

201236014A

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 24 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 伊佐間 和郎

平成 25 (2013) 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 24 年度 総括・分担研究報告書

平成 25 (2013) 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 ユニット長
中江 大	東京都健康安全研究センター 薬事環境科学部 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	47
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	68
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	80
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 ...	92
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	103
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	114
渡邊 昌俊	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	129
IV. 研究成果の刊行物・別刷	135

I. 総括研究報告

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。Tween80 及び遊星ボールミル型粉碎機を用いて、超音波破碎機よりも二次粒子径の小さい懸濁液が作成できた。NiO では二次粒子径の異なる懸濁液が作成できた。金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の各金属イオン濃度を測定した。電子顕微鏡による細胞内動態解析において、細胞障害性を有するが可能な限り低い曝露量が望ましく、細胞形態を壊さないために搔き取りによる細胞採取が必要であることが確認できた。A549 細胞を用いた小核試験において、明らかな遺伝毒性が観察されたのは酸化亜鉛のみであった。物理化学的性質の異なる酸化亜鉛において、遺伝毒性強度と細胞毒性強度には関連がなかった。酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) のヒト肺上皮細胞への毒性は、細胞死の誘導よりも細胞増殖を抑制するものであった。ZnO NPs の毒性はカルシウムにより低減され、それは細胞周期の進行を回復させるためであった。TiO₂ ナノ粒子共存下で金属塩 8 種類の細胞毒性は変化しなかったが、SiO₂ ナノ粒子共存下で AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。産地の異なるカオリンの ROS 産生量を比較したところ、RAW264.7 では kaolin-U による ROS 産生細胞数が kaolin-K に比べ約 3 倍多かったが、A549 ではどちらも低かった。A549 の ROS 産生及び DNA 損傷性は、RAW264.7 供培養下で増強された。マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにするため、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った結果、マグネタイトは明らかな発がんイニシエータ活性を発揮しなかった。非修飾磁性体ナノ粒子に比べ、カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子は、細胞内取込みが落ち、ROS 産生及び 8-OHdG 生成量が減少することを明らかにした。

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
- 戸塚ゆ加里 (独) がん研究センター研究所
発がんシステム研究分野
ユニット長
- 中江 大 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 部長
- 渡邊 昌俊 横浜国立大学 工学研究院
教授

研究協力者

- 加藤 玲子 国立医薬品食品衛生研究所
医療機器部 主任研究官
- 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
薬事環境科学部 生体影響研究科 主任研究員
- 猪又 明子 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部 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
薬事環境科学部 参事研究員

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』(2009)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。

我々は、平成 20 年度及び平成 21 年度の厚生労働省家庭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 (2009) 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。また、Xu ら (2010) 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。さらに、Cho ら (2012) 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。

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。

以下に平成 24 年度の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. 研究方法及び結果

1. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

9 種類 (10 試料) の金属酸化物ナノマテリアルについて、二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試みた。懸濁液として入手した Al_2O_3 、 CeO_2 、ITO、 SiO_2 、 TiO_2 及び ZnO (ZnO は入手先の異なる 2 種類) では、懸濁原液 (10 mg/mL) 調製時に分散剤として 0.1% (w/v) の Tween80 を添加した。懸濁原液では、Tween80 を添加した影響は認められなかったが、10%FBS-MEM で 0.2 mg/mL となるように調製した懸濁液 (Tween80 濃度: 2 mg/L) では、非添加に比べていくつかの金属酸化物ナノマテリアルで、平均粒子径及び粒径分布が粒径の小さい側にシフトした。また、粉体として入手した NiO、CuO 及び Y_2O_3 について、異なる直径 (0.05、0.1、0.5 μm) のジルコニアボール及び遊星ボールミル型湿式粉砕機を用い、Tween80 を 0.1% (w/v) 含むように懸濁原液 (10 mg/mL) を調製したところ、一部の金属酸化物ナノマテリアルで平均粒子径及び粒径分布に違いが認められ、特に NiO ではジルコニアボールの直径が小さくなると共に平均粒子径が小さくなった。10%FBS-MEM を用いて 0.2 mg/mL に調製した懸濁液 (Tween80 濃度: 2 mg/L) では直径 0.05 μm のジルコニアボールを用いた試料とそれ以外とは平均粒子径及び粒径分布に違いが認められた。分散剤 (Tween80) の添加の有無や直径の異なる

