

(2×10^5 cells/well) し、24 時間後に試験液を添加して NiO ナノマテリアルを 24 および 48 時間曝露させた。曝露濃度は 1~25 $\mu\text{g/mL}$ とし、比較対象として、塩化ニッケル (NiCl_2) および培地のみの条件でも検討した。培養後、培地を除去し、各 well を PBS で繰り返し洗浄した後、トリプシン処理して細胞を回収した。回収した細胞を PBS で繰り返し洗浄後、細胞数を計測した。細胞内の Ni 量の測定は、昨年度の伊佐間らの報告¹⁵⁾に従って行った。すなわち、回収した細胞に 2%塩酸を加えて 60°C で 2 時間加温し、細胞内の Ni を抽出した。抽出液は 5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後に、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター (ザルトリウス) を用いてろ過した。この溶液中の Ni 濃度を、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) を用いて Ni 量を測定した。

ICP-MS は Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Inc.) を用いた。測定条件は、高周波出力: 1500W、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: 0.33 L/min、コリジョンガス: He 5mL/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 0.1 sec/element、測定回数: 3 times とした。

Ni 標準液 (1000 mg/mL: 和光純薬工業製) を、5%硝酸溶液で段階希釈し標準溶液とした。また、Ag の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を 5%硝酸で 5 $\mu\text{g/L}$ に希釈したものを内部標準液として用いた。Ni および Ag の測定質量電荷比 (m/z) は、60 および 107 とした。Ni のバックグラウンド濃度は 0.536 $\mu\text{g/L}$ であった。

B.4 金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC に対する Tween 80 の影響

表 1 に示した、 Al_2O_3 、 CeO_2 、ITO、 TiO_2 、

ZnO-Sigma および ZnO-Alfa の 5 種類 (6 試料) を 10 mg/mL (懸濁液) の濃度になるように、Milli-Q 水で調製した。その際に、Tween80 を 0.1% (w/v) 含むように添加したものと、非添加の 2 種類を調製した。これらの金属酸化物ナノマテリアル懸濁液について、ELSZ-2 および pH タイトレーターシステム ELSZ-PT を用いて、懸濁液中の各 pH 条件下での平均粒子径 (n=3) およびゼータ電位 (n=4、レーザードップラー法) を測定した。

C. 結果および考察

C.1 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の調製

各破碎ジルコニアボール径で調製した、NiO ナノマテリアル懸濁原液 (10 mg/mL) および 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.05、0.1、0.2 および 0.4 mg/mL) の平均粒子径を表 2 に示した。また、懸濁原液および 0.2 mg/mL の 10%FBS-MEM 懸濁液の粒径分布の様子を散乱強度分布 (図 1. 左) および個数分布 (図 1. 右) としてそれぞれ示した。

破碎ジルコニアボール径が小さくなるにつれて、懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液ともに平均粒子径も小さくなり、破碎ジルコニアボール径の異なる懸濁液間では、どの濃度でも平均粒子径サイズが異なっていることが確認できた。また、懸濁原液と 10%FBS-MEM 懸濁液では、後者の方がやや平均粒子径は大きくなっていたが、10%FBS-MEM 懸濁液の各濃度間では、どの濃度でも同程度の平均粒子径となった。また、37°C で 24 時間静置した各懸濁液の平均粒子径を測定したところ、ほとんど変化がないことが確認できた (表 2)。粒径分布についても、懸濁原液および 10%FBS-MEM とともに、散乱強度分布および個数分布どちらの分布図でも、破碎ジル

コニアボール径が小さくなるほど、そのピークが粒径の小さい側にシフトしていくことが確認できた。

このように、NiO ナノマテリアルについて、細胞毒性試験に供試出来得る二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製ができた。

C.2 二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性試験

前項で調製した NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて細胞毒性試験を行った結果、破碎ジルコニアボール径サイズが大きい、すなわち懸濁液中の NiO 二次粒子径サイズが大きいほど、細胞毒性曲線は低濃度側にシフトすることが認められた (図 2)。また、細胞毒性曲線より各懸濁液の IC₅₀ 値は、φ0.05 mm (147.5 μg/mL)、φ0.1 mm (83.5 μg/mL) および φ0.5 mm (33.4 μg/mL) と算出された。これらのことから、一次粒子径サイズが同じ NiO ナノマテリアル懸濁液において、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなることが明らかとなった。

次に、二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を曝露した後の A549 細胞中の Ni 量を測定した結果を図 3 に示した。その結果、各懸濁液ともに、曝露量が多くなるほど細胞内 Ni 量が多くなっていた。また、二次粒子径サイズの異なる試料間で比較すると、二次粒子径サイズが大きいほど、細胞内の Ni 量は多くなっていた。一方で、対照とした培地の場合と、Ni イオンの影響を評価するために NiCl₂ 溶液を曝露した場合には、懸濁液を曝露した試料に比べて細胞内の Ni 量は非常に少なかった。

Horie et al¹⁶⁾は NiO ナノマテリアルおよび NiCl₂ について、HacaT 細胞および A549 細胞を用いた細胞毒性試験を行っている。そして、どちらの細胞においても、試験液

中 Ni イオン濃度が同一の場合には、NiO ナノマテリアル懸濁液の方が細胞毒性は強く、Ni イオンのみならず NiO も細胞毒性に影響していると報告している。今回行った試験では、NiO 懸濁液中の Ni 濃度は 0.786~19.6 μg/mL であり、NiCl₂ 溶液中の Ni 濃度は 0.0587~2.94 μg/mL である。昨年度、超音波処理により調製した NiO 懸濁液中の Ni イオン濃度を測定したところ、その溶出量は 20%程度であった¹⁷⁾。懸濁液の調製方法が異なるが、今回の懸濁液の Ni 溶出率が昨年度と同程度 (20%) と仮定すると、その懸濁液中 Ni イオン濃度は 0.1572~3.92 μg/mL となる。この濃度は今回曝露した NiCl₂ 溶液中の Ni イオン濃度とほぼ同じであるが、細胞内の Ni 量は大きく異なっていた。このことから、NiO 懸濁液を曝露した A549 細胞から検出された Ni は、Ni イオンとして取り込まれたものではなく、NiO として細胞内に取り込まれた可能性が高いと考えられた。また、二次粒子径サイズが大きいほど毒性が強く、細胞内の Ni 量も多かったことから、細胞内への NiO ナノマテリアルの取り込みに二次粒子径サイズが影響し、そのサイズが大きいほど細胞内に取り込みやすく、細胞毒性が強くなったと考えられた。

しかしながら、細胞回収操作で洗浄しているが、洗浄後も細胞表面に NiO が付着している可能性も排除できないことから、今後、透過型電子顕微鏡を用いた細胞内の直接観察や、細胞内への NiO ナノマテリアルの取り込み阻害試験などにより、検証する必要がある。

C.3 金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC に対する Tween 80 の影響

Tween80 添加および非添加条件下での Al₂O₃、CeO₂、ITO、TiO₂、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液 (10 mg/mL) の各 pH

におけるゼータ電位を図4に、平均粒子径を図5に示した。また、図4に示したゼータ電位変化からゼータ電位がゼロとなるpHをPZCとして求め表3に示した。

Tween80 添加および非添加条件ともに、pH が大きくなると、ゼータ電位は低下する傾向が認められた。ただし、ZnO-Sigma では、その Zeta 電位は Tween80 非添加時に pH3 から 6 にかけて低下した後、pH7 にかけて大きく上昇した。その後、pH の上昇と共にゼータ電位は低下し、PZC は 10.51 と他に比べて大きい値となった。これは、ZnO-Sigma には分散剤として 3-aminopropyltriethoxysilane が添加されていることが影響しているものと考えられた。Tween80 添加条件下では、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液のゼータ電位の pH による変化の様子はおおむね同じ傾向を示した(図4)。また、ZnO-Alfa を除き、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC は Tween80 添加条件下の方が非添加条件下よりも低い値を示し、各金属酸化物ナノマテリアル間における PZC 値の差は小さくなっていた。

