

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 28 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 29 (2017) 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 幸壹朗	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・予防研究分野 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 技術開発・共用部門 副部門長
河上 強志	国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 室長

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および機能解析 15
渡邊 昌俊
2. ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーション 25
林 幸彦朗
3. 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 33
戸塚 ゆ加里
4. 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築 37
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 48
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 59
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 65
河上 強志

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 77

IV. 研究成果の刊行物・印刷 83

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。平成28年度（3年計画の2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。異なる一次粒子径の酸化ニッケルナノ粒子を同程度の二次粒子径あるいは同程度の一次粒子径で異なる二次粒子径の懸濁液による細胞毒性への影響やナノ粒子の分散性に重要な役割を果たす分散剤の毒性を排除するナノ粒子の製造法の開発を行った。多層カーボンナノチューブに対する *in vivo* および共培養システムによる *gpt* 遺伝子を指標とした遺伝毒性試験より、*in vivo* 系のデータとの比較により共培養系の妥当性および多層カーボンナノチューブの長さに影響されない可能性がある事が認められた。さらに、3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、いくつかの考慮すべき点が存在するが、皮膚組織のナノ粒子侵入に対する抵抗性が認められた。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発現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が、酸化鉄ナノ粒子曝露マーカーとしての解析は検討を要する点も認めた。A549細胞の切片担体培養系の使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無のみならず、細胞側の活性酸素種に対する抵抗性との複合的関わりを明らかにした。

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・予防研究分野 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 技術開発・共用部門 副部門長
河上 強志 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：

小森谷 薫 国立医薬品食品衛生研究所 医療機器部
比留間 瞳 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
美谷島 克宏 東京農業大学応用生物学部食品安全健康学科 准教授
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、(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 28 年度、(1)毒性を有する界面活性剤を用いないナノ粒子の新規作製法及び形態変化をもたらす新規作製法の開発、(2)異なる一次粒子径のナノ粒子による同程度の二次粒子径の懸濁液の細胞毒性評価および一次粒子径が同じで二次粒子径が異なるナノ粒子の懸濁液による細胞毒性および免疫応答解析、(3)*in vivo* および共培養システムによる遺伝毒性試験、(4)3D ヒト皮膚再構成系におけるナノ粒子の表皮傷害性と表皮侵入性の解析、(5)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、(6)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ーゼーション(林)：

金(Au)、銀(Ag)ナノ粒子(NPs)の界面活性剤を使用しない作製法および酸化チタンの新しい形状の作製法の開発を行った。
hexadecyltrimethylammonium bromide

(CTAB)を用いずに塩化金酸水溶液または硝酸銀水溶液にシステインを溶解した。この溶液に氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液を加え、超音波処理を行い、作製した。また、酸化チタンの合成では、加水分解・縮合速度や構造が異なる次の 5 つの化合物を用いて、尿素およびウレアーゼ水溶液に加え、60 以下で最長 3 日間反応させ、作製した。尿素濃度は、1.2 ~ 19.2 mg/mL とし、ウレアーゼ濃度は 5 ~ 10 mg/mL とした。

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 (NiO) NPs による同程度の二次粒子径の懸濁液の細胞毒性評価を行った。NiO NPs (Sigma、一次粒子径 < 50nm) および Ni NPs (Alfa Aesar 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。A549 細胞に 48 時間これら懸濁液を添加し、その後 MTS 法で毒性評価を行った。

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)：

一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル(NiO) NPs の懸濁液による A549、THP-1 の細胞毒性および THP-1 細胞の免疫応答解析を行った。酸化ニッケル NiO (Sigma-Aldrich)は粉碎用ジルコニアボールを用いて、二次粒子径の異なる懸濁液を作製した。MTS 法で、細胞毒性を評価した。THP-1 細胞の細胞表面マーカーの測定や培養液中のサイトカインの測定を Flow Cytometry で行った。

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) :

in vivo 遺伝毒性試験

10 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)の懸濁液の気管内反復投与を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを安楽死後、肺を摘出し、*gpt* 遺伝子解析に用いた。

共培養システムによる遺伝毒性試験

GDL1 細胞を播種して 24 時間培養した後、ThinCert™ 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。MWCNT-L 及び MWCNT-S を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に突然変異の解析に用いた。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験

MWCNT-L 及び MWCNT-S を曝露した組織、細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組替え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組替え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37°C で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

5) 3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築 (中江) :

LabCyte EPIモデル (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) を用いた3Dヒト皮膚再構成系においてシステイン水溶液を媒体としたAu NPsおよびAg NPsの懸濁液を調整および曝露し、LDH assayにより表皮傷害性と病理組織学的に表皮侵入性について、ヒト肝細胞癌由来のHepG2細胞を用いた単層培養系において、LDH assayおよびNR assayにてAu NPsおよびAg NPsの細胞傷害性を解析した。

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):

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および機能解析(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 : A549細胞の切片担体培養の条件設定後、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。曝露実験でのCM-H₂DCFDAの使用により活性酸素種(ROS)の発生及びAlamar Blue assayを用いて細胞生存率を測定した。

ナノマテリアルの細胞内動態および機能解析 : 前立腺癌細胞株DU145、LNCaP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、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞内局在を観察した。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-H₂DCFDAを使用した。また、GSH-Glo™ Glutathione assayを用いて、細胞内のGSHの検出、定量化を行った。

(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って行った。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)に準じて行った。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った。

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:

CTAB の代わりに低毒性アミノ酸であるシステインを用いることで 2 mg/mL の金ナノ粒子および銀ナノ粒子水分散液の作製に成功した。原料として titanium(IV)chloride を用い、ウレアゼ濃度 5.0 mg/mL、尿素濃度 9.6 mg/mL とし、アンモニア水、ドデカン、エタノール、hexadecyltrimethylammonium bromide 水溶液を混合し、超音波処理を行って作製したエマルジョン中での酸化チタンナノ粒子の合成反応は、水溶液中での反応と異なり、bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium を原料として用いた場合のみ、中空ナノ粒子が得られ、その他の原料では球状粒子が得られた。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析:

NiO-Sigma には、数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在していた。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。NiO-Sigma の各試料の半数致死濃度 (IC_{50}) は、調製に用いたジルコニアボール径 0.5、0.1 及び 0.05 mm

の試料で 23.1、29.3 及び 39.0 $\mu\text{g/mL}$ であった。NiO-Sigma については、ジルコニアボール径が 0.1 mm 及び 0.05 mm の試料では差が認められず、0.5 mm の試料では他に比べてやや細胞毒性が強くなる傾向を示した。

Ni-Alfa に関しては、各試料の IC_{50} は調製に用いたジルコニアボール径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 18.9、24.0 及び 32.6 $\mu\text{g/mL}$ であった。Ni-Alfa については、各濃度でのデータのばらつきが大きく、二次粒子径サイズが細胞毒性に及ぼす影響については評価できなかった。

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:

A549 および THP-1 細胞に関する細胞毒性試験では、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に認められた。CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、NiO 用量依存的に上昇が観察され、NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ で 783~883 %であったが、NiO 二次粒子径による差異は認められなかった。一方、CD86 の RFI は NiO 処理により NiO 50~200 $\mu\text{g/mL}$ まで NiO 用量依存的な上昇が観察され、その RFI の程度は NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ で 216~260 %であった。NiO 処理により培養上清中の IL-8、IL-1 β 、TNF の上昇が観察された。IL-6、IL-10、IL-12p70 は検出限界未満であった。IL-8 産生量は、NiO 200 $\mu\text{g/mL}$ 及び 400 $\mu\text{g/mL}$ で顕著に観察され、400 $\mu\text{g/mL}$ 処理群の方が産生量が多かった。IL-1 β 及び TNF 産生量は NiO 用量依存的に上昇が観察され、IL-1 β は、NiO (粉碎ジルコニアボールの直径 0.5mm) 400 $\mu\text{g/mL}$ において産生量が高かった。TNF 産生量は、NiO (直径 0.5 mm) 200, 400 $\mu\text{g/mL}$ において、NiO (直径 0.05 mm) に比べると産生量が高かったが、IL-8, IL-1 β , TNF のいずれのサイトカインにおいても、NiO の二次粒子径の差異は影響しなかった。

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：

in vivo 遺伝毒性試験

繊維長の異なる MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性試験から検討を行った。解析の結果、MWCNT 投与により肺の変異頻度は溶媒対象群(2% CMC)に比べて約 3~4 倍に上昇したが、繊維長の違いによる変異頻度に対する影響は観察されなかった。次に、繊維長の異なる MWCNT による変異パターンを解析した。また、変異クローンの解析数が少ないが、コントロールの変異パターンと比較して、MWCNT 投与により G:C→A:T 変異が上昇する傾向が観察された。また、変異頻度と同様に、繊維長の違いによる変異スペクトルへの影響はほとんど観察されなかった。

共培養システムによる遺伝毒性試験

MWCNT の RAW のみ、及び RAW と GDL1 の両細胞への暴露群ともに、コントロールと比較して変異頻度の上昇傾向が観察された。また、この時に観察された変異頻度に対して、MWCNT の繊維長の違いは影響していないことがわかった。

5) 3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築：

金属ナノ粒子の表皮傷害性および表皮内侵入性

Au NPs については、最終濃度 1・3・7・15・31・62.5・125・250・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay の結果、Au NPs は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった。また、HE 染色および金染色の病理組織学的検索では、Au NPs は表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図 3)。

Ag NPs については、最終濃度 31・125・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度

2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay の結果、Ag NPs は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった。また、HE 染色および銀染色の病理組織学的検索を行った結果、Ag NPs は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。

単層培養系における金属ナノ粒子の細胞傷害性

Au NPs については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay および NR assay による細胞毒性解析を行った結果、Au NPs は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

Ag NPs については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。LDH assay および NR assay による細胞毒性解析を行った結果、Ag NPs は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

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：

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 103~166 個であった。各曝露条件において、いずれか 1 つ以上の条件でシグナル強度が得られた miRNA プローブは 68 個あり、この 68 個について階層的クラスタリングを行なった。培養 24 時間後において、磁性ナノ粒子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を示した。非修飾磁性ナノ粒子と修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞での miRNA 発現パターンは異なるが、これらの磁性ナノ粒子の濃度の違いは 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。培養後 72 時間に

において、修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞とは異なることを示した。磁性ナノ粒子の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で発現量がコントロールに比べて変動した miRNA のリストを作成したが、磁性ナノ粒子の影響が顕著に反映されている miRNA を見出すことは困難であったが、昨年度のリストとの比較から miR-1260b が昨年度と同様の傾向を示すことが見出された。

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：

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

肝および肺組織切片担体培養における A549 の細胞密度の経時変化より、肝あるいは肺組織切片担体培養において、アセトン固定かつ切片の厚さが 4 μm で実験を行う事に決定した。吸光度の測定値から直接算出した生存率は、スライド上非曝露群が $100.0 \pm 2.96\%$ 、スライド上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $105.5 \pm 4.11\%$ 、肺切片担体上非曝露群が $97.0 \pm 3.57\%$ 、肺切片担体上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $104.5 \pm 5.28\%$ 、肝臓切片上非曝露群が $90.7 \pm 1.60\%$ 、肝臓切片担体上 100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群が $99.7 \pm 2.54\%$ であった。いずれも統計学的に有意差を示す減少は認められなかった。組織切片担体上の細胞を回収し、Flow cytometry によって細胞内 ROS 産生量を定量した。スライドガラス上では曝露群 $100 \pm 20.2\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $125.0 \pm 51.1\%$ 、肺切片担体上では非曝露群時 $100 \pm 39.6\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $122.3 \pm 22.1\%$ 、肝臓切片担体上では非曝

露群 $100 \pm 12.9\%$ 、100 $\mu\text{g/mL}$ 曝露群 $114.1 \pm 33.0\%$ であった。いずれも統計学的に有意差を示す上昇は認められなかった。

ナノマテリアルの細胞内動態及び機能解析：細胞の種類に問わず、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ はミトコンドリアあるいは細胞質に存在し、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ はライソゾームと思われる構造物に集積するのを認めた。曝露 72 時間後の前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 の細胞生存率の結果では、LNCaP に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。また、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ では $p < 0.01$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。DU145 に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。また、 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

24 時間曝露後の細胞内 ROS 生成量を定量化した解析結果では、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 100 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ 、200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.01$ の有意差での低下が認められた。

細胞内 GSH を定量化した解析結果では、ナノ粒子の修飾の有無あるいは細胞の種類により、細胞内の GSH 量の変化は異なった。DU145 に関して、非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 200 $\mu\text{g/ml}$ では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

D. 考察

1) ナノマテリアルの作成及びキャラクターゼーション：

システインは CTAB に比べて小さい分子であるため、ナノ粒子表面に結合する分子の数はシステインの方が多く、システインと Au NPs および Ag NPs は共有結合で結合するため、CTAB よりも強固に結合すると考えられる。これらのシステインの特性に

より、Au NPs および Ag NPs の分散性が向上したと考えられた。また、ウレアーゼの酵素活性を活用したエマルジョン中でのチタンアルコキシドの加水分解・縮合により、中空 TiO₂ ナノ粒子を 60 以下の低温で作製できることが明らかになった。

2) 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析：

同一条件で調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果より、ばらつきが大きい、Ni-Alfa の細胞毒性が強い傾向を認めた。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。

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：

細胞毒性試験の結果では、どちらの細胞株も懸濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。これは、由来の組織によるナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることや、細胞の接着と浮遊で異なるため、ナノマテリアルとの接触の状態が異なることが、細胞内への取り込み等へ影響を与えている可能性も考えられた。THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54 の発現変化は、NiO ナノマテリアルに対する応答においても Ni イオンが作用している可能性が考えられた。サイトカイン産生結果より、用量依存的なサイトカイン産生の増加は認められたが、NiO によるサイトカイン産生に二次粒子径は影響を及ぼさないと考えられた。

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：

コントロールと比較して両MWCNTともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じMWCNTを用いて行った、共培養系による*in vitro*試験系でも、MWCNTの暴露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo*変異原性試験の結果をサポートするものとなった。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMWCNTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みた。現在のところ、*in vivo*試験で得られた一部の変異クローンの解析データのみではあるが、何のMWCNT投与でもG:C→A:T変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。我々の以前の報告によると、本研究で用いたものとは異なるMWCNT (MWCNT-7)を用いて行った*in vivo*の遺伝毒性試験の結果では、MWCNT-7投与により、マウス肺ではG:C→C:G変異が上昇したことを見出している。このことは、変異誘発のメカニズムがMWCNT-7と本研究で用いたMWCNT-S/-Lでは異なる可能性が考えられる。その要因は不明である。おそらく、細胞内への取り込みやROS産生能などを介したものと推測されるので、今後は、これらの点についても検討を行う必要があると思われる。毒性誘発のメカニズムが明らかになれば、有用なナノマテリアルの毒性低減化方法の提言へとつながるとと思われる。

