

- ナノ粒子の安全性評価, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, パシフィコ横浜, 神奈川, 2011 年 7 月
3. Matsuoka, A., Kodama, Y., Yoshida, M., Isama, K., Inoue, K., Kawakami, T., Nishikawa, A. Toxicological studies of nanosuspensions of silica, silver and zinc oxide. 24th European Conference on Biomaterials, Dublin, Ireland. Sep. 2011
  4. 宮島敦子・酒井恵子・河上強志・加藤玲子・松岡厚子・尾崎正康・宇佐見誠・伊佐間和郎, A549 細胞を用いたナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系の検討, 日本薬学会第 132 年会, 北海道大学, 札幌, 2012 年 3 月
  2. Isama, K. Kawakami, T., Sakai, K., Miyajima, A., Matsuoka, A. Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts, Stockholm, EUROTOX 2012, Sweden, Jun. 2012
  3. 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, 仙台国際センター, 2012 年 7 月
  4. 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, Portugal, Oct., 2012
  5. 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, 高松市, 2012 年 11 月
  6. Miyajima-Tabata, A., Sakai K., Kawakami T., Kato R., Matsuoka A., Isama K. Cytotoxicity and genotoxicity studies in A549 cells cultured with metal oxide nanoparticles, 52nd Annual Meeting of the Society of Toxicology, San Antonio, USA, March, 2013
  7. Isama K., Kawakami T., Miyajima A., Matusoka 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 Technology, Suntec City, Singapore, July 2013
  8. 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 SiO<sub>2</sub> および TiO<sub>2</sub> 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
  9. 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
  10. 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
- 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 <sup>a</sup>	製造(販売)先	一次粒子径 <sup>b</sup> (nm)	比表面積 <sup>b</sup> (m <sup>2</sup> /g)	比表面積 <sup>c</sup> (m <sup>2</sup> /g)	入手時濃度 (重量%)	pH <sup>c</sup>	形状 <sup>b</sup>	外観(色)
酸化アルミニウム	Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	31	55	50.4	10%	4.7	球状	無色
酸化セリウム	CeO <sub>2</sub>	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	黒みがかかった灰色～緑色固体
二酸化ケイ素	SiO <sub>2</sub>	25	110	95.7	10%	7.8	球状	白色
二酸化チタン	TiO <sub>2</sub>	36	45	41.6	10%	2.4	球状 (アナターゼ80%)	白色
酸化銅	CuO	48	20	14.5	-	-	多面体	黒色
二酸化スズ	SnO <sub>2</sub>	21	45	50.2	-	-	角状	類白色
酸化イットリウム	Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	33	35	40.3	-	-	球状	白色
酸化ニッケル	NiO	< 50	-	-	-	-	-	黒色
酸化亜鉛 <sup>d</sup>	ZnO-Sigma	< 35	-	-	50%	-	-	白色
酸化亜鉛	ZnO-Alfa	Alfa Aesar	40	-	-	40%	-	白色

<sup>a</sup> 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注射用水中で超音波処理した

<sup>b</sup> 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)

<sup>c</sup> メーカーの検査成績表より

<sup>d</sup> 3-Aminopropyltriethoxysilaneを分散剤として2%含有

表2. 各金属酸化物ナノマテリアルの注射用水および10%FBS-MEM中の平均粒子径(流体力学粒径)およびZeta電位<sup>a</sup>

金属酸化物	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)	
	注射用水 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	注射用水 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM <sup>b</sup> (0.2 mg/mL)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	120.9 ± 1.2	325.9 ± 6.3	62.1 ± 0.5	-14.0 ± 1.7
CeO <sub>2</sub>	63.5 ± 1.5	407.2 ± 8.2	55.0 ± 0.3	-21.7 ± 0.7
ITO	98.4 ± 1.5	158.3 ± 2.5	59.8 ± 1.4	-18.7 ± 1.7
SiO <sub>2</sub>	141.7 ± 0.5	189.7 ± 1.8	-54.4 ± 0.4	-10.7 ± 0.4
TiO <sub>2</sub>	41.0 ± 0.3	152.9 ± 0.5	49.5 ± 1.9	-13.1 ± 0.9
CuO	156.4 ± 1.9	242.2 ± 2.9	51.9 ± 0.9 <sup>c</sup>	-10.8 ± 0.5
SnO <sub>2</sub>	— <sup>d</sup>	1388.6 ± 52.4	—	-12.9 ± 0.9
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	105.1 ± 2.0	374.5 ± 9.4	49.3 ± 0.7	-22.7 ± 0.4
NiO	256.8 ± 13.0	403.6 ± 2.6	41.6 ± 0.7 <sup>c</sup>	-18.2 ± 0.3
ZnO-Sigma	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6
ZnO-Alfa	164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5

<sup>a</sup> 平均値 ± SD

<sup>b</sup> 10%FBS-MEMのZeta電位 (-9.6 ± 1.6 mV)

<sup>c</sup> 0.1 mg/mL (10 mg/mLでは測定不可)

<sup>d</sup> -: 測定不可

表3. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中に含まれる金属イオン濃度とその溶出率<sup>a</sup>

試料液	ZnO-Sigma		ZnO-Alfar		CuO		NiO	
	Znイオン濃度 (μg/mL)	溶出率 (%)	Znイオン濃度 (μg/mL)	溶出率 (%)	Cuイオン濃度 (μg/mL)	溶出率 (%)	Niイオン濃度 (μg/mL)	溶出率 (%)
10 mg/mL (懸濁原液)	26	0.33	20	0.25	— <sup>b</sup>	—	—	—
0.2 mg/mL (10%FBS-MEM)	12	7.6	12	7.5	89	56	30	19
0.2 mg/mL (1日後) (10%FBS-MEM)	13	8.2	13	8.3	—	—	—	—
0.05 mg/mL (10%FBS-MEM)	10	25	11	27	19	47	7.7	20
0.05 mg/mL (1日後) (10%FBS-MEM)	11	28	14	35	—	—	—	—
Blank (10%FBS-MEM)	0.29		0.29		0.96		0.19	

<sup>a</sup> 溶出率 (%) = 100 × (イオンとして検出された金属量 / 溶液中の全金属量)

<sup>b</sup> -: 未測定

表4. Tween 80を含む水で調製された金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の平均粒子径 (流体力学径) およびZeta電位<sup>a</sup>

