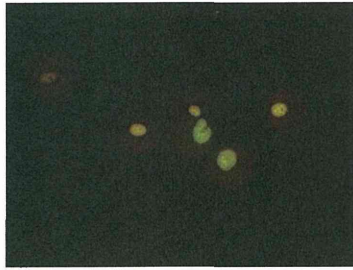


CuO



10 µg/mL, 48h (x20)



20 µg/mL, 48h (x20)

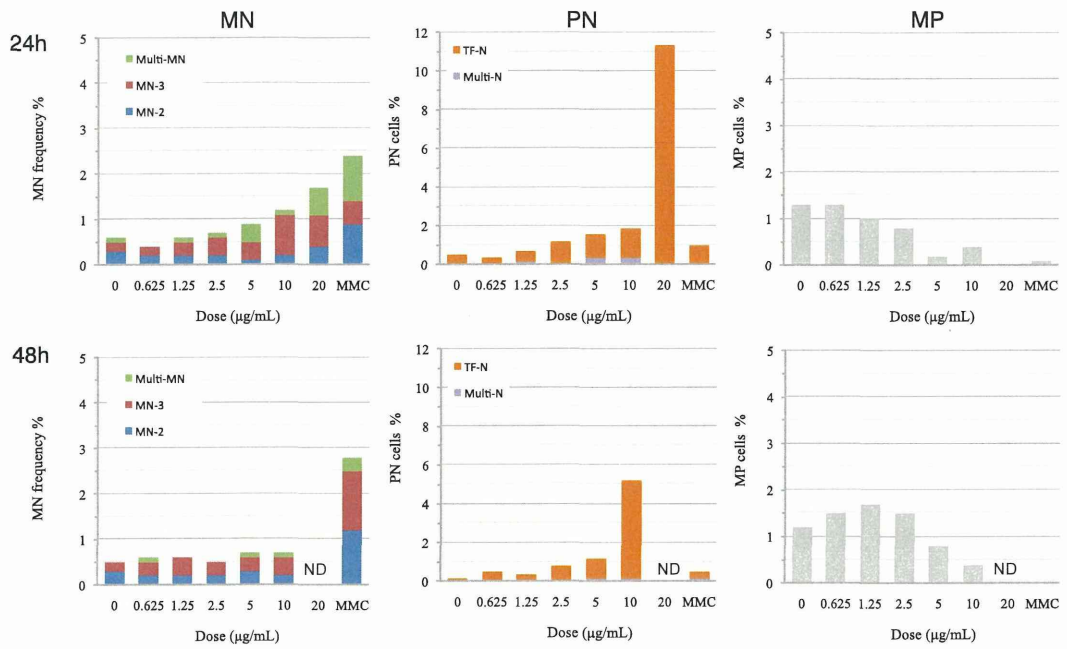
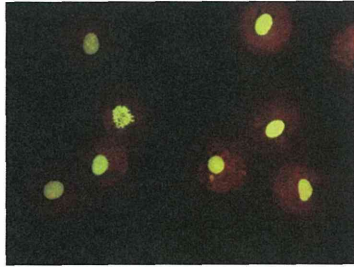
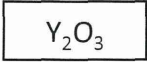
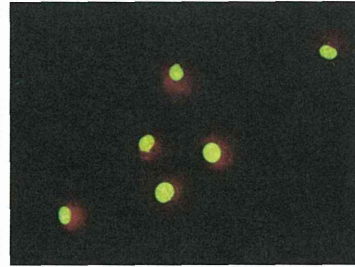


図6 A549細胞のCuOに対する小核試験



20 µg/mL, 24h (x20)



10 µg/mL, 48h (x20)

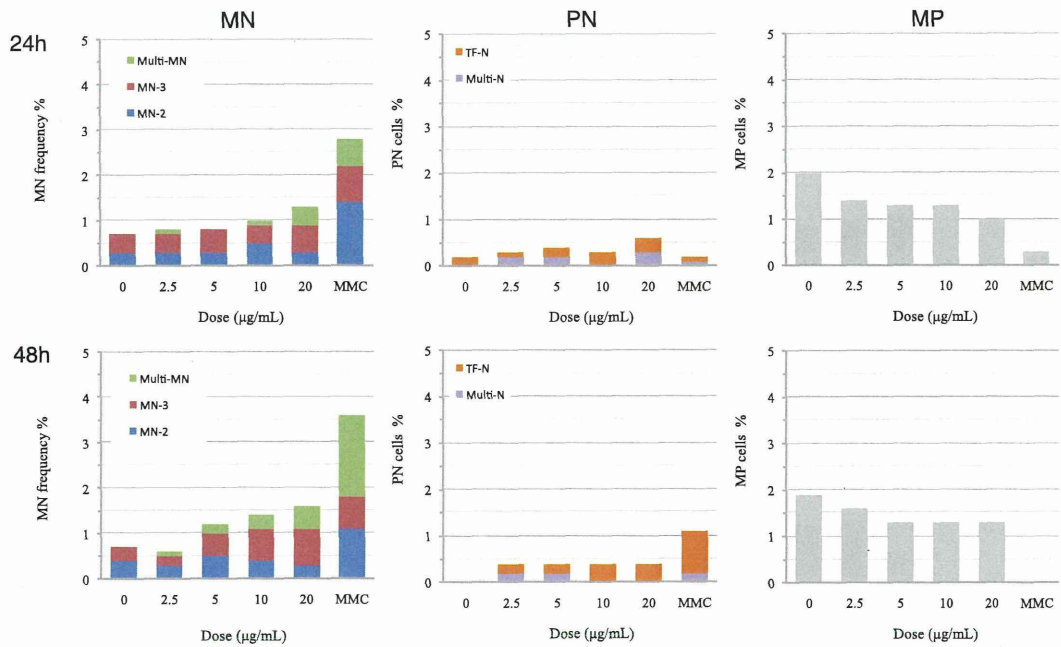
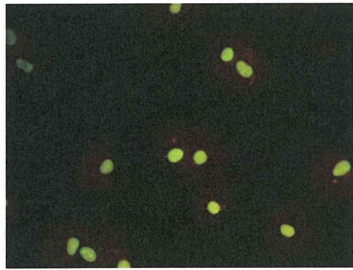
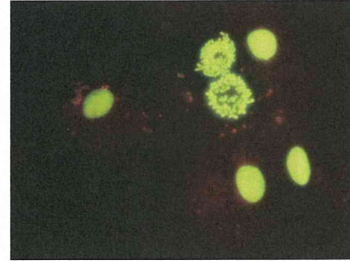


図7 A549細胞の $Y_2O_3$ に対する小核試験

NiO



10 µg/mL, 24h (x20)



20 µg/mL, 24h (x40)

