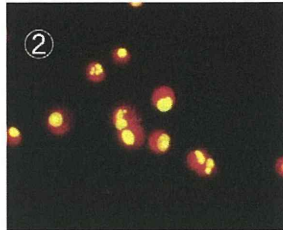
A549細胞 MN試験検討



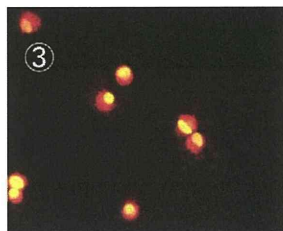
CHLと同様の方法
 <問題点>
 ・核の変形が多い
 ・細胞質のにじみ



①低張処理(KCl:37°C) 10min→半固定
 カルノア(3:1)15min→遠心
 カルノア(3:1)15min→遠心
 カルノア(1%AcOHinMeOH)



②低張処理(KCl:37°C) 5min→半固定
 カルノア(3:1)15min→遠心
 カルノア(3:1)15min→遠心
 カルノア(1%AcOHinMeOH)



③低張処理(KCl:室温) 5min→半固定
 カルノア(1%AcOHinMeOH)30min

図4 A549細胞 MN試験サンプル調製法の検討

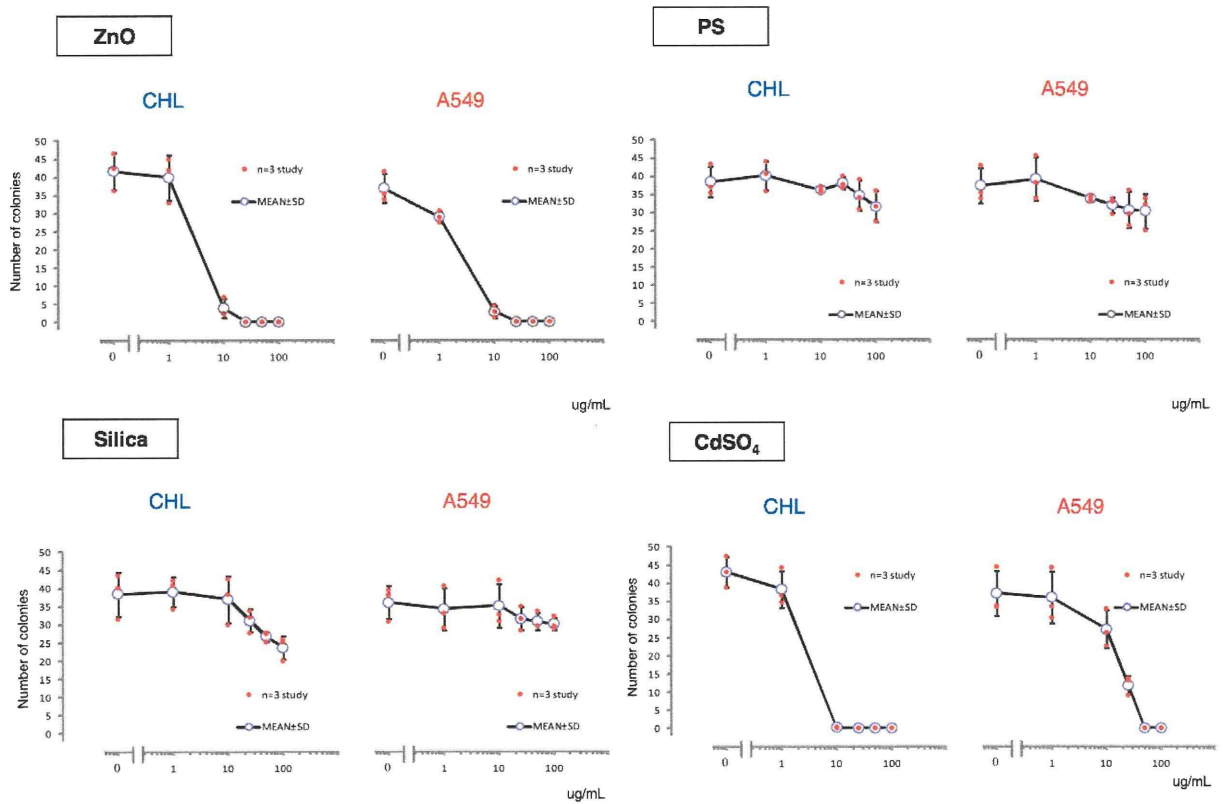