ジルコニアボールを用いた湿式粉砕を組み合わせることで、一次粒子径が同じで二次粒子径の異なる懸濁液を調製することができた。

ZnO、CuO 及び NiO について、金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の各金属イオン濃度を測定した。ZnO では入手先の異なる 2 種類で Zn イオン溶出量に違いは認められなかった。また、懸濁原液中よりも 10%FBS-MEM 中の方が Zn イオン溶出率は高かったが、ZnO が低濃度ほど Zn イオン溶出率は上昇する傾向が認められた。一方、CuO 及び NiO では、10%FBS-MEM 中の各金属イオンの溶出率は 47~56% 及び 19~20% となり、金属酸化物濃度が異なっても金属イオンの溶出率は同程度であった。

2. ナノマテリアルの細胞内動態の解析

In vitro 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討を中心に解析を行った。酸化亜鉛の暴露条件として、投与量 1~10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、細胞数 10×10^5 、固定時間 2 時間が適切であると考えられた。また、文献等の調査より、回収方法はスパーテルによる掻き取りが適切であると考えられた。これらの細胞を電子顕微鏡で観察した。トリプシン処理を行った非曝露の細胞を非処理細胞と比較したところトリプシン処理により細胞形態が変化していた。非処理の方が培養時の状態がよく保持されていたことから、トリプシン処理は細胞回収方法として適切でないことが確認された。酸化亜鉛投与により細胞ライソゾーム内と思われる箇所が高電子密度物質が存在し、細胞に取り込まれた酸化亜鉛である可能性が考えられた。投与により細胞の明らかなアポトーシスの増加などは認められなかったが、細胞の変性が認められた。

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

ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、前年度、ヒト肺がん由来細胞株 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、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、細胞毒性について評価した。本年度は細胞毒性が観察された 5 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、小核試験により遺伝毒性を評価した。その結果、明らかな遺伝毒性が観察されたのは酸化亜鉛のみであった。また、物理化学的性質の異なる 2 種類の酸化亜鉛において、細胞毒性の強度に遺伝毒性の強度は関連がなかった。酸化亜鉛の細胞毒性の発現について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として比較検討した結果、処理 3 時間目では、まず ATP 及び GSH 含量の減少が観察され、その後、ATP の減少に並行して MTT 還元能の低下が観察された。GSH 含量の減少は、ATP の減少、MTT 還元能の低下に比べて小さかった。

4. ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析

ヒト肺上皮 A549 細胞に対する酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) の細胞毒性に対する影響を調べた。A549 細胞は、増殖ステージの違いによって ZnO NPs に対する感受性が異なり、増殖ステージが後期になるほど ZnO NPs の毒性効果は緩和された。また、ZnO NPs から培地に溶出する Zn イオンの飽和濃度は約 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ であり、ZnCl₂ はこの濃度では毒性を示さないので、ZnO NPs の毒性に溶出イオンは影響していないことが示唆された。ZnO NPs の A549 に対する毒性は、細胞死を誘導するよりも細胞の増殖速度を低下させる効果の

方が大きかった。ZnO NPs の毒性に対する A549 の感受性は、培地中の FBS 濃度の影響を受けないが、カルシウム (Ca) 濃度の影響を強く受けた。培地中の Ca 濃度を高めることによって、ZnO NPs の毒性効果を緩和することができた。Ca は、ZnO NPs に曝露されていない細胞には何の影響を与えないが、ZnO NPs に曝露されている細胞に対しては細胞周期に関与する遺伝子群の発現を増加させた。それらの遺伝子が発現することにより、ZnO NPs によって低下した増殖速度を回復させていると考えられる。このような細胞増殖速度の回復効果があるのは、Ca のみであり、Mg や K では同様の回復効果は観察されなかった。

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、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、ナノマテリアルと他の化学物質との相互作用は不明である。そこで、共存する金属塩化物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、金属塩化物には、塩化アルミニウム (AlCl₃)、塩化クロム (III) (CrCl₃)、塩化銅 (I) (CuCl)、塩化銅 (II) (CuCl₂)、塩化鉄 (II) (FeCl₂)、塩化鉄 (III) (FeCl₃)、塩化ニッケル (II) (NiCl₂) 及び塩化亜鉛 (ZnCl₂) を使用した。ナノ粒子共存下における金属塩化物の細胞毒性は、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。また、ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂ を曝露した V79

