

図 1. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の生存率

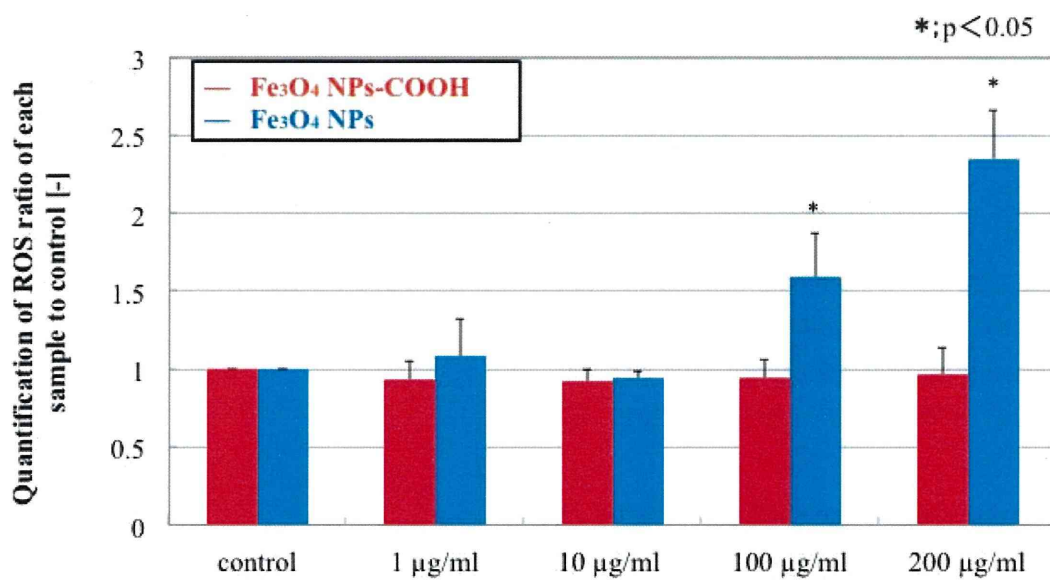


図 2. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の ROS 生成

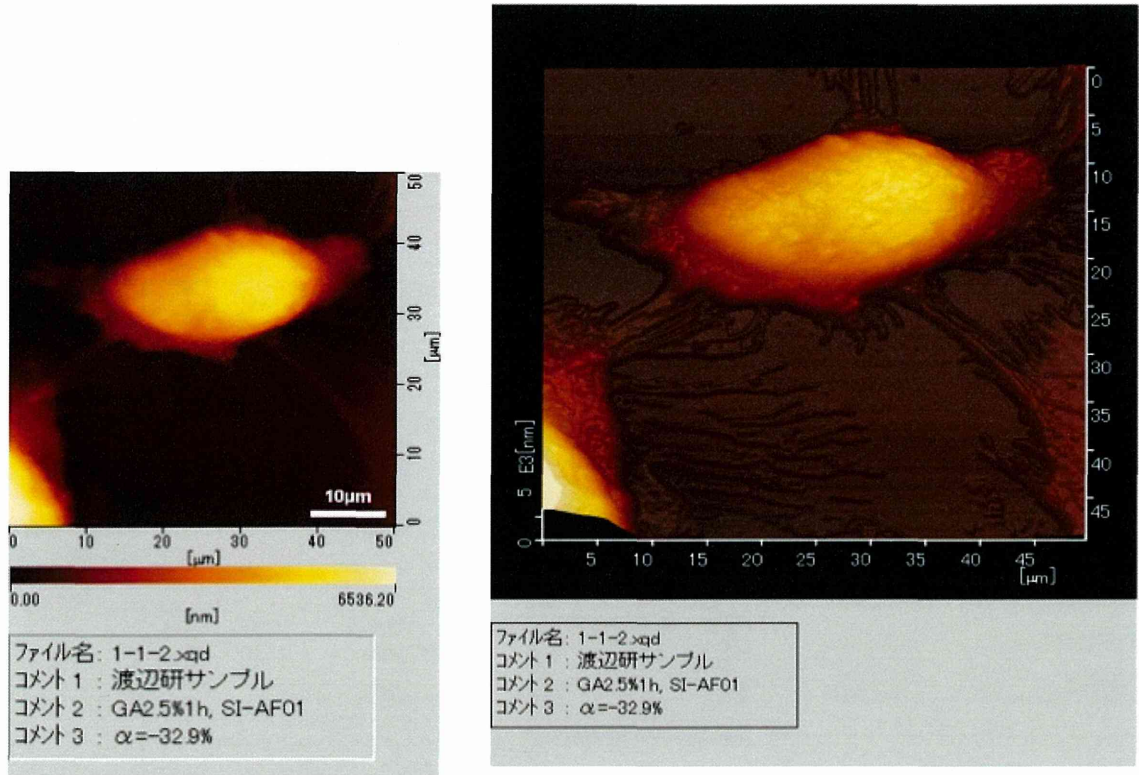


図 3. AFM によるナノ粒子を曝露していない DU145 細胞像

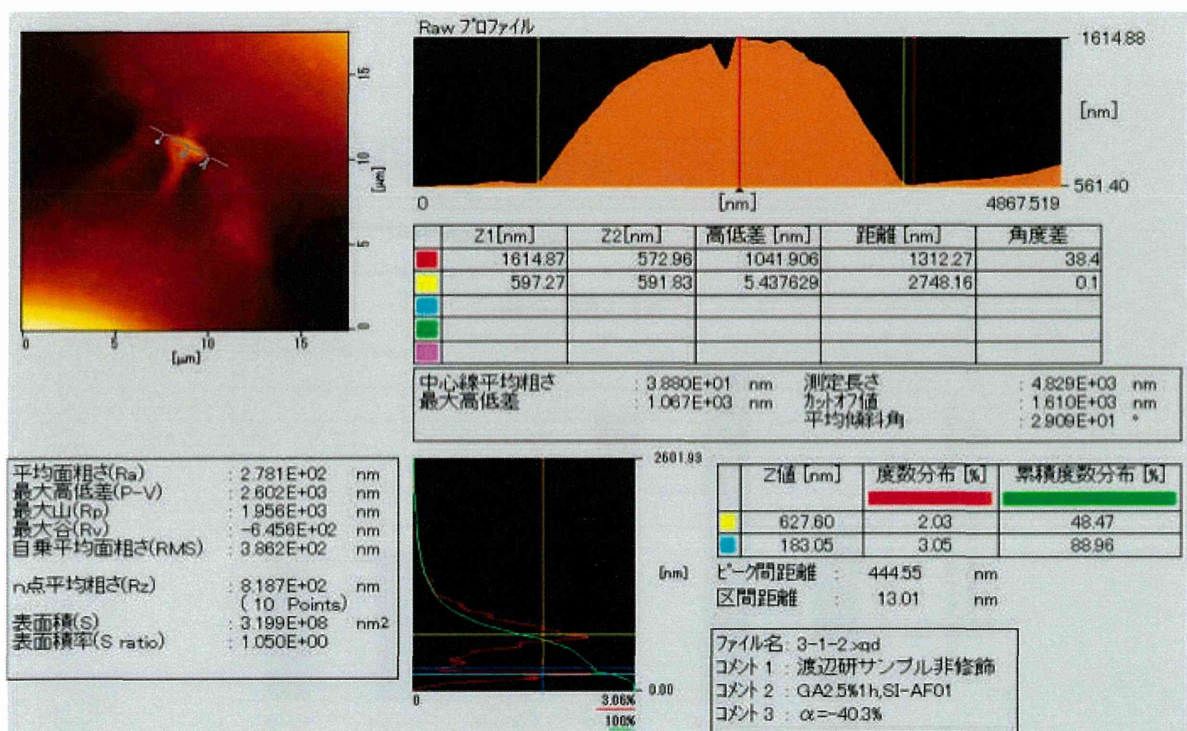


図 4. AFM による Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs を曝露した DU145 細胞像