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：

Au NPs・Ag NPs は、少なくとも本実験条件下において、3D ヒト皮膚再構成系・単層培養系いずれでも明らかな細胞傷害性を

示さず、また、3D ヒト皮膚再構成系で表皮内に侵入しないことが明らかとなった。Au NPs の細胞毒性量については、実験に供する Au NPs の物性や細胞の種類などに依存して異なるためばらつきが大きいですが、種々の哺乳類細胞培養系を用いて 1 nM から 300 μ M で有意に検出された例が報告されているが、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない。このことは、本研究が実験に供した Au NPs がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝（癌）細胞や再構成皮膚組織が Au NPs の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことが示唆された。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.08 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった結果は金ナノ粒子が表皮細胞内に侵入できないことを明確に示したものであるが、本研究で用いた 3D ヒト皮膚再構成系は毛孔とその付属組織や汗腺などがいないため、それらを介した侵入の可能性については評価できない。

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：

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、本研究の問題点が明らかになった。すなわち、磁性ナノ粒子の影響は、培養の違いあるいは培養時間の違いによる細胞の生理的变化よりも小さいため、培養条件の影響により隠れてしまうことである。これは、磁性ナノ粒子の miRNA 発現に与える影響は、非常に小さいことを示唆している。磁性ナノ粒子の細胞活性に与える影響も 100 あるいは 200 μ g/ml という高い曝露量においても 10~20% 程度の低下であるため、細胞全体の平均として考えると、細胞機能あるいは細胞の生理状態にほとん

ど影響していないということができる。すなわち、磁性ナノ粒子でアポトーシスやネクローシスが誘導されても、あるいは細胞活性が低下しても、それは特定の細胞に起こった現象であり、全体から見ると無視してもよい程度のものであると考えることができる。

8) 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 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種(ROS)の発生及び細胞生存率の変化を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。この培養系の評価は、GDL-1 細胞を使用した変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。

同一腫瘍なるも活性酸素種に対する応答が異なる 2 つの前立腺癌に対する非修飾・カルボキシル基修飾の磁性体ナノ粒子の影響を調べた。修飾により、ナノ粒子の細胞内局在が異なり、ROS-dependent/independent の反応が生じることが明らかにされた。一方、その反応の程度は、細胞種により異なる可能性が示された。

E. 結論

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。また、*in vitro*実験系での二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、一次粒子径と二次粒子径の関係が細胞毒性に影響を与える事やナノ粒子の分散性に重要な分散剤の毒性を排除する製造法に新たな知見が得られた。MWCNTに対する *in vivo* および共培養システムによる遺伝毒性試験より、共培養系の妥当性およびM

WCNTの長さに影響されない可能性がある事が認められた。さらに、3D皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築では、いくつかの考慮すべき点が存在するが、皮膚組織のナノ粒子侵入に対する抵抗性が認められた。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が、酸化鉄ナノ粒子曝露マーカーとしての解析は検討を要する点も認めた。A549細胞の切片担体培養系の使用可能を認めた。また、酸化鉄ナノ粒子の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無のみならず、細胞側の活性酸素種に対する抵抗性との複合的関わりを明らかにした。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, Y. Sato, W. Sakamoto, T. Yogo. Theranostic nanoparticles for MRI-guided thermochemotherapy: Tight clustering of magnetic nanoparticles boosts relaxivity and heat-generation power, *ACS Biomater. Sci. Eng.*, 2017, 3, 95–105.
- (2) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo. Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging. *J. Colloid Interf. Sci.*, 2017, 492, 127–35.
- (3) 林幸彦朗. 光と生体物質に応答する有機 - 無機ハイブリッド中空ナノ粒子の新規合成法とイメージガイド下三種同時治療. *セラミックス*, 2017, 52,130-3.
- (4) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of dual stimulus-responsive degradable hollow hybrid nanoparticles for image-guided trimodal therapy. *Adv. Funct. Mater.*, 2016, 26, 8613–22.
- (5) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy. *Adv. Funct. Mater.*, 2016, 26, 1708–18.
- (6) N. Ozawa, K. Hayashi, S. Yamaura, W. Zhang, W. Sakamoto, T. Yogo. Synthesis of inorganic-organic hybrid membranes consisting of triazole linkages formed by the azide-alkyne click reaction. *J. Membr. Sci.*, 2016, 517, 21–9.
- (7) T. Hoshino, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of proton-conductive inorganic-organic hybrid membranes from organoalkoxysilane and phosphonic acid derivatives. *J. Membr. Sci.*, 2016, 502, 133–40.
- (8) K. Takahashi, J. Umeda, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. One-pot synthesis of inorganic/organic hybrid membranes from organoalkoxysilane, hydroimidazole derivative, and cyclic sulfonic acid ester. *J. Mater. Sci.*, 2016, 51, 3398–407.
- (9) S. Zhukov, Y.A. Genenko, J. Koruza, J. Schultheiß, H. von Seggern, W. Sakamoto, H. Ichikawa, T. Murata, K. Hayashi, T. Yogo. Effect of texturing on polarization switching dynamics in ferroelectric ceramics. *Appl. Phys. Lett.*, 2016, 108, 012907.
- (10) R. Maruyama, W. Sakamoto, I. Yuitoo, T. Takeuchi, K. Hayashi, T. Yogo. Photocurrent enhancement of chemically synthesized Ag nanoparticle-embedded

- BiFeO₃ thin films. Jpn. J. Appl. Phys., 2016, 55, 10TA14-1.
- (11) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. J. Ceram. Soc.Jpn., 2016, 124, 855–62.
- (12) 松岡厚子, 児玉幸夫, 吉田緑, 伊佐間和郎, 中嶋富士雄, 井上薫, 河上強志, 松田良枝, 五十嵐良明. シリカ, 銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価. 国立衛研報, 2016, 134, 33-41.
- (13) M. Usami, M Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, A. Miyajima, T. Irie, O. Doi, T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi. Proteomic analysis of valproic acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos. Fundam. Toxicol. Sci., 2017, 4(1), 31-5.
- (14) S. Mimaki, Y. Totsuka, Y. Suzuki, C. Nakai, M. Goto, M. Kojima, H. Arakawa, S. Takemura, S. Tanaka, S. Marubashi, T. Matsuda, T. Shibata, H. Nakagama, A. Ochiai, S. Kubo, S. Nakamori, H. Esumi, K. Tsuchihara. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. Carcinogenesis 2016, 37, 817-26.
- (15) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of Kaolin. Genes Environ., 2017, 39, 12.
- (16) 大久保智子, 保坂三継, 中江 大. ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ばく露による細胞傷害に関する研究. 薬学雑誌, 2016, 136 (10), 1433-38 .
- (17) K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, D. Nakae, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma. Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 *gpt* delta rats. Genes Environ., 2017, 39, 4.
- (18) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata. Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery. Mater. Express, 2016, 6, 116-26.
- (19) S. Chinnathambi, N. Abu, N. Hanagata. Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin. RSC Adv., 2017, 7, 2392-402.
- (20) X. Yao, Z. Tian, J. Liu, Y. Zhu, N. Hanagata, Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots for potential chemo-photothermal synergistic cancer therapy. Langmuir, 2017, 33, 591-9.
- (21) X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Hanagata, X. Wang, Q. Weng, A. Ito, Y. Bando, D. Golberg, Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment. Nat. Commun., 2017, 8, 13936.
- (22) H. Tone, S. Yoshioka, H. Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, M. Watanabe, A. Umezawa. Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform, BioMed Res. Int., 2016, 2016, 7098987.
- (23) 渡邊昌俊, 菅野純. 特集ナノトキシコロジー「はじめに」, 医学のあゆみ, 2016, 259(3), 215.
- (24) 小島佳奈子, 齊藤春五, 渡邊昌俊. ナ

- ノトキシコロジーにおける *in vitro* 評価試験：現状と将来. 医学のあゆみ, 2016, 259(3), 255-60.
2. 学会発表
- (1) 林幸彦. ハイブリッドナノ粒子のバイオメディカル応用. 平成 28 年度日本セラミックス協会東海支部学術研究発表会, 名古屋, 2016 年 12 月.
 - (2) 林幸彦, 山田翔太, 坂本涉, 余語利信. 赤血球様粒子の作製と体内動態の解明. 第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡, 2016 年 6 月.
 - (3) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Dual Stimulus-Responsive Degradable Hollow Organic-Inorganic Hybrid Nanoparticles for Image-Guided Trimodal Therapy. The 1st International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development (iLIM-1), Osaka, Oct. 17-18, 2016.
 - (4) 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. 二次粒子径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の応答. 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋市, 2016 年 6 月.
 - (5) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 50th Anniversary Conference IARC, Lyon, 2016 年 6 月.
 - (6) Y. Totsuka, M. Watanabe, K. Hayashi, D. Nakae. Development of a novel *in vitro* mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials. 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, Copenhagen, 2016 年 8 月.
 - (7) 戸塚ゆ加里, 林櫻松, 加藤護, 十時 泰, 柴田龍弘, 松島芳隆, 中釜斉. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (8) 伴野勸, 山地太樹, 岩崎基, 成島大智, 加藤護, 戸塚ゆ加里, 三好規之, 今井俊夫. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (9) 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がん 1 症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
 - (10) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析の統合による発がん要因の探索. 第 59 回日本放射線影響学会, 広島, 2016 年 10 月.
 - (11) 前迫裕也, 善家茜, 古川英作, 加藤 護, 椎崎一宏, 中釜斉, 戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析), 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016 年 11 月.
 - (12) 戸塚ゆ加里, 善家茜, 古川英作, 加藤護, 十時泰, 柴田龍弘, 中釜斉. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索, 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016 年 11 月.
 - (13) Y. Totsuka, H. Sato, N. Akiba, D. Nakae, N. Suzui-Kemuriyama, M. Watanabe, K. Hayashi. Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials. International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS)

- International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016年6月.
- (14) 北條幹, 坂本義光, 藤谷知子, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 久保喜一, 長澤明道, 海鉾藤文, 高橋博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 田中和良, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. MWCNTによるラット中皮腫誘発過程の経時的解析. 第43回日本毒性学会学術年会, 愛知県名古屋, 2016年7月.
- (15) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江大. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に対する病理組織学的解析. 第75回日本癌学会総会, 神奈川県横浜市, 2016年10月.
- (16) 佐藤春菜, 坂本義光, 中江大, 戸塚ゆ加里. 多層カーボンナノチューブの線維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響, 日本環境変異原学会第46回大会, 東京都千代田区, 2016年11月.
- (17) 坂本義光, 北條幹, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. ラットにおける多層カーボンナノチューブ(CNT)の発がん性と phenyl *N*-tert-butyl nitron (PBN) 併用が及ぼす影響, 第33回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017年1月.
- (18) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝廣, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大. 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察. 第33回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017年1月.
- (19) S. Chinnathambi, N. Hanagata. Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles. International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (20) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata. Calcium phosphate induce exosome release of human monocyte for exosomal-based drug delivery systems. International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (21) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata. Calcium Phosphate Induce Exosome Release of Human Monocyte for Exosomal-based Drug Delivery Systems. Nano S&T-2016, Oct. 26-28, 2016, Singapore.
- (22) K. Kojima, S. Hashimoto, R. Sakamaki, S. Takahashi, R. Kasakura, R. Maruyama, H. Ishiguro, H. Uemura, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles enhance anti-tumor effect of docetaxel on prostate cancer cells *via* ROS generation and NF-kappa B signaling. April 16-20, 2016, New Orleans, LA.
- (23) S. Hashimoto, K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, T. Nittami, M. Watanabe. Cytotoxicity of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄: cell vision *versus* surface modification. 第75回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (24) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. Iron oxide nanoparticles enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B and anti-apoptotic pathway in prostate cancer cells. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (25) S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M.

Watanabe. MicroRNAs profiling of A549 cells after iron oxide nanoparticles exposure. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.

- (26) K. Kojima, S. Hashimoto, K. Yamamoto, S. Ota, Y. Takemura, M. Watanabe. Effect of carboxylated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *via* NF- κ B-independent pathways. International Workshop on Magnetic Bio-Sensing 2016, Oct. 12-14, 2016, Fukuoka.

