

細胞周囲には突起は乏しい。核には異常は認められない。

ミトコンドリア(M)の大きさは無処置群と同様である。層状構造物(L)が認められる。

NiO 径0.5mm群で認められた細胞

図 13 酸化ニッケル 粒子径 0.5 mm 曝露細胞

酸化亜鉛曝露群 EDS解析

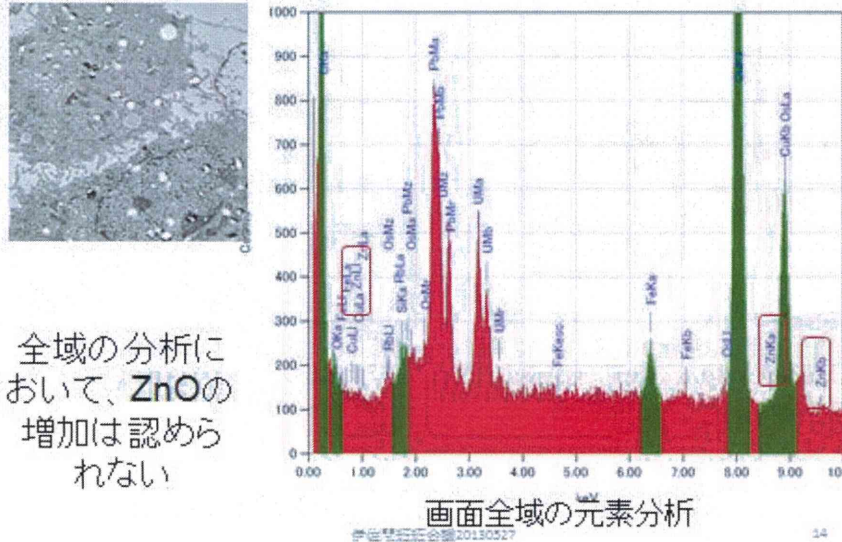


図 14 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析



図 15 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析

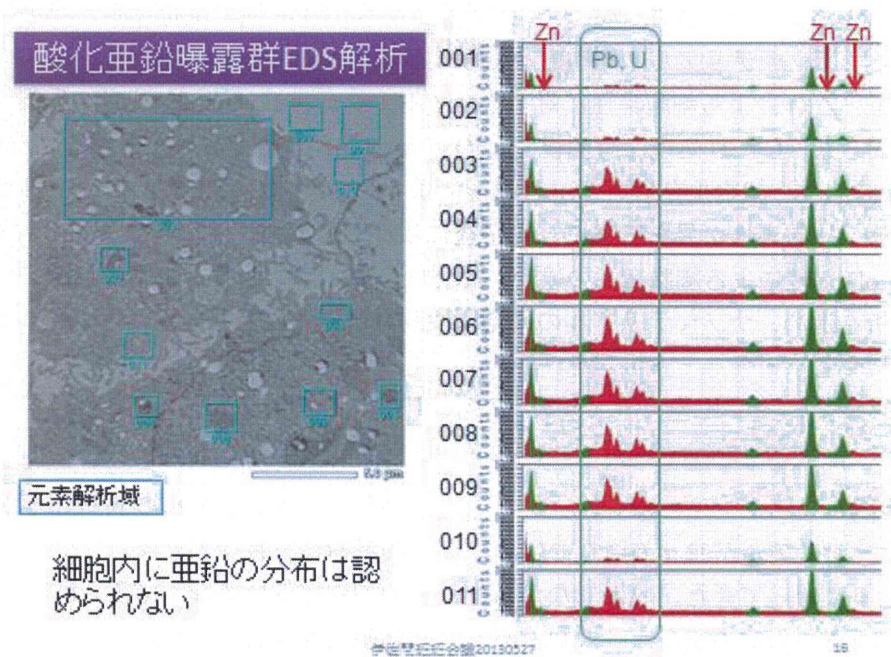


図 16 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析

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

（分担研究課題名） 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  
研究協力者 小森谷 薫 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  
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

研究要旨：ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。8 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、THP-1 細胞に曝露し、ATP 法による細胞毒性の評価と培養上清中のサイトカイン測定による免疫応答の検討を行った。細胞毒性試験の結果、3 種類のナノマテリアルで毒性が観察され、その強さは CuO、ZnO、NiO の順であった。細胞培養上清中のサイトカイン量は、CuO、ZnO、NiO 曝露により IL-8 が増加し、その量は、ZnO 曝露で最も高く、次いで NiO、CuO であった。CuO では 48h で 24h に比べて上清中の IL-8 量は減少しており、細胞毒性の影響が考えられた。一方、CuO、ZnO、NiO 曝露による TNF- $\alpha$  量の変化は殆どなかった。また、ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、A549 細胞を用いて、ZnO による細胞毒性に対するサイトカラシン D (CytoD) 処理の影響について検討した。CytoD 処理 3 時間後に ZnO (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を曝露させたところ、ZnO 曝露 24 時間後の細胞生存率は CytoD 処理により約 80% に回復した。今後、物理化学的状態、細胞毒性が異なる ZnO、粒子径に依存して細胞毒性が異なる NiO について、CytoD 処理による細胞毒性の違い、細胞内金属イオン濃度、細胞内動態についての解析を進め、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。

平成 23、24 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。次に、細胞毒性試験において毒性が観察されたITO、CuO、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、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。

ナノマテリアルの曝露において、肺等の臓器に曝露された後、生体内で様々な免疫応答が起こることが想定されることから、本年度は、*in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株THP-1を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。また、ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、A549細胞を用いて、ZnOによる細胞毒性に対するサイトカラシンD (CytoD) 処理の影響について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 材料

THP-1、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、酸化アルミニウム Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、酸化セリウム CeO<sub>2</sub>、酸化インジウムスズ ITO、酸化ケイ素 SiO<sub>2</sub>、酸化チタン TiO<sub>2</sub>、酸化銅 CuO (以上 CIK NanoTeK)、酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び NanoTeK, 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。(分担研究者・河上のH23, 24年度の報告参照。) 細胞毒性試験の陽性対照

物質として、硫酸カドミウム CdSO<sub>4</sub> (Cadmium sulfate hydrate (3/8) (Sigma-Aldrich)を用い、免疫応答の陽性対照物質として、塩化ニッケル(II) NiCl<sub>2</sub> (WAKO)を用いた。

### 2) 細胞株及び培養方法

ヒト白血病由来単球細胞株 THP-1 (ATCC)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin (PS)、0.055 mM 2-Mercaptoethanol を含む RPMI 1640 (GIBCO)にて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 (JCRB)は、10% 非働化 FBS、1% non-essential amino acid (NEAA) を含む MEMにて、37°C、5% CO<sub>2</sub> インキュベーターで培養した。各細胞株は、3-4 日ごとに継代した。

