

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 27 年度 総括・分担研究年度終了報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

平成 27 (2015) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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

平成 27 年度 総括・分担研究年度終了報告書

平成 28 (2016) 年 3 月

渡邊 昌俊	国立大学法人横浜国立大学大学院 工学研究院 教授
林 幸壱朗	国立大学法人名古屋大学未来材料・システム研究所 助教
戸塚 ゆ加里	国立研究開発法人国立がん研究センター研究所 発がんシステム研究分野 ユニット長
中江 大	東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子	国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部 室長
花方 信孝	国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 ナノテクノロジー融合ステーション ステーション長
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

目次

I. 総括研究年度終了報告

- 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 1
渡邊 昌俊

II. 分担研究年度終了報告

1. 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築・エピジェネティック
スマーカーの検索・ナノマテリアルの細胞内動態の解析 11
渡邊 昌俊
2. ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション 19
林 幸彦朗
3. 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 22
戸塚 ゆ加里
4. *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 25
中江 大
5. 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 27
宮島 敦子
6. ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析 38
花方信孝
7. 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析 45
河上 強志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 59

IV. 研究成果の刊行物・印刷 63

I. 總括研究年度終了報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括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

研究代表者 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 工学研究院 教授

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。また、本研究では、消費者が日常生活で曝露している、ある程度の安全性の知見が集積されているナノマテリアルである金・銀・酸化チタン・酸化亜鉛・酸化鉄等の金属ナノ粒子を対象とする。平成27年度（3年計画の1年目）は、次のような成果を得た。ナノマテリアルの毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後、2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規 *in vitro* リスク評価系として、*in vivo* 実験 (*gpt delta mouse*)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、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Au NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、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*系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノマテリアルによる特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした（概略図）。

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
戸塚 ゆ加里 国立がん研究センター研究所・発がんシステム研究分野 ユニット長
中江 大 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 教授
宮島 敦子 国立医薬品食品衛生研究所 分子毒理学（医療機器部）室長
花方 信孝 国立研究開発法人物質・材料研究開発機構 生物工学（ナノテクノロジー融合ステーション）ステーション長
河上 強志 国立医薬品食品衛生研究所 衛生化学（生活衛生化学部）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
小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
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
煙山 紀子 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 助教

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い、仮にリスクがある場合、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が必要である。また、動物愛護の3Rの観点から、動物実験

代替法の開発も必要である。本研究は、ナノマテリアルの物性解析後、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。

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の単独培養系によるが、当該毒性の発現機構には肺胞マクロファージの貪食と液性因子放出の関与が示唆されている (*Part.Fibre.Toxicol.*6(1),23, 2009; *Genes Environ.*,33,14-20,2011; *Nanotoxicology*,7,452-61, 2013)。本研究グループは、マクロファージ由来細胞 (RAW264) との共培養で、肺胞上皮由来細胞 (A549) に対するカオリンの遺伝毒性の増強を確認している。従って、本研究グループは、上皮細胞単独の *in vitro* 評価法が不十分であり、生体模倣の新規 *in vitro* 試験系の構築の必要性を考えた。本研究は、ナノマテリアルの新規 *in vitro* リスク評価系及びマーカーの確立とナノマテリアルリスク低減方策の策定を目指す。

具体的には、(1)ナノマテリアルのリスク評価のための新規 *in vitro* 評価系およびマーカーの開発(ナノマテリアルの DNA 損傷性新規評価系およびマーカーの開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの気道毒性新規評価系の開発、共培養及び 3D モデルを用いたナノマテリアルの皮膚毒性新規評価系の開発)、(2)従来の *in vitro* リスク評価系との比較検討、*in vivo* 動物実験による当該リスク評価系の検証、(3)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(4)当該評価結果に基づくリスク低減化方策の考案と検証を柱とする。

平成 27 年度、主として各種細胞の共培養系、各種細胞と組織切片の共培養系(切片担体培養系)、再構成ヒト皮膚培養系 (3D-skin model) 構築の基礎的解析および microRNA 等の網羅的解析によるマーカーの抽出を行

った。

以下に各分担研究の成果の概要を記載する。

B. 研究方法

1)ナノマテリアルの作成及びキャラクタリゼーション(林) :

本年度は、金(Au)、銀(Ag)ナノ粒子(NPs)の合成および評価を行った。HAuCl₄ 水溶液と臭化ヘキサデシルトリメチルアンモニウム (CTAB) 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、遠心分離、水への再分散を繰り返し、Au NPs を合成した。クエン酸三ナトリウム水溶液に AgNO₃ 水溶液を攪拌混合し、冷却した NaBH₄ 水溶液を加え、Ag NPs を合成した。透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察および動的光散乱 (DLS) にて粒径分布を評価した。

2)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上) :

異なる一次粒子径の酸化ニッケル (II)(NiO) NPs より同程度の二次粒子径の懸濁液の作成と評価を行った。NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) および Ni NPs (一次粒子径: 5 ~ 20 nm) に Tween 80 含む Milli-Q 水を加え、サイズの異なる 3 種類のジルコニアボールを用いて、遊星ボールミル型粉碎機で懸濁液を調製した。粉碎後、10 mg/mL (または 1 mg/mL) の懸濁原液を作成した。懸濁原液を 10 % FBS-MEM で、毒性試験用ナノ粒子懸濁液を調製した。これらの懸濁原液について、平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を DLS にて測定した。

3)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(宮島) :

本年度は、酸化亜鉛(ZnO) NPs の懸濁液中の特性および細胞毒性・免疫応答解析を行った。酸化亜鉛 ZnO (Sigma-Aldrich と Alfa Aesar)の懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位は、DLS により測定した。THP-1 細胞における細胞毒性は、ATP 法により評価した。Interleukin-8 (IL-8) 、 Tumor Necrosis

Factor- α (TNF- α)の測定は、ELISA Kit により測定した。THP-1 細胞の活性化マーカー CD86, 54 の測定は、FITC ラベルされた 3 種類の抗体にて細胞を染色後、Flow Cytometry により解析した。

4) 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および共培養系及び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(戸塚)：

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：ICRマウスに非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)懸濁液の経気道的曝露実験を行い、摘出した肺組織の消化後、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 Fe_3O_4 NPs投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされ、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。

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 と RAW264 を共培養し、 Fe_3O_4 NPs を各細胞単独に、あるいは両細胞に 24 時間曝露した後、*gpt* 遺伝子の変異を解析した。

5) *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(中江)：

本年度は、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に着手した。市販の再構成ヒト皮膚培養系について情報収集・精査後、本研究で使用するべき再構成ヒト皮膚培養系を選定した。また、LabCyte EPIモデルを用い、Au NPs各濃度で24時間曝露し、細胞毒性をLDH assayで解析した。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索(花方、渡邊)：

本年度は、非修飾/カルボキシル基修飾磁

性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOH)をA549細胞に24時間あるいは72時間曝露し、RNAを回収し、miRNA microarrayを用いて網羅的発現およびクラスター解析を行った。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)：

切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築：過去の切片担体培養の条件で、A549細胞の試行培養を行った。既に作成された凍結切片を用いて(本学動物実験取扱い委員会に過去提出済み)、担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、各臓器のスライドガラスを準備し、細胞を播種し、接着性と増殖性を解析した。

ナノマテリアルの細胞内動態の解析：前立腺癌細胞株DU145に対して、 Fe_3O_4 NPsと Fe_3O_4 NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞膜上の状態を観察した。また、Alamar Blue assayを用いて、生存率を求めた。活性酸素種(ROS)の測定はCM- H_2 DCFDAを使用した。また、Western blottingで、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究グループでは、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従い行う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行う。次年度以降の必要とされる動物実験は、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) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs 濃度が 2 mg/mL の溶液を合成できた。Ag NPs 濃度が 0.02 mg/mL 以下では均一な溶液が得られたが、これ以上の濃度では Ag NPs が凝集・沈降を示した。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

作成した NiO NPs (一次粒子径: 100 nm) は、調製後速やかに凝集してしましたが、Ni NPs は、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できた。

3) 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：

2 種類の ZnO NPs (Sigma 及び Alfa) は、一次粒子径が各 <35 nm, 40 nm、水懸濁液中 (10 mg/mL) での平均粒子径は各 66 nm, 165 nm 等と性状が異なり、血清含有培地懸濁液中での異なる二次粒径変化を認めた。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、ZnO (Sigma) が ZnO (Alfa) より強かった。THP-1 細胞の産生サイトカイン量や CD54 の活性化も 2 種の Zn NPs で異なることが観察された。

4) 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および共培養系及び 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：

非投与群と比べて、Fe₃O₄ NPs 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が Fe₃O₄ NPs 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされ、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された。

Fe₃O₄ NPs の GDL1 細胞単独曝露に比べ、RAW264 単独及び両細胞に曝露させた時の変異頻度が優位に上昇することがわかった。さらに、Fe₃O₄ NPs 曝露による変異スペクトラムの解析では、Fe₃O₄ NPs を両細胞に曝露時のスペクトルは、*gpt delta* マウスへの

Fe₃O₄ NPs 曝露時の肺の変異スペクトルに類似することを認めた。

5) *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：

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；ヒト幹細胞由来のメラノサイト、ヒト・ケラチノサイト、ヒト線維芽細胞による表皮・真皮の構成)、LabCyte EPI モデル (J-TEC；ヒト正常皮膚細胞による表皮のみの構成)。Au NPs 曝露実験では、LDH assay により、最大用量でわずかな細胞死 (5%) を認めるのみであった。

6) ナノマテリアル曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

全 1374 個の miRNA のうち、1 つ以上のサンプルでシグナルが検出された miRNA は 118 個あった。これらについて階層型クラスタリングを行い、heat map と clustering tree を作成した。この miRNA 発現パターンの類似性から推測されたサンプルの clustering tree において、2 つの大きなグループが検出された。いずれのグループも NPs に暴露された細胞の miRNA の発現パターンが、暴露されていない細胞の発現パターンとは異なっていることや非修飾 NPs と修飾 NPs に暴露された細胞での miRNA 発現パターンは異なることを認めた。

7) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築およびナノマテリアルの細胞内動態の解析：

A549細胞の担体培養を行ったが、総じて細胞接着が悪く、その後の十分な増殖も認められなかった。

ナノマテリアルの細胞内動態の解析：
Fe₃O₄NPs, Fe₃O₄NPs-COOHのDU145細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に減少し

たが、200 µg/mL曝露時には有意に低下した。また、ROS産生はFe₃O₄NPsでは濃度依存的に増加、Fe₃O₄NPs-COOHは抑制されていた。AFMでは、細胞表面に付着している粒子凝集体の粒径については、非修飾、修飾粒子において顕著な違いは確認されなかった。また、細胞内の生存シグナルであるNFκBの発現量は、Fe₃O₄NPsでは抑制され、Fe₃O₄NPs-COOHでは増強されるのを認めた。

D. 考察

1) ナノ材料の作成及びキャラクターゼーション：

Au NPs は、本研究グループ内で供給出来るレベルであることを確認した。Ag NPs は約 2 mg/mL の銀ナノ粒子溶液を合成する必要があるため、新しい合成法を開発することになった。

2) 細胞応答に及ぼすナノ材料の物性解析：

NiO NPs について、調製方法の検討が必要と考えられた。一方、Ni NPs については、1 mg/mL では二次粒子径サイズの異なる懸濁液が調製できたが、10 mg/mL を懸濁原液の調製を検討する必要性を認めた。

3) ナノ材料の細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析：

2 種類の ZnO NPs 分散製品について、懸濁液及び培地懸濁液中での物理化学的性質を明らかにした。また、THP-1 を用いた評価系を用いた細胞毒性、免疫応答解析では、A549 細胞を用いた先行実験の結果と比較すると、両細胞株ともに ZnO(Sigma)が強い細胞毒性を示し、IL-8 産生量、CD54 発現量も共に高い結果を得た。材料の物理化学的性状の重要性を認めた。

4) ナノ材料による DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築および共培養系及び 3D 皮膚モデルを用いたナノ材料の遺伝毒性評価系の構築：

Fe₃O₄ NPs 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。

変異頻度は RAW264 細胞の共存下で上昇することを認めた。変異スペクトル解析では、Fe₃O₄ NPs の各細胞単独の曝露時と比べ、両細胞曝露時に *in vivo* におけるパターンと類似することを認めた。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の有用である可能性が示された。

5) *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：

再構成ヒト皮膚培養系の選定を行い、ナノ粒子の皮膚浸潤を病理組織学的および ICP 測定を準備する段階とした。

6) ナノ材料曝露による網羅的遺伝子発現解析およびエピジェネティクスマーカーの検索：

カルボキシル基による修飾の有無が、miRNA の発現変動に最も大きな影響を与える因子であることがわかった。また、Fe₃O₄ NPs のカルボキシル基修飾の有無、暴露時間、および暴露濃度の 3 つの条件に基づく miRNA のクラスタリングから、特徴的な発現パターンを示す 4 つのクラスターを抽出した。これらの結果より、ナノ材料による特徴的な miRNA 変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。

8) 切片担体培養系を用いたナノ材料のリスク評価系の構築およびナノ材料の細胞内動態の解析：

A549細胞の細胞接着不良および十分な増殖が認められなかった原因は、担体の劣化が考えられ、次年度に新たに申請後に、新しい担体を作成する予定である。

細胞の種類によりNPsの取り込まれる状況は異なり、またNPsの表面修飾によっても異なることを明らかにした。一方、取

り込まれたNPsのNFκB axisへの影響を認めた。

E. 結論

ナノ材料の毒性評価において、ナノ粒子の物理化学的性状および形状・表面修飾は重要な因子である。また、*in vitro*実験系での2次粒子径あるいはコロナの形成等も重要な因子である。本研究グループにおいて、培養液中などにおいて粒径分布、ゼータ電位の基礎的なデータを収集した。異なる1次粒子径のNi NPsを同程度の2次粒子径の懸濁液を作成に成功し、今後2次粒子径の細胞毒性における役割の解明への準備を整えた。新規*in vitro*リスク評価系として、*in vivo* 実験 (*gpt delta* mouse)-DNAアダクトーム-共培養系の解析の流れが出来、その有効性について解析する準備ができた。これに切片担体培養系(A549細胞あるいはGDL1細胞)を新たに加える準備中である。一方、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Au NPsの再構成ヒト皮膚培養系への応用を始めた。これにより、ナノ材料の皮膚への影響を再構成ヒト皮膚培養系で解析し、*in vivo*系のデータで妥当性を評価する予定である。非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子のA549細胞への曝露実験で、網羅的遺伝子発現解析を行い、miRNAのクラスタリング解析から、ナノ材料による特徴的なmiRNA変動、すなわちマーカーとしての可能性を認めた。また、カルボキシル基修飾の有無により、細胞への取り込みやNFκB axisへの影響を明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 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.* in press.

- (2) 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.
- (3) N. Hanagata, H. Morita, Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles, *J. Toxicol. Sci.*, 2015, 40(5), 625-35.
- (4) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R. A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe, Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.*, 2015, 10, 6105-19.
- (5) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88.
- (6) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichianagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia treatment. *J. Appl. Phys.*, 2015, 117, 17D157.

