

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

ナノマテリアル共存下での化学物質の細胞機能への影響評価

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  
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

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（ $\text{SiO}_2$ ）及び二酸化チタン（ $\text{TiO}_2$ ）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（ $\text{AlCl}_3$ ）、塩化クロム（III）（ $\text{CrCl}_3$ ）、塩化銅（I）（ $\text{CuCl}$ ）、塩化銅（II）（ $\text{CuCl}_2$ ）、塩化鉄（II）（ $\text{FeCl}_2$ ）、塩化鉄（III）（ $\text{FeCl}_3$ ）、塩化ニッケル（II）（ $\text{NiCl}_2$ ）及び塩化亜鉛（ $\text{ZnCl}_2$ ）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  $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuCl}_2$  及び  $\text{ZnCl}_2$  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、 $\text{SiO}_2$  ナノ粒子が共存すると、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{CuCl}$  及び  $\text{CuCl}_2$  の細胞毒性強度は増強した。一方、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子が共存しても、 $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{CrCl}_3$ 、 $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{NiCl}_2$  及び  $\text{ZnCl}_2$  の細胞毒性強度は変化しなかった。また、 $\text{SiO}_2$  ナノ粒子共存下で  $\text{CuCl}$  及び  $\text{CuCl}_2$  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、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子共存下で  $\text{CuCl}$ 、 $\text{CuCl}_2$  及び  $\text{ZnCl}_2$  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、 $\text{SiO}_2$  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。

#### A. 研究目的

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ばかりか、一般消費者向け製品にも幅広く使用されている。しかしながら、これまでにナノマテリアルの *in vivo* 及び *in vitro* 毒性試験が実施されているものの、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のが現状である。

近年、一部のナノマテリアルについて、

化学組成、粒子サイズ、物性等に依存した生体影響が確認され、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。しかしながら、ナノマテリアルと他の化学物質との相互作用による生体影響は不明である。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する。

今年度は、ナノ粒子共存下における金属塩化物の細胞毒性と細胞内取り込み量の関

係を検討した。

## B. 研究方法

### 1. 試料

二酸化ケイ素 (SiO<sub>2</sub>) ナノ粒子 (一次平均粒子径 25 nm) 及び二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子 (一次平均粒子径 36 nm) の 10% 水懸濁液を CIK ナノテック株式会社から入手した。なお、これらのナノ粒子水懸濁液には、分散剤等は含まれていない。また、金属塩化物として、塩化アルミニウム (AlCl<sub>3</sub>)、塩化クロム (III) (CrCl<sub>3</sub>)、塩化銅 (I) (CuCl)、塩化銅 (II) (CuCl<sub>2</sub>)、塩化鉄 (II) (FeCl<sub>2</sub>)、塩化鉄 (III) (FeCl<sub>3</sub>)、塩化ニッケル (II) (NiCl<sub>2</sub>) 及び塩化亜鉛 (ZnCl<sub>2</sub>) (いずれも和光純薬工業株式会社) を使用した。

### 2. 細胞毒性試験

ナノ粒子共存下及び非共存下における金属塩化物の細胞毒性は、ISO 10993-5:2009; Biological evaluation of medical devices — Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity に準じて、コロニー形成法を用いて評価した。

#### 2-1. 細胞株及び培地

細胞株は、チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞 V79 (JCRB0603) を使用した。培地は、牛胎児血清 (10%)、ペニシリン (100 U/ml) 及びストレプトマイシン (100 µg/ml) を含有する Earle 組成の Eagle's MEM 培地 (Invitrogen Corp.) を使用した。

#### 2-2. 試験操作

24 ウエルマルチプレートの各ウエルに培地 1 ml に懸濁させた 50 個の V79 細胞を播種した。プレートを 37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 24 時間静置し、細胞をウ

エルの底面に接着させた。培地を捨て、予め試料を溶解又は懸濁させた培地 1 ml をウエルに加えた。培地を交換したプレートを CO<sub>2</sub> インキュベータ内に入れ、6 日間静置培養した。その後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で細胞を洗い、10% ホルマリン液を用いて細胞を固定した。ギムザ染色液 (Merck & Co., Inc.) をリン酸緩衝液 (M/15, pH 6.4) で 25 倍に希釈したものをウエルに加え、コロニーを染色した。

#### 2-3. コロニー形成率の測定

ウエル内に形成したコロニー数を数え、対照群のコロニー数に対する割合 (%) を求めた。

### 3. 細胞内取り込み量の測定

ナノ粒子共存下及び非共存下において CuCl、CuCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> を暴露した細胞について、銅及び亜鉛の細胞内取り込み量を測定した。

#### 3-1. 細胞株及び培地

細胞毒性試験と同様に、V79 細胞及び 10% 牛胎児血清を含有する MEM 培地を使用した。

#### 3-2. 試験操作

6 ウエルマルチプレートの各ウエルに培地 2 ml に懸濁させた 5×10<sup>5</sup> 個の V79 細胞を播種した。37°C の CO<sub>2</sub> インキュベータ内で 48 時間静置培養した後、培地を予め試料を溶解又は懸濁させた培地 2 ml と交換した。培地を交換したプレートを CO<sub>2</sub> インキュベータ内に入れ、24 時間及び 48 時間静置培養した。その後、PBS で 2 回細胞を洗った後、トリプシン処理にて細胞を回収し、さらに PBS で 3 回細胞を洗った。その後、ディスポーザブル細胞計数盤 (株式会社ワンセル) を用いて回収した細

胞数を数えた。

### 3-3. 定量

回収した細胞塊に 2% 塩酸を加え、60°C で 2 時間加温し、細胞内の銅及び亜鉛を抽出した。

抽出液中の銅及び亜鉛の濃度は、オクタポールリアクションシステムを搭載した誘導結合プラズマ質量分析計 (ICP-MS) Agilent 7500ce (アジレント・テクノロジー株式会社) を用いて測定した。ICP-MS の測定条件は、

高周波出力 : 1500 W

プラズマガス : Ar 15 L/min

キャリアガス : Ar 0.7 L/min

メイクアップガス : Ar 0.33 L/min

コリジョンガス : He 5 mL/min

サンプリング位置 : 8 mm

スプレーチャンバー温度 : 2°C

積分時間 : 0.5 sec/element

測定回数 : 3 times

とした。また、各元素の測定質量数 (m/z) は、

銅 : 63

亜鉛 : 66

コバルト : 59 (内標準)

とした。

検量線作成用の混合標準液は、銅及び亜鉛の各 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業株式会社) を用いて作製し、2% 塩酸を用いて段階希釈した。また、コバルトの 1 µg/L 溶液 (アジレント・テクノロジー株式会社) を内標準溶液とした。

なお、ICP-MS 測定における銅及び亜鉛の検出下限値、定量下限値及びバックグラウンド相当濃度は、それぞれ銅が 0.0133 ng/mL、0.0444 ng/mL 及び 0.229 ng/mL 並びに亜鉛が 0.177 ng/mL、0.590 ng/mL 及び 2.17 ng/mL であった。