図5 CHL細胞及びA549細胞のナノマテリアルに対するコロニー試験の比較

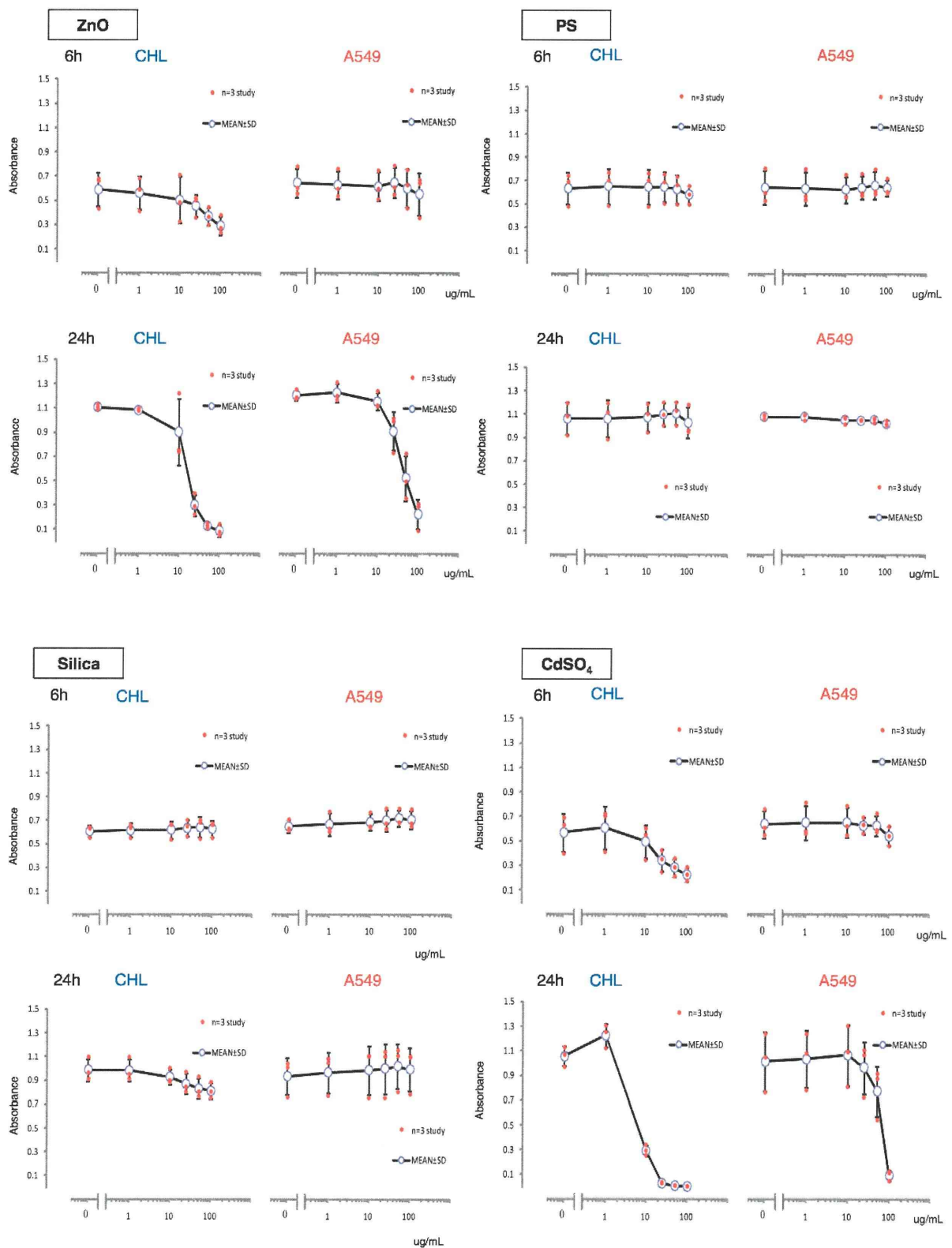


図6 CHL細胞及びA549細胞のナノ材料に対するMTT試験の比較

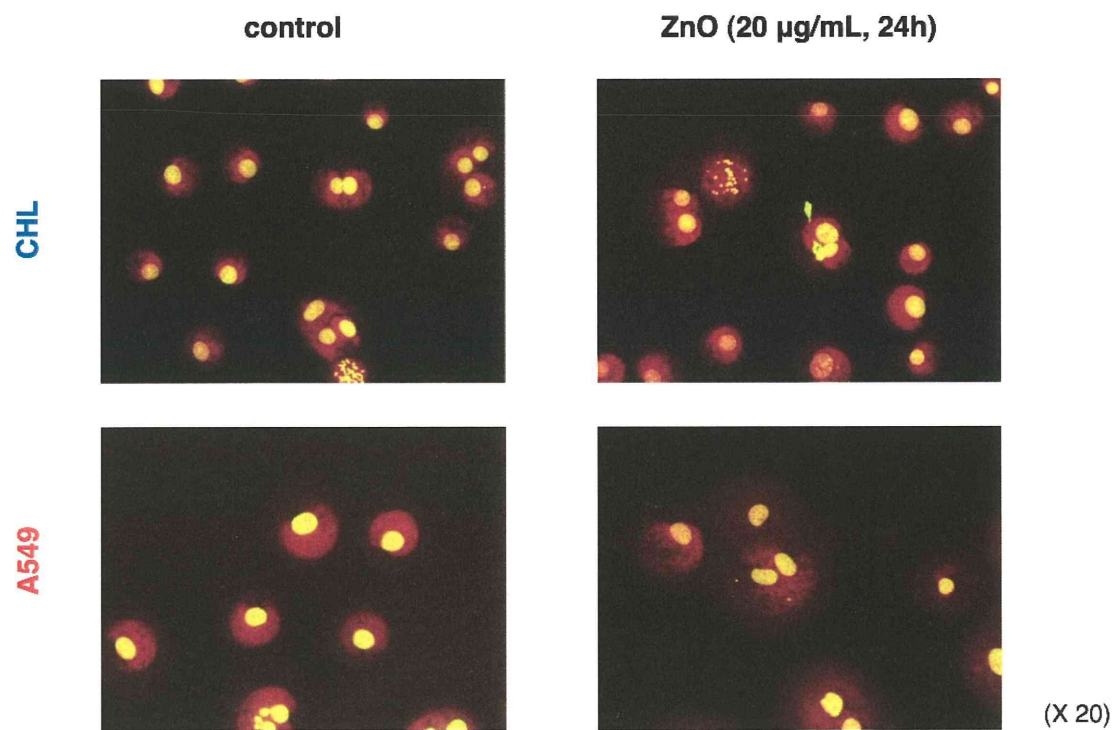
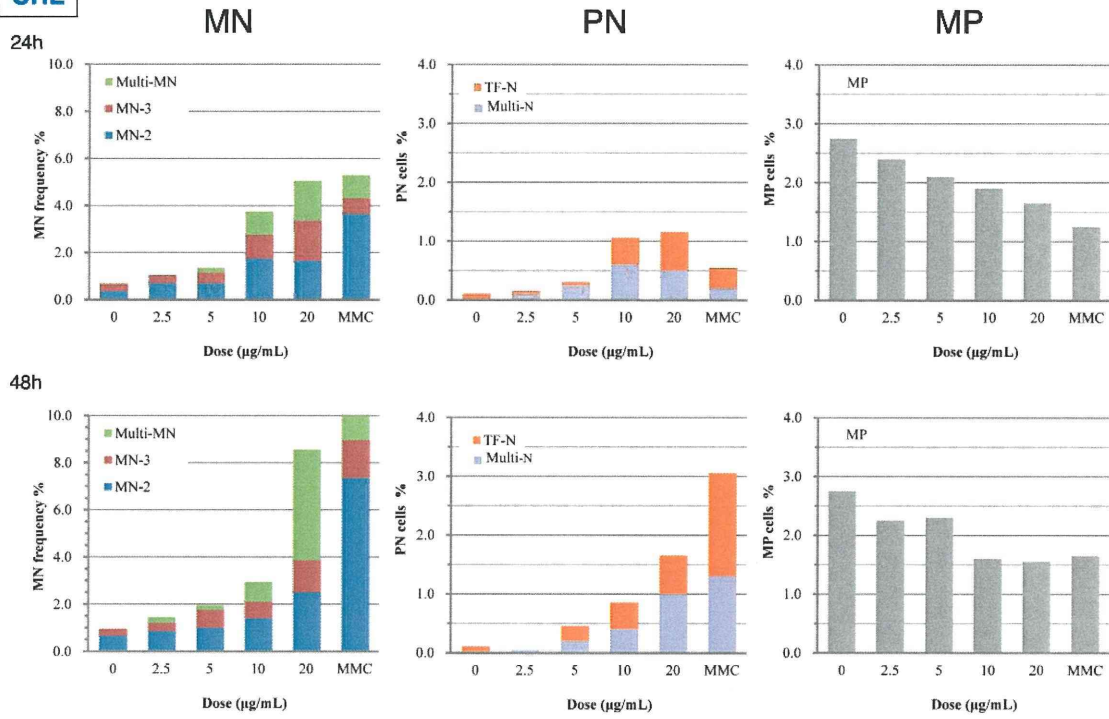