- (7) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 2015, 75 (10), 1009-19.
- (8) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.
- (9) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. *医学のあゆみ*, 2015, 252(4), 303-8.
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, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016 (予定).
- (4) 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、金沢、2015 年 7 月.
- (5) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis), 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) 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、福岡、2015 年 12 月.
- (7) 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、福岡、2015 年 12 月.
- (8) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (9) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (10) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三. 各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (11) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (12) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N.

Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(13) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

(14) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects

of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月.

H. 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

H27年度

新規 *In vitro* 評価系の構築

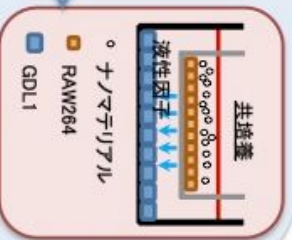
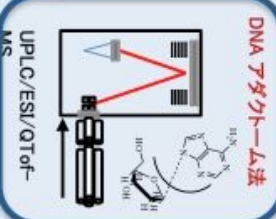
ナノテリアル動態・毒性メカニズム解析
ナノテリアル供給・物理化学的性状解析

- ・DNA損傷性評価系の構築
- アダクトーム
- ・生体を模倣した毒性試験
- 共培養系
- 切片培養系
- 3D皮膚モデル
- ・生体評価影響に適したマーカーの探索

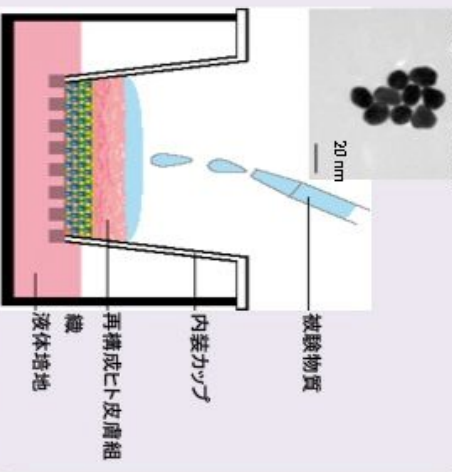
適切な *in vivo* の動物実験による当該代替法の有効性の検証



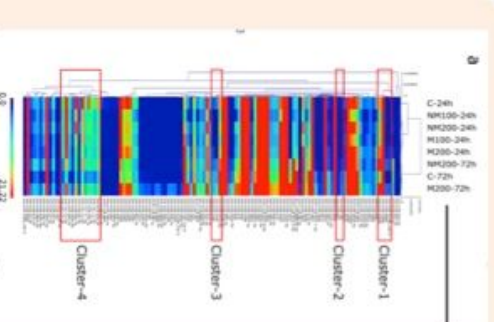
新規 *in vitro* 評価系(肺)



新規 *in vitro* 評価系(皮膚)



miRNA 網羅的解析



金ナノ粒子の合成、ナノテリアルの2次粒子径の重要性、物理化学的性状と細胞毒性・免疫応答、表面修飾の細胞内取り込みとNFκB axisへの影響

II. 分担研究年度終了報告

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
切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築
エピジェネティクスマーカーの検索
ナノマテリアルの細胞内動態の解析

研究代表者 渡邊 昌俊 横浜国立大学大学院 工学研究院 教授

今年度は、ナノマテリアルの細胞内動態の解析について報告する。前立腺癌細胞株DU145に対して、 Fe_3O_4 NPsと Fe_3O_4 NPs-COOHを各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞膜上での状況を観察した。Alamar Blue assayを用いて、生存率を求めた。活性酸素種(ROS)の測定はCM- H_2 DCFDAを使用した。Western blottingで、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。 Fe_3O_4 NPs, Fe_3O_4 NPs-COOHのDU145細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に低下し、200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 曝露時には有意に低下した。また、ROS産生は Fe_3O_4 NPsでは濃度依存的に増加、 Fe_3O_4 NPs-COOHは抑制されていた。AFMでは、 Fe_3O_4 NPs-COOHが細胞表面に付着する数は多く、粒子凝集体の粒径については、違いは認められなかった。胞内の生存シグナルであるNF κ Bの発現量は、 Fe_3O_4 NPsでは抑制され、 Fe_3O_4 NPs-COOHでは増強されるのを認めた。同一細胞に対して、磁性体ナノ粒子の修飾の有無による影響が確認できた。

A. 研究目的

本研究グループの目的は、ナノマテリアルの物性解析後、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である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびエピジェネティクスおよびエピジェネティクスな変化を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。本研究での分担は、(1) 切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築、(2) エピジェネティクスマーカーの検索、(3) ナノマテリアルの細胞内動態の解析

である。(1)に関して、過去の切片担体培養の条件で、A549細胞の試行培養を行った。既に作成された凍結切片を用いて(本学動物実験取扱い委員会に過去提出済み)、担体培養を行った。細胞懸濁液の濃度を設定し、各臓器のスライドガラスを準備し、細胞を播種し、接着性と増殖性を解析した。A549細胞の担体培養を行ったが、総じて細胞接着が悪く、その後の十分な増殖も認められなかった。従って、(3)について、報告をまとめた。前立腺癌細胞株 DU145 に対して、 Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 NPs-COOH を各濃度に調整し、24時間あるいは72時間曝露を行った。その後、原子間力顕微鏡(AFM)を用いて、非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)、

カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs-COOH)の細胞膜上の状態を観察した。また、Alamar Blue assay を用いて、生存率を求めた。活性酸素種 (ROS) の測定は CM- H_2DCFDA を使用した。また、Western blotting で、細胞内の基本的なシグナリングの解析を行った。

B . 研究方法

1)使用細胞株と細胞培養

本実験ではアンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 を使用した。同細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。DU145 は RPMI 1640 培養液(10 %FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有)を用いて 37 °C、 CO_2 濃度 5 %加湿インキュベーターで培養した。

2) 使用した磁性体ナノ粒子 (Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOH)

磁性体ナノ粒子の一次粒径は約 10 nm であり主成分は Fe_3O_4 (マグネタイト)で構成されている。 Fe_3O_4 は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は $-\text{Fe}_2\text{O}_3$ へ成分に変化があるがどちらの場合も磁性を示す酸化物である。

非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は戸田工業株式会社より購入し、また、表面をカルボキシル基で修飾した磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs-COOH) は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。各々 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で培養液に調整して、超音波破碎機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社) にて、分散処理を行い、 Fe_3O_4 NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe_3O_4 NPs 曝露前には、培養液中における Fe_3O_4 NPs の大きさ、粒径の分布を濃厚系粒径アナライザー (Fiber-Optics Particle Analyzer FPAR-1000、大塚電子) にて測定を行った。

3) Cell viability の測定

生細胞の細胞数の変化を測定するために本実験においては Alamar Blue (Alamar Bioscience , Sacrament、California、 USA)を用いた。細胞は細胞密度が 1.0×10^4 cells/well となるように 24 well プレートに再播種、培養した。 Fe_3O_4 NPs 曝露後に、培養液を取り除き、PBS を用いて細胞上に付着した Fe_3O_4 NPs をウォッシュアウトする。そして、培養液で 10 倍希釈した Alamar Blue 溶液を 500 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ添加した。37 °C、5 % CO_2 加湿インキュベーター内で 3 時間培養後、細胞内や細胞に付着した NPs の影響を考慮し、Alamar Blue 溶液の上澄みを 450 $\mu\text{l}/\text{well}$ ずつ別の 24 well plate に移し替えた。その後、分光光度計(Viento XS、DS Pharma Biomedical Co.、Ltd)により 570 nm と 600 nm の波長を測定し、生存率を求めた。

4) 活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) の測定

5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate、acetyl ester CM- H_2DCFDA (Invitrogen 社) を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った。6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well になるように播種した。まず、PBS 8.54 ml に CM- H_2DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well plate の培地を吸引して、その well に PBS 1ml に 10 μM に調整した試薬を 200 μl 加えた。その後 30 分インキュベーターを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、Imaging Soft (Photoshop Elements 8 ;Adobe)を用いて、画像の輝度と細胞の接着の面積(Pixel 数)を求めて、定量化を行った。

6) AFM による DU145 細胞上の NPs 観察

以下の工程でゼラチンコートを作成した。ゼラチン粉末 + 純水で 1 mg/ml (0.1%)のゼラチン溶液を作製し、オートクレーブで 120 °C、10 分で溶解させた。35 mm dishに

ガラス基板を入れて3 mlゼラチン溶液を入れて60分静置し、最終的にゼラチン溶液を除去し、クリーンベンチUV下で乾燥させた。AFM観察用に細胞を培養するためガラス基板にゼラチンをコートした。ゼラチンコート済のガラス基板に細胞を播種した。播種24時間後、細胞をカバーガラス上に接着させたまま固定(グルタルアルデヒド)した。固定した細胞をAFM装置(プローブステーションSPI3800N(NanoNavi II Station)、SIIナノテクノロジー社;顕微鏡ユニット:SPA-400、SIIナノテクノロジー社)で測定し、写真撮影を行った。

7) NF- κ Bの発現量の測定

細胞密度が 2.0×10^5 cells/well(24時間曝露)、 0.8×10^5 cells/well(72時間曝露)となるように細胞を6 well plateに播種した。細胞接着後、 Fe_3O_4 NPsあるいは Fe_3O_4 NPs-COOH曝露を行った。一定時間後、PBSを用いてNPsをウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 250 μ lを添加して細胞を剥離し、回収した。回収した全ての細胞を1000 rpm、5分の条件で遠心分離し上清を除去した後、PBSに懸濁した。15000 \times g、3分の条件で遠心分離し、細胞をペレット状にした後上清を除去した。RIPA buffer 30 μ l/sampleにprotease inhibitor, phosphatase inhibitorを0.3 μ l/sampleずつ混ぜMixを作り、各サンプルに30 μ lずつ添加したあとホモジナイズした。4、15000 \times g、30分の条件で遠心分離し、その上清をWB sampleとした。

Sampleのタンパク質濃度をBradford法によって測定し、全量10 μ l、タンパク質量が10 μ gとなるようにsampleとPBSを混合した。そこに同量の2 \times SDS sample buffer(10%メルカプトエタノール含有)を加え計20 μ lとし、95 $^{\circ}$ C、5分の条件でタンパク質を変性させた。

その後、E SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel electrophoresis)を

行い、タンパク質を分離した。電気泳動を行ったゲルからPVDF membraneに分離したタンパク質を転写し、吸着させた。転写後、membraneをTBS-T buffer(2% BSA含有)に1時間振盪させ、ブロッキングを行った。

ブロッキング後、Signal Boosterを用いて、一次抗体である α -actin抗体(abcam)を5000倍希釈、NF- κ B抗体を1000倍希釈し、membraneを浸透させ、4 $^{\circ}$ Cで一昼夜処理した。その後、TBS-T bufferにmembraneを10分振盪し、洗浄した。この操作を3回繰り返した。

それぞれの抗体の動物種由来に対応するHRP標識二次抗体をSignal Boosterを用いて10000倍に希釈し、membraneを室温で1時間振盪した。その後、TBS-T bufferにmembraneを10分振盪させ、洗浄した。この操作を3回繰り返した。洗浄後、発光試薬をmembraneの表面に垂らし、5分ほど反応させ、検出器を用いて化学発光を検出し、バンドの検出を行った。各Sampleのバンドの定量化はImage Jを用いて行った。

なお、抗癌剤docetaxel(DTX)は前立腺癌細胞でNF- κ Bの発現を誘導する事が知られているので、positive controlとして用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は各施設の遺伝子組換え実験の安全管理規則に従う。ナノマテリアルの取扱いに関して、「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第0331013号)に準じて行う。

C. 研究結果

1) 細胞生存率

前立腺癌細胞株DU145において(図1)、 Fe_3O_4 NPsおよび Fe_3O_4 NPs-COOHの曝露量

が増えるに従い、ともに細胞生存率は低下し、200 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時には有意に低下した ($p < 0.05$)。しかし、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露時に比べ、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 曝露時は細胞生存率の低下は抑制されるも両者の間に有意差は認めなかった。

2) ROS 生成の測定

DU145 細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を図 2 に示す。ROS の産生量を、Control 時を 1.00 [-] として数値化を行った。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露では、100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時より有意に ROS 産生が確認された ($p < 0.05$)。一方、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 曝露では、濃度に関係なく変化を認めなかった。

3) DU145 細胞上の NPs 観察

図 3 は NPs を曝露していない時の DU145 細胞の AFM 像を示した。図 4 および図 5 はそれぞれ $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を添加した場合の DU145 細胞を示している。観察範囲について比較すると、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ に比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。細胞表面に付着している NPs 凝集体の粒径については、表面修飾の有無による違いは認められなかった。

5) NF- κ B の発現量の測定

Control 時 1.00 [-]、DTX 1 nM 処理時 1.89 [-]、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 1.65 [-]、DTX 1nM と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 1.29 [-]、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 0.86 [-]、DTX 1nM と $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 曝露時 0.80 [-]であった (図 6)。

D. まとめ

同一細胞に対する非修飾・カルボキシル基修飾の磁性体ナノ粒子の影響を調べた。カルボキシル基修飾により、非修飾と比較して有意差を認められなかったが、細胞生存率の減少を抑制することが出来た。また、ROS 産生も抑制することが確認出来た。一方、非修飾磁性体ナノ粒子とカルボキシル

基修飾磁性体ナノ粒子の細胞への影響で、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響に差を認めた。加えて、細胞膜表面上の磁性体ナノ粒子の観察で、その分布状態に差を認めたが、これの細胞毒性への影響については更なる解析が必要と考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 2016, 291(1), 72-88.
- (2) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takanoto, N. Ohuchi, Y. Ichiyanagi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by $\text{Mn}_{1-x}\text{Zn}_x\text{Fe}_2\text{O}_4$ nanoparticles for hypertension treatment. *J. Appl. Phys.*, 2015, 117, 17D157.
- (3) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*, 2015, 75(10), 1009-19.
- (4) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-555, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.

- (5) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. 医学のあゆみ, 2015, 252(4), 303-8.