金属酸化物	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)	
	懸濁原液 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	懸濁原液 (10 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)
Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub>	127.8 ± 1.0	141.2 ± 0.9	52.7 ± 1.7	-13.6 ± 1.2
SiO <sub>2</sub>	114.7 ± 0.5	170.7 ± 1.5	-48.8 ± 1.8	-11.1 ± 1.3
ITO	107.1 ± 1.2	118.7 ± 1.4	37.0 ± 0.9	-19.7 ± 1.0
TiO <sub>2</sub>	43.5 ± 0.4	95.9 ± 0.4	39.7 ± 0.6	-19.3 ± 0.6
CeO <sub>2</sub>	67.3 ± 0.5	137.4 ± 0.6	42.6 ± 0.9	-14.8 ± 1.3
ZnO-Sigma	67.3 ± 0.4	144.5 ± 0.6	45.1 ± 3.2	-15.1 ± 1.2
ZnO-Alfar	167.9 ± 0.9	160.4 ± 0.4	-10.4 ± 0.6	-9.2 ± 0.8
NiO (φ 0.05 mm)	102.0 ± 0.5	152.6 ± 2.5	25.2 ± 0.4 <sup>b</sup>	-14.1 ± 0.4
NiO (φ 0.1 mm)	172.0 ± 2.8	249.9 ± 4.2	— <sup>c</sup>	-17.5 ± 0.9
NiO (φ 0.5 mm)	310.4 ± 6.7	411.9 ± 13.1	—	-13.5 ± 1.4
CuO (φ 0.05 mm)	111.5 ± 3.9	148.7 ± 1.1	25.7 ± 0.9 <sup>b</sup>	-11.1 ± 0.9
CuO (φ 0.1 mm)	154.6 ± 9.2	183.9 ± 0.5	—	-8.2 ± 0.4
CuO (φ 0.5 mm)	234.8 ± 68.6	251.9 ± 1.6	—	-9.60 ± 0.4
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (φ 0.05 mm)	146.9 ± 2.4	178.7 ± 1.0	66.9 ± 2.0	-18.5 ± 0.2
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (φ 0.1 mm)	174.2 ± 1.2	221.8 ± 18.5	60.9 ± 1.1	-18.3 ± 0.5
Y <sub>2</sub> O <sub>3</sub> (φ 0.5 mm)	242.8 ± 6.0	271.3 ± 1.7	—	-15.6 ± 0.4

<sup>a</sup> 懸濁原液中のTween 80濃度は0.1% (w/v)

<sup>b</sup> 1 mg/mL

<sup>c</sup> —:未測定

表5. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液のPZC<sup>a</sup>

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

<sup>a</sup>懸濁液中金属酸化物ナノマテリアル濃度は10 mg/mL

<sup>b</sup>3-Aminopropyltriethoxysilaneを分散剤として2%含有

表6. NiOナノマテリアル懸濁液中の二次粒子の平均粒子径(nm)<sup>a</sup>

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 <sup>b</sup>	310.4 ± 6.7	172.0 ± 2.8	102.0 ± 0.5
0.4 mg/mL <sup>c</sup>	373.1 ± 0.6	234.7 ± 2.2	154.8 ± 1.2
24h <sup>d</sup>	367.7 ± 11.7	225.9 ± 3.9	147.2 ± 0.5
0.2 mg/mL <sup>c</sup>	411.9 ± 13.1	249.9 ± 4.2	152.6 ± 2.5
24h <sup>d</sup>	371.2 ± 11.4	219.3 ± 0.7	135.4 ± 3.0
0.1 mg/mL <sup>c</sup>	345.1 ± 15.4	258.0 ± 1.5	151.2 ± 3.0
24h <sup>d</sup>	369.0 ± 5.6	217.1 ± 2.0	132.2 ± 2.2
0.05 mg/mL <sup>c</sup>	414.2 ± 5.8	234.5 ± 17.8	135.2 ± 1.5
24h <sup>d</sup>	348.7 ± 11.3	206.9 ± 1.4	130.4 ± 15.2

<sup>a</sup> Tween 80 [0.1% (w/v)] を分散剤として使用

<sup>b</sup> 標準原液.

<sup>c</sup> 10%FBS-MEM 懸濁液.

<sup>d</sup> 24時間後(37°C)

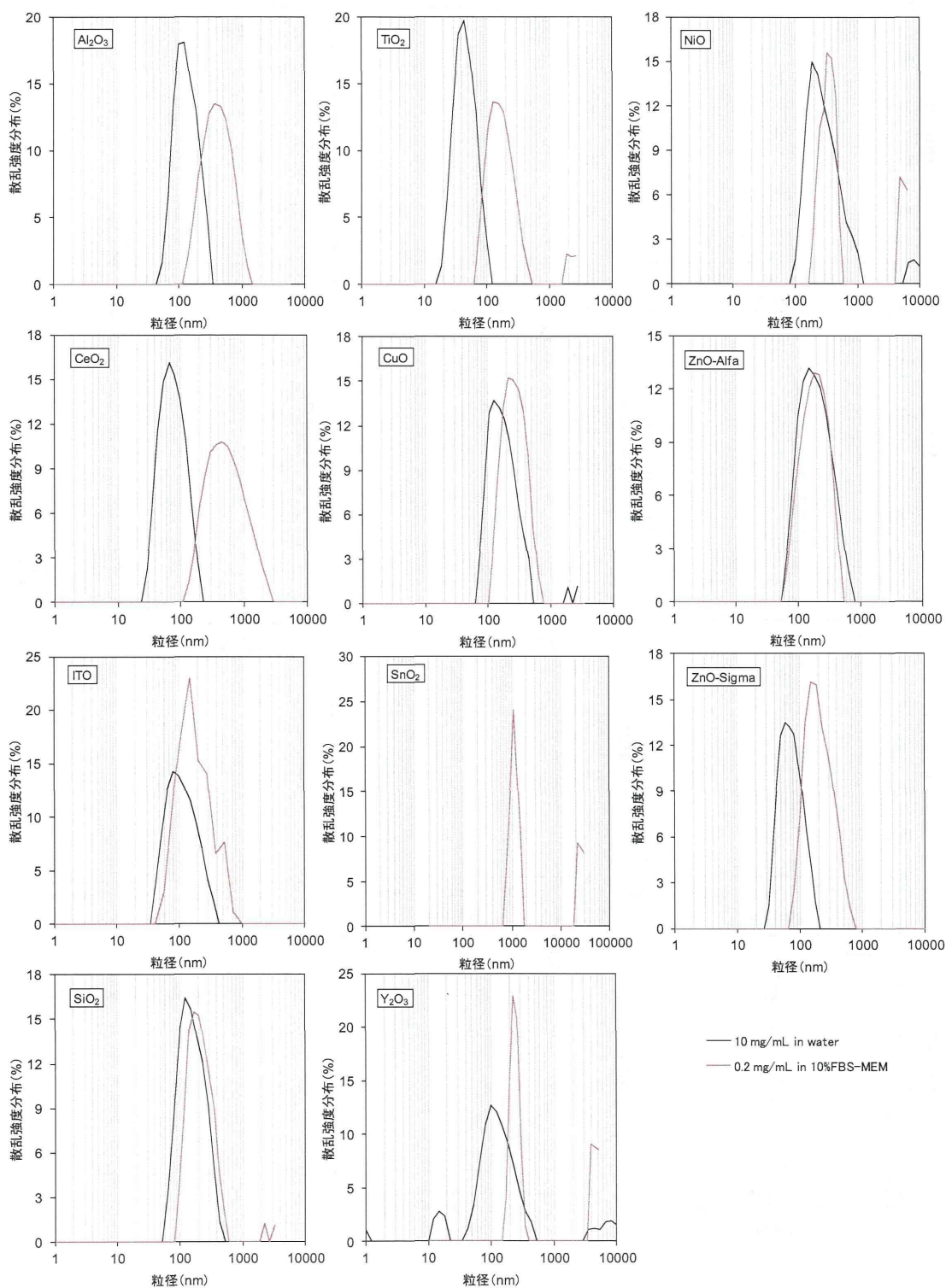


図 1. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の粒径分布 (散乱強度分布)