図7 CHL細胞及びA549細胞のZnOに対する小核試験

CHL



A549

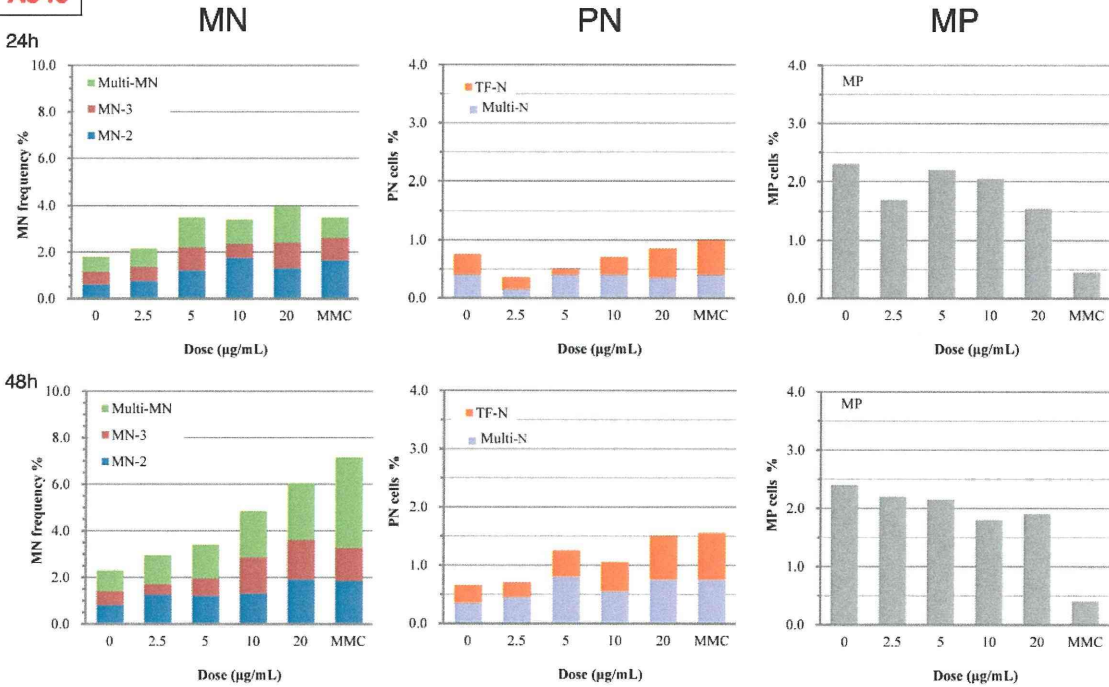


図8 CHL細胞及びA549細胞のZnOに対する小核試験の比較

MN; micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, PN; polynucleus, TF-N; transformed nucleus, Multi-N; multi nucleus, MP; metaphase

