

電顕用標本作製条件の検討 CKナノテック

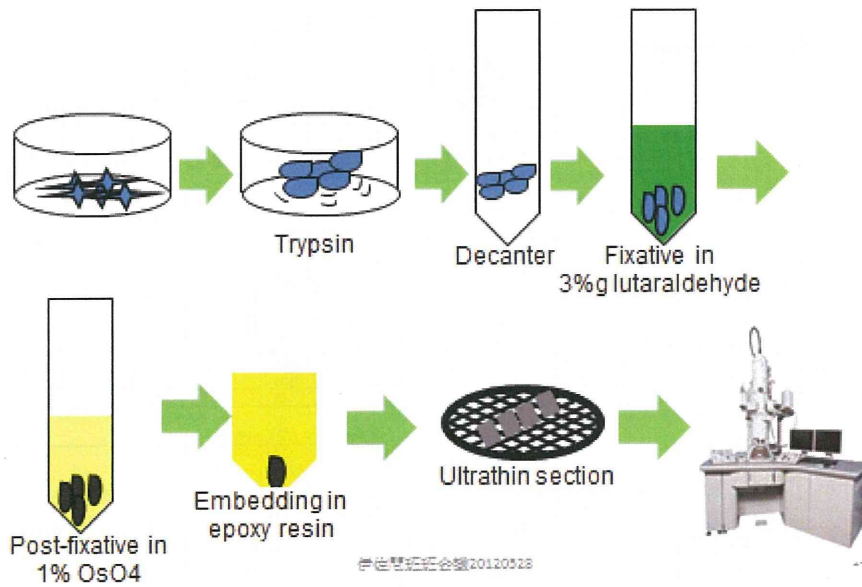


図3 電顕用標本作製条件の検討 CK ナノテック

電顕用標本作製条件の検討 CKナノテック

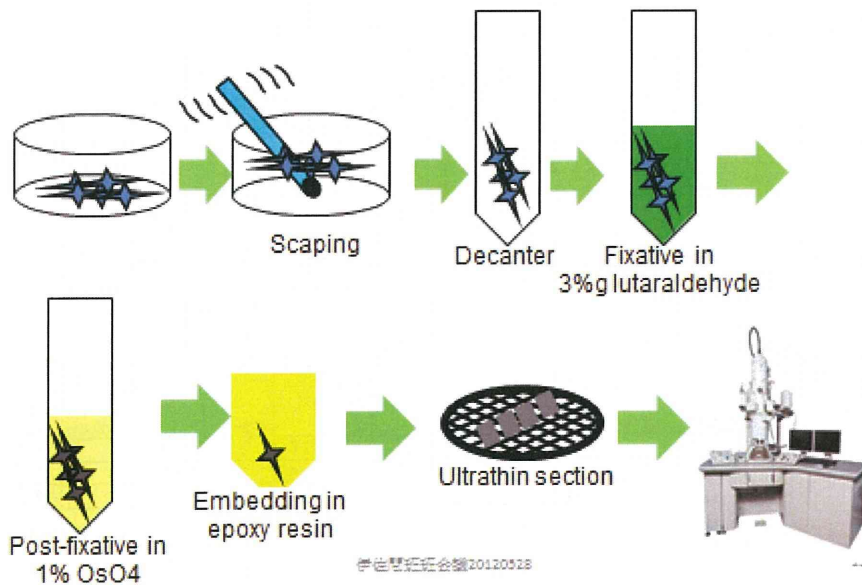
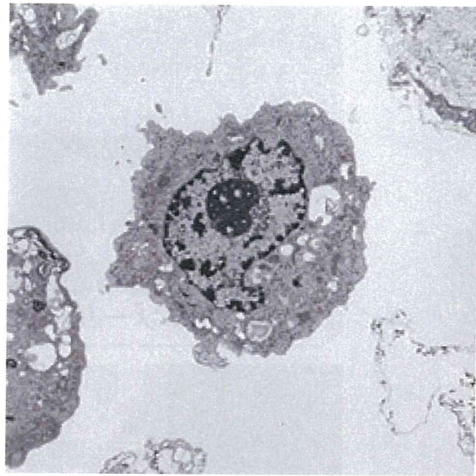
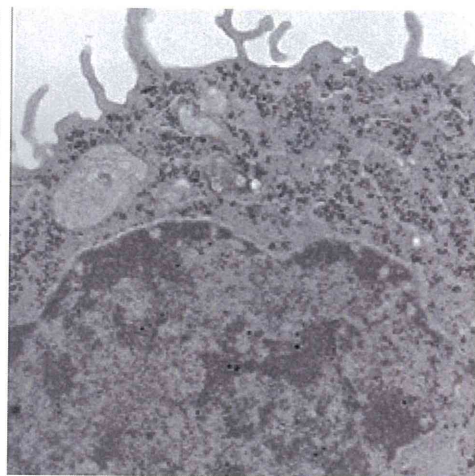


