

超微形態学的変化まとめ

トリプシン処理	非曝露群		曝露群	
	あり	なし	あり	なし
細胞周囲突起	なし	減少 あり	減少	減少
細胞内小器官	密	密	減少?	減少?
リボゾーム	豊富	豊富	豊富	豊富
空胞	あり	あり	増加?	増加?
ライソゾーム内 高電子密度	なし	なし	あり	あり

- ✓ 超微形態学的にもトリプシン処理なしが、培養細胞の変化の検出に適していると結論した
- ✓ 酸化亜鉛曝露群で増加した空胞は平成25年度に再実験。

表1 トリプシン処理が細胞に与える影響の比較表

nano処理用		
	final (ug/mL)	final *3(ug/mL)
1) 未処理	0	0
2) ZnO (alfa)	1	3
3) ZnO (alfa)	10	30
4) NiO (φ0.05mm)	10	30
5) NiO (φ0.1mm)	10	30
6) NiO (φ0.5mm)	10	30

培養細胞  
A549 細胞

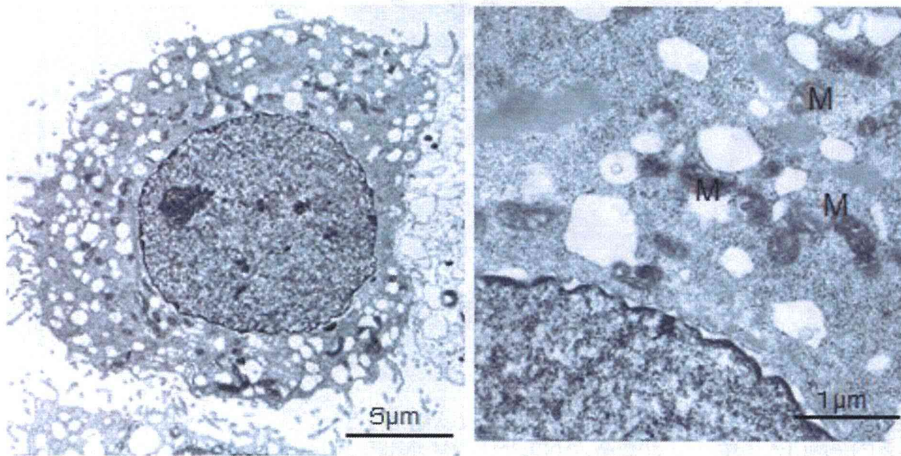
細胞播種  
10 x 10<sup>5</sup> cells/10mL/10cm dish

被験液(3倍濃度) 5mLを添加

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9 酸化亜鉛および酸化ニッケル曝露 実験条件

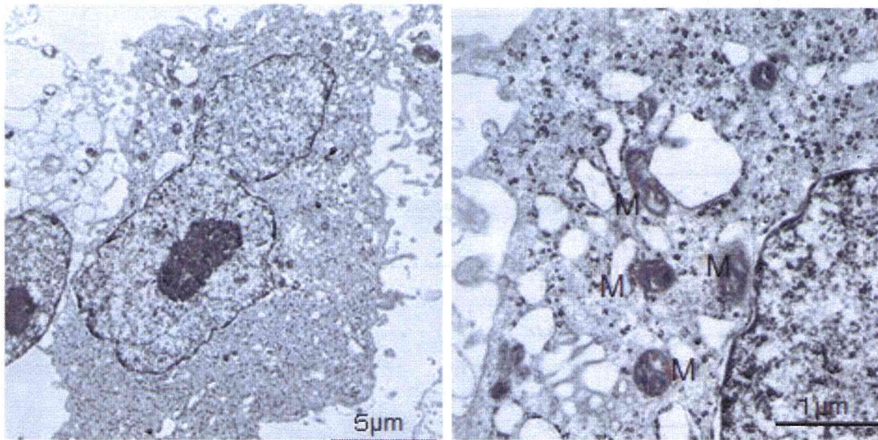


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にはリボソームが豊富。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 10 無処置細胞