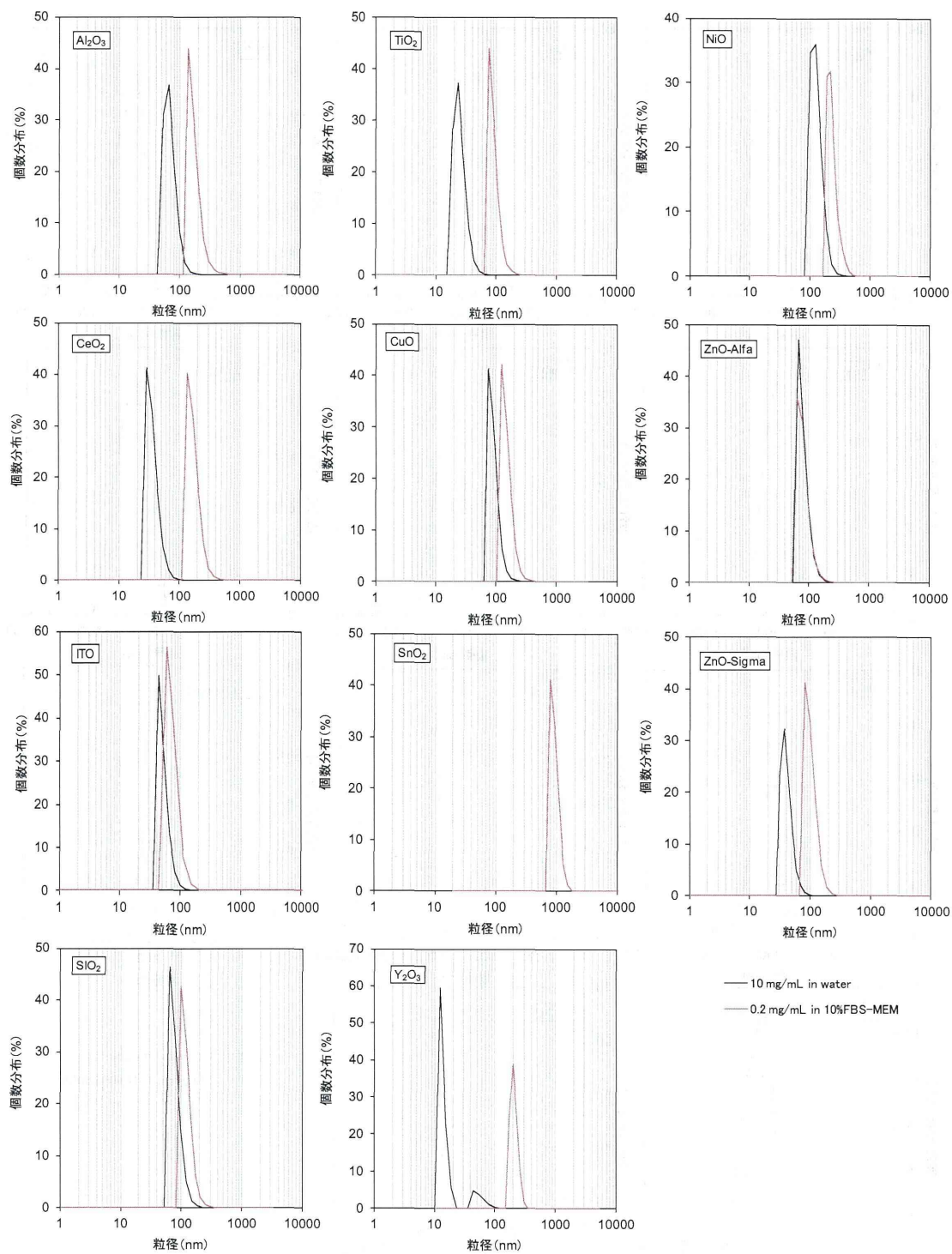


図 2. 各金属酸化物ナノマテリアル懸濁液中の粒径分布 (個数分布)