2. 学会発表

- (1) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (2) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (3) 渡邊昌俊、中野洋、白石泰三. 各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について. 第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (4) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N. Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

- (7) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

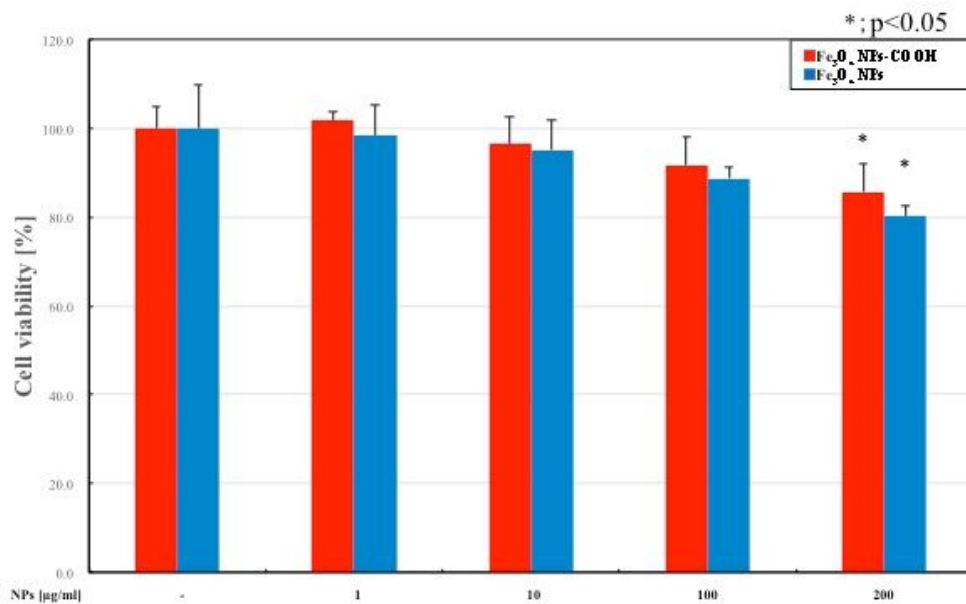


図 1. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の生存率

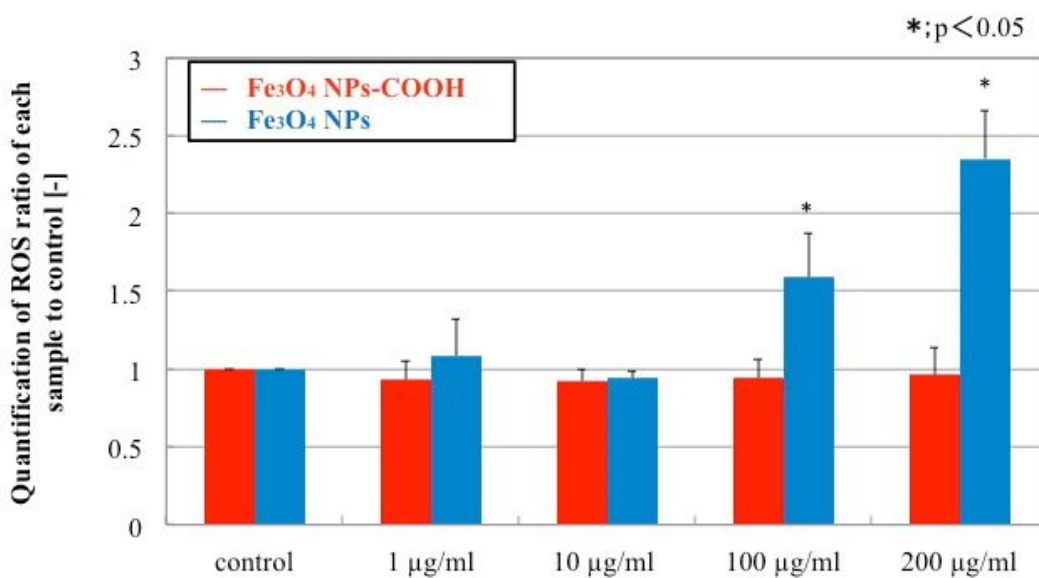


図 2. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の ROS 生成

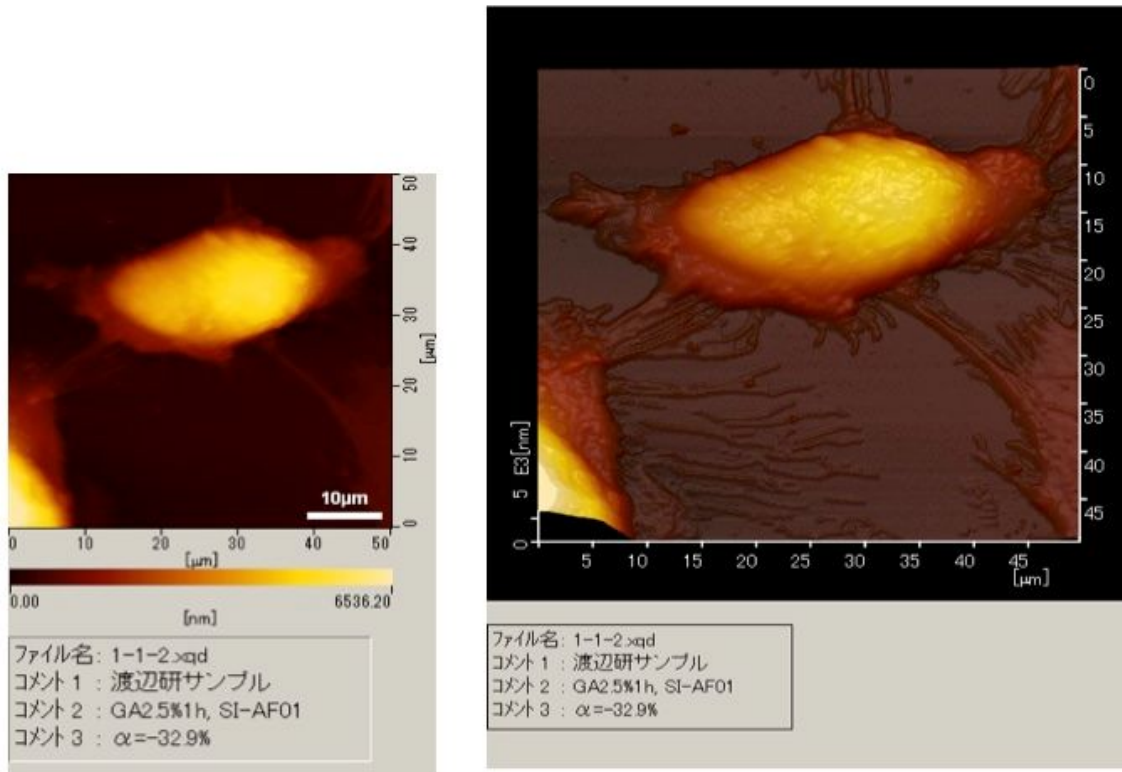


図 3. AFM によるナノ粒子を曝露していない DU145 細胞像

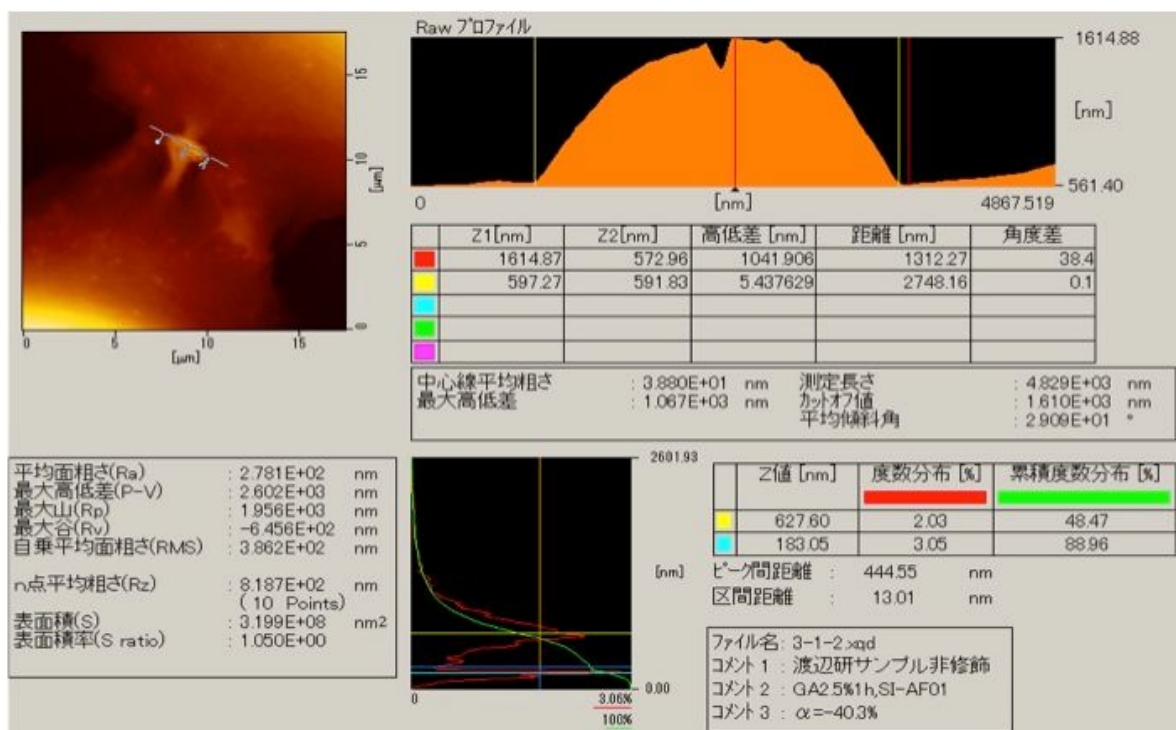


図 4. AFM による Fe_3O_4 NPs を曝露した DU145 細胞像

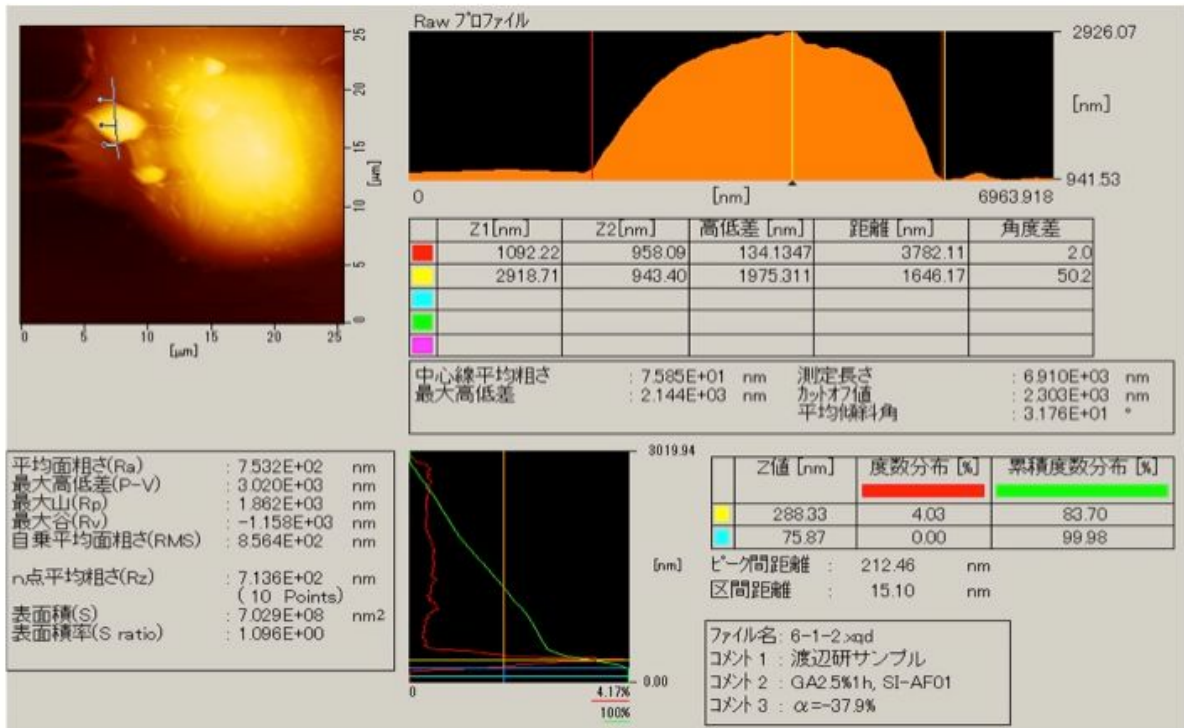


図 5. AFM による Fe₃O₄ NPs-COOH を曝露した DU145 細胞像

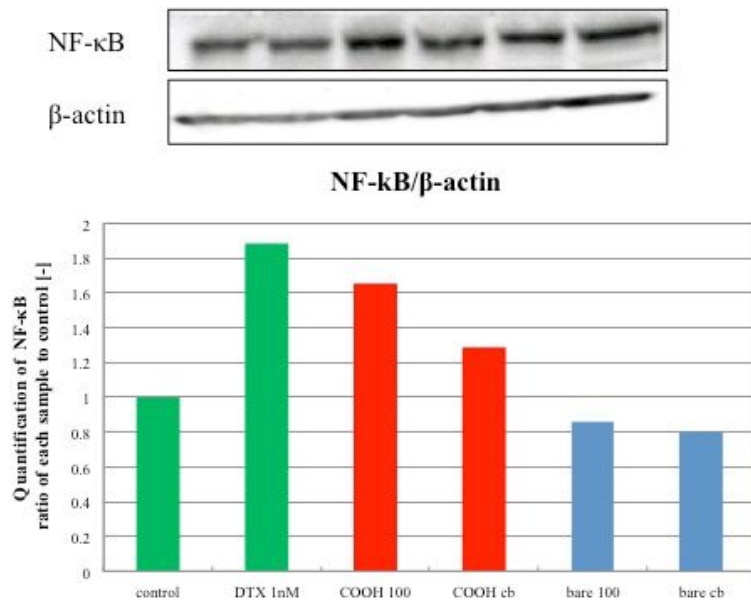


図 6. Fe₃O₄ NPs/ Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露時の DU145 細胞の NF-κB 発現量

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（ ）（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（ ）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 μ 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 μ L を攪拌しながら加えた。次に、氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液 (濃度 5.3 M) 100 μ 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 () 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 () 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 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 以上になると凝集し、沈降してしまった (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た。 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ったが、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った。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

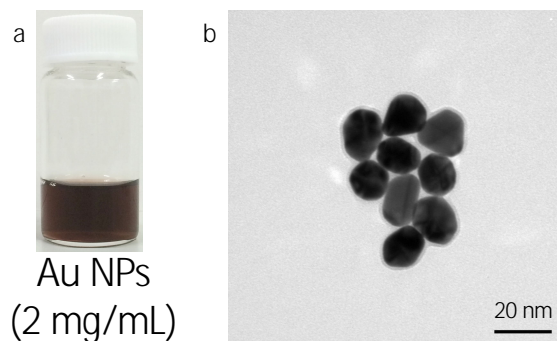


図 1. (a) 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

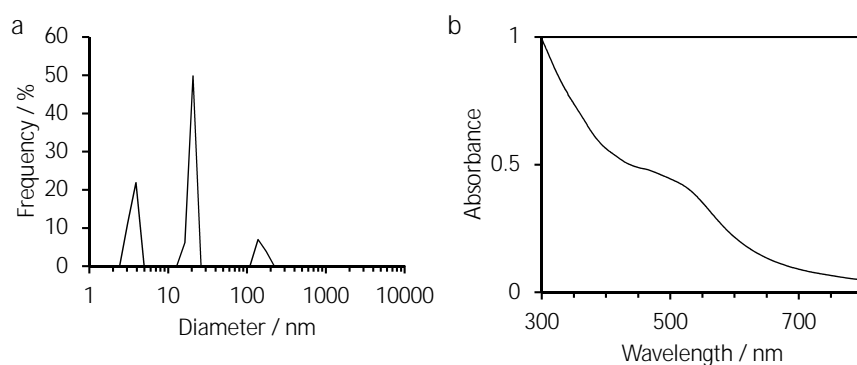


図 2. (a) 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

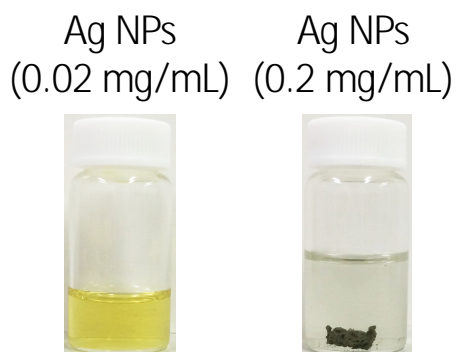


図 3. 方法 1 で作製した銀ナノ粒子水溶液の写真 : (左) 0.02 mg/mL, (右) 0.2 mg/mL

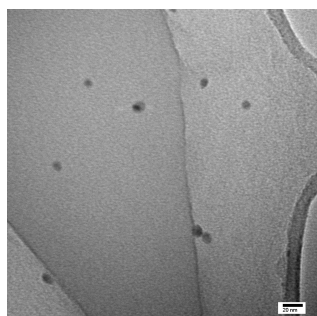


図 4. 方法 2 で作製した銀ナノ粒子の TEM 像

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 アダクトーム法)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