## 4. 統計学的検定

細胞毒性試験では、二元配置分散分析を行い、有意差が認められた場合は、Tukey-Kramer 法を用いて各濃度の金属塩のナノ粒子共存群と非共存群との間で多重比較を行った。また、細胞内取り込み量の測定では、ナノ粒子共存群と非共存群との間で F 検定を行い、等分散とみなせる場合は、Student の t 検定を行った。いずれの検定においても有意水準は危険率 5% 未満とした。

## C. 研究結果及び考察

### 1. 細胞毒性

昨年度に実施した SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の単独暴露における細胞毒性試験の結果から、ナノ粒子と金属塩化物との共存下における細胞毒性試験において、細胞毒性を示さなかった SiO<sub>2</sub> ナノ粒子の曝露濃度は 100 µg/ml とした。また、細胞毒性を示した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の曝露濃度は、コロニー形成率が低下しなかった 10 µg/ml 及びコロニー形成率が有意に低下した 100 µg/ml とした。

ナノ粒子共存下における AlCl<sub>3</sub> のコロニー形成率を図 1 に示した。100 µg/ml の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下において、AlCl<sub>3</sub> のコロニー形成率は有意に低下した。一方、10 µg/ml 及び 100 µg/ml の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下において、AlCl<sub>3</sub> のコロニー形成率は変化しなかった。

ナノ粒子共存下における CrCl<sub>3</sub> のコロニー形成率を図 2 に示した。100 µg/ml の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子並びに 10 µg/ml 及び 100 µg/ml の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下において、CrCl<sub>3</sub> のコロニー形成率は変化しなかった。

ナノ粒子共存下における CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> のコロニー形成率をそれぞれ図 3 及び図 4 に示した。ナノ粒子共存下における AlCl<sub>3</sub> のコロニー形成率と同様に、100

μg/ml の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> のコロニー形成率は有意に低下し、10 μg/ml 及び 100 μg/ml の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> のコロニー形成率は変化しなかった。

ナノ粒子共存下における FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、NiCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> のコロニー形成率をそれぞれ図 5 から図 8 に示した。ナノ粒子共存下における CrCl<sub>3</sub> のコロニー形成率と同様に、100 μg/ml の SiO<sub>2</sub> ナノ粒子並びに 10 μg/ml 及び 100 μg/ml の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下でこれらの金属塩化物のコロニー形成率は変化しなかった。

以上の結果から、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子が共存すると、AlCl<sub>3</sub>、CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> の細胞毒性強度は増強することが分かった。一方、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が共存しても、AlCl<sub>3</sub>、CrCl<sub>3</sub>、CuCl、CuCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、NiCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> の細胞毒性強度は変化しないことが分かった。

## 2. 細胞内取り込み量

SiO<sub>2</sub> ナノ粒子の共存下においてコロニー形成率が低下した CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> 並びに SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の共存下においてコロニー形成率が変化しなかった ZnCl<sub>2</sub> について、細胞内の銅及び亜鉛の取り込み量を測定した。

ナノ粒子共存下で 24 時間及び 48 時間 CuCl を曝露した V79 細胞における細胞内の銅濃度を図 9 に示した。曝露 24 時間において、細胞内の銅濃度は、ナノ粒子非共存群と SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群との間に有意な差は認められなかった。一方、曝露 48 時間において、ナノ粒子非共存群に比べて、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群では有意に増加し、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群では変わらなかった。

ナノ粒子共存下で 24 時間及び 48 時間 CuCl<sub>2</sub> を曝露した細胞における細胞内の銅

濃度を図 10 に示した。CuCl を曝露した場合と同様に、曝露 24 時間において、細胞内の銅濃度は、ナノ粒子非共存群と SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群との間に有意な差は認められず、曝露 48 時間において、ナノ粒子非共存群に比べて、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群では有意に増加し、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群では変わらなかった。

ナノ粒子共存下で 24 時間及び 48 時間 ZnCl<sub>2</sub> を曝露した細胞における細胞内の亜鉛濃度を図 11 に示した。CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> を曝露した場合と異なり、曝露時間に関わらず、細胞内の亜鉛濃度は、ナノ粒子非共存群と SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存群との間に有意な差は認められなかった。

以上の結果から、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> を曝露すると、V79 細胞内への銅の取り込み量は増加することが分かった。一方、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> 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いことが分かった。

## D. 結論

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明らかにするため、ナノ粒子共存下における金属塩化物の細胞毒性及び細胞内取り込み量を評価した。その結果、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子が共存すると、AlCl<sub>3</sub>、CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> の細胞毒性強度は増強した。一方、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が共存しても、AlCl<sub>3</sub>、CrCl<sub>3</sub>、CuCl、CuCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、NiCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> の細胞毒性強度は変化しなかった。また、SiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl 及び CuCl<sub>2</sub> 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、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl、CuCl<sub>2</sub> 及び ZnCl<sub>2</sub> 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、SiO<sub>2</sub> 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。

謝辞 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の水懸濁液をご提供いただきました CIK ナノテック株式会社に心より感謝いたします。

## E. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) 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, *Journal of Environmental Chemistry*, 22, 197-204 (2012)

- 4) Kawakami T, Isama K, Nishimura T: Analysis of isothiazolinones and other preservatives in gel-products used for cooling in Japan, *Journal of Environmental Chemistry*, 22, 205-211 (2012)
- 5) 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化合物(TPT)及びトリブチル錫化合物(TBT)の試験法改定にかかわる検討, *薬学雑誌*, 132, 1197-1208 (2012)
- 6) 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)
- 7) 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, *日本皮膚アレルギー・接触皮膚炎学会雑誌*, 6, 339-350 (2012)
- 8) 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, *大阪市立環境科学研究所報告*, 74, 17-22 (2012)

### 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 SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> 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, 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)
- 6) 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)

#### 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

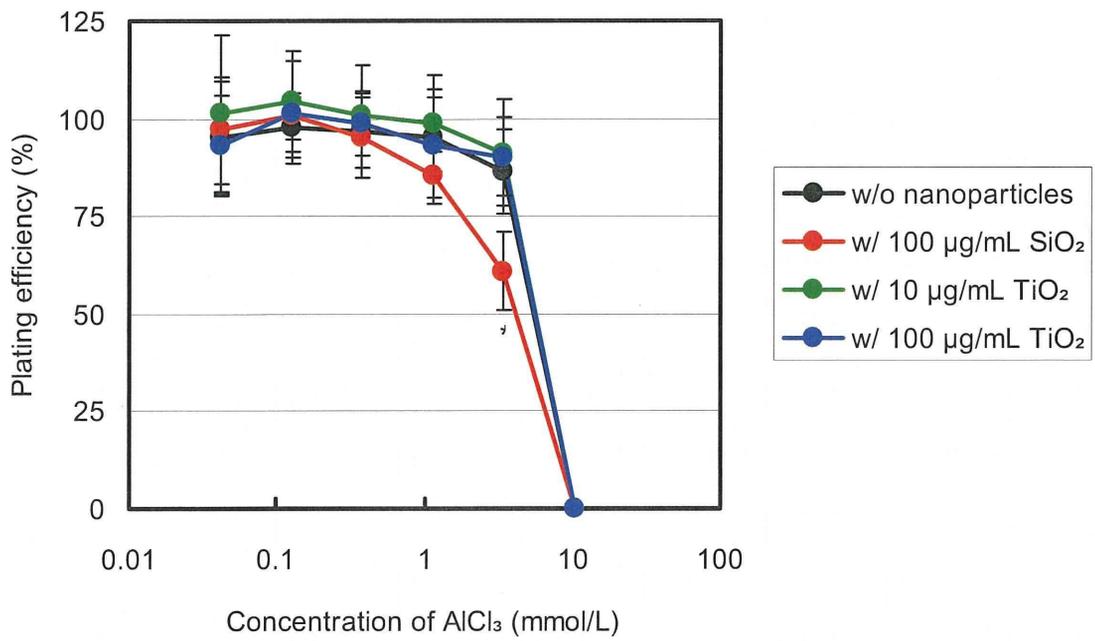


図1 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるAlCl<sub>3</sub>のコロニー形成率 (\*p<0.05)