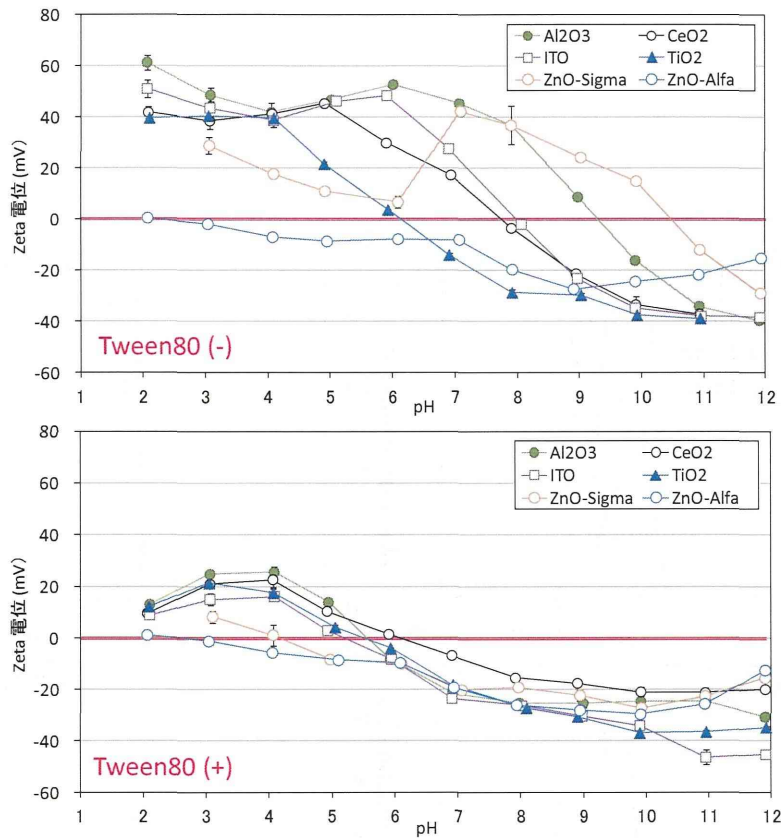


図 3. Tween80 添加 (+) および非添加 (-) 条件下での各金属酸化物 ナノマテリアル原液 (10 mg/mL) の各 pH での Zeta 電位

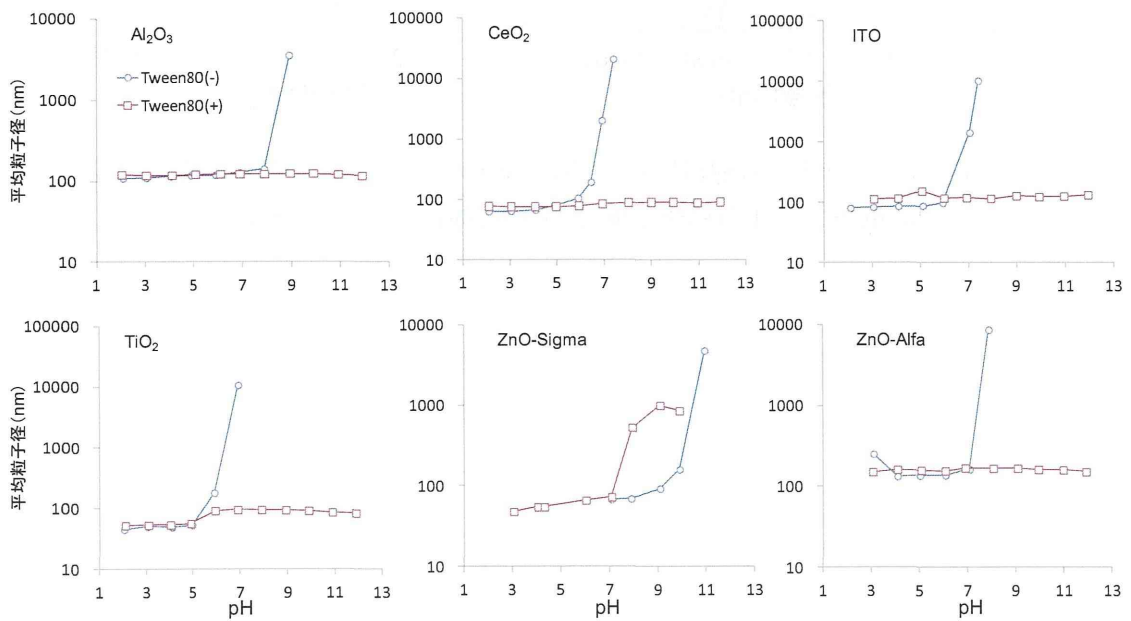


図 4. Tween80 添加 (+) および非添加 (-) 条件下での各金属酸化物 ナノマテリアル原液 (10 mg/mL) の各 pH での平均粒子径



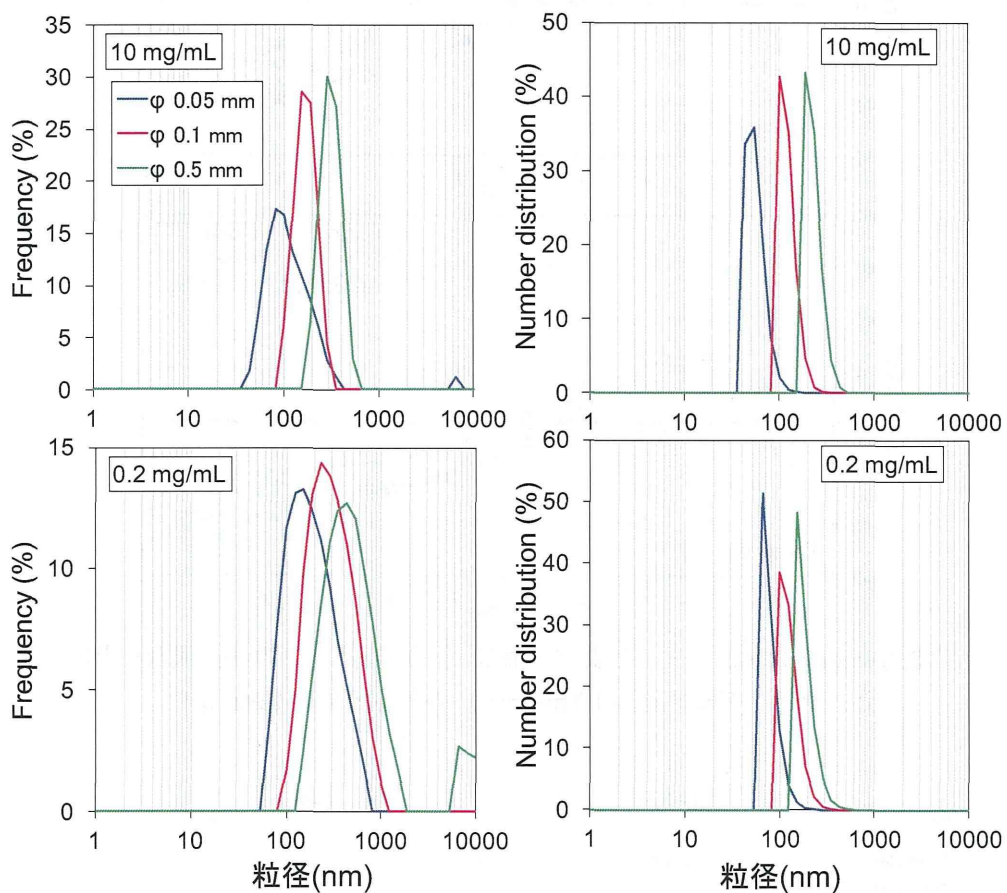


図 5. NiO ナノマテリアル懸濁原液 (10 mg/mL) および 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) 中の粒径分布 (左:散乱強度分布、右: 個数分布)

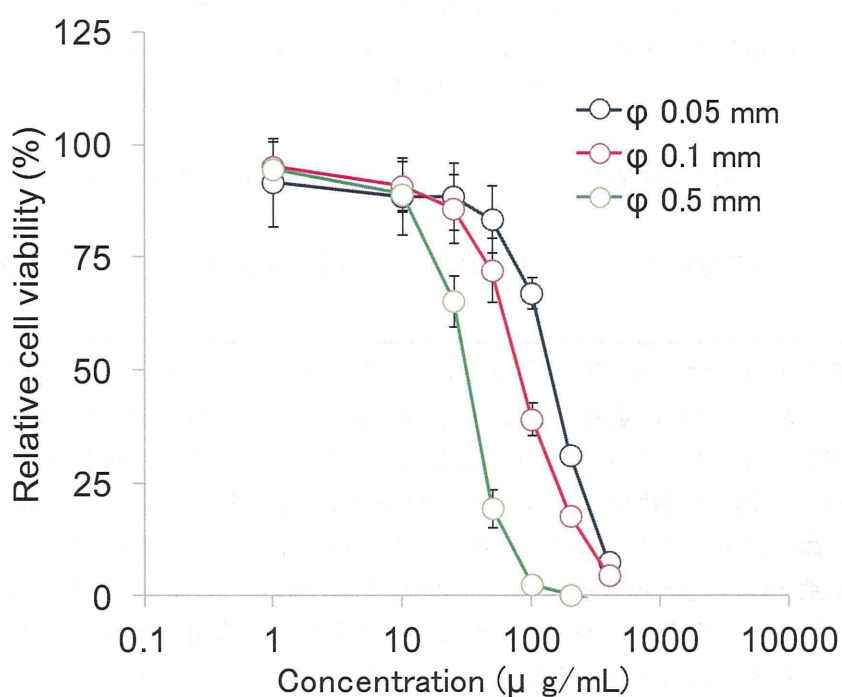


図 6.二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液の細胞毒性曲線 (MTS 法、48 時間曝露)