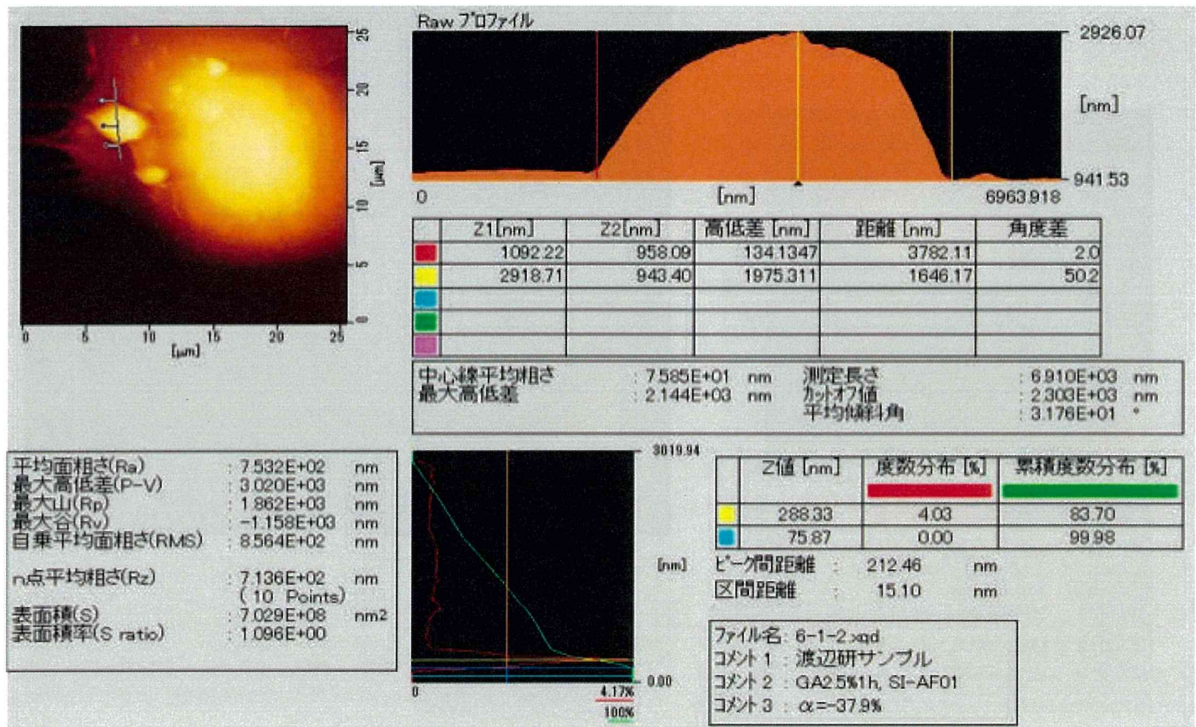


図 5. AFM による Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-COOH を曝露した DU145 細胞像

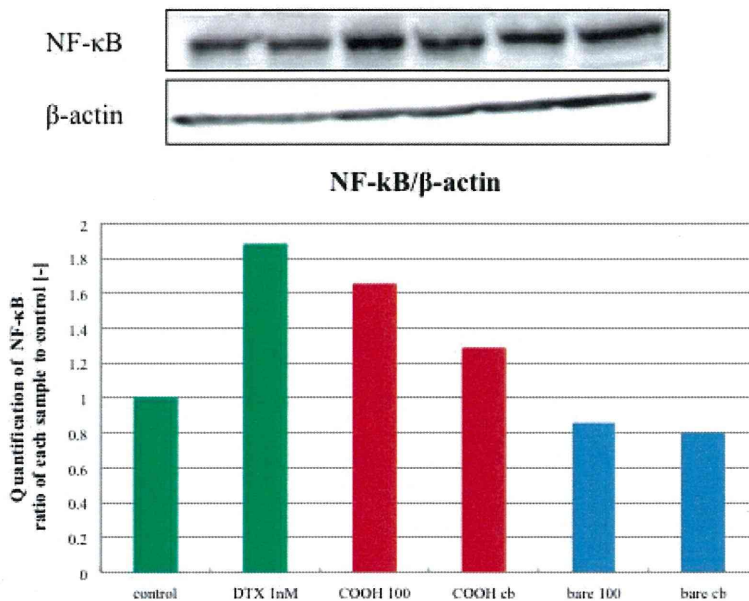


図 6. Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs/ Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の NF-κB 発現量

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

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究  
ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション

研究分担者 林 幸彦 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教

本研究は、ナノマテリアルの適切な物性解析、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証を目的とする。その中で、分担研究として、ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーションである。平成 27 年度（3 年計画の 1 年目）は、次のような成果を得た。金ナノ粒子および銀ナノ粒子を水溶液中で合成する方法を確立した。金ナノ粒子の一次粒径は 10~20 nm であったが、水中では一次粒径 10 nm 以下のナノ粒子や、粒径 100~200 nm の凝集体が存在することが明らかになった。ゼータ電位は +8.6 mV であった。銀ナノ粒子の一次粒径は 40 nm であり、水中では一次粒径 10 nm 以下のナノ粒子が存在していた。ゼータ電位は -15.3 mV であった。金ナノ粒子は溶液濃度を高め、2 mg/mL にしても分散していたが、銀ナノ粒子は凝集しやすく、溶液濃度を 0.02 mg/mL 以上にすると沈降してしまった。銀ナノ粒子溶液の濃度を 2 mg/mL まで高めても安定な分散状態を保つことができるようにすることが今後の課題である。

## A. 研究目的

金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成する。金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指す。

## B. 研究方法

### 【使用した試薬】

硝酸銀（I）（特級、キシダ化学）、Hexadecyltrimethylammonium bromide（CTAB）（Sigma-Aldrich）、D（+）-グルコース（特級、キシダ化学）、水酸化ナトリウム（特級、キシダ化学）、Gold（III）chloride hydrate（Sigma-Aldrich）

### 【使用した評価機器】

透過型電子顕微鏡（TEM, H-800, Hitachi）、加圧システム（DelsaMax ASSIST, Beckman Coulter）付ゼータ電位・ナノ粒子径測定装置（DelsaMaxPro, Beckman Coulter）、紫外-可視分光光度計（V-570, JASCO）

### 【合成方法】

#### <金ナノ粒子の合成>

1 M 塩化金酸水溶液 10  $\mu$ L を 5 mL の水で希釈した。また 1.1 g の CTAB を 4 mL の水に、水素化ほう素ナトリウム 0.91 mg を 1 mL の水に溶解させ、それぞれ水溶液を調製した。塩化金酸水溶液に CTAB 水溶液を加えたのち、水素化ほう素ナトリウム水溶液を一滴ずつ攪拌しながら加えた。反応が終了後、未反応の CTAB や析出した NaBr の結晶を遠心分離によって取り除いた。

#### <銀ナノ粒子の合成>

(方法1) 0.7 mM のクエン酸三ナトリウム水溶液 100 mL に 0.1 M 硝酸銀水溶液 100  $\mu$ L を攪拌しながら加えた。次に、氷浴で冷却した  $\text{NaBH}_4$  水溶液 (濃度 5.3 M) 100  $\mu$ L を 1 滴ずつ加えた。