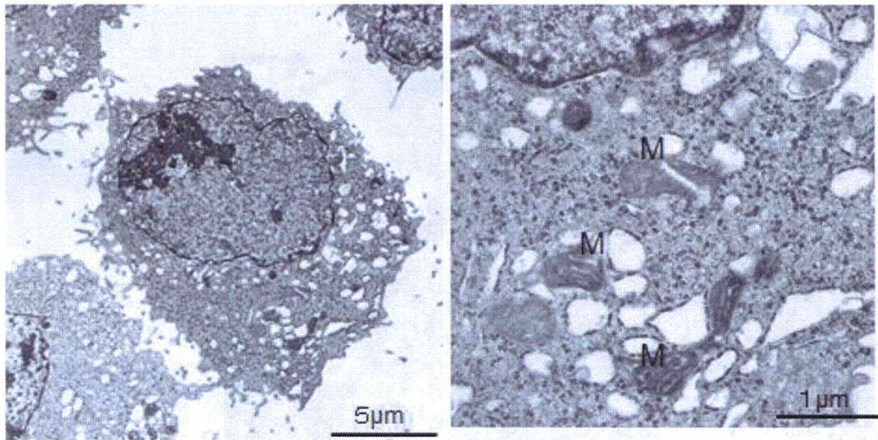


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

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 11 無処置細胞

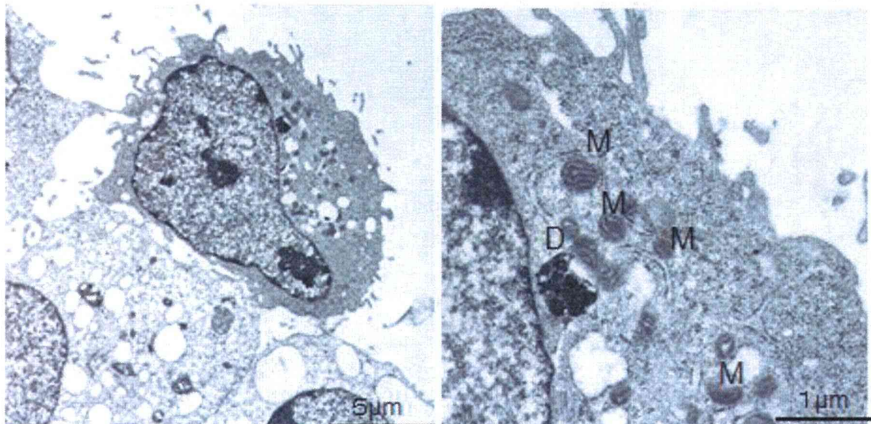


細胞周囲には突起が豊富。核は異常は認められない。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

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 12 酸化亜鉛曝露細胞

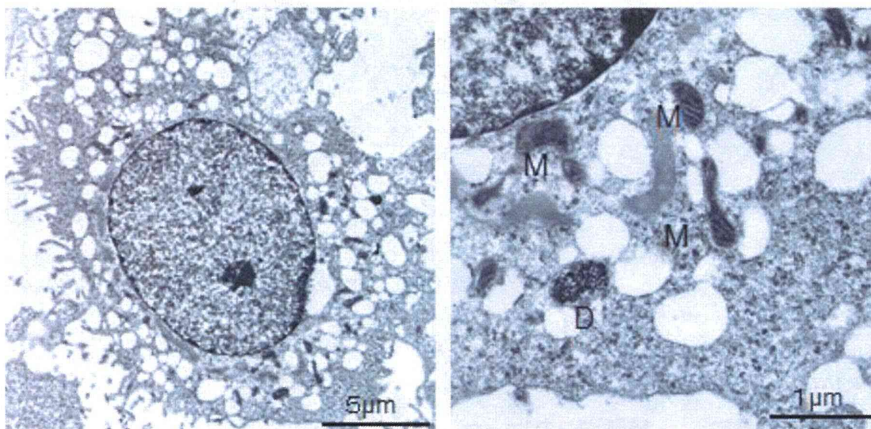


細胞周囲には突起が豊富。核及び細胞質には異常は認められない。

細胞質にはリゾソームが豊富。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 13 酸化ニッケル (φ0.05 mm) 曝露細胞

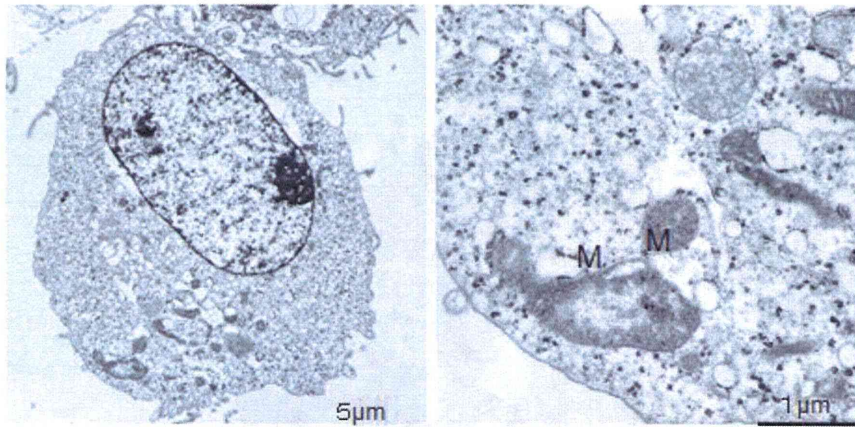


細胞周囲には突起が豊富。細胞質全体には大小種々の空胞で占められている。細胞質内空胞は人工産物と考えられる。

細胞質にはリゾソームが豊富。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 14 酸化ニッケル (φ0.05 mm) 曝露細胞

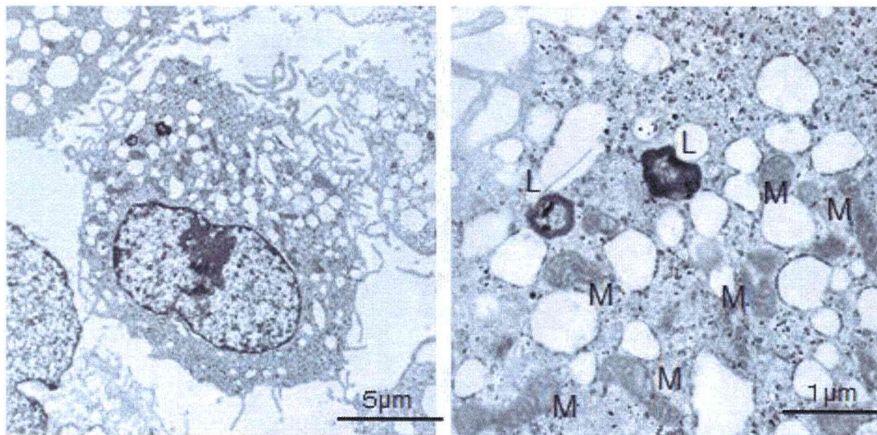


細胞周囲には突起は乏しい。核は異常は認められない。

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 15 酸化ニッケル (φ0.5 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 16 酸化ニッケル (φ0.5 mm) 曝露細胞