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。

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

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)。

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

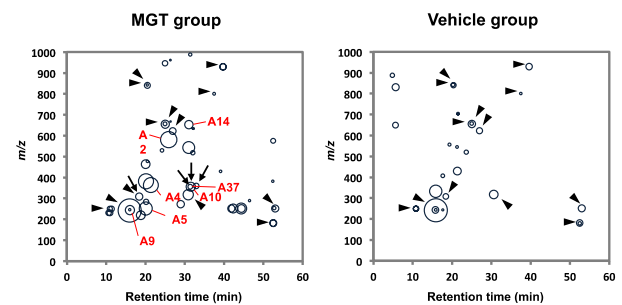


図 2 PCA 解析の結果

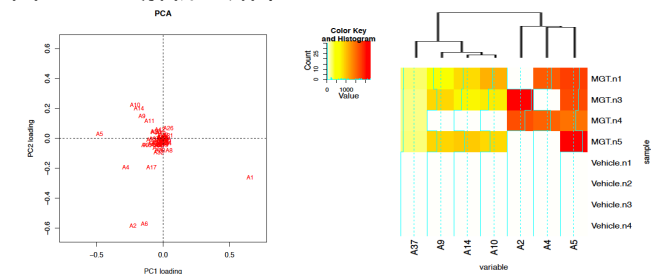
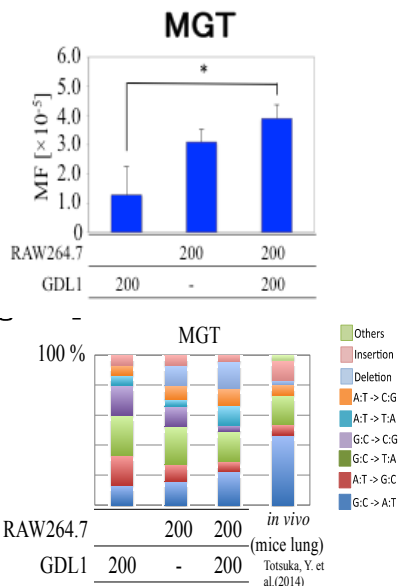
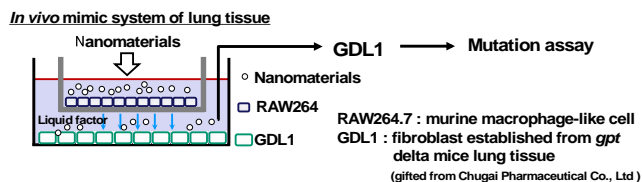


表 1 MGT 曝露に特徴的な付加体としてスクリーニングされたもの

Adducts	M/Z [M+H]	Comparing with DNA adduct database [M+H]	Derivation
A2	580.79	Unknown	
A4	363.17	βedA [363.1816 (+NH ₃)]	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 ³ -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 μM 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 μM 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 アッセイによっては、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 β 、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_4 (Cadmium sulfate hydrate (3/8) (Sigma-Aldrich)を用いた。細胞表面マーカー測定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_2 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、 1×10^5 から 8×10^5 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(2×10^4 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[®] 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 β 、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 μ 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 β 、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 β 、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

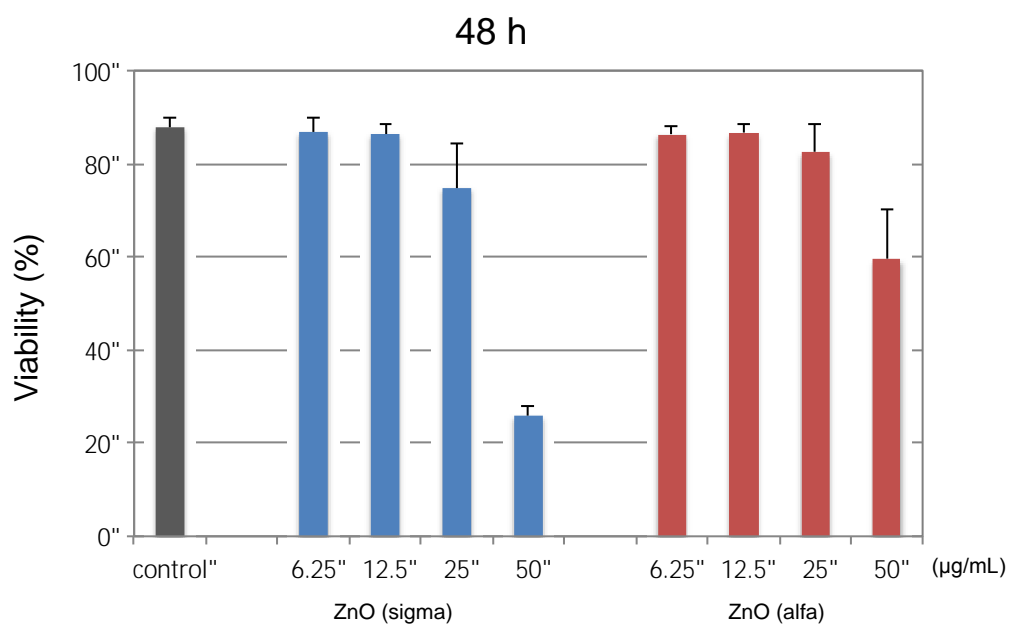
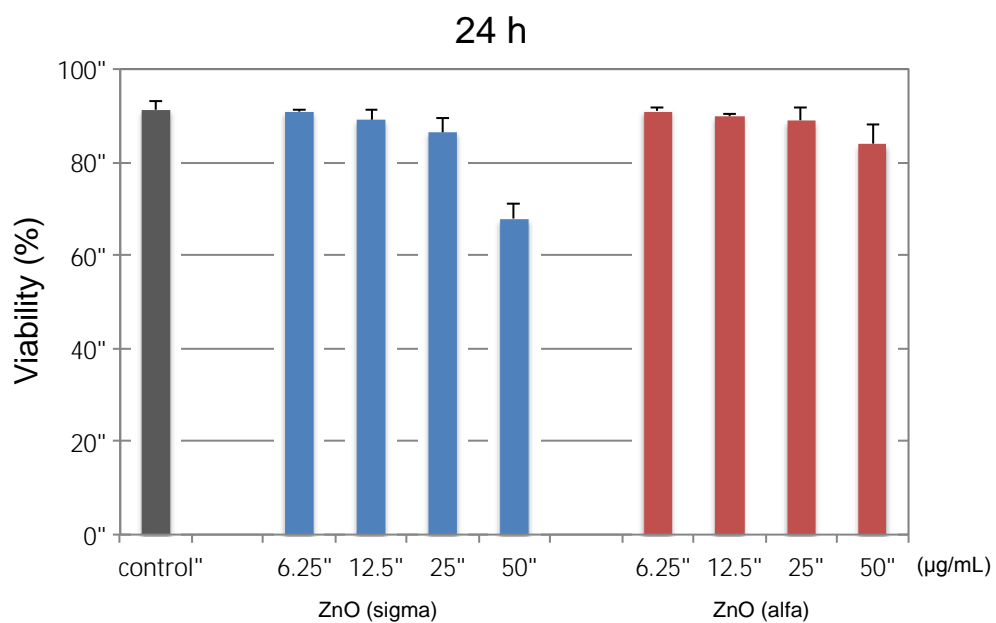


図3 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

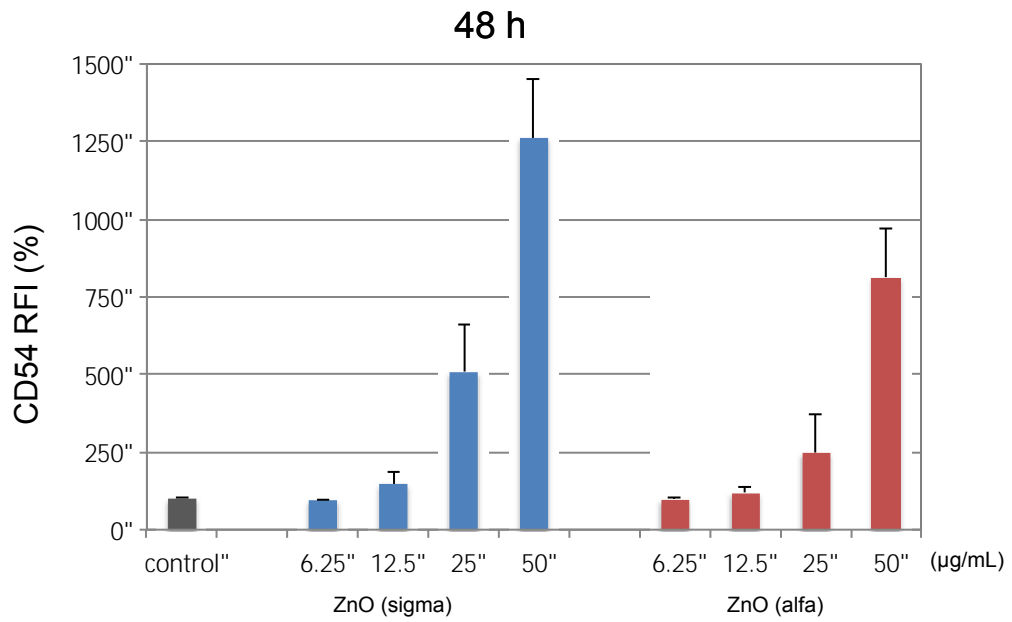
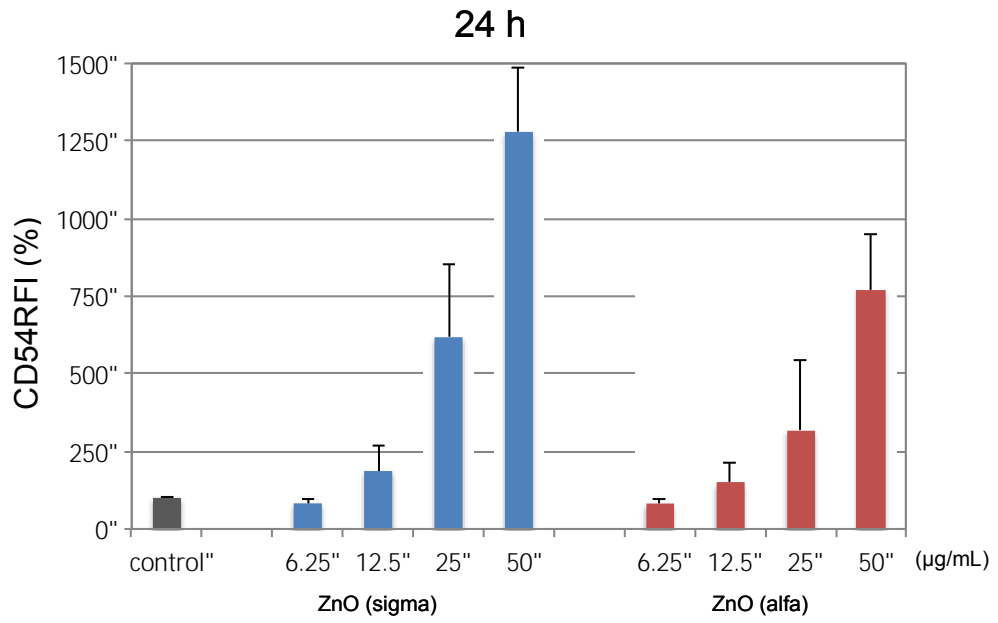


図4 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

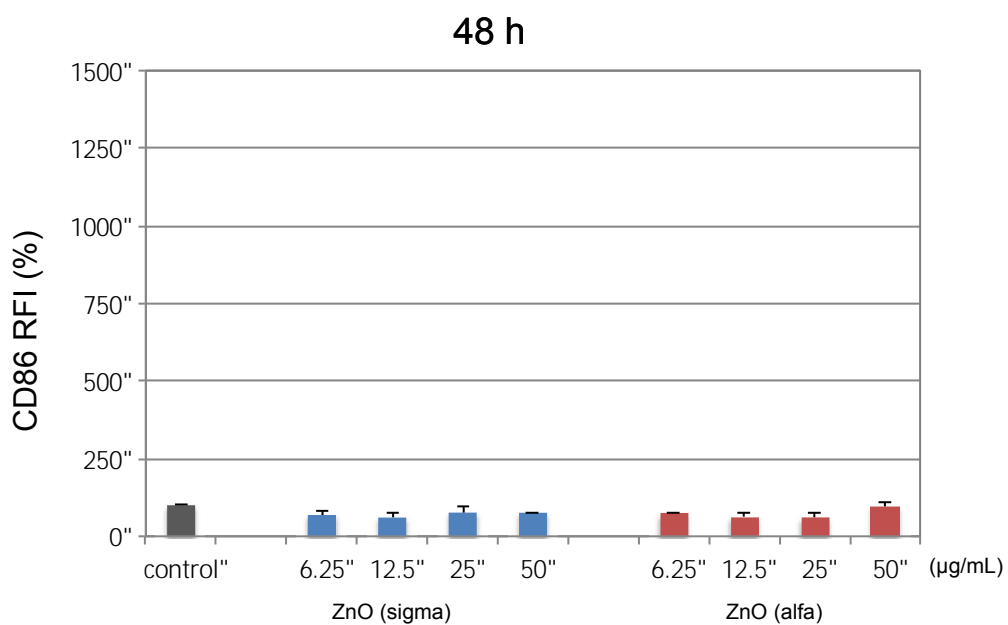
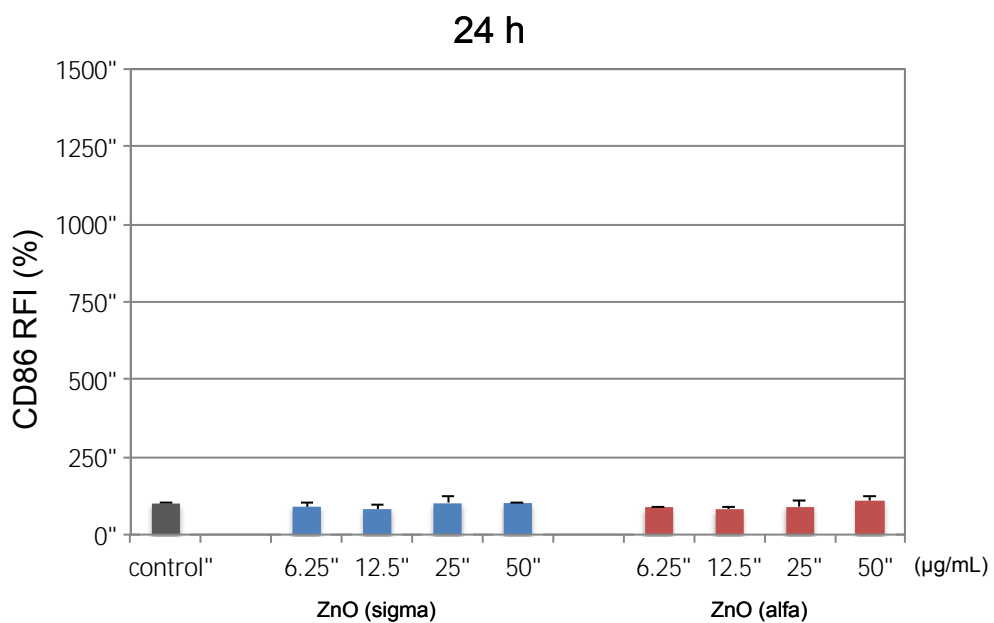