(方法2) 25 mM グルコース水溶液、50 mM 水酸化ナトリウム水溶液、50 mM 硝酸銀 (I) 水溶液、50 mM CTAB 水溶液をそれぞれ 5 mL ずつ調製した。硝酸銀 (I) 水溶液を CTAB 水溶液に一滴ずつ攪拌をしながら加えた。これにより溶液は黄色の銀錯体溶液となった。次にグルコース水溶液に対して水酸化ナトリウム水溶液を加え、さらに銀錯体溶液を加えた。反応により溶液は黄褐色となった。この溶液を 50°C で 5 時間超音波処理し、遠心分離によって未反応の CTAB を回収し、目的とする銀ナノ粒子溶液を得た。

### C. 研究結果

#### 1) 金ナノ粒子の特性：

金ナノ粒子は 2 mg/mL という高濃度で蒸留水に分散させても、凝集や沈降なく安定的に分散した (図 1a)。また、金ナノ粒子の粒径は 10~20 nm であった (図 1b)。金ナノ粒子のゼータ電位は +8.6 mV であった。蒸留水中での粒度分布を測定したところ、TEM から見積もった一次粒径とほぼ同じであったが、10 nm 以下の微小な粒子や 100 nm 以上の凝集体も存在していることが明らかになった (図 2a)。金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトルを測定したところ、金ナノ粒子の表面プラズモン共鳴に由来するピークが観察され、金ナノ粒子が水溶液中で均一に分散していることが光学的評価からも明らかになった (図 2b)。

#### 2) 銀ナノ粒子の特性：

方法 1 で銀ナノ粒子を合成すると、銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上にするると凝集し、沈降してしまっ (図 3)。そこで、銀ナノ粒子水溶液濃度を 2 mg/mL 以

上にしても沈降しない方法の開発に取り組んだところ、方法 2 によりこの目的を達成することができることが明らかになった。この方法により得られた銀ナノ粒子は粒径が 10 nm 以下であった (図 4)。

### D. 結論

金ナノ粒子は銀ナノ粒子より水中で安定であり、粒子濃度が 2 mg/mL 以上の高濃度水溶液中でも沈降なく分散した。一方、銀ナノ粒子は、粒子濃度を 0.02 mg/mL 以上にするると沈降してしまっ。  $\text{NaBH}_4$  を用いた還元法では、粒子濃度が 2 mg/mL 以上の銀ナノ粒子水溶液を作製することができなかつたが、界面活性剤として CTAB を使用し、グルコースを用いることで、粒子濃度 2 mg/mL 以上の銀ナノ粒子水溶液を作製することができた。しかし、この方法では、界面活性剤である CTAB を過剰に加える必要があつた。CTAB が毒性を示すため、正確な銀ナノ粒子の毒性を評価するためには、CTAB に代わる毒性を示さず、水中分散性を高めるキャッピング剤の探索が必要である。

### E. 研究発表

#### 1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.* DOI: 10.1002/adfm.201504215 (Back Cover に採用)

### F. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

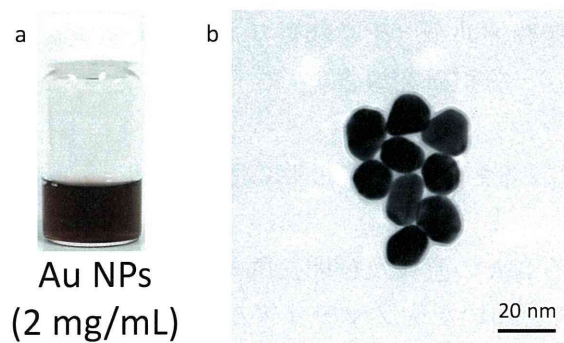


図 1. (a) 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

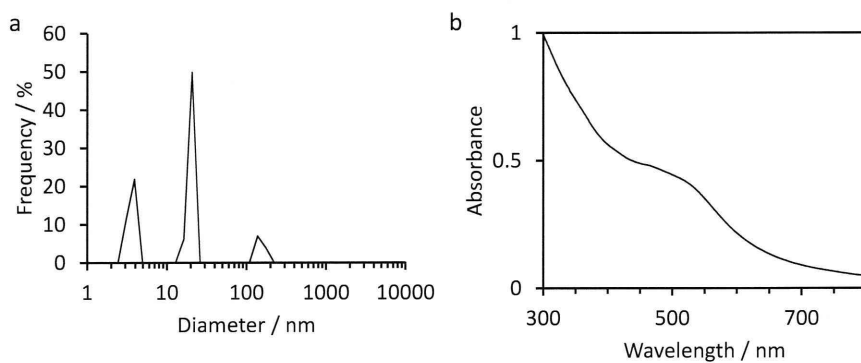


図 2. (a) 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

Ag NPs (0.02 mg/mL)      Ag NPs (0.2 mg/mL)

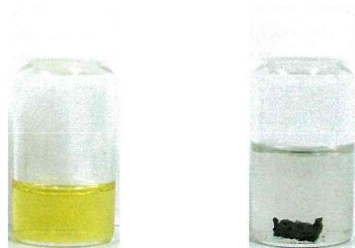


図 3. 方法 1 で作製した銀ナノ粒子水溶液の写真：(左) 0.02 mg/mL, (右) 0.2 mg/mL

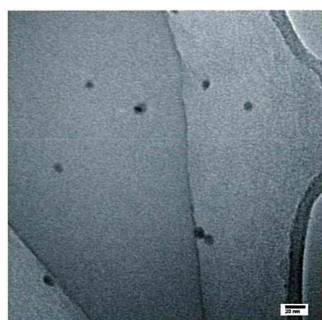


図 4. 方法 2 で作製した銀ナノ粒子の TEM 像

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築  
共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

研究分担者 戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所 発がん・予防研究分野 ユニット長

我々は新規のヒト発がんリスク評価法として、DNA 付加体の網羅的解析手法(DNA アダクトーム方)の構築に取り組んできた。これまでに、分析手法の構築や付加体同定に用いるデータベースの構築等を行い、ナノマグネタイトの遺伝毒性評価を *in vivo* モデルを用いて行ったところ、マグネタイト(MGT)を気管内投与したマウス肺で酸化ストレスや炎症に由来する DNA 付加体がスクリーニングされた。

このことから、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムの一部には、マクロファージ等を介した炎症反応が関与することが示唆された。そこで、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 毒性評価システム確立の検討を行うため、*gpt delta* マウスより樹立した細胞株(GDL1 細胞)とマクロファージ由来培養細胞(RAW264.7)を共培養し、MGT の変異原性に対するマクロファージの影響を検討した。MGT 曝露群では、マクロファージの共存下において、GDL1 細胞の突然変異頻度の増加が観察された。更に各種ナノマテリアルによる変異パターンを解析したところ、共培養系で観察されたパターンは、単独培養で観察されたパターンと異なり、ナノマテリアルを気管内投与したマウス肺に観察された変異パターンと類似することがわかった。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

## A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験(変異原性試験)、コメットアッセイ(DNA 損傷試験)、小核試験(染色体異常試験)などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは微粒子などの化学物質の遺伝毒性評価は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。これまで我々は、LC-MS/MS により DNA 付加体を網羅的に解析する方法(アダクトーム法)を用い、DNA 損傷のより詳細な評価を行ない、化学物質の *in vitro* 安全性評価法として妥当かどうかについて確かめてきた。本手法を用い、ナノマテリアルの遺伝毒性評価について検討した。

一方、ナノマテリアルの気道毒性の *in vitro* リス

ク評価は主として肺胞上皮由来細胞を単独で用いた系で為されているが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージによる貪食と液性因子放出が関与することが示唆されている。そこで、我々は、生体を模倣した新規 *in vitro* 試験系の構築が必要であると考え、マクロファージ様細胞と肺由来の細胞の共培養系を利用して、新しい *in vitro* 気道毒性試験系を開発することを試みた。