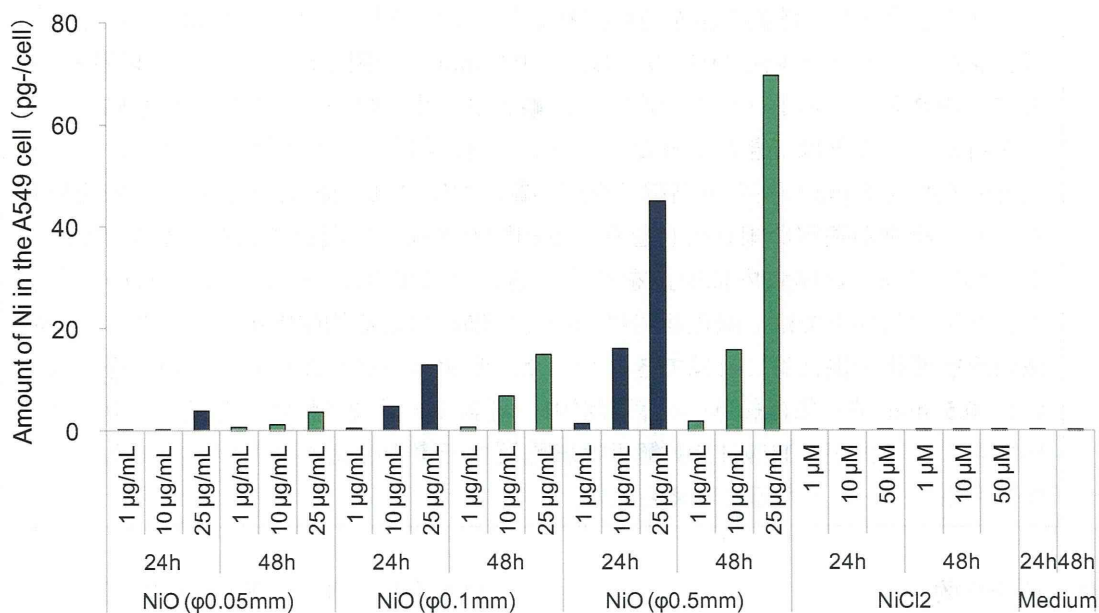


図 7.二次粒子径サイズの異なる NiO ナノマテリアル懸濁液、NiCl<sub>2</sub> 溶液および対照試料 (培地のみ) 曝露後 24 および 48 時間後の A549 細胞中 Ni 量

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  
分担研究総合報告書

(分担研究課題名) ナノマテリアルの細胞内動態の解析

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：**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に曝露された培養細胞における細胞内動態を透過型電子顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて明らかにする基礎研究として、*in vivo* 材料を用いて TEM-EDS で検出可能か予備検討を経て、酸化亜鉛を曝露した細胞系を用いた *in vitro* 系の電子顕微鏡標本作製条件の検討を開始した。次に培養細胞に酸化亜鉛を曝露した場合の超微形態学的な観察を行い、細胞内の TEM-EDS の解析を行った。*In vitro* 実験では、低および高濃度の酸化亜鉛および径の異なる粉碎用ジルコニアボールで調製し、二次粒子径の大きさおよび細胞毒性が異なる酸化ニッケルを曝露した。その結果、*in vivo* 実験として銀を曝露したラット肺のマクロファージ細胞内に TEM-EDS に銀が認められたことから、同解析法は細胞内の元素分析に有用であると考えられた。*In vitro* 実験の基礎検討として実施した培養細胞の電顕観察用標本の作製方法については、固定時間 2 時間、スパーテルによる掻き取り回収が培養細胞の形態観察に適していると考えられた。これらの基礎検討に基づき、酸化亜鉛および酸化ニッケルを曝露した培養細胞を電顕観察した。その結果、1 および 10  $\mu\text{g}$  亜鉛曝露群、ジルコニアボール径 0.05、0.1 および 0.5 mm で調製した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群においても同程度の 0.4~0.6  $\mu\text{m}$  の不整形高電子密度物質が観察され、径 0.5 mm 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径 0.5 mm 群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、十分にキャラクタリゼーション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。

研究の行った3年間ではまず、*in vivo* 材料を用いて TEM-EDS で細胞内のナノマテリアル等元素が検出可能か予備検討を行い、続いて *in vitro* 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討を行った。次に培養細胞に酸化亜鉛を曝露した場合の超微形態学的な観察を行い、細胞内の TEM-EDS の解析を行った。さらに粒子の大きさにより細胞毒性が異なるニッケルを曝露した培養細胞について、超微形態学的解析を実施した。培養細胞の実験では、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曝露した。

## B. 研究方法

今回の全ての実験で使用したナノマテリアルは、本研究の分担研究者により物理化学的特徴を十分に把握したものを用いた。

### 1. *in vivo* 材料を用いた TEM-EDS 解析の予備検討

2.0 mg/kg の酸化亜鉛あるいは 0.5 mg/kg 銀の懸濁液を雄性成熟ラットに反復投与することにより誘発した肺病変の一部(肉眼的異常部位)を細切して 2.5%グルタルアルデヒド・リン酸緩衝作用に一晩固定した。その後、1%オスミウム酸で後固定し、アルコール脱水後ブチルグリジルエーテルで置換し、エポキシ樹脂に包埋した。準超薄切片を作成し、トルイジンブルー染色後光学顕微鏡で観察し、肺胞マクロファージ集簇を伴う肉芽腫性炎症発現部位をトリミン

グした。トリミング部位を超薄し、銅製メッシュに乗せ酢酸ウラニル・鉛染色を施して透過型電子顕微鏡(TEM, JEM-14000)にて 100 KV でマクロファージを中心に観察した(x1500 から x15000 くらい)。病変部の数か所について、TEM-EDS にて亜鉛および銀の元素解析を実施した。

### 2. *in vitro* 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討

A459 培養細胞)に異なる用量の酸化亜鉛(ZnO) を曝露 24 時間後、細胞を回収し、トリプシン処理の有無、細胞数あるいは用量による電顕標本作製に与える影響を検索した。細胞の培養条件および回収条件については図 5,6 に、トリプシン処理の有無の操作手順の違いを図 7,8 に詳細を記載した。