酸化亜鉛曝露群 EDS解析

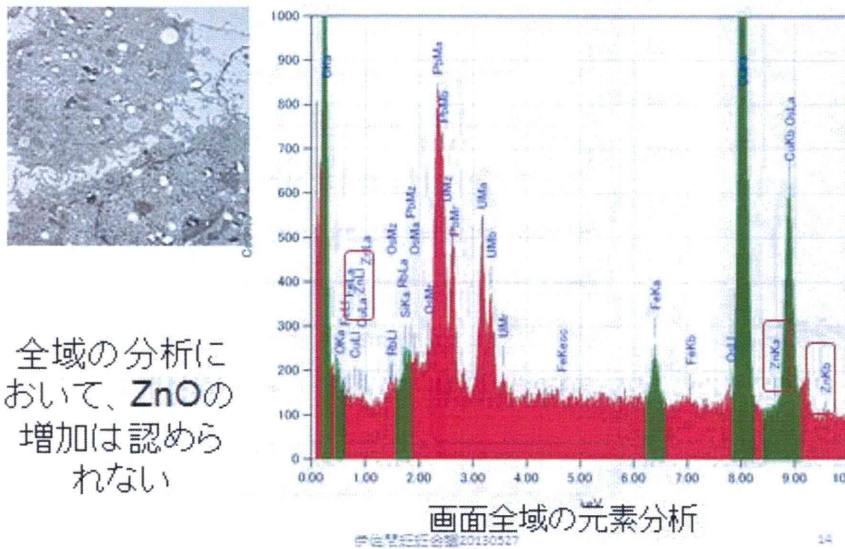


図 17 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析

酸化亜鉛曝露群 EDS解析

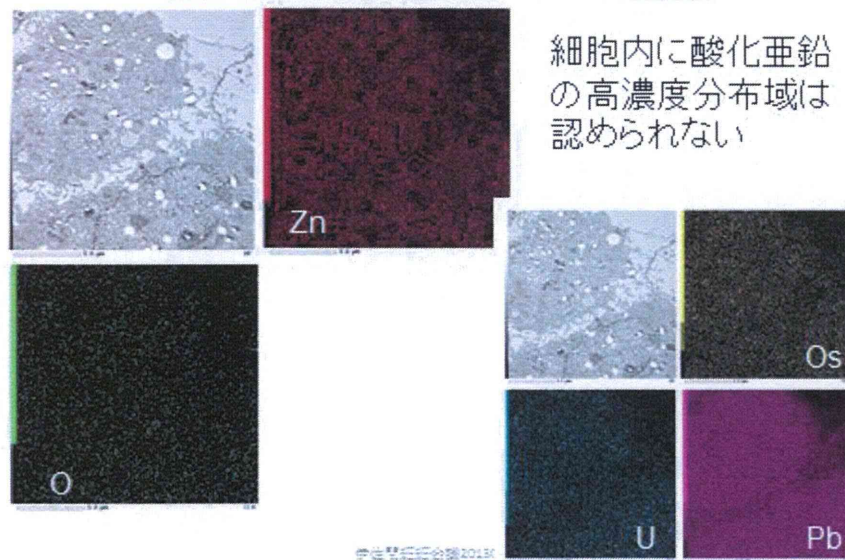


図 18 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析

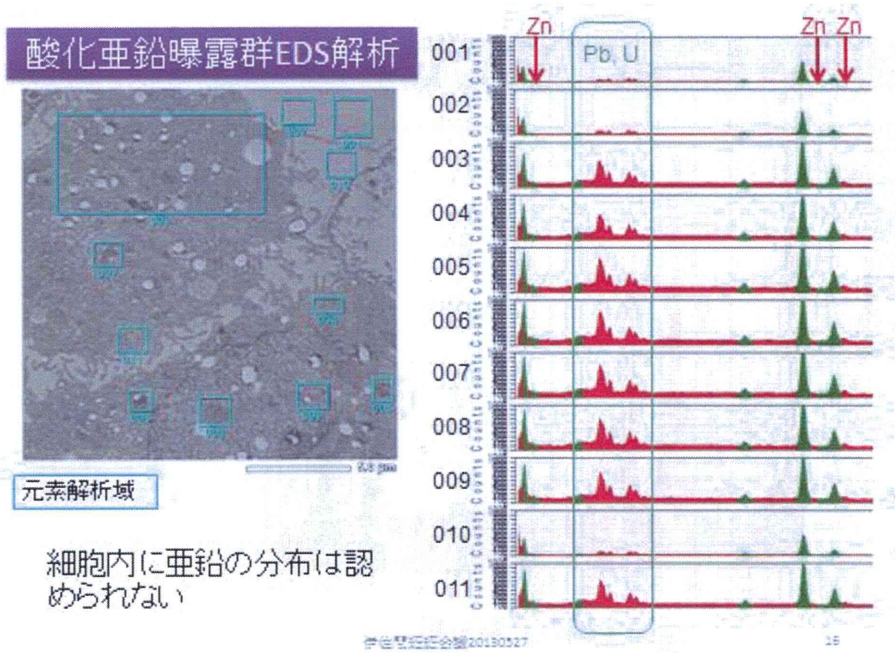


図 19 酸化亜鉛細胞内分布 EDS 解析

（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	酒井 恵子	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。本研究では十分にキャラクター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、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。ナノマテリアル *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト肺がん由来細胞株である 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、その有用性を確認した。次に、10 種類の酸化金属ナノマテリアルを対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した。細胞毒性が観察された 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。その結果、明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO のみであった。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、細胞毒性強度と遺伝毒性強度との間に関連がなかった。ZnO の細胞毒性の発現について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として、細胞毒性発現メカニズムについて解析を進めた。また、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結果、CuO、ZnO、NiO で毒性が観察された。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。今後、物理化学的状態及び細胞毒性が異なる 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 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。平成 24 年度は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。平成 25 年度は、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、*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。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