### 3) 細胞毒性試験・ATP法

細胞を 96-well プレートに播種し (THP-1 ; 2 x 10<sup>4</sup> cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、4, 24 及び 48 時間培養した。プレートを 30 分間室温間平衡化させた後、50 µL の CellTiter-Glo<sup>®</sup> 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。

### 4) 細胞毒性試験・MTT法

細胞を 96-well プレートに播種し (A549 細胞 ; 5 x 10<sup>3</sup> cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、4, 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<sup>®</sup> Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬, Promega) を添加し、5% CO<sub>2</sub> 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。

#### 5) 培養上清中のサイトカインの測定

細胞毒性試験を実施する際に、培養上清を別のプレートに移し、-20 °C で保存した。Interleukin-8 (IL-8) および Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) の測定は、凍結保存した培養上清を、ELISA により測定した。測定キットは、IL-8 (Human IL-8 ELISA Kit、Invitrogen)、TNF- $\alpha$  (Human TNF- $\alpha$  ELISA Kit、Invitrogen) を用いた。ELISA による測定は、キットの添付文書に従って実施した。推奨の希釈により検量線上に値が乗らない場合は、希釈倍率を変更し再検討を行い、全サンプルを同じ希釈倍率で測定した。

#### 6) アクチン重合阻害剤サイトカラシン D 処理

サイトカラシン D (CytoD, Sigma-Aldrich) 溶液は、5 mg/mL DMSO 溶液より DMSO にて希釈系列を作成し、培地に使用直前に懸濁した。CytoD 溶液は、被験液添加の3時間前に処理した。DMSO の最終濃度は 0.2% とした。被験液も CytoD を含む培地で作製し、CytoD の濃度が同じになるようにした。

(倫理面への配慮)

該当なし。

### C. 研究結果

#### 1) THP-1 細胞による酸化金属ナノマテリアルを対象とした細胞毒性評価

ナノマテリアルの曝露において、肺等の臓器に曝露された後、生体内で様々な免疫応答が起こることが想定されることから、血球系細胞に対する評価も重要であると考えられる。THP-1 細胞は、ヒト血球系細胞

株で、PMA や LPS 等の刺激により、単球に分化し最終的にマクロファージへと分化する。本年度の研究では、*in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性について検討した。8 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、細胞毒性について検討した。(酸化金属ナノマテリアル溶液の調製及び物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。) 細胞毒性の検討は、THP-1 が浮遊細胞であり、細胞の血球系の細胞で大きさも小さいことから、ATP 法により測定した。その結果、CuO、NiO、ZnO は細胞毒性を示し、Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、CeO<sub>2</sub>、SiO<sub>2</sub>、TiO<sub>2</sub>、SnO<sub>2</sub> は細胞毒性を示さなかった (図 1, 2)。細胞毒性を示した酸化金属ナノマテリアルでは、細胞毒性の強さはその強さは CuO、ZnO、NiO の順であった。ZnO は Sigma-Aldrich 及び Alfa Aesar から分散製品が市販されている。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa) では、A549 細胞における細胞毒性試験の結果と同様に、ZnO(Sigma) の方が強い細胞毒性を示した。酸化金属ナノマテリアルの物理化学的特性と THP-1 細胞及び A549 細胞に対する細胞毒性について、表 1 にまとめた。

#### 2) THP-1 細胞における酸化金属ナノマテリアルによる免疫応答

酸化金属ナノマテリアルに対して細胞毒性が観察された CuO、NiO、ZnO について、細胞毒性試験時に培養上清に放出されるサイトカインを測定し、免疫応答について検討した。THP-1 細胞の免疫応答における代表的なサイトカインとして、インターロイキンの中から IL-8、細胞傷害因子の TNF スーパーファミリーの中から腫瘍壊死因子

(TNF- $\alpha$ )を選定した。測定は human 用の ELISA kit を用いて行った。その結果、細胞培養上清中の IL-8 は、CuO、ZnO、NiO 曝露により増加が観察された (図 3)。その量は、ZnO 曝露で最も高く、次いで NiO、CuO であった。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa)、CuO では 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理まで用量依存性が観察され、NiO では 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理まで用量依存性が観察された。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa)では、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理までは ZnO(Sigma)の方が IL-8 の産生量が多かったが、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理では、ZnO(Alfa)の方が多かった。CuO では 48h で 24h に比べて IL-8 量は減少していた。一方、TNF- $\alpha$  は、CuO 曝露では殆ど検出されず、ZnO、NiO 曝露では検出されたが、曝露濃度間での差は認められなかった (図 4)。

### 3) A549 細胞のサイトカラシンに対する細胞毒性試験

サイトカラシンはアクチン重合阻害剤で、核分裂のみを進行させ、細胞質分裂を阻害することが知られている。サイトカラシン D (CytoD)は、サイトカラシンBとほぼ同様の機能を持つが、グルコース輸送において阻害活性を示さないことが知られており、CytoDを細胞に処理することにより、細胞外にある物質の細胞内への取り込みを阻害することが期待できる。A549細胞にCytoDを処理し、細胞内へのナノマテリアルの取り込みと細胞毒性について検討するため、まず、CytoD自身のA549細胞に対する細胞毒性について、MTT法により検討した

(図 5)。細胞の形態については、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4時間処理において、アクチン重合阻害効果により細胞が丸くなっているのが観察されたが、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、24時間処理においても細胞毒性が観察されないことを確認した。

### 4) A549細胞を用いたZnOの取り込み阻害実験

A549 細胞を 96-well プレートに播種し、21 時間目(被験液添加 3 時間前)から、2.5、5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の CytoD を処理し、次いで 24 時間目に ZnO(Alfa)を曝露した。被験液添加後、4、24 時間後に MTT 法により細胞毒性を評価した (図 6)。曝露 4 時間目には、コントロール(DMSO 処理)では、他に比べて cell viability が若干低くなっていた。24 時間目には、コントロールでは、ZnO(Alfa) 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  曝露で 7%程度であったが、CytoD の前処理により、cell viability の回復が観察された(CytoD 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理で 66%、5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理で 71%、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  処理で 79%)。次に、ZnO(Alfa) の曝露を 50、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  に固定して、CytoD の濃度を細かく設定し、影響について 48 時間目まで検討した (図 7)。ZnO(Alfa) 曝露 4 時間目では細胞毒性はなく、24 および 48 時間目では、CytoD の処理濃度に応じた cell viability の回復が観察された。48 時間目では、cell viability の回復は、CytoD 5、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  でほぼ頭打ちになっていた。

### D. 考察

本年度は、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。ナノマテリアルの曝露において、肺等の臓器に曝露された後、生体内で様々な免疫応答が起こることが想定されることから、血球系細胞を用いるナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系は有用であると考えられる。8 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、細胞毒