図5 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

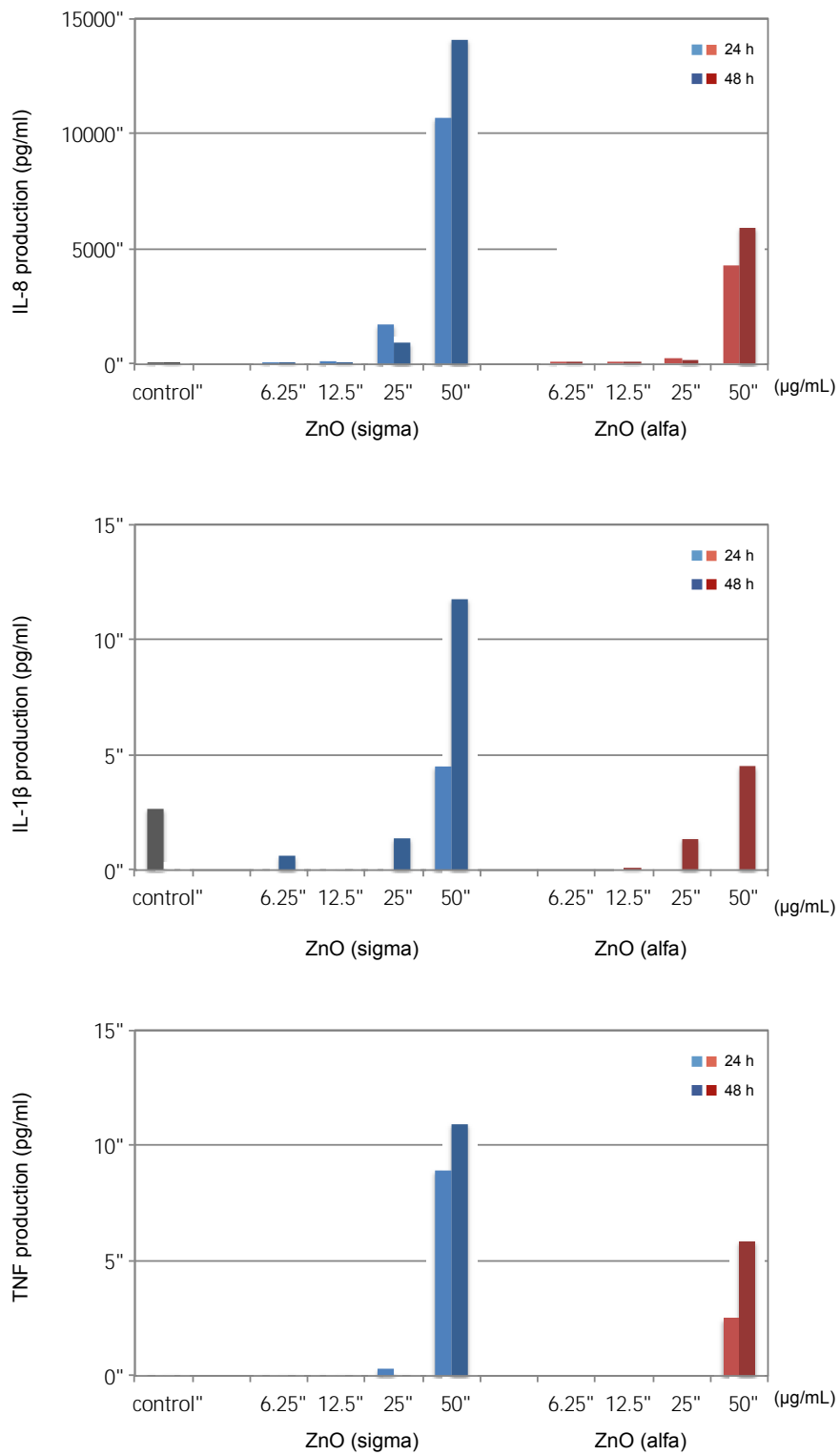


図6 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生

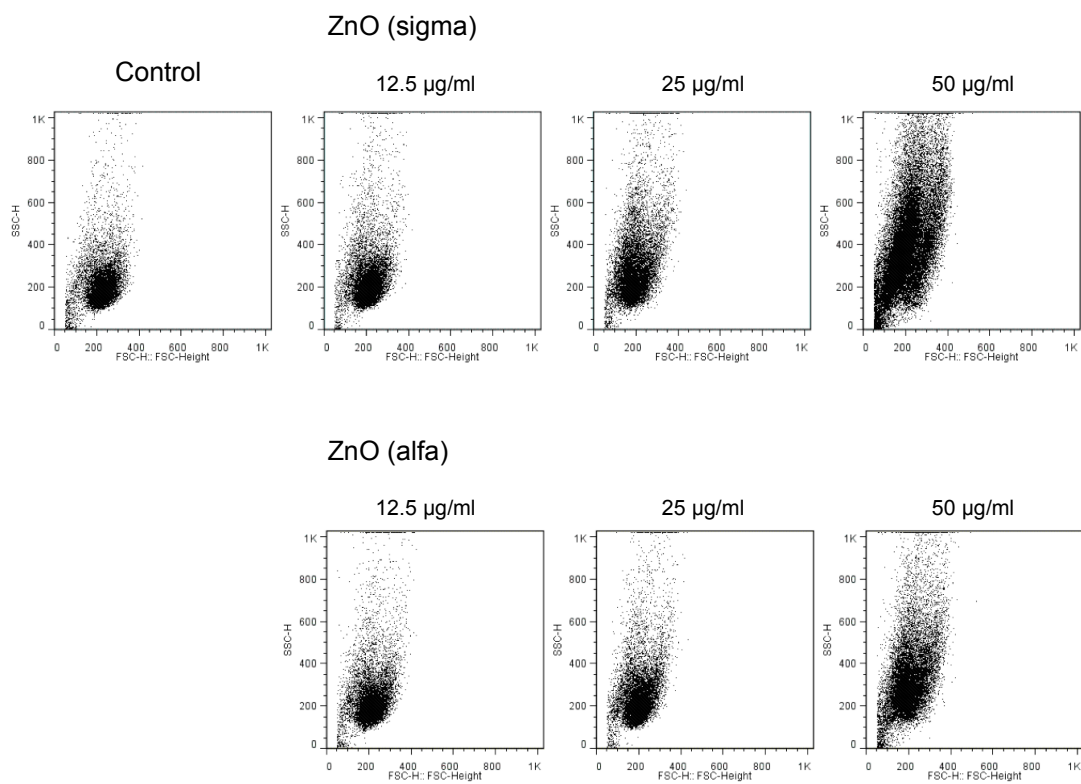


図7 酸化亜鉛ナノマテリアル処理48 h後のTHP-1細胞のFSC-SSC ドットプロット

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
ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析

研究分担者 花方 信孝 国立研究開発法人 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

本研究は、非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子の肺上皮細胞A549への曝露実験で、網羅的miRNA発現解析を行い、そのクラスタリング解析から、ナノマテリアルにより変動する特徴的なmiRNA群を認めた。特に、曝露72時間において、磁性粒子の修飾の有無はmiRNAの発現に大きな影響を及ぼすことがわかった。これらのmiRNAは、曝露マーカーとしての可能性に加え、磁性ナノ粒子による肺上皮細胞の分子応答解析のための手がかりになると考えられる。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露の*in vitro*における影響に関しては、細胞の生死あるいは細胞内の特定酵素の活性が細胞毒性の指標となっている。しかしながら、ナノマテリアル曝露に細胞毒性が観察された場合、その毒性がどのような細胞機能に影響するのか、その分子機構に関する詳細な解析は行われていない。たとえば、ナノマテリアルが細胞内で活性酸素を発生させ、その活性酸素が細胞毒性を誘導するという報告は多いが、活性酸素が細胞機能にどのような影響を及ぼし、どのように生理状態が変化するのかに関しては詳しくわかっていない。

本研究では、近年、様々な遺伝子の制御因子として注目されているmicroRNA(miRNA)が、ナノマテリアルに曝露された細胞でどのように変化するのかを解析することによって、ナノマテリアル曝露のマーカーとしてのmiRNAを探索するとともに、同定されたmiRNAが制御する遺伝子を探索し、ナノマテリアルの細胞毒性に関する分子応答機構についての情報を得ることを目的とする。

B. 研究方法

非修飾/カルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$)を A549 細胞に 24 時間あるいは 72 時間曝露し、RNA を回収した後、Agilent G4870A SurePrint G3 Human v16 miRNA 8x60K Microarray Kit にて miRNA の発現を解析した。アレイ上の各スポットの蛍光強度は Agilent G2600D SureScan Microarray Scanner により計測し、Agilent Feature Extraction v11.5 によって数値化した。

なお、それぞれの曝露サンプルは、以下のようにサンプル名を付した。

C-24h : NPs で曝露せずに 24 時間培養した細胞

NM100-24h : 修飾していない (non-modified) NPs を 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞

NM200-24h : 修飾していない (non-modified) NPs を 200 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞

M100-24h : 修飾した (modified) NPs を 100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞

M200-24h : 修飾した (modified) NPs を

200 µg/ml の濃度で 24 時間曝露した細胞
C-72h : NPs で曝露せずに 72 時間培養した細胞

NM200-72h : 修飾していない (non-modified) NPs を 200 µg/ml の濃度で 72 時間曝露した細胞
M200-72h : 修飾した (modified) NPs を 200 µg/ml の濃度で 72 時間曝露した細胞

C. 研究結果

miRNA マイクロアレイから得られたデータにおいて、シグナルが検出されなかった miRNA は発現していないと仮定して、シグナル強度を 0 とした。シグナル強度はサンプル間の誤差が含まれている可能性があるため、グローバルノーマライゼーションにより各サンプルのシグナル強度を補正した。

全 1374 個の miRNA のうち、1 つ以上のサンプルでシグナルが検出された miRNA は 118 個あった。これらについて階層型クラスタリングを行い、heat map と clustering tree を作成した (図 1a, b)。この miRNA 発現パターンの類似性から推測されたサンプルの clustering tree において、2 つの大きなグループが検出された。ひとつは C-24h、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなり、もう一方は NM200-72h、C-72h、M200-72h からなっていた (図 1b)。すなわち、前者は、NPs の曝露の有無にかかわらず培養後 24 時間経過した細胞のグループであり、後者は NPs の有無にかかわらず培養後 72 時間経過した細胞のグループである。これは、118 個の miRNA の発現パターンに最も大きな影響を与えている因子が、NPs ではなく培養時間であることを意味している。24 時間培養した細胞グループにおいては、C-24h が単独でグループを形成し、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなるグループとは分離している。これは、培養 24 時間後において、

NPs に曝露された細胞の miRNA の発現パターンが、曝露されていない細胞の発現パターンとは異なっていることを示している。さらに、NM100-24h、NM200-24h、M100-24h、M200-24h からなるグループは、NM100-24h と NM200-24h からなるグループと M100-24h、M200-24h からなるグループに分かれている。このことから非修飾 NPs と修飾 NPs に曝露された細胞での miRNA 発現パターンは異なるが、これらの NPs の濃度の違いは miRNA の発現パターンに大きな影響を及ぼさないことが推測された。一方、72 時間培養したグループにおいては、C-72h と M200-72h がグループを形成し、NM200-72h とは分離していた。これは、培養後 72 時間において、修飾 NPs に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは NPs に曝露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾 NPs に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは NPs に曝露されていない細胞とは異なることを意味している。

次に、特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した (図 1a)。Cluster-1 は、has-miR-1274_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している (図 2, 表 1)。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている (図 2, 表 2)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている (図 2, 表 3)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞

で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時間暴露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった (図 2, 表 4)。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

D. 考察

クラスタリングの結果、曝露細胞の miRNA の変動は、72 時間の曝露においてカルボキシル基による修飾の有無に影響されることが明らかとなり、この修飾が細胞毒性の大きさと関連することが示唆された。本研究で得られた miRNA 群が、どのような遺伝子の発現を制御しているのかを見出すことができれば、磁性ナノ粒子によって影響を受ける分子応答についての情報を得ることができると考えられる。今後は、カルボキシル基の修飾の有無と細胞毒性により影響を受ける miRNA の絞り込みを行い、マーカーとなる miRNA の選択を試みる。

F. 研究発表

1. 論文発表

(1) N. Hanagata, H. Morita. Calcium Ions Rescue Human Lung Epithelial Cells from the

Toxicity of Zinc Oxide Nanoparticles, *J. Toxicol. Sci.*, 2015, 40(5), 625-35.

(2) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R. A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model, *Int. J. Nanomed.*, 2015, 10, 6105-19.