H. 知的財産権の取得状況

1. 特許取得

- 1) 林幸彦, 坂本涉, 余語利信, 丸岡弘規, “フローサイトメトリー用蛍光プローブ及び蛍光標識細胞の選別方法” 出願番号 (国内: 特願 2016-91356, 2016年04月, 国際: 2017年2月10日, PCT/JP2017/4979), 名古屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.
- 2) 林幸彦, 坂本涉, 余語利信, 丸岡弘規, “蛍光プローブ、蛍光検出方法及び蛍光プローブの使用方法”, 出願番号 (国内: 特願 2016-91359, 2016年04月, 国際: 2017年2月10日, PCT/JP2017/4981), 国立大学法人名古屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

2. 実用新案登録

なし

3. その他

林幸彦 “新ナノ粒子でがん狙い撃ち名大チーム”, 中日新聞. 2016年12月18日

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および機能解析

今年度は、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および機能解析について報告する。A549細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種(ROS)の発生及び細胞生存率の変化を認めた。前立腺癌細胞株DU145、LNCaP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、透過型電子顕微鏡にて局在を観察した。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-H₂DCFDAを使用した。また、細胞内のGSHの測定を行った。細胞株に関わらず、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの局在が異なることが認められた。 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの曝露により、両細胞に対する細胞生存率は濃度依存的に有意差をもって低下した。また、細胞内ROS産生およびGSH量の結果より、DU145およびLNCaPは Fe_3O_4 NPsによるROS-dependentな反応を示し、 Fe_3O_4 NPs-COOHによるROS-independentな反応を示し、また、細胞間の差異を認めた。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るも、細胞の種類も重要な因子である事を確認した。

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

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、新たに作成された凍結切片を用いて、A549細胞の切片担体培養を行

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。(2)に関して、花方分担研究者との共同研究のためにここでは省略させていただいた。(3)について、前立腺癌細胞株 DU145 および LNCaP に対して、非修飾磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)とカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子(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、透過型電子顕微鏡(TEM)を用いて、 Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOHの細胞内の局在を観察した。また、Alamar Blue assayを用いた生存率、

CM-H₂DCFDA による活性酸素種 (ROS) の測定、細胞内 GSH の測定を行った。

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依存性前立腺癌細胞株 LNCaP、アンドロゲン非依存性前立腺癌細胞株 DU145 およびヒト肺上皮細胞由来 A549 を使用した。これら細胞株は ATCC (American Type Culture Collection) より入手した。LNCaP および DU145 は RPMI 1640 培養液 (10 % FBS、1 % penicillin & streptomycin 含有) を用いて、また A549 は F12 培養液を用いて 37 °C、CO₂ 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 (Fe₃O₄ NPs、Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄ (マグネタイト) で構成されている。Fe₃O₄ は空気中の酸素によって酸化され粒子表面は Fe₂O₃ 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 (Fe₃O₄ 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 (Fe₃O₄ NPs-COOH) は、Institute for Integrated Cell-Material Sciences (iCeMS)、京都大学より購入した。各々 1 μg/mL、10 μg/mL、100 μg/mL で培養液に調整して、超音波破砕機 (Ultrasonic homogenizer VP-050、TAITEC 社) にて、分散処理を行い、Fe₃O₄ NPs の凝集を取り除き使用した。細胞への Fe₃O₄ NPs 曝露前には、培養液中における Fe₃O₄ 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) 透過型電子顕微鏡 (TEM) による観察 所定の条件で各細胞に Fe₃O₄ NPs と Fe₃O₄ NPs-

COOH を 24 時間曝露後、回収し、2.5% グルタルアルデヒドで固定し、外部に切片の作成および TEM の撮影の委託した (花市電子顕微鏡技術研究所)。

4) 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, Sacramento, California, USA) を用いた。細胞は細胞密度が 1.0×10⁴ cells/well となるように 24 well プレートに再播種、培養した。Fe₃O₄ 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 Fe₃O₄ 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 μl/well ずつ添加した。37 °C、5 % CO₂ 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 μl/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。

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

5- (and 6) -chloromethyl-2', 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate、acetyl ester CM-H₂DCFDA (Invitrogen) を用いて、活性酸素種 (ROS) の測定を行った。6 well プレートに細胞濃度が 1.0×10⁵ cells/well になるように播種した。まず、PBS 8.54 mL に CM-H₂DCFDA の試薬を溶かし 10 μM に調整する。6 well プレートの培地を吸引して、その well に PBS 1 mL 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) 細胞内 GSH の測定

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が 1.0×10^4 [cells/well] となるように 24 well プレートに播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露を行った。

曝露 24 時間後に培養液を除去した後、試薬を添加した。1×GSH-Glo™ 試薬 (Promega, Madison, WI) を 100 μ L/well 加えた。試薬の内訳は Luciferin-NT 1 μ L, Glutathione S-Transferase 1 μ L, GSH-Glo™ Reaction 100 μ L である。プレートシェイカーに乗せて 30 min, 室温でインキュベートし、先ほどの 1×GSH-Glo™ 試薬を除去、Luciferon Detection 試薬を 100 μ L/well 加えた。試薬の内訳は Luciferin Detection Reagent, Reconstitution Buffer with esterase である。その後プレートシェイカーに乗せて 15 min, 室温でインキュベート、プレートリーダーでの発光のプログラムで測定した。

データの算出方法は、以下の通りに行った。まず、Control の値の平均をとり、各々のサンプル値を Control の平均値で割った。各々のサンプルごとに出した値の平均、標準偏差を算出した。

7) 切片担体の作成 ラット (SD, male, 21 weeks) 2 匹を安楽死後に、臓器を摘出し、OCT コンパウンドに包埋し、-80 で保存した。凍結した組織をクライオスタットで切片を作成し、アセトン固定あるいは風乾し-80 で保存した。

8) 切片担体培養 組織切片担体を 4 well multidish (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA) に入れ、4 で乾燥させた後に培養液を入れ、A549 細胞を 7×10^4 cells/well 播種、培養をした。24 時間毎に細胞形態の観察および細胞接着数 [cells/cm²] を計測した。

9) 切片担体培養系による A549 細胞の毒性評価 A549 細胞の組織切片担体培養に磁性体ナノ粒子を 24 時間曝露し、Alamar Blue を用いて、細胞生存率を測定した。また、

組織切片担体上の A549 細胞の ROS 産生を Flowcytometry により測定を行った。

(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* 実験が主体であるが、ラットより組織切片担体を得るために本学動物実験取扱い委員会に審査を受けている。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。

C. 研究結果

1) 前立腺癌細胞における Fe₃O₄NPs と Fe₃O₄NPs-COOH の細胞内の局在 細胞の種類に問わず、Fe₃O₄NPs はミトコンドリアあるいは細胞質に存在するのを認めた。一方、Fe₃O₄NPs-COOH はライソゾームと思われる構造物に集積するのを認めた。

2) 細胞生存率

曝露 72 時間後の前立腺癌細胞株 LNCaP、DU145 の細胞生存率の結果を示す (図 1)。LNCaP に関して、非曝露群と比べて Fe₃O₄NPs 100 μ g/mL、200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。また、Fe₃O₄NPs-COOH 100 μ g/mL 曝露群では $p < 0.01$ 、200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.001$ の有意差で低下が認められた。DU145 に関して、非曝露群と比べて Fe₃O₄NPs 200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。また、Fe₃O₄NPs-COOH 200 μ g/mL 曝露群では、 $p < 0.05$ の有意差で低下が認められた。

3) ROS 生成の測定

24 時間曝露後の細胞内 ROS 生成量を定量化した解析結果を示す (図 2)。各データは非曝露群を 1.00 [-] として数値化を行った。LNCaP に Fe₃O₄NPs の 24 時間曝露時にお

いて、非曝露群 1.00 ± 0.003 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.02 ± 0.13 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.96 ± 0.10 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.04 ± 0.20 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.13 ± 0.17 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の 24 時間曝露時において、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.61 ± 0.12 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.69 ± 0.12 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.78 ± 0.07 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.81 ± 0.05 [-]であった。

DU-145 に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ の 24 時間曝露時において、非曝露群 1.00 ± 0.15 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.01 ± 0.03 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.89 ± 0.08 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.51 ± 0.06 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 2.18 ± 0.08 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ の 24 時間曝露時、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.91 ± 0.25 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.03 ± 0.24 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.94 ± 0.24 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.01 ± 0.27 [-]であった。非曝露群と比べて $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群では、 $p < 0.05$ 、 $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群では、 $p < 0.01$ の有意差での低下が認められた。

4) 細胞内の GSH 量の測定

細胞内 GSH を定量化した解析結果を図 3 に示す。データは control 時を 1.00 [-]として数値化を行った。

LNCaP に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を曝露した場合、非曝露群 1.00 ± 0.41 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.16 ± 0.25 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.18 ± 0.24 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.00 ± 0.23 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.94 ± 0.20 [-]であった。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を曝露した場合、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.93 ± 0.14 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.93 ± 0.19 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.85 ± 0.13 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露した時 0.79 ± 0.15 [-]であった。

DU-145 細胞に $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ を曝露した場合、非曝露群 1.00 ± 0.03 [-], $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.04 ± 0.009 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.19 ± 0.01 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.81 ± 0.062 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 0.75 ± 0.08 [-]であった。

$\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$ を曝露した場合、 $1 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.18 ± 0.05 [-], $10 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.17 ± 0.002 [-], $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.11 ± 0.013 [-], $200 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 1.06 ± 0.01 [-]であった。

5) A549 細胞の切片担体培養系による毒性評価

肝および肺組織切片担体培養における A549 の細胞密度の経時変化を示す (図 4、5)。これらの結果より、肝あるいは肺組織切片担体培養において、アセトン固定かつ切片の厚さが $4 \mu\text{m}$ で実験を行う事に決定した。 $\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$ 曝露時の各組織切片担体上の A549 細胞の生存率を、Alamar Blue 吸光度から直接算出したものと、検量線から算出したものの 2 種類をまとめた結果を図 6 に示す。

吸光度の測定値から直接算出した生存率は、スライド上非曝露群が 100.0 ± 2.96 %、スライド上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 105.5 ± 4.11 %、肺切片担体上非曝露群が 97.0 ± 3.57 %、肺切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 104.5 ± 5.28 %、肝臓切片上非曝露群が 90.7 ± 1.60 %、肝臓切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 99.7 ± 2.54 %であった。いずれも統計学的に有意差を示す減少は認められなかった。

検量線から算出した生存率は、スライド上非曝露群が 100.0 %、スライド上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 100.7 %、肺切片担体上非曝露群が 101.1 %、肺切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 100.9 %、肝臓切片上非曝露群が 96.5 %、肝臓切片担体上 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群が 96.8 %であった。

組織切片担体上で培養した細胞を回収し、Flow cytometry によって細胞内 ROS 産生量を定量的に測定した結果を図 7 に示す。スライドガラス上では曝露群 100 ± 20.2 %、 $100 \mu\text{g/mL}$ 曝露群 125.0 ± 51.1 %、肺切片担体上では非曝露群時 100

± 39.6 %、100 µg/mL 曝露群 122.3 ± 22.1 %、肝臓切片担体上では非曝露群 100 ± 12.9 %、100 µg/mL 曝露群 114.1 ± 33.0 %であった。いずれも統計学的に有意差を示す上昇は認められなかった。

D. まとめ

A549 細胞の切片担体培養系の条件設定後に、磁性体ナノ粒子(Fe₃O₄ NPs)の曝露実験を行った。これらの実験より、切片担体の種類に依存した細胞生着・増殖を認め、曝露実験での活性酸素種 (ROS) の発生及び細胞生存率の変化を認めたが、統計学的有意差は認められなかった。この培養系の評価は、GDL-1 細胞を使用した変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。また、活性酸素種に対する応答が異なる 2 つの前立腺癌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。修飾により、ナノ粒子の細胞内局在が異なり、ROS-dependent/independent の反応が生じることが明らかにされた。一方、その反応の程度は、細胞種により異なる可能性が示された。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) H. Tone, S. Yoshioka, H. Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, M. Watanabe, A. Umezawa. Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform. *BioMed research International*. 2016, 2016, 7098987.
- (2) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effects of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes*

Environ. 2017, 39, 12.

- (3) 渡邊昌俊, 菅野純. 特集ナノトキシコロジー「はじめに」. *医学のあゆみ*. 2016, 259(3) 215.
- (4) 小島佳奈子, 斉藤春五, 渡邊昌俊. ナノトキシコロジーにおける in vitro 評価試験：現状と将来. *医学のあゆみ*. 2016, 259(3), 255-260.

2. 学会発表

- (1) K. Kojima, S. Hashimoto, R. Sakamaki, S. Takahashi, R. Kasakura, R. Maruyama, H. Ishiguro, H. Uemura, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles enhance anti-tumor effect of docetaxel on prostate cancer cells via ROS generation and NF-kappa B signaling. April 16-20, 2016, New Orleans, LA.
- (2) S. Hashimoto, K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, T. Nittami, M. Watanabe. Cytotoxicity of magnetic nanoparticles of Fe₃O₄: cell vision versus surface modification. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (3) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. Iron oxide nanoparticles enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B and anti-apoptotic pathway in prostate cancer cells. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (4) S. Takahashi, S. Saito, W. Kobayashi, S. Hashimoto, Y. Endo, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of A549 cells after iron oxide nanoparticles exposure. 日本癌学会学術総会, 横浜, 2016 年 10 月.
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, K. Yamamoto, S. Ota, Y. Takemura, M. Watanabe. Effect of

carboxylated Fe₃O₄ magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells *via* NFκB-independent pathways. International Workshop on Magnetic Bio-Sensing 2016, Oct.12-14, 2016, Fukuoka.