性について検討した結果、3種類のナノマテリアルが細胞毒性を示した。A549細胞の細胞毒性はMTT法、THP-1細胞の細胞毒性はATP法であり、測定しているマーカーが異なることから、一概に比較することはできないが、A549、THP-1細胞における細胞毒性の強さを比較してみると(表1)、A549細胞では、CuOのIC<sub>50</sub>は1.0 µg/mLで、NiOの34、ZnO(Sigma)の32、ZnO(Alfa)の73 µg/mLに比べて強い毒性を示したのに対して、THP-1細胞では、CuOのIC<sub>50</sub>は46 µg/mLで、NiOの80、ZnO(Sigma)の49、ZnO(Alfa)の63 µg/mLと比べても大差なかった。これは、肺由来細胞と血球系由来細胞で、CuOに対して感受性が異なるためと考えられる。また、A549細胞では、NiOとZnO(Sigma)のIC<sub>50</sub>が同程度で、ZnO(Sigma)に対してZnO(Alfa)が弱いという結果であったが、THP-1細胞では、ZnO(Sigma)の毒性が強く、次いでZnO(Alfa)、NiOの順であった点も、細胞の由来組織に起因すると考えられる。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa)の細胞毒性については、両細胞株でどちらもZnO(Sigma)の方が強いという結果が得られた。本年度の研究では、THP-1細胞を分化させないで用いたが、PMAやLPS等の刺激により、単球に分化し最終的にマクロファージへと分化することが知られている細胞株であるため、条件を最適化することにより、ナノマテリアルのマクロファージに対する*in vitro*生体影響評価系もしくは、マクロファージ介した*in vitro*生体影響評価系として利用することが可能であろう。

THP-1細胞において細胞毒性が観察されたCuO、NiO、ZnOについて、免疫応答を検討した。その結果、細胞培養上清中のIL-8は、CuO、ZnO、NiO曝露により増加が観察された(図3)。IL-8産生量は、ZnO曝露で最も高く、次いでNiO、CuO

であった。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa)、CuOでは100 µg/mLまで用量依存性が観察され、NiOでは200 µg/mLまで用量依存性が観察された。ZnO(Sigma)、ZnO(Alfa)では、100 µg/mLまではZnO(Sigma)の方がIL-8の量が多かったが、200 µg/mLでは、ZnO(Sigma)に比べてZnO(Alfa)の方が多かった。CuOは、NiO、ZnOに比べて細胞毒性が強かったことから、IL-8、TNF-α共に産生量が少なかったと予想される。ZnO(Sigma)とZnO(Alfa)では、どちらも200 µg/mLで100 µg/mLに比べて、IL-8の産生量が減っており、細胞毒性が現れている可能性が考えられた。一方、TNF-α量については、ZnO、NiO曝露では検出されたが、曝露濃度間での差は殆ど認められなかった(図4)。THP-1細胞はNi応答細胞であることが報告されていることから、陽性対照物質として今回NiCl<sub>2</sub>を用いたところ、1000 µMまで用量依存的なIL-8及びTNF-αの産生が観察され、それと比較するとナノマテリアルによる免疫応答はそれほど強くないと考えられた。

次に、ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、A549細胞を用いて、ZnOによる細胞毒性に対するCytoD処理の影響について検討した。まず、CytoD自身のA549細胞に対する細胞毒性について、MTT法により検討した(図5)結果、10 µg/mLまでは細胞毒性は認められなかった。細胞の形態については、2.5 µg/mL、4時間処理において、細胞が丸くなっているのが観察された。また、CytoD処理により細胞増殖も抑制されるため、CytoD処理のみで24時間で約77%、48時間で約63%まで全体のMTT活性が減少していた。

本年度の研究では、ZnO(Alfa)の細胞毒性に対して、CytoD処理によりcell viabilityが回復することを観察でき、至適

条件として、CytoD 処理濃度 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、ナノマテリアルの処理時間 24 時間が明らかになった。

今後、物理化学的状态、細胞毒性が異なる ZnO、二次粒子径の違いにより細胞毒性に差が観察された NiO に対して、CytoD 処理による細胞毒性の違い、細胞内金属イオン濃度、細胞内動態についての解析を進め、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。

## E. 結論

1) ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。

8 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、THP-1 細胞に曝露し、ATP 法による細胞毒性及び、培養上清中のサイトカイン測定による免疫応答の検討を行った結果、  
・ 3 種類のナノマテリアルで毒性が観察され、その強さは CuO、ZnO、NiO の順であった。

・ 細胞培養上清中のサイトカイン量は、CuO、ZnO、NiO 曝露により IL-8 量が増加し、TNF- $\alpha$  量には変化がなかった。IL-8 の産生は、ZnO 曝露で最も高く、次いで NiO、CuO であった。

・ CuO では 48h で 24h に比べて IL-8 量は減少しており、細胞毒性の影響が考えられた。

2) ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、A549 細胞を用いて、ZnO による細胞毒性に対するサイトカラシン D (CytoD) 処理の影響について検討した。

・ CytoD 自身の A549 細胞に対する細胞毒性について確認したところ、10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  までは細胞毒性が認められなかった。細胞

の形態は、2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、4 時間処理において、丸くなっていた。

・ CytoD 処理 3 時間後に ZnO (100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) を曝露させたところ、ZnO 曝露 24 時間後の細胞生存率は CytoD 未処理では約 7%であったが、CytoD の処理では約 80%に回復した。

今後、物理化学的状态、細胞毒性が異なる ZnO、粒子径に依存して細胞毒性が異なる NiO について、CytoD 処理による細胞毒性の違い、細胞内金属イオン濃度、細胞内動態についての解析を進め、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。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Usami M., Mitsunaga K., Irie T., Miyajima A., Doi O. Proteomic analysis of ethanol-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos (in press)

### 2. 学会発表

1) 伊佐間和郎、河上強志、宮島敦子、松岡厚子：金属塩の細胞毒性に及ぼす SiO<sub>2</sub> 及び TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の影響 第 40 回日本毒性学会学術年会（幕張、2013.6）

2) Isama K, Kawakami T, Miyajima A, Matsuoka A.: Effect of SiO<sub>2</sub> and TiO<sub>2</sub> nanoparticles on the cytotoxicity of metal chlorides. 7th International Conference on Materials for Advanced Technologies (ICMAT 2013) (Singapore, 2013.6)

3) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai K., Matsuoka A.: Effects of culture on polymer biomaterials on the cellular responses to chemicals. Eurotox 2013 (Interlaken, 2013.9)

4) 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 年会 (熊本、2014.3)

5) 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 年会 (熊本、2014.3)