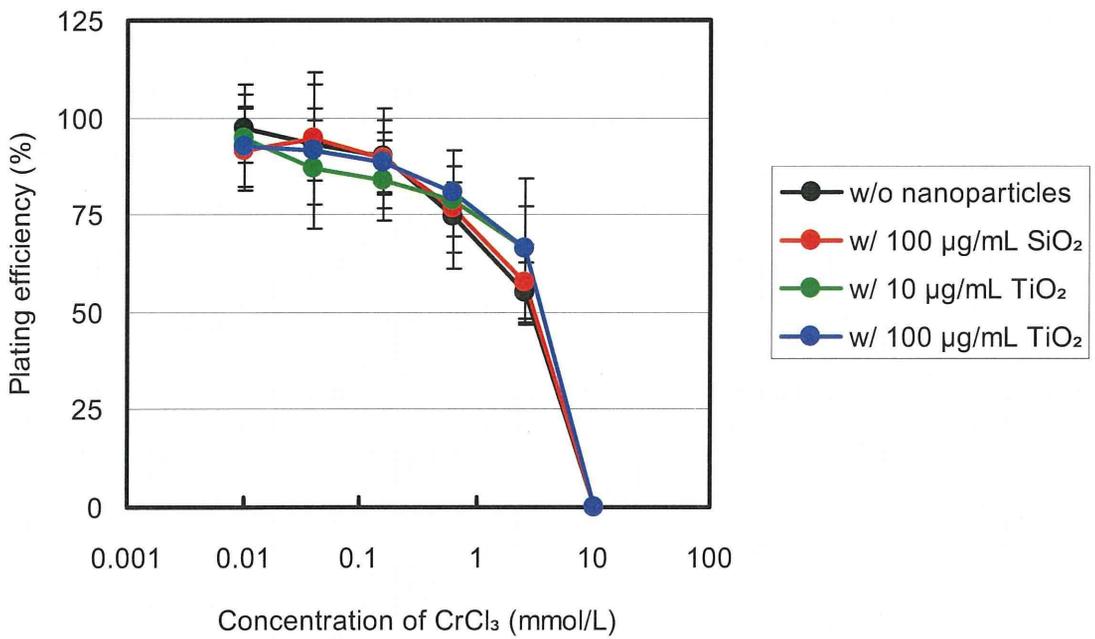


図2 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるCrCl<sub>3</sub>のコロニー形成率

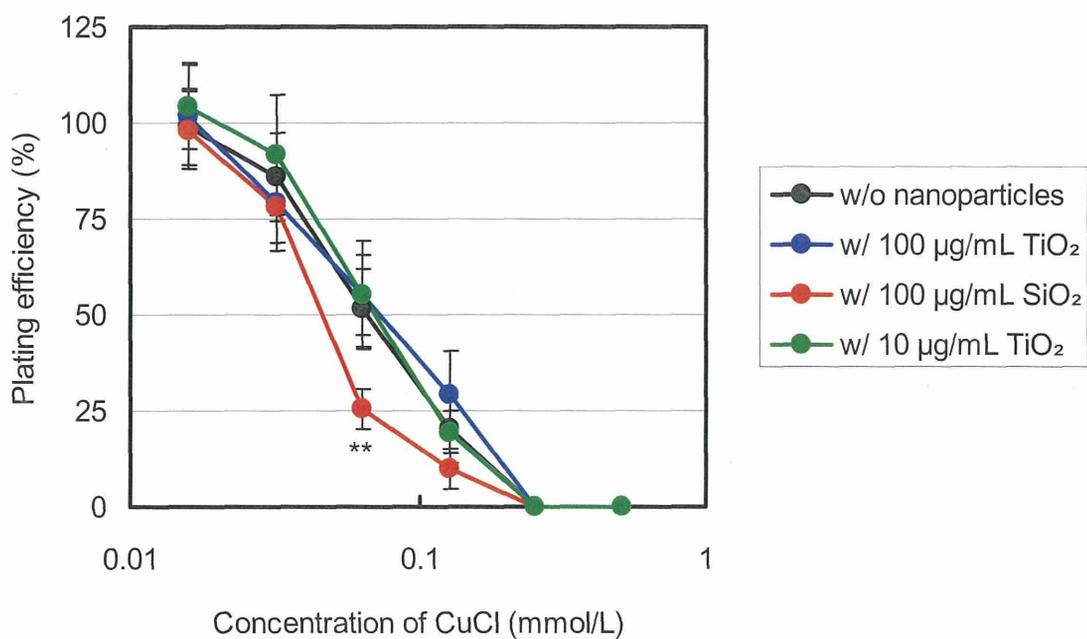


図3 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるCuClのコロニー形成率 (\*\*p<0.01)

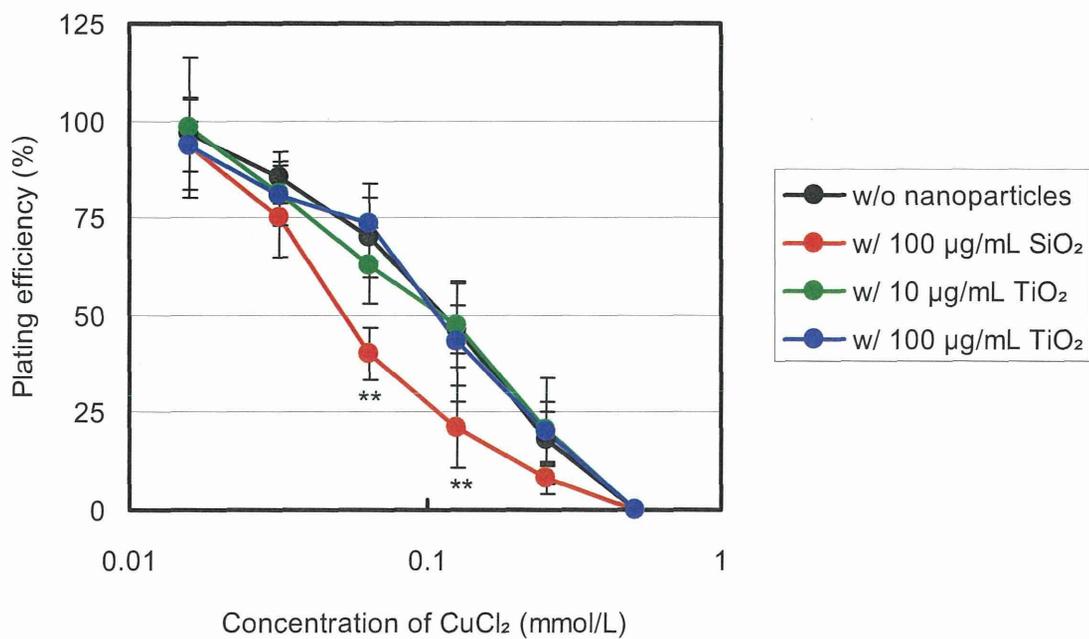


図4 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるCuCl<sub>2</sub>のコロニー形成率 (\*\*p<0.01)