## B. 研究方法

①ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築  
マグネタイト(MGT, 0.05% Tween20 に懸濁)を経気道的に ICR マウス(オス、7 週齢)に曝露した。その際、同時に 0.05% Tween20 のみを投与したマウスを準備しコントロールとした。投与から 24 時間後に屠殺し、肺を摘出した。肺から DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホス

ホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、水-メタノールの溶媒系を用い LC-QToF-MS で DNA 付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が MGT 投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされた。これら付加体の同定は既に構築済みの DNA 付加体リストとの比較により行った。

## ②共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ (pore size; 0.4 μm, high density: greiner bio-one) を各 well に入れ、インサート内に RAW264 を播種し、24 時間培養した。MGT を曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、突然変異の解析に供した。

### (倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、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う。

## C. 研究結果

### ①ナノマテリアルによるDNAの直接及び間接的損傷性評価系の構築

MGTをマウスに経気道曝露し、投与後24時間後に肺を摘出しDNAを抽出後、HPLC-QToF-MSを用いてDNA付加体を分析した。その結果、vehicle投与群と比べて、MGT投与群においてより多くのDNA付加体が生成されていた(図1)。PCA解析の結果、幾つかの付加体がMGT投与に特徴的なものとしてスクリーニングされた(図2)。これら付加体のm/z値を既知のDNA付加体の標品と比較したところ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC(εdC)などであることが示唆された(表1)。

### ②共培養系を用いたナノマテリアルの遺伝毒性評価系の構築

GDL1とRAW264を共培養し、MGTをGDL1またはRAW264のみ、及び両細胞に24時間曝露した後、gpt遺伝子における変異原性について評価した。その結果、MGTをRAW264のみ及びGDL1とRAW264の両方に曝露させた時の変異頻度が、MGTをGDL1のみに曝露させた変異頻度と比べ優位に上昇することがわかった(図3)。さらに、MGTによる変異スペクトラムの解析を行ったところ、MGTを両細胞に曝露させた場合のスペクトルは、それぞれの細胞単独で曝露させた場合とは異なり、MGTをgpt deltaマウスに気管内投与した場合の肺における変異スペクトルに近くなることがわかった(図3)。

## D. 考察

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘

発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。このようなナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいたin vitro遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を考えた。本手法を用いてMGTの変異原性を評価してみたところ、変異頻度はRAW264細胞の共存下で上昇することがわかった。変異スペクトル解析の結果、MGTの各細胞単独の曝露の場合と比べ、両細胞に曝露した場合にin vivoにおけるパターンと類似することがわかった。これらのことから、in vitro共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

図1 MGT投与群及びコントロール群のDNA付加体マップ

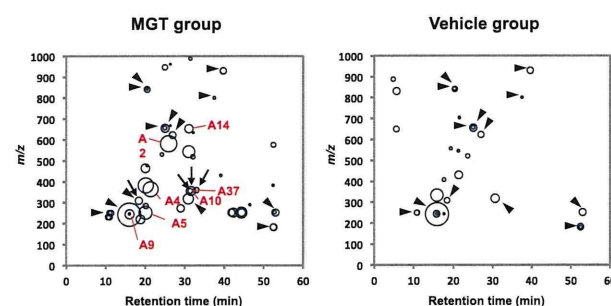


図2 PCA解析の結果

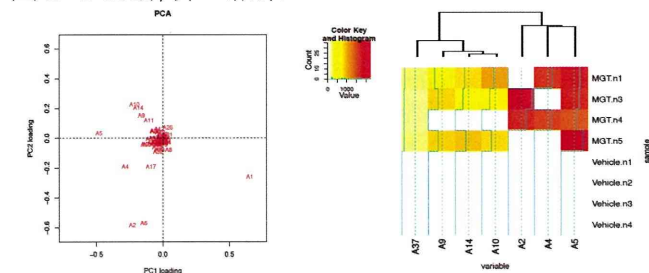
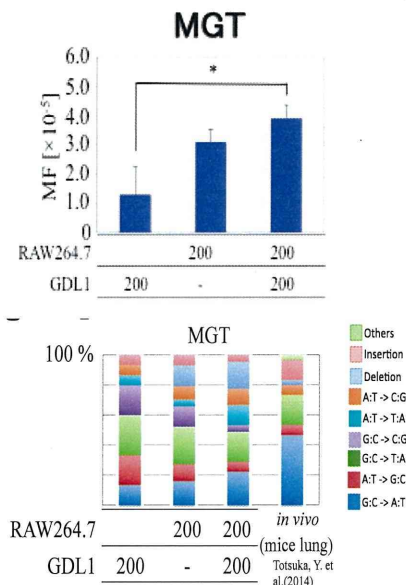
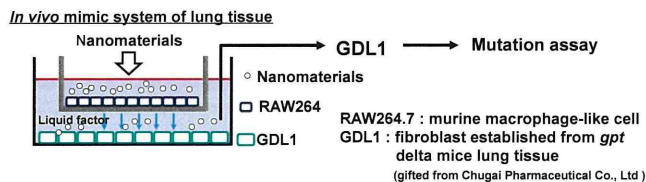


表1 MGT 曝露に特徴的な付加体としてスクリーニングされたもの

Adducts	M/Z [M+H]	Comparing with DNA adduct database [M+H]	Derivation
A2	580.79	Unknown	
A4	363.17	BεdA [363.1816 (+NH <sub>3</sub> )]	Lipid peroxidation (4-OHE), inflammation-related adduct
A5	252.11	εdC [252.0984]	Lipid peroxidation (4-hydroperoxy-2-nonenal), inflammation-related adduct Induce C to T transition
A9	243.12	dT [243.0981], N <sup>5</sup> -MedC [243.1213]	5-mdC deamination (dT), Alkylating agent (MNU)
A10	355.23	Unknown adduct in model reaction [355.23]	DNA oxidation
A14	652.37	Unknown	
A37	356.24	Unknown adduct in model reaction [356.24]	DNA oxidation

図3 共培養系を用いた MGT の遺伝毒性評価系





## E. 結論

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた*in vitro*遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を用いてMGTの変異原性を評価してみたところ、変異頻度はRAW264細胞の共存下で上昇することがわかった。変異スペクトル解析の結果、MGTの各細胞単独の曝露の場合と比べ、両細胞に曝露した場合に*in vivo*におけるパターンと類似することがわかった。これらのことから、*in vitro*共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。現在、これら試験系を用いて、金属ナノ粒子の毒性評価を行う準備をしている。

今後さらに、本解析の妥当性を検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことで、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する。

## F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- K. Ishino, T. Kato, M. Kato, T. Shibata, M. Watanabe, K. Wakabayashi, H. Nakagama, Y. Totsuka. Comprehensive DNA adduct analysis reveals pulmonary inflammatory response contributes to genotoxic action of magnetite nanoparticles. *Int. J. Mol. Sci.*, 2015, 16(2), 3474-92.
- M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and *Apc* mutant Min mice. *Cancer Sci.*, 2015, 106(11), 1499-1505.