図4 電顕用標本作製条件の検討 CK ナノテック

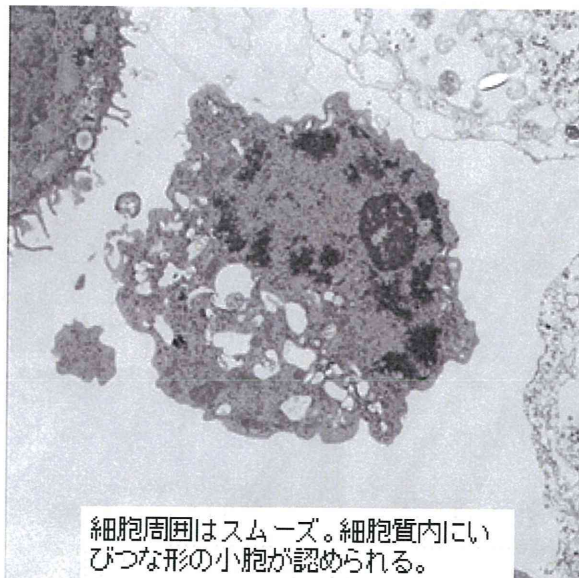


細胞周囲がスムーズな細胞。細胞質に少数の小胞がある以外は、核および細胞質内は比較的正常構造を保っていると思われる



細胞周囲には少数の突起が認められる。リボゾームがよく発達している。核は正常。

写真1 トリプシン処理 曝露なし



細胞周囲はスムーズ。細胞質内にいびつな形の胞が認められる。



小胞野中には時々層板状の構造が認められる



リボゾームがよく発達している

写真2 トリプシン処理 曝露なし

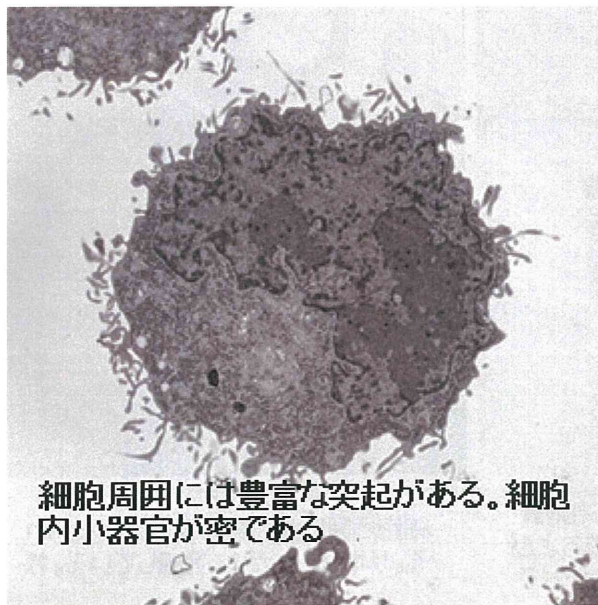


写真3 トリプシン処理なし
曝露なし

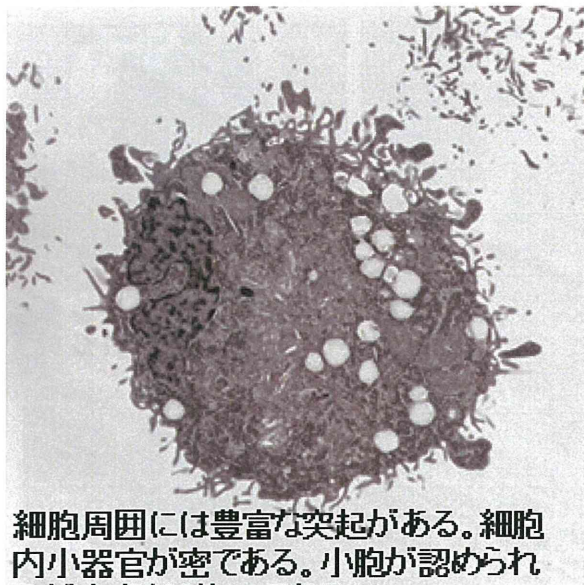
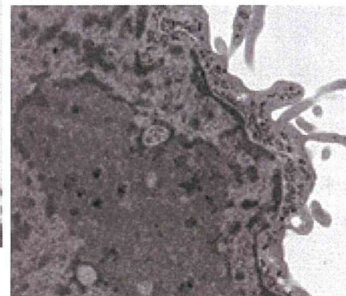
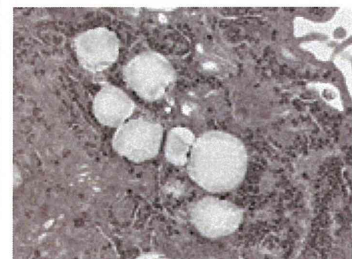
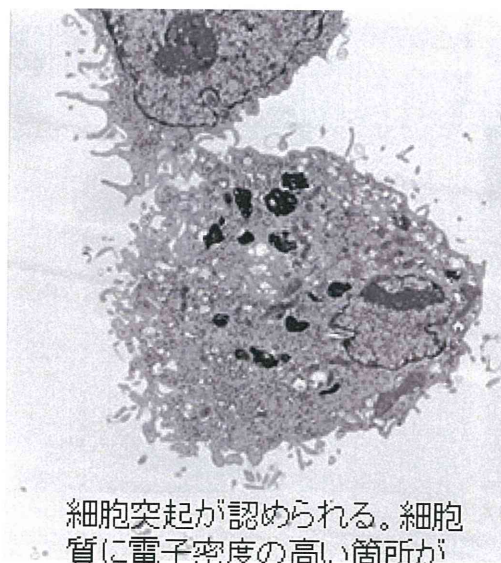
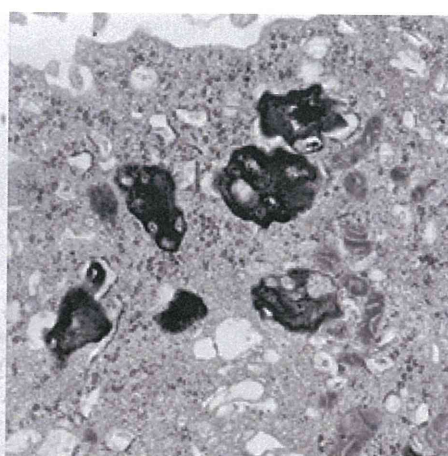