CHL、A549、THP-1 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、酸化スズ SnO<sub>2</sub>、酸化イットリウム Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> (以上 CIK NanoTeK)、酸化ニッケル NiO、(Sigma-Aldrich)酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び NanoTeK, Alfa Aesar)を用いた。また、Sigma-Aldrich 社の ZnO ナノマテリアルの分散剤として報告されている 3-Aminopropyl-triethoxysilane (APTS) (Sigma-Aldrich)についても検討した。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・河上の報告参照。)

### 2) 細胞株

チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞 CHL は、国立衛研において樹立された細胞株で基盤研の JCRB 細胞バンク(吹田)、American Type Culture Collection (ATCC) (USA)にも登録され、遺伝毒性試験に汎用されている。A549 はヒト肺由来細胞株で JCRB 細胞バンク(吹田)より購入して使用した。THP-1 細胞は、ヒト白血病由来単球細胞株で ATCC より購入して使用した。

### 3) 細胞毒性試験・コロニー法

医療機器の生物学的安全性評価のための試験法に従い、50 個/well の CHL 細胞または A549 細胞を 24-well プレートに播種し、翌日被験液を添加し、さらに 7 日間または 10 日間静置培養した。その後、ギムザ染色してコロニーを数え、陰性対照群のコロニー数に対する割合 (コロニー形成率) を算出した。

#### 4) 細胞毒性試験・MTT 法

細胞を 96-well プレートに播種し (CHL ;  $1 \times 10^4$  cells/well、A549 ;  $5 \times 10^3$  cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、4 または 6、24 及び 48 時間培養した。培地を除去後、100  $\mu$ L の Phenol Red-free MEM 培地及び 20  $\mu$ L 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) 細胞毒性試験・ATP 法

細胞を 96-well プレートに播種し (THP-1 ;  $2 \times 10^4$  cells/well、A549 細胞 ;  $5 \times 10^3$  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  $\mu$ L 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 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。

#### 6) 細胞内 GSH 含量の測定

A549 細胞を 96-well 白色プレートに播種し ( $5 \times 10^3$  cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、3、6、24 及び 48 時間培養した。培地を除去後、100  $\mu$ L の GSH-Glo<sup>™</sup> 試薬 (Luciferin-NT, Glutathione Stransferase 含有, Promega) を添加し、遮光、室温で 30 分間反応させ、さらに 100  $\mu$ L の Reconstituted luciferin detection 試薬 (Esterase 含有) を添加して、遮光、室温でさらに 15 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。

#### 7) 遺伝毒性試験・小核試験

CHL 細胞または A549 細胞 ( $1 \times 10^5$  cells)

を  $\phi$  60 mm プレートに播種し、翌日被験液を添加して 24 時間及び 48 時間培養した。その後トリプシン処理による剥離と遠心により細胞を回収し、生細胞数をカウントした。CHL 細胞または A549 細胞より小核観察用標本作製し、標本をアクリジン オレンジで染色し、蛍光顕微鏡で観察した。陽性対照物質としてマイトマイシン C (MMC) (Kyowa Hakko Kirin) を用いた。

#### 8) 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。

#### 9) 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. 研究結果及び考察

平成 23 年度

1) A549 細胞を用いたナノマテリアルの生体影響評価系として、細胞毒性及び遺伝毒性評価系を確立した。

2) A549 細胞と CHL 細胞のナノマテリアルに対する細胞毒性試験及び遺伝毒性試験(小核試験)における感受性について比較検討した結果、コロニー法及び MTT 法の両方において、細胞毒性試験の感受性に相違は認められなかった。小核試験においては、A549 細胞で未処理群の小核保有細胞の出現率が若干高かったものの、両細胞間の試験結果に大きな相違は認められなかった。ヒトへの影響を評価する観点から、A549 細胞を用いたナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性評価系は有用で、今後データ蓄積が必要であると考えられた(図 1、2)。

3) 10 種類の酸化金属ナノマテリアルについて、物理化学的性質を明らかにすると同時に、A549 細胞をこれらのナノマテリアルに暴露し、細胞毒性試験を行った結果、

- ・コロニー法において ITO、CuO、Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub>、ZnO、NiO が、MTT 法において CuO、ZnO、NiO が細胞毒性を示した。CuO は、どちらの試験法においても強い毒性を示し、NiO と ZnO は中程度、ITO と Y<sub>2</sub>O<sub>3</sub> はコロニー法においてのみ弱い毒性を示した。これらの結果は、各試験法の特異性及び感受性の差によるものと考えられた。
- ・ZnO は 2 社の分散製品で、細胞毒性が異なっていた。両 ZnO 分散製品は、注射用水中でのゼータ電位が異なり、注射用水と血清培地のどちらの懸濁液中においても粒子径が異なったことから、物理化学的性質が細胞毒性の差に関わっている可能性が考えられた。

平成 24 年度

1) 前年度確立した A549 細胞を用いたナノマテリアルの生体影響評価系を用いて、細胞毒性が観察された 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。

- ・明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO

のみであった。

- ・CuO も処理後 24 時間において弱い遺伝毒性を示したが、核への障害が観察され、遺伝毒性よりも低い用量で細胞毒性を示していた。
- ・物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO 分散製品で、ZnO(Alfa)は ZnO(Sigma)よりも強い遺伝毒性を示した。両 ZnO 分散製品間で、細胞毒性強度と遺伝毒性強度との間に関連がなかった。