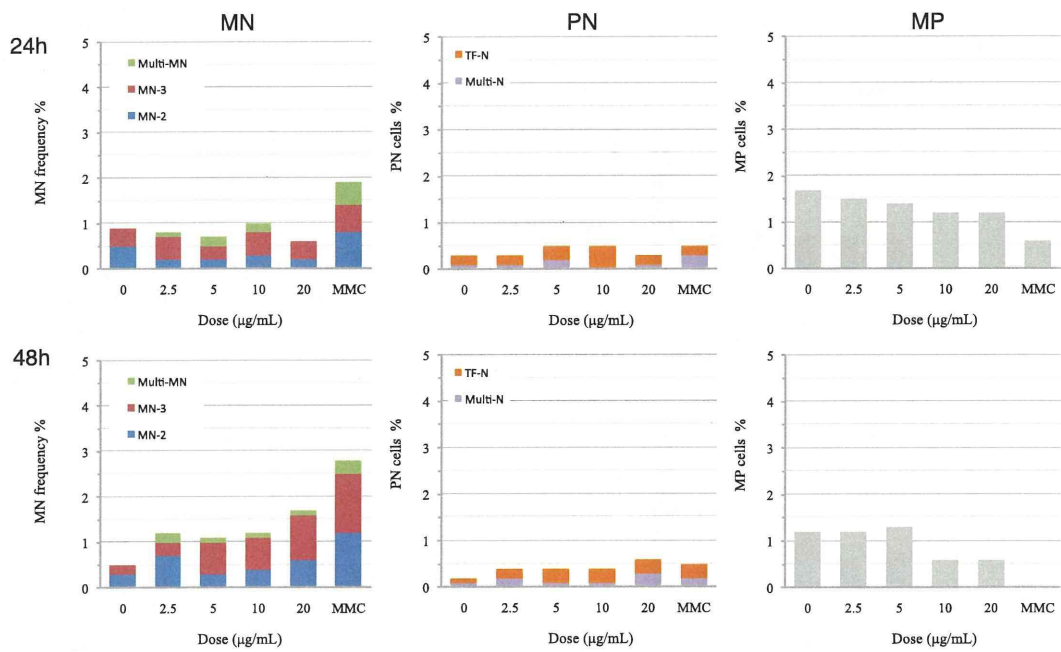
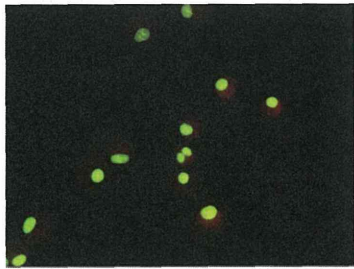
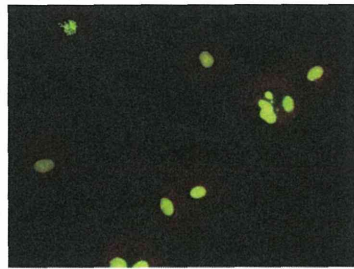


図8 A549細胞のNiOに対する小核試験

ZnO(Sigma)



5 µg/mL, 24h (x20)



20 µg/mL, 24h (x20)

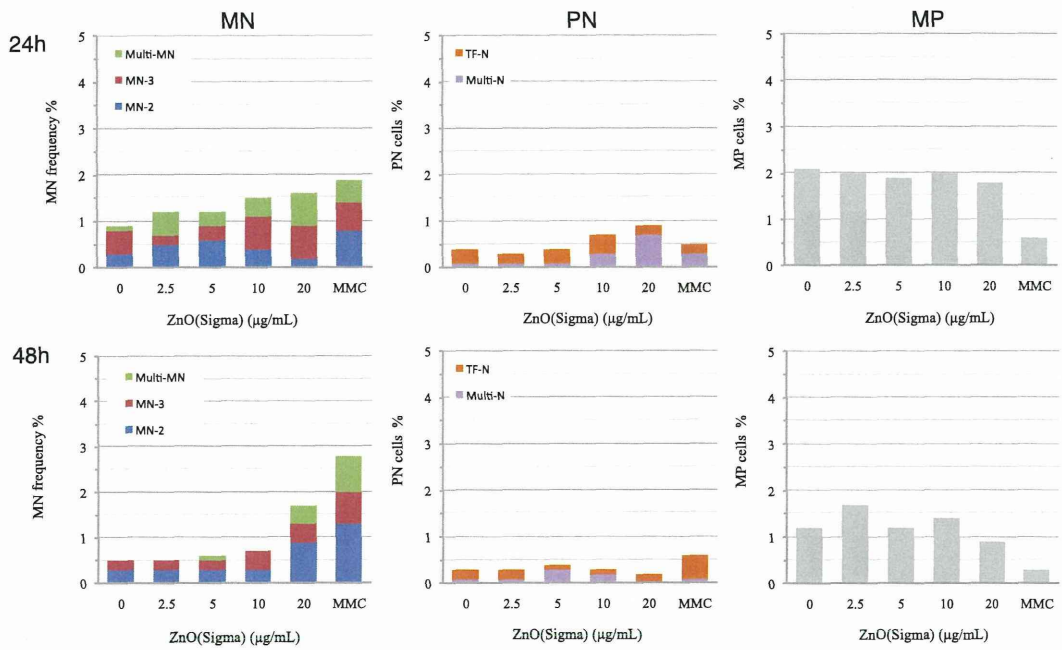
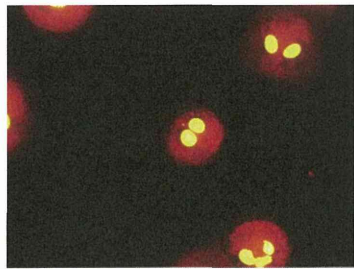
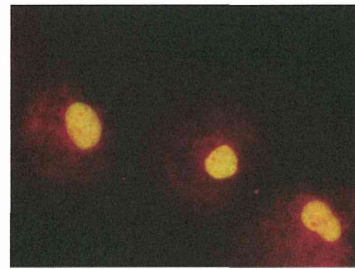


図9 A549細胞のZnO(Sigma)に対する小核試験

ZnO(Alfa)



10 µg/mL, 24h (x20)



10 µg/mL, 24h (x40)