写真4 トリプシン処理なし
曝露なし





細胞突起が認められる。細胞質に電子密度の高い箇所が散見される。核はほぼ正常

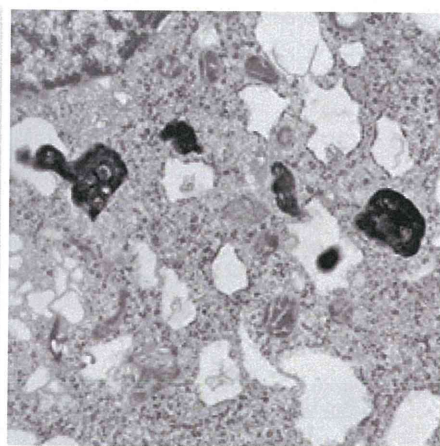


細胞質に電子密度の高い箇所。ライソゾーム内に存在すると思われる。

写真5 トリプシン処理 曝露群

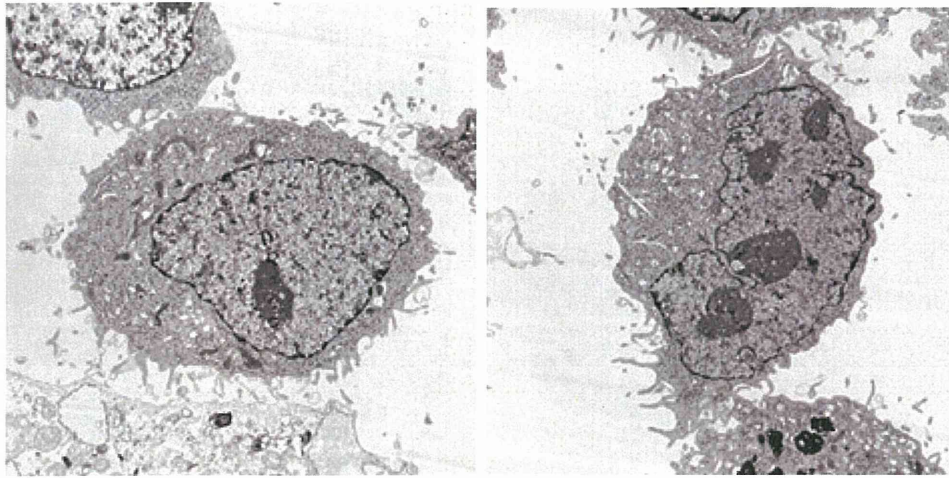


豊富ではないが、細胞突起が認められる。細胞質に種々の大きさのいびつな形の小胞が認められる。電子密度の高い箇所が数か所散見される。核はほぼ正常

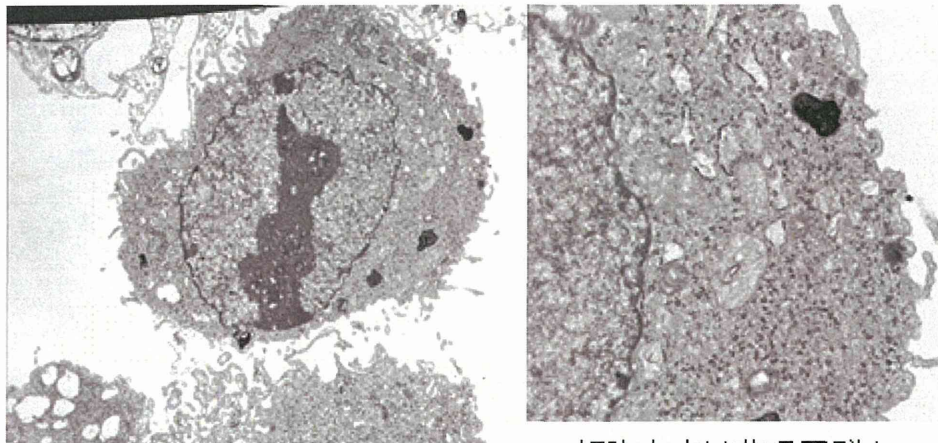


細胞質内のリボゾームは豊富ではない。また種々の大きさのいびつな形の小胞が認められる。電子密度の高い箇所が数か所散見される。核はほぼ正常

写真6 トリプシン処理 曝露群



ほぼ非曝露群と類似の細胞も散見された
 写真7 トリプシン処理 曝露群



豊富ではないが、細胞突起が認められる。細胞密度は非曝露群より低い。小胞が認められる。電子密度の高い箇所が数か所散見される。核はほぼ正常

細胞密度は非曝露群より低い。電子密度の高い箇所が数か所散見される。

写真8 トリプシン非処理群 曝露群

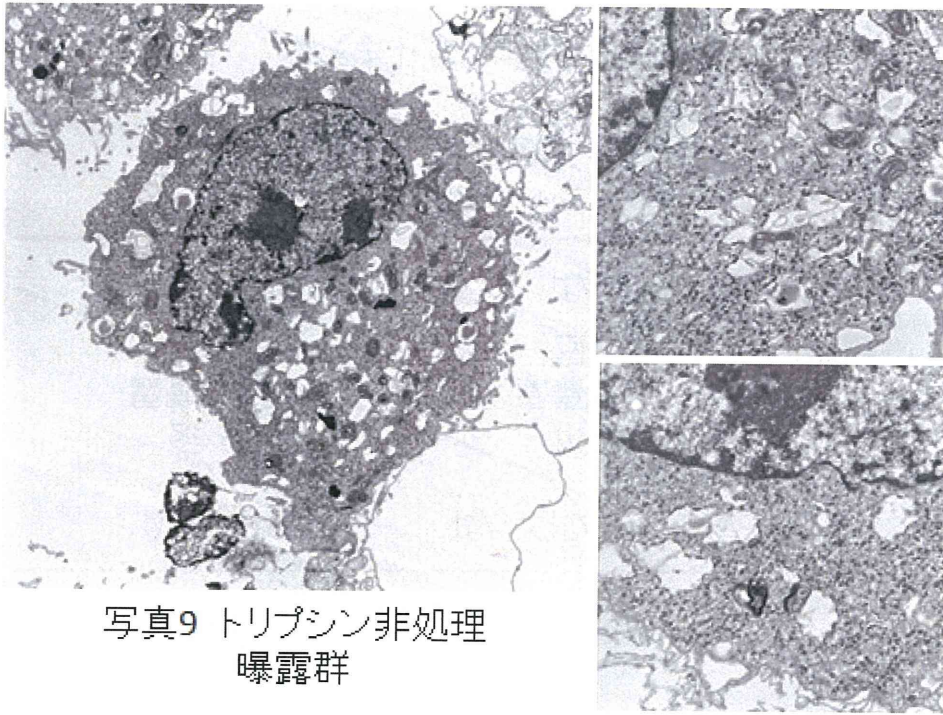
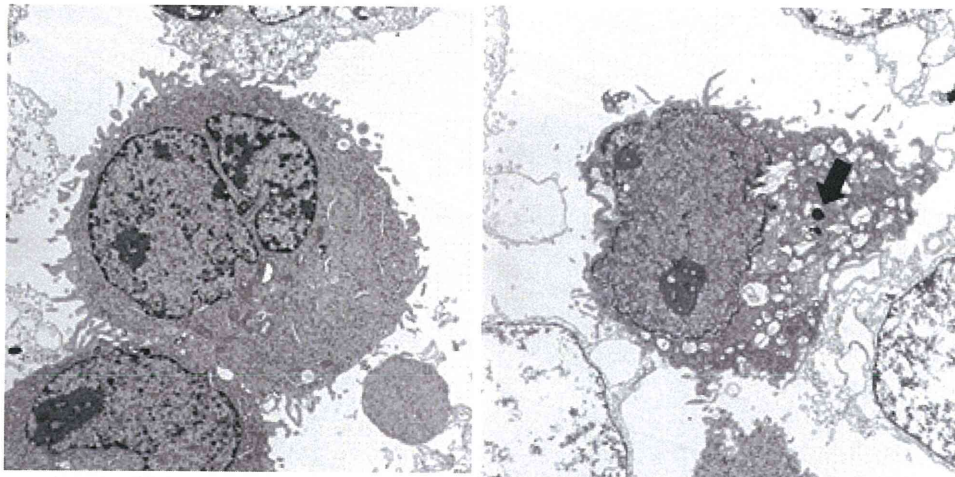


写真9 トリプシン非処理
曝露群



ほぼ非曝露群と類似の豊富な細胞突起と密な細胞質を有する細胞も散見された

細胞内の空胞化が著しく、リボゾームも減少している。わずかだが、電子密度の高い箇所が存在する(→)

写真10 トリプシン非処理 曝露群

表1

超微形態学的変化まとめ

トリプシン処理	非曝露群		曝露群	
	あり	なし	あり	なし
細胞周囲突起	なし/減少	あり	減少	減少
細胞内小器官	密	密	減少	減少
リボゾーム	豊富	豊富	豊富	豊富
小胞	少	少	多	多
ライソゾーム内 高電子密度	なし	なし	あり	あり

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 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
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 主任研究官
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

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。今後、遺伝子発現解析、細胞内動態についての解析を進める。また、酸化亜鉛以外のナノマテリアルについても物理化学的状態の異なる懸濁液を用いて、細胞毒性の違いについて解析を進め、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について明らかにする。

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、十分にキャラクター化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。

初年度は、ナノマテリアルの *in vitro* 生

体影響評価系として、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、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、コロニー法、MTT 法により細胞毒性を評価した。本年度は、まず、A549 細胞のクローニングを行い、染色体数の揃っている株を用いて、前年度の細胞毒性試験において毒性が観察された ITO, CuO, Y₂O₃, ZnO, NiO の 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。また、

物理化学的性質の異なる ZnO の細胞毒性発現について、いくつかの指標を用いて細胞毒性発現メカニズムについて解析を進めた。

B. 研究方法

1) 材料

A549 細胞を用いた酸化金属ナノマテリアルの細胞毒性、遺伝毒性評価においては、初年度の細胞毒性試験において毒性が観察された、酸化インジウムスズ ITO, 酸化銅 CuO, 酸化イットリウム Y₂O₃ (以上 CIK NanoTeK), 酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び Alfa Aesar), 酸化ニッケル NiO (Sigma-Aldrich)を用いた。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 (研究研究者・河上の報告参照)。

2) 細胞株及び培養方法

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。細胞は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS), 1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO) 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。細胞株は、3-4 日ごとに継代した。

3) A549 細胞のクローニング

細胞のクローニングは、コロニー分離法及び希釈法により行った。コロニー分離法では、φ60 mm プレートに細胞を 10 または 20 cells 播種し、1-2 週間後、形成されたコロニーを底部にワセリンを塗布したリングで囲み、リング内のみをトリプシン処理し、クローンをピックアップした。希釈法では、96-well plate に 0.5 cells / 100μL / well 播種し (1 well に細胞が 0 または 1 個