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

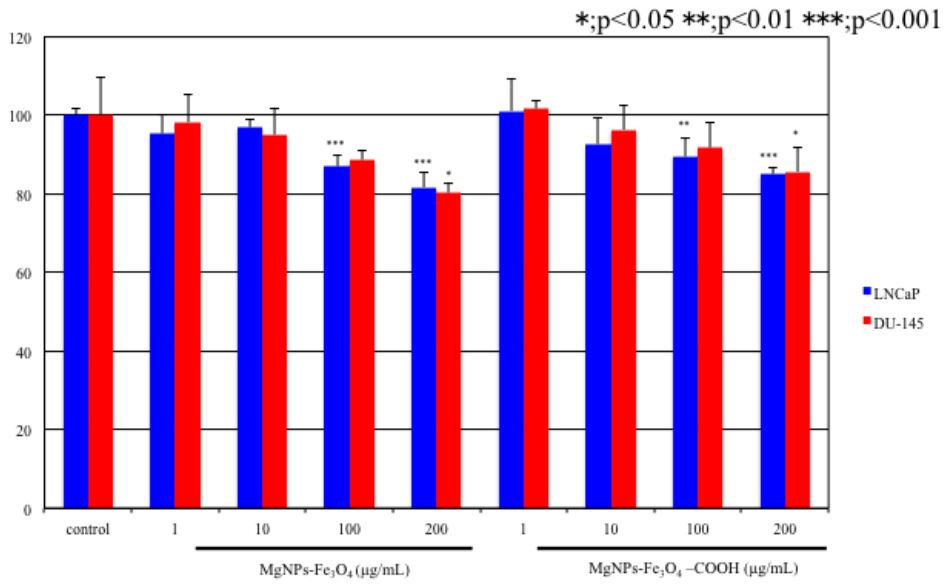


図 1. Fe₃O₄NPs と Fe₃O₄NPs-COOH 曝露時の DU145、LNCaP 細胞の生存率

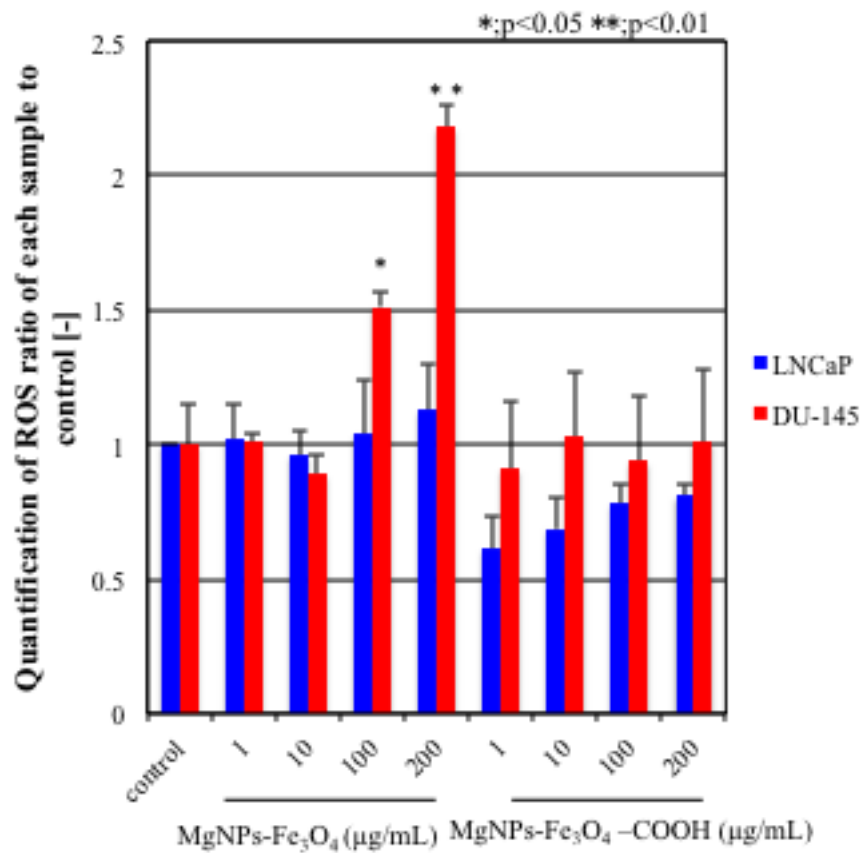


図 2. DU145 および LNCaP 細胞における ROS 産生

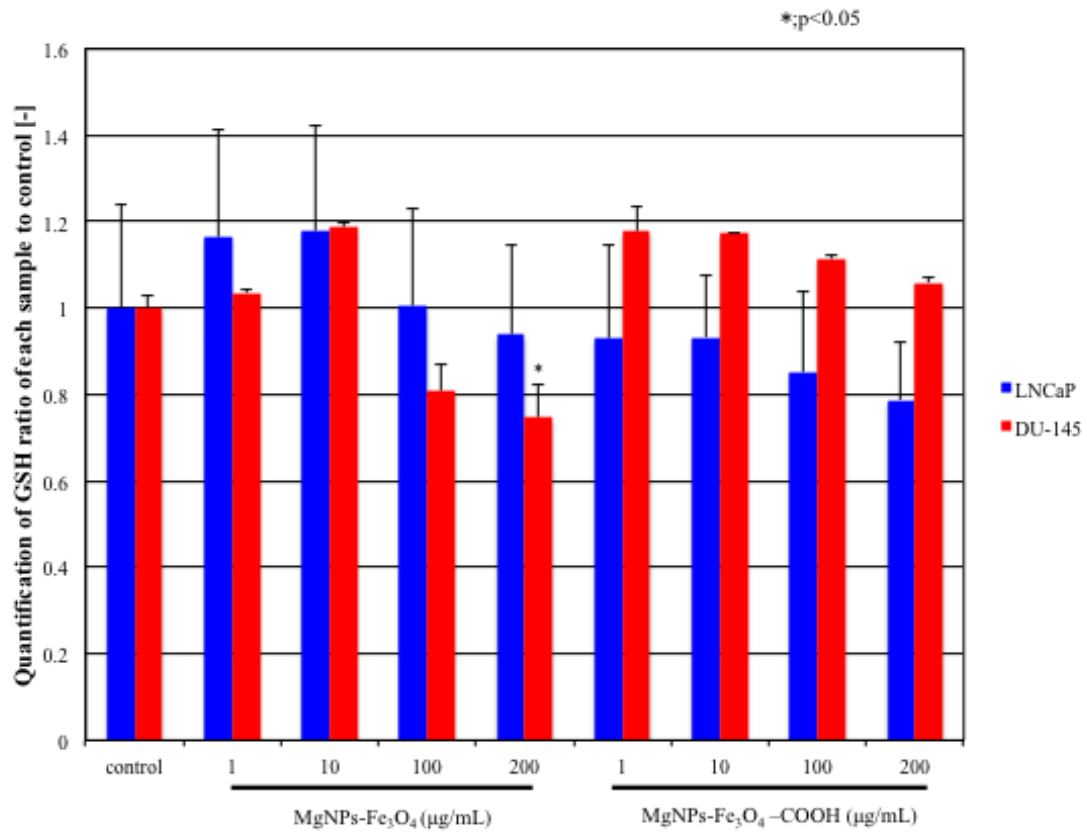


図 3. 細胞内の GSH 量の測定

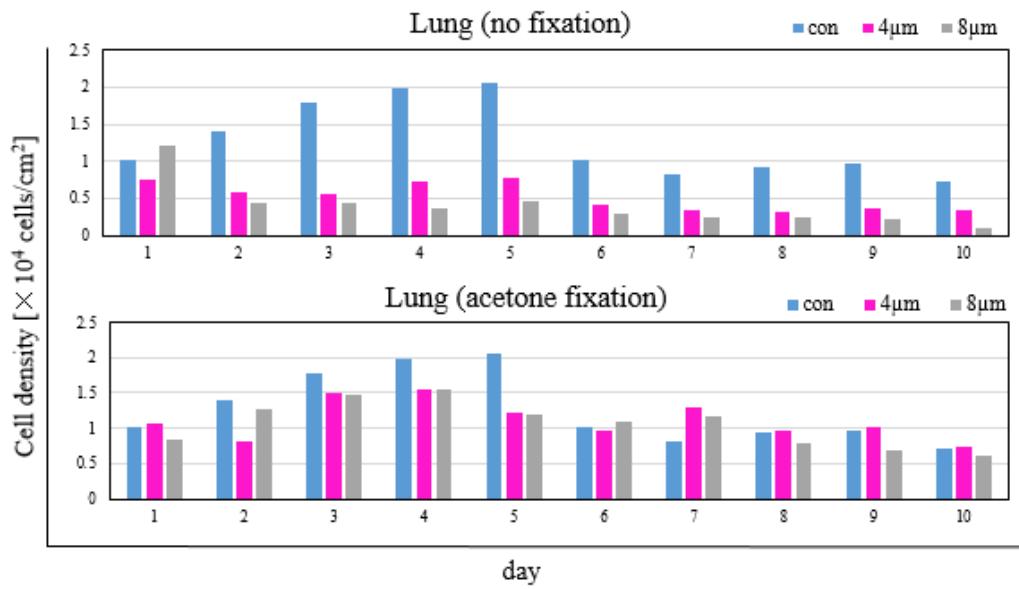


図 4. 肺組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

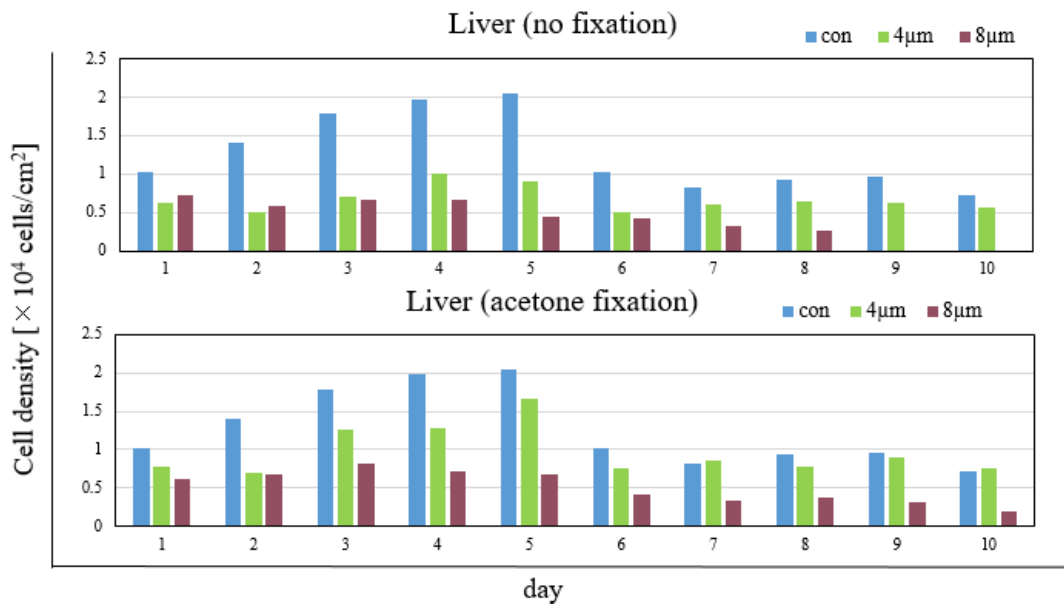


図 5. 肝組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

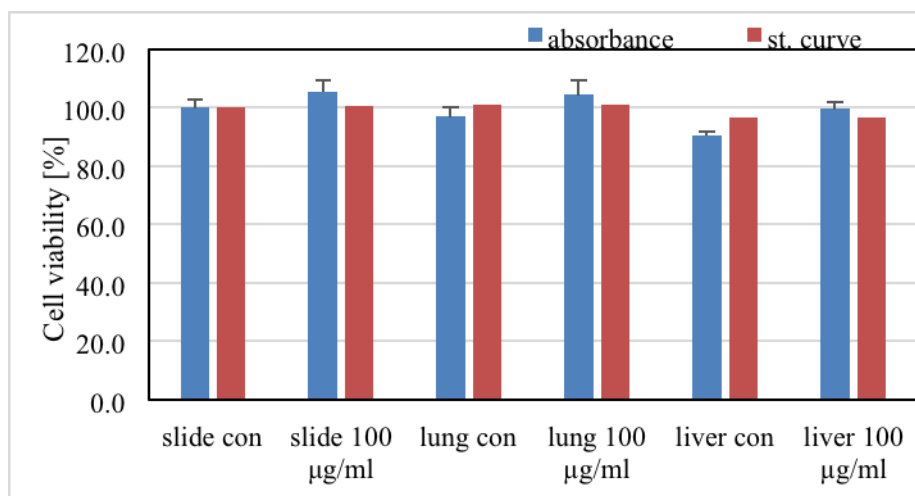


図 6. ナノ粒子曝露による切片担体培養における細胞生存率

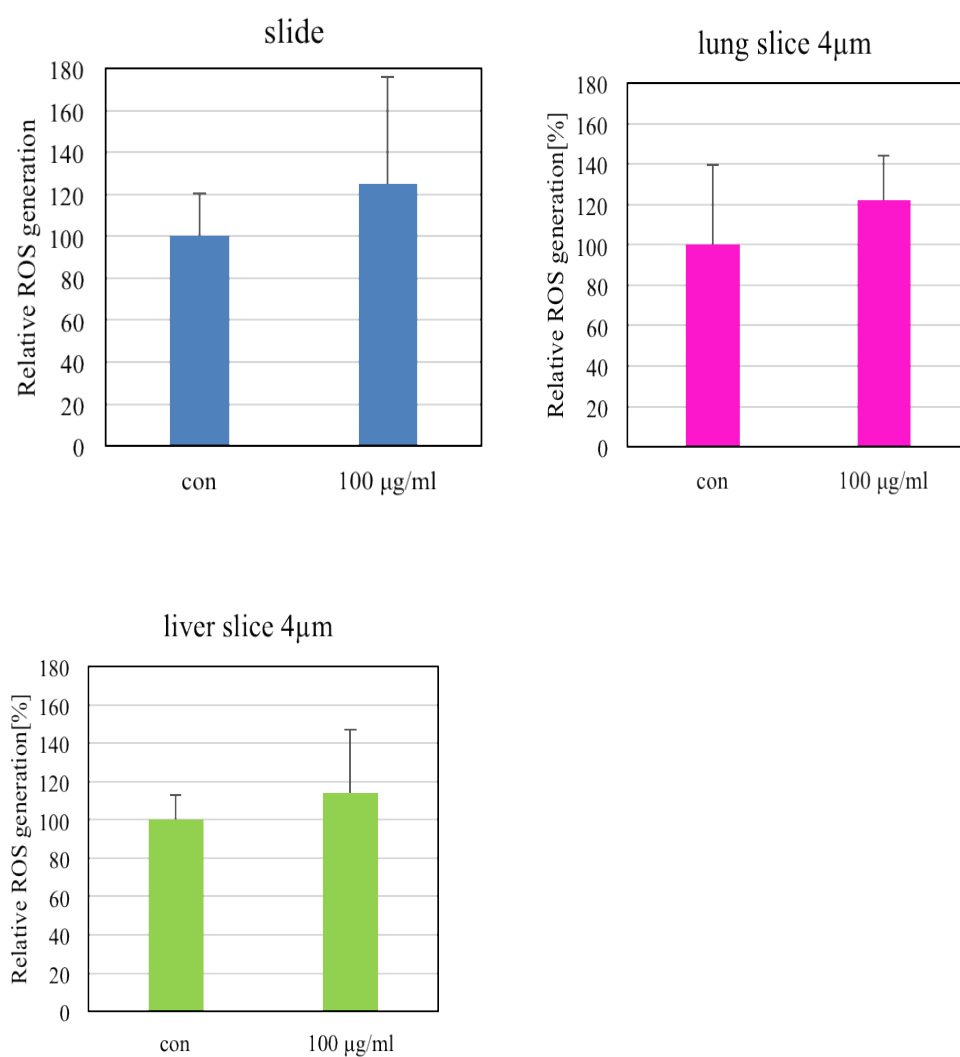


図 7. 組織切片担体上での A549 細胞の ROS 産生量

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製およびキャラクタリゼーション

研究分担者 林 幸彦朗 名古屋大学未来材料・システム研究所 助教

酸化チタン、金、銀ナノ粒子の作製を行った。金ナノ粒子や銀ナノ粒子は凝集が生じやすいため、一般的な作製法では *in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することが困難である。また、一般的な合成法では界面活性剤を使用するが、この界面活性剤が毒性を示すため、界面活性剤を使用しない作製法が求められる。そこで本研究では、金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液の新規作製法の開発に取り組んだ。アミノ酸であるシステインを界面活性剤の代わりとして用いることで、毒性を高めることなく、*in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することに成功した。また、酸化チタンナノ粒子については、酵素であるウレアーゼを用いることで、針状粒子が球状にクラスター化した集合体を作製することができた。また、中空構造の酸化チタンナノ粒子を作製する方法も確立した。

A．研究目的

本研究分担者は、ナノマテリアルの *in vitro* リスク評価を実施するための、金ナノ粒子、銀ナノ粒子、酸化チタンナノ粒子を作製することを目的とする。特に、金ナノ粒子や銀ナノ粒子は凝集が生じやすいため、一般的な作製法では *in vitro* 評価を実施することが可能なほど高濃度(2 mg/mL)の金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液を作製することが困難である。また、一般的な合成法では界面活性剤を使用するが、この界面活性剤が毒性を示すため、界面活性剤を使用しない作製法が求められる。そこで本研究では、金ナノ粒子や銀ナノ粒子分散液の新規作製法の開発を目的とする。