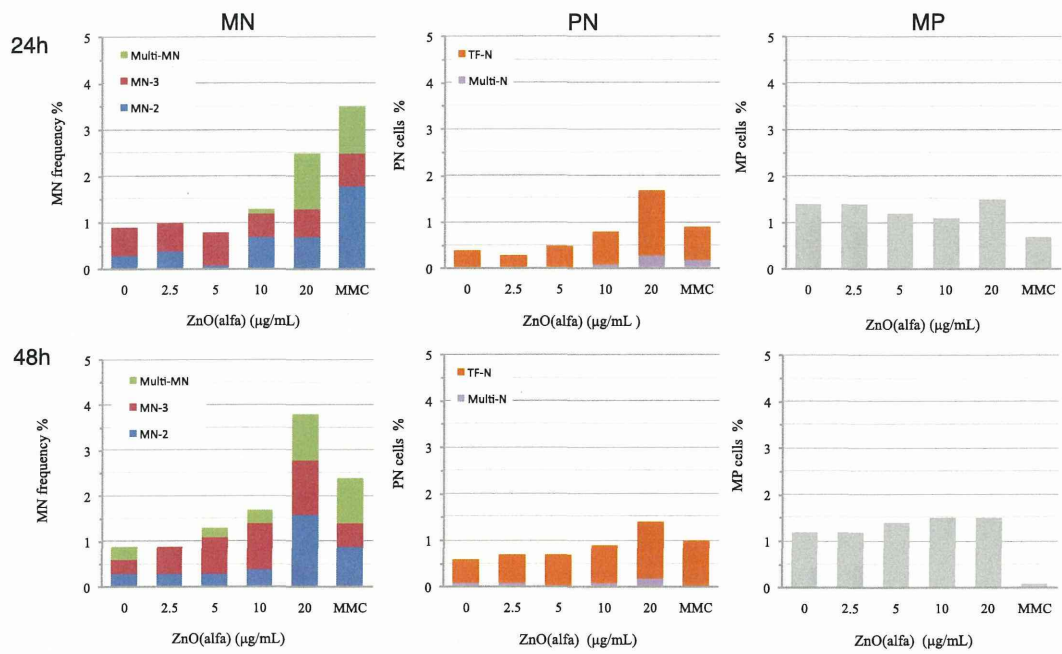


図10 A549細胞のZnO(Alfa)に対する小核試験

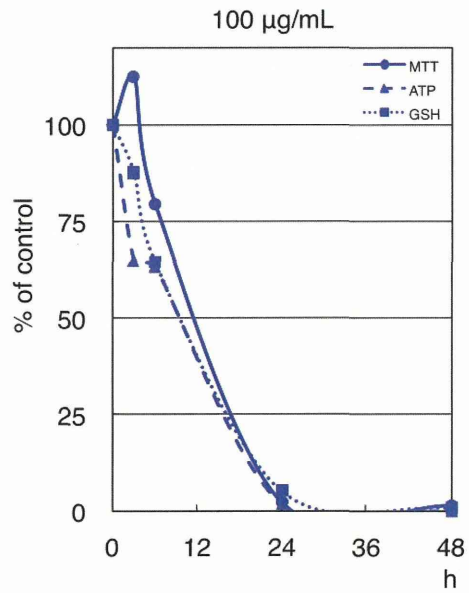
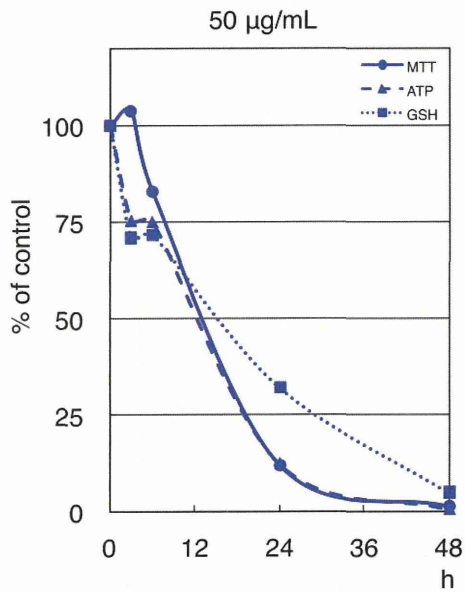
表1 酸化金属ナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞に対する細胞毒性・遺伝毒性

種類 <sup>b</sup>	製造(販売)元	1次粒子径 <sup>c</sup> (nm)	比表面積 <sup>c</sup> (m <sup>2</sup> /g)	懸濁液中平均粒子径 <sup>a</sup> (nm ± SD) <sup>d</sup>		Zeta電位 <sup>a</sup> (mV ± SD) <sup>e</sup>		細胞毒性 (IC50)		遺伝毒性
				注射用水 (10 mg/ml)	10%FBS-MEM培地 (0.2 mg/ml)	注射用水 (10 mg/ml)	10%FBS-MEM培地 (0.2 mg/ml)	コロニー法 (ug/ml)	MTT法 (48h) (ug/ml)	小核試験 (20 ug/ml)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		31	55	120.9 ± 1.2	325.9 ± 6.3	62.1 ± 0.5	-14.0 ± 1.7	>100	>100	
CeO <sub>2</sub>		14	60	63.5 ± 1.5	407.2 ± 8.2	55.0 ± 0.3	-21.7 ± 0.7	>100	>100	
ITO		30	30	98.4 ± 1.5	158.3 ± 2.5	59.8 ± 1.4	-18.7 ± 1.7	38.0	>100	陰性
SiO <sub>2</sub>	CIK ナノテック	25	110	141.7 ± 0.5	189.7 ± 1.8	-54.4 ± 0.4	-10.7 ± 0.4	>100	>100	
TiO <sub>2</sub>		36	45	41.0 ± 0.3	152.9 ± 0.5	49.5 ± 1.9	-13.1 ± 0.9	>100	>100	
<u>CuO</u>		48	20	156.4 ± 1.9	242.2 ± 2.9	51.9 ± 0.9 <sup>f</sup>	-10.8 ± 0.5	0.6	1.0	弱い陽性
<u>SnO<sub>2</sub></u>		21	45	— <sup>g</sup>	1388.6 ± 52.4	—	-12.9 ± 0.9	>100	>100	
<u>Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub></u>		33	35	105.1 ± 2.0	374.5 ± 9.4	49.3 ± 0.7	-22.7 ± 0.4	57.2	>100	陰性
ZnO <sup>h</sup>	Sigma-Aldrich	<35		65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	10.5	31.7	陽性
<u>NiO</u>		<50		256.8 ± 13.0	403.6 ± 2.6	41.6 ± 0.7 <sup>f</sup>	-18.2 ± 0.3	4.9	34.3	陰性
ZnO	Alfa Aesar	40		164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	16.7	72.5	陽性

<sup>a</sup>測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA <sup>b</sup>下線の金属酸化物ナノ粒子試料は粉体を秤量後に注射用水中で超音波処理した <sup>c</sup>カタログより <sup>d</sup>cumulant法より算出

<sup>e</sup>10%FBS-MEM培地のZeta電位(-9.6 ± 1.6 mV) <sup>f</sup>0.1 mg/ml (10 mg/mLでは測定不可) <sup>g</sup>-: 測定不可 <sup>h</sup>2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

ZnO(Sigma)



ZnO(Alfa)

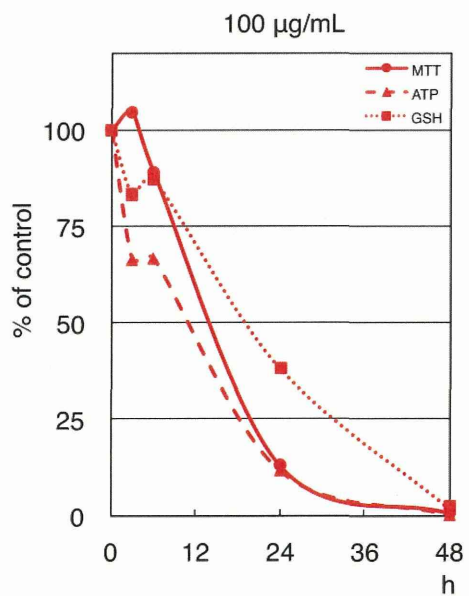
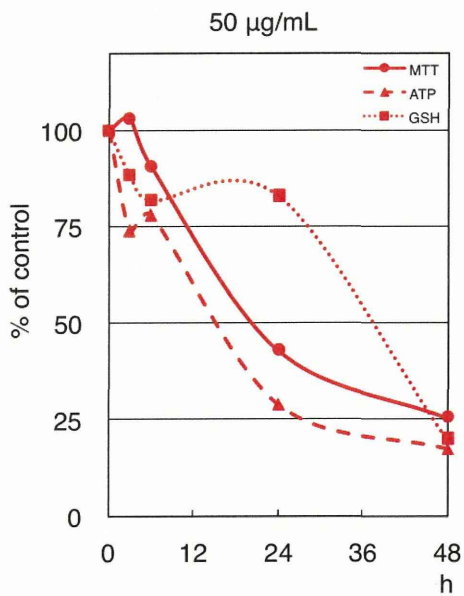
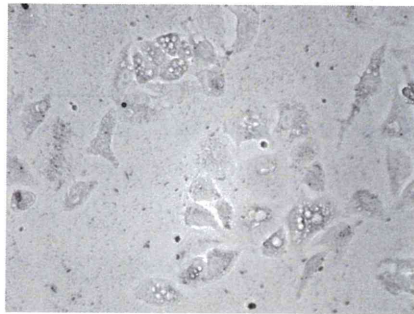
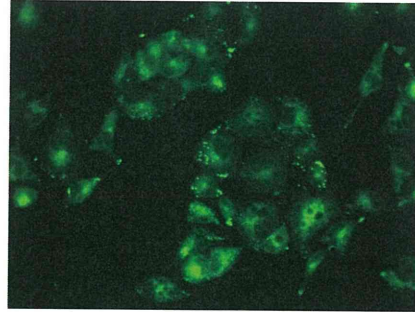