2. 学会発表

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

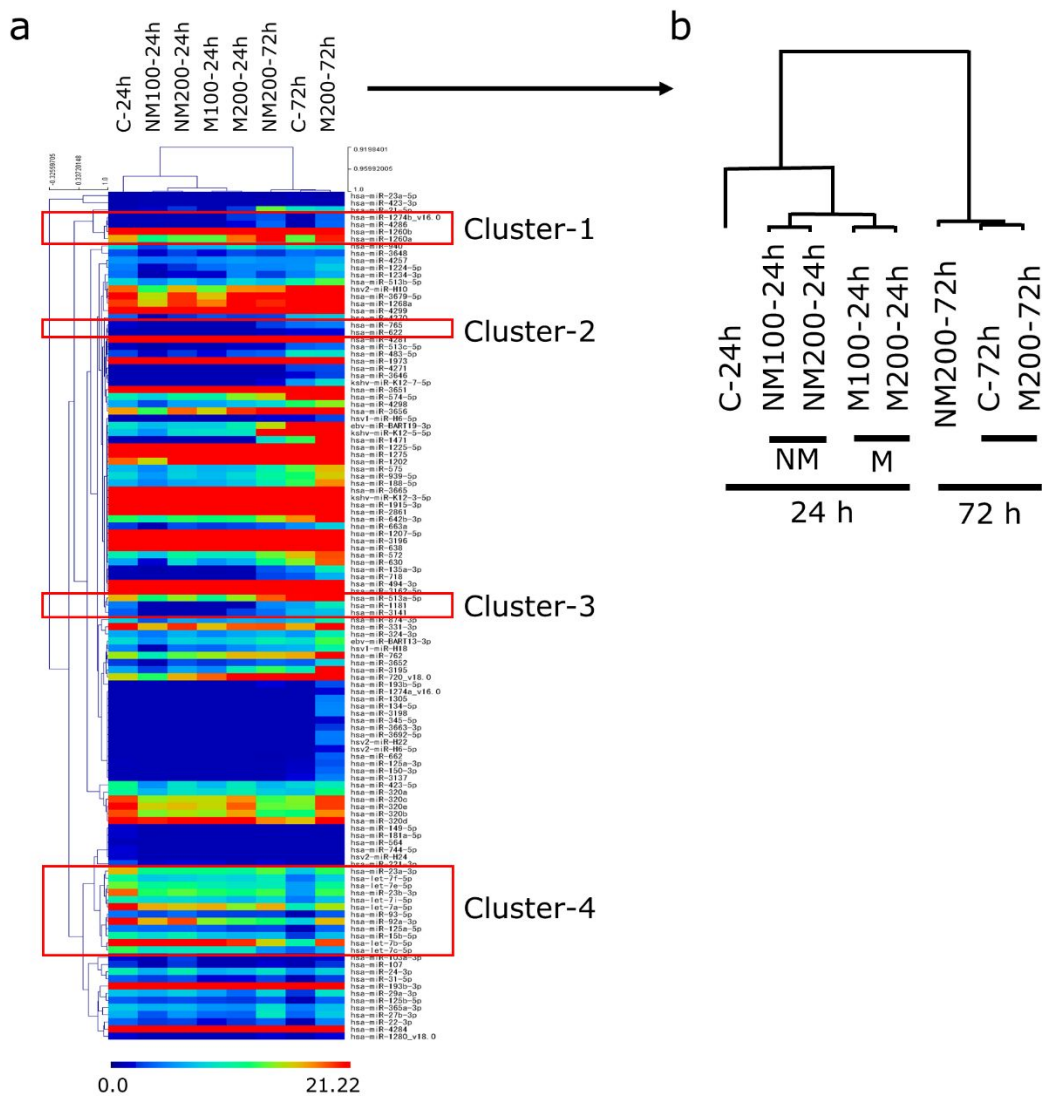


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリーとヒートマップ

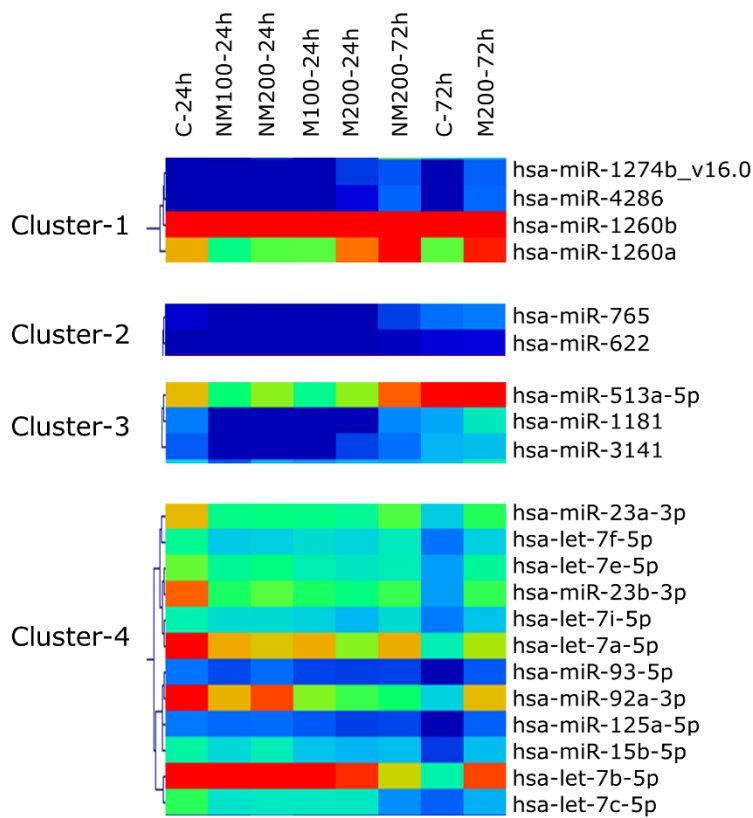


図 2 . それぞれのクラスターのヒートマップとクラスターを構成する miRNA

表 1 Cluster-1 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-1274b_v16.0	ND	ND	ND	ND	2.4	ND	3.3	3.7
hsa-miR-4286	ND	ND	ND	ND	2.2	ND	3.9	4.0
hsa-miR-1260b	31.3	24.9	33.2	30.5	42.8	31.7	57.1	51.8
hsa-miR-1260a	17.1	11.7	13.6	13.7	18.5	13.7	21.2	20.3

ND, not detected

表 2 Cluster-2 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-765	1.8	ND	ND	ND	ND	4.2	2.6	4.7
hsa-miR-622	ND	ND	ND	ND	ND	2.1	1.4	2.1

ND, not detected

表 3 Cluster-3 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100 -24h	NM200 -24h	M100 -24h	M200 -24h	C-72h	NM200 -72h	M200 -72h
hsa-miR-513a-5p	16.7	12.1	14.6	11.4	14.7	20.7	18.9	26.9
hsa-miR-1181	4.7	ND	ND	ND	ND	6.3	5.1	9.7
hsa-miR-3141	3.5	ND	ND	ND	2.7	6.8	4.2	7.3

表 4 Cluster-4 に含まれる miRNA の補正した蛍光強度（発現量）

Systematic Name	Normalized signal intensity (linear scale)							
	C-24h	NM100-24h	NM200-24h	M100-24h	M200-24h	C-72h	NM200-72h	M200-72h
hsa-miR-23a-3p	16.7	11.6	11.8	11.7	11.1	8.0	13.5	12.9
hsa-let-7f-5p	11.2	7.8	8.1	8.9	8.3	4.4	9.8	8.2
hsa-let-7e-5p	13.9	11.1	11.7	10.2	9.4	5.9	9.9	11.0
hsa-miR-23b-3p	18.8	12.7	13.7	12.7	11.9	5.8	13.2	13.1
hsa-let-7i-5p	10.2	8.8	8.7	8.2	7.0	4.6	8.8	7.5
hsa-let-7a-5p	21.8	17.2	16.5	17.1	14.5	10.0	17.1	15.2
hsa-miR-93-5p	4.4	3.0	4.1	2.7	2.6	ND	2.7	3.4
hsa-miR-92a-3p	21.2	16.9	19.4	14.4	13.2	8.2	12.5	16.7
hsa-miR-125a-5p	4.6	4.1	4.1	3.5	2.7	ND	2.8	3.8
hsa-miR-15b-5p	10.7	8.6	9.9	7.5	6.9	2.4	7.3	7.2
hsa-let-7b-5p	28.0	21.9	21.0	21.8	19.9	10.4	16.0	19.5
hsa-let-7c-5p	12.9	9.2	9.6	9.5	9.5	3.7	5.4	6.6

ND, not detected

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

細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

研究分担者	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	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
研究協力者	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	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

我々はこれまで NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた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の調製法を開発し、NiO ナノマテリアルの細胞毒性に対する二次粒子径サイズの影響評価を行ってきた。本研究ではその調製法を利用し、3 種類のナノマテリアル[NiO-Sigma（一次粒子径: <50 nm）、NiO-Alfa（同: 100 nm）および Ni-Alfa（同: 5-20 nm、表面が酸化皮膜で覆われ NiO として利用可能）]を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。その結果、ミリ Q 水で調製された懸濁原液では、その濃度が 10 mg/mL の場合には NiO-Sigma では問題なかったが、NiO-Alfa および Ni-Alfa は調製後速やかに凝集した。一方、1 mg/mL では NiO-Sigma および Ni-Alfa で懸濁原液の調製が可能であった。また、粉碎に径の異なる 3 種類のジルコニウムボール（0.5 mm、0.1 mm および 0.05 mm）を用いることによって、各ナノマテリアルについて二次粒子径サイズの異なる懸濁原液が調製できた。そして、それらのうち 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma および Ni-Alfa 懸濁原液を 10%FBS-MEM で希釈した懸濁液（0.2 mg/mL）では、ナノマテリアルの二次粒子径サイズおよび粒径分布が同程度となり、本研究で目的としたナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。今後は、これらの懸濁液を用いた細胞毒性試験を実施し、一次粒子径サイズが NiO ナノマテリアルの細胞毒性に与える影響について検討していく予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一次粒径が 100 nm 未満と一般的に定義される¹⁾。そして、これまでに種々のナノマテリアルが開発され、工業製品、塗料、化粧品、触媒など様々な分野の製品に使用されてきた。

一方で、ナノマテリアルまたはナノマテ

リアルを用いた製品の製造時に、作業員がナノマテリアルに曝露される可能性や、製品中に含有されるナノマテリアルに消費者が曝露され、ナノマテリアルに特有の毒性の発現が懸念されている^{2,3)}。

このような背景から、様々な *in vivo* ならびに *in vitro* 試験系において、ナノマテ

リアルな安全性が研究され、一部のナノマテリアルについては、化学組成、サイズ、物性等に依存した生体影響が確認されている⁴⁾。しかし、これまでに行われてきたナノマテリアルの生体影響に関する研究について、ナノマテリアルのキャラクタリゼーションが不十分なために、研究者の経験則に基づいた試験が行われ、異なる実験室間で得られた結果を比較することが難しい事が指摘されている⁵⁾。そして、ナノマテリアルの安全性評価については、試験法や評価基準などが明確でなく断片的な試験結果の集積に留まっているとして、ナノマテリアルの *in vitro* 試験法の開発が必要とされている⁶⁾。このような背景から、欧州委員会 (European Commission) の共同研究センター (Joint Research Centre) ではコロニー形成試験法によるナノマテリアルの細胞毒性試験について多機関共同試験による評価が実施されており、ナノマテリアルの統一的な毒性試験方法の検討が進んでいる⁷⁾。

金属酸化物ナノマテリアルは工業材料や消費生活製品材料として開発されており、ZnO、SiO₂ および TiO₂ 等は化粧品や塗料等に用いられている⁶⁾。これら金属酸化物ナノマテリアルに関して、様々な *in vitro* 試験が行われている。例えば、Yuan らは一次粒子径サイズの異なる SiO₂ ナノ粒子による細胞毒性試験を行い、一次粒子径の違いが細胞毒性に影響を及ぼすことを明らかにしている⁸⁾。また、*in vivo* 試験では、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる TiO₂ ナノ粒子によるラット気管内投与試験で、二次粒子径サイズが異なっても炎症反応に差異は認められないことが報告されている⁹⁾。

このように、個々の金属酸化物ナノマテリアルの物性が毒性試験の結果に影響を及ぼすことから、毒性試験にはその物性情報として、状態 (粒子径・粒径分布・凝集

体・形状)、材料 (化学組成・結晶性・表面組成・純度)、周囲に影響する因子 (表面積・表面化学特性・表面荷電) の 3 点に加え、安定性、培地の影響および適切な用量計測での評価が求められている⁵⁾。

我々はこれまでに、金属酸化物ナノマテリアルの培養細胞試験系における細胞応答に及ぼすナノマテリアルの影響の解明を目的として、培養細胞試験系に用いる金属酸化物ナノマテリアル懸濁液の調製方法の検討とその物性解析を行ってきた¹⁰⁾。そして、NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型粉碎機の粉碎ボール径を変えることで、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の調製法を開発した。さらに、それらの懸濁液について A549 細胞 (ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞) を用いた細胞毒性試験を実施し、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や、その要因が NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量に起因する可能性を明らかにしてきた。

一方で、前述のように金属酸化物ナノマテリアルの細胞毒性に一次粒子径サイズが影響していることが報告されている⁸⁾。そこで、本研究では NiO ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性について、一次粒子径サイズの影響を評価することを目的とした。本年度は、一次粒子径が異なり二次粒子径サイズが同程度の NiO ナノマテリアル懸濁液の作製を検討した。

B. 研究方法

B.1 ナノマテリアル

試験には Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma) 並びに Alfa Aesar 製の NiO およびニッケルナノマテリアル (NiO-Alfa および Ni-Alfa) を用いた。それらの性状等を表 1 に示した。Ni-Alfa については、業者のデータシートによれば、

表面から深さ 0.5 ~ 1.0 nm まで酸化被膜に覆われているとされており、NiO と同等に扱えるものと考えた。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm)、NiO-Alfa (100 nm) および Ni-Alfa (5-20 nm) であった。

B.2 ナノマテリアル懸濁液の調製

これまでに我々が開発した、遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた方法に従い懸濁液の調製を行った。粉碎機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉碎容器はジルコニア製であった。粉碎には、直径が 0.5、0.1 および 0.05 mm の三種類のジルコニアボールを用いた。始めに、金属酸化物ナノマテリアル試料 10 mg をジルコニア容器に量り採り、そこに Tween80 を 0.1% (w/v) 含む Milli-Q 水を 2.5 mL 加えた。次に、ジルコニアボールを 2.5 g 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 2000 rpm の条件で 2 分間粉碎を行った。その後、Milli-Q 水を 7.5 mL 加えた後、MILL/MIX モードで公転速度 400 rpm の条件で 1 分間混合し、懸濁原液 (1 mg/mL) を作製した。また、そのナノマテリアル懸濁液を 10% のウシ胎児血清 (Fetal bovine serum: FBS) を含む GIBCO 製 Minimum Essential Medium (MEM) を用いて希釈し、培地懸濁液を作製した。

これらの懸濁液について、大塚電子社製の ELSZ-2 を用い、ナノマテリアルの平均粒子径 (流体力学粒径) および粒径分布を動的光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) で、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザードップラー法) にて測定した。その際、平均粒子径は Cumulant 法で、粒径分布は Marquardt 解析法を用いたヒストグラム法でそれぞれ求めた。平均粒子径および粒径分布については同一試料を繰り返し 3 回測定した。Zeta 電位については、平

均粒子径を測定した後に同一試料を繰り返し 4 回測定して求めた。

B.3 各ナノマテリアル表面状態の確認

用いたナノマテリアルについて、NiO-Sigma および NiO-Alfa では外観 (色調) が異なっていること、Ni-Alfa については表面酸化被膜を確認する必要があることから、これらのナノマテリアルについてその表面状態を X 線光電子分光法 (XPS) にて分析した。分析には島津製作所製 ESCA-3200 を用いた。

C. 結果および考察

C.1 ナノマテリアルの表面状態

試験に用いた 3 種類のナノマテリアルの XPS 分析結果を図 1 に示した。どの試料についてもニッケルおよび酸素のピークが認められた。また、そのスペクトルも全て類似していたことから、Ni-Alfa を含め今回使用したナノマテリアルの表面はいずれも酸化ニッケルであることが確認できた。

C.2 各ナノマテリアル懸濁原液中の二次粒子径の平均粒子径および粒径分布

各ナノマテリアル懸濁原液の作製にあたって、これまで試験してきた NiO-Sigma と同様に NiO-Alfa および Ni-Alfa について、10 mg/mL での調製を試みた。その結果、どちらのナノマテリアル懸濁液も調製後、速やかに凝集し試験に供試できなかった。そこで、ナノマテリアル濃度を変えて検討した結果、Ni-Alfa については 1 mg/mL で懸濁液の調製が可能であった。一方、NiO-Alfa については、0.1 mg/mL でかつ用いるジルコニウムボールが 0.5 mm の条件でのみ、分散状態を維持した懸濁液の調製が可能であった (データ未掲載)。NiO-Sigma および Ni-Alfa について、1 mg/mL で調製した懸濁原液中ナノマテリアル粒子