Tween80 非添加条件下での各 pH における平均粒子径は、ZnO-Alfa を除き、PZC よりも少し低い pH から PZC にかけて、粒子径が増大し、金属酸化物ナノマテリアルが凝集していることが明らかとなった。これは、金属酸化物ナノマテリアルのゼータ電位および平均粒子径と pH との関連を調べた既報の結果と一致していた¹⁸⁾。一方、Tween80 添加条件下では ZnO-Sigma を除き、どの pH 条件下においても平均粒子径サイズに変化は認められなかった。昨年の報告¹⁷⁾では、10%FBS-MEM で調製した各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液について、Tween80 を添加したほうが凝集しにくく平均粒子径サイズが小さくなることを明らかにしているが、その要因の一つとして、

Tween80 により金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の pH 変化による凝集を抑制する効果が影響していると考えられた。ZnO-Sigma で Tween80 添加による凝集抑制効果が認められなかった理由の一つとして、分散剤として 3-aminopropyltriethoxysilane が添加されていることが影響していると考えられた。

D. まとめ

NiO ナノマテリアルについて、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液(例: 0.4 mg/mL の平均粒子径 154.8~373.1 nm)を調製し、それらについて A549 細胞を用いた細胞毒性試験を行った。その結果、二次粒子径サイズが大きくなるほど細胞毒性は強くなる(IC₅₀: 33.4~147.5 μg/mL)ことが明らかとなった。これらの試料について、細胞内の Ni 量を測定したところ、二次粒子径サイズが大きい NiO ナノマテリアル懸濁液を曝露した細胞ほど、細胞内の Ni 量が多いことが明らかとなった。このため、二次粒子径サイズが大きいほど NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量が多く、その結果、細胞毒性が強くなったと考えられた。

Al₂O₃、CeO₂、ITO、TiO₂、ZnO-Sigma および ZnO-Alfa 懸濁液(10 mg/mL)について、Tween80 添加および非添加条件下での PZC を測定し、その分散状態に対する Tween80 添加の影響について検討した。その結果、Tween80 を添加することで、ZnO-Alfa を除き、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の PZC 値は小さくなった。また、ZnO-Sigma を除き、Tween80 添加により、酸性から塩基性まで幅広い pH 範囲で、各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の平均粒子径サイズに変化は認められなかった。そのため、Tween80 には金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の pH 変化による凝集を抑制

する効果があると考えられた。

E. 謝辞

CIK ナノテックから試験に供試した金属酸化物ナノマテリアルを、株式会社シンキーから湿式粉碎に用いた直径 0.05 mm のジルコニアボールを提供して頂きました。ここに謝意を表します。

F. 引用文献

- 1) Whatmore R.W.: Nanotechnology - what is it? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006
- 2) Aitken R.J., Chaudhry M.Q., Boxall A.B.A., Hull M.: Manufacture and use of nanomaterials: current status in the UK and global trends, *Occup. Med.*, 56, 300-306, 2006
- 3) Lux Report.: Nanomaterials State of the Market Q3 2008: Stealth Success, Broad Impact, https://portal.luxresearchinc.com/research/document_excerpt/3735, 2008"
- 4) ナノマテリアルの安全対策に関する検討会: ナノマテリアルの安全対策に関する検討会報告書, <http://www.mhlw.go.jp/houdou/2009/03/dl/h0331-17c.pdf>, 2009
- 5) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 6) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 7) Song Y., Li X., Du X.: Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma, *Eur. Respir. J.*, 34, 559-567, 2009
- 8) Song Y., Li X., Wang L., Rojanasakul Y., Castranova V., Li H., Ma J.: Nanomaterial in humans: Identification, characteristics, and potential damage, *Toxicol. Pathol.*, 39, 841-849, 2011
- 9) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 10) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 11) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Ledo, Yu R., Zhao H., Lan M.: Study on controllable preparation of silica nanoparticles with multi-sizes and their size-dependent cytotoxicity in pheochromocytoma cells and human embryonic kidney cells, *J. Health Sci.*, 56, 632-640, 2010
- 12) Karlsson H.L., Gustafsson J., Cronholm P., Möller L.: Size-dependent toxicity of metal oxide particles - A comparison between nano- and micrometer size, *Toxicol. Lett.*, 188, 112-118, 2009
- 13) Xu M., Fujita D., Kajiwara S., Minowa T., Li X., Takemura T., Iwai H., Hanagata N.: Contribution of physicochemical characteristics of nano-oxides to cytotoxicity, *Biomaterials*, 31, 8022-8031, 2010
- 14) Kobayashi N., Naya M., Endoh S., Maru J., Yamamoto K., Nakanishi J.: Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO₂ particles of different sizes and agglomerations in rats: Different short- and long-term post-instillation results, *Toxicology*, 264, 110-118, 2009
- 15) 伊佐間和郎・河上強志: 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, 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H23-化学-一般-006)

- 16) Horie M., Nishio K., Fujita K., Kato H., Nakamura A., Kinugasa S., Endoh S., Miyauchi A., Yamamoto K., Murayama H., Niki E., Iwahashi H., Yoshida Y., Nakanishi J.: Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release, *Chem. Res. Toxicol.*, 22, 1415-1426, 2009
- 17) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・酒井恵子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 24 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H23-化学-一般-006)
- 18) Berg J.M., Romoser A., Banerjee N., Zebda R., Sayes C.M.: The relationship between pH and zeta potential of ~ 30 nm metal oxide nanoparticle suspensions relevant to *in vitro* toxicological evaluations, *Nanotoxicology*, 3, 276-283, 2009

G. 研究発表

G.1 論文発表

1. 河上強志・伊佐間和郎・五十嵐良明: EU における繊維および革製品中のアゾ染料由来の特定芳香族アミン類の違反事例の特徴, *国立衛研報*, 131, 66-74 (2013)
2. Kitamura K., Maruyama K., Hamano S., Kishi T., Kawakami T., Takahashi Y., Onodera S.: Effect of hypochlorite oxidation on cholinesterase-inhibition assay of acetonitrile extracts from fruits and vegetables for monitoring traces of organophosphate pesticides. *J. Toxicol. Sci.*, 39, 71-81 (2014)
3. 味村真弓・中島晴信・吉田仁・吉田俊明・河上強志・伊佐間和郎: 有害物質含有家庭用品規制法で規制されている繊維製品中のトリス (2,3-ジブロムプロピル) ホスフェイト分析法の改定に向け

た検討, *薬学雑誌*, 134, 259-268 (2014)

G.2 学会発表

1. 伊佐間和郎・河上強志・五十嵐良明, 金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO₂ および TiO₂ ナノ粒子の影響, 第 50 回全国衛生化学技術協議会年会, 富山市, 2013 年 11 月
2. 宮島敦子・河上強志・加藤玲子・酒井恵子・小森谷薫・新見伸吾・伊佐間和郎, 酸化金属ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性および遺伝毒性, 日本薬学会第 134 回年会, 熊本, 2014 年 3 月
3. 河上強志・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子・伊佐間和郎, NiO ナノ粒子の細胞毒性に及ぼす懸濁液中の二次粒子径の影響, 日本薬学会第 134 回年会, 熊本, 2014 年 3 月
4. Isama K., Kawakami T., Miyajima A., Matusoka A. Effect of SiO₂ and TiO₂ nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides, 7th International Conference on Materials for Advanced Technology, Suntec City, Singapore, July 2013