#### 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

3. その他

なし

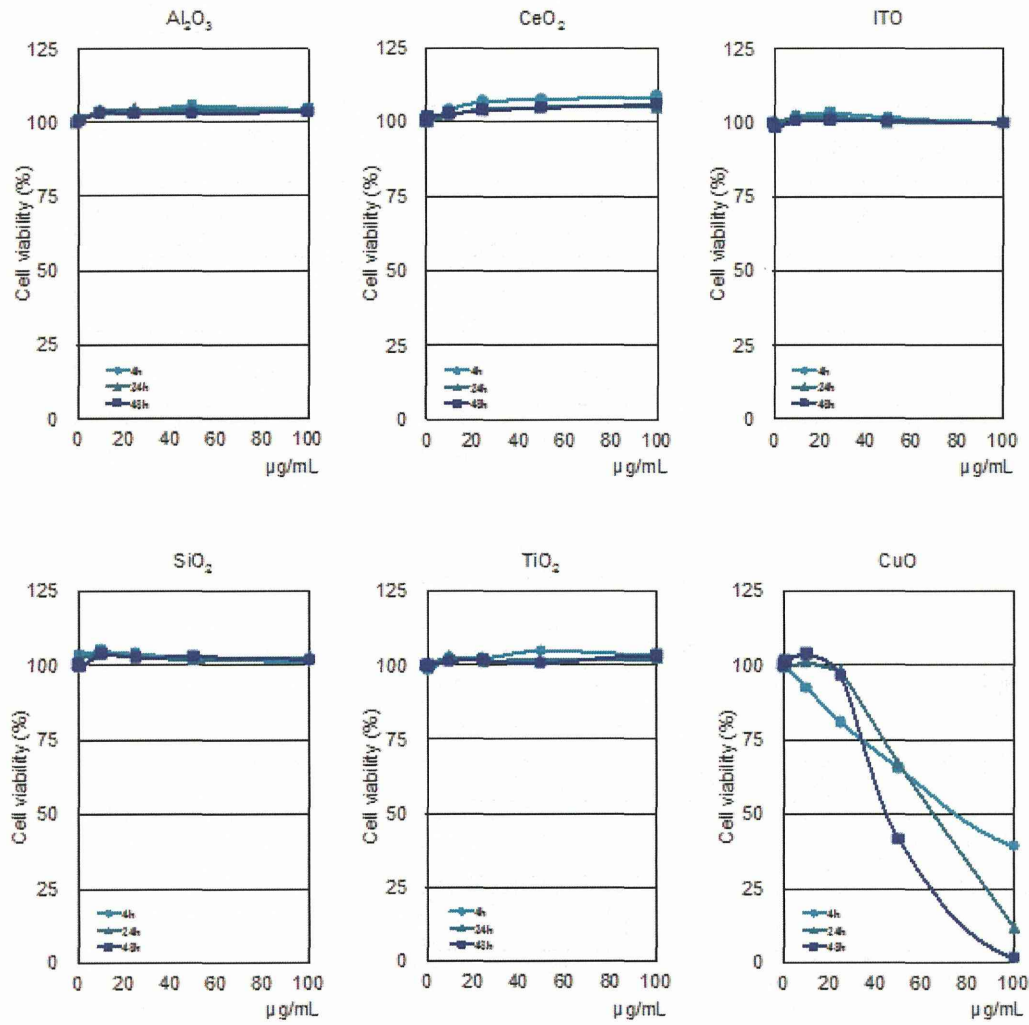


図1 THP-1細胞の酸化金属ナノ材料に対する細胞毒性試験-1

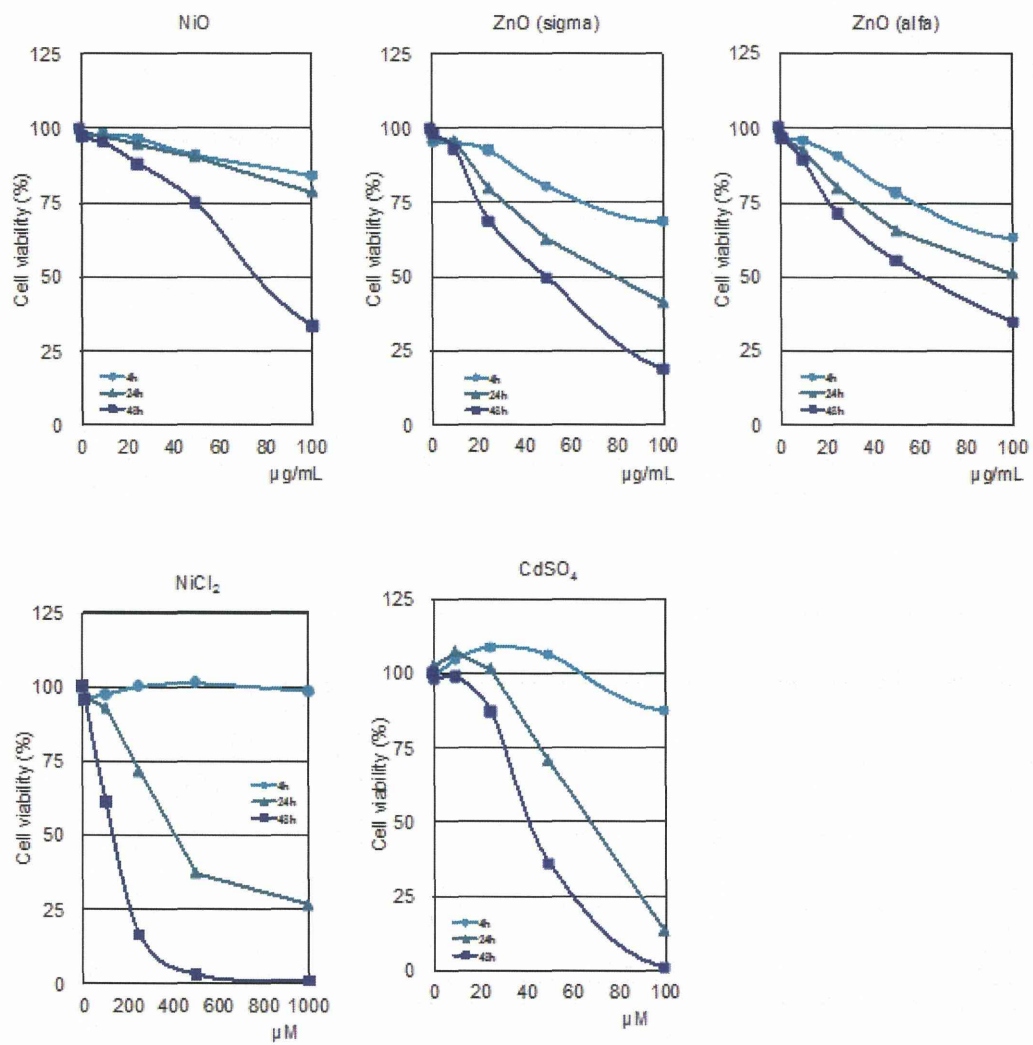


図2 THP-1細胞の酸化金属ナノマテリアルに対する細胞毒性試験-2

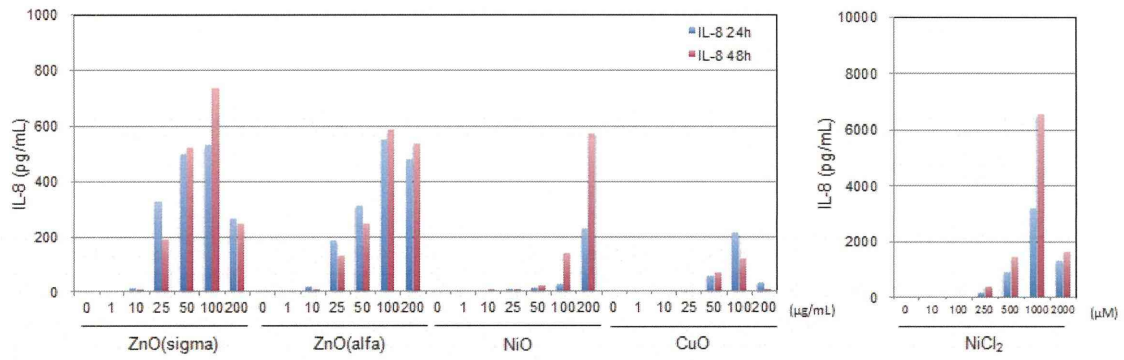


図3 ナノマテリアル処理による THP-1 細胞の IL-8 産生

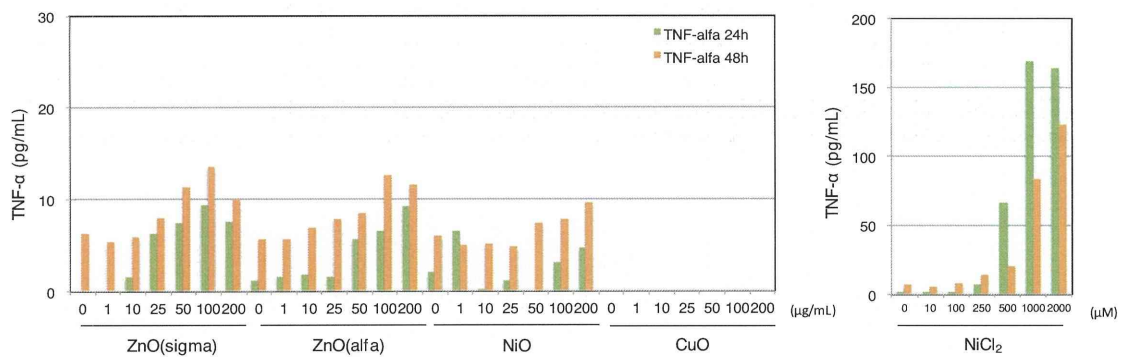


図4 ナノマテリアル処理による THP-1 細胞の TNF-α 産生

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、THP-1 細胞に対する細胞毒性

種類*	製造(販売)元	懸濁液中平均粒子径* (nm ± SD) <sup>a</sup>				Zeta電位* (mV ± SD) <sup>a</sup>		細胞毒性 (IC50)	
		1次粒子径* (nm)	比表面積* (m <sup>2</sup> /g)	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)	A549細胞 MTT法 (48h) (μg/ml)	THP-1細胞 ATP法 (48h) (μg/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	>100	>100
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
CuO		48	20	156.4 ± 1.9	242.2 ± 2.9	51.9 ± 0.9 <sup>f</sup>	-10.8 ± 0.5	1.0	46.2 <sup>e</sup>
SnO <sub>2</sub>		21	45	— <sup>h</sup>	1388.6 ± 52.4	—	-12.9 ± 0.9	>100	NT <sup>i</sup>
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>		33	35	105.1 ± 2.0	374.5 ± 9.4	49.3 ± 0.7	-22.7 ± 0.4	>100	NT <sup>i</sup>
NiO	Sigma-Aldrich	<50		256.8 ± 13.0	403.6 ± 2.6	41.6 ± 0.7 <sup>f</sup>	-18.2 ± 0.3	34.3	80.0 <sup>e</sup>
ZnO <sup>j</sup>		<35		65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	31.7	49.4
ZnO	Alfa Aesar	40		164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	72.5	63.0

\*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>-: φ0.1mmジルコニアボールにて調製 <sup>h</sup>-: 測定不可 <sup>i</sup>NT: 測定せず <sup>j</sup>2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