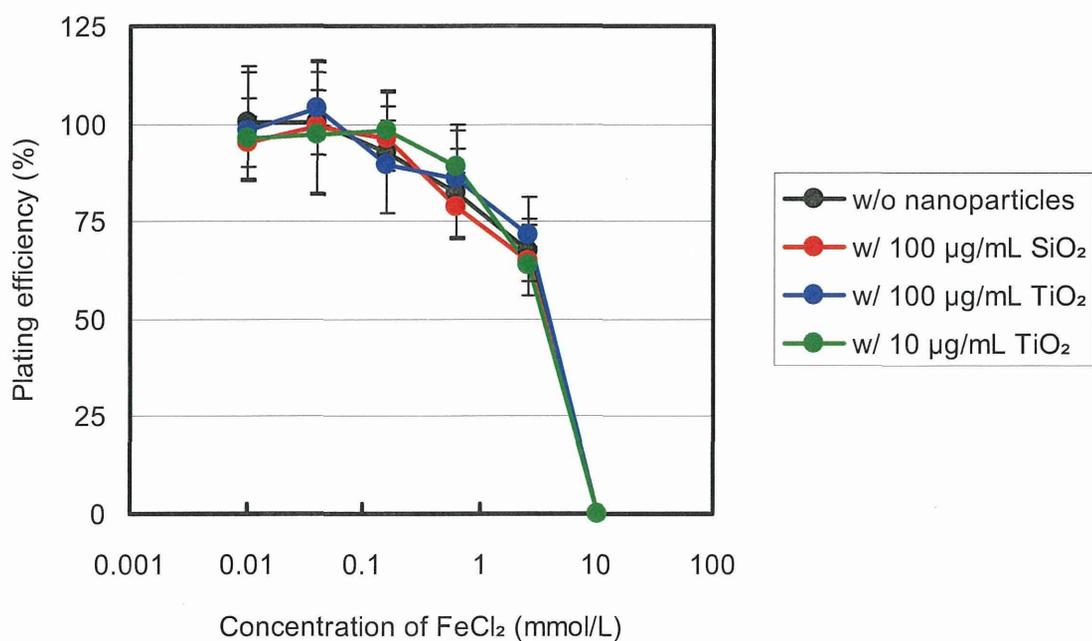


図5 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるFeCl<sub>2</sub>のコロニー形成率

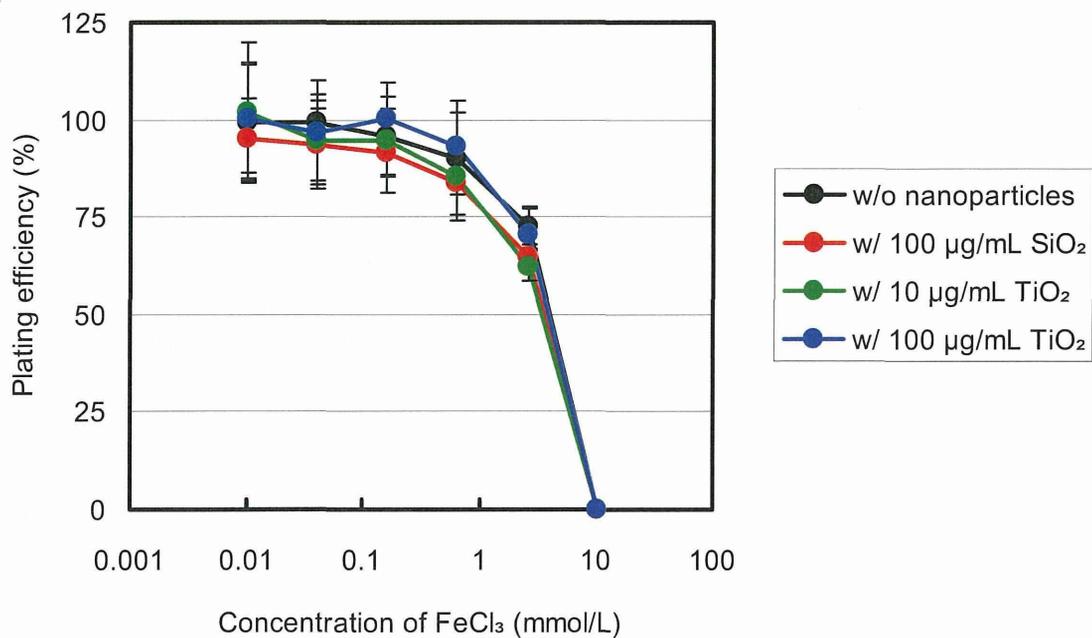


図6 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるFeCl<sub>3</sub>のコロニー形成率

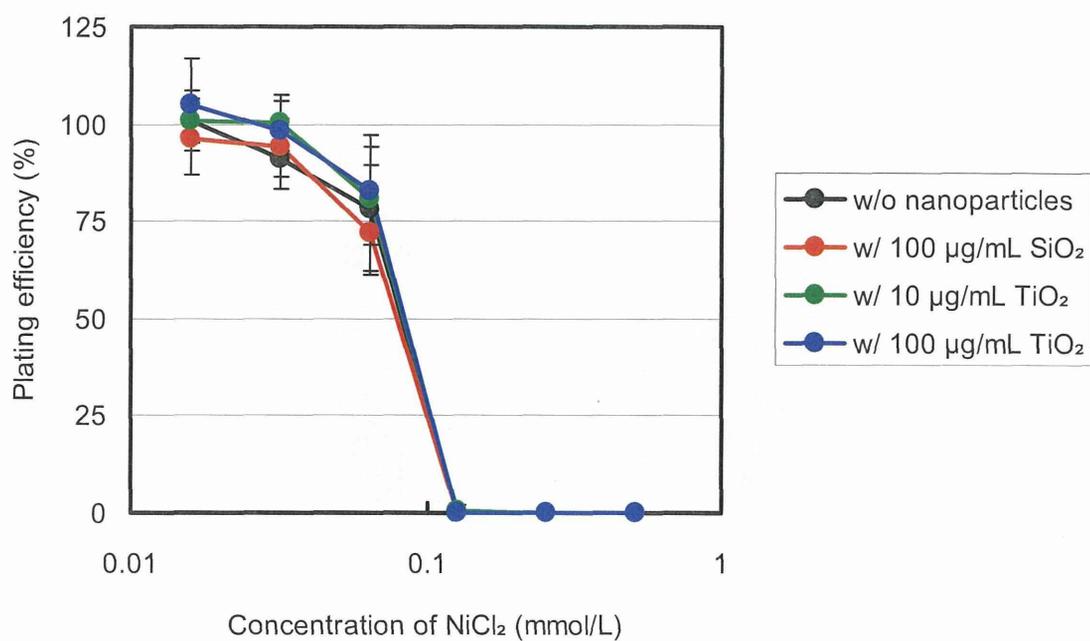


図7 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるNiCl<sub>2</sub>のコロニー形成率