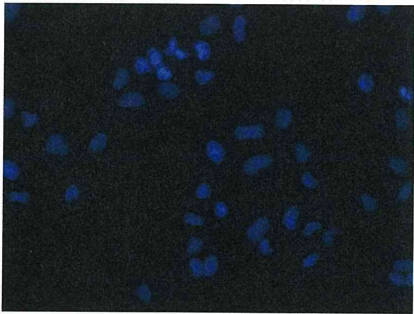
図11 ZnO(Sigma)及びZnO(Alfa)のA549細胞に対する細胞応答の比較



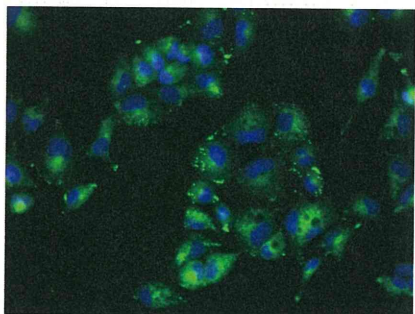
(x 40)



BODIPY 493/503



Hoechst 33258



Merged

図12  $Y_2O_3$ 処理A549細胞の免疫組織染色



ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析

研究分担者 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

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  $\mu\text{g/mL}$  であり、ZnCl<sub>2</sub> はこの濃度では毒性を示さないため、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。

#### A. 研究目的

亜鉛は、生物にとって必須の微量元素であるが、亜鉛の過剰摂取は、副作用を引き起こす。そのため、細胞内での亜鉛の恒常性は厳密に制御されている。

酸化亜鉛ナノ粒子(ZnO NPs)は、電気的および光学的特性から、バイオセンサー、色素、ゴムの製造および電子材料の分野において応用されている。さらに、ZnO NPs は、紫外線を吸収する作用があることから、紫外線防止材や化粧品に利用されている。近年の気候変動により、紫外線量は過去に比べて増加しており、紫外線防止材の重要性は拡大している。また、ZnO NPs は抗酸化作用を有することから、細菌の感染に対する予防薬としての応用が期待されている。ZnO NPs の需要の拡大は、これらの生産現場において、労働者が ZnO NPs を吸引する機会を増やしている。

ヒトが ZnO NPs を吸引すると、肺胞に達し、TNF $\alpha$  や IL-6 などの炎症性サイトカインを誘導することによって metal fume fever を引き起こすことが報告されている。また、ZnO NPs の吸引は、肺の機能に深刻なダメージを与えることが報告されている。

同じ化学組成のナノ粒子では、サイズ、表面積、および表面特性が細胞毒性に影響することが示唆されている Hanly et al. (2009)は、免疫細胞において、ZnO NPs のサイズが小さくなるほど細胞毒性は大きくなることを報告した。一方、Deng et al. (2009)は、マウスの申請幹細胞において、ZnO NPs の毒性は、濃度が高くなると大きくなるが、サイズには依存しないことを報告している。また、Lin et al. (2009)も、ヒトの肺上皮細胞に対して、70 nm および 420 nm のサイズの ZnO NPs は、同じ濃度であれば類似の毒性を有することを

示した。しかしながら、同じ表面積ならば、420 nmの方が、70 nmのZnO NPsよりも毒性は大きかった。我々(2010)も、20 nmと60 nmのZnO NPsに曝露されたヒト肺上皮細胞の細胞活性には大きな違いがないことを報告している。ZnO NPsの毒性は、活性酸素種(ROS)に起因することが示唆されている。ZnO NPsによるROSの発生は、glycine- $Zn^{2+}/Zn^{+}$ のような amino acids- $Zn^{2+}/Zn^{+}$ の還元特性のため連続的な酸化還元反応がZnO NPsの表面で起こるといふ仮説が提案されている。

ZnO NPsの細胞毒性に関する報告は多いが、一方で、ZnO NPsはヒト表皮細胞には毒性を示さないという結果も報告されている。同じサイズのZnO NPsの細胞毒性の程度は、濃度や集塊サイズに依存するが、細胞種にも依存すると考えられる。

我々は、昨年度の報告書において、酸化銅ナノ粒子(CuO NPs)の毒性に及ぼす溶出イオンの影響について報告した。ZnO NPsの毒性に関しては、ZnO NPsから溶出するZnイオンの影響であるという結果と、ZnO NPs自身の影響であるという矛盾する結果が報告されている。

本研究では、ZnO NPsの毒性に及ぼす因子を抽出し、ヒト肺上皮細胞のZnO NPsに対する分子レベルの応答について調べた。

## B. 研究方法

### B1. ZnO NPs

ZnO NPsはSigma-Aldrichから購入した。この粒子の平均サイズ径は60nmであった。

### B2. 細胞培養および細胞毒性の評価

Carcinoma-derived human lung epithelial A549 cellsを、culture plateあるいはculture dishに5,000 cells/cm<sup>2</sup>の密度で播種し、DMEM+10% FBSで、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下において培養した。次に、この培養で用い

た培地をZnO NPs等を含む所定の培地に交換し、さらに24時間培養した後、細胞毒性を評価した。DNAマイクロアレイには6-wellカルチャープレートが、WSTアッセイには96-wellカルチャープレートが用いられた。WSTアッセイは、water-soluble tetrazolium salt (WST-8)からのformazan生成量をcell counting kit-8 (Dojindo)を用いて測定した。

### B3. Znイオン濃度の定量

ZnO NPsをDMEM+10%FBSに分散し、37°Cで24時間インキュベーションした後、メタロアッセイキットを用いて定量した。

### B4. DNAマイクロアレイ解析

培養細胞からISOGENを用いてRNAsをAmino Allyl MessageAmp II aRNA Amplification Kit (Ambion)で増幅後、Cy3およびCy5でラベルした。Cy3およびCy5でラベルされたamplified RNAsは、a Whole Human Genome Microarray kit 4x44K (Agilent)にアプライされ、65°C、18時間、競合的にhybridizeされた。このDNAマイクロアレイは洗浄後、GenePix 4000B (Axon)によりCy3およびCy5の蛍光強度を、10µmの解像度で、PTM gain値を小さい値から大きな値まで3段階に設定してスキャンした。スキャンしたイメージはGenePix Pro (Axon)にてスポットを検出し、各スポットのフォアグラウンド値およびバックグラウンド値は含まれるピクセルの中央値(median value)として求めた。各スポットのフォアグラウンド値からバックグラウンド値を差し引いた値をシグナル値とした。バックグラウンド値の標準偏差をノイズ値とし、シグナル値がノイズ値の3倍以上あるスポットのみを有効なスポットとして解析に用いた。ゲインを3段階にわけてスキャンしたデータをglobal normalizationした後にマージし、最後にLocally Weighted Scatter plot Smoother (LOWESS)補正を行った。

DNA マイクロアレイ実験は、異なる培養から得られた RNA を用いて 2 回行った。1 回目の実験は、コントロール培地で培養した細胞から得られた RNA を Cy3 で、CuO-NPs 含有培地および溶出 Cu 含有培地で培養した細胞から得られた RNA を Cy5 でラベルし、Cy3 に対する Cy5 の蛍光強度の比が 2 倍以上あるいは 0.5 倍以下の遺伝子を発現量に変動のあった遺伝子として抽出した。2 回目の実験は、Cy3 と Cy5 を入れ替え、コントロール細胞から得られた RNA を Cy5 でラベルし、Cy5 に対する Cy3 の蛍光強度の比から発現量に変動のあった遺伝子を抽出した。これらの抽出された遺伝子は、2 回の実験による発現量比の誤差が 2 倍以内の遺伝子のみを再現性のある遺伝子として同定した。これらの遺伝子の発現量比の値は、2 回の実験の平均値とした。