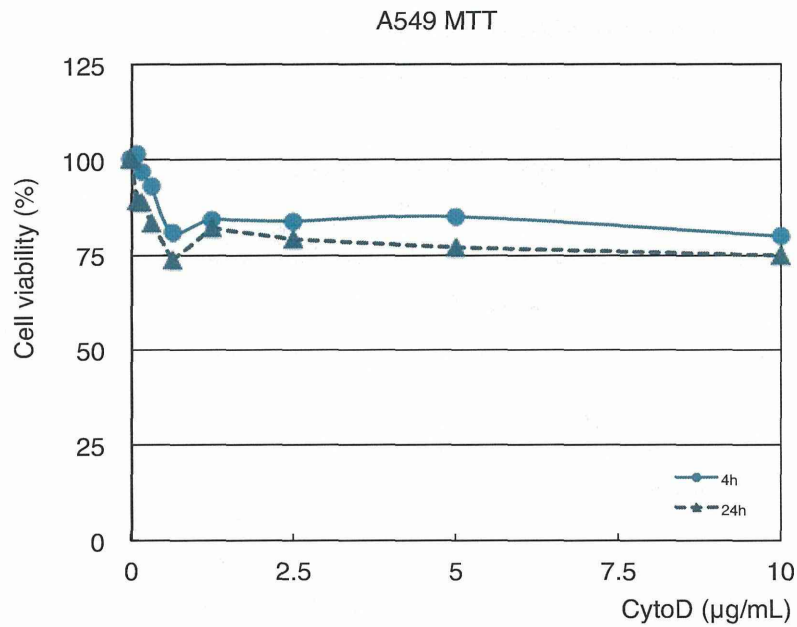


図5 A549細胞のCytoDに対する細胞毒性

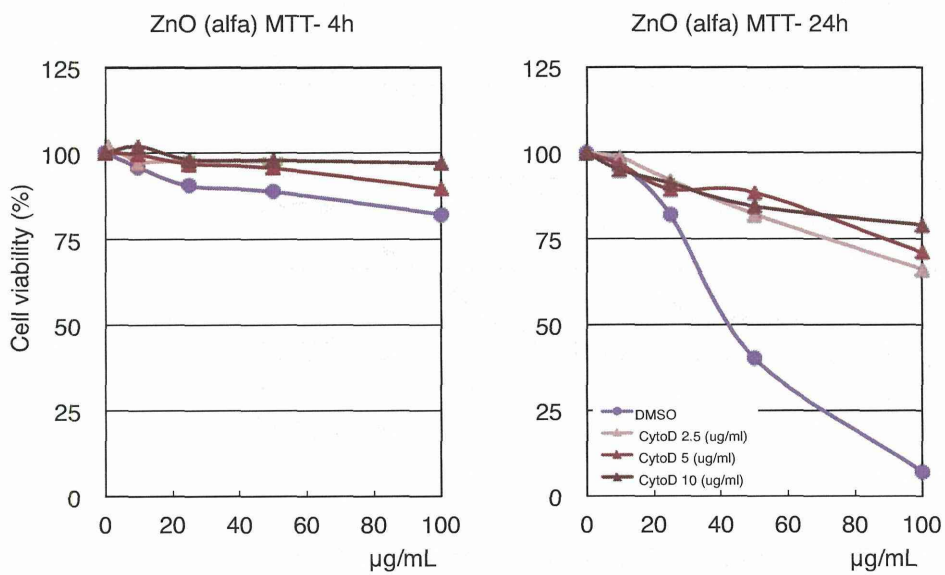


図6 ZnO(alfa)の細胞毒性に対するCytoDの影響



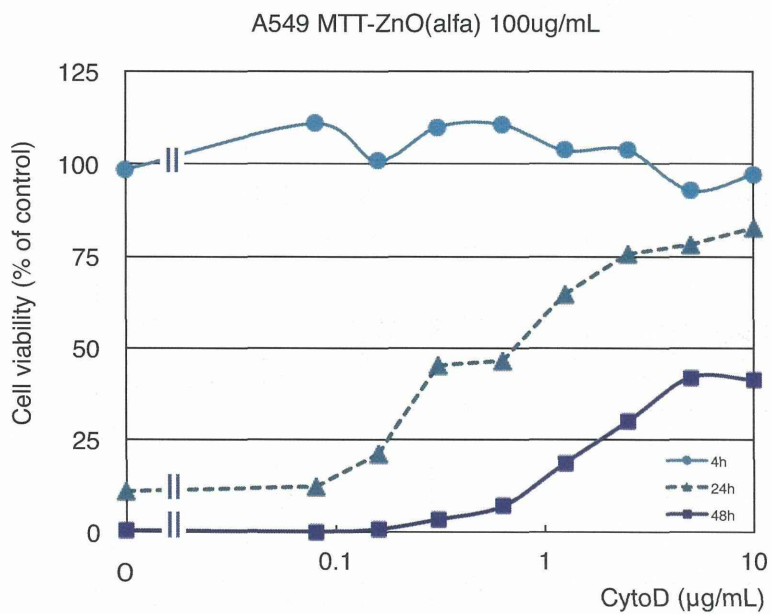
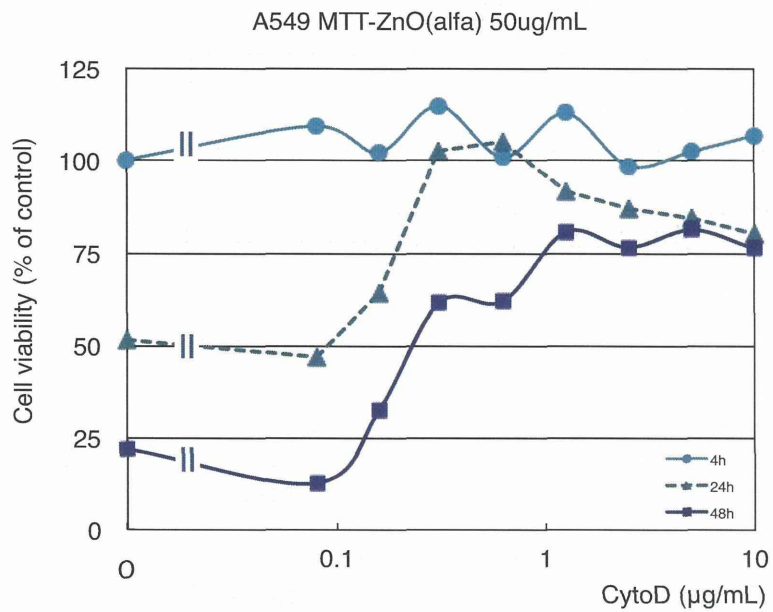


図7 ZnO(Alfa)の細胞毒性に対する CytoD の影響

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

（分担研究課題名） 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

研究要旨：ヒト肺上皮細胞株 A549 に対する carbon nanotubes (CNTs)の細胞毒性について検討した。A549 細胞を予め 4、24、48 および 72 時間前培養し、その後、single wall CNTs (SWCNTs)および multi wall (MWCNTs)を添加すると、4 および 24 時間前培養した細胞においてこれらの CNTs の感受性が大きくなり、前培養時間が長い細胞ほど CNTs に対する感受性が低下した。また、一定時間前培養した細胞にこれらの CNTs を曝露時間を変えて処理すると、SWCNT では、24 時間曝露したときに比べて、48 時間曝露したときの細胞毒性が低減された。一方、MWCNT では、曝露時間が細胞毒性に及ぼす影響は観察されなかった。前培養時間が異なると細胞密度が異なる。前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いが、細胞密度の違いによるのか、あるいは細胞の生理的状態の違いによるのかを網羅的遺伝子解析および細胞周期解析により推測した。その結果、前培養時間による CNTs に対する細胞の感受性の違いは細胞の増殖ステージによる生理的状態の違いに依存することが示唆された。

## A. 研究目的

近年のナノテクノロジーの進歩により、ナノ物質(nanomaterials)は様々な産業に利用され、ナノ物質を利用した製品の数は、この数年で急激に増加している。特に、炭素系のナノ物質であるカーボンナノチューブ(carbon nanotube)は、素材産業、電子産業、さらには医療産業など、広範囲な産業分野での応用が検討され、その一部はすでに実用化している。しかしながら、CNTsの安全性あるいは毒性に関してはコンセンサスが得られていない。これは、CNTsの形態や修飾による物理化学的特性の多様性、および製造過程における不純物の混入などに起因すると考えられているが、細胞学的観点からはあまり検討されていない。