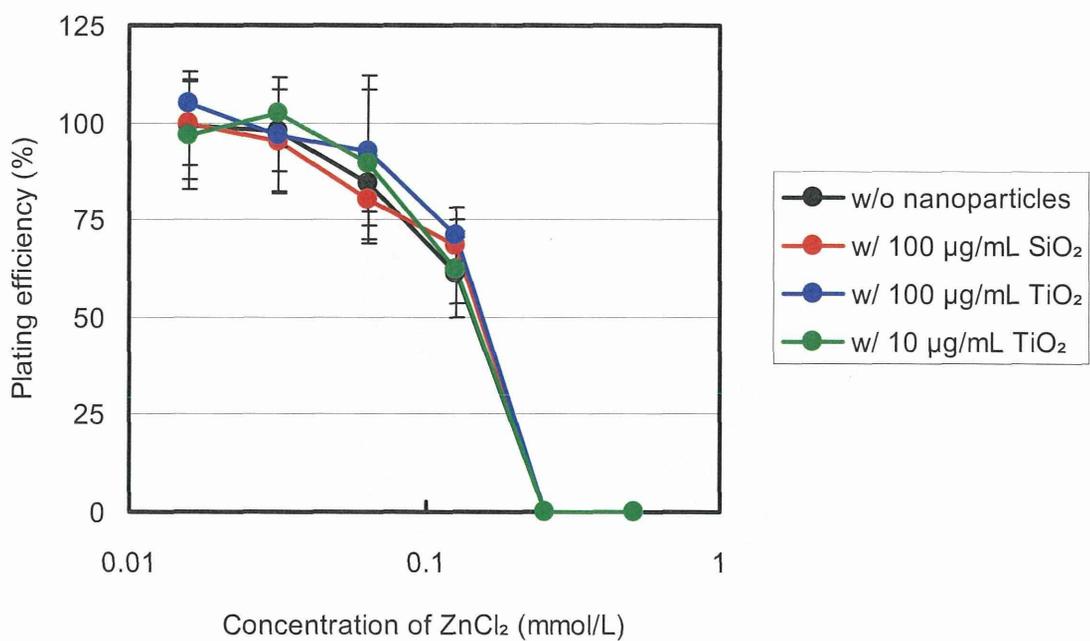


図8 SiO<sub>2</sub>ナノ粒子及びTiO<sub>2</sub>ナノ粒子共存下におけるZnCl<sub>2</sub>のコロニー形成率

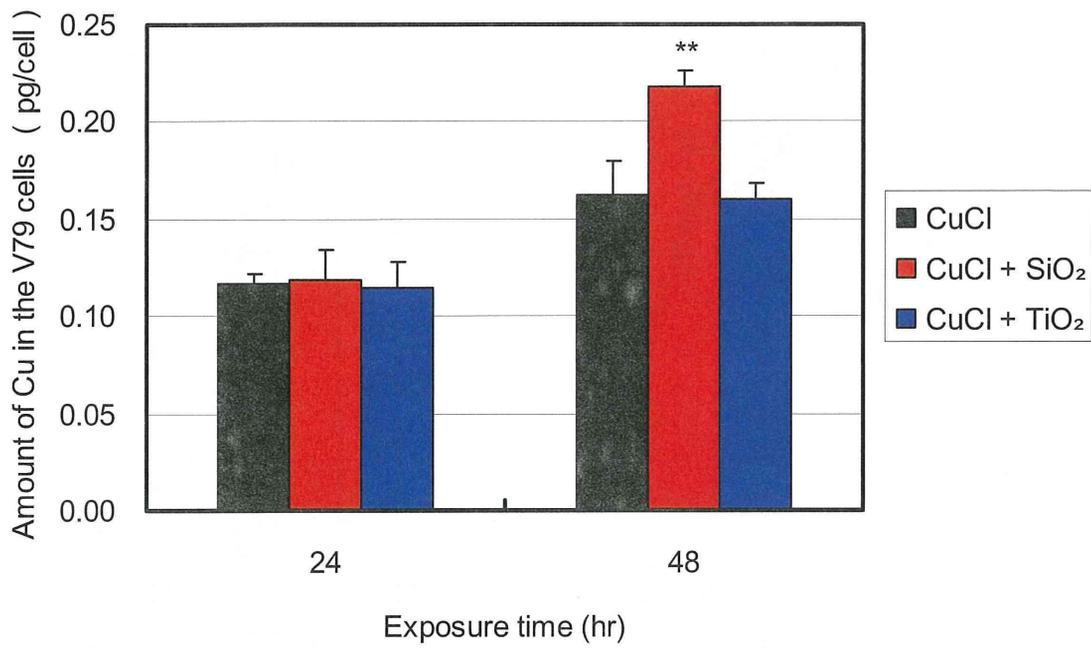


図 9 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl を曝露した V79 細胞内の銅濃度 (\*\*p<0.01)

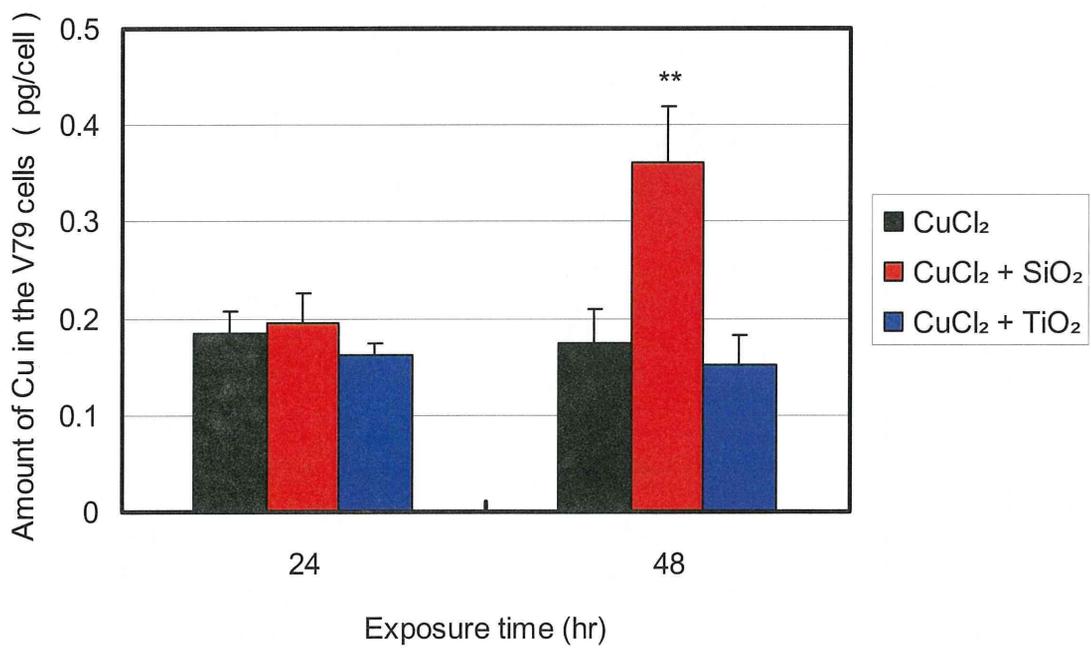


図 10 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で CuCl<sub>2</sub> を曝露した V79 細胞内の銅濃度 (\*\*p<0.01)