さらに、これらの遺伝子は、PANTHER program の Gene expression analysis / Compare gene lists (<http://www.pantherdb.org/tools/genexAnalysis.jsp>) により Gene Ontology (GO) の Biological Process の categories への分類を行い、over(+)かつ p-value < 0.001 の categories を significant changed categories とした。

## C. 結果

### C1. ZnO NPs の分散溶媒が毒性に及ぼす影響

ZnO NPs を H<sub>2</sub>O、10%FBS、DMEM、DMEM+2%FBS、DMEM+10%FBS に分散させた。ZnO NPs には不純物はほとんど含まれておらず(Fig. 1a)、DMEM+10%FBS 分散させた時には、表面からカルシウム(Ca)が検出された(Fig. 1b)。また、炭素、燐、酸素が検出されたことからタンパク質の吸着が起こったと考えられる。

これらの分散溶媒が ZnO NPs の細胞毒性に影響を及ぼすかどうかを調べるために、播

種して 4 時間後の A549 細胞に、それぞれの分散溶媒に分散している ZnO NPs を添加し、24 時間後に WST アッセイにより細胞活性を測定した。その結果、ZnO NPs の毒性は、分散溶媒として H<sub>2</sub>O および 10%FBS を用いた時が大きく、DMEM、DMEM+2%FBS および DMEM+10%FBS を分散溶媒としたときは小さかった(Fig. 1c)。この結果は、分散溶媒に DMEM が含まれると、ZnO NPs の毒性が緩和されることを示唆している。

### C2. 暴露までの培養時間が ZnO NPs の毒性に及ぼす影響

A549 細胞を ZnO NPs を含まない DMEM+10%FBS で培養すると、培養 4 時間目ではまだ増殖は認められないが、24 時間後および 48 時間後では細胞は活発に増殖し、72 時間後にはコンフルエントに達した(Fig. 4a)。また、それぞれの培養時間で細胞周期の分布を調べると、24 時間および 48 時間では 4 時間に比べて S 期の細胞が多く、72 時間では G0/G1 期の細胞が多かった(Fig. 2b)。したがって、培養 4 時間目の細胞は増殖の誘導期に、24 時間および 48 時間の細胞は増殖期に、72 時間の細胞は定常期にあると言える。

培養 4 時間目、24 時間目、48 時間目の細胞に DMEM+10%FBS および H<sub>2</sub>O 分散した ZnO NPs を様々な濃度で添加し、24 時間後の細胞活性を測定すると、暴露までの細胞の培養時間が長くなるにつれて、ZnO NPs の細胞毒性は緩和された(Fig. 3a,b)。これは 2 つの理由が考えられる。ひとめの理由は、ZnO NPs に暴露のまでの培養時間が長くなるほど、細胞増殖によって細胞数は増える。ZnO NPs を同じ濃度で与えると、単位細胞数あたりの ZnO NPs の量は、細胞数が多いほど少なくなり、逆に細胞数が少ないと単位あたりの ZnO NPs の量は大きくなる。すなわち、培養 4 時間後、24 時間後、48 時間後

では細胞密度がことなり、細胞密度が高くなると単位細胞当たりの ZnO NPs の数が少なくなるため、毒性が緩和されるという理由である。2 つめの理由は、細胞の生理状態の違いである。培養時間が異なると細胞の生理状態も異なることは細胞周期の分布の違いからも明らかである。すなわち、培養時間によって細胞の生理状態が異なり、その生理状態によって ZnO NPs に対する感受性も異なるという理由である。どちらの理由によるのかを調べるため、培養 24 時間の細胞を回収し、新たなディッシュに 8000、16000、24000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した。すなわち、同じ生理状態の細胞を異なる密度で播種した。これらの細胞を ZnO NPs で暴露すると、ZnO NPs の細胞毒性に差は見られなかった(Fig. 3c)。すなわち、培養時間の違いによる ZnO NPs の細胞毒の違いは、細胞の生理状態の違いに起因することがわかった。

本研究では細胞毒性の評価方法として WST アッセイを用いた。WST アッセイはミトコンドリアの酸化還元酵素の活性を細胞活性の指標としている。ZnO NPs の毒性による酵素活性低下は、細胞死および増殖速度の低下の 2 つの理由が考えられる。ZnO NPs による酵素活性の低下、すなわち細胞活性の低下が、細胞死によるものなのか、あるいは増殖速度の低下によるものなのか、を調べるため、ZnO NPs で暴露した細胞を propidium iodide と Annexin V 抗体を用いて染色し、FACS によって生細胞と死細胞の割合を求めた。その結果、培養 4 時間目、24 時間目、48 時間目の細胞に H<sub>2</sub>O で分散した ZnO NPs を暴露したとき、死細胞の割合は、それぞれ 16.1%、17.5%、22%となった(Fig. 4)。ZnO NPs を暴露していない細胞でも、それぞれ 3.8%、7.2%、7.1%が細胞死を起こしていたので、ZnO NPs のみによる細胞死の割合は、それぞれ 12.3%、10.3%、14.9%となる。もし、ZnO NPs による細胞活性の低下の原因が細

胞死のみに起因するとしたら、培養 4 時間、24 時間、48 時間後の細胞を ZnO NPs で暴露したときの細胞活性は、それぞれ 87.7%、8、9.7%、85.1%となるはずである。しかしながら、実際の細胞活性は、Fig. 3b からわかるように、それぞれ 19%、28%、45%であるので、ZnO NPs による細胞活性の低下の主な原因は、細胞死ではなく増殖速度の低下であると考えられることができる。

### C3. ZnO NPs から溶出 Zn イオンの影響

ZnO NPs を DMEM+2%FBS および DMEM+10%FBS に様々な濃度で添加し、24 時間以内に溶出する Zn イオンの量を測定した。その結果、培地中に溶出する Zn イオンの量は FBS 濃度の影響を受けず、最大溶解濃度は約 10 $\mu$ g/mL であった(Fig. 5a)。

次に溶出した Zn イオンが ZnO NPs の毒性に寄与しているのかどうかを調べるために、培養 4 時間目の細胞を ZnCl<sub>2</sub> で暴露した。10 $\mu$ g/mL の Zn イオン濃度は、約 20 $\mu$ g/mL の ZnCl<sub>2</sub> 濃度に相当するが、この濃度では細胞毒は観察されなかった(Fig. 5b)。すなわち、ZnO NPs から溶出する Zn イオンは、ZnO NPs の細胞毒性には寄与していないと考えられる。また、Zn イオンが溶出すると培地中のリン酸と反応して Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> を形成することが考えられる。しかしながら、Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> にも細胞毒性は認められなかった(Fig. 5c)。

### C.4 培地組成が ZnO NPs の毒性に与える影響

培地組成が ZnO NPs の毒性に与える影響を調べるために、DMEM+10%FBS で 4 時間培養した細胞の培地を、DMEM+2%FBS および DMEM+10%FBS に交換し、同時に H<sub>2</sub>O に分散した ZnO NPs で暴露した。しかし、24 時間後の細胞活性に大きな違いは見られなかった(Fig. 6a)。