### 2. 学会発表

- 戸塚ゆ加里、中釜 斉：質量分析機器を用いたDNA付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明  
第42回日本毒性学会学術大会. 2015年7月
- Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama : Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis) 日本癌学会学術総会. 2015年10月
- 戸塚ゆ加里：ゲノム解析およびDNA付加体の網羅的解析による発がん要因の探索、第44回日本環境変異原学会. 2015年12月
- 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 斉、戸塚ゆ加里：職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響、第44回日本環境変異原学会. 2015年12月

(発表誌名巻号・頁・発行年等も記入)

## H. 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

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

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価及びリスク低減化に関する研究

*In vivo* 動物実験による新規 *in vitro* リスク評価系の有効性の検証

研究分担者 中江 大 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 教授

本分担研究は、再構成ヒト皮膚培養系を用いて、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規 *in vitro* スクリーニング評価系を開発することを目的に、現在市販されている再構成ヒト皮膚培養系の中から、本研究で使用すべきものとして、POCA ヒト 3D HADA モデルと LabCyte EPI モデルを選定した。LabCyte EPI モデルを用いて金ナノ粒子の細胞毒性を試験したところ、60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (300  $\mu\text{M}$  に相当) でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。

研究協力者：

煙山 紀子 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 助教

ヒト皮膚培養系を用いて、ナノ粒子の皮膚毒性に関する新規 *in vitro* スクリーニング評価系を開発することである。

### A. 研究目的

ナノマテリアルの社会的受容の実現には十分なリスク評価を行うことが必須であり、その結果仮にリスクがある場合にはベネフィット・リスクバランスを考慮した適切なリスク低減を図ることが必要である。当該リスク評価に当たっては、動物愛護の3Rの観点から、動物実験代替法の開発も要求される。本研究は、全体として、ナノマテリアルの物性解析、新規 *in vitro* リスク評価系の確立、細胞内応答機構等を指標とした当該 *in vitro* リスク評価系と従来の評価系の比較、新たなリスク評価バイオマーカーの確立、適切な動物実験等による当該 *in vitro* リスク評価系の妥当性検証、などを目的として行われている。

その中で、本分担研究の目的は、再構成

### B. 研究方法

1) 現在市販されている再構成ヒト皮膚培養系について情報を集めて精査した後、複数の取扱業者にヒアリングを行い、再構成ヒト皮膚培養系として本研究で使用すべきものを選定した。

2) LabCyte EPI モデルを用い、金ナノ粒子（一次粒径、4-10 nm；媒体、水；入手濃度、2 mg/mL）を 0, 2, 10, 30, 60  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (0, 50, 150, 300  $\mu\text{M}$  に相当) の用量で 24 時間曝露し、細胞毒性を生化学的 (LDH アッセイ) および病理学的に検索し、再構成皮膚組織下部の培地中金ナノ粒子の存在同定と定量のための培地を回収・保存した。

(倫理面への配慮)

細胞生物学的研究に関する国際的・国内的・東京農業大学学内的な諸規則に基づき、必要な倫理的配慮を施した。

### C. 研究結果

1) 下記の2種類の再構成ヒト皮膚培養系を用いることに決定した。

・POCA ヒト3D HADA モデル (DS ファーマ・バイオメディカル取扱；ヒト幹細胞 (Muse 細胞, 東北大学・出澤教授が発見した間葉系幹細胞) 由来のメラノサイトとヒト・ケラチノサイトとヒト線維芽細胞から作成；「表皮」と「真皮」とメラノサイトを有する.)

・LabCyte EPI モデル (J-TEC 取扱；ヒト正常皮膚細胞から作成；「表皮」のみを有する.)

2) LDH アッセイによつては、最高用量でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。なお、病理学的試験は標本作成中であり、機器分析は準備中である。

### D. 考察

本年度は、研究の準備段階の作業が終了し、本格的な段階における作業を開始したところである。

今後の予定は、以下の通りである。

- ・高用量の用量相関性試験 (着手済)。
- ・毒性用量でのタイムコース試験。
- ・再構成皮膚培養系間のデータ比較 (着手済)。
- ・金ナノ粒子結果を参考に、他の金属ナノ粒子を用いて順次試験。
- ・動物実験による妥当性評価。

### E. 結論

本研究は、2種類の再構成ヒト皮膚培養系の選定が終わり、合成に成功した金ナノ粒子の再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。本研究においては、今後、ナノマテリアルの皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*動物実験により、その妥当性を評価する予定である。

### F. 研究発表

なし

### G. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価  
およびリスク低減化に関する研究

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	室長
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	主任研究官
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	加藤 玲子	国立医薬品食品衛生研究所	医療機器部	主任研究官
研究協力者	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

研究要旨：2種類の ZnO ナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、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（細胞表面マーカー CD54 及び CD86 の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した。その結果、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)では、ZnO(sigma)が強い細胞毒性を示した。ZnO ナノマテリアルは用量依存的に CD54 発現量を増加させ、相対蛍光強度(RFI)は ZnO(sigma)の方が高かった。サイトカインは、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF において産生の増加が観察され、その量は、ZnO(Sigma)の方が多かった。さらに、ZnO 処理後の THP-1 細胞を、フローサイトメーターで解析した結果、側方散乱光強度（SSC 強度）の変化が、用量依存的に観察され、その変化は ZnO(sigma)処理細胞で多かった。今後、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルについても同様の検討を行い、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 27 年度は、2種類の ZnO ナノマテリアル分散製品について、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位等の物理化学的性質について動的光散乱光度計により明らかにすると同時に、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、ATP 法により細胞毒性を、細胞表面マーカー CD54、CD86 の発現、培

養上清中のサイトカイン測定により免疫応答について検討した。

## B. 研究方法

### 1) 材料

ナノマテリアルは酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich 及び NanoTeK, Alfa Aesar)を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。ナノマテリアルの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。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)を用いた。細胞表面マーカー測定のための陽性対照物質として、2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB) (Sigma-Aldrich)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。細胞株は 3 - 4 日ごとに継代し、1 x 10<sup>5</sup> から 8 x 10<sup>5</sup> cells/mL の範囲で培養した。実験には、培養開始後 2 週間以降の 2 ヶ月以内の細胞を用いた。

### 3) 細胞毒性試験 (ATP 法)

THP-1 細胞を 96-well プレートに播種し (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) THP-1 細胞の細胞表面マーカー測定

THP-1 細胞の表面マーカーの測定は、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法) の改変法により実施した。各ナノマテリアルを 24 時間又は 48 時間処理した細胞を回収し、冷 FACS buffer (0.1% BSA 含有 PBS) にて 2 回洗浄後、600 µL の 0.01% ヒト γ グロブリン含有 PBS に懸濁し、4°C で 15 分間静置して FcR のブロッキングを行なった。ブロッキング後、遠心して上清を除き、120 µL の冷 FACS buffer に懸濁し、3 種類の抗体で染色した。抗体は FITC ラベルされた、anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO) 3/5 希釈、anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen) 3/5 希釈、アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone: DAK-G01, DAKO) 3/10 希釈を使用した。4°C で 30 分間静置して抗体染色後、200 µL の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400 µL の冷 FACS buffer に再懸濁し、2.5 µg/mL の Propidium Iodide (PI, Life Technologies) を添加して、5 分後にフローサイトメトリー (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson) で解析した。死細胞は PI により染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞の生存率は、PI 陰性細胞の割合より算出した。

CD54 及び CD86 発現の評価は、相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity (RFI)) により行なった。

$$\text{RFI (\%)} = (\text{MFI of chemical treated cells} - \text{MFI of chemical treated isotype control cells}) / (\text{MFI of vehicle control cells} - \text{MFI of vehicle control isotype control cells}) \times 100$$

MFI = Geometric Mean fluorescence intensity

### 5) 培養上清中のサイトカインの測定

細胞表面マーカー測定試験を実施する際

に、培養上清を別のチューブに移し、液体窒素で凍結後、-80℃で保存した。

Interleukin-8 (IL-8), IL-1β, IL-6, IL-10, Tumor Necrosis Factor (TNF), IL-12p70 の測定は、BD™ Cytometric Bead Array (CBA) human inflammation kit (Becton Dickinson)を用いて、フローサイトメトリーにより測定した。