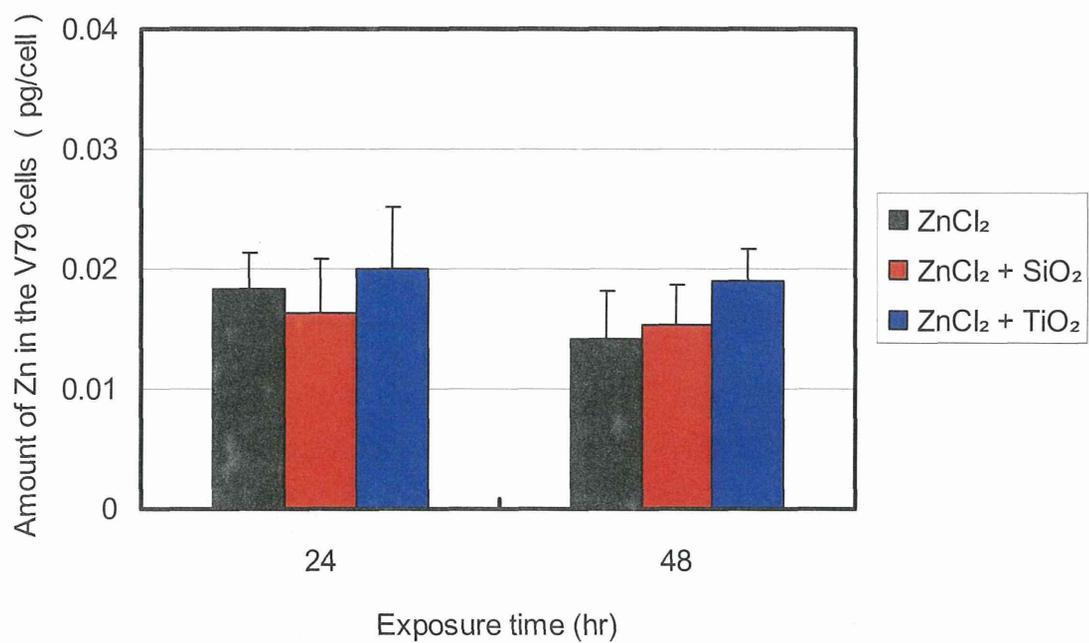


図 11 SiO<sub>2</sub> ナノ粒子及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子共存下で ZnCl<sub>2</sub> を曝露した V79 細胞内の亜鉛濃度

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

ナノマテリアルの遺伝毒性の低減化とそのメカニズムに関する研究

研究分担者 戸塚 ゆ加里 独立行政法人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

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供培養系を構築して、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。

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等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。我々はこれまでに、フラーレン（C60）、カオリン、マグネタイ

ト及び、今後、様々な分野における応用が有望視されている MWCNT 等のナノマテリアルの遺伝毒性について *in vitro* 及び *in vivo* の試験系で検討し、これら全てのナノマテリアルが遺伝毒性を示す事を明らかにした。しかしながら、これらナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性メカニズムについては未だ良くわかっていない。一方、実用化に向け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が積極的に行われていることや、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。しかしながら、このような同種異型のナノマテリアルの安全性評価は、従来の規制手法の応用では限界がある。従って、化学修飾、表面構造、サイズ等の違いがナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に及ぼす影響に関しては緊急に明らかにする必要がある。従って、本研究では、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ことを目的とする。更に、分析化学的手法等を用いたナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムについても検討を行ない、毒性メカニズムに基づいたナノマテリアルの遺伝毒性低減化方法について検討する。本研究の遂行により、有用ナノマテリアルのメカニズムに基づく遺伝毒性低減化方法が明らかとなれば、より安全なナノマテリアルを製造する上に極めて有効な資料を提供する。

## B. 研究方法

今年度は、産地の異なるカオリン、kaolin-K 及び kaolin-U (図 1) 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、RAW264.7 供培養下でのカオリンの A549 に対する影響についても検討を行なった。

### ① フローサイトメーター (FCM) を用いた細胞内取込み量の解析

*In vitro* 実験用の試料として、各 Kaolin を 10 mg/ml となるように 0.05% Tween-80 に懸濁したものを冷蔵保存しておき、使用時に所定の濃度になるように MEM 基本培地に懸濁した。曝露直前に超音波処理により十分に分散させた。

所定の濃度に調製した Kaolin をヒト肺胞上皮細胞 A549 及びマウスマクロファージ様細胞 RAW264 に曝露し、一定時間培養後、余剰の Kaolin 除去し、トリプシン処理により細胞を回収した。得られた細胞浮遊液を用いて FCM 解析し、細胞内の複雑さの指標である側方散乱光強度の違いから、各 Kaolin の細胞内への取込み効率を比較した。

### ② 活性酸素種 (ROS) 産生細胞の解析

kaolin を曝露させた細胞浮遊液に、終濃度 20  $\mu$ M となるように 2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate (DCFH-DA) を添加し、37 °C 遮光下で 30 分間静置した。FCM を用いて、各細胞浮遊液における FS、SS 及び FL2 (励起波長; 485 nm、蛍光波長; 530 nm) を得た。FS、SS 及び FL2 とともに、コントロール群と比較して値が増加している細胞群の割合を算出した。

### ③ 肺胞上皮及びマクロファージ様細胞の共培養系を用いた細胞間相互作用の解析

あらかじめ肺胞上皮細胞 A549 を播種して 24 時間培養した。そこに

ThinCert™ (pore size: 0.4 μm、high density: greiner bio-one) を各 well に入れて、インサート内に  $8 \times 10^5$  cells/2 ml MEM の RAW264 を播種した後、24 時間培養した (図 2)。Kaolin を曝露させた後にトリプシン処理により A549 を回収し、一部をコメントアッセイに、残りの細胞は ROS 産生細胞の解析に供した。

④ 肺胞上皮細胞に対する DNA 損傷性の解析 (Fpg 併用コメントアッセイ)