DMEM+10%FBS で 4 時間培養した細胞の

培地を、70%に希釈した DMEM+10%FBS に交換し、同時に H<sub>2</sub>O に分散した ZnO NPs で暴露すると、細胞活性は希釈していない培地に比べて顕著に低下していた(Fig. 6b)。これは、DMEM に含まれる成分が ZnO NPs に対する細胞の感受性に大きく影響していることを意味している。そこで、ZnO NPs に対する細胞の感受性に影響している成分を探索した。DMEM には、CaCl<sub>2</sub> が 1.8 mM、KCl が 5.3 mM、MgSO<sub>4</sub> が 0.81 mM 含まれているので、70%に希釈した培地では、それぞれの濃度は、1.26 mM、3.73 mM、0.57 mM となっている。70%に希釈した DMEM にそれぞれの成分を段階的な濃度となるように添加して ZnO NPs の毒性を調べた。その結果、70%DMEM 中の CaCl<sub>2</sub> 濃度を段階的に増加したとき、毒性の緩和現象が見られ、3.6 mM 以上の CaCl<sub>2</sub> 濃度で ZnO NPs の毒性は観察されなくなった(Fig. 6c)。このような毒性緩和は、KCl や MgSO<sub>4</sub> では観察されなかった(Fig. 6d, e)。これらの結果は、カルシウム(Ca)には、ZnO NPs の毒性から細胞を保護する効果があることが明らかとなった。

ZnO NPs の毒性の主な原因は ROS であることが報告されている。しかしながら、Ca は、ROS の毒性から細胞を保護する効果をもっていないと考えられる(Fig. 6f)。

#### C5. Ca による ZnO NPs の毒性緩和機構

Ca による ZnO NPs の毒性緩和機構を調べるために DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析を行った。DMEM+10%FBS で 4 時間培養した細胞の培地を、70% DMEM+10%FBS および 70%DMEM+10%FBS に CaCl<sub>2</sub> 濃度が 3.6 mM になるように添加した培地に交換し、24 時間培養後の遺伝子発現を比較した。その結果、3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 70%DMEM では、1.26 mM CaCl<sub>2</sub> を含む 70%DMEM に比べて、1 遺伝子が upregulation し、7 遺伝子が downregulation し

た(表 1)。これらの遺伝子を Gene Ontology のカテゴリーに分類したが、有意なカテゴリーは生じなかった。すなわち、ZnO NPs が存在しなければ Ca は細胞に何も影響を及ぼさないことを意味している。

次に DMEM+10%FBS で 4 時間培養した細胞の培地を、70% DMEM+10%FBS および 70%DMEM+10%FBS に CaCl<sub>2</sub> 濃度が 3.6 mM になるように添加した培地に交換し、ZnO NPs を 25 µg/mL および 100 µg/mL の濃度で添加した。25 µg/mL の濃度で ZnO NPs を添加すると、24 時間後には CaCl<sub>2</sub> を 3.6 mM 含む 70%DMEM では、1.26 mM 含む 70%DMEM に比べて、886 遺伝子が upregulation し、1155 遺伝子が downregulation した(Table 1)。また、100 µg/mL の濃度で ZnO NPs を添加すると、24 時間後には CaCl<sub>2</sub> を 3.6 mM 含む 70%DMEM では、1.26 mM 含む 70%DMEM に比べて、1055 遺伝子が upregulation し、1151 遺伝子が downregulation した(Table 1)。これらの変動があった遺伝子を GO カテゴリーに分類し、有意なカテゴリーを得た。ZnO NPs の濃度にかかわらず upregulation した遺伝子から生じた有意なカテゴリーは、細胞周期に関連していた(Table 2)。すなわち、ZnO NPs の存在下において、Ca は細胞周期を促進する作用があることが示唆された。一方、downregulation した遺伝子から生じたカテゴリーは代謝プロセスに関する機能が多かった(Table 3)。

#### D. 考察

ZnO NPs の毒性に関しては多くの研究がなされてきた。しかしながら、毒性の程度に関しては、ZnO NPs に大きな毒性があるという研究と、ZnO NPs に毒性はほとんどないという研究まで幅が広い。細胞種が異なると毒性の程度も異なることが報告されているが、同じ細胞種であっても、培養条件等が異なることで ZnO NPs に関する感受性が異な

るかどうかに関してはあまり注意が払われてこなかった。本研究において、我々は、ZnO NPs の分散溶媒や、細胞の生理的状态、あるいは培地組成によって A549 細胞の ZnO NPs に対する感受性が変化することを明らかにした。また、ZnO NPs による A549 細胞の細胞活性の低下は細胞死よりもむしろ細胞の増殖速度が低下したことに起因すること、さらに、ZnO NPs から溶出する Zn イオンは、ZnO NPs の毒性にほとんど関与していないことを見出した。

特に、ZnO NPs の A549 細胞に関する毒性は、培地中の Ca 濃度に依存することを明らかにした。すなわち、培地中の Ca 濃度が低いと細胞の ZnO NPs 毒性に対する感受性が上がるが、Ca 濃度を高くすると細胞は ZnO NPs 毒性に対して耐性となる。分散溶媒として H<sub>2</sub>O や 10%FBS を用いると ZnO NPs の毒性は大きくなったが、これは、分散溶媒中に分散している ZnO NPs を細胞に添加する際に、H<sub>2</sub>O や 10%FBS によって DMEM が希釈され、それによって Ca 濃度が低下したことによると推察される。

Ca は ZnO NPs の毒性から細胞を保護する効果を有するが、興味深いことに、DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子解析は、ZnO NPs が培地中に存在しないと Ca は細胞に何も影響を与えないことを示した。しかしながら、DNA マイクロアレイによる遺伝子解析は、ZnO NPs が存在すると、Ca は ZnO NPs によって低下した増殖速度を ZnO NPs が存在しないときと同程度まで回復させることを示した。

多くの研究は、ZnO NPs の毒性は、ROS を発生させることに起因することを示している。さらに、ROS の発生は、細胞内の Ca 濃度も増加することが報告されている。また、ZnO NPs の毒性は ROS 消去作用のある NAC によって緩和できるが、細胞を NAC 処理すると Ca の細胞内への流入量が低下すること

が報告されている。したがって、NAC は、ROS を消去するとともに、細胞内へ Ca への流入を抑制することで ZnO NPs の毒性から細胞を保護することが示唆されている。しかしながら、本研究によって、Ca は ZnO NPs の毒性を緩和することが見出された。したがって、ROS の発生と連動して起こる Ca の細胞内流入の抑制は ZnO NPs の毒性には関与していないと考えられる。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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)
- 2) 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)
- 3) 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)

### 2. 学会発表

- 1) 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 独立行政法人産業技術総合研究所 7月9, 10日(2012)

## 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

**Table 1.** 1.26 mM CaCl<sub>2</sub>を含む培地中で培養した細胞と比較したときの 3.6 mM CaCl<sub>2</sub>を含む培地で培養した細胞の遺伝子発現の変化.

	ZnO NPs = 0 µg/mL	ZnO NPs = 25 µg/mL	ZnO NPs = 100 µg/mL
Number of valid genes <sup>a)</sup>	13,708	12,869	12,085
Number of upregulated genes <sup>b)</sup>	1	886	1055
Number of downregulated genes <sup>c)</sup>	7	1155	1151

- a) 19,595 遺伝子を DNA マイクロアレイで比較。2 倍以上の発現量の差がある遺伝子を有効遺伝子とした。
- b) 1.26 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地中で培養した細胞と比較したときの 3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地で培養した細胞で 2 倍以上発現量が増加する遺伝子数。
- c) 1.26 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地中で培養した細胞と比較したときの 3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地で培養した細胞で発現量が 0.5 以下に低下する遺伝子数。