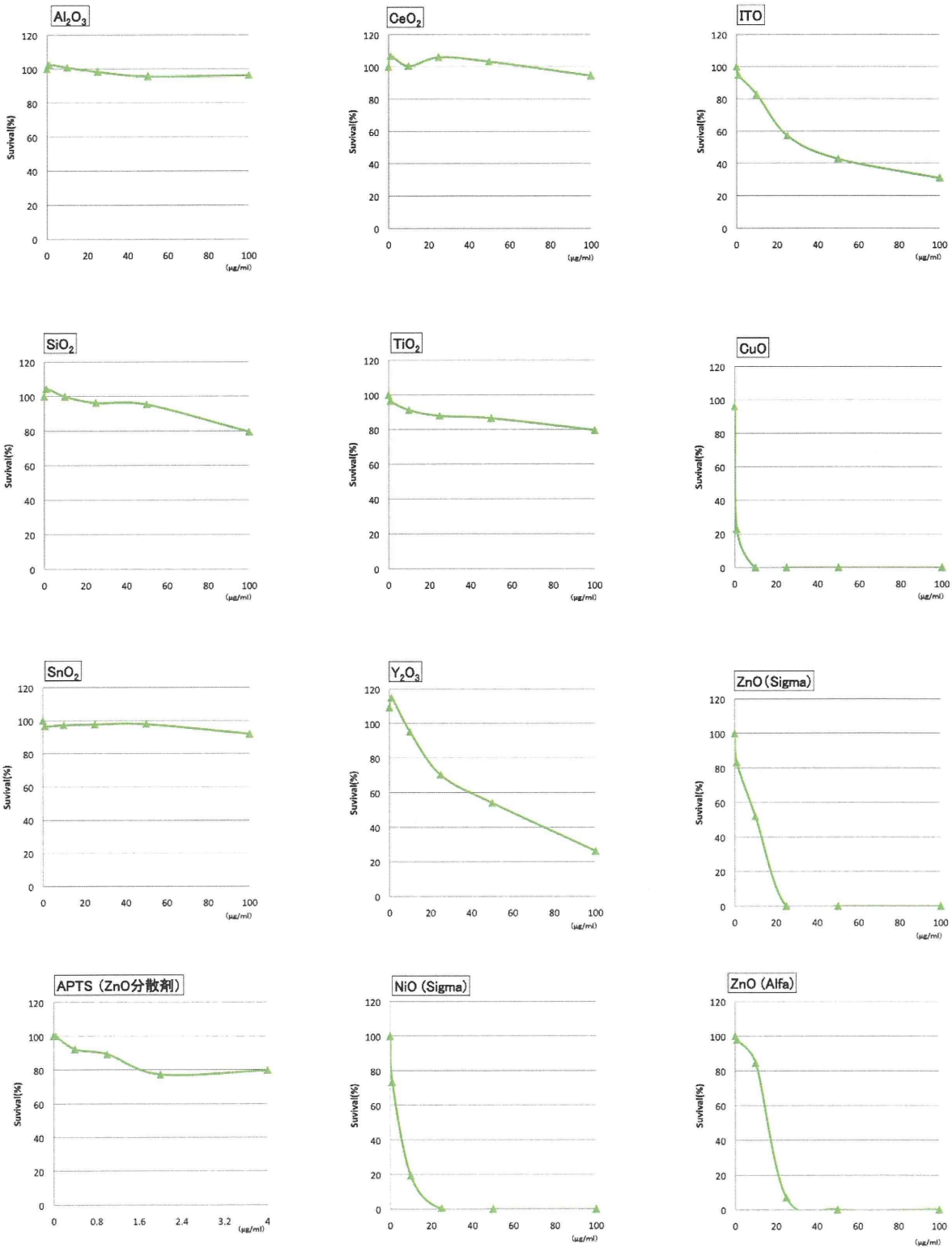


図9 A549細胞の酸化金属ナノマテリアルに対するコロニー試験

Al₂O₃ 酸化アルミニウム

24h

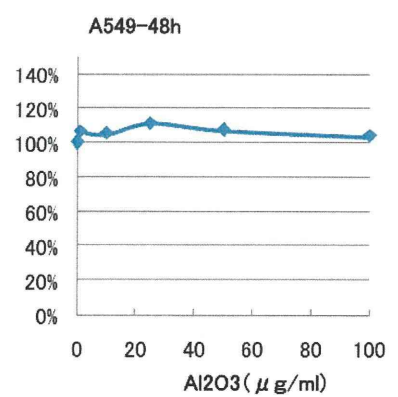