2) 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。

- ・ZnO の細胞毒性に関する共通の現象として、処理 3 時間目に、ATP 及び GSH 含量の減少が観察され、その後、ATP の減少に並行して MTT 還元能の低下が観察された。GSH 含量の減少は、ATP の減少、MTT 還元能の低下に比べて小さく、ZnO の細胞毒性には、酸化ストレスは直接関与しておらず、むしろ ATP の減少が ZnO の細胞毒性に影響を与えていると考えられた。
- ・ZnO(Sigma)と ZnO(Alfa)の細胞応答を比較したところ、ATP 及び GSH 含量の減少のカーブが、ZnO(Alfa)の方が緩やかであった。

平成 25 年度

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細胞毒性が観察され、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 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 (図 3)。

酸化金属ナノマテリアルの物理化学的特性と THP-1 及び A549 細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性について、表 1 にまとめた。

今後、物理化学的状态及び細胞毒性が異なる 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。

#### D. 結論

ナノマテリアル *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト肺がん由来細胞株である 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、その有用性を確認した。次に、10 種類の酸化金属ナノマテリアル

を対象として、その物性について明らかにすると同時に、細胞毒性についてコロニー法及び MTT 法により検討した。細胞毒性が観察された ITO、CuO、 $\text{Y}_2\text{O}_3$ 、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。その結果、明らかな遺伝毒性が観察されたのは ZnO のみであった。物理化学的性質の異なる 2 種類の ZnO において、細胞毒性の強度に遺伝毒性の強度は関連がなかった。酸化亜鉛の細胞毒性の発現について、MTT 法に加えて ATP 及び GSH 含量の変化を指標として、細胞毒性発現メカニズムについて解析を進めた。また、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結果、CuO、ZnO、NiO で毒性が観察された。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 CytoD 処理の影響について検討した。今後、物理化学的状态及び細胞毒性が異なる 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予定である。

本研究では、分担研究者と共同で研究を進め、粒子径の異なるナノマテリアルを用いて細胞試験を実施し、物理化学的性質の解析と細胞応答について解析を行った。また、細胞内動態に関しても、ナノマテリアルの物理化学的性質と細胞内動態について解析が進めることができた。

本研究成果は、最終目標であるナノマテリアルの *in vitro* 安全性試験における評価指針の作成に役立つだけでなく、レギュラ

トリーサイエンスに資するデータとしても大変重要であり、厚生労働行政分野におけるナノマテリアルの安全性評価への活用が期待できる。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

- 1) Kikura-Hanajiri R., Kawamura M., Miyajima A., Sunouchi M., Goda Y. : Chiral analyses of dextromethorphan/levomethorphan and their metabolites in rat and human samples using LC-MS/MS. *Anal Bioanal Chem*, 400, 165-174 (2011)
- 2) Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A. : Toxicological studies of nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide *Proceedings of 24<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials*, 87-90 (2011)
- 3) 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) Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A. : In Vitro and Vivo Toxicity Studies of Nanomaterials Used in Household Products., *ICAMT 2011 (Singapore)*, 2011.6
- 2) Matsuoka A., Kodama Y., Yoshida M., Isama K., Inoue K., Kawakami T., Nishikawa A. : Toxicological Studies of Nano-suspensions of silica, silver and zinc oxide., *24<sup>th</sup> European Conference on Biomaterials (Dublin)*, 2011.9
- 3) 宮島敦子, 加藤玲子, 酒井恵子, 松岡厚子: チタン系金属, 合成高分子等の医用材料上で培養した CHL 細胞の細胞毒性お

よび遺伝毒性、第 33 回バイオマテリアル学会 (京都、2011.11)

- 4) 酒井恵子, 宮島敦子, 加藤玲子, 岡田恵里, 尾崎正康, 松岡厚子: ナノ材料の安全性評価における A549 細胞と CHL 細胞の感受性の比較、日本環境変異原学会第 40 回大会 (東京、2011.11)
- 5) Miyajima-Tabata A., Kato R., Sakai, K., Okada E., Matsuoka A.: Cytotoxicity studies in A549 cells cultured on 2-Methacryloyloxyethyl phosphorylcholine polymers., *The 51st Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Francisco)*, 2012.3
- 6) 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 (札幌、2012.3)
- 7) Miyajima-Tabata A., Sakai, K., Kato R., Matsuoka A.: Studies on cytotoxicity and genotoxicity in CHL cells cultured on MPC polymers., *EUROTOX 2012 (Stockholm)*, 2012.6
- 8) Isama K., Kawakami T., Sakai, K., Miyajima A., Matsuoka A.: Effect of nanoparticles on the cytotoxicity of coexisting metal salts., *EUROTOX 2012 (Stockholm)*, 2012.6
- 9) 宇佐見誠, 満長克祥, 入江智彦, 宮島敦子, 関野祐子: 培養ラット胚におけるエタノールによる発生毒性のプロテオミクス解析, 第 52 回日本先天異常学会学術集会 (東京, 2012.7)
- 10) 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)
- 11) 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., ESTIV2012 (Lisbon, 2012.10)
- 12) 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 52<sup>nd</sup> Annual Meeting of the Society of Toxicology (San Antonio, 2013.3)
- 13) 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）
- 14) 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)
- 15) 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)
- 16) 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）
- 17) 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