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

なし

表1. 実験に用いた金属酸化物ナノマテリアルの性状、販売元、一次粒子径など

金属酸化物 ^a	製造(販売)先	一次粒子径 ^b (nm)	比表面積 ^b (m ² /g)	比表面積 ^c (m ² /g)	入手時濃度 (重量%)	pH ^c	形状 ^b	外観(色)	
酸化アルミニウム	Al ₂ O ₃	31	55	50.4	10%	4.7	球状	無色	
酸化セリウム	CeO ₂	CIK ナノテック	14	60	84.4	10%	4.3	多面体	淡黄白色
酸化インジウムスズ	ITO		30	30	44.4	15%	4.3	角状	黒みがあった灰色～緑色固体
二酸化チタン	TiO ₂	36	45	41.6	10%	2.4	球状 (アナターゼ80%)	白色	
<u>酸化ニッケル</u>	NiO	Sigma-Aldrich	< 50	-	-	-	-	黒色	
酸化亜鉛 ^d	ZnO-Sigma		< 35	-	-	50%	-	白色	
酸化亜鉛	ZnO-Alfa	Alfa Aesar	40	-	-	40%	-	白色	

^a 下線の無いものは水に懸濁させた状態で入手し、下線のある金属酸化物ナノマテリアル試料は粉体を秤量後に遊星ボールミル型粉砕機で調製した

^b 各メーカーカタログより(Sigma-AldrichおよびAlfa Aesarの金属酸化物の1次粒子径はエアロダイナミックパーティクルサイザー(APS)によるデータ)

^c メーカーの検査成績表より

^d 3-Aminopropyltriethoxysilaneを分散剤として2%含有

表2. NiOナノマテリアル懸濁液中の二次粒子の平均粒子径(nm)^a

NiO濃度	破碎ジルコニアボール径		
	φ 0.5 mm	φ 0.1 mm	φ 0.05 mm
10 mg/mL ^b	310.4 ± 6.7	172.0 ± 2.8	102.0 ± 0.5
0.4 mg/mL ^c	373.1 ± 0.6	234.7 ± 2.2	154.8 ± 1.2
24h ^d	367.7 ± 11.7	225.9 ± 3.9	147.2 ± 0.5
0.2 mg/mL ^c	411.9 ± 13.1	249.9 ± 4.2	152.6 ± 2.5
24h ^d	371.2 ± 11.4	219.3 ± 0.7	135.4 ± 3.0
0.1 mg/mL ^c	345.1 ± 15.4	258.0 ± 1.5	151.2 ± 3.0
24h ^d	369.0 ± 5.6	217.1 ± 2.0	132.2 ± 2.2
0.05 mg/mL ^c	414.2 ± 5.8	234.5 ± 17.8	135.2 ± 1.5
24h ^d	348.7 ± 11.3	206.9 ± 1.4	130.4 ± 15.2

^a Tween 80 [0.1% (w/v)] を分散剤として使用

^b 標準原液.

^c 10%FBS-MEM 懸濁液.

^d 24時間後(37°C)

表3. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液のPZC^a

金属酸化物 ナノマテリアル	PZC	
	Tween80(-)	Tween80(+)
Al ₂ O ₃	9.28	5.55
CeO ₂	7.75	6.10
ITO	8.00	5.17
TiO ₂	6.15	5.50
ZnO-Sigma ^b	10.51	4.17
ZnO-Alfa	2.43	2.59

^a懸濁液中金属酸化物ナノマテリアル濃度は10 mg/mL

^b3-Aminopropyltriethoxysilaneを分散剤として2%含有

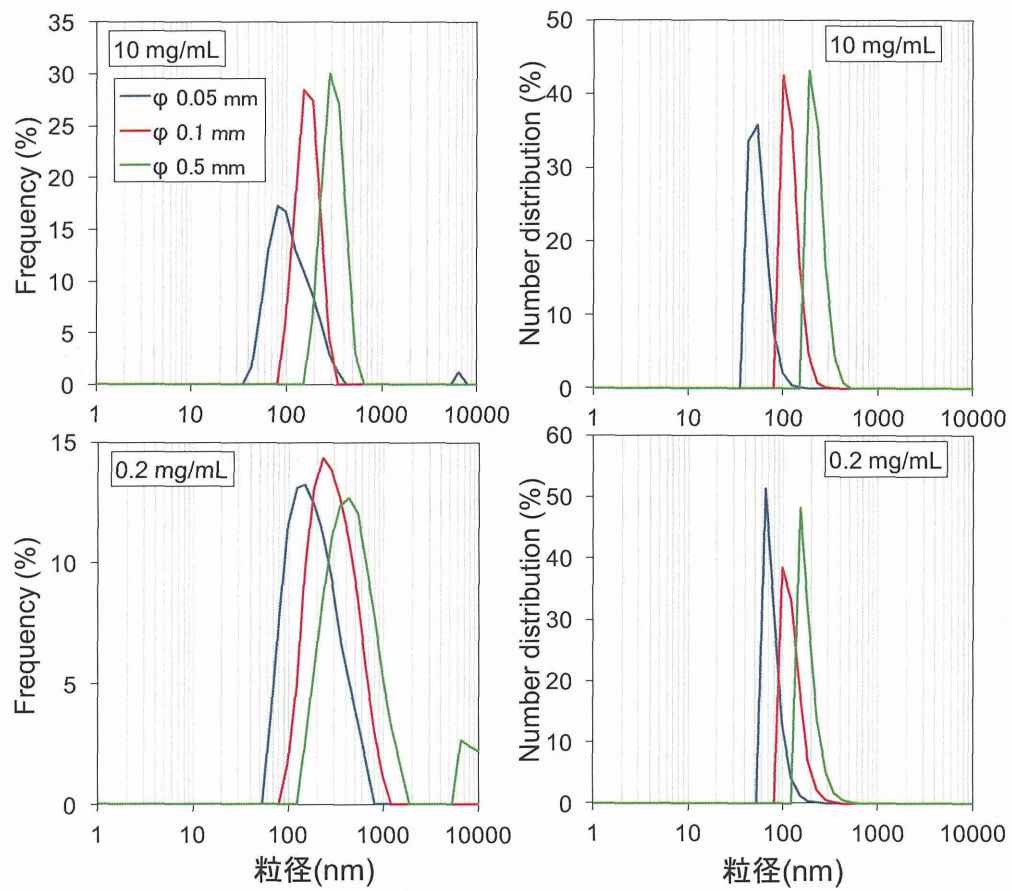


図 1. NiO ナノマテリアル懸濁原液 (10 mg/mL) および 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) 中の粒径分布 (左:散乱強度分布、右: 個数分布)