B．研究方法

1) 一般的な方法による金ナノ粒子の作製

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 hexadecyltrimethylammonium bromide

(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。

2) 一般的な方法による銀ナノ粒子の作製

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 NaBH₄ 水溶液 (濃度 5.3 M) 100 μ L を一滴ずつ加えた。

3) 高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法

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 (I) 水溶液を CTAB 水溶液に一滴ずつ攪拌しながら加えた。

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。

4) CTAB 用いずに高濃度の金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液を作製する方法

塩化金酸水溶液または硝酸銀水溶液にシステインを溶解した。この溶液に氷浴で冷却した NaBH_4 水溶液を加え、超音波処理を 5 時間行った。金ナノ粒子、銀ナノ粒子どちらにおいても、金属：システイン = 1 : 1 とした。

5) 酸化チタンナノ粒子の作製

原料として、加水分解・縮合速度や構造が異なる次の 5 つの化合物を用いた： titanium(IV) chloride, titanium 2-ethylhexyloxide, tetrabutyl orthotitanate, bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, tetrabutyl orthotitanate tetramer, tetraisopropyl orthotitanate (図 1)。これらの化合物を、尿素およびウレアーゼ水溶液に加え、60 以下で最長 3 日間反応させた。尿素濃度は、1.2 ~ 19.2 mg/mL とし、ウレアーゼ濃度は 5 ~ 10 mg/mL とした。

C . 研究結果

1) 一般的な方法で作製した金ナノ粒子の特性

B 1)の方法で作製した金ナノ粒子は 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 2a)。また、金ナノ粒子の粒径は 10 ~ 20 nm であった(図 2b)。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 3a)。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 3b)。

しかし、戸塚先生による評価により、CTAB に毒性があることが判明したため、CTAB を用いない金ナノ粒子の作製法の開発が必要であることが明らかになった。

2) 一般的な方法で作製した銀ナノ粒子の特性

B 2)の方法で作製した方法で銀ナノ粒子を合成すると、図 4 に示すように、銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上にする凝集し、沈降してしまった。この凝集体を超音波処理により再分散させることは不可能であった。In vitro 評価を行うために、2 mg/mL 以上の濃度でも水に分散する銀ナノ粒子の作製法の開発が必要であることが明らかになった。

3) B 3)の方法で作製した銀ナノ粒子の特性

B 3)の方法により銀ナノ粒子を作製したところ、2 mg/mL 以上の濃度でも凝集・沈降が生じない銀ナノ粒子分散液を得ることができた。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 5)。しかし、この方法は CTAB を使用するため、得られる銀ナノ粒子は毒性を示すことが明らかになった。このため、CTAB を用いず 2 mg/mL 以上の濃度でも凝集・沈降しない銀ナノ粒子を作製する方法を開発する必要があることが明らかになった。

4) B 4)の方法で作製した金ナノ粒子および銀ナノ粒子の特性

B 4)の方法により作製した金ナノ粒子は粒径 20 nm 以下であった(図 6 左)。ICP-MS により元素分析を行ったところ、金 37 mmol/kg、硫黄 50 mmol/kg であった。この

硫黄はシステインに由来するものである。金と硫黄は1 : 1で仕込んでいるため、精製の過程で若干金ナノ粒子の損失があったと思われる。

B 4)の方法により作製した銀ナノ粒子は一般的な方法で作製した銀ナノ粒子よりも長細い形状をしており、サイズは約40 nm × 約12 nmであった(図6右)。ICP-MSにより元素分析を行ったところ、金51 mmol/kg、硫黄50 mmol/kgであり、仕込み比とほぼ同じであった。

B 4)の方法で得られた金ナノ粒子および銀ナノ粒子は2 mg/mL以上で蒸留水に分散させると時間が経過するにつれて凝集・沈降が生じたが、超音波で再分散させることができ、*in vitro* 評価での使用が可能であった。

以上の結果から以下のことがいえる。CTABの代わりに低毒性アミノ酸であるシステインを用いることで2 mg/mLの金ナノ粒子および銀ナノ粒子水分散液を作製することができる。金ナノ粒子においては、2 mg/mLという高濃度条件下では、CTABを用いた場合とシステインを用いた場合で分散性には大きな違いは見られない。このため、システインを使用することで分散性を低下させることなく、安全性を高めることができる。銀ナノ粒子に関しては、CTABを用いた場合は、粒子濃度を2 mg/mLにすると再分散させることができなかつたが、システインを用いることで2 mg/mLでも分散させることが可能になり、毒性だけでなく分散性の面においてもシステインを用いることの有意性がみられる。システインはCTABに比べて小さい分子であるため、ナノ粒子表面に結合する分子の数はシステインの方が多いと考えられる。また、システインと金ナノ粒子および銀ナノ粒子は共有結合で結合するため、CTABよりも強固に結合すると考えられる。これらのシステイ

ンの特性により、金ナノ粒子および銀ナノ粒子の分散性が向上したと考えられる。

5) 酸化チタンナノ粒子の特性

原料として titanium(IV) chloride を用いた場合は、尿素濃度9.6~19.2 mg/mL、ウレアーゼ濃度5.0 mg/mLの場合に中空ナノ粒子が得られた。この尿素濃度範囲では、尿素濃度が低いほど粒径が小さい粒子が得られ、尿素濃度9.6 mg/mLでは粒径約500 nmの中空粒子が得られ、尿素濃度19.2 mg/mLでは粒径約20 nmの中空ナノ粒子が得られた。ウレアーゼ濃度5.0 mg/mLの場合で、尿素濃度を9.6 mg/mL未満にすると針状粒子が得られた。ウレアーゼ濃度10 mg/mLの場合は、尿素濃度に関わらず針状粒子が得られ、尿素濃度が高くなるにつれて粒子の長さは短くなった。

以上の結果に基づき、ウレアーゼ濃度5.0 mg/mL、尿素濃度9.6 mg/mLとし、構造と加水分解・縮合速度が異なるチタンアルコキシドを原料として用いて、原料の構造と加水分解・縮合速度が生成物の形状に与える影響を調査した。Tetrabutyl orthotitanate tetramerのようにすでにTi-O-Tiの結合ができている化合物を原料として用いると、中空ナノ粒子が得られることが明らかになった。その他の化合物(titanium 2-ethylhexyloxide, tetrabutyl orthotitanate, bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato) titanium, tetraisopropyl orthotitanate)を用いた場合は、粒径100 nm以下の球状粒子が生成した。

上記の方法では、適切な原料の選択と合成条件の最適化により、one-potで中空ナノ粒子が得られたが、その生成量は僅かであった。そこで、より多くの中空粒子を得るために、予めエマルジョンを調製しておき、このエマルジョン中で上記と同様の反応を行うことで、中空ナノ粒子の作製を試みた。エマルジョンはアンモニア水、ドデカン、

エタノール、hexadecyltrimethylammonium bromide 水溶液を混合し、超音波処理を行うことで作製した。このエマルジョン中での反応の場合は、水溶液中での反応と異なり、bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato) titanium を原料として用いた場合のみ、中空ナノ粒子が得られ(図 7) その他の原料では球状粒子が得られた。この結果は、エマルジョン中での反応の場合は、原料として反応速度がそれほど速くない化合物を用いて、ミセル表面でのみ反応させることが重要であることを示している。また、hexadecyltrimethylammonium bromide を用いなかった場合は、エマルジョンが生成しないため、中空ナノ粒子は得られなかった。以上より、ウレアーゼの酵素活性を活用した、エマルジョン中でのチタンアルコキシドの加水分解・縮合により、中空 TiO₂ ナノ粒子を 60 以下の低温で作製できることが明らかになった。

D . 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Hayashi, Y. Sato, W. Sakamoto, T. Yogo, Theranostic nanoparticles for MRI-guided thermochemotherapy: Tight clustering of magnetic nanoparticles boosts relaxivity and heat-generation power, ACS Biomater. Sci. Eng., 2017, 3, 95–105.
- (2) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo, Relaxometric property of organosilica nanoparticles internally functionalized with iron oxide and fluorescent dye for multimodal imaging, J. Colloid Interf. Sci., 2017, 492, 127–35.
- (3) **林幸彦朗**, 光と生体物質に応答する有機 - 無機ハイブリッド中空ナノ粒子の新規合成法とイメージガイド下三種同時治療, セラミックス, 2017, 52,130-3.
- (4) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of dual stimulus-responsive degradable hollow hybrid nanoparticles for image-guided trimodal therapy, Adv. Funct. Mater., 2016, 26, 8613–22.
- (5) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy, Adv. Funct. Mater., 2016, 26, 1708–18.
- (6) N. Ozawa, K. Hayashi, S. Yamaura, W. Zhang, W. Sakamoto, T. Yogo, Synthesis of inorganic-organic hybrid membranes consisting of triazole linkages formed by the azide-alkyne click reaction, J. Membr. Sci., 2016, 517, 21–9.
- (7) T. Hoshino, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of proton-conductive inorganic-organic hybrid membranes from organoalkoxysilane and phosphonic acid derivatives, J. Membr. Sci., 2016, 502, 133–40.
- (8) K. Takahashi, J. Umeda, K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo, One-pot synthesis of inorganic/organic hybrid membranes from organoalkoxysilane, hydroimidazole derivative, and cyclic sulfonic acid ester, J. Mater. Sci., 2016, 51, 3398–407.
- (9) S. Zhukov, Y.A. Genenko, J. Koruza, J. Schultheiß, H. von Seggern, W. Sakamoto, H. Ichikawa, T. Murata, K. Hayashi, T. Yogo, Effect of texturing on polarization switching dynamics in ferroelectric ceramics, Appl. Phys. Lett., 2016, 108, 012907.
- (10) R. Maruyama, W. Sakamoto, I. Yuitoo, T. Takeuchi, K. Hayashi, T. Yogo, Photocurrent enhancement of chemically synthesized Ag nanoparticle-embedded

BiFeO₃ thin films, Jpn. J. Appl. Phys.,
2016, 55, 10TA14-1.

名大チーム ” , 中日新聞. 2016年12月
18日

- (11) K. Hayashi, Multifunctional hybrid
nanoparticles for biomedical applications,
J. Ceram. Soc.Jpn., 2016, 124, 855–62.

2. 学会発表

- (1) **林幸彦朗**, ハイブリッドナノ粒子のバ
イオメディカル応用, 平成 28 年度日本
セラミックス協会東海支部学術研究発
表会, 名古屋, 2016 年 12 月.
- (2) **林幸彦朗**, 山田翔太, 坂本渉, 余語利信,
赤血球様粒子の作製と体内動態の解明,
第 32 回日本 DDS 学会学術集会, 静岡,
2016 年 6 月.
- (3) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T.
Yogo, Dual Stimulus-Responsive
Degradable Hollow Organic-Inorganic
Hybrid Nanoparticles for Image-Guided
Trimodal Therapy, The 1st International
Symposium on Creation of Life Innovation
Materials for Interdisciplinary and
International Researcher Development
(iLIM-1), Osaka, Oct. 17-18, 2016.

E . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) **林幸彦朗**, 坂本渉, 余語利信, 丸岡弘
規, “ フローサイトメトリー用蛍光プ
ローブ及び蛍光標識細胞の選別方法 ”
出願番号 (国内 : 特願 2016-91356 ,
2016 年 04 月, 国際 : 2017 年 2 月 10 日,
PCT/JP2017/4979) , 名古屋大学, 倉敷
紡績株式会社, 日本国.
- 2) **林幸彦朗**, 坂本渉, 余語利信, 丸岡弘
規, “ 蛍光プローブ、蛍光検出方法及
び蛍光プローブの使用法 ” , 出願番
号 (国内 : 特願 2016-91359 , 2016 年 04
月, 国際 : 2017 年 2 月 10 日,
PCT/JP2017/4981) , 国立大学法人名古
屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

3. その他

- 1) **林幸彦朗** “ 新ナノ粒子でがん狙い撃ち

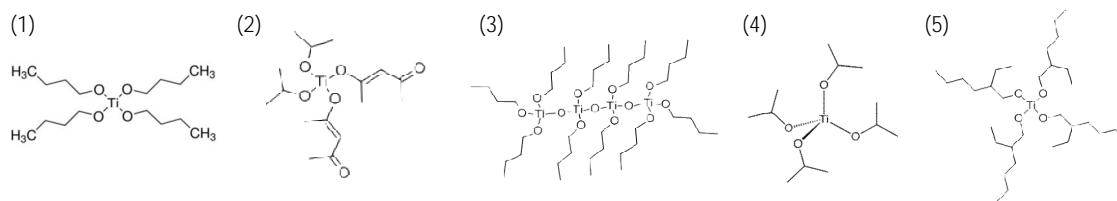


図 1. 原料の構造：(1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate, (5) titanium 2-ethylhexyloxide