細胞の銅及び亜鉛の取り込み量は、ICP-MS法を用いて測定した。その結果、SiO₂ ナノ粒子が共存すると、AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。一方、TiO₂ ナノ粒子が共存しても、AlCl₃、CrCl₃、CuCl、CuCl₂、FeCl₂、FeCl₃、NiCl₂ 及び ZnCl₂ の細胞毒性強度は変化しなかった。また、SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。一方、TiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl₂ 及び ZnCl₂ を曝露しても、細胞内への銅及び亜鉛の取り込み量は変化しなかった。これらのことから、SiO₂ ナノ粒子は、共存する一部の金属塩化物の細胞内取り込み量を増加させることによって、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

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。本研究では、ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性のメカニズムを化学的及び生物学的に追究することにより、これらナノマテリアルによって誘発される遺伝毒性は何に起因するのか、例えばマテリアル自身の物理的あるいは化学的な性質によるものなのか、または宿主側の生物学的な応答性の問題なのかについて検討した。

昨年度の研究結果で、産地の異なるカオリン (kaolin-K (韓国産) 及び kaolin-U (米国産)) のマウス肺に対する DNA 損傷性に違いがあることがわかり、この毒性

の違いは各々のカオリンの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。そこで今年度は、産地の異なるカオリンの遺伝毒性の違いが何に起因するのかを調べるため、*in vitro* における、各カオリンの ROS 産生量を比較した。また、*in vivo* を模倣した各細胞の培養系を構築して、実質細胞にもたらされるカオリンの影響を検討した。その結果、肺胞上皮細胞である A549 では細胞内にカオリンを取込んでいるにもかかわらず ROS を産生している細胞はほとんどみられなかったが、マクロファージ様細胞の RAW264 ではカオリンの取込みと相関して ROS 産生細胞が増加していた。更に、A549 及び RAW264 を同一培地内で共培養した、*in vivo* mimic system において、RAW264 のみにカオリンを曝露し、A549 にもたらされる影響を解析したところ、ROS 産生細胞及び DNA 損傷が顕著に誘導されることがわかった。また、カオリンの曝露により、RAW264 から炎症性サイトカインの放出も促され、かつ、その分泌量は Kaolin-K に比べ Kaolin-U で亢進していることがわかった。これらの結果から、カオリンの遺伝毒性メカニズムとして、これらマテリアルがマクロファージに取り込まれることに起因して、周囲の実質細胞に遺伝毒性が誘導されていると推測した。また Kaolin の原産地による毒性の違いは、RAW264 細胞への取込み量に起因しているものと推察した。

7. ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価

本研究は、ナノマテリアルの遺伝毒性低減化のための *in vivo* 評価を目的として遂行している。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、また、体内動態及び排泄についての評価を行い、その中で肺に対する発がん性を有することが懸念された。本年度は、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにする目的で、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った。試験は、当センター動物飼育施設内のナノ物質取扱いエリアにおいて、当センターのナノマテリアルの取扱いに関する作業規定及び試験管理マニュアルに従って、F344/DuCrIj 系ラット（10 週齢）に、マグネタイトを 0（対照群）・5 mg/kg 体重（投与群）の用量でスプレー投与器により週 1 回計 4 回気管内投与した後、 γ -オリザノール（1%混餌）あるいはグリセロール（8%混水）による 32 週間の肺発がんプロモーション処置を施し、肺における腫瘍性病変の発生を病理組織学的に検索した。その結果、マグネタイト投与群ラットの肺においては、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの肺胞腔への浸潤・炎症細胞浸潤・II 型肺胞上皮の腫大などを認めたが、肺の増殖性病変の発生を認めなかった。 γ -オリザノールあるいはグリセロールは、これらの変化に対して顕著な影響を与えなかった。以上の結果より、マグネタイトは、明らかな肺発がんイニシエータ活性を有しないものと示唆された。