播種)、1 個の細胞から増殖した細胞をストックした。各方法で 12 クローンずつを凍結保存し、そのうちの 6 株について、染色体本数の確認、細胞増殖、ZnO(Alfa)に対する MTT 試験を行った。

4) A549 細胞の染色体数計測試験

A549 細胞 (1 × 10⁵ cells) を φ60 mm プレートに播種し、2 日間培養後、コルセミド (最終濃度 0.2 μg/mL) (GIBCO)を添加し 2 時間培養した。トリプシン処理により細胞を回収し、低張処理 (75 mM 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後、スライドグラスに滴下し、染色体観察用標本を作製した。標本はギムザ液で染色し、分裂中期像を撮影し、各株 50 像について染色体の本数をカウントした。

5) 増殖試験

6-well プレートに、クローニングした A549 細胞を播種し (2 × 10⁴ cells/ 2 mL)、10% 非働化 FBS、1% NEAA 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。

6) 細胞毒性試験・MTT 法

A549 細胞を 96-well プレートに播種し (5 × 10³ cells/ well)、24 時間後に被験液を添加し、3, 6, 24 及び 48 時間培養した。培地を除去後、100 μL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 μL 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。

7) 遺伝毒性試験・小核試験

A549 細胞 (1×10^5 cells) を $\phi 60$ 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。A549 細胞を低張処理 (75 mM 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、小核観察用標本を作製した。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。

8) 細胞内 ATP 量の測定

A549 細胞を 96-well 白色プレートに播種し (5×10^3 cells/ well)、24 時間後に被験液を添加し、3, 6, 24 及び 48 時間培養した。プレートを 30 分間室温平衡化させた後、50 μ L の CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。

9) 細胞内 GSH 含量の測定

A549 細胞を 96-well 白色プレートに播種し (5×10^3 cells/ well)、24 時間後に被験液を添加し、3, 6, 24 及び 48 時間培養した。培地を除去後、100 μ L の GSH-Glo[™] 試薬 (Luciferin-NT, Glutathione Stransferase 含有, Promega) を添加し、遮光、室温で 30 分間反応させ、さらに 100 μ L の Reconstituted luciferin detection 試薬 (Esterase 含有) を添加して、遮光、室温でさらに 15 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。

10) A549 細胞の免疫組織染色

A549 細胞を枠付きスライドグラス上に

播種し、24 時間後に被験液を添加し、さらに 24 時間培養した。培地を除去後、細胞を PBS で洗い、10%ホルマリン緩衝液にて固定した。スライド標本を PBS で洗った後、Hoechst 33258 (Invitrogen) (5 μ M) で、室温、30 分間、細胞核を染色した。スライド標本を PBS で洗浄後、次に BODIPY 493/503 (Invitrogen) (10 μ g/mL) により室温、30 分間、脂肪を染色した。スライド標本を PBS 及び蒸留水で洗浄後、蛍光顕微鏡で観察した。細胞核の測定波長は Ex 360 nm / Em 460 nm, 脂肪の測定波長は Ex 493 nm / Em 503 nm で行った。

(倫理面への配慮)

該当なし。

C. 研究結果

1) A549 細胞のクローニング

初年度、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。コロニー法において培養期間の検討を行った際に、コロニーの大きさに大小が観察された。また、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、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、また二核による 100 本以上の染色体を有する細胞も存在し、これら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 細胞をクローニングし、染色体数の安定した株を用いることにした。コロニー分離法及び希釈法によりクローニングを行い、それぞれ 12 株を凍結保存した。そのうちの 6 株 (R-1, R-3, R-5, D-1, D-2, D-6) について、染色体本数の確認、細胞増殖、ZnO(Alfa)に対する MTT 試験を行った。図 1 に細胞の形態の写真を示した。R-1, R-3, R-5, D-1, D-2 株は、似た形態を示し

たクローンを選び、D-6 株は比較のため、形態が他の株と異なり、敷石状で膨らんだ形態を持つ株を選んだ。図 2 に 6 株の各 50 細胞分の染色体本数の分布を示した。その結果、いずれの株においても、染色体本数が一定の数に固定せず、ある程度のばらつきが観察された。R-1, R-3, R-5, D-1 株では、染色体数が 50 本以下の細胞が観察され、R-1, D-1, D-2, D-6 株では、染色体数が 100 本以上の細胞が観察された。通常クローニングを行うと細胞の集団が揃い、染色体本数が揃うことが期待できるが、A549 細胞の場合にはクローニングを行った直後から染色体数にバリエーションが生じやすい細胞株であることが推測された。細胞増殖について検討した結果 (図 3)、R-3 株が若干増殖曲線の立ち上がりがあったものの、倍加時間は R-1 株 19.5 時間、R-3 株 21.7 時間、R-5 株 21.1 時間、D-1 株 18.9 時間、D-2 株 17.9 時間、D-6 株 18.2 時間でほとんど差がなかった。細胞毒性試験 (MTT 試験) を行った結果を、図 4 に示した。その結果、R-1 株及び D-6 株は、他のクローン 4 株に比べて、ZnO(Alfa) に対する細胞毒性が 24, 48 時間目共に弱かった。

染色体本数の分布の結果より、二核の細胞がコロニーの大きさに影響することから、R-3, R-5 株を候補とした。さらに細胞増殖、細胞毒性試験の結果より、R-3 株は他の株に比べて、増殖の立ち上がり早く、細胞毒性の感受性が高かったことから、R-5 株を遺伝毒性試験に用いることにした。

2) 酸化金属ナノマテリアルを対象とした A549 細胞による遺伝毒性評価

前年度、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 ITO, CuO, Y₂O₃, ZnO, NiO について、小核試験により遺伝毒性を評価した。陽性対照物質として MMC を用いた。

ITO 処理では、小核の出現頻度 MN (micronucleus) は、24 時間処理、2.5 - 10 µg/mL において、MN-2 (主核の 1/10 - 1/3 の小核を含む単核細胞の頻度)、MN-3 (主核の 1/3 - 1/2 の小核を含む単核細胞の頻度)、Multi-MN (multi micronucleus, 複数の小核をともなった単核細胞の頻度) の総計は同程度で、20 µg/mL では MN が減少していた (図 5)。核への障害の指標となる PN (polynucleus) (TF-N (transformed nucleus, 変形核細胞の頻度) と Multi-N (multi nucleus, 多核細胞の頻度) の総計) には、いずれの濃度においても差が観察されなかった。10 µg/mL 以上において、細胞質にぼやけが観察され、ITO が細胞質に影響を与えている可能性が考えられた。MP (metaphase, 分裂期細胞の頻度) を見ると、10 µg/mL 以上で MP が減少しており、毒性が出ていると考えられた。48 時間処理では、2.5 - 10 µg/mL において、僅かではあるが MN の濃度依存的な上昇が観察された。MN の内訳は MN-3 が増加し、Multi-MN が減少していた。MMC 処理の結果と比べると陽性とは判断されなかった。

CuO 処理では、24 時間処理 20 µg/mL、48 時間処理 10 µg/mL 以上において、変形核が多く観察され、脱核も観察された (図 6)。24 時間処理では、0.625 - 20 µg/mL において僅かではあるが MN の濃度依存的な上昇が観察されており、20 µg/mL の MN を MMC 処理と比較し、弱い遺伝毒性があると考えられた。PN は、20 µg/mL において顕著に観察され、MN の上昇と共に、核への障害が強く出ていることが示された。MP は、5 µg/mL 以上で減少しており、毒性が出ていると考えられた。48 時間処理