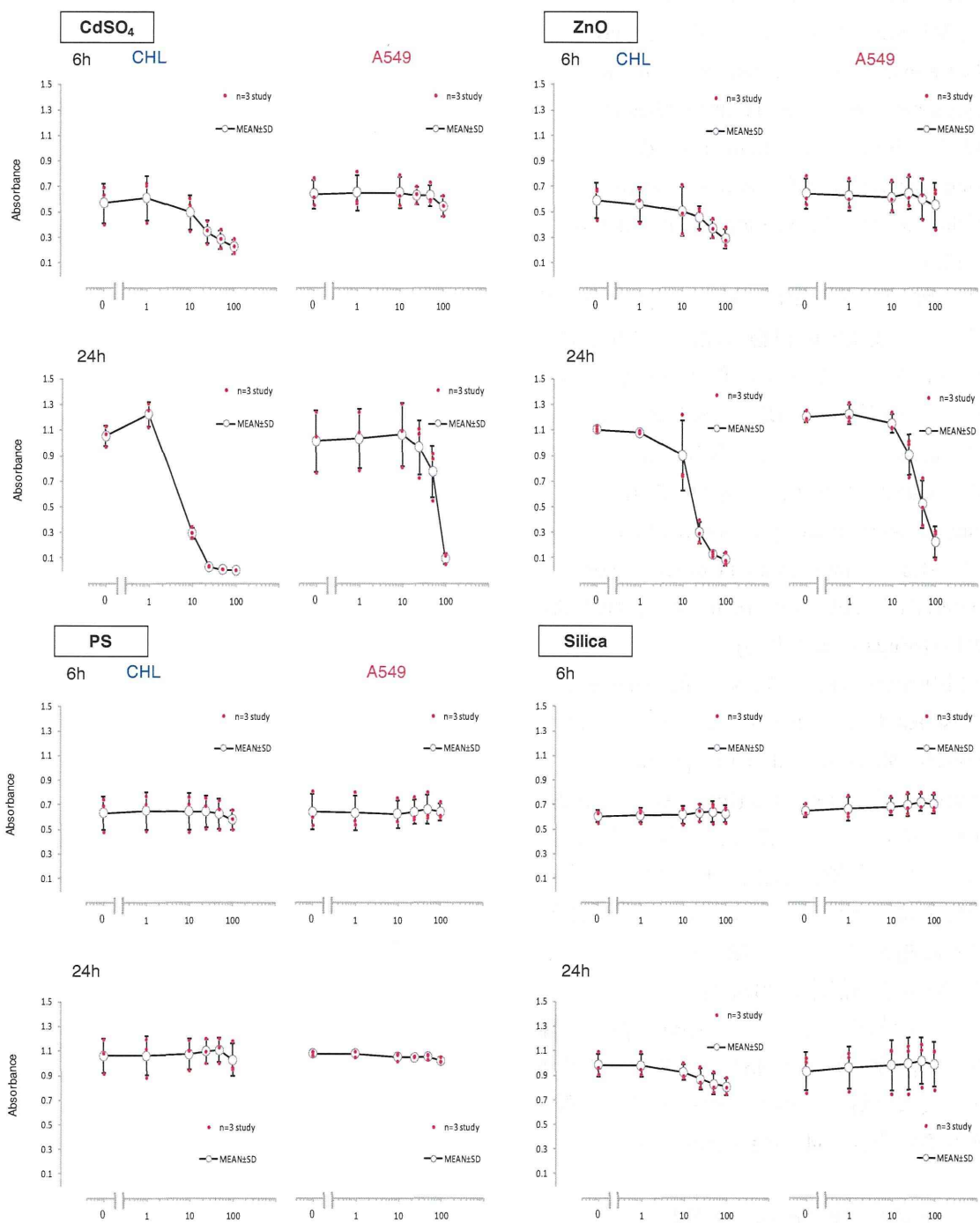


図1 CHL細胞及びA549細胞のナノ材料に対するMTT試験の比較

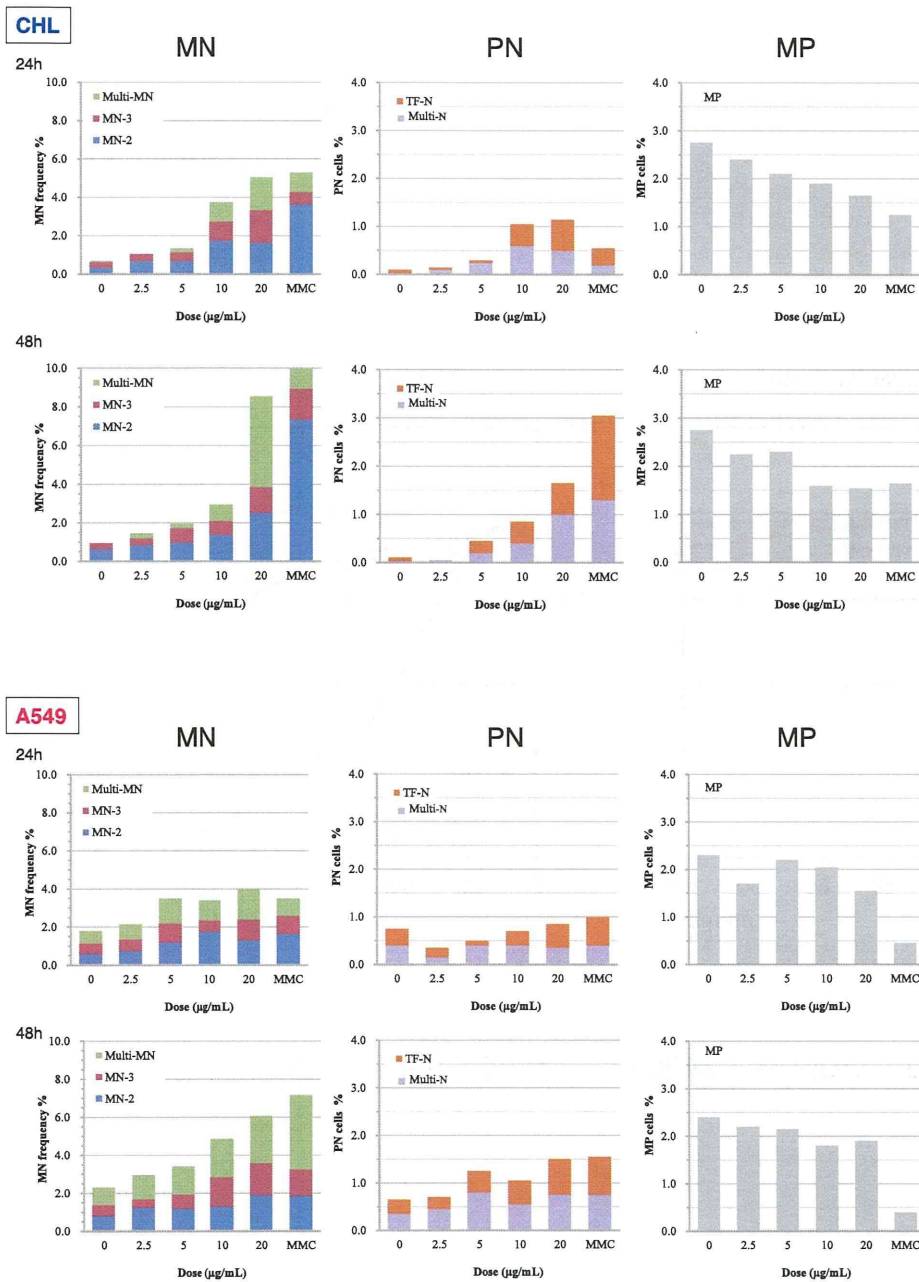


図2 CHL細胞及びA549細胞のZnOに対する小核試験の比較

MN; micronucleus, Multi-MN; multi micronucleus, MN-2; 1/10-1/3 micronucleus, MN-3; 1/3-1/2 micronucleus, PN; polynucleus, TF-N; transformed nucleus, Multi-N; multi nucleus, MP; metaphase



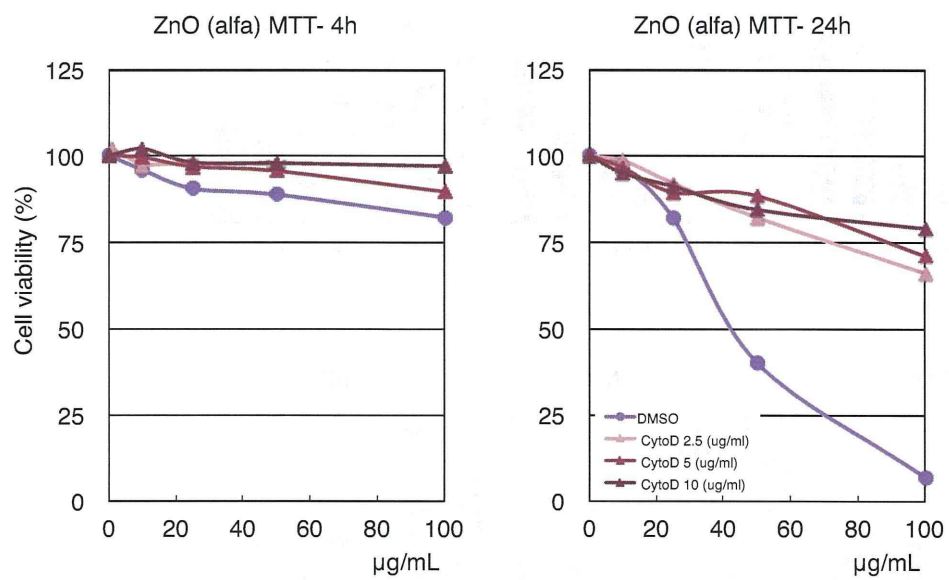


図3 ZnO(Alfa)の細胞毒性に対する CytoD の影響

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

種類 <sup>b</sup>	製造(販売)元	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>a</sup>		細胞毒性 (IC50)			遺伝毒性		
		1次粒子径 <sup>c</sup> (nm)	比表面積 <sup>c</sup> (m <sup>2</sup> /g)	注射用水	10%FBS-MEM培地	注射用水	10%FBS-MEM培地	A549細胞	A549細胞	THP-1細胞	A549細胞
				(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	コロニー法 (μg/ml)	MTT法 (48h) (μg/ml)	ATP法 (48h) (μg/ml)	小核試験 (20 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	>100	NT <sup>f</sup>
CeO <sub>2</sub>		14	60	63.5 ± 1.5	407.2 ± 8.2	55.0 ± 0.3	-21.7 ± 0.7	>100	>100	>100	NT <sup>f</sup>