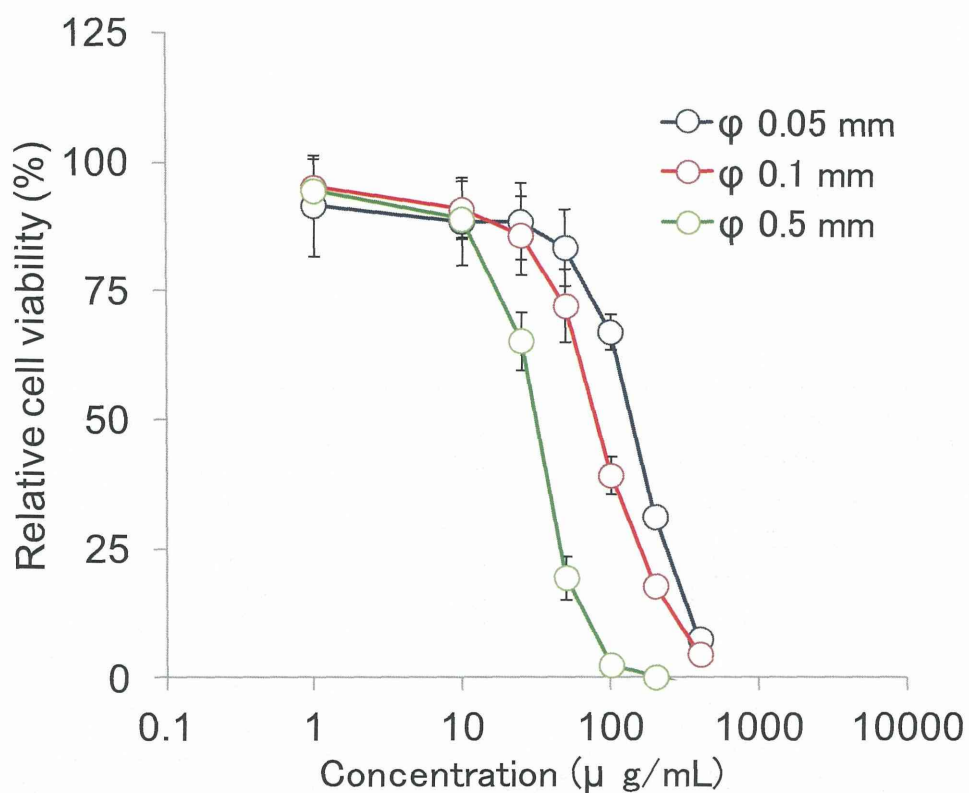


図 2.二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性曲線 (MTS 法、48 時間曝露)

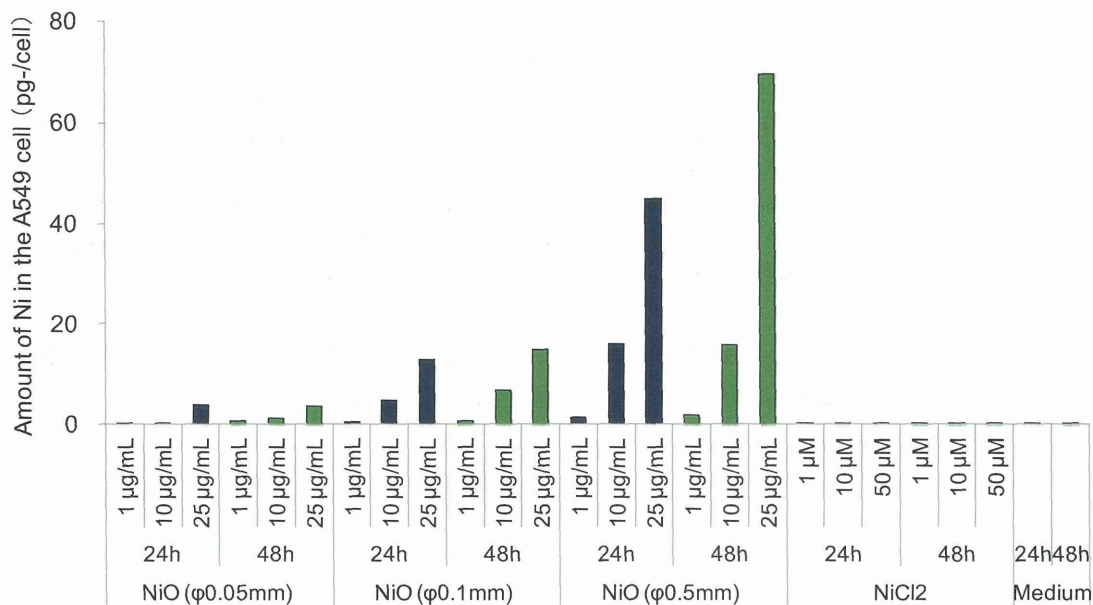


図 3.二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液、NiCl₂ 溶液および対照試料 (培地のみ) 曝露後 24 および 48 時間後の A549 細胞中 Ni 量