電顕用標本作製条件は *in vivo* 実験方法を参考にし、3%グルタルアルデヒド固定時間のみ培養細胞で推奨されている 2 時間固定とした。後固定は 1%オスミウム酸で 2 時間、アルコール脱水後ブチルグリジルエーテルで置換、エポキシ樹脂包埋した。エポンプロックはトルイジンブルー準超薄切片作成後、トリミングし、銅製メッシュに乗せ酢酸ウラニル・鉛染色二十染色を施して透過型電子顕微鏡(TEM, JEM-14000)にて 80~100 KV で TEM にて観察した。

### 3. 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 9 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  $\mu\text{g/mL}$  の酸化亜鉛、あるいは 3 種類の粉碎用ジルコニアボール (径 0.05、0.1 および 0.5 mm) で調製した酸化ニッケル試料 (以下、 $\phi 0.05$ 、0.1、0.5 mm と表示。これらの酸化ニッケル懸濁液の二次粒子径サイズはそれぞれ異なる。試料調

製法および粒子径等の詳細は分担研究者・河上の報告参照)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70nm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 µg/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。

#### (倫理面への配慮)

実験中に動物に与える苦痛は最小限にとどめるよう配慮した。動物実験は、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会の審査・承認を経て実施した。培養細胞を用いた実験であるため倫理上の問題は発生しない。

### C. 研究結果

#### 1. *in vivo* 材料を用いた TEM-EDS 解析の予備検討

##### 1) 酸化亜鉛

光学顕微鏡レベルで酸化亜鉛投与ラットの肺では顕著な肉芽腫性炎症および気管支過形成が認められ、炎症部周囲には泡沫状の肺胞マクロファージの集簇も観察された。

電顕観察においても、肉芽腫性病変では、多くのマクロファージが認められた。

数か所のマクロファージについて、EDSによる元素解析を実施したが、細胞全体にも亜鉛 Zn は検出されず、ライソゾーム相当部位のみを囲んでも Zn のピークは検出されなかった。

##### 2) 銀

光学顕微鏡レベルで酸化亜鉛投与ラットの肺では明らかな肉芽腫性炎症が認められ、

炎症部周囲には泡沫状の肺胞マクロファージの集簇も観察された(図1)。

電顕観察においても、銀投与群の肺病変においても、肉芽腫性病変では、多くのマクロファージが認められた。

酸化亜鉛と同様に、数か所のマクロファージについて、EDSによる元素解析を実施したところ、高いピークではないものの細胞全体に銀が検出され(図2)、ライソゾームのみを囲んだ解析においても銀のピークが検出された(図3)。核、その他の細胞質には検出されなかった(Fig.8)。

#### 2. *in vitro* 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討

酸化亜鉛高用量群では、培養後回収物はオスミック酸で固定されず標本作製過程で消失したことから、回収物の大部分は被験物質である酸化亜鉛の凝集物であった。

投与量1~10 µg/mLの酸化亜鉛では細胞が回収可能であった。

細胞数については $3 \times 10^5$  cellsでは回収量が少なく標本作製過程途中で細胞塊が消失した。 $10 \times 10^5$  細胞では樹脂包埋まで細胞が残っていた。

固定は良好であった。

これらの細胞を電子顕微鏡で観察した。トリプシン処理を行った非曝露の細胞を非処理細胞と比較したところ処理群では細胞周囲の突起が消失あるいは減少していた。細胞は細胞小器官の密度が高く、リボゾームも豊富であり活性の高い細胞であることが考えられた。一部細胞質内にいびつな形の小胞が認められた。掻きとりを行った非処理群では、細胞突起もよく保持されており、各細胞質内に状態が保持されていた。トリプシン処理群と同様の大小種々の細胞質内小胞も認められた。

酸化亜鉛投与群では、核膜へのクロマチ

ン凝集などアポトーシスに関連した変化の増加はみとめられなかった。特徴として、ライソゾーム内と思われる空胞部位に高電子密度物質が多少の差はあれ、大部分の曝露群の細胞に認められた。また小胞の増加がトリプシン処理・非処理群ともに増加する傾向が認められたが明らかではなかった。電子顕微鏡結果を表1にまとめた。

### 3. 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

#### 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 (φ0.05 mm) 図 8-10

粉砕用ジルコニアボール粒子径 0.05 mm および 0.1 mm で調製した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。

#### 4) 酸化ニッケル (φ0.5 mm) 図 11~13

粉砕用ジルコニアボール粒子径 0.5 mm で調製した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

### 1. in vivo 材料を用いた TEM-EDS 解析の予備検討

亜鉛および銀を経気道的に反復暴露したラットの肺の電顕観察および EDS 解析より、両物質とも光学顕微鏡では顕著な肺の炎症性変化を誘発したが、投与物質である亜鉛あるいは銀の細胞内局在の検索は容易ではなかった。亜鉛については検出できなかったが、銀では肺胞マクロファージ内の局在が確認できた。光学顕微鏡と異なり広範な領域を観察できないが、電顕観察による EDS 解析は曝露物質を検出できる有用なツールであると考えられた。

### 2. in vitro 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討

*in vitro* 研究の基礎として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討を中心に解析を行った結果、

- 酸化亜鉛の暴露条件として
- 投与量 1~10 µg/mL
- 細胞数  $10 \times 10^5$
- 3%グルタール固定時間 2時間

が適切であると考えられた。

これらの細胞を電子顕微鏡での観察結果をもとにトリプシン処理と非処理細胞と比較したところ、トリプシン処理により細胞突起が消失する細胞形態変化が認められた。また非処理のほうが培養時の状態がよく保持されていたことから、トリプシン処理は細胞回収方法として適切でないことが確認された。これは文献の結果とも一致した。

酸化亜鉛曝露群で観察された特徴は、細胞ライソゾーム内と思われる箇所を高電子密度物質の存在が認められ、酸化亜鉛である可能性が示唆されたため、平成 25 年度に EDS 解析を行った(以下参照)。酸化亜鉛投与によりアポトーシスの増加などは認められなかったが、細胞質内の小胞の増加は、細胞質内の変性所見として考えられるが、無処置群にも観察され、細胞回収時の人工産物の可能性も高いことから、空胞の増加傾向について投与との関連性を明らかにすることはできなかった。再実験を平成 25 年度に実施した(以下参照)。

### 3. 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

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含み、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 nm 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 nm 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**

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に曝露された培養細胞における細胞内動態を透過型電子顕微鏡およびエネルギー分散型 X 線分析 (TEM-EDS) を用いて明らかにする基礎検討として、*in vivo* 材料を用いて曝露物質が TEM-EDS で検出可能か予備検討を行った後、*in vitro*

実験として、酸化亜鉛を曝露した細胞系における電子顕微鏡標本作製条件の検討を行った。次に培養細胞に酸化亜鉛を曝露した場合の超微形態学的な観察を行い、細胞数や回収条件、電顕標本作製条件の検討を行った。さらに細胞が回収可能な濃度の酸化亜鉛 2 用量と二次粒子径の大きさにより細胞毒性が異なる酸化ニッケル 3 試料を曝露した培養細胞について、超微形態学的解析を実施した。