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事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。本研究では、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。私用したナノ粒子は Fe_3O_4 （ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ ）及びカルボキシル基、ポリエチレンイミン、プルロニックで修飾した $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を用いて、*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、活性酸素種（ROS）の測定の解析である。まず、これら表面修飾を行った $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の溶媒（培養液、PBS、蒸留水）における分散能を検討したところ、表面修飾により分散能の安定性が高まる場合もあるが、溶媒、とくに FBS 等の成分に影響される事が認められた。遺伝毒性の指標としての 8-OHdG 測定を行い、カルボキシル基修飾の $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ は濃度依存的に増加するも、非修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ に比べて明らかに低下している事を認めた。また、カルボキシル基修飾 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ はほとんど ROS を産生しない事を認めた。細胞生存率に関しては、今回新たにポリエチレンイミン及びプルロニック修飾の場合について解析を行ったが、ポリエチレンイミンが曝露量に依存して細胞生存率が有意に低下する事を認めた。これらの結果より、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の表面修飾により細胞毒性、遺伝毒性の低減あるいは増強の可能性が示唆された。

C. 結論

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析では、Tween80 及び遊星ボールミル型粉碎機を用いて、NiO や CuO 等では超音波破碎機よりも二次粒子径の小さい懸濁液が作成できた。NiO では異なる径のジルコニアボールを用いて二次粒子径の異な

る懸濁液が作成できた。ナノマテリアルの細胞内動態の解析では、電子顕微鏡による細胞内動態解析において、細胞障害性を有するが可能な限り低い曝露量が望ましく、細胞形態を壊さないために搔き取りによる細胞採取が必要であることが確認できた。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、A549 細胞を用いた小核試験において、明らかな遺伝毒性が観察されたのは酸化亜鉛のみであった。物理化学的性質の異なる酸化亜鉛において、遺伝毒性強度と細胞毒性強度には関連がなかった。ナノマテリアル暴露による網羅的遺伝子発現解析では、酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) のヒト肺上皮細胞への毒性は、細胞死の誘導よりも細胞増殖を抑制するものであった。ZnO NPs の毒性はカルシウムにより低減され、それは細胞周期の進行を回復させるためであった。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、TiO₂ ナノ粒子共存下で金属塩 8 種類の細胞毒性は変化しなかったが、SiO₂ ナノ粒子共存下で AlCl₃、CuCl 及び CuCl₂ の細胞毒性強度は増強した。SiO₂ ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl₂ を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加した。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の ROS 産生量を比較したところ、RAW264.7 では kaolin-U による ROS 産生細胞数が kaolin-K に比べ約 3 倍多かったが、A549 ではどちらも低かった。A549 の ROS 産生及び DNA 損傷性は、RAW264.7 供培養下で増強された。ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化の *in vivo* 評価では、マグネタイトの肺発がんイニシエータ活性の有無と背景機構を明らかにするため、ラット 2 段階肺発がんモデルを用いた検索を行った結果、マグネタイトは明らかな発がんイニシエータ活性を

揮しなかった。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、非修飾磁性体ナノ粒子に比べ、カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子は、細胞内取込みが落ち、ROS 産生及び 8-OHdG 生成量が減少することを明らかにした。

D. 健康危険情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 河上強志、伊佐間和郎、中島晴信、吉田仁、大嶋智子、大野浩之、上村仁、塩田寛子、菊地洋子、松岡厚子、西村哲治：有害物質を含有する家庭用品の規制に関する法律（有害物質含有家庭用品規制法）におけるトリフェニル錫（TPT）及びトリブチル錫（TBT）の試験法改定に係わる検討、薬学雑誌、132、1197-1208（2012）
- 2) Kawakami T, Isama K, Nishimura T: Survey of primary aromatic amines originating from azo dyes in commercial textile products in direct contact with skin and in commercial leather products in Japan. *J. Environ. Chem.*, 22, 197-204 (2012)
- 3) Kawakami T, Isama K, Nishimura T: Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan. *J. Environ. Chem.*, 22, 205-211 (2012)
- 4) 大嶋智子、河上強志、山野哲夫、尾崎麻子、清水充、伊佐間和郎：有害物質含有家庭用品規制法のトリフェニル錫（TPT）およびトリブチル錫（TBT）分析法改定過程において観察された TPT の分解について、大阪市立環科研報告、74、17-22（2012）