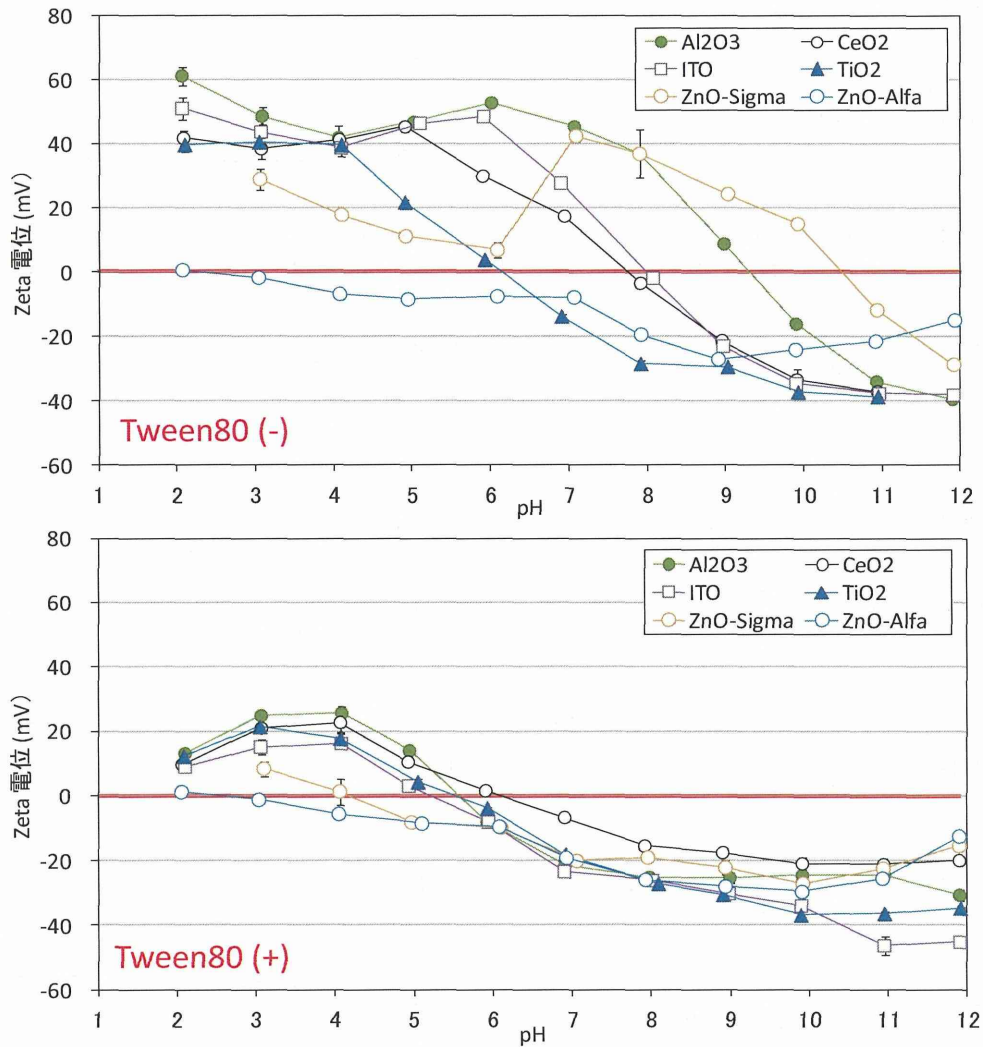


図 4. Tween80 添加 (+) および非添加 (-) 条件下での各金属酸化物 ナノマテリアル原液 (10 mg/mL) の各 pH でのゼータ電位

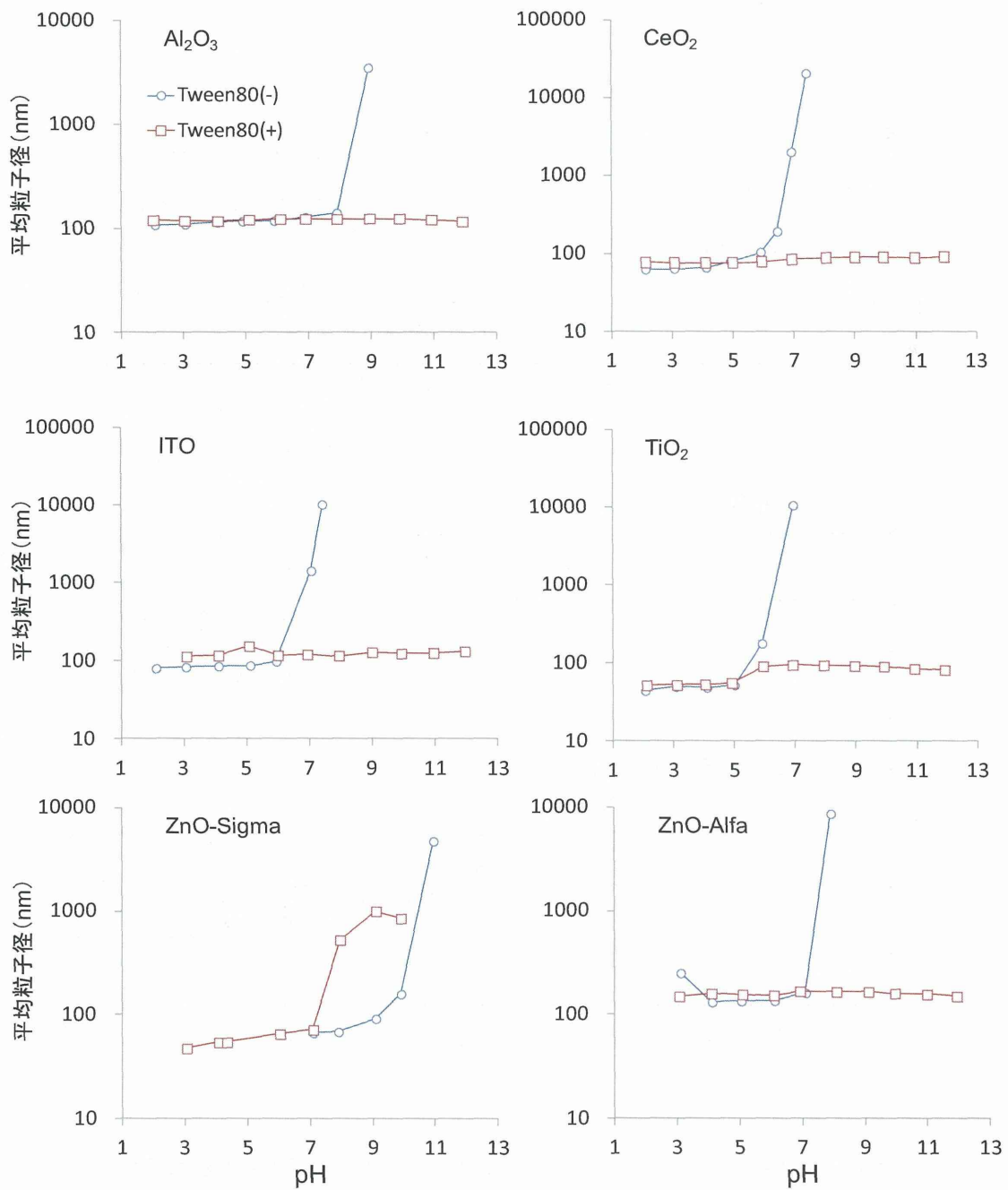


図 5. Tween80 添加 (+) および非添加 (-) 条件下での各金属酸化物
ナノマテリアル原液 (10 mg/mL) の各 pH での平均粒子径

厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク 研究事業)
課題名 ナノマテリアルの in vitro 評価系構築に向けた基礎研究
分担研究平成 25 年度報告書

(分担研究課題名) ナノマテリアルの in vitro 評価系構築に向けた基礎研究

研究分担者 吉田 緑 国立医薬品食品衛生研究所 病理部 室長

研究要旨：平成 24 年までの研究で検討した培養細胞の電顕観察用標本の作製方法条件で、A549 細胞に酸化亜鉛および酸化ニッケルを 24 時間曝露し電顕観察を行った。その結果、1 および 10 μg 亜鉛曝露群、径 0.05、0.1 および 0.5 μm の酸化ニッケル曝露群ともに細胞壊死、アポトーシスの増加等は観察されず、曝露による明らかな細胞傷害像を特定することはできなかった。ニッケル曝露細胞ではいずれの粒子径群においても同程度の 0.4~0.6 μm の不整形高電子密度物質が観察され、径 0.5 μm 群では細胞突起が乏しい細胞が豊富な細胞突起を有する細胞と混在して観察された。TEM-EDS 解析においては、細胞質内に亜鉛を検出することはできなかった。これらの結果より、今回の条件下では、酸化亜鉛については曝露による細胞内小器官の明らかな特徴的形態変化を捉えることはできなかった。酸化ニッケルについては粒子径の大きい 0.5 μm 曝露は細胞への影響が強い可能性が示唆された。今回の結果では検出できなかったが、TEM-EDS 解析は細胞質内元素を捉えることが可能であることから有用なツールであると考えられた。

A. 研究目的

本課題の目的は、単純化された培養細胞系において、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、ナノマテリアルの化学組成、サイズ、物性等と細胞への影響との関係を明確にすることであるが、その中で分担研究者は、物理化学的特徴を十分に把握した種々のナノマテリアルを培養細胞に暴露し、細胞内動態を超微形態的に明らかにすることを目的として本研究を行った。通常培養細胞は実態顕微鏡あるいは光学顕微鏡レベルでの形態観察に留まることが多いことから、本研究では超微形態学的検索および元素の細胞内分布を検出できる透過型電子顕微鏡 - エネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて曝露したナノマテリアルの細胞質

内局在を明らかにすることを目的とした。

平成 25 年度は、平成 24 年度までに検討した電子顕微鏡標本作製条件をもとに、A549 細胞に酸化亜鉛および酸化ニッケルを 24 時間曝露し、超微形態学的な観察を行い、酸化亜鉛については細胞内の TEM-EDS の解析を行った。酸化ニッケルについては粒子の大きさにより細胞毒性が異なる結果が得られていることから、粒子径の異なる 3 群について検討を行った。

B. 研究方法

酸化亜鉛およびニッケル曝露培養細胞の電顕観察および曝露物質の細胞内分布 今回の実験条件を図 1 に示した。A549 細胞を 10 cm のディッシュに播種した。翌日 1 および 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の酸化亜鉛、あるいは

粒子径 0.05、0.1 および 0.5 mm の酸化ニッケルを添加して 24 時間曝露した。その後 PBS で洗浄して、スパーテルにて細胞を回収した。電顕観察用に 3%グルタルアルデヒドで 2 時間固定後 1%オスミニウムにて後固定し、アルコール脱水、ブチルグリシジルエーテル置換を経てエポン包埋した。これらを 70 nm に超薄し、酢酸ウラニルと鉛で二重染色し、透過型電子顕微鏡(TEM, JEOL-1400)で観察した。また 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の酸化亜鉛曝露群については、TEM 付属のエネルギー回収 X 線分析装置(EDS)にて、細胞内に元素分析を実施した。