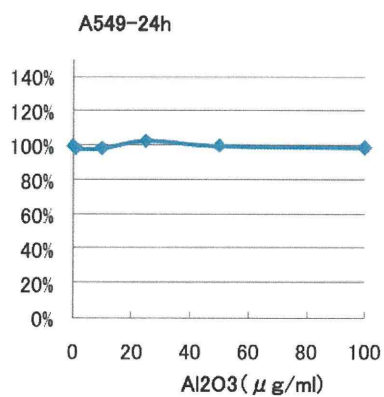
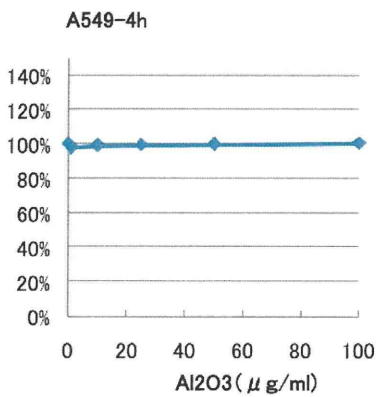
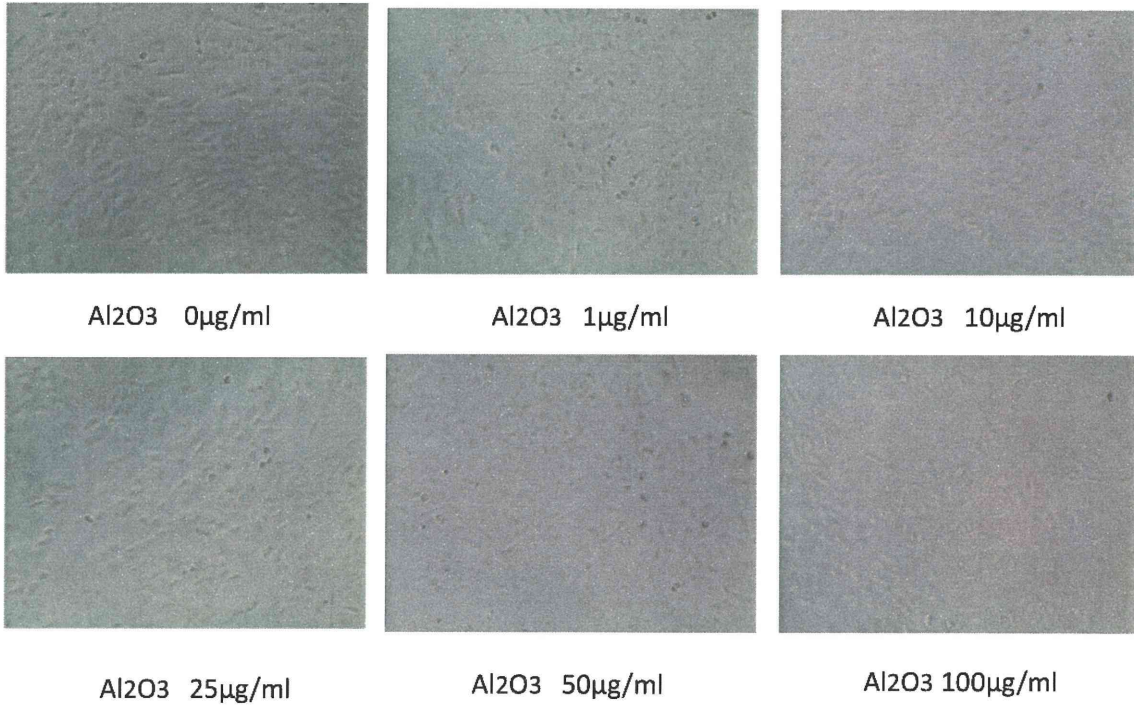
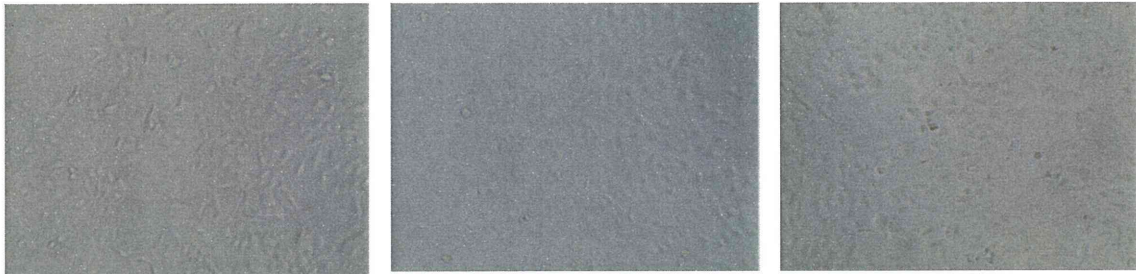