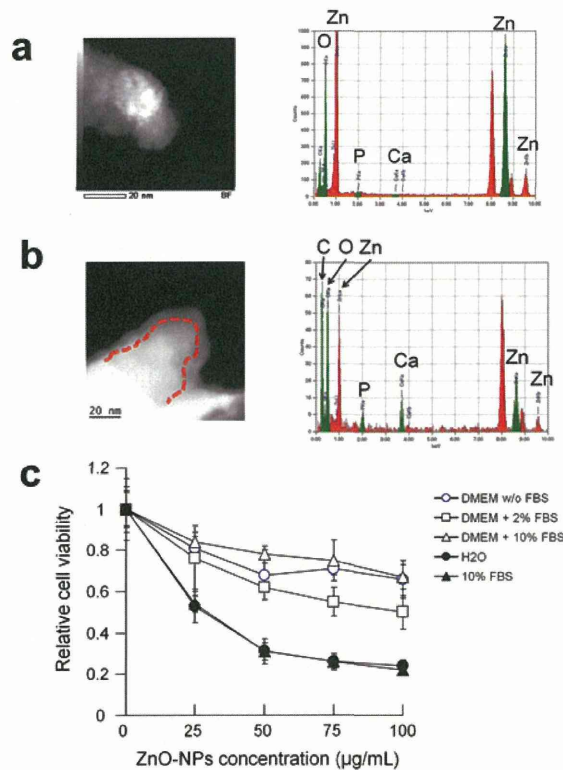
**Table 2.** 3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地で発現量が増加した遺伝子群で GO 解析を行い有意に変化のあった上位 10 のカテゴリー。

ZnO NPs =25 µg/mL			ZnO NPs =100 µg/mL		
GO ID	GO term	p-value	GO ID	GO term	p-value
GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	8.52E-44	GO:0022403	cell cycle phase	5.10E-89
GO:0000280	nuclear division	1.48E-43	GO:0000278	mitotic cell cycle	2.23E-79
GO:0007067	mitosis	1.48E-43	GO:0000279	M phase	3.81E-68
GO:0022403	cell cycle phase	1.55E-43	GO:0000087	M phase of mitotic cell cycle	2.71E-64
GO:0000278	mitotic cell cycle	6.83E-43	GO:0000280	nuclear division	3.24E-64
GO:0000279	M phase	3.26E-42	GO:0007067	mitosis	3.24E-64
GO:0022402	cell cycle process	7.95E-42	GO:0048285	organelle fission	4.32E-62
GO:0048285	organelle fission	2.41E-41	GO:0006259	DNA metabolic process	2.56E-51
GO:0007049	cell cycle	2.43E-41	GO:0051301	cell division	2.65E-50
GO:0051301	cell division	2.11E-32	GO:0006260	DNA replication	5.72E-40

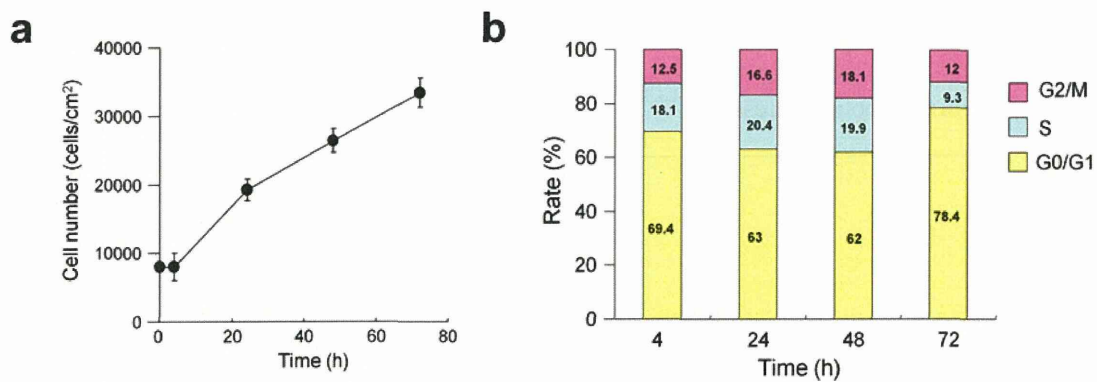
**Table 3.** 3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を含む培地で発現量が減少した遺伝子群で GO 解析を行い有意に変化のあった上位 10 のカテゴリー.

ZnO NPs =25 µg/mL			ZnO NPs =100 µg/mL		
GO ID	GO term	p-value	GO ID	GO term	p-value
GO:0009966	regulation of signal transduction	4.25E-10	GO:0010033	response to organic substance	6.30E-13
GO:0009893	positive regulation of metabolic process	8.13E-10	GO:0009893	positive regulation of metabolic process	8.31E-11
GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	2.07E-09	GO:0031325	positive regulation of cellular metabolic process	3.18E-10
GO:0010033	response to organic substance	2.39E-09	GO:0070887	cellular response to chemical stimulus	1.74E-09
GO:0051174	regulation of phosphorus metabolic process	8.27E-09	GO:0009966	regulation of signal transduction	1.88E-09
GO:0010646	regulation of cell communication	1.30E-08	GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	1.95E-09
GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	1.71E-08	GO:0010604	positive regulation of macromolecule metabolic process	2.63E-09
GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	1.74E-08	GO:0051246	regulation of protein metabolic process	3.15E-09
GO:0023051	regulation of signaling	1.91E-08	GO:0051174	regulation of phosphorus metabolic process	9.62E-09
GO:0032268	regulation of cellular protein metabolic process	4.06E-08	GO:0019220	regulation of phosphate metabolic process	1.09E-08

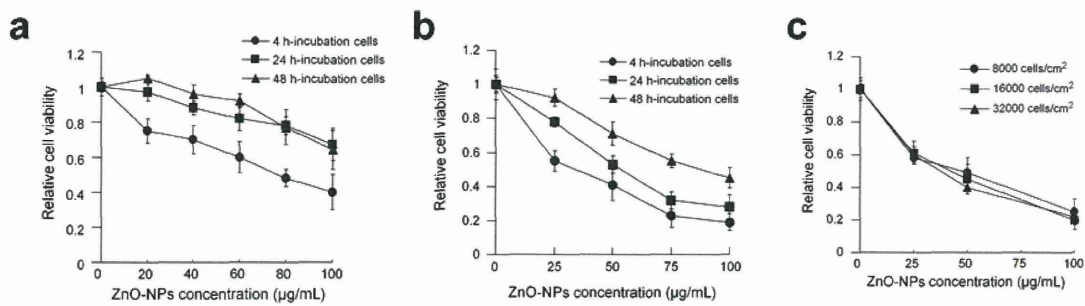




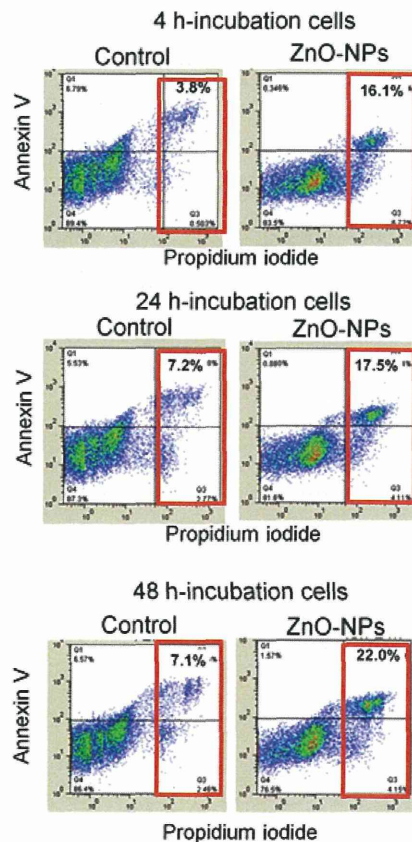
**Fig. 1.** ZnO NPs の毒性に及ぼす分散溶媒の影響. (a) ZnO NP の純度. 左図は TEM 像、右図は EDS. (b) DMEM+10%FBS に分散させた ZnO NP への培地成分の吸着. 左図は TEM 像、右図は EDS. (c) H<sub>2</sub>O, 10% FBS, DMEM, DMEM+2%FBS, および DMEM+10%FBS で分散させた ZnO NPs を 4 時間培養した A549 培養液に添加したときの細胞活性.