の平均粒子径を表 1 に、粒径分布を図 2 にそれぞれ示した。

NiO-Sigma および Ni-Alfa は、どちらについてもこれまでの研究と同様に、粉碎に用いるジルコニウムボール径が小さくなるほど、懸濁液中ナノマテリアルの二次粒子の平均粒子径が小さくなる傾向が認められた。また、粒径分布についてもジルコニウムボール径が小さくなるほど、散乱強度分布および個数分布共にピークが粒径の小さい側に分布していた。このように、NiO-Sigma だけでなく Ni-Alfa についてもナノマテリアルの二次粒子径サイズが異なる懸濁液の作製できた。また、NiO-Sigma については、これまで 10 mg/mL で調製した懸濁原液に比べると、どのジルコニウムボール径を用いたときも、1 mg/mL で調製した懸濁液中のナノマテリアル粒子の方が平均粒子径は若干大きくなる傾向が認められた。

なお、今回調製した 1 mg/mL の懸濁原液については、分散状態はやや不安定であり、数時間から 1 日後には凝集・沈降が認められている。そのため、細胞毒性試験等に用いる際には、調製後速やかに培地で希釈する必要があると思われる。

C.3 各ナノマテリアル 10%FBS-MEM 懸濁液中の二次粒子径の平均粒子径および粒径分布

NiO-Sigma および Ni-Alfa 懸濁原液 (1 mg/mL) について、10%FBS-MEM にて 0.2 mg/mL に希釈し、平均粒子径および粒径分布への影響を検討した (表 1 および図 3)。全ての懸濁液で懸濁原液よりもナノマテリアルの平均粒子径は大きくなり、10%FBS-MEM による凝集の影響が考えられた。ただし、その平均粒子径は懸濁原液と同様に粉碎に用いたジルコニウムボール径が小さくなるにつれて小さくなる傾向を

示した。一方、粒径分布では散乱強度分布で NiO-Sigma および Ni-Alfa とともにピークが一部重なる傾向が認められた。また、個数分布でも Ni-Alfa では 0.1 mm と 0.5 mm でピークが重なっていた。

次に、10%FBS-MEM で希釈して調製した懸濁液を 37 で一日静置した後のナノマテリアルの平均粒子径および粒径分布を表 1 および図 4 に示した。懸濁液中ナノマテリアルの平均粒子径は NiO-Sigma では 0.05 mm で若干小さくなり、その他は若干大きくなる傾向を示した。一方、NiO-Alfa では一日後のほうが全て平均粒子径は小さくなり、その変化も NiO-Sigma よりも大きかった。ただし、その平均粒子径は粉碎に用いたジルコニウムボール径に応じた傾向を維持していた。また、粒径分布では Ni-Alfa の個数分布で調製直後と同様に 0.1 mm と 0.5 mm でピークが重なっていた。

本研究では、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の調製を目的としている。そこで、平均粒子径が同程度のジルコニアボール径 0.05 mm で調製された、NiO-Sigma および Ni-Alfa の 10%FBS-MEM 懸濁液について、粒径分布を比較してみた (図 5)。その結果、散乱強度分布および個数分布共にほぼピークが一致しており、ナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。

C.4 各ナノマテリアル懸濁液の Zeta 電位

NiO-Sigma および Ni-Alfa の懸濁原液および 10%FBS-MEM で調製した懸濁液中ナノマテリアルの Zeta 電位を表 1 および図 5 に示した。各懸濁原液中ナノマテリアルの Zeta 電位は正の値を示し、19.4 ~ 24.8 mV の範囲であった。一方、10%FBS-MEM 懸濁液では、全ての試料で負の値を示した。

この傾向は、これまでの研究でも認められており、懸濁液中のタンパク質が粒子に吸着した影響と考えられる¹¹⁾。

D. まとめ

我々はこれまでに、NiO ナノマテリアルを用いて、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の調製法を開発し、それを用いて NiO ナノマテリアルの細胞毒性に対する二次粒子径サイズの影響評価を行ってきた。本研究では、一次粒子径サイズの異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma、NiO-Alfa および Ni-Alfa) を用いて、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。その結果、一部の懸濁液ではナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズおよび粒径分布が同程度の懸濁液が調製できた。今後は、これらの懸濁液を用いた細胞毒性試験を実施し、一次粒子径サイズが NiO ナノマテリアルの細胞毒性に与える影響について検討していく予定である。

E. 謝辞

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) Ema M., Kobayashi N., Naya M., Hanai S., Nakanishi J.: Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials, *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010
- 3) Schmidt C.W.: Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ.*

- Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009
- 4) Dhawan A., Sharma V.: Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010
- 5) Boverhof D.R., David R.N.: Nanomaterial characterization: considerations and needs for hazard assessment and safety evaluation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 396, 953-961, 2010
- 6) 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
- 7) European Commission: JRC SCIENCE AND POLICY REPORTS “Interlaboratory comparison study of the colony forming efficiency assay for assessing cytotoxicity of nanomaterials”, 2014
- 8) Yuan H., Gao F., Zhang Z., Miao Lede, 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
- 9) 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
- 10) 河上強志・伊佐間和郎・宮島敦子・小森谷薫・加藤玲子: 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析, 平成 25 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)
- 11) 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

G. 研究発表

G.1 論文発表

なし

G.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, 金沢市, 2015年6月

3. Miyajima-Tabata, A., Kawakami T., Komoriya K., Kato R., Niimi S., Isama K. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016

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. 実験に用いたナノマテリアルの製造(販売)先、一次粒子径および外観(色)

試料	略名	製造(販売)先	一次粒子径 ^a (nm)	外観(色) ^a
酸化ニッケル	NiO-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
	NiO-Alfa	Alfa Aesar	100	緑色
ニッケル	Ni-Alfa	Alfa Aesar	5-20	シルバークレー

^a 各メーカーカタログより(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)

表2. 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^a

ナノマテリアル ^b	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)	
	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)
(0.05 mm)	149.9 ± 3.2	249.1 ± 9.1	19.8 ± 0.1	-11.7 ± 0.6
	1day	229.2 ± 19.6		
NiO-Sigma (0.1 mm)	216.7 ± 8.7	266.1 ± 4.5	24.8 ± 0.4	-10.7 ± 0.2
	1day	323.7 ± 13.3		
(0.5 mm)	329.2 ± 5.8	405.6 ± 22.0	19.4 ± 0.5	-9.7 ± 0.7
	1day	424.3 ± 57.7		
(0.05 mm)	192.4 ± 6.4	246.9 ± 22.0	22.8 ± 0.6	-8.4 ± 0.4
	1day	176.7 ± 2.2		
Ni-Alfa (0.1 mm)	280.0 ± 4.7	361.2 ± 33.5	23.6 ± 0.7	-13.8 ± 0.4
	1day	262.3 ± 15.5		
(0.5 mm)	357.7 ± 17.2	436.2 ± 89.4	22.1 ± 1.4	-10.8 ± 0.2
	1day	313.8 ± 16.7		

^a 1day: 37 °C で一日放置後

^b カッコ内は粉碎に用いたジルコニウムボールの粒子径

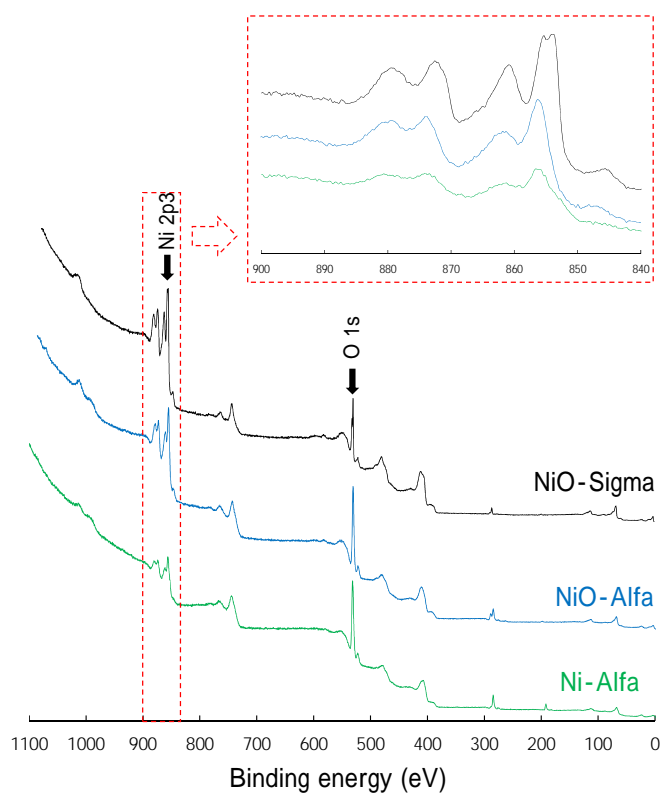


図 1. ナノマテリアルの XPS スペクトル

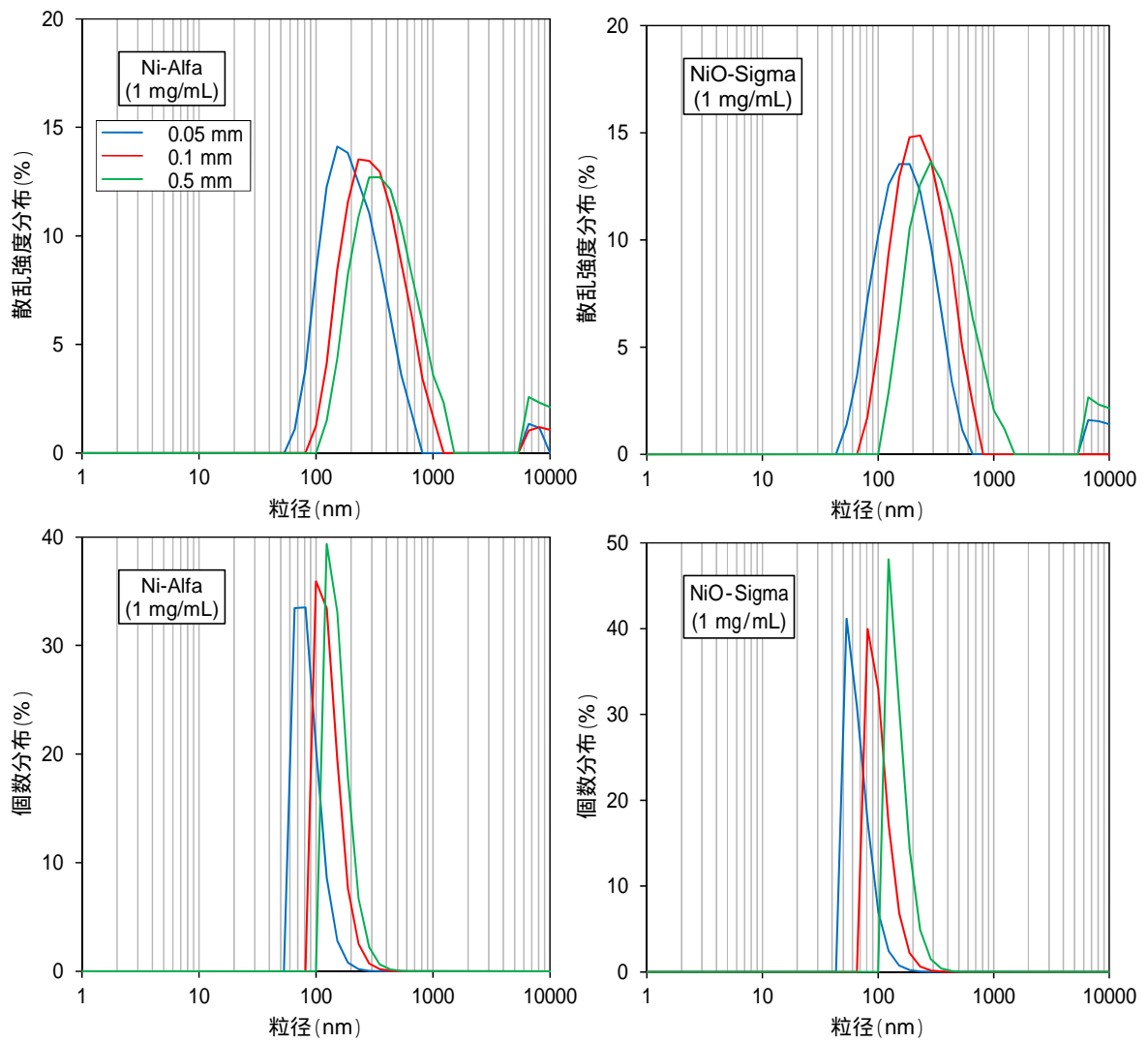


図 2.Ni-Alfa および Ni-Sigma 懸濁原液 (1 mg/mL) の粒径分布
 (上 : 散乱強度分布、下 : 個数分布)