では、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ は、脱核が多く、計測不能（グラフに ND と記載）であった。0.625 - 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、MN はいずれも低く、PN は、計測できた 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において増加していた。MP は 0.625 - 2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においては control と同程度であったが、5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で減少していた。

Y_2O_3 処理では、24 時間処理では、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN が若干上昇していたが、MMC 処理の結果と比べると陽性とは判断されなかった（図 7）。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上において細胞質にひび割れが観察された。PN は、いずれの濃度においても低かった。MP は control が若干高めであったが、いずれの濃度においても大きな差はなかった。48 時間処理では、5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN が若干上昇していたが、MMC 処理の結果と比べると陽性とは判断されなかった。PN は、24 時間処理同様、いずれの濃度においても低かった。MP は 24 時間処理同様、control が若干高めであったが、いずれの濃度においても大きな差はなかった。

NiO 処理では、24 時間処理では、MN の上昇はなかった（図 8）。PN はいずれの濃度においても低かった。10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上において、細胞質にぼやけが観察され、NiO が細胞質に影響を与えている可能性が考えられた。MP はいずれの濃度においても大きな差はなかった。48 時間処理では、2.5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN が濃度依存性は観察されなかったが、control に比べて上昇しており、特に 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ での上昇が大きかったが、MMC 処理の結果と比べると陽性とは判断されなかった。PN は、24 時間処理同様、いずれの濃度においても低かった。MP は 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で減少しており、毒性が出ていると考えられた。

ZnO(Sigma)処理では、24 時間処理、2.5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において僅かではあるが MN の濃度依存的な上昇が観察され、弱い遺伝毒

性があると考えられた（図 9）。PN はいずれの濃度においても低かった。MP はいずれの濃度においても大きな差はなかった。48 時間処理では、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN の上昇が観察され、遺伝毒性陽性と判断された。PN は、24 時間処理同様、いずれの濃度においても低かった。MP は control が若干低めであったが、ZnO(Sigma)処理でも同程度であった。

ZnO(Alfa)処理では、24 時間処理、2.5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN の濃度依存的な上昇が観察され、遺伝毒性陽性であった（図 10）。PN は 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、TN-F の上昇が観察された。MP はいずれの濃度においても大きな差はなかった。48 時間処理では、2.5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において MN の濃度依存的な上昇が観察され、遺伝毒性陽性であった。20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ における MN は陽性対物質 MMC より高かった。PN は 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において上昇が観察された。MP は control が若干低めであったが、ZnO(Alfa)処理でも同程度であった。

以上より、ITO, CuO, Y_2O_3 , ZnO, NiO について、小核試験により遺伝毒性を評価した結果、明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO のみであった。CuO については、処理 24 時間において、弱い遺伝毒性が観察されたが、同時に強い核への障害も観察された。処理 48 時間では核への障害が強く出たため、遺伝毒性は観察できなかった。酸化金属ナノマテリアルの物理化学的特性と A549 細胞に対する細胞毒性及び遺伝毒性について、表 1 にまとめた。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、ZnO(Alfa)の方が ZnO(Sigma)より強い遺伝毒性を示し、細胞毒性の強度に遺伝毒性の強度は関連がなかった。

3) 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛の A549 細胞に対する細胞応答の検討

前年度検討した酸化金属ナノマテリアルにおいて、ZnO は Sigma-Aldrich 社及び Alfa Aesar 社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 (48 h)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、ZnO(Sigma)の方が強い細胞毒性を示した。そこで、2種類の ZnO 分散製品について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として細胞応答について比較検討した (図 11)。処理濃度は、両 ZnO の IC₅₀ 値に挟まれる 50 µg/mL 及び細胞毒性が強く観察された 100 µg/mL について検討し、ZnO 処理 3, 6, 24 及び 48 時間目に測定した。MTT 法は、細胞内のミトコンドリアの還元酵素である succinate-tetrazolium reductase によるテトラゾリウム化合物の MTS 試薬 (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) の還元を測定する方法で、酵素活性量により細胞の生存率を算定し、ミトコンドリアの呼吸鎖及び電子伝達系への影響をみることができる。細胞内 ATP の定量は、細胞内のエネルギー合成能の指標となり、GSH 含量の測定は、細胞内の還元型グルタチオンを測定することにより、酸化ストレスに対する影響を見ることができる。

ZnO(Sigma)処理では、50 µg/mL 処理において、3 時間目では、まず ATP 及び GSH 含量の減少が観察され、6 時間目は 3 時間目と同程度であった。6 時間目から MTT 還元能の低下が観察され、ATP の減少と MTT 還元能の低下曲線がほぼ重なる形で下降し、GSH の減少は遅れて緩やかに下降した。48 時間目には、3 測定法共に control に対して数%となった。100 µg/mL

処理においては、3 時間目でまず ATP の減少が顕著に観察され、続いて GSH の減少、MTT 還元能の低下が観察され、24 時間目には、3 測定法共に control に対して数%となった。

ZnO(Alfa)処理では、50 µg/mL 処理において、3 時間目で、まず ATP の減少が顕著に観察され、続いて 3, 6 時間と GSH 含量の減少が観察された。6 時間目から MTT 還元能の低下が観察され、ATP の減少を追う形で、MTT 還元能の低下が観察された。24 時間目において GSH 含量は、6 時間目と同程度であった。48 時間目には、3 測定結果は control に対して 17 - 25%となった。100 µg/mL 処理においては、3 時間目でまず ATP の減少が顕著に観察され、続いて GSH の減少、MTT 還元能の低下が観察された。ATP と MTT 還元能は、24 時間目で 12 及び 13%まで低下したのに対して、GSH 含量の低下は緩やかであった。48 時間目には、3 測定法共に control に対して数%となった。

ZnO の細胞毒性に関して、ZnO(Sigma), ZnO(Alfa)共通に、処理 3 時間目にまず、ATP 及び GSH 含量の減少が観察された。その後、ATP の減少に続く、もしくは重なる形で MTT 還元能の低下が観察された。24 時間目では、ATP の減少、MTT 還元能の低下に比べて、GSH 含量の減少は小さかった。

ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)の結果を比較してみると、細胞毒性の強かった ZnO(Sigma)では、50 µg/mL 処理において、3 時間目に ATP 及び GSH 含量が同様に低下しており、その後の ATP の減少、GSH 含量の低下も ZnO(Alfa)に比べて早く起こっていた。ZnO(Sigma)では、MTT 還元能の低下曲線が ATP の減少にほぼ重なる形で下降していたが、ZnO(Alfa)では、MTT 還元能の低下は、ATP の減少の後であった。

100 µg/mL 処理においては、両者ともに 3 時間目の ATP の減少、GSH 含量が低下は同程度で、その後の ATP の減少、MTT 還元能の低下も両者で同様であったが、GSH 含量の低下が ZnO(Sigma)では早く、ZnO(Alfa)では緩やかであった。

4) Y₂O₃ による A549 細胞の形態変化について

Y₂O₃ はコロニー試験で弱い細胞毒性を示し、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、または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。そこで、Y₂O₃ 処理 A549 細胞を、Hoechst 33258 により核（青色）、BODIPY 493/503 により脂肪（緑）を免疫組織染色した（図 12）。その結果、BODIPY 493/503 により A549 細胞内の球状部分は染色されず、むしろその部分は抜けて周りの細胞質部分が染色されていた。以上より球状部分には油滴（脂肪）の蓄積ではないことが明らかになった。しかしながら、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は不明である。