本研究では、CNTsの細胞毒性をヒト肺

上皮細胞株である A549 で検討した。肺上皮細胞を用いたのは、CNTsが最終製品から人体に影響を及ぼす可能性は低く、最も懸念されるのは製造過程で労働者が呼吸によって曝露される可能性が高いためである。CNTsの毒性に関しては多くの研究があり、同じ細胞種でも異なる結果が報告されている。これは CNTsの物理化学的特性に依存すると考えられているが、生物学的な要因も考慮する必要があると考えられる。本研究では、細胞の増殖ステージによる生理的状態の違いが CNTsに対する感受性に影響するかどうかを調べた。

## B. 研究方法

### B1. CNTs

Single-wall CNTs (SWCNTs)および multi-

wall CNTs (MWCNTs)は Sigma-Aldrich から購入した。

## B2. CNTs 含有培地および溶出培地の調製

CNTs 含有培地は、CNTs を high-glucose Dulbecco modified Eagle's medium supplemented with 10% of fetal bovine serum, 100 units/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (以下 DMEM と略す) に添加することによって調製した。CNTs は予め滅菌水中で超音波にて 15 分間分散してから DMEM に添加した。この培地は、使用直前に調製した。

溶出培地は、CNTs 含有培地を 37°C、ローターリー振とう機で 24 時間インキュベートした後、150,000 g、1 時間の遠心分離により CNTs を除去することにより調製された。遠心分離によって得られた上澄み中に CNTs が残っていないことは transmission electron microscopy (TEM) and energy dispersive spectroscopy (EDS) (JEOL) にて確認した。

## B3. 細胞培養および毒性評価

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 で、37°C、5% CO<sub>2</sub> 雰囲気下において前培養した。次に、この培養で用いた培地を、CNTs 含有培地あるいは溶出培地に取り換え、さらに 24 時間あるいは 48 時間培養した後、細胞毒性を評価した。細胞周期および DNA マイクロアレイのための培養には 6-well カルチャープレートが、WST assay (cell counting kit-8, Dojindo)には 96-well カルチャープレートが用いられた。

## B4. DNA マイクロアレイ解析

DMEM で 4、24、48 および 72 時間前培養した細胞から、ISOGEN (Nippon Gene)により全 RNA を回収した。これらの 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、10 µm 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 Cy3 および Cy5 での標識を逆にして 2 回行った。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。発現量比が 2 倍以上差があるものを抽出し、変動のあった遺伝子として同定した。

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. 研究結果

### C1. 培養時間の影響

最初に、A549 細胞の培養時間と CNTs の毒性の関係について調べた。A549 細胞を 8000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種し、4 時間、24 時間、48 時間、および 72 時間、前培養 (pre-culture) した後、CNTs を 20 - 100 μg/ml の濃度になるように添加した。添加して 24 時間後に、WST assay によって細胞毒性を評価した(図 1)。4 時間および 24 時間前培養した細胞を SWCNT で曝露すると、60 μg/ml までは、濃度依存的に細胞毒性が大きくなったが、細胞の前培養時間の影響は、それほど大きくはなかった。48 時間前培養した細胞に SWCNT を曝露させると、やはり濃度依存的な細胞毒性が観察されたが、毒性の程度は、4 時間および 24 時間前培養した細胞に比べて小さかった。72 時間前培養した細胞では、SWCNT の毒性の影響は小さく、100 μg/ml の濃度でさえ、cell viability は 80 % 以上であった。MWCNT の A549 細胞に対する毒性も、SWCNT と同様の傾向を示した。4 時間および 24 時間前培養した細胞を MWCNT で曝露すると、40 μg/ml までは、濃度依存的に細胞毒性が大きくなったが、これらの前培養時間による細胞毒性の差は観察されなかった。48 時間および 72 時間前培養した細胞も、MWCNT の細胞毒性は、濃度依存的であり、前培養時間が長くなるにしたがって毒性の程度は低くなった。すべての条件において、CNTs に対する曝露時間は 24 時間で一定であったので、この結果は、予め長時間培養した細胞ほど、CNTs の細胞毒性に対する感受性は低くなることを示している。

CNTs の細胞毒性は、合成および精製の

時に混入した不純物に起因するという報告がある。本研究で使用した CNTs の毒性が不純物であるかどうかを調べるために、培地中に CNTs を 20 - 100 μg/ml の濃度で 24 時間浸漬した後、その培地から 150,000 g の遠心分離によって CNTs を除去した上澄みを調製した。新鮮培地 (fresh medium) で A549 細胞を前培養し、24 時間後に、この CNTs を 24 時間浸漬した上澄み培地 (supernatant medium) に交換し、さらに 24 時間培養して WST assay を行った(図 2)。その結果、いずれの CNTs 濃度で浸漬した上澄み培地においても、細胞毒性は観察されなかった。したがって、CNTs の細胞毒性は、不純物の溶出によるものではないことが示唆された。

### C2. 細胞周期解析

図 1 から、A549 細胞は、前培養の時間によって CNTs に対する感受性が異なることが示された。CNTs に対する感受性の違いは、前培養の時間によって細胞の生理状態が異なることに起因すると考えられた。そこで、A549 細胞の前培養時間における細胞周期の分布を調べた。細胞を 8000 cells/cm<sup>2</sup> の密度で播種した後、24 時間、48 時間、および 72 時間後の細胞密度および細胞周期の分布を図 3 に示す。前培養 48 時間後では、24 時間後に比べて、G0/G1 phases が減少し、S phase および G2/M phases の細胞が増加していた。これは、48 時間後の方が、24 時間後に比べて、細胞分裂が盛んであることを示唆している。また、前培養 72 時間後では、24 時間および 48 時間後に比べて、S phase および G2/M phase の細胞が減少し、G0/G1 phases の細胞が顕著に増加していた。これらの結果から、前培養 24 時間後の細胞は増殖の誘導期 (induction phase)、48 時間後の細胞は増殖期 (growth phase)、72 時間後の細胞は定常期 (stationary phase) にあると考えられる。

すなわち、CNTs の毒性に対する感受性は、誘導期で最も大きく、増殖期を経て定常期に進むにしたがって、小さくなる。しかしながら、たとえば、S phase の細胞が多いと CNTs の毒性に対する感受性が大きいというような、細胞周期の分布と CNTs の毒性に対する感受性との間に、明確な相関は得られなかった。