で得られた細胞浮遊液を、 $8 \times 10^3$  cells/ml に調製した。細胞浮遊液 10 μl と 0.5%NMPA 90 μl をピペッティングにより混和し、そのうち 80 μl を高撥水印刷 MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業) に塗布した後、チップの腹で均一にのばした。その後、4 °C で 10 分間冷却し、完全にアガロースを固化した。項目②で得られた細胞浮遊液 10 μl と 0.5%NMPA 90 μl をピペッティングにより混和し、そのうち 80 μl を高撥水印刷 MAS コートスライドグラス (松浪硝子工業) に塗布した後、チップの腹で均一にのばした。その後、4 °C で 10 分間冷却し、完全にアガロースを固化した。スライド標本を染色ビンに並べた後、予め調製して 4 °C で冷却しておいた細胞溶解液に浸した。浸した状態で 4 °C 遮光下で一晩、細胞溶解した。氷上のサブマリン式電気泳動槽に、予め調製して冷却しておいた電気泳動バッファーを注ぎ、その中にスライド標本を浸して 15 分間 DNA の巻き戻しを行った。その後、25 V、300 mA で 15 分間電気泳動した。泳動槽から慎重に取り出したスライドグラスを、0.4 M Tris buffer に 5 分間浸して中和した。スライド標本をエタノールに浸し、脱水固

定した。室温で完全に乾燥し、観察時まで保管した。10000 倍希釈した CYBRGold 70 μl をスライド上に塗布し、チップの腹でのばした後、室温遮光下で 10 分間染色した。アガロースが剥がれないように注意しながら、超純水に 10 分間浸し、余剰な CYBRGold を洗浄した。超純水で 3 回洗浄した後、室温遮光下で完全に乾燥させた。スライド標本の解析は、蛍光顕微鏡を用いて、最終倍率 200 倍で行った。1 検体につき 100 個の細胞を解析し、画像解析ソフト (Comet assay IV) を用いて、解析パラメーター (Tail intensity (%)) を自動算出した。Tail intensity (%): 全体の DNA 量 (%) - 核の DNA 量 (%)

⑤ RAW264 培養上清中の IL-1β および TNF-α の定量

6 well plate に RAW264 を  $2 \times 10^6$  cells/well で播種して、24 時間前培養した後、各 well に Kaolin を曝露して、24 時間培養した。次に、Immunoassay Kit, Mouse IL-1β (BioSource International) および Quantikine® Mouse TNF-α (R&D Systems) を用いて培養上清中 IL-1β、TNF-α の定量を行った。

(倫理面への配慮)

尚、本研究で行った動物実験は、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行った。

C. 研究結果

昨年度に得られた、*in vivo* コメントアッセイによる肺の DNA 損傷性は kaolin-K に比べ kaolin-U で、およそ 2~3 倍高い tail intensity を示した。また、kaolin-K

に比べ、kaolin-U はより効率的に A549 および RAW264.7 細胞内に取り込まれており、また、A549 よりも RAW264.7 に積極的に取り込まれることが明らかとなった。

RAW264.7 において、kaolin-U を曝露させた時の ROS 産生細胞数の出現が kaolin-K に比べ約 3 倍多かった。一方、A549 においては、いずれのカオリンも殆ど ROS 産生をしていないことがわかった。これらの結果から、マクロファージ様細胞である RAW264 が、Kaolin 粒子を取り込むことで ROS を産生するということが確認された。このことから、Kaolin による遺伝毒性が、マクロファージ細胞から放出される ROS、もしくはその他の因子により周囲の実質細胞にもたらされているものと推察した。そこで、A549 と RAW264 を同一培地内で共培養し、RAW264 のみに Kaolin を曝露した際に A549 にもたらされる影響を確認した。

#### ① 共培養による上皮細胞への影響

共培養系の RAW264 のみに各 Kaolin を 24 時間曝露し、その後 A549 のみを回収し、FCM 解析及び Fpg 併用コメットアッセイを行った。

SS 強度による細胞内取込みの確認を行ったところ、陰性対照群と変わらなかったことから、RAW264 に曝露した Kaolin が、インサートのメンブレンを通過していないことを確認した (図 3)。一方、RAW264 に Kaolin を曝露すると、陰性対照に対して、A549 における ROS 産生細胞の割合が増加していた。また、Kaolin-K に比べ Kaolin-U を曝露した群において、ROS 陽性細胞の割合が大きかったことから、RAW264 への取込み量と相関していた (図 3)。一方、このときの A549 における DNA 損傷を確認したところ、陰性対照の Tail intensity (%) が  $2.19 \pm 0.38$  であるのに対し、Kaolin-K では  $3.17 \pm 0.73$ 、

Kaolin-U では  $4.34 \pm 0.42$  ( $p < 0.01$ ) となり、ROS 産生細胞の結果と一致した (図 4)。また A549 を単体で培養した時に比べ、RAW264 と共培養した際には、A549 における Tail intensity が増大したことから、免疫系細胞であるマクロファージが共存することで周囲の実質細胞は何らかの影響を受け、さらにそのマクロファージが Kaolin 粒子を取り込むことでその影響が促進するものと推察された。また、この DNA 損傷性は DNA の酸化的損傷を切断する酵素である Fpg(Formamidopyrimidine [fapy]-DNA glycosylase)処理により上昇していたことから、これらカオリンで誘発された DNA 損傷の一部には酸化ストレスが関与していることが示唆された (図 4)。

#### ② RAW264 培養上清中の炎症性サイトカイン量

共培養系で A549 にみられた影響が、Kaolin を取込んだ RAW264 から細胞外に放出される炎症性サイトカインによるものと推察した。そこで、RAW264 に Kaolin を 24 時間曝露した培養上清中の IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  を、ELISA 法 (サンドイッチ法) を用いて測定した (図 5、6)。

Control での IL-1 $\beta$  及び TNF- $\alpha$  濃度は  $114.5 \pm 14.9$  及び  $89.0 \pm 31.9$  pg/ml だった。一方 Kaolin-K 及び Kaolin-U を曝露したところ、IL-1 $\beta$  濃度は  $191.1 \pm 62.2$  及び  $360.4 \pm 94.8$  pg/ml に、TNF- $\alpha$  濃度は  $900.7 \pm 245.3$  及び  $1167.8 \pm 42.0$  pg/ml に増加し、IL-1 $\beta$  濃度は Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が有意に高かった。TNF- $\alpha$  濃度も、Kaolin-K に比べ Kaolin-U の方が高い傾向がみられた。

#### D. 研究発表

##### 1. 論文発表

1) 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*, 2013 7: 452-61.

2) 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* 2012, *in press*.

3) Ishino K, Mutoh M, Totsuka Y, Nakagama H. Metabolic syndrome: A novel high-risk state for colorectal cancer. *Cancer Lett*, 2012, *in press*.

4) 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*. 2012, *in press*.

5) 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.

## 2. 学会発表

1) 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 (ドーハ、カタール、26-29, March, 2012).