- 5) 河上強志、伊佐間和郎、松岡厚子、西村哲治：防カビ剤として用いられたフマル酸ジメチルによる接触皮膚炎、*J. Environ. Dermatol. Cutan. Allergol.*, 6, 339-350 (2012)
- 6) 河上強志：フラーレンが植物による土壌中の疎水性化合物の吸収を促進させる？、*ファルマシア*, 49, 252 (2013)
- 7) Fujimoto N, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Ozawa S, Gamou T, Nemoto K, Degawa M: Estrogen and androgen receptor status in hepatocellular hypertrophy induced by phenobarbital, clofibrate, and piperonyl butoxide in F344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 37(2), 281-286 (2012)
- 8) Ozawa S, Gamou T, Habano W, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Nemoto K, Degawa M: Altered expression of GADD45 genes during the development of chemical-mediated liver hypertrophy and liver tumor promotion in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36(5), 613-623 (2012)
- 9) Nemoto K, Tanaka T, Ikeda A, Ito S, Mizukami M, Hikida T, Gamou T, Habano W, Ozawa S, Inoue K, Yoshida M, Nishikawa A, Degawa M: Super-induced gene expression of the N-methyl-D-aspartate receptor 2C subunit in chemical-induced hypertrophic liver in rats. *J. Toxicol. Sci.*, 36(5), 507-514 (2012)
- 10) Xu M, Li J, Fujita D, Su H, Chen H, Hanagata N: Formation of nano-bio-complex as nanomaterials dispersed in a biological solution for understanding nanobiological interaction. *Scientific Reports*, 2, 406 (2012)
- 11) Xu L, Li X, Takemura T, Hanagata N, Wu G, Chou LL: Genotoxicity and molecular response of silver nanoparticle (NP)-based hydrogel. *Journal of Nanobiotechnology*, 10, 16 (2012)
- 12) Zhuang F, Hanagata N: Synergic toxicity of solid particles and released zinc from zinc oxide nanoparticles to human lung epithelial cells. *Nano Biomedicine*, 4, 85-97 (2012)
- 13) Sawada R, Kono K, Isama K, Haishima Y, Matsuoka A: The effect of calcium ions incorporation into titanium surface by chemical treatment on osteogenic differentiation of human mesenchymal stem cells, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.
- 14) Haishima Y, Isama K, Fukui C, Yuba T, Matsuoka A: A development and biological safety evaluation of novel PVC medical devices with surface structures modified by UV irradiation to suppress plasticizer migration, *Journal of Biomedical Materials Research: Part A*, in press.
- 15) 伊佐間和郎、河上強志、西村哲治：乳幼児が誤飲する可能性のある金属製アクセサリーからの有害 8 元素の溶出、*薬学雑誌*, 132, 959-968 (2012)

- 16) Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, Goto S, Masuda S, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Matsuda T, Watanabe M, Wakabayashi K: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay system. *Nanotoxicology*, 7, 452-61 (2013)
- 17) Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Yamamoto M, Takahashi-Nakaguchi A, Fukuda H, Ono M, Takamura-Enya T, Kinashi H, Totsuka Y: ADP-ribosylation of guanosine by SCO5461 protein secreted from *Streptomyces coelicolor*. *Toxicon*, in press.
- 18) Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H: Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett.*, in press.
- 19) Lin Y, Totsuka Y, He Y, Kikuchi S, Qiao Y, Ueda J, Wei W, Inoue M, Tanaka H: Comparative epidemiology of esophageal cancer between Japan and China. *J. Epidemiol.*, in press.
- 20) 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)
- 21) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H: Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Science*, 103, 2045-2050 (2012)
- 22) Tada Y, Yano N, Takahashi H, Yuzawa K, Ando H, Kubo Y, Nagasawa A, Ogata A, Nakae D: Acute phase pulmonary responses to the single intratracheal spray instillation of magnetite (Fe_3O_4) nanoparticles in Fischer 344 rats. *Journal of Toxicologic Pathology*, 25, 233-239 (2012)
- 23) Sato A, Itcho N, Ishiguro H, Okamoto D, Kobayashi N, Kawai K, Kasai H, Kurioka D, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M: Magnetic nanoparticles of Fe_3O_4 enhance docetaxel-induced prostate cancer cell death. *Int. J. Nanomed.*, in press.
- 24) 渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、栗岡大輔：前立腺がん化学療法における磁性体ナノ粒子の効果、日本磁気学会第 187 回研究会資料、7-11 (2012)
- 25) 栗岡大輔、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大樹、渡邊昌俊：前立腺がん化学療法への磁性体ナノ粒子の応用、*化学工業*、64(3)、67-73 (2013)