ITO		30	30	98.4 ± 1.5	158.3 ± 2.5	59.8 ± 1.4	-18.7 ± 1.7	38.0	>100	>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	>100	NT <sup>f</sup>
TiO <sub>2</sub>		36	45	41.0 ± 0.3	152.9 ± 0.5	49.5 ± 1.9	-13.1 ± 0.9	>100	>100	>100	NT <sup>f</sup>
<u>CuO</u>		48	20	156.4 ± 1.9	242.2 ± 2.9	51.9 ± 0.9 <sup>e</sup>	-10.8 ± 0.5	0.6	1.0	46.2 <sup>h</sup>	弱い陽性
<u>SnO<sub>2</sub></u>		21	45	— <sup>i</sup>	1388.6 ± 52.4	—	-12.9 ± 0.9	>100	>100	NT <sup>f</sup>	NT <sup>f</sup>
<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	NT <sup>f</sup>	陰性
<u>NiO</u>	Sigma-Aldrich	<50		256.8 ± 13.0	403.6 ± 2.6	41.6 ± 0.7 <sup>e</sup>	-18.2 ± 0.3	4.9	34.3	80.0 <sup>h</sup>	陰性
ZnO <sup>j</sup>		<35		65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	10.5	31.7	49.4	陽性
ZnO	Alfa Aesar	40		164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	16.7	72.5	63.0	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>NT: 測定せず <sup>g</sup>0.1 mg/ml (10 mg/mLでは測定不可) <sup>h</sup>φ 0.1mmジルコニアボールにて調製 <sup>i</sup>—: 測定不可 <sup>j</sup>2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究総合報告書