### C3. 前培養時間における遺伝子発現パターンの違い

細胞周期の分布と CNTs の毒性に対する感受性との間に相関が見出せなかったため、前培養後、4 時間、24 時間、48 時間および 72 時間の細胞の網羅的遺伝子発現解析 (global gene expression analysis) を行い、それぞれの細胞の遺伝子発現の相違を調べた。得られた遺伝子発現データを Ward's Method によりクラスター解析した結果、9 個のクラスターを得た(図 4)。Cluster A は、前培養後 4 時間および 24 時間で、48 時間および 72 時間よりも発現量が高い遺伝子グループ、一方、Cluster B は、前培養後 4 時間および 24 時間で、48 時間および 72 時間よりも発現量が低い遺伝子グループであった。Clusters C および D は、それぞれ、前培養後 48 時間でのみ発現量が高い、および低い遺伝子グループであった。また、Clusters E および F は、それぞれ前培養後 72 時間でのみ発現量が高い、および低い遺伝子グループであった。前培養後 4 時間でのみ発現量が高いあるいは低い遺伝子グループは、見出せなかった。これは、前培養後、4 時間および 24 時間の細胞は、遺伝子発現パターンが類似していると考えられ、図 1 において、前培養後、4 時間および 24 時間の細胞は、CNTs に対する感受性に大きな差はなかったという結果を支持している。

それぞれの cluster は、579 遺伝子(cluster A)、367 遺伝子(cluster B)、565 遺伝子

(cluster C)、683 遺伝子(cluster D)、656 遺伝子(cluster E)、および 590 遺伝子(cluster F) から構成されていた。次に、それぞれの cluster の遺伝子の発現量の変化が、どのような細胞機能に影響しているのかを調べるために Gene Ontology (GO) 解析を行った。それぞれの cluster に含まれる遺伝子を GO の "Biological Process" の各カテゴリーに分類し、それらのカテゴリーの p-value を計算した。GO では、21958 遺伝子が、各カテゴリーに分類されている。p-value は、これら 21958 遺伝子から、k 個の遺伝子をランダムにとってきた時、偶然にある GO カテゴリーに含まれる遺伝子を k 個とってきてしまう確率である。単独の事象で  $p\text{-value} < 0.05$  (5%の危険率) とすると、ヒトの遺伝子に割り当てられている GO の各カテゴリーは 21958 個あるので、

$$1-(1-p)^{21958} < 0.05$$

となる。このときの p-value は、 $< 2.37E^{-6}$  である。ここで、9 個未満の遺伝子しか含まない GO カテゴリーは、確からしさが小さいので、10 個以上の遺伝子を含む 5356 個のカテゴリーのみを考慮すると、

$$1-(1-p)^{5356} < 0.05$$

となる。このときの p-value は、 $< 9.58 \times 10^{-6}$  である。したがって、 $p\text{-value} < 9.58 \times 10^{-6}$  の GO カテゴリーを抽出した。

前培養後 4 時間および 24 時間の細胞で、48 時間および 72 時間よりも発現量の高い cluster A の 579 遺伝子の GO 解析において、 $p\text{-value} < 9.58 \times 10^{-6}$  のカテゴリーは 17 個あった(表 1)。これらのカテゴリーは、大きく "positive regulation of metabolic process" と "positive regulation of programmed cell death" の 2 つの機能に分けることができる。一方、前培養後 4 時間および 24 時間の細胞で、48 時間および 72 時間よりも発現量の低い cluster B に含まれる 367 遺伝子の GO 解析では、 $p\text{-value} < 9.58E^{-6}$  のカテゴリーは、5

個同定された(表 2)。これらのカテゴリーは、大きく”transcription elongation”および”positive regulation of viral reproduction”の 2 つの機能に分けることができる。ここで、”viral reproduction”に関連する 3 つの GO カテゴリーに含まれる 9 個の遺伝子は、すべて同じ遺伝子であり、これらはすべて ribosomal protein の subunits であった。すなわち、前培養後 4 時間および 24 時間の細胞は、代謝機能が活発で、かつ apoptosis 誘導関連遺伝子が多く発現しているが、遺伝子の転写および翻訳に関与する機能が低いことが示唆される。

前培養後 48 時間の細胞でのみ発現量が高い cluster C の 565 遺伝子の GO 解析では、62 個が有意なカテゴリーとして同定された(表 3)。これらのカテゴリーは、大きく”nucleic acids metabolism”と”mitotic cell cycle”の 2 つの機能に分けることができる。この結果は、前培養後 48 時間の細胞は、核酸の合成と細胞分裂が盛んであることを示唆し、S phase と G2/M phase の細胞の割合が多い(図 3b)ことと一致する。一方、前培養後 48 時間の細胞でのみ発現量の低い cluster D の 683 遺伝子の GO 解析では、27 個が有意なカテゴリーとして同定された(表 4)。これらのカテゴリーは、大きく”organization and disassembly of cellular components”と”viral reproduction and translation”に分けることができる。Viral reproduction に関連する 9 個のカテゴリーに含まれる遺伝子の多くは ribosomal protein の subunits であった。この結果は、前培養後 48 時間の細胞は、遺伝子の翻訳に関与する機能は低いことを示唆している。また、タンパク質などの biomolecules の組織化(organization)と分解(disassembly)の両方が低下していることから、biomolecules の再構成に関する機能が低下していることが予測される。

前培養後 72 時間の細胞でのみ発現量が高い cluster E の 656 遺伝子の GO 解析では、21 個が有意なカテゴリーとして同定された(表 5)。これらのカテゴリーは、大きく”organization and disassembly of cellular components”と”viral reproduction and translation”に分けることができる。一方、前培養後 72 時間の細胞のみで発現量が低い cluster F の 590 遺伝子の GO 解析では、56 個が有意なカテゴリーとして同定された(表 6)。これらのカテゴリーは、大きく”mitotic cell cycle”、”nucleic acids metabolism”、”cellular component assembly”および”regulation of programmed cell death”に分けることができる。これらの結果は、前培養後 72 時間の細胞は、biomolecules の再構成と遺伝子の翻訳に関する機能が亢進している一方、細胞分裂や核酸の合成、および apoptosis 関連の機能が低下していることを示唆している。細胞分裂と核酸合成に関する機能の低下は、細胞周期における S phase と G2/M phase の細胞の割合の低下(図 3b)と一致する。

## D. 研究発表

### 1. 論文発表

1.1 Li X., Xu L., Shao A., Wu G., Hanagata N. Cytotoxic and genotoxic effects of silver nanoparticles on primary Syrian hamster embryo (SHE) cells. *Journal of Nanotechnology and Nanoscience* 13: 161-170 (2013)

1.2 Xu M., Li J., Hanagata N., Su H., Chen H., Fujita D. Challenge to assess the toxic contribution of metal cation released from nanopaterials for nanotoxicity: a case of ZnO nanoparticles. *Nanoscale* 5: 4763-4769 (2013)

1.3 Hanagata N. Biological interpretation of the in vitro assessment of nanotoxicity. *Nano Biomedicine* 5: 1-10 (2013)