2. 学会発表

- 1) Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts, The 48th Congress of the European Societies of Toxicology (Stockholm, 2012.6)
- 2) 伊佐間和郎、河上強志、酒井恵子、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼすナノマテリアルの影響、第39回日本毒性学会学術年会（仙台、2012.7）
- 3) Isama K, Kawakami T, Sakai K, Miyajima A, Matsuoka A: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal salts, European Society of Toxicology in Vitro 2012 International Conference (Lisbon, 2012.10)
- 4) 伊佐間和郎、河上強志、酒井恵子、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼすナノ粒子の影響、第49回全国衛生化学技術協議会年会（高松、2012.11）
- 5) Miyajima-Tabata A, Sakai K, Kawakami T, Kato R, Matsuoka A, Isama K: Cytotoxicity and genotoxicity studies in A549 cells cultured with metal oxide nanoparticles, 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Antonio, 2013.3)
- 6) 宇佐見誠、満長克祥、入江智彦、宮島敦子、関野祐子：培養ラット胚におけるエタノールによる発生毒性のプロテオミクス解析、第52回日本先天異常学会学術集会（東京、2012.7）
- 7) Miyajima-Tabata A, Sakai K, Kato R, Matsuoka A: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers, The 48th Congress of the European Societies of Toxicology (Stockholm, 2012.6)
- 8) Zhuang F, Hanagata N: Response of human lung epithelial cells to the toxicity of zinc oxide nanoparticles. 第6回ナノバイオメディカル学会大会（つくば、2012.7）
- 9) 伊佐間和郎：ナノマテリアルの in vitro 安全性評価のための基礎研究—金属酸化物ナノ粒子に対する細胞応答—、日本薬学会第133年会（横浜、2013.3）
- 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, The 6th International Conference on Environmental Mutagens in Human Populations (Doha, 2012.3)
- 11) 戸塚ゆ加里、石野孔祐、若林敬二、渡辺哲志、中釜 斉：メイラード反応生成物、アミノベンゾアゼピノキノリン (ABAQ) の in vivo 変異原性と生体内における生成、第71回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 12) 石野孔祐、戸塚ゆ加里、武藤倫弘、中釜 斉：ヒト白血球を用いた肥満関連DNA付加体の網羅的解析、第71回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）

- 13) Ishino K, Sekine A, Goto S, Nakagama H, Totsuka Y: Analysis of DNA damage induced by nanomaterials using comprehensive analysis of DNA adducts (DNA adductome analysis), 3rd Asian Conference on environmental mutagens (Hangzhou, 2012.10)
- 14) Totsuka Y, Ishino K, Wakabayashi K, Watanabe T, Masuda S, Nakagama H: In vivo mutagenicity and formation of a Maillard reaction product, aminobenzoazepinoquinoline derivative (ABAQ), 3rd Asian Conference on environmental mutagens (Hangzhou, 2012.10)
- 15) 戸塚ゆ加里：ナノマテリアルの遺伝毒性発現メカニズム、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 16) 戸塚ゆ加里、石野孔祐、松島芳隆、中釜 斉：ハロゲン系炭化水素由来の DNA 付加体の解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 17) 石野孔祐、関根彬弘、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里：DNA 付加体の網羅的解析による新規付加体の探索、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 18) 堺澤絢、後藤純雄、若林敬二、渡辺徹志、中釜 斉、戸塚ゆ加里：トリプトファンとグルコースのメイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の in vivo 変異原性、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 19) 大野絢、中野毅、中釜 斉、松島芳隆、布柴達男、戸塚ゆ加里：ゲノム中に存在する DNA 付加体の免疫沈降法を用いた濃縮法、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 20) 関根彬弘、石野孔祐、後藤純雄、中釜 斉、戸塚ゆ加里：マグネタイト（MGT）により誘発される DNA 付加体のアダクトーム解析、第 41 回大会 日本環境変異原学会（静岡、2012.11）
- 21) 坂本義光、小縣昭夫、前野智和、西村哲治、広瀬明彦、小杉有希、鈴木俊也、中江大：ラットによる 5 種の多層カーボンナノチューブの腹腔内中皮腫発生に関する検討、第 39 回日本毒性学会学術年会（仙台、2012.7）
- 22) 藤谷知子、大山謙一、広瀬明彦、西村哲治、中江大、小縣昭夫：マウスにおける多層カーボンナノチューブの催奇形性について、第 39 回日本毒性学会学術年会（仙台、2012.7）
- 23) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、中江大：5 種の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のラット腹腔内投与による中皮腫の誘発、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 24) 中江大、坂本義光、藤谷知子、多田幸恵、齋藤育江、保坂三継、猪又明子、小縣昭夫：ナノマテリアルの発がん性、日本環境変異原学会第 41 回大会（静岡、2012.11）
- 25) 坂本義光、小縣昭夫、西村哲治、広瀬明彦、猪又明子、中江大：ラットにおける多層カーボンナノチューブによる中皮腫誘発性に繊維長が及ぼす影響、第 29 回日本毒性病理学会（つくば、2013.1）