2) 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ノン(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、9 月 19-21 日)

3) 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、9 月 19-21 日)

4) 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 (杭州、中国、10 月 23-26 日)

5) 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 (杭州、中国、10 月 23-26 日)

6) 戸塚ゆ加里；ナノマテリアルの遺伝毒性発言メカニズム、第 41 回大会 日本環境変異原学会 (静岡、11 月 29-30 日)

7) 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、11 月 29-30 日)

8) 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、11 月 29-30 日)

9) 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、11 月 29-30 日）

10) 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、11 月 29-30 日）

11) 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、11 月 29-30 日）

#### E. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

##### 1. 特許取得

特に無し

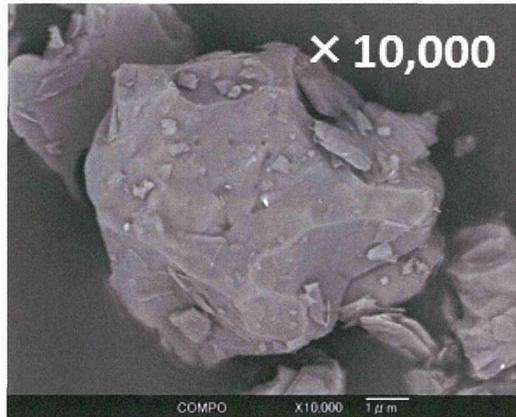
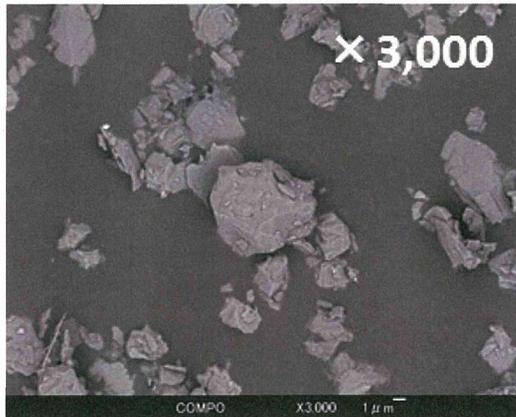
##### 2. 実用新案登録

特に無し

##### 3. その他

特に無し

## Kaolin-K



## Kaolin-U

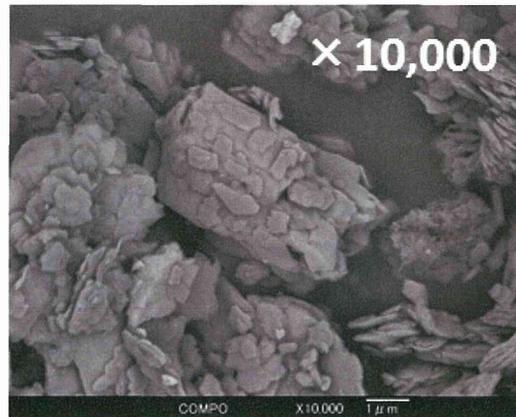
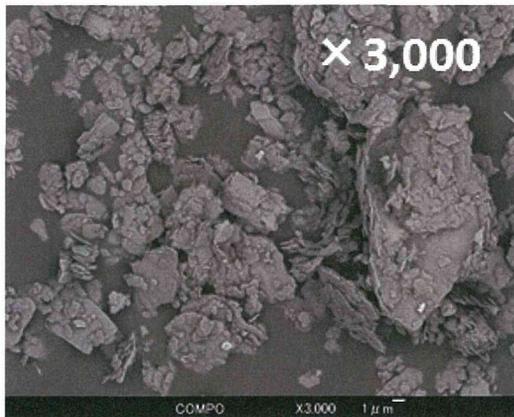


図1 kaolin K および kaolin U の SEM 像

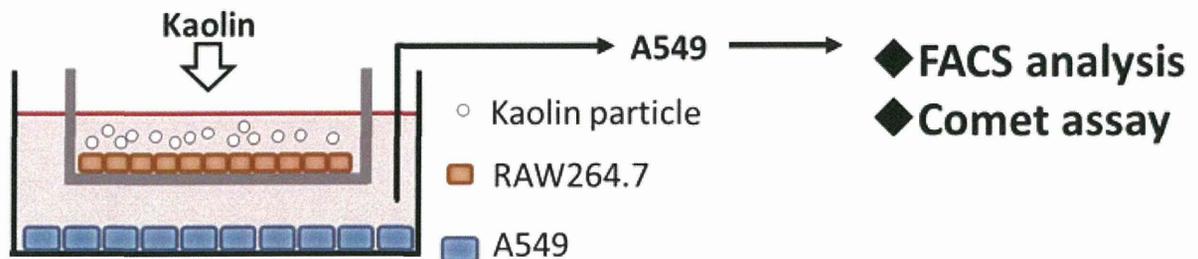


図2 肺胞上皮及びマクロファージ様細胞の共培養系

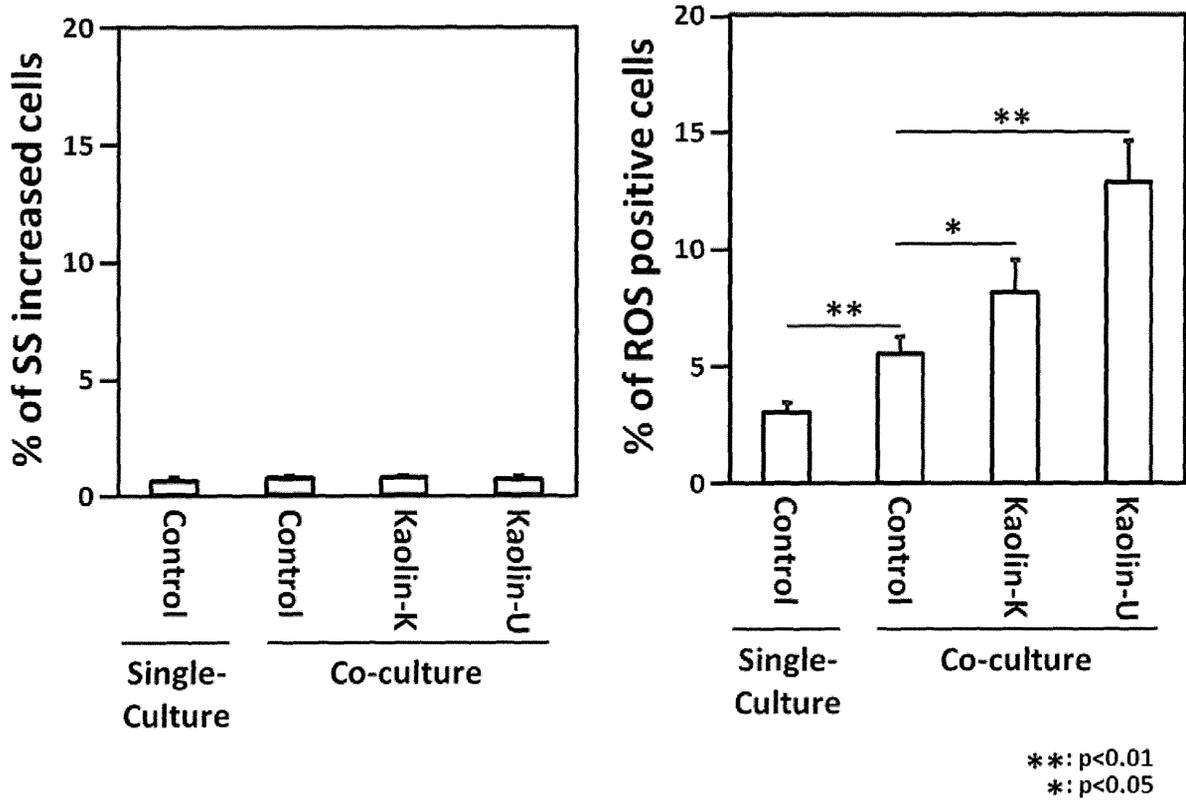


図3 RAW264 との共培養による A549 の ROS 産生能