（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

酸化銅ナノ粒子 (CuO NPs) および酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) に曝露されたヒト肺上皮細胞の分子応答を DNA マイクロアレイによって調べた。CuO NPs に曝露された細胞では、細胞周期関連遺伝子の発現低下と p38 経路の活性化が認められた。これは、CuO NPs の毒性に対する防御機構であると考えられた。また、ZnO NPs に曝露された細胞は、増殖速度が低下したが、これはカルシウムにより回復した。DNA マイクロアレイによる解析から、カルシウムは細胞周期関連遺伝子の発現を向上させ、ZnO NPs による増殖速度の低下を相殺することが明らかとなった。また、これら金属酸化物とは異なる炭素系ナノマテリアルとしてカーボンナノチューブの細胞毒性と遺伝子発現変化についても調べた。カーボンナノチューブは ZnO ナノ粒子と同程度の細胞毒性を示した。カーボンナノチューブの DNA マイクロアレイによる遺伝子発現では、細胞機能に変化を及ぼすような大きな遺伝子発現変化は認められなかった。カーボンナノチューブの毒性はヒト肺上皮細胞の前培養時間に依存し、前培養時間が長い細胞ほどカーボンナノチューブの毒性に対する感受性が低下していた。DNA マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析から、前培養時間に依存した感受性の違いは細胞の生理状態の差に依存することが明らかとなった。

#### 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。ナノ物質のサイズ、形状、表面積や表面活性は、ナノ物質を利用する上で魅力的な特性である半面、これらの性質は毒性にも寄与することが懸念される。ナノ物質は、呼吸や傷口等から容易に体内に侵入し、様々な組織に影響を及ぼすことが考えられる。しかしながら、ナノ物質に関する安全性に関しては、明確な基準は設けられていない。

ヒトが最終製品からナノマテリアルに被曝するより製造現場で呼吸により被曝する可能性の方が高いと考えられる。そこで本研究では呼吸により取り込まれたナノマテ

リアルが肺上皮細胞に影響を及ぼすことを想定し、ヒト肺上皮細胞株 A549 をモデル細胞として使用した。これまでの細胞毒性の研究の多くは、ナノマテリアルによる細胞活性の低下、アポトーシスの誘導、遺伝子損傷による細胞死、炎症反応の誘導という現象と、これらの現象を引き起こすと考えられる活性酸素種の発生に焦点が当てられてきた。しかしながら、ナノマテリアルが細胞機能に及ぼす影響をゲノムレベルで調べた研究は多くはない。本研究では、酸化銅(CuO)、酸化亜鉛(ZnO)という2種の金属酸化物、およびこれらのナノマテリアルとは性状が大きく異なるカーボンナノチューブ(CNT)について、これらのナノマテリアルに対する細胞の遺伝子応答を網羅的に解析し、バイオインフォマティクスの手法

により、分子レベルでの応答を推測した。その結果、ナノマテリアルの化学組成が異なると細胞の分子レベルでの応答も大きく異なることが明らかになった。これは、異なるナノマテリアルで同様な細胞毒性が観察されても、細胞内の分子レベルでの応答は全く異なっていることを示唆している。

## B. 研究方法

### B1. ナノマテリアル

CuO、ZnO のナノ粒子(CuO NPs および ZnO NPs)は Sigma-Aldrich から購入した。これらの粒子の平均サイズ径は 50-60nm であった。また、multi-wall CNTs (MWCNTs) および single-wall CNTs (SWCNTs)は Sigma-Aldrich から購入した。

### B2. CuO NPs、ZnO NPs および MWCNTs 含有培地

ナノマテリアル含有培地は、それぞれの NPs 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 25-100 µg/ml の濃度になるように添加することによって調製した。これらのナノマテリアル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。

### B3. 細胞培養

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 48 時間培養した。この培養において細胞密度は、約 70% confluence に達した。次に、この培養で用いた培地を、ナノマテリアル含有培地、溶出イオン含有培地あるいは Cu および Zn イオンを含有した培地に取り換え、さらに 24 時間培養した後、細胞毒性を評価した。

### B4. 細胞毒性の評価

細胞毒性は、細胞数のカウントおよび formazan formation により行った。細胞数のカウントのために、トリプシン処理により細胞をプレートから剥離した。これらの細胞を 2000 g で 2 分間の遠心分離により回収後、DMEM に再懸濁し、トリパンブルーで染まらない生細胞数を血球計算盤上で数えた。細胞数の計測は、独立した 4 回の培養で行い、それぞれの培養について異なる 8 視野をカウントした。

### B5. DNA マイクロアレイ解析

DMEM で予め 48 時間培養した細胞を、ナノマテリアル含有培地、溶出イオン含有培地およびコントロール培地 (DMEM) でさらに 24 時間培養した細胞から、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