## 6) FSC-SSC ドットプロット解析

ZnO 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、ZnO で処理した THP-1 細胞をフローサイトメトリーで解析し、前方散乱光 (forward scattered (FSC)) 強度及び、側方散乱光 (side scattered light (SSC)) 強度の相関について検討した。10,000 細胞について解析した。

(倫理面への配慮)

該当なし。

## C. 結果

### 1) ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系の開発およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した毒性メカニズムを解明するための研究を進めるため、2種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を対象として、その物理化学的性質について明らかにすると同時に、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。研究に用いた ZnO ナノマテリアルの一次粒子径、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と A549 細胞及び THP-1 細胞に対する細胞毒性について表 1 にまとめた。また、図 1 に、ZnO ナノマテリアルの水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒度分布 (散乱強度分布) を示した。(ナノマテリアル

溶液の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。) 2種類の ZnO ナノ分散製品(sigma 及び alfa)は、一次粒子径がそれぞれ <35 nm, 40 nm、水懸濁液中(10 mg/mL)での平均粒子径は、それぞれ 66 nm, 165 nm、ゼータ電位は 44.9 mV, -7.5 mV であった。血清含有培地懸濁液中(0.2 mg/mL)では、ZnO(sigma)は粒径が変化した、ZnO(alfa)は殆ど変化せず、ゼータ電位は共に血清含有培地に近い値を示した。図 2 に、ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性試験の結果を示した。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。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。

### 2) THP-1 細胞における ZnO ナノマテリアルによる細胞表面マーカーの変化

THP-1 細胞の表面マーカーの測定は、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法)の改変法により実施した。図 3 に、ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞に対する細胞毒性を PI 染色により評価した結果を示した。ZnO 処理 24 時間では、ZnO (alfa) は細胞毒性を示さず、ZnO(sigma) 50µg/mL 処理で弱い細胞毒性を示した。48 時間では、ZnO 50µg/mL では、viability が ZnO(sigma)処理で 26%、ZnO(alfa)処理で 59%まで低下した。図 4, 5 に ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞における細胞表面マーカーの変化について検討した結果を示した。ZnO は共に、CD54 を用量依存的に活性化し、ZnO(Sigma)の方が相対蛍光強度(RFI) は高かった。ZnO(sigma) 50µg/mL 処理では、24 時間で RFI は 1270%まで上昇し、48 時間目でも殆ど同じ結果を示した。ZnO(alfa)では、RFI は

750%まで上昇した。これに対して、CD86 においては ZnO による発現量の変化は観察されなかった。

### 3) THP-1 細胞における ZnO ナノマテリアルによるサイトカイン産生

ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞におけるサイトカインの産生について、今回、CBA Human inflammation kit を用いて、フローサイトメトリーにより、6 種類のサイトカインを同時に測定した。その結果、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF において産生の増加が観察され、その量は ZnO(Sigma)の方が多かった(図 6)。IL-6、IL-10 は検出限界未満で、IL-12p70 は ZnO 50 $\mu$ g/mL 処理で僅かに検出できた程度であった。

### 4) ZnO ナノマテリアルの細胞内への取り込み

フローサイトメトリーにより、ZnO ナノマテリアル処理 THP-1 細胞の前方散乱光(FSC)強度及び側方散乱光(SSC)強度について検討した。ZnO 処理 48 時間後に、10,000 細胞について解析した結果を、図 7 に示した。FSC 強度は、レーザーの光軸に対して前方で検出される光で、細胞の表面積、大きさに関連する指標である。SSC 強度は、レーザーの光軸に対して 90°の角度で検出される光で、細胞の顆粒性状、内部構造に関連する指標である。FSC は、ZnO 処理により変化がなかったのに対して、SSC は、ZnO 処理により、用量依存的な増加が観察された。また、ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方が SSC が増加していた。

## D. 考察

ナノマテリアルの気道及び皮膚毒性新規評価系の開発およびマーカーの開発を目指すと共に、経気道及び経皮曝露を想定した

毒性メカニズムを解明するための研究を進める上で、血球系由来細胞株を用いた評価系は有用であると考えられる。THP-1 細胞を用いた h-CLAT 法は、皮膚感作誘導過程において、抗原提示に関わる表面抗原 CD54 及び CD86 の発現が変化することから、遅延型炎症性反応(感作性)を調べる *in vitro* 評価法として、化粧品材料をはじめとする化学物質の評価に汎用され、多くのデータを有している。本研究では、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品について、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性、免疫応答について検討した。先行する A549 細胞を用いた ZnO ナノマテリアル分散製品に対する細胞毒性試験の結果と比較すると、両細胞株で共に、ZnO(Sigma) の細胞毒性が強いという結果が得られた。細胞表面マーカー CD54 の発現量は、ZnO の用量依存的に増加が観察され、ZnO(Sigma)の方が ZnO(alfa)に比べて高かった。また、サイトカイン産生は、ZnO 処理により、IL-8、IL-1 $\beta$ 、TNF において産生の増加が観察され、その量は ZnO (Sigma)の方が多かった。ZnO 処理 THP-1 細胞をフローサイトメトリー解析により、FSC-SSC ドットプロット解析した結果、FSC は変化せず、細胞の顆粒性状、内部構造に関連する指標 SSC が用量依存的に増加していた。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方がより SSC が増加しており、細胞内に取り込まれた ZnO 量と細胞毒性との間に関連があると考えられた。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)の細胞影響の違いは、両 ZnO の物理化学的な性質が関連していると考えられた。

今後、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルについても同様の検討を行い、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。

## E. 結論

2種類のZnOナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、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（細胞表面マーカーCD54及びCD86の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した結果、

- THP-1細胞に対する細胞毒性は、A549細胞同様、ZnO(sigma)がZnO(alfa)より強かった。
- ZnOは共に用量依存的にCD54発現量を増加させ、RFIはZnO(sigma)の方が高かった。
- ZnO処理によりTHP-1細胞におけるIL-8、IL-1 $\beta$ 、TNFの産生が観察され、その量はZnO(sigma)の方が多かった。
- ZnO処理後のTHP-1細胞をフローサイトメーターで解析した結果、SSC強度の変化が、用量依存的に観察された。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
なし

## 2. 学会発表

- 1) 河上強志, 宮島敦子, 小森谷薫, 加藤玲子, 伊佐間和郎, NiOナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第24回環境化学討論会, 札幌市, 2015年6月
- 2) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎, 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第42回日本毒性学会学術大会, 石川, 2015年6月
- 3) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016.