- 26) 多田幸恵、矢野範男、高橋 博、湯澤勝廣、安藤弘、久保喜一、長澤明道、猪又明子、小縣昭夫、中江大： γ -オリザノール/グリセロール併用投与が磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす影響、第 29 回日本毒性病理学会（つくば、2013.1）
- 27) Sato A, Kurioka D, Ishiguro H, Uemura H, Kubota Y, Watanabe M: Synergistic effect of magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells in vitro, AACR (Chicago, 2012.3)
- 28) Hamanaka Y, Nittami T, Takezawa T, Watanabe M: Application of a culture model utilizing substrata made of tissue/organ sections for histopathology in cancer behavior diagnosis, Symposium on New Technology for Cell-based Drug Assay (Tokyo, 2012.12)
- 29) Nittami T, Speirs L, Tucci J, Watanabe M, Seviour RJ: False positive identification due to FISH probe hybridization to sites with single base deletions may overestimate the abundance of some filamentous bacterial morphotypes, including those belonging to the candidate division TM7, The 14th International Symposium on Microbial Ecology (Copenhagen, 2012.8)
- 30) 渡邊昌俊：肝臓組織切片共培養における前立腺癌細胞 DU145 の挙動、第 101 回日本病理学会総会（東京、2012.4）
- 31) 渡邊昌俊、広川佳史、白石泰三：ヒト前立腺癌細胞における plk2 遺伝子の機能について、第 101 回日本病理学会総会（東京、2012.4）
- 32) 上大介、高橋慎、豊田雅士、関澤隆一、松原弘明、渡邊昌俊、梅澤明弘、五條理志：iPS 細胞の早期・効率的取得を目指したキャピラリー等電点電気泳動、第 11 回日本再生医療学会総会（横浜、2012.6）
- 33) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片を利用した培養システムのがん研究への応用、第 31 回分子病理学研究会・恵那シンポジウム（恵那、2012.7）
- 34) 濱中祥弘、竹澤俊明、渡邊昌俊：組織切片基質での培養系における前立腺癌細胞の挙動について、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 35) 佐藤明子、諸橋彩香、岩崎有由美、石黒斉、植村博司、窪田吉信、渡辺昌俊：磁性体ナノ粒子は前立腺癌に対するドセタキセルの効果を増強する、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 36) 岡本大樹、深井瑛美、岩崎有由美、佐藤明子、白石泰三、河井伊一明、葛西宏、石黒斉、渡辺昌俊：前立腺癌におけるカルボキシル基就職磁性体ナノ粒子とドセタキセルの併用効果、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 37) 諸橋彩香、佐藤明子、岩崎有由美、河井一明、葛西宏、石黒斉、古林直人、渡辺昌俊：磁性体ナノ粒子が曝露したがん細胞における抗酸化酵素遺伝子および活性酸素種酸性の変化について、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）