D. 考察

本年度は、染色体本数の安定した細胞株をコロニー試験、遺伝毒性試験に用いるため、まず A549 細胞のクローニングを行った。クローニングした株について、染色体本数の分布を確認したところ、いずれの株においても、染色体本数が一定の数に固定せず、ある程度のばらつきが観察された。通常クローニングを行うと染色体数が揃うことが期待されるが、A549 細胞の場合にはクローニングを行った直後から染色体数にバリエーションが生じやすい細胞株であ

ることが推測された。細胞株購入元の JCRB 細胞バンクの細胞情報においても、一般性状の欄に、Y chr. Invisible とあり、既に Y 染色体がかなり（もしくはすべて）抜け落ちていることが予想される。この株に関しては、時々クローニングを行うよりも、あるクローンの株を特定の継代数で大量にストックし、それを元に特定の期間（継代数）内に試験を行う方法が有用であると考えられた。コロニー試験に関しては、今回クローニングした株を用いることにより、極端に大きなコロニーや小さなコロニーの出現が減ることが期待できる。

次に、細胞毒性が観察された酸化金属ナノマテリアル ITO, CuO, Y₂O₃, ZnO, NiO について、小核試験により遺伝毒性を評価した。その結果、5 種類の前記ナノマテリアルのうち、明らかな遺伝毒性が観察されたのは、ZnO のみであった。CuO については、処理 24 時間において、弱い遺伝毒性が観察されたが、同時に 20 µg/mL において核への障害も観察された。処理 48 時間では核への障害が強くなったため、遺伝毒性は観察できなかった。CuO は MTT 試験において、処理 4 時間目において 10 µg/mL の viability が 37%で、24 時間目では 1 µg/mL で 42%、10 µg/mL で 10%と強い細胞毒性を示していた。このことから、CuO は弱い遺伝毒性を示すものの、遺伝毒性よりも低い用量で細胞毒性を示していた。小核試験標本において観察された核への障害も、細胞毒性の影響によるものであることが推測された。

物理化学的性質の異なる ZnO 分散製品、ZnO(Sigma)及び ZnO(Alfa)において、ZnO(Sigma)処理では、24 時間処理において弱い遺伝毒性、48 時間処理で、20 µg/mL において遺伝毒性陽性と判断された。ZnO(Alfa)は ZnO(Sigma)よりも強い遺伝毒性を示し、24 時間処理、48 時間処理共に 2.5 - 20 µg/mL において MN の濃度依存的

な上昇が観察され、遺伝毒性陽性と判断された。細胞毒性試験においては、ZnO(Sigma)の方が強い毒性を示していたことから、細胞毒性の強度に遺伝毒性の強度は関連がなかった。今回、遺伝毒性試験を行った濃度 (2.5 - 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) では、MP はいずれの濃度においても大きな差はなく、細胞毒性を示さない濃度であると考えられた。また、MTT 試験の viability においても 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下の濃度では、ほとんど細胞毒性を示していなかった。このことから、両 ZnO 分散製品の細胞毒性の発現には、遺伝毒性以外の細胞応答が関与していると考えられた。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。

さらに、ZnO 分散製品について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として、細胞応答について比較検討した。ZnO の細胞毒性に関する共通の現象として、処理 3 時間目に、まず、ATP 及び GSH 含量の減少が観察された。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。24 時間目では、ATP の減少、MTT 還元能の低下に比べて、GSH 含量の減少は小さかった。このことから、ZnO の細胞毒性には、酸化ストレスは直接関与しておらず、むしろ ATP の減少が ZnO の細胞毒性に影響を与えていると考えられた。また、ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)の結果を比較してみると、細胞毒性の強かった。ZnO(Sigma)では、50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理において、3 時間目に ATP 及び GSH 含量が同様に低下しており、その後の ATP の減少、GSH 含量の低下も ZnO(Alfa)に比べて早く起こっていた。ZnO(Sigma)では、MTT 還元能の低下曲線が ATP の減少にほぼ重なる形で下降していたが、ZnO(Alfa)では、MTT 還元能の低

下は、ATP の減少の後であった ATP の減少を ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)で比較してみると、3 及び 6 時間目は殆ど差がないが、24 時間目で ZnO(Sigma)では 12%まで、ZnO(Alfa)では 29%まで減少しており、ZnO(Alfa)の方が ATP の減少のカーブが緩やかであった。また GSH 含量の低下も ZnO(Sigma)では徐々に起こっていたが、ZnO(Alfa)では 24 時間目の GSH 含量は 6 時間目と同程度で、48 時間目に減少していた。これらの細胞応答の差が、ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)の細胞毒性の強度の差に関与していると考えられた。

Y_2O_3 は処理により A549 細胞内に生じた球状のものについては、本年度行った脂肪の免疫組織染色では染まらず、球状部分に油滴 (脂肪) の蓄積はないことが明らかになった。しかしながら、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は不明である。本研究において、 Y_2O_3 処理 A549 細胞を用いて小核試験を行ったが、標本において、細胞質にひび割れが観察された (図 7)。これは、小核試験の標本作製する際に、細胞の低調処理、固定処理を行うため、この球状の部分が細胞質のひび割れにつながったと考えられた。今後、他のプローブ試薬を用いて免疫組織染色を行うなど、 Y_2O_3 による細胞応答について解析を引き続き進めたいと考えている。

E. 結論

1) 前年度確立した A549 細胞を用いたナノマテリアルの生体影響評価系を用いて、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。

・ 明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO のみであった。

・ CuO も処理 24 時間において弱い遺伝毒性を示したが、核への障害が観察され、

遺伝毒性よりも低い用量で細胞毒性を示していた。

・物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO 分散製品で、ZnO(Alfa)は ZnO(Sigma)よりも強い遺伝毒性を示した。両 ZnO 分散製品間で、細胞毒性の強度に遺伝毒性の強度は関連がなく、細胞毒性の発現には遺伝毒性以外の細胞応答が関与していると考えられた。

2) 物理化学的性質の異なる ZnO 分散製品について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として細胞毒性の発現について比較検討した。

・ZnO の細胞毒性に関する共通の現象として、処理 3 時間目に、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く、ZnO の細胞毒性には、酸化ストレスは直接関与しておらず、むしろ ATP の減少が ZnO の細胞毒性に影響を与えていると考えられた。

・ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)の細胞応答を比較したところ、ATP 及び GSH 含量の減少のカーブが、ZnO(Alfa)の方が緩やかであった。

今後、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、遺伝子発現等の初期の細胞応答及び、細胞内動態について詳細な解析を行い、ナノマテリアルによる毒性発現メカニズムについての検討を進める。また、ZnO 以外の酸化金属ナノマテリアルについても物理化学的状態の異なる懸濁液を用いて、細胞毒性の違いについての解析を進める。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

1) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers, EUROTOX 2012 (Stockholm, 2012.6)

2) Isama K., Kawakami T., Sakai K., Miyajima A., Matsuoka A.: Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts, EUROTOX 2012 (Stockholm, 2012.6)

3) 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)

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)

5) Isama K., Kawakami T., Sakai K., Miyajima A., Matsuoka A.: Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal salts, ESTIV2012 (Lisbon, 2012.10)