## 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



表1 ZnO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、遺伝毒性

種類	製造(販売)元	1次粒子径 <sup>a</sup> (nm)	懸濁液中平均粒子径 <sup>a</sup> (nm ± SD) <sup>a</sup>		Zeta電位 <sup>a</sup> (mV ± SD) <sup>a</sup>		細胞毒性 (IC50)		遺伝毒性
			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 MTS法 (48h) (μg/ml)	THP-1細胞 ATP法 (48h) (μg/ml)	A549細胞 小核試験 (20 μg/ml)
ZnO*	Sigma-Aldrich	<35	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	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	72.5	63.0	陽性

\*測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA \*カタログより \*cumulant法より算出 \*10%FBS-MEM培地のZeta電位(-9.6 ± 1.6 mV) \*2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

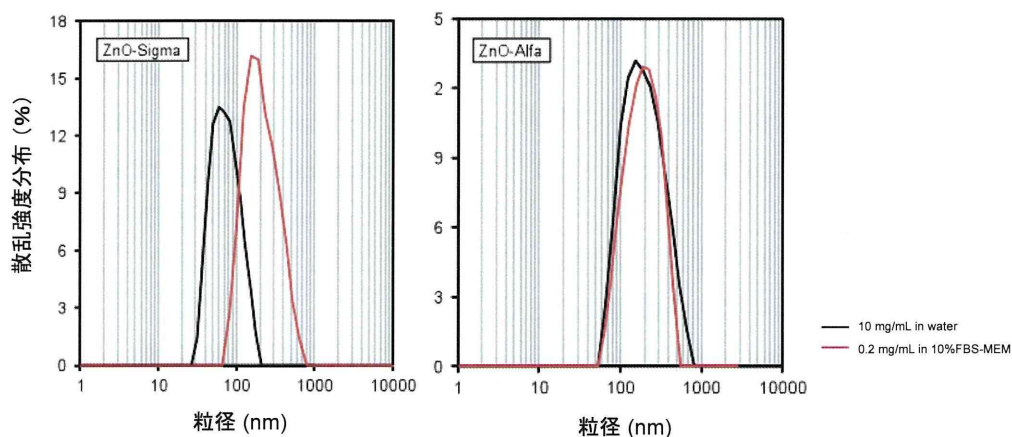


図1 ZnOナノマテリアル懸濁液中の粒径分布(散乱強度分布)

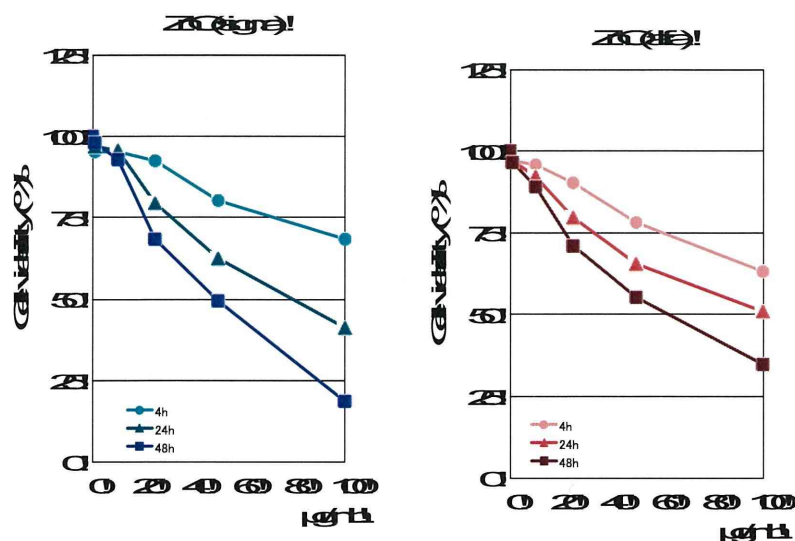


図2 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(ATP法)