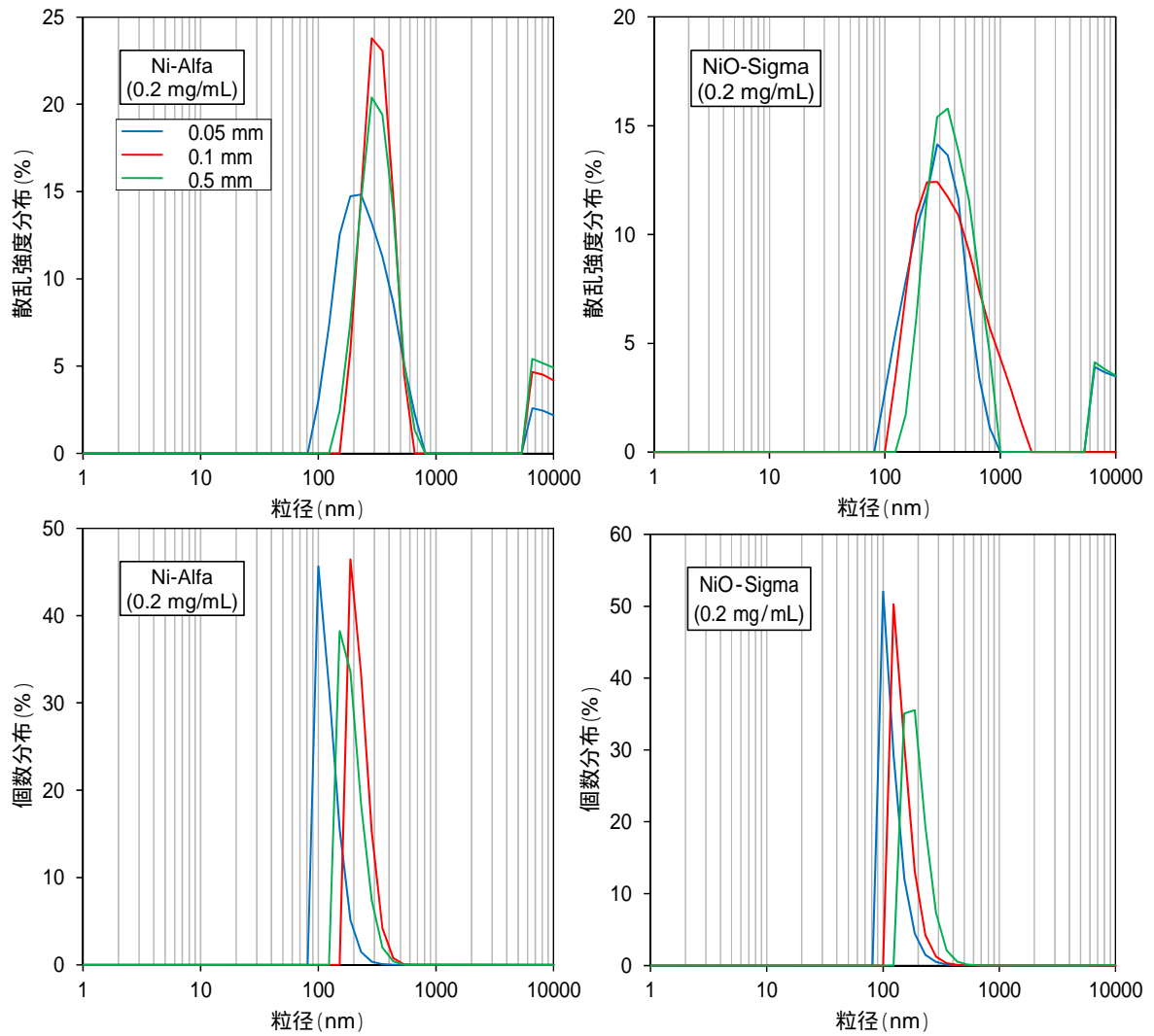


図 3. Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

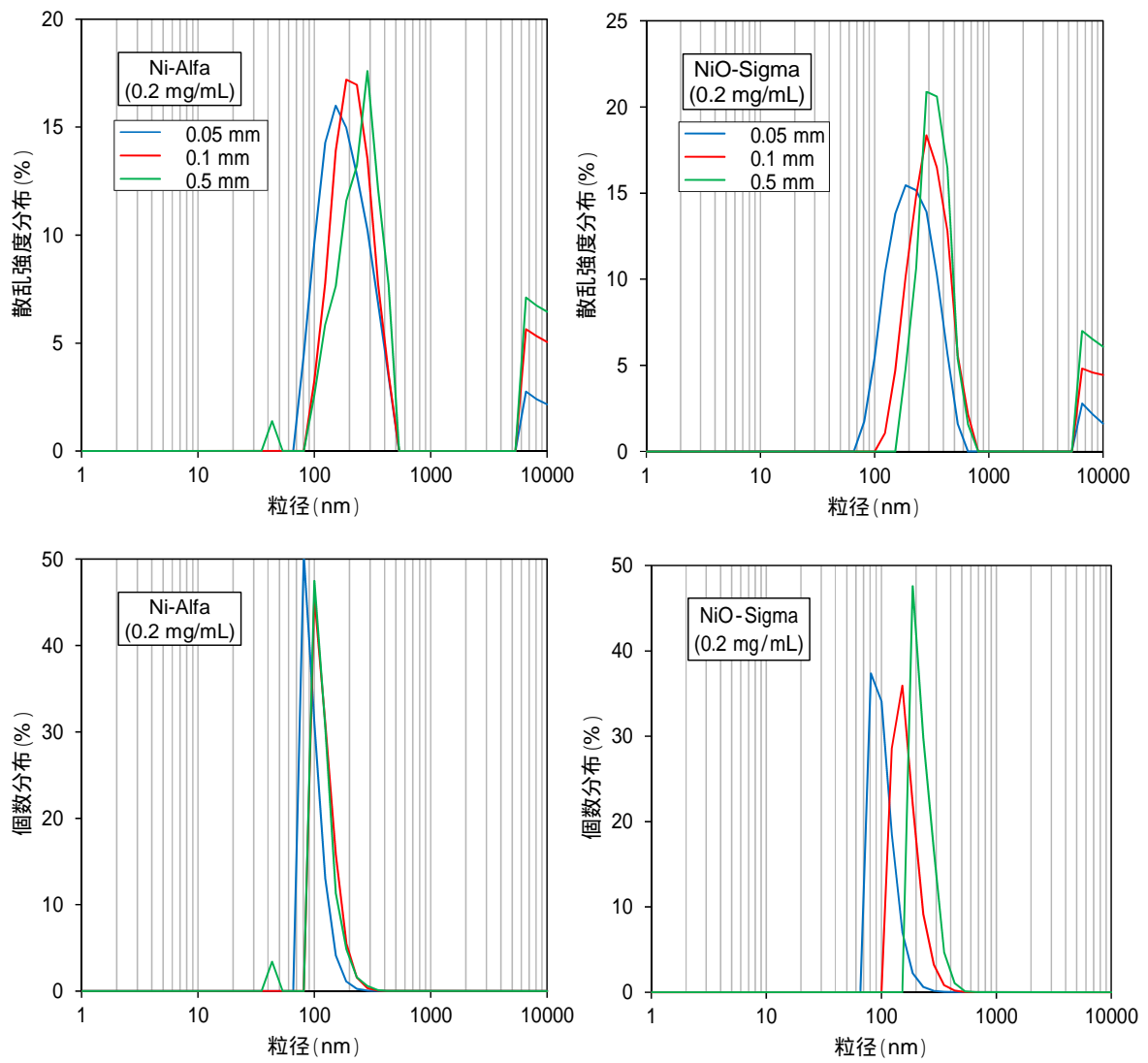


図 4.37 で 1 日静置後の Ni-Alfa および NiO-Sigma の
 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布
 (上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

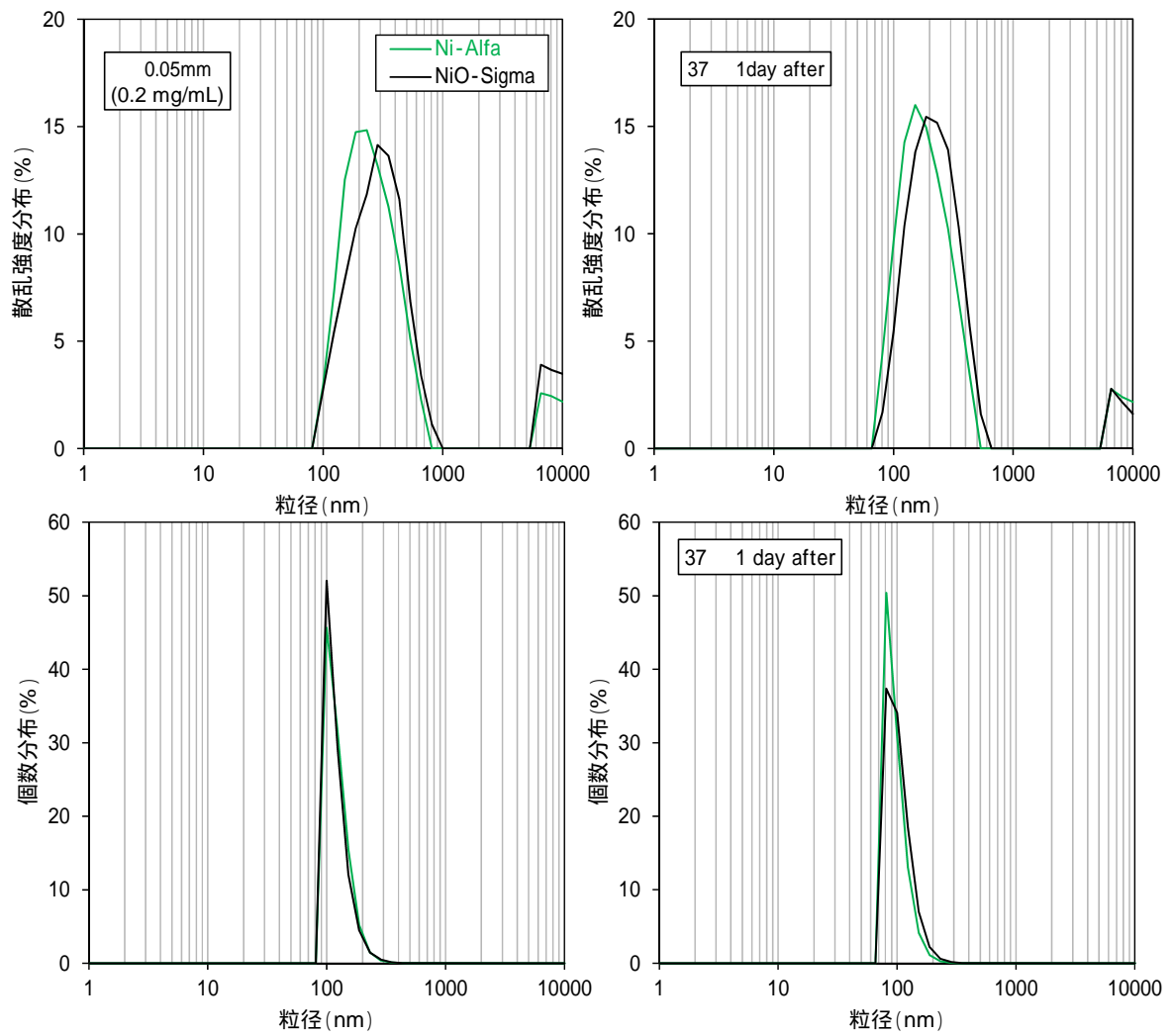


図 5. 粉碎に 0.05 mm のジルコニアボールを用いた Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液の調製後（左）および 37 で 1 日静置後（右）の粒径分布（上：散乱強度分布、下：個数分布）

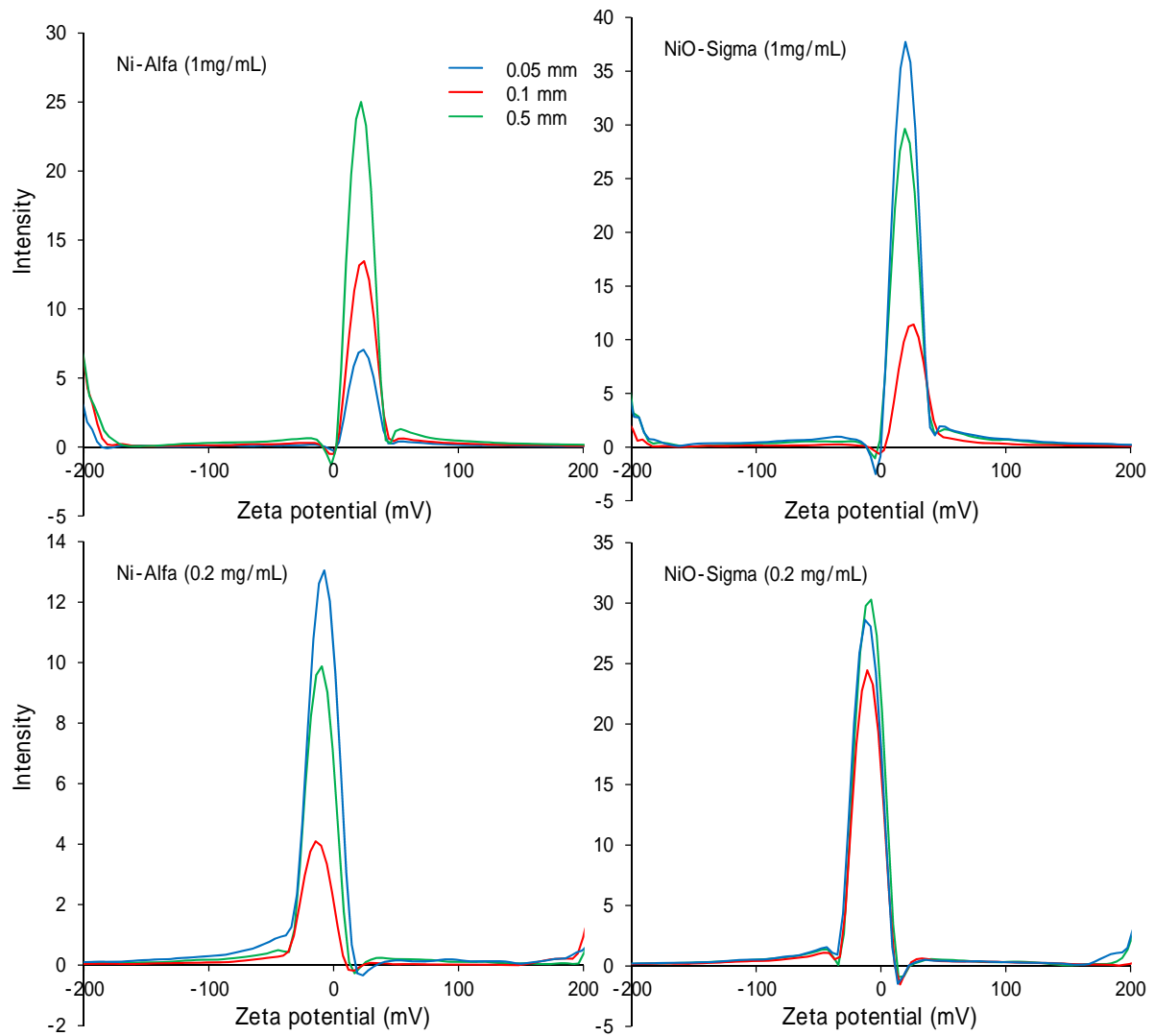


図 6. Ni-Alfa および NiO-Sigma の懸濁原液および 10%FBS-MEM 懸濁液の Zeta 電位

III. 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo.	Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy.	Jitendra Naik	Nano Based Drug Delivery.	IAPC-OBP	Croatia	2015	547-55

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai.	Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis.	J. Biol. Chem.	291(1)	72-88	2016
T.Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H.	AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mnl-xZnxFe ₂ O ₄ nanoparticles for hyperthermia treatment.	J. Appl. Phys.	117	17D157	2015

Tada, Y. Hamada, M. Takano, N. Ohuchi, Y. Ichiyanagi.					
Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura.	Adipocyte-derived monocyte chemotactic protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity.	Prostate	75(10)	1009-19	2015
K.Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo.	Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy.	Adv. Funct. Mater.	26(11)	1708-18	2016
K. Ishino, T. Kato, M. Kato, T. Shibata, M. Watanabe, K. Wakabayashi, H. Nakagama, Y. Tostuka.	Comprehensive DNA auct analysis reveals pulmonary inflammation response contributes to genotoxic action of magnetic nanoparticles.	Int. Mol. Sci.	16(2)	3474-92	2015
M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori,	Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc	Cancer Sci.	106(11)	1499-505	2015

W. Onuma, K. Ishino, Y. Tostuka, K. Fujimoto, M. Mutoh.	mutant Min mice.				
N. Hanagata, H. Morita.	Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles.	J. Toxicol. Sci.	40(5)	625-35	2015
L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R. A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata.	Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model.	Int.J.Nanomed.	10	6105-18.	2015
岩崎有由美, 岡本大樹, 遠藤宣弘, 渡邊昌俊.	前立腺癌治療へのナノ粒子の応用	医学のあゆみ	252(4)	303-8	2015

IV. 研究成果の刊行物・別刷