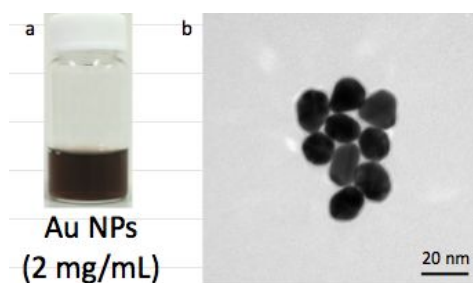


図 2 (a). 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

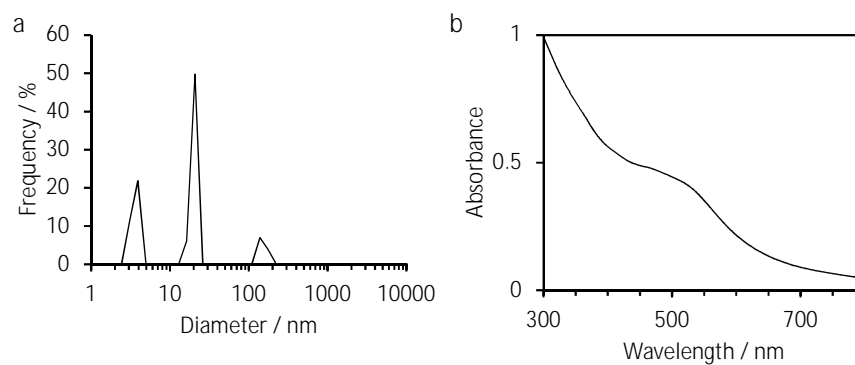


図 3 (a). 金ナノ粒子の水溶液中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

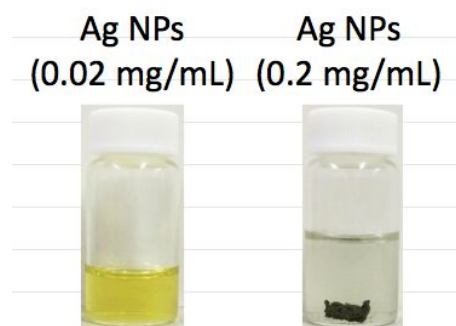


図 4. 一般的な方法で作製した銀ナノ粒子水溶液の写真：
(左) 0.02 mg/mL, (右) 0.2 mg/mL

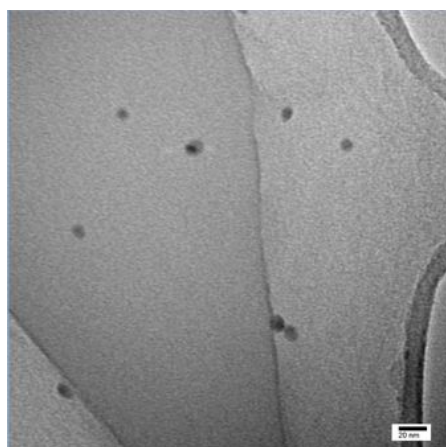


図 5. B3の方法で作製した銀ナノ粒子の TEM 像

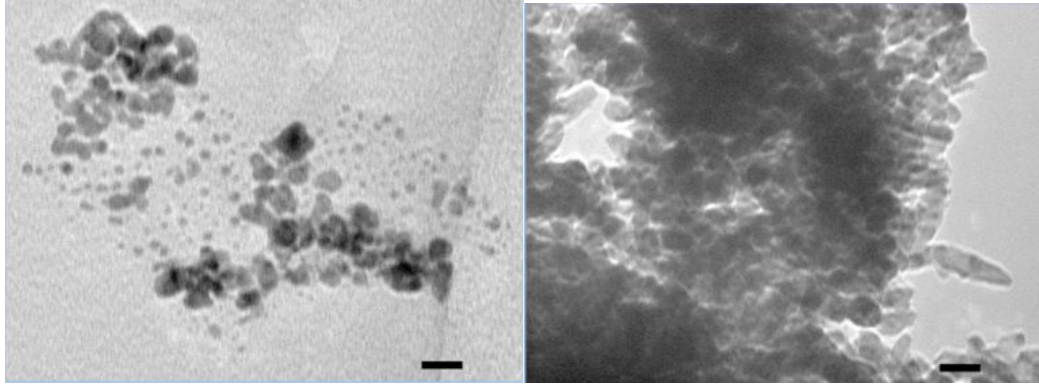


図 6. 4.4 の方法により作製した金ナノ粒子（左）と銀ナノ粒子（右）の TEM 像（スケールバー：20 nm）

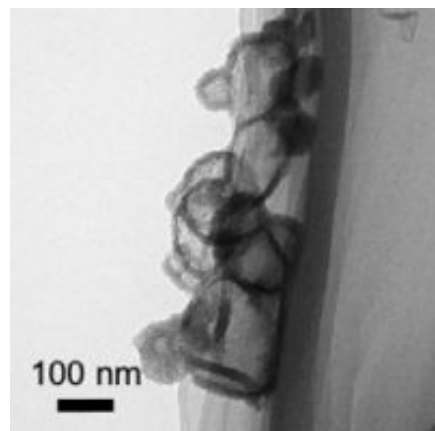


図 7. 中空酸化チタンナノ粒子の TEM 像

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
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

研究代表者 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

昨年度より、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っており、肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系の妥当性について、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて検証した。また、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いの状態が遺伝毒性に対する影響についても観察した。繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-S 及び MWCNT-L)を *gpt delta mouse* に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両 MWCNT ともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じ MWCNT を用いて行った、共培養系による *in vitro* 試験系でも、MWCNT の曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo* 変異原性試験の結果を支持するものとなった。更に、変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MWCNT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。何の MWCNT 投与でも G:C→A:T 変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。これらのことから、共培養システムは、生体を模倣する試験系として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、表面修飾の異なる金属ナノ粒子の毒性評価を行っている。

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。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。

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ている。本年度は、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いが遺伝特性に対する影響について観察した。

B. 研究方法

in vivo 遺伝毒性試験法

10 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)を 2%カルボキシメチルセルロース (CMC) 水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で気管内反復投与（1 回/週 x 4 週）を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを屠殺後、肺を摘出し、突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子解析は、ゲノム DNA を抽出して行った。

共培養システムによる遺伝毒性試験法

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。MWCNT-L 及び MWCNT-S を RAW264 のみ、または RAW 264 と GDL1 の両方に 24 時間曝露させた後にトリプシン処理により GDL1 を回収し、一定期間培養した後に突然変異の解析に供した。

gpt 遺伝子を指標とした変異原性試験気管内投与及び共培養系において、ナノマテリアルを曝露した組織、細胞から DNA を抽出し、*in vitro* パッケージングによってトランスジーン λ EG10 をファージ粒子として回収した。回収したファージを Cre 組換え酵素発現している大腸菌 YG6020 株に感染させると、 λ EG10 上にある一組の loxP 配列に挟まれた領域が Cre 組換え酵素によって切り出され、プラスミドに転換する。感染後の YG6020 菌液を 6-thioguanin (6-TG) と chloramphenicol (Cm) を含む M9 寒天培地に播いて 37 で培養すると、プラスミド上の *gpt* 遺伝子が不活化している変異体のみが、6-TG を含む寒天培地上でコロニーを形成する。また、Cm を含む M9 寒天培地に播いて生じたコロニー数から、感染ファージ由来のプラスミドによる形質転換効率を求め、変異コロニー数を形質転換コロニー数で除去して突然変異頻度を算出した。

(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

in vivo 遺伝毒性試験法

繊維長の異なる MWCNT の遺伝毒性を *in vivo* 及び *in vitro* 共培養系で評価し、得られた遺伝毒性の結果を比較した。まず *in vivo* 遺伝毒性試験から検討を行った。MWCNT-L 及び MWCNT-S を *gpt* delta mouse に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった。解析の結果、MWCNT 投与により肺の変異頻度は溶媒対象群(2% CMC)に比べて約 3~4 倍に上昇したが、繊維長の違いによる変異頻度に対する影響は観察されなかった (図 1)。次に、繊維長の異なる MWCNT による変異パターンを解析した。まだ、変異クローンの解析数が少ないが、コントロールの変異パターンと比較

して、MWCNT 投与により G:C→A:T 変異が上昇する傾向が観察された。また、変異頻度と同様に、繊維長の違いによる変異スペクトルへの影響はほとんど観察されなかった (図 2)。

共培養システムによる遺伝毒性試験法

共培養条件下の RAW 細胞または RAW 及び GDL1 の両細胞に繊維長の異なる MWCNT を 24 時間曝露し、6~7 日間培養した後、GDL1 細胞から DNA を抽出し、*gpt* 遺伝子を標的とした変異原性試験を行った。MWCNT の RAW のみ、及び RAW と GDL1 の両細胞への曝露群ともに、コントロールと比較して変異頻度の上昇傾向が観察された。また、この時に観察された変異頻度に対して、MWCNT の繊維長の違いは影響していないことがわかった (図 2)。

D . 考察

昨年度、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた肺の遺伝毒性評価系として共培養システムを構築した。今年度は、この評価系を用い、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の遺伝毒性に対する繊維長の影響を観察した。

繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-S 及び MWCNT-L) を *gpt* delta mouse に気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両 MWCNT ともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じ MWCNT を用いて行った、共培養系による *in vitro* 試験系でも、MWCNT の曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo* 変異原性試験の結果をサポートするものとなった。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MWCNT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。現在のところ、*in vivo* 試験で得られた一部の変異クローンの解析データのみではあるが、何の MWCNT 投与でも G:C→A:T 変異が増加しており、繊維長の違いによる変異スペクトルの影響は殆どないものと思われた。(一部 A:T→T:A 変異が MWCNT-L で増加しているように思われるが、解析サンプル数が少なく、まだ結論できない。さらに解析数を追加し

て検討する必要がある) 我々の以前の報告によると、本研究で用いたものとは異なるMWCNT (MWCNT-7)を用いて行った*in vivo* 遺伝毒性試験の結果では、MWCNT-7投与により、マウス肺ではG:C→C:G変異が上昇したことを見出している。このことは、変異誘発のメカニズムがMWCNT-7と本研究で用いたMWCNT-S/-Lでは異なる可能性が考えられる。その要因にはどのようなメカニズムが存在し、こういった物理的な性質が寄与するのかについてはまだよくわかっていない。おそらく、細胞内への取り込みやROS産生能などを介したものと推測されるので、今後は、これらの点についても検討を行う必要があると思われる。毒性誘発のメカニズムが明らかになれば、有用なナノ材料の毒性低減化方法の提言へとつながるとと思われる。

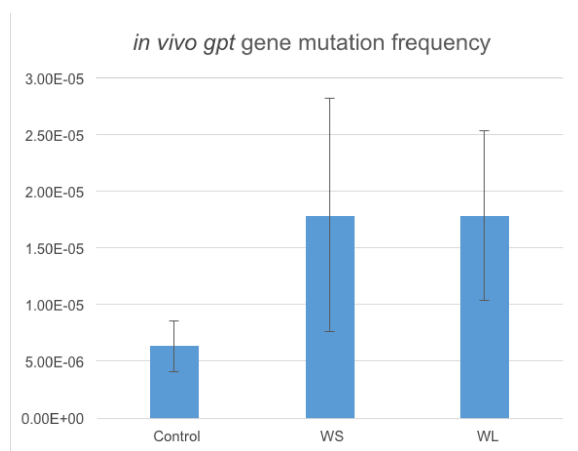


図1. 繊維長の異なるMWCNTの*in vivo*遺伝毒性

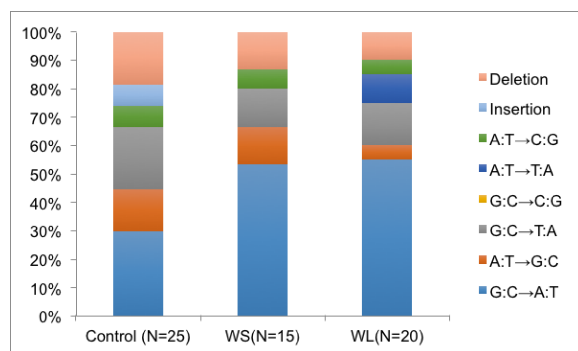


図2. *gpt delta*マウス肺に観察された変異スペクトル

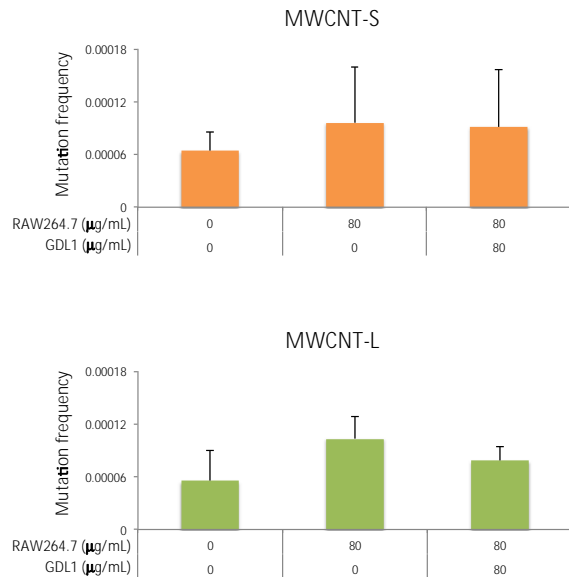


図3. 単培養及び共培養下にGDL1細胞に観察された*gpt*変異頻度

E. 結論

昨年度までに肺毒性試験系として、マウス肺より樹立した細胞株(GDL1細胞)とマクロファージ(RAW264.7)を共培養システムの構築を行った。本年度は、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて、本システムの妥当性の検証及び、毒性の低減化も考慮して、繊維長の違いに対する影響についても観察した。繊維長の異なるMWCNT (MWCNT-S及びMWCNT-L)を*gpt delta* マウスに気管内反復投与し、肺における点突然変異の解析をおこなった結果、コントロールと比較して両MWCNTともに変異頻度の上昇が観察されたものの、繊維長の違いによる変異頻度への影響は観察されなかった。同じMWCNTを用いて行った、共培養系による*in vitro*試験系でも、MWCNTの曝露による変異頻度の上昇は観察されたが、繊維長の違いによる変異頻度の影響は観察されず、*in vivo*変異原性試験の結果をサポートするものとなった。これらのことから、共培養システムは、生体を模倣する試験系として有用であることが示唆された。また、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材料や様々な表面修飾を施したナノ材料の毒性評価を行なうことで、有用なナノ材料のリスク低減化を検討する。

F. 健康危険情報

特になし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) S. Mimaki, Y. Totsuka, Y. Suzuki, C. Nakai, M. Goto, M. Kojima, H. Arakawa, S. Takemura, S. Tanaka, S. Marubashi, T. Matsuda, T. Shibata, H. Nakagama, A. Ochiai, S. Kubo, S. Nakamori, H. Esumi, K. Tsuchihara. Hypermutation and unique mutational signatures of occupational cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes. *Carcinogenesis* 2016, 37, 817-26.
- (2) T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, M. Watanabe, Y. Totsuka. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of Kaolin. *Genes Environ.*, 2017, 39, 12.

2. 学会発表

- (1) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 50th Anniversary Conference IARC, Lyon, 2016年6月.
- (2) Y. Totsuka, M. Watanabe, K. Hayashi, D. Nakae. Development of a novel in vitro mechanism-based evaluation system of the genotoxicity of nanomaterials. 45th Annual Meeting of the European Environmental Mutagenesis and Genomics Society, Copenhagen, 2016年8月.
- (3) 戸塚ゆ加里, 林櫻松, 加藤護, 十時 泰, 柴田龍弘, 松島芳隆, 中釜斉. DNA アダクトーム解析により中国食道癌の要因を探索する. 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.
- (4) 伴野勸, 山地太樹, 岩崎基, 成島大智, 加藤護, 戸塚ゆ加里, 三好規之, 今井俊夫. 血漿中 cis-4-decenal の大腸がんリスクマーカーとしての可能性, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016年10月.