図10 A549細胞の酸化金属ナノ材料に対するMTT試験-1

CeO₂ 酸化セリウム

24h



CeO₂ 0µg/ml

CeO₂ 1µg/ml

CeO₂ 10µg/ml



CeO₂ 25µg/ml

CeO₂ 50µg/ml

CeO₂ 100µg/ml

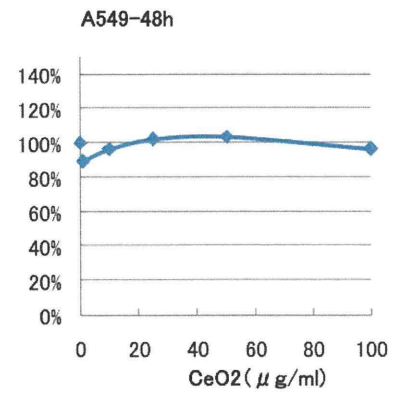
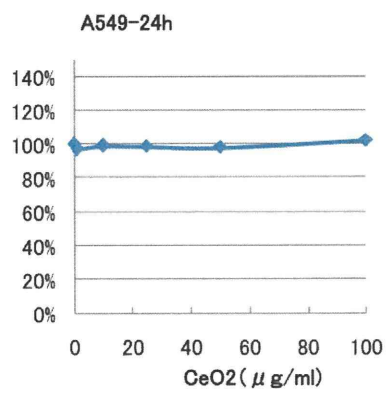
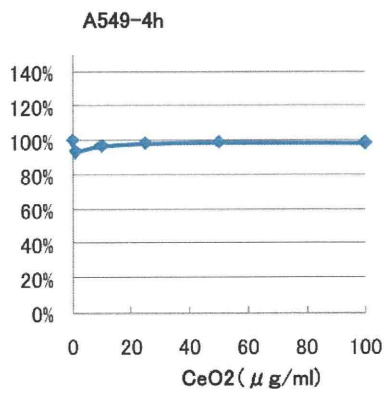