C 結果

曝露培養細胞の形態学的解析

1) 無処置群 図 2-4

A549 細胞は、細胞突起が豊富で、細胞質内にはリボゾームおよびグリコーゲンが認められた。また柱状に折り畳まれるような構造のクリステが小型のミトコンドリア内に認められた。また多くの無処置細胞に大小種々の大きさの空胞が認められた。

2) 酸化亜鉛 図 5-7

酸化亜鉛群での電顕像は前述の無処置細胞とほぼ同様であった。明らかな細胞壊死やアポトーシス細胞の増加は認められなかった。曝露細胞の細胞突起も豊富で、核の異常も認められなかった。細胞質内の形態は無処置群とほぼ同様であった。

3) 酸化ニッケル粒子径 0.05 mm 図 8-10

粒子径 0.05 mm および 0.1 mm の酸化ニッケル曝露群の細胞はいずれも無処置群と同様の豊富な細胞突起を有する細胞が多く認められた。明らかな細胞壊死やアポトーシス細胞の増加は認められなかった。曝露細胞の細胞突起も豊富で、核の異常も認められなかった。細胞質内の形態は無処置群とほぼ同様であった。無処置群と異なる点として、全ての細胞ではないが、多くの細胞

に約 0.4-0.6 μm の電子密度の高い不整形の構造物が細胞質に認められた。しかし、これらが限界膜に囲まれていないものも多いことから、ライソゾーム内に存在しているかは明らかにならなかった。

3) 酸化ニッケル粒子径 0.5 mm 図 11-13

粒子径 0.5 mm の酸化ニッケル曝露群の細胞では、他の群と同様、明らかな細胞壊死やアポトーシス細胞の増加は認められなかった。異なる点として、豊富な細胞突起を有する細胞に混在して、細胞突起の乏しい細胞も多く認められた。核の異常は明らかではなかった。またミトコンドリアが大型化し、クリステが明瞭でない細胞も散見された。しかし、その他の粒子径群と同様の細胞も認められた。また、その他の粒子径群で観察された電子密度の高い不整形の構造物が細胞質に認められた。しかし、その程度は他の群とほぼ同様であった。一部電子密度の高い構造物が層状構造物内に認められた。

4) 酸化亜鉛の細胞内分布 図 14-16

EDS により亜鉛の細胞内分布を細胞全体および細胞内各所について解析を行ったが、細胞全体について、いずれの細胞質にも亜鉛の増加は認められなかった。

D. 考察

A549 細胞に酸化亜鉛および酸化ニッケルを 24 時間曝露し電顕観察を行った。A549 細胞は細胞突起の豊富な細胞で、細胞質にはリボゾームとグリコーゲンを有し、小型のミトコンドリアを含む細胞であった。1 および 10 μg 亜鉛曝露によって、A549 の細胞に特徴的な形態学的変化は核、細胞質ともに観察されなかったことから、いずれの量の酸化亜鉛曝露も今回の実験条件下で影響を明らかにすることはできなかった。

一方酸化ニッケルについては、壊死やアポトーシスなどの顕著な毒性影響は認めら

れなかったものの、投与による影響が認められた。これらの物質の細胞質内分布について一部層状構造物内にも認められたことから、ライソゾーム内である可能性も示唆されたが、明らかな限界膜が確認されない場合も多かったためさらに今後の解析が必要であると考えられた。

また酸化ニッケル曝露群では粒子径による影響の違いの可能性が認められた。粒子径 0.5 μm 曝露群では A549 細胞の特徴である細胞突起が乏しい細胞が多く観察された。細胞突起の減少の機序は不明であるが、0.5 μm という粒子径の酸化ニッケルが細胞に何等かの影響を及ぼしていると考えられた。また同群で認められたミトコンドリアの変化も注目すべき点であるが、検出頻度が多くないことから、さらなる電顕観察をして確認すべきと考えられた。

EDS 解析では酸化亜鉛曝露群の細胞内に亜鉛は検出されなかった。これは同曝露細胞において影響が検出できなかったことに関連している可能性が考えられた。酸化ニッケル曝露群では上述のように、いずれの粒子径曝露群においても、不整形の高電子密度物質が細胞質に観察され、これらがニッケルである可能性がある。現在これらの物質についての EDS 解析を実施中である。

E. 結論

平成 24 年度までに検討した培養条件および電顕用標本作製条件下で、酸化亜鉛お

よび酸化ニッケル 24 時間曝露した細胞における変化を検討した結果、今回の条件下では、酸化亜鉛については曝露による細胞内小器官の明らかな特徴的形態変化を捉えることはできなかった。酸化ニッケルについては粒子径の大きい 0.5 μm で細胞への影響が強い可能性が示唆された。今回の結果では検出できなかったが、TEM-EDS 解析は細胞質内元素を捉えることが可能であることから有用なツールであると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Yoshida M, Inoue K, Isama K, Kawakami T, Kadama Y, Matsuoka A. (2013) Comparison of Lung Lesions in Rat Treated with Nano-suspensions of Silica, Silver and Zinc oxide. 32nd Annual Symposium, Society of Toxicologic Pathology. Portland USA

G. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

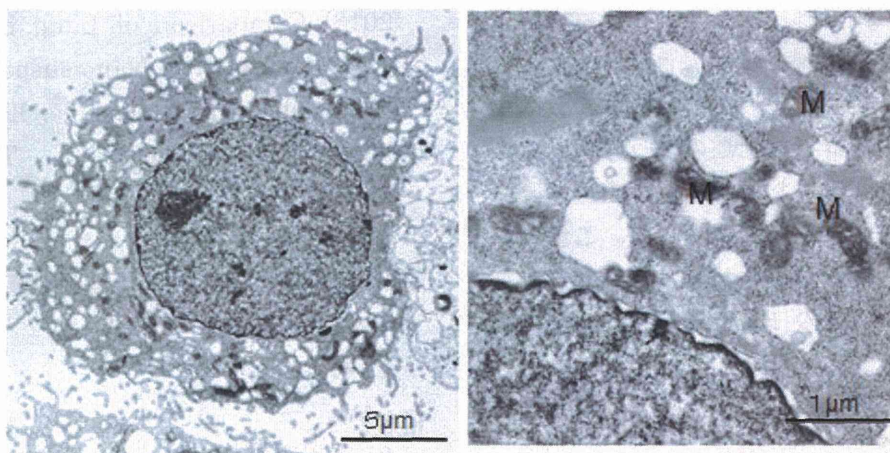
なし

nano処理用			培養細胞 A549 細胞
	final (ug/mL)	final *3(ug/mL)	
1) 未処理	0	0	細胞播種 10 x 10(5) cells/10mL/10cm dish
2) ZnO (alfa)	1	3	
3) ZnO (alfa)	10	30	被験液(3倍濃度) 5mL を添加
4) NiO (φ0.05mm)	10	30	
5) NiO (φ0.1mm)	10	30	
6) NiO (φ0.5mm)	10	30	

標本作製手順
24 時間培養
Wash in PBS x3
スクレイパー回収
遠心
3%グルタルアルデヒド 2h 4℃固定
Wash in PBS
1%オスミック酸 2h 4℃後固定
脱水・透徹・エポン樹脂包埋