- (5) 三牧幸代, 中森正二, 久保正二, 木下正彦, 戸塚ゆ加里, 中釜斉, 落合淳志, 江角浩安, 土原一哉. 職業性胆管がん1症例に認められた同時多発腫瘍の変異プロファイルの比較, 第 75 回日本癌学会学術総会, 横浜, 2016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の統合による発がん要因の探索. 第 59 回日本放射線影響学会, 広島, 2016年10月.
- (7) 前迫裕也, 善家茜, 古川英作, 加藤 護, 椎崎一宏, 中釜斉, 戸塚ゆ加里. 職業性胆管がん発生に關与する 1,2-ジクロロプロパンの DNA 付加体の網羅的な解析 (アダクトーム解析), 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016年11月.
- (8) 戸塚ゆ加里, 善家茜, 古川英作, 加藤護, 十時泰, 柴田龍弘, 中釜斉. 次世代シーケンサーと DNA アダクトーム解析の統合による発がん要因の探索, 第 45 回日本環境変異原学会, つくば, 2016年11月.
- (9) Y. Totsuka, H. Sato, N. Akiba, D. Nakae, N. Suzui-Kemuriyama, M. Watanabe, K. Hayashi. Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials. International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS) International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016年6月.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

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

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

3D 皮膚モデルを用いたナノマテリアルの経皮毒性評価系構築

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
研究協力者 美谷島 克宏 東京農業大学応用生物科学部食品安全健康学科 准教授
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

本分担研究の目的は、3D ヒト皮膚再構成系を利用して、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* スクリーニング評価モデルを開発することである。本年度は、LabCyte EPI モデル（株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング）を用いた 3D ヒト皮膚再構成系において金ナノ粒子および銀ナノ粒子の表皮傷害性と表皮侵入性について、ヒト肝細胞癌由来の HepG2 細胞を用いた単層培養系において、当該ナノ粒子の細胞傷害性について、それぞれ解析した。その結果、3D ヒト皮膚再構成系においては、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出を指標として解析した結果、金ナノ粒子・銀ナノ粒子共に最高 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで表皮傷害性を示さなかった。また、病理組織学的に検索したところ、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、いずれも、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった。単層培養系においては、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出または生細胞によるニュートラルレッド取り込みを指標として解析した結果、金ナノ粒子・銀ナノ粒子共に最高 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度まで細胞傷害性を示さなかった。以上より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本実験条件下において明らかな細胞傷害性を示さず、また、表皮内に侵入しないことが明らかとなった。また、LabCyte EPI モデルは、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* スクリーニング評価モデルに利用し得るものと評価された。

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、3Dヒト皮膚再構成系を用いて、金属ナノ粒子の経皮毒性に関する新規*in vitro*評価系を構築することである。

B. 研究方法

1) 細胞

3D ヒト皮膚再構成系としては、LabCyte EPI 24 モデル (株式会社ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング)(図 1) を、当該モデルに添付の培養液と共に用いた。培養条件は、温度 37 °C、受動湿潤、気相条件 95% 空気・5% 二酸化炭素とした。なお、LabCyte EPI 24 モデルは、14 日齢にて納入され、24 時間培養後の 15 日齢にて実験に供した。

単層培養系としては、HepG2細胞を、Low-Glucose-D-MEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium)にL-グルタミン酸溶液・ペニシリンストレプトマイシンを添加して胎仔ウシ血清を10%混合した培養液で継代したものを用いた。培養条件は、前項と同様とした。

2) 金属ナノ粒子

金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本研究の研究分担者である林 幸孝朗 博士 (名古屋大学エコトピア科学研究所) が作成し、本研究班全体に分配したものである。詳細は、林博士の報告書を参照されたい。

金ナノ粒子 (一次粒径4-10 nm) は、システイン水溶液 (2260 µg/mL) を媒体とし、濃度7300 µg/mLの懸濁液として供給された。一方、銀ナノ粒子 (一次粒径4-10 nm) は、同様のシステイン水溶液を媒体とし、濃度5500 µg/mLの懸濁液として供給された。

3) 生化学的細胞毒性解析

細胞毒性は、細胞死による培養液中への乳酸脱水素酵素漏出 (LDHアッセイ)、ま

たは生細胞によるニュートラルレッド取り込み (NRアッセイ) を指標として、解析した。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

4) 病理学的表皮傷害性および表皮侵入性解析

3Dヒト皮膚再構成系においては、ヘマトキシリン・エオジン (HE) 染色に加え、金染色・銀染色を行い、表皮傷害性および表皮内侵入性について解析した。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

5) その他

3Dヒト皮膚再構成系においては、今後の金・銀の含有量に関する分析学的解析に供するため、実験終了時に培地を回収すると共に、表皮組織の一部を凍結保存した。

(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) 3D ヒト皮膚再構成系における金属ナノ粒子の表皮傷害性および表皮内侵入性

金ナノ粒子については、最終濃度 1・3・7・15・31・62.5・125・250・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン (最終濃度 2260 µg/mL) を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。LDH アッセイによる解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった (図 2)。また、HE 染色および金染色による病理組織学的検索を行った結果、金ナノ粒子は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に

明らかな傷害を与えなかった(図3)。

銀ナノ粒子については、最終濃度 31・125・500・1000 µg/mL (システイン最終濃度 2260 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 2260 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。LDH アッセイによる解析を行った結果、銀ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な表皮傷害性を示さなかった(図4)。また、HE 染色および銀染色による病理組織学的検索を行った結果、銀ナノ粒子は、表皮内に侵入せず、また接触する表皮表面に明らかな傷害を与えなかった(図5)。

2) 単層培養系における金属ナノ粒子の細胞傷害性

金ナノ粒子については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 226 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、ウェルあたり 100 µL の培養液中に 10 µL の容量で投与した。LDH アッセイ(図6)および NR アッセイ(図7)による細胞毒性解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

銀ナノ粒子については、最終濃度 0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mL (システイン最終濃度 226 µg/mL) で 24 時間曝露した。陰性対照には蒸留水を、媒体対照にはシステイン(最終濃度 226 µg/mL)を、それぞれ投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、3D ヒト皮膚再構成系の表皮表面に 100 µL の容量で投与した。被験物質または対照物質は、いずれの場合も、ウェルあたり 100 µL の培

養液中に 10 µL の容量で投与した。LDH アッセイ(図8)および NR アッセイ(図9)による細胞毒性解析を行った結果、金ナノ粒子は、いずれの用量でも有意な毒性を示さなかった。

D. 考察

以上の結果より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、少なくとも本実験条件下において、3D ヒト皮膚再構成系・単層培養系いずれでも明らかな細胞傷害性を示さず、また、3D ヒト皮膚再構成系で表皮内に侵入しないことが明らかとなった。なお、金ナノ粒子の最大無毒性量(NOEL)は、3D ヒト皮膚再構成系で 1000 µg/mL (= 5.08 mM)、単層培養系で 100 µg/mL (= 0.51 mM)であった。一方、銀ナノ粒子の NOEL は、3D ヒト皮膚再構成系で 1000 µg/mL (= 5.26 mM)、単層培養系で 100 µg/mL (= 0.53 mM)であった。

金ナノ粒子の細胞毒性量については、実験に供する金ナノ粒子の物性や細胞の種類などに依存して異なるためばらつきが大きい。種々の哺乳類細胞培養系を用いて 1 nM から 300 µM で有意に検出された例が報告されている(1-3)。これに対して、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない、このことは、本研究が実験に供した金ナノ粒子がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝(癌)細胞や再構成皮膚組織が金ナノ粒子の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことを示唆する。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.08 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった。金属ナノ粒子の皮膚透過性について、現時点では透過しないという理解が支配的であるが、そうでないことを示す知見も報告されている(4-11)。したがって、本研究の結果は金ナ

ノ粒子が表皮細胞内に侵入すらできないことを明確に示したものであるが、本研究で用いた 3D ヒト皮膚再構成系は毛孔とその付属組織や汗腺などがいないため、それらを介した侵入の可能性については評価できない。しかし、先行研究の多くは、それらの経路を介した金属ナノ粒子の皮膚透過性がないか、あったとしても明らかな毒性を誘導するレベルのものでないとしている(4,6,7,10,11)。なお、ヒトや動物の皮膚には、バリア機能があり、外来化学物質に対する防御機構の一翼を担っている(12)。本研究の 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮侵入性の欠如には、このバリア機能が再現されて関与しているものと推察される。

銀ナノ粒子の細胞毒性量についても、金ナノ粒子の場合と同様に、種々の哺乳類細胞培養系を用いて 5 nM から 2.36 μ M の 50% 毒性量が報告されている(13,14)。これに対して、本研究では、それら先行報告よりはるかに高い用量で細胞傷害性がみられていない、このことは、金ナノ粒子の場合と同様に、本研究が実験に供した銀ナノ粒子がそれら先行報告で使用されたものに比べて毒性が低いものであったか、肝(癌)細胞や再構成皮膚組織が銀ナノ粒子の毒性に対して感受性が低かったか、または、それらの両者であったことを示唆する。また、3D ヒト皮膚再構成系においては、5.26 mM という莫大な用量で曝露しても表皮傷害性を示さず、表皮内に侵入しなかった。本研究の結果は、銀ナノ粒子が表皮細胞内に侵入すらできないことを、明確に示したものである。この点に関する考察は金ナノ粒子の場合と同様であるので、ここでは繰り返さない。

本研究は、少なくとも本実験条件の下で金ナノ粒子・銀ナノ粒子の毒性が低いことを明らかにしたが、これらが明確な遺伝毒

性を持たない(15)ことを考え合わせると、金ナノ粒子・銀ナノ粒子の安全性を比較的高く評価してよいことが示唆された。

E. 結論

以上より、金ナノ粒子・銀ナノ粒子は、本実験条件下において明らかな細胞傷害性を示さず、また、表皮内に侵入しないことが明らかとなった。また、LabCyte EPI モデルは、ナノマテリアルの経皮毒性の新しい *in vitro* 評価系として利用し得るものと評価された。

F. 参考文献

- (1) Jain S, Coulter JA, Butterworth KT, Hounsell AR, McMahon SJ, Hyland WB, Muir MF, Dickson GR, Prise KM, Currell FJ, Hirst DG and O'Sullivan JM "Gold nanoparticle cellular uptake, toxicity and radiosensitisation in hypoxic conditions." *Radiotherapy and Oncology* 110(2), 342-347, 2014.
- (2) Vetten MA, Tlotleng N, Tanner Rascher D, Skepu A, Keter FK, Boodhia K, Koekemoer LA, Andraos C, Tshikhudo R and Gulumian M "Label-free *in vitro* toxicity and uptake assessment of citrate stabilised gold nanoparticles in three cell lines." *Particle and Fibre Toxicology* 10:50, 2013.
- (3) Bajak E, Fabbri M, Ponti J, Gioria S, Ojea-Jiménez I, Collotta A, Mariani V, Gilliland D, Rossi F, Gribaldo L "Changes in Caco-2 cells transcriptome profiles upon exposure to gold nanoparticles." *Toxicology Letters* 233(2), 187-99, 2015.
- (4) Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC and Wong JK "The dynamic anatomy and patterning of skin." *Experimental Dermatology* 25(2), 92-98,

- 2016.
- (5) Matsuo K , Hirobe S, Okada N and Nakagawa S “Analysis of skin permeability and toxicological properties of amorphous silica particles.” *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 39 (7), 1201-1205, 2016.
- (6) Xie G , Lu W and Lu D “Penetration of titanium dioxide nanoparticles through slightly damaged skin *in vitro* and *in vivo*.” *Journal of Applied Biomaterials and Functional Materials* 13(4), e356-e361, 2015.
- (7) Shakeel M , Jabeen F , Shabbir S , Asghar MS , Khan MS and Chaudhry AS “Toxicity of nano-titanium dioxide (TiO₂-NP) through various routes of exposure: A review.” *Biological Trace Element Research* 172 (1), 1-36, 2016.
- (8) Hirai T , Yoshikawa T, Nabeshi H, Yoshida T, Akase T, Yoshioka Y, Itoh N and Tsutsumi Y “Dermal absorption of amorphous nanosilica particles after topical exposure for three days.” *Pharmazie* 67 (8), 742-743, 2012.
- (9) Nabeshi H , Yoshikawa T, Matsuyama K, Nakazato Y, Matsuo K, Arimori A, Isobe M, Tochigi S, Kondoh, S, Hirai T, Akase T, Yamashita T, Yamashita K, Yoshida T, Nagano K, Abe Y, Yoshioka Y, Kamada H, Imazawa T, Itoh N, Nakagawa S, Mayumi T, Tsunoda S and Tsutsumi Y “Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application.” *Biomaterials* 32 (11), 2713-2724, 2011.
- (10) Sadrieh N , Wokovich AM, Gopee NV, Zheng J, Haines D, Parmiter D, Siitonen PH, Cozart CR, Patri AK, McNeil SE, Howard PC, Doub WH and Buhse LF “Lack of significant dermal penetration of titanium dioxide from sunscreen formulations containing nano- and submicron-size TiO₂ particles.” *Toxicological Sciences* 115 (1), 156-166, 2010.
- (11) Wu J , Liu W, Xue C, Zhou S, Lan F, Bi L, Xu H, Yang X and Zeng FD “Toxicity and penetration of TiO₂ nanoparticles in hairless mice and porcine skin after subchronic dermal exposure.” *Toxicological Letters* 191 (1) 1-8, 2009.
- (12) Wong R, Geyer S, Weninger W, Guimberteau JC and Wong JK “The dynamic anatomy and patterning of skin.” *Experimental Dermatology* 25(2), 92-98, 2016.
- (13) Ivask A, Juganson K, Bondarenko O, Mortimer M, Aruoja V, Kasemets K, Blinova I, Heinlaan M, Slaveykova V and Kahru A “Mechanisms of toxic action of Ag, ZnO and CuO nanoparticles to selected ecotoxicological test organisms and mammalian cells *in vitro*: A comparative review.” *Nanotoxicology* 8 (51), 57-71, 2014.
- (14) Reidy B, Haase A, Luch A, Dawson KA, and Lynch I “Mechanisms of silver nanoparticle release, transformation and toxicity: A critical review of current knowledge and recommendations for future studies and applications.” *Materials* 6 (6), 2295-2350, 2013.
- (15) Nam S-H, Kim SW and An Y-J “No evidence of the genotoxic potential of gold, silver, zinc oxide and titanium dioxide nanoparticles in the SOS chromotest.” *Journal of Applied Toxicology* 33 (10), 1061-1069, 2013.