その結果、*in vivo* 実験として銀を曝露したラット肺のマクロファージ細胞内に TEM-EDS に銀が認められたことから、同解析法は細胞内の元素分析に有用であると考えられた。基礎検討として実施した培養細胞の電顕観察用標本の作製方法については、固定時間 2 時間、スパーテルによる掻き取り回収が培養細胞の形態観察に適していると考えられた。これらの基礎検討に基づき、酸化亜鉛および粒径の異なる粉碎用ジルコニアボールで調製した酸化ニッケルを曝露した培養細胞を電顕観察した。その結果、1 および 10  $\mu\text{g}$  亜鉛曝露群、酸化ニッケル曝露群（粉碎用ジルコニアボール径:  $\phi 0.05$ 、 $0.1$  および  $0.5 \text{ mm}$ ）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  $0.4\sim 0.6 \mu\text{m}$  の不整形高電子密度物質が観察され、 $\phi 0.5 \text{ mm}$  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。回収時の人工産物と考えられる空胞が無処置および曝露細胞ともに観察された。

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  $\phi 0.5 \text{ mm}$  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。

## 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. 32<sup>nd</sup> 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

### 3. その他

なし



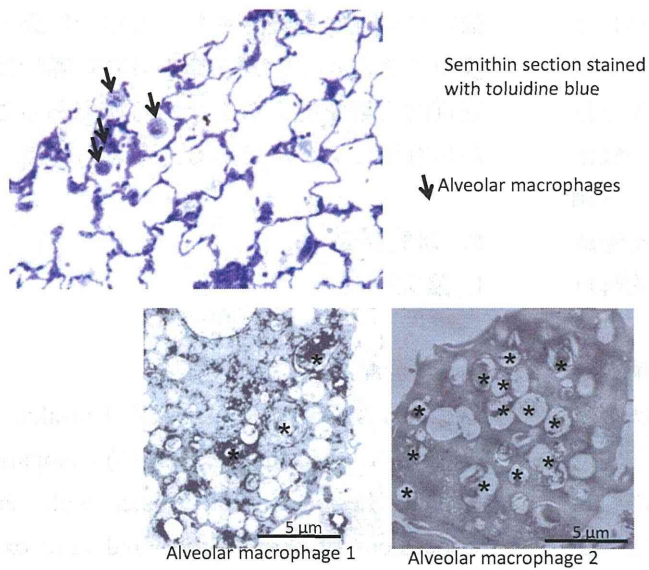


図 1 銀曝露 肺胞内のマクロファージ(上図矢印 準超薄切片 トルイジンブルー染色)。マクロファージ内には多くのライソゾームが観察される

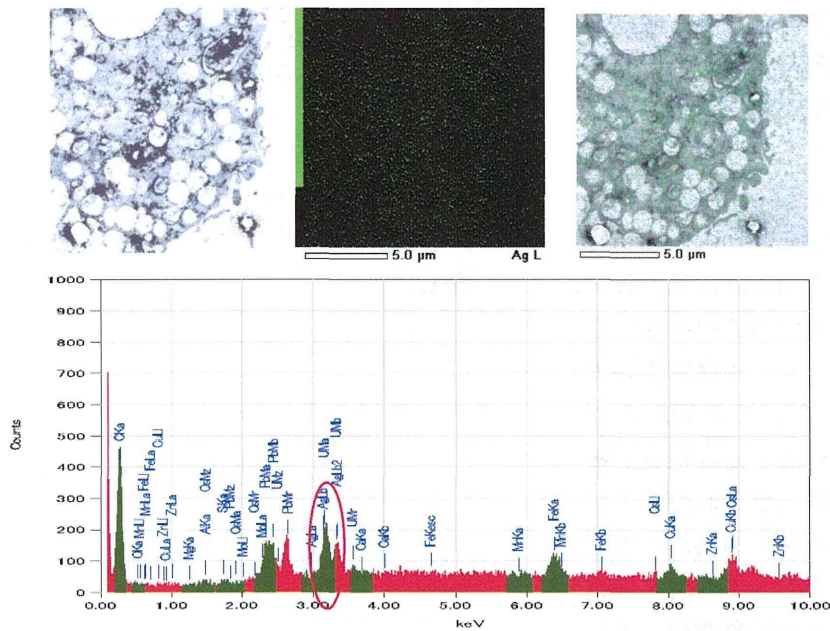


図 2 肺胞マクロファージ電顕写真および細胞全体内 EDS 解析結果 1 Ag のピーク(○で囲んだ部分)が認められた。

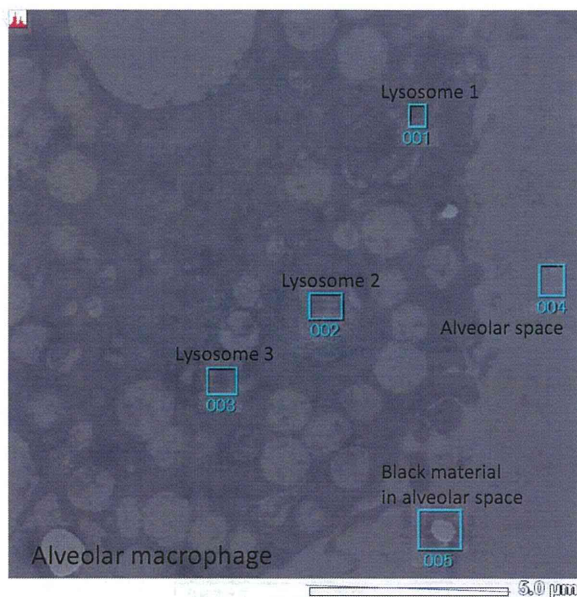


図 3 肺泡マクロファージ電顕写真。ライソゾーム(001, 002, 003)および細胞外(004, 005)を囲んで解析した。

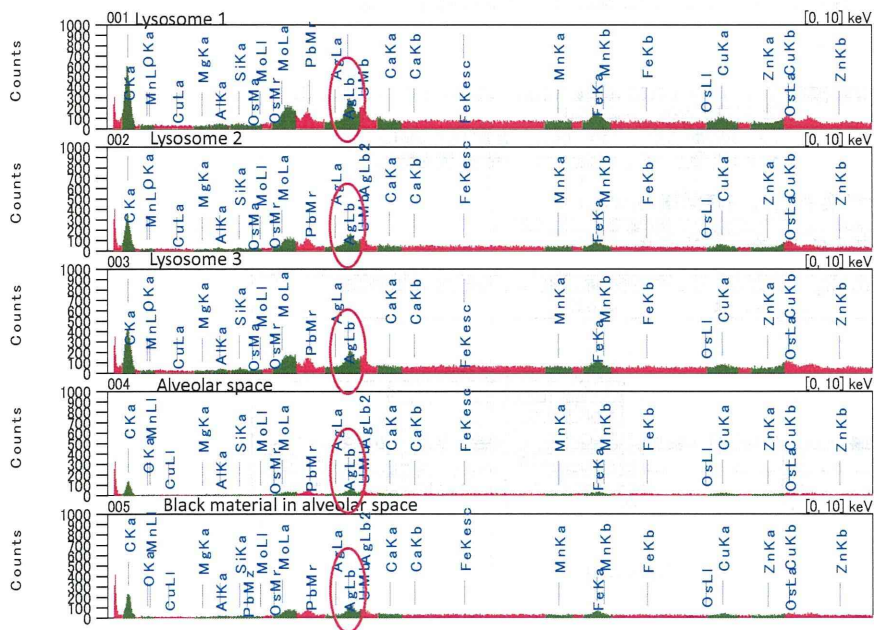


図 4 ライソゾーム内(001~003)には Ag が検出されたが(○で囲んだ)、細胞外(004,005)には検出されなかった。

細胞培養および曝露条件 -細胞数-

A549