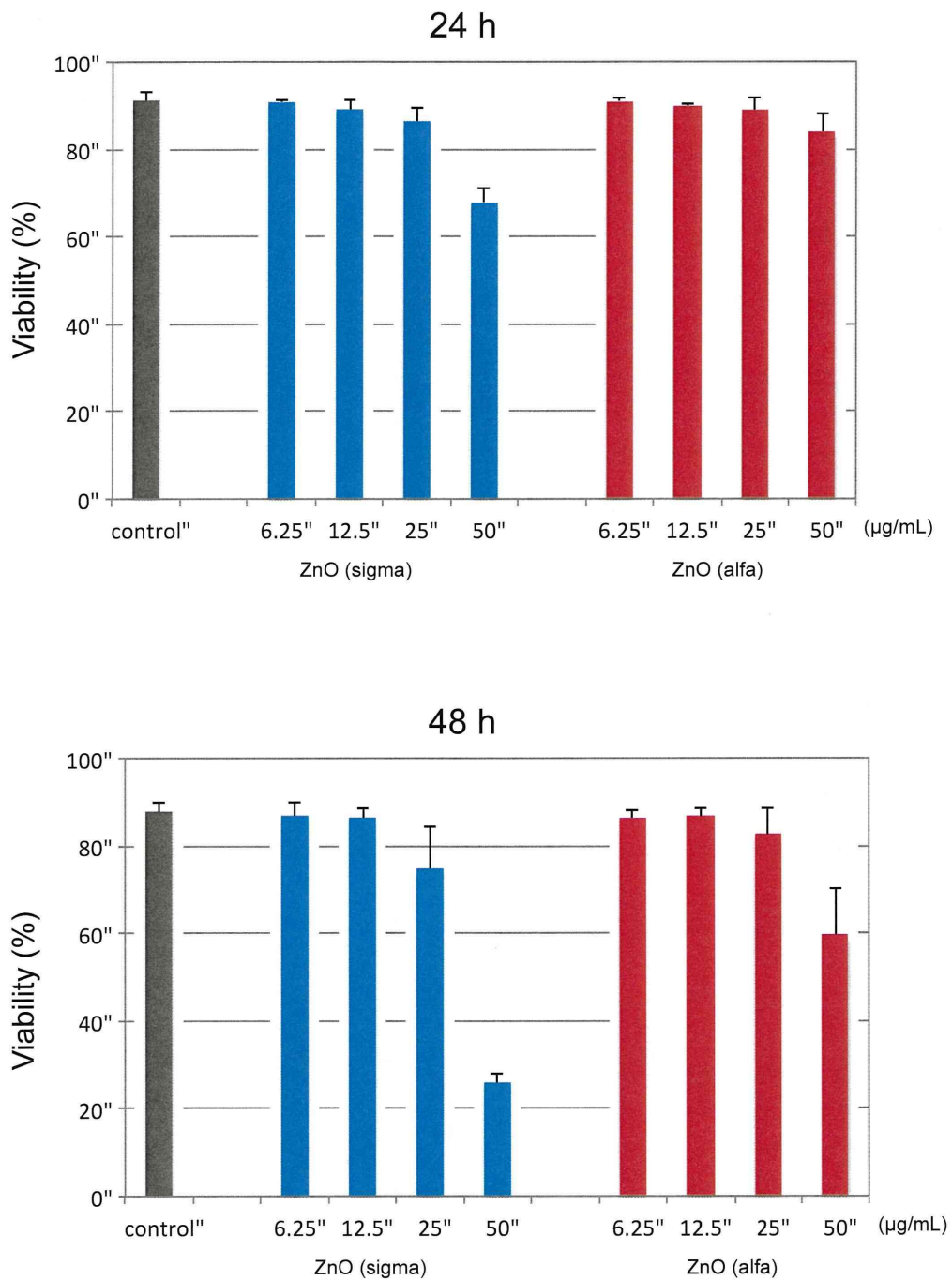


図3 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

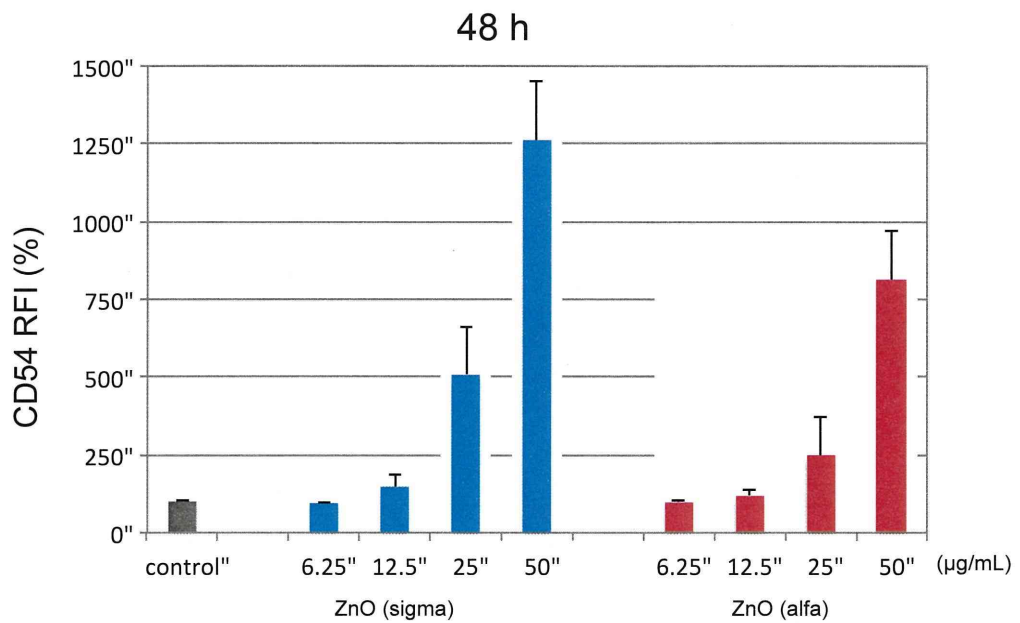
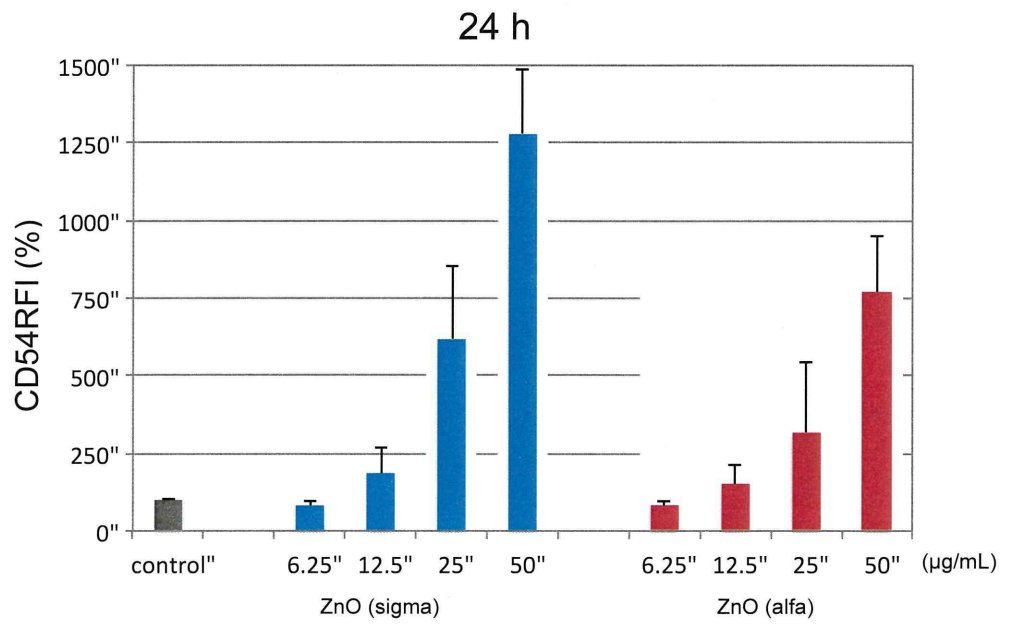


図4 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

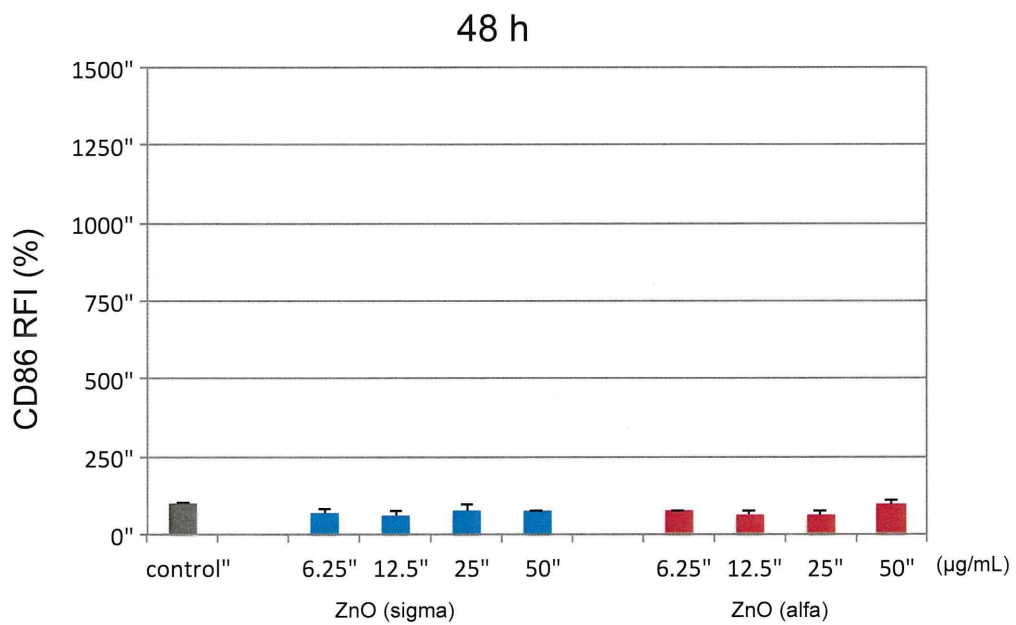
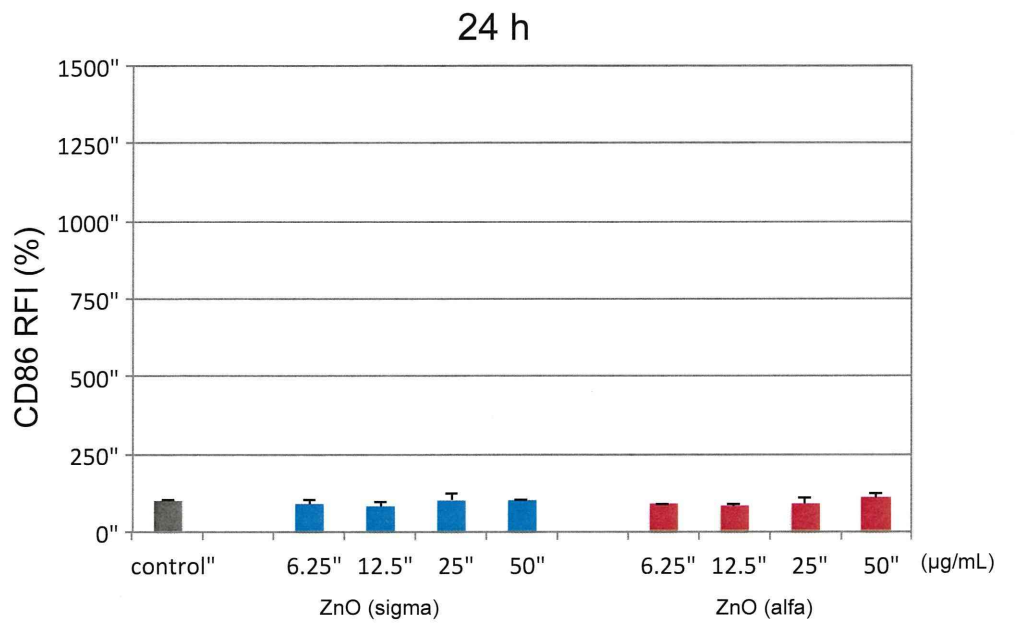


図5 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度