実験条件 酸化亜鉛および酸化ニッケル

図 1 酸化亜鉛および酸化ニッケル曝露 実験条件

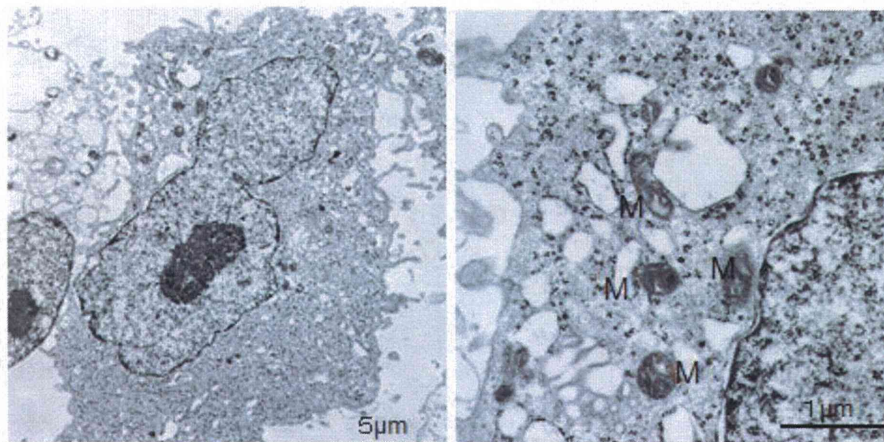


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にポリゾームが豊富。ミトコンドリア(M)も認められる

無処置群に多く認められた細胞

図 2 無処置細胞

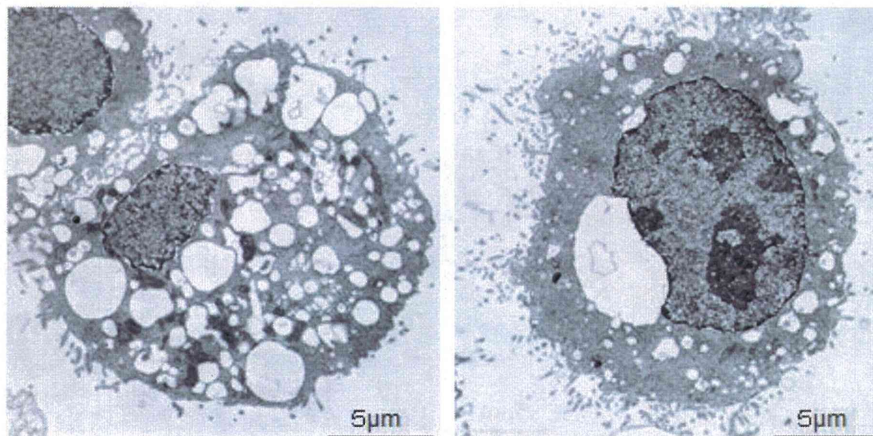


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にリボソームとグリコーゲンが豊富。ミトコンドリア(M)も認められる

無処置群に多く認められた細胞

図3 無処置細胞

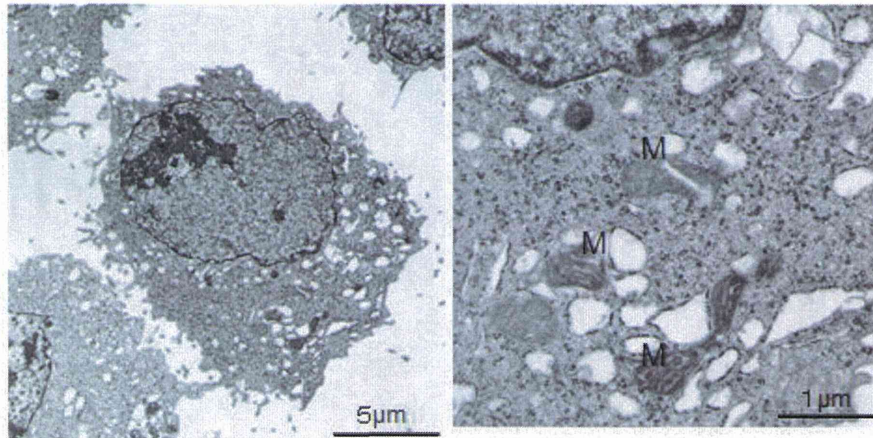


細胞周囲には突起が豊富。細胞質全体は暗調で大小種々の空胞で占められている。

細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。大きなものも含め細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

無処置群で散見された細胞

図4 無処置細胞

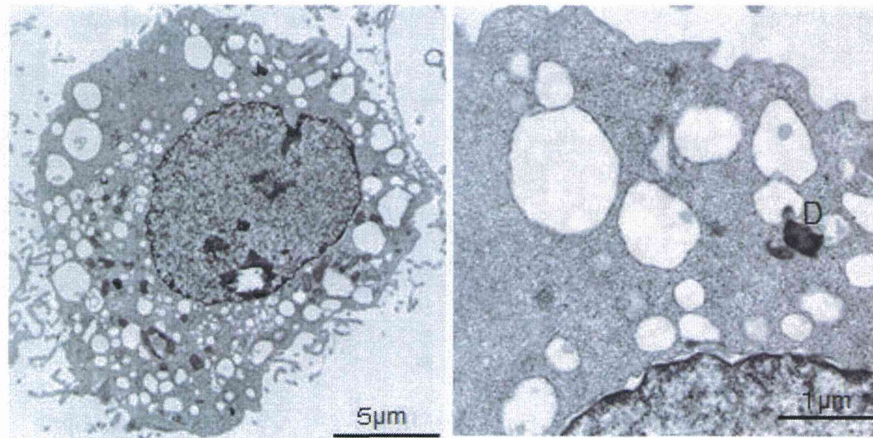


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にはリボソーム及びグリコーゲンが豊富。ミトコンドリア(M)も認められるが無処置群と差はない。

ZnO 10µg群で多く認められた細胞

図5 酸化亜鉛曝露細胞

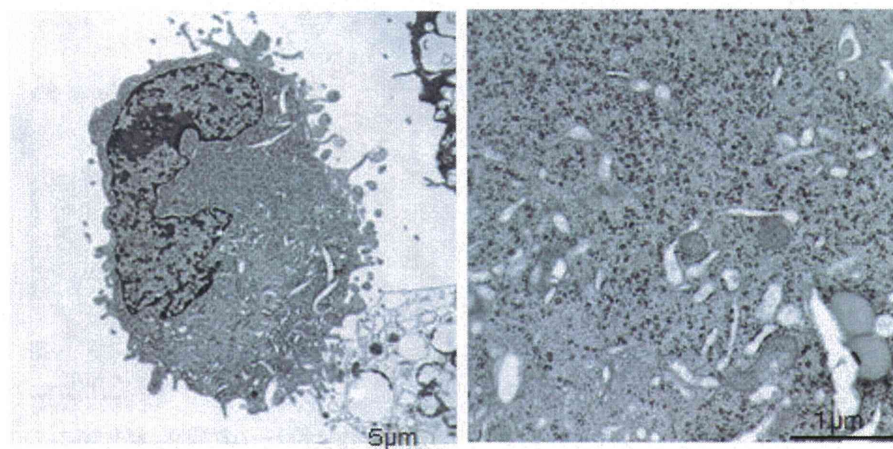


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にはリボソームが豊富。細胞質に不整形の高電子密度物質(D)が認められる。