6) Miyajima-Tabata A., Sakai K., Kato R., Kawakami T., Matsuoka A., Isama K.: Cytotoxicity and genotoxicity studies in A549 cells cultured with metal oxide nanoparticles, The 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Antonio, 2013.3)

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

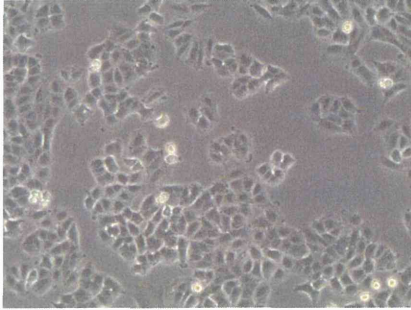
2. 実用新案登録

なし

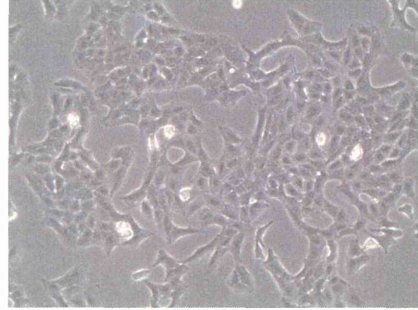
3. その他

なし

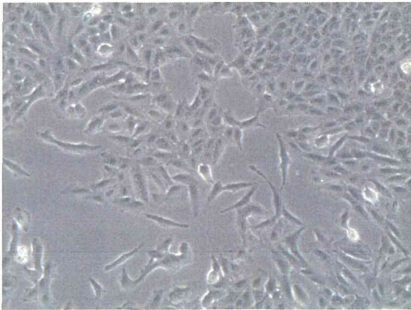
A549(R-1)



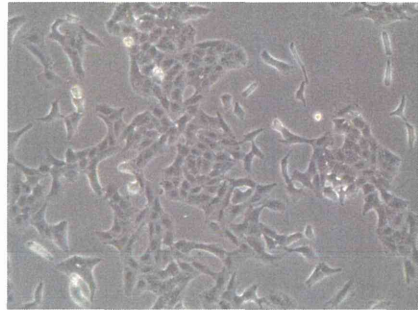
A549(R-3)



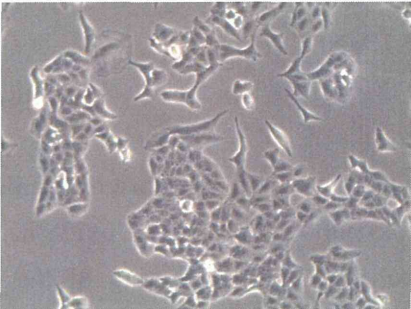
A549(R-5)



A549(D-1)



A549(D-2)



A549(D-6)