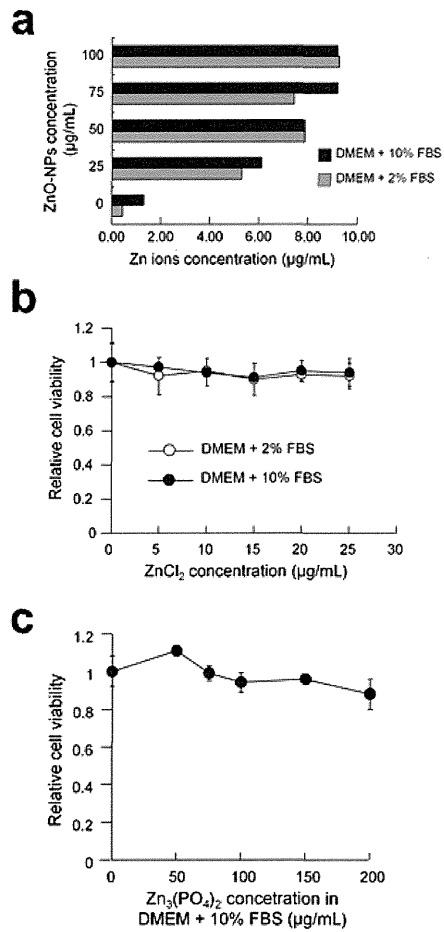
**Fig. 2.** ZnO NPs を含まない DMEM+10%FBS 中での A549 の増殖特性. (a) 増殖曲線. (b) 細胞周期の分布.



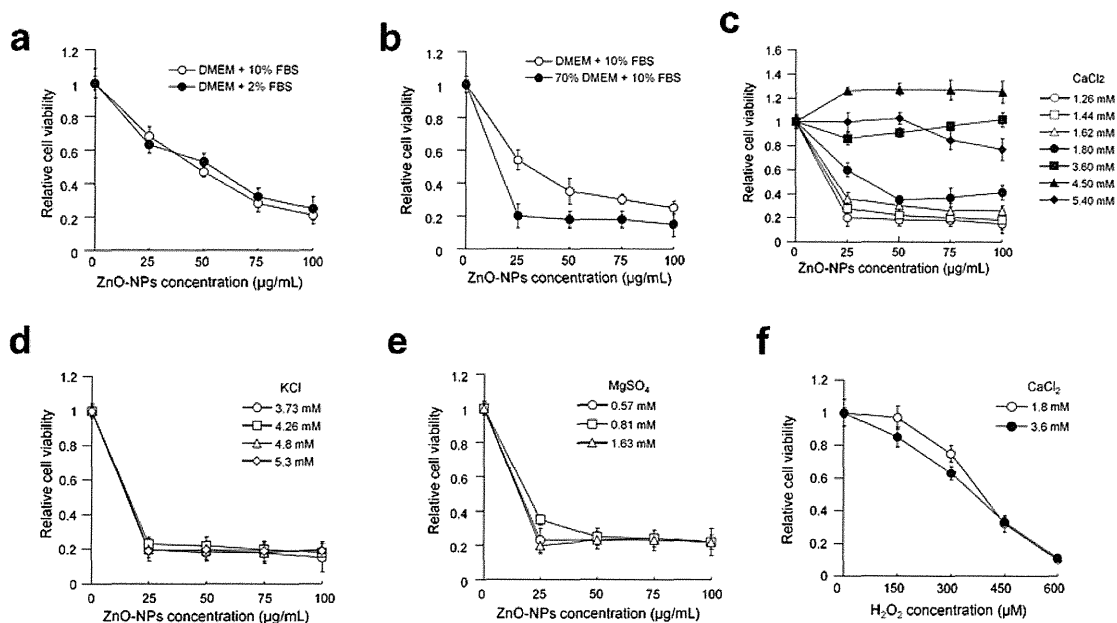
**Fig. 3.** ZnO NPs に曝露するまでの細胞の培養時間が毒性に及ぼす影響. **(a)** A549 細胞を 4 時間、24 時間、48 時間培養し、その後 DMEM+10%FBS に分散した ZnO NPs を異なる濃度で加えた。ZnO NPs を加えて 24 時間後に WST アッセイにより細胞活性を測定. **(b)** A549 細胞を 4 時間、24 時間、48 時間培養し、その後 H<sub>2</sub>O に分散した ZnO NPs を異なる濃度で加えた。ZnO NPs を加えて 24 時間後に WST アッセイにより細胞活性を測定. **(c)** 細胞密度が ZnO NPs の毒性に及ぼす影響. A549 を異なる密度で播種し 4 時間培養後、H<sub>2</sub>O 中に分散した ZnO NPs を添加。24 時間後に細胞活性を測定.



**Fig. 4.** ZnO NPs の毒性による死細胞の割合. A549 細胞を 4 時間、24 時間、48 時間培養した後、100 µg/mL の ZnO NPs で曝露。24 時間後に propidium iodide と抗 Annexin V 抗体で染色し、FACS により解析.



**Fig. 5.** ZnO NPs から溶出する Zn イオンの影響. **(a)** 溶出 Zn イオン濃度. DMEM+2%FBS および DMEM+10%FBS に異なる濃度の ZnO NPs を添加し、24 時間後に溶出した Zn イオンをメタロアッセイキットにより定量. **(b)** ZnCl<sub>2</sub> が A549 の細胞活性に及ぼす影響. **(c)** Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> が A549 の細胞活性に及ぼす影響.



**Fig. 6.** 培地組成が A549 の ZnO NPs の感受性に及ぼす影響. **(a)** FBS 濃度の影響. DMEM+2%FBS と DMEM+10%FBS で細胞を 4 時間培養し、その後 H<sub>2</sub>O に分散した ZnO NPs を添加.24 時間後に細胞活性を測定. **(b)** 培地濃度の影響. DMEM+10%FBS と DMEM+10%FBS を 70%希釈した培地で細胞を 4 時間培養し、その後 H<sub>2</sub>O に分散した ZnO NPs を添加. 24 時間後に細胞活性を測定. **(c)** Ca 濃度の影響. 70% 希釈した培地に様々な濃度になるように CaCl<sub>2</sub> を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 1.26 mM の CaCl<sub>2</sub> が含まれている. **(d)** K 濃度の影響. 70% 希釈した培地に様々な濃度になるように KCl を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 3.73 mM の KCl が含まれている. **(e)** Mg 濃度の影響. 70% 希釈した培地に様々な濃度になるように MgSO<sub>4</sub> を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に ZnO NPs を添加し、24 時間後に細胞活性を測定. 70%DMEM には 0.57 mM の MgSO<sub>4</sub> が含まれている. **(f)** Ca が H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> の毒性に及ぼす影響. 70% 希釈した培地に 1.8 mM および 3.6 mM CaCl<sub>2</sub> を添加し、それらの培地で細胞を培養. 4 時間後に H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> を添加し、24 時間後に細胞活性を測定.