- 38) 讚良茂浩、菅原健太郎、石黒斉、白石泰三、高木陽光、古林直人、渡辺昌俊：前立腺がんの抗癌剤抵抗性への Plk2 遺伝子の関与について、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 39) 工藤祐子、原田博美、藤森浩彰、小泉史明、田村研治、渡辺昌俊、益谷美都子：Dot-blot 法による薬力学的マーカーとしての PARP 活性測定系の基礎的検討、第 71 回日本癌学会学術総会（札幌、2012.9）
- 40) 小坂俊仁、芳野純治、乾和郎、若林貴夫、小林隆、三好広尚、服部信幸、友松雄一郎、山本智支、成田賢生、鳥井淑敬、森智子、林繁和、白石泰三、山本隆行、渡邊昌俊：潰瘍性大腸炎高齢発症例と NQO1 遺伝子多型との関連、第 51 回日本消化器病学会大会（神戸、2012.10）
- 41) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三：病理組織片を用いた細胞培養法の応用、第 59 回日本臨床検査医学会学術集会（京都、2012.11）
- 42) 栗岡大輔、渡邊昌俊、横田淳、中釜斉、土屋直人：p53 変異大腸がん細胞における NEK9 抑制を介した miR-22 増殖抑制機構、第 35 回日本分子生物学会年会（福岡、2012.12）
- 43) 西田百代、藤原優子、渡邊昌俊、横田淳、中釜斉、土屋直人：miR-101 による p53 経路の選択的活性化機構、第 35 回日本分子生物学会年会（福岡、2012.12）
- 44) 渡邊昌俊、佐藤明子、岩崎有由美、深井瑛美、岡本大機、栗岡大輔：前立腺がん化学療法に置ける磁性体ナノ粒子の効果、日本磁気学会第 187 回研究会（東京、2012.12）
- 45) 濱中弘、岡本愛、渡邊昌俊、竹澤俊明：コラーゲンビトリゲル膜チャンバー内に再構築したヒト血管内皮組織シートのパリア機能、日本薬学会第 133 年会（横浜、2013.3）
- 46) 工藤祐子、原田博美、藤森浩彰、渡邊昌俊、益谷美都子：生体試料における poly(ADP-ribose) 測定系の検討、日本薬学会第 133 年会（横浜、2013.3）
- F. 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

II. 分担研究報告

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

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

9 種類（10 試料）の金属酸化物ナノマテリアルについて、二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製を試みた。懸濁液として入手した Al_2O_3 、 CeO_2 、ITO、 SiO_2 、 TiO_2 および ZnO （ ZnO は入手先の異なる 2 種類）では、懸濁原液（10 mg/mL）調製時に分散剤として 0.1%（w/v）の Tween80 を添加した。懸濁原液では、Tween80 を添加した影響は認められなかったが、10%FBS-MEM で 0.2 mg/mL となるように調製した懸濁液（Tween80 濃度: 2 mg/L）では、非添加に比べていくつかの金属酸化物ナノマテリアルで、平均粒子径および粒径分布が粒径の小さい側にシフトした。また、粉体として入手した NiO 、 CuO および Y_2O_3 について、異なる直径（0.05、0.1、0.5 mm）のジルコニアボールおよび遊星ボールミル型湿式粉碎機を用い、Tween80 を 0.1%（w/v）含むように懸濁原液（10 mg/mL）を調製したところ、一部の金属酸化物ナノマテリアルで平均粒子径および粒径分布に違いが認められ、特に NiO ではジルコニアボールの直径が小さくなると共に平均粒子径が小さくなった。10%FBS-MEM を用いて 0.2 mg/mL に調製した懸濁液（Tween80 濃度: 2 mg/L）では直径 0.05 mm のジルコニアボールを用いた試料とそれ以外とでは平均粒子径および粒径分布に違いが認められた。分散剤（Tween80）の添加の有無や直径の異なるジルコニアボールを用いた湿式粉碎を組み合わせることで、一次粒子径が同じで二次粒子径の異なる懸濁液を調製することができた。今後、Tween80 が *in vitro* 試験に及ぼす影響を検討した上で、二次粒子径の異なる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液を用いた *in vitro* 試験を行う予定である。

ZnO 、 CuO および NiO について、金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の各金属イオン濃度を測定した。 ZnO では入手先の異なる 2 種類で Zn イオン溶出量に違いは認められなかった。また、懸濁原液中よりも 10%FBS-MEM 中の方が Zn イオン溶出率は高かったが、 ZnO が低濃度ほど Zn イオン溶出率は上昇する傾向が認められた。 CuO および NiO では、10%FBS-MEM 中の各金属イオンの溶出率は 47~56% および 19~20% となり、金属酸化物濃度が異なっても金属イオンの溶出率は同程度であった。今後、より詳細な検討を行い *in vitro* 試験結果と比較していく予定である。

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、