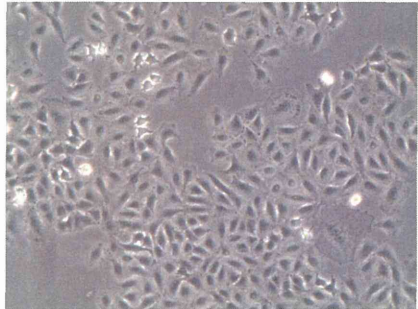


図1 A549細胞クローニング株の形態

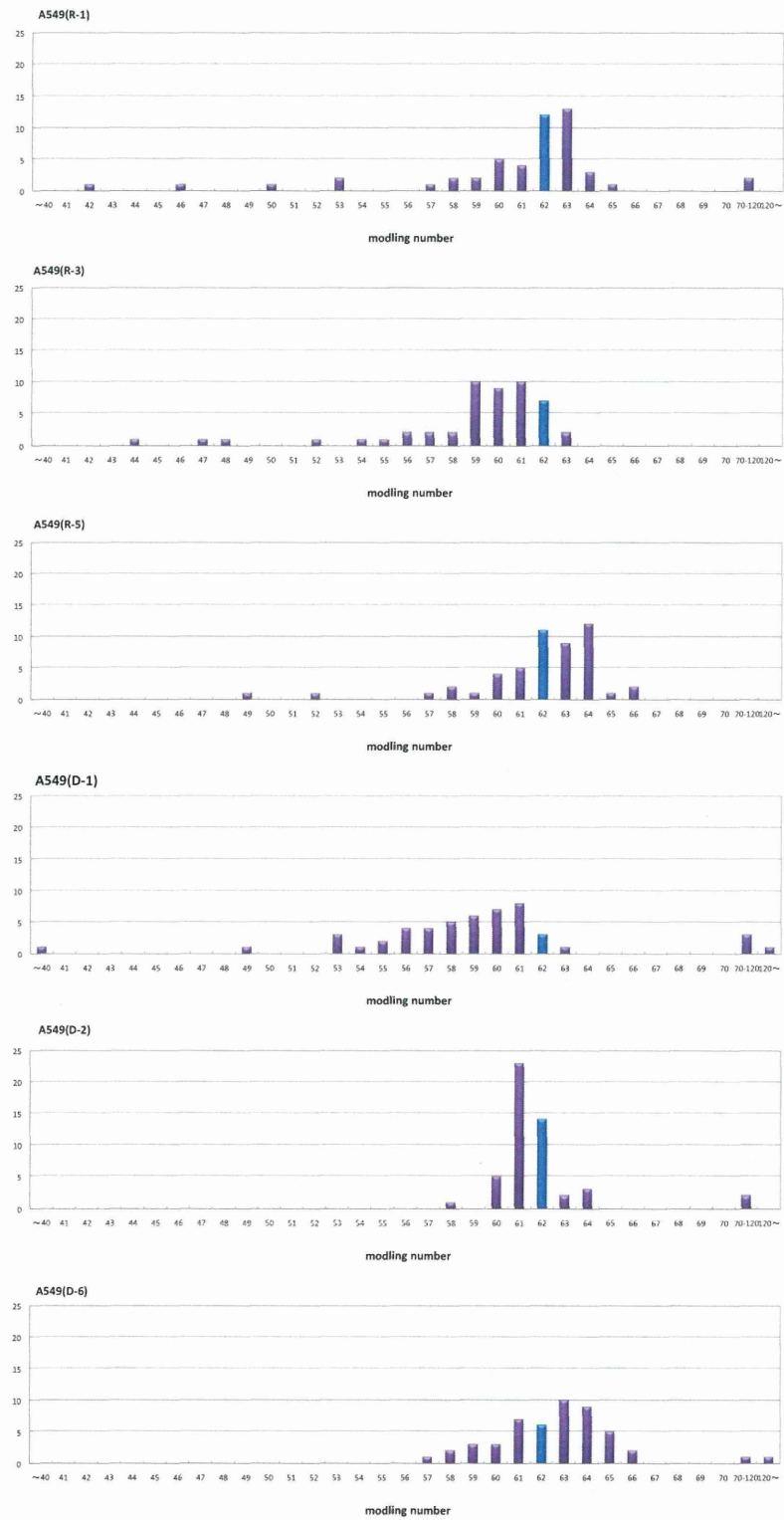


図2 A549細胞株の染色体本数分布

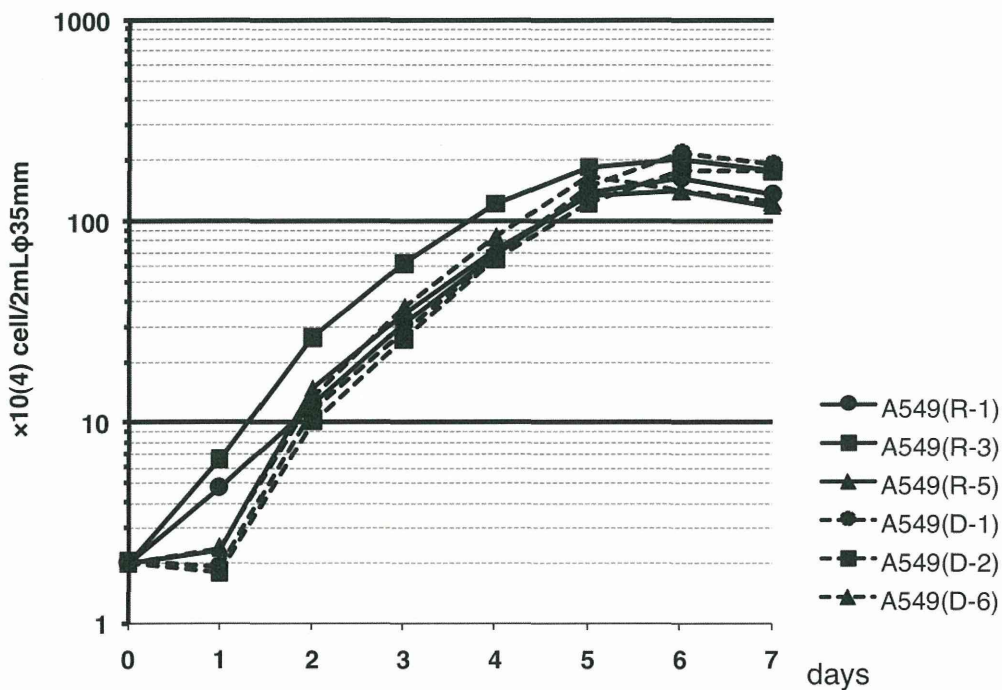


図3 A549細胞株の増殖曲線

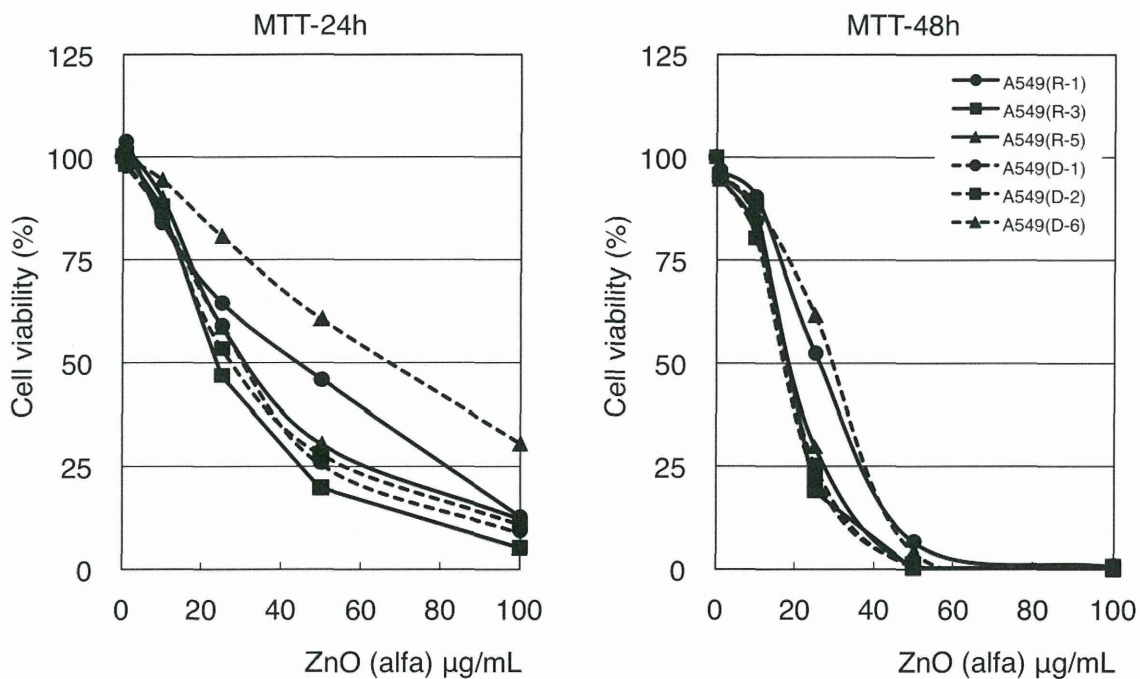
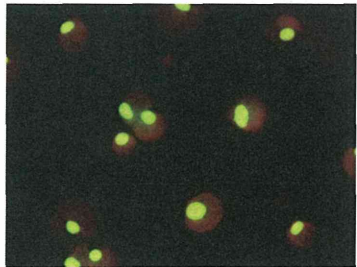
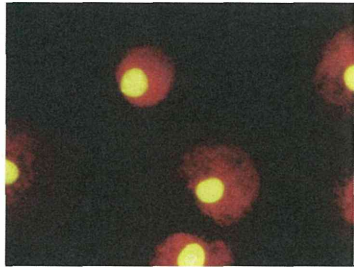


図4 A549細胞株の細胞毒性

ITO



10 µg/mL, 24h (x20)



10 µg/mL, 24h (x40)

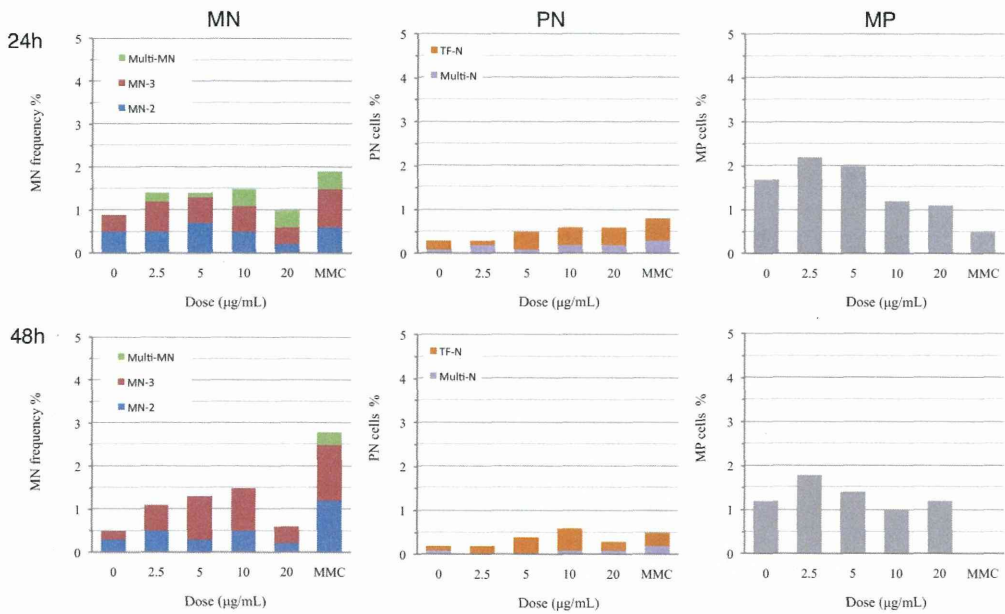


図5 A549細胞のITOに対する小核試験