ZnO 10µg群で多く認められた細胞

図6 酸化亜鉛曝露細胞

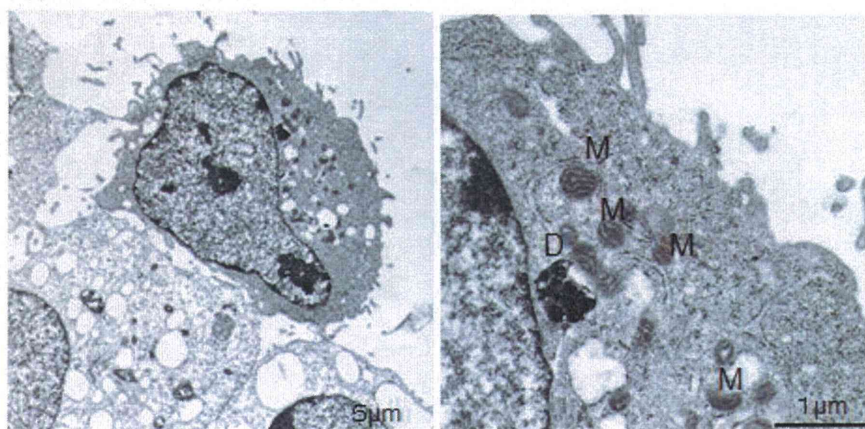


細胞周囲には突起が豊富。核及び細胞質には異常は認められない。

細胞質にはグリコーゲンが豊富。

ZnO 10µg群で認められた人工産物がほとんど認められない細胞

図7 酸化亜鉛曝露細胞

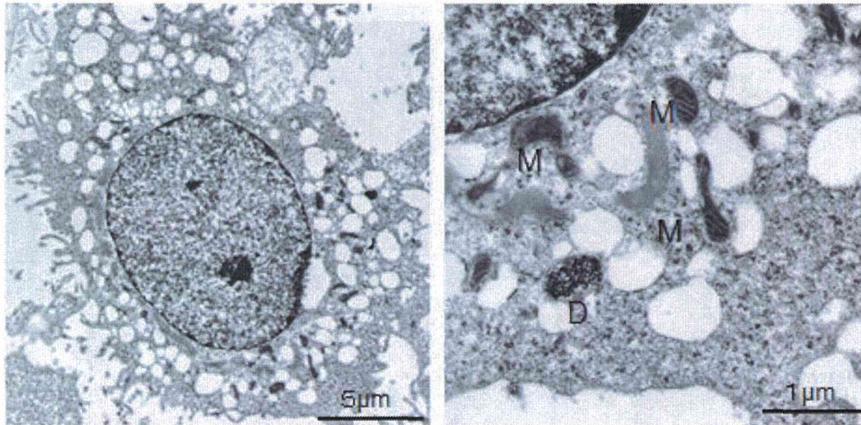


細胞周囲には突起が豊富。核及び細胞質には異常は認められない。

細胞質にはリボソームが豊富。細胞質にはミトコンドリア(M)と不整形の高電子密度物質(D)が認められる。ミトコンドリアの異常は認められない。

NiO 径0.05mm群で多く認められた細胞

図8 酸化ニッケル 粒子径 0.05 mm 曝露細胞

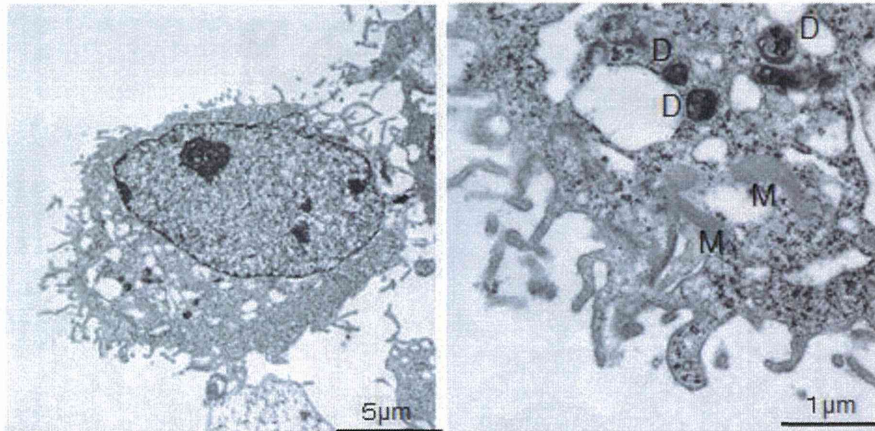


細胞周囲には突起が豊富。細胞質全体は大小種々の空胞で占められている。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にはリボソームが豊富。細胞質にはミトコンドリア(M)と不整形の高電子密度物質(D)が認められる。ミトコンドリアの異常は認められない。

NiO 径0.05mm群で多く認められた細胞

図9 酸化ニッケル 粒子径 0.05 mm 曝露細胞

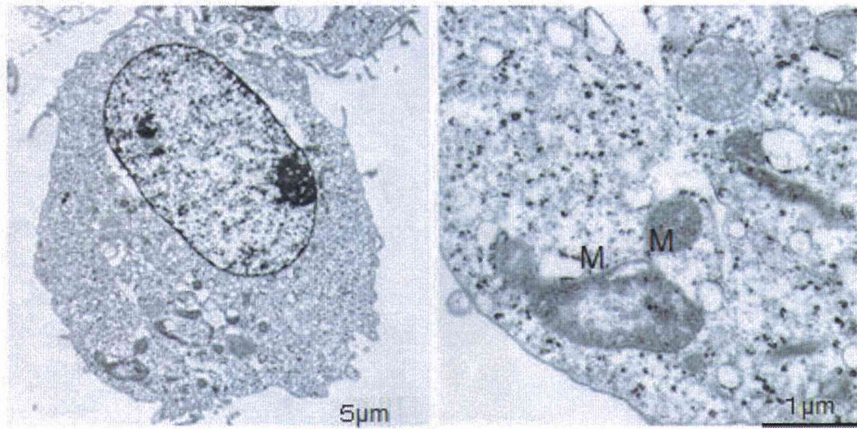


細胞周囲には突起が豊富。核には異常は認められない。細胞質には空胞が認められる。

細胞質にはリボソームおよびグリコーゲンが豊富。細胞質にはミトコンドリア(M)と不整形の高電子密度物質(D)が認められる。ミトコンドリアの異常は認められない。

NiO 径0.05mm群で多く認められた細胞

図10 酸化ニッケル 粒子径 0.05 mm 曝露細胞

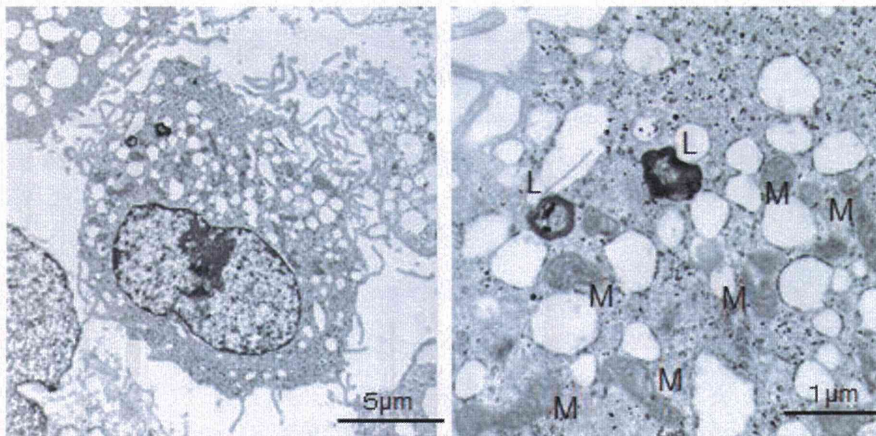


細胞周囲には突起は乏しい。核は異常は認められない。

ミトコンドリア(M)は大型化し、クリステが不明瞭である。

NiO 径0.5mm群で多く認められた細胞

図 11 酸化ニッケル 粒子径 0.5 mm 曝露細胞



細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質には空胞が認められる。

細胞質にはリコーゲンが豊富。細胞質にはミトコンドリア(M)と層状構造物(L)が認められる。ミトコンドリアの異常は認められない。

NiO 径0.5mm群で多く認められた細胞

図 12 酸化ニッケル粒子径 0.5 mm 曝露細胞