1日目 細胞播種 3x 10<sup>5</sup> cells/10mL/10cm dish 10枚以上  
 2日目 1or2枚 未処置(培地+ddw 5mL)、  
 4枚 nano処置(ZnO、10ug/mL、3倍濃度を5mL)  
 4枚 nano処置(ZnO、50ug/mL、3倍濃度を5mL)

3日目 (午前中) 約24時間後 harvest  
 PBS wash, trypsin処理, 血清入り培地で止めて遠心、  
 pptに グルタルを入れて固定 (2h)

nano Stock 10 mg/mL (ZnO ナノテック alfa(40 mg/mL)を4倍希釈)  
 1mL\*4 4 mL

nano処理用

		22mL作成(4枚)		
final (ug/mL)	final *3(ug/mL)	nano (uL) 10mg/mL ZnO	ddw (uL)	medium (uL)
50	150	330	0	21670
10	30	66	264	21670
未処置	0	0	330	21670

		27mL作成(5枚)		
final (ug/mL)	final *3(ug/mL)	nano (uL) 10mg/mL ZnO	ddw (uL)	medium (uL)
50	150	405	0	26585
10	30	81	324	26585
未処置	0	0	405	26585

学位記授与会議20120528 12

図5 細胞培養および曝露条件 -細胞数-

細胞培養および曝露条件 -細胞回収条件-

A549

1日目 午後、細胞播種 5 or 10 x 10<sup>5</sup> cells/10mL/10cm dish 10枚以上  
 2日目 1or2枚 未処置(培地+ddw 5mL)、  
 4枚 nano処置(ZnO、1ug/mL、3倍濃度を5mL)  
 4枚 nano処置(ZnO、10ug/mL、3倍濃度を5mL)

3日目 (午後1時過ぎ) 約24時間後 harvest  
 PBS wash, スクレイパーで細胞を回収, 遠心、  
 pptに グルタルを入れて固定 (2h)

nano Stock 10 mg/mL (ZnO ナノテック alfa(40 mg/mL)を4倍希釈)  
 1mL\*4 4 mL

nano処理用

		45mL作成(8枚分)		
final (ug/mL)	final *3(ug/mL)	nano (uL) 10mg/mL ZnO	ddw (uL)	medium (uL)
10	30	135	0	44865
1	3	14	122	44865
未処置	0	0	135	44865

学位記授与会議20120528 13

図6 細胞培養および曝露条件 -回収条件-



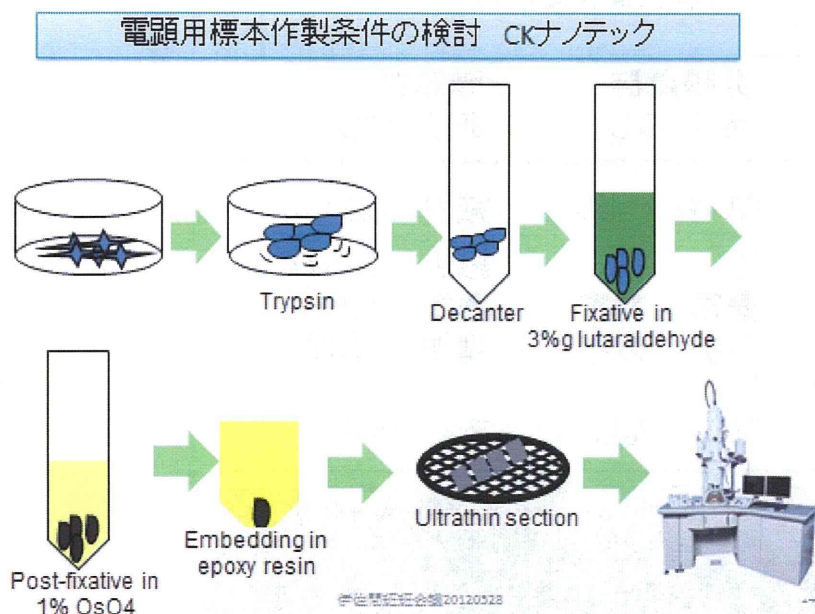


図 7 電顕用標本作製条件の検討 酸化亜鉛(CK ナノテック)

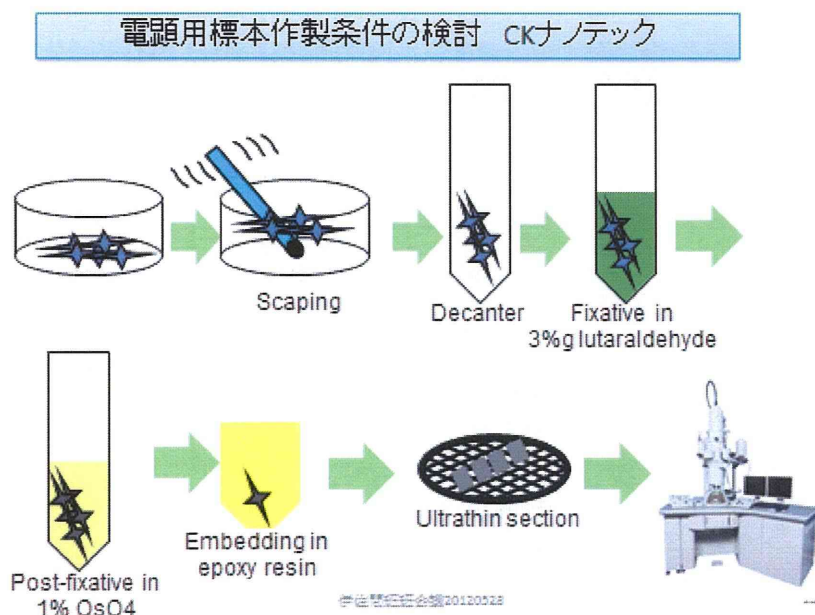


図 8 電顕用標本作製条件の検討 酸化亜鉛(CK ナノテック)