図10 A549細胞の酸化金属ナノマテリアルに対するMTT試験-2

ITO 酸化インジウムスズ

24h



ITO 0μg/ml



ITO 1μg/ml



ITO 10μg/ml



ITO 25μg/ml

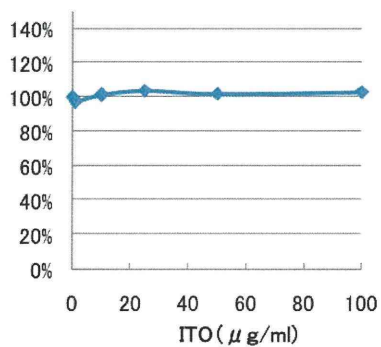


ITO 50μg/ml

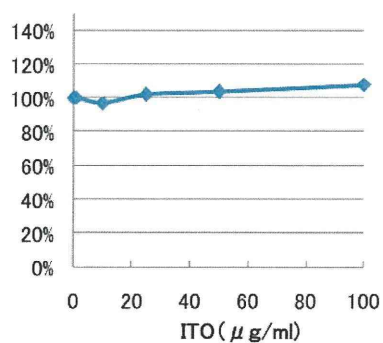


ITO 100μg/ml

A549-4h



A549-24h



A549-48h

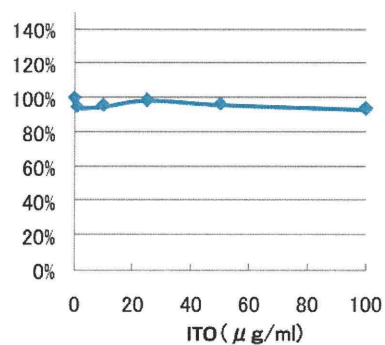


図10 A549細胞の酸化金属ナノマテリアルに対するMTT試験-3

SiO₂ 酸化ケイ素

24h

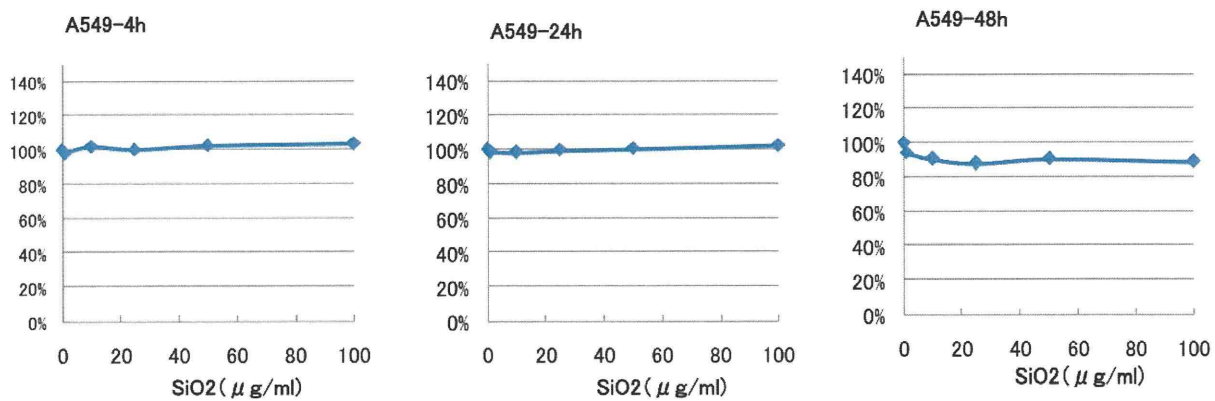
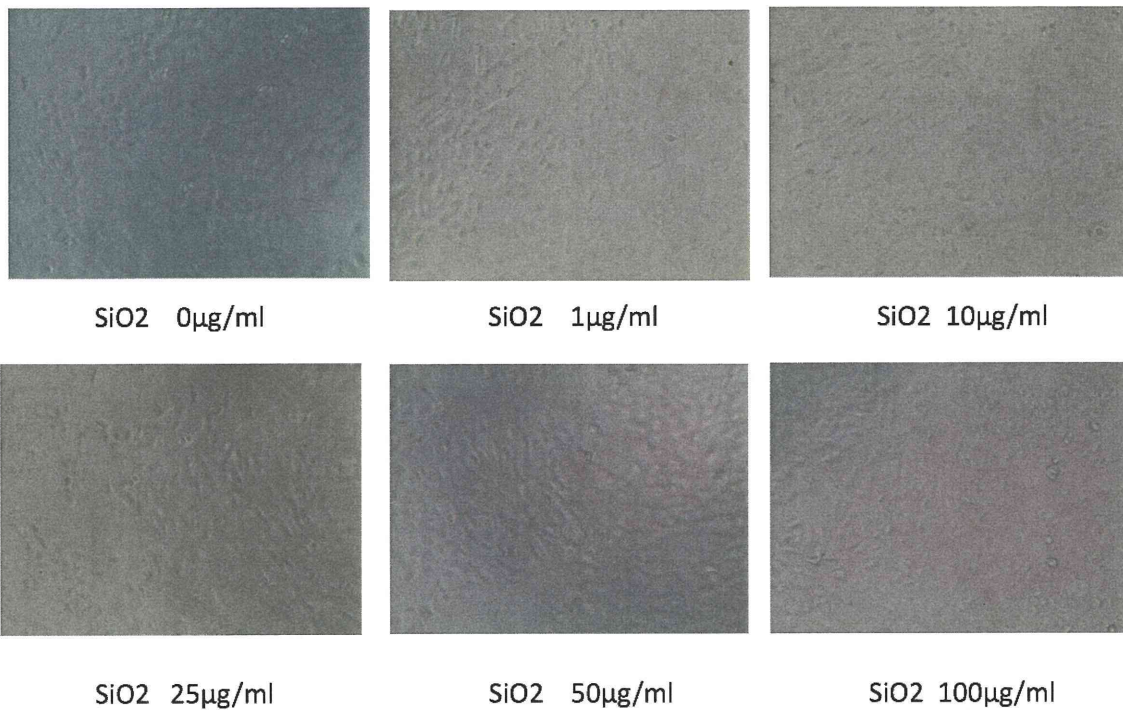


図10 A549細胞の酸化金属ナノ材料に対するMTT試験-4