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 大久保智子, 保坂三継, 中江 大, ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ばく露による細胞傷害に関する研究, 薬学雑誌, 2016, 136 (10), 1433-38 .
- (2) K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, D. Nakae, H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K. Yuzawa, M. Honma, Absence of *in vivo* mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 *gpt* delta rats, Genes Environ., 2017, 39, 42.

2. 学会発表

- (1) Y. Totsuka, H. Sato, N. Akiba, D. Nakae, N. Suzui-Kemuriyama, M. Watanabe, K. Hayashi, Construction of novel *in vitro* evaluation systems based on the genotoxic mechanisms of nanomaterials, International Council of Chemical Associations' Long-Range Research Initiative (ICCA-LRI) and Japan's National Institute of Health Sciences (NIHS) International Workshop: Meeting the Global Challenge of Applying New Scientific Methods to Improve Environmental and Human Health Risk Assessments, 兵庫県淡路市, 2016 年 6 月 .
- (2) 北條幹, 坂本義光, 藤谷知子, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 久保喜一, 長澤明道, 海鉾藤文, 高橋 博, 湯澤勝廣, 安藤弘, 田中和良, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大, MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的解析, 第 43 回日本毒性学会学会学術年会, 愛知県名古屋市, 2016

年 7 月 .

- (3) 坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大, 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を経気管反復投与したラットに見られた肺胞過形成病変に対する病理組織学的解析, 第 75 回日本癌学会総会, 神奈川県横浜市, 2016 年 10 月 .
- (4) 佐藤春菜, 坂本義光, 中江 大, 戸塚ゆかり, 多層カーボンナノチューブの線維長の違いが遺伝毒性に及ぼす影響, 日本環境変異原学会第 46 回大会, 東京都千代田区, 2016 年 11 月 .
- (5) 坂本義光, 北條 幹, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江 大, ラットにおける多層カーボンナノチューブ (CNT) の発がん性と phenyl *N-tert-butyl* nitron (PBN) 併用が及ぼす影響, 第 33 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017 年 1 月 .
- (6) 北條幹, 坂本義光, 山本行男, 長谷川悠子, 多田幸恵, 湯澤勝廣, 広瀬明彦, 猪又明子, 中江大, 多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察 . 第 33 回日本毒性病理学会学術集会, 大阪府堺市, 2017 年 1 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

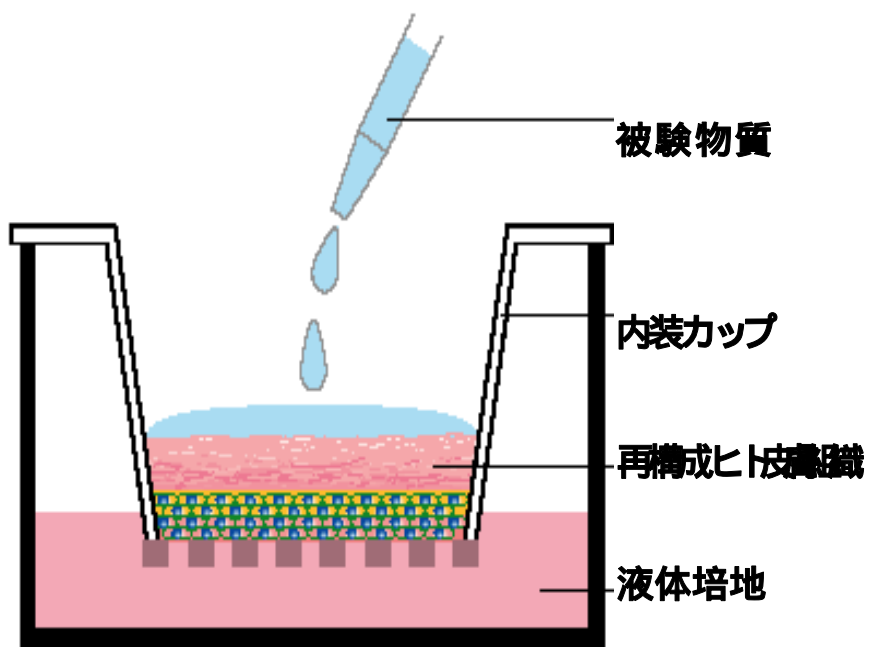


図1 . 3D ヒト皮膚再構成系としての LabCyte EPI 24 モデル

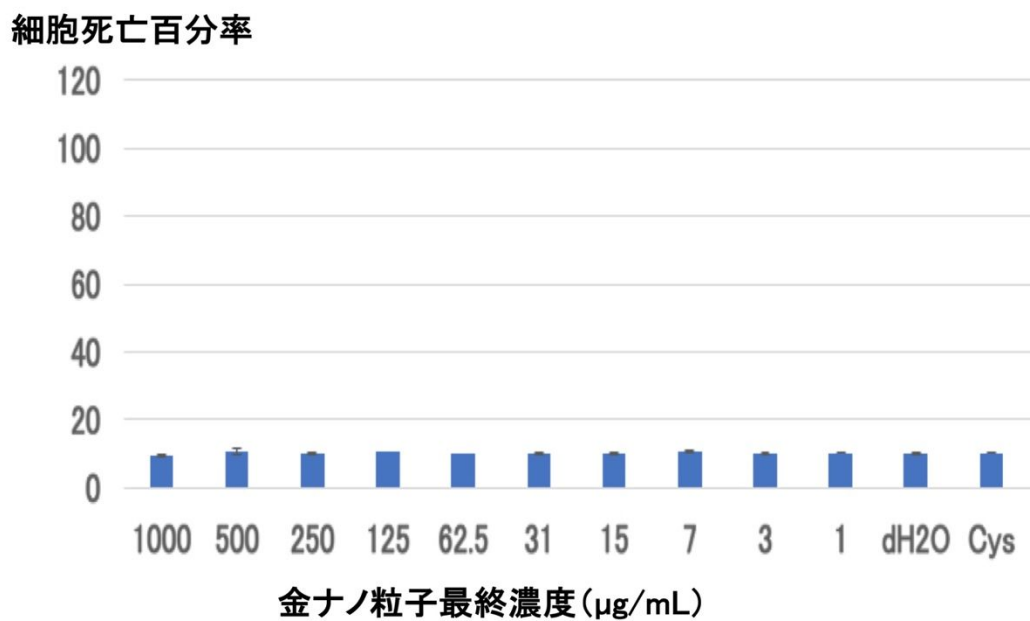


図 2 . 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

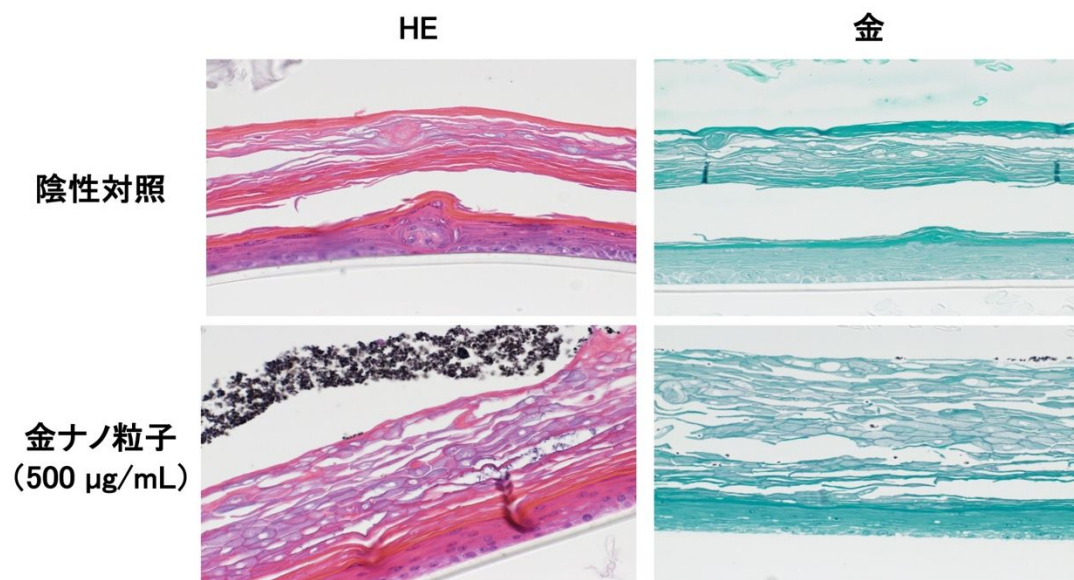


図 3 . 3D ヒト皮膚再構成系における金ナノ粒子の表皮傷害性および表皮侵入性 (HE 染色および金染色)

細胞死亡百分率

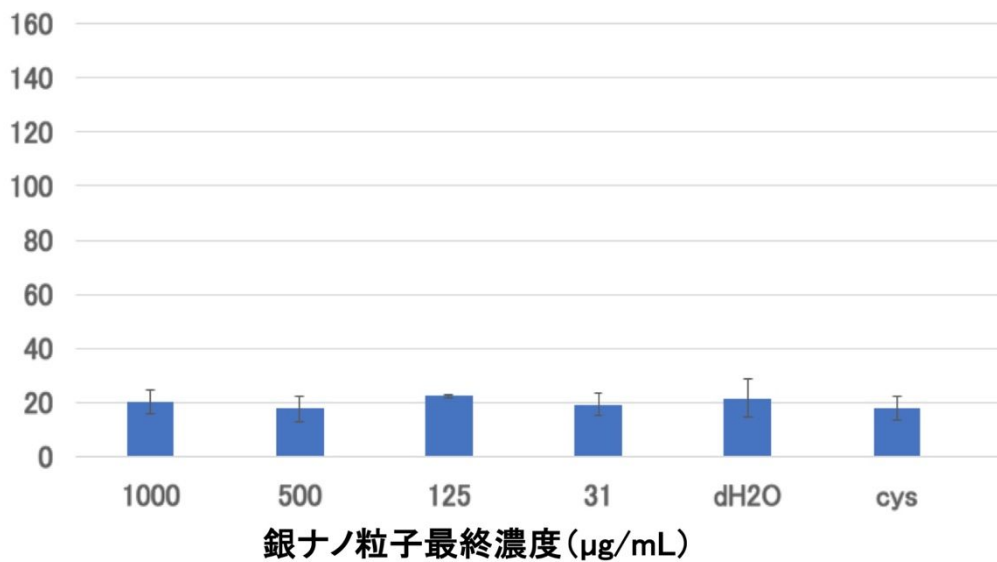


図 4. 3D ヒト皮膚再構成系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差.

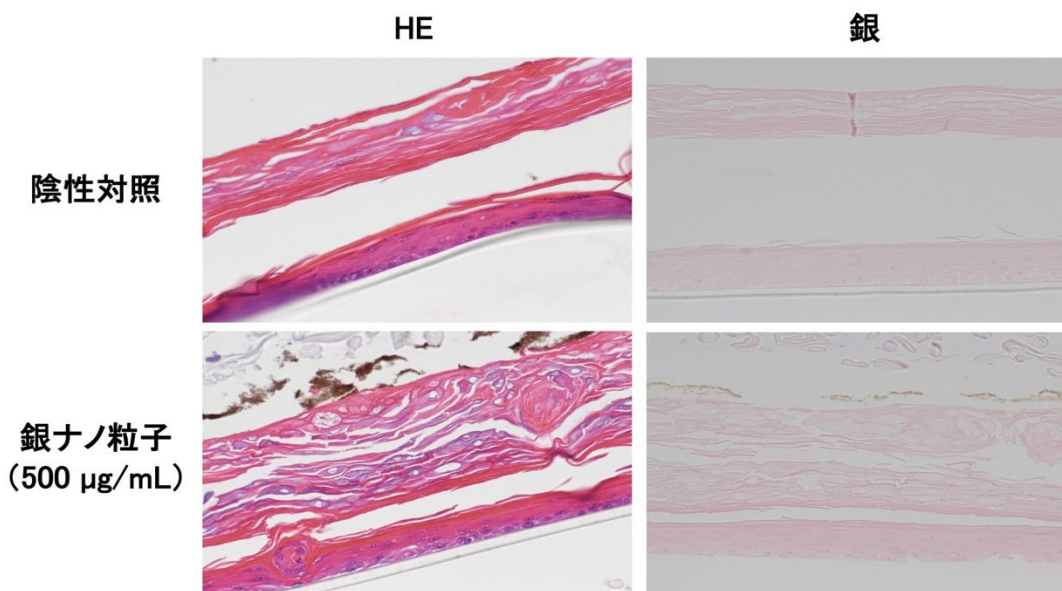


図 5. 3D ヒト皮膚再構成系における銀ナノ粒子の表皮傷害性および表皮侵入性 (HE 染色および銀染色)

細胞死亡百分率

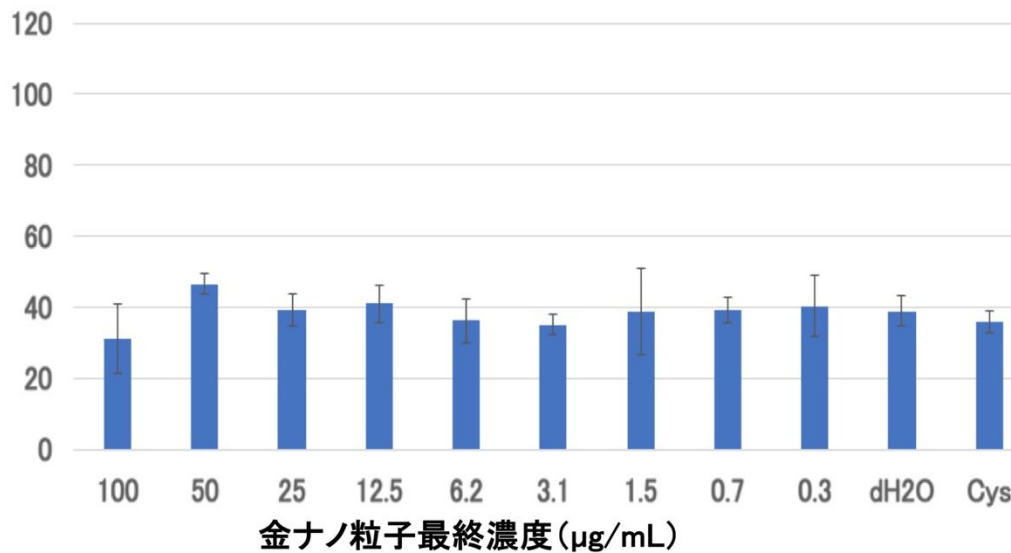


図6. 単層培養系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

細胞生存百分率



図7. 単層培養系における金ナノ粒子の表皮傷害性 (NR アッセイ) 平均 ± 標準偏差 .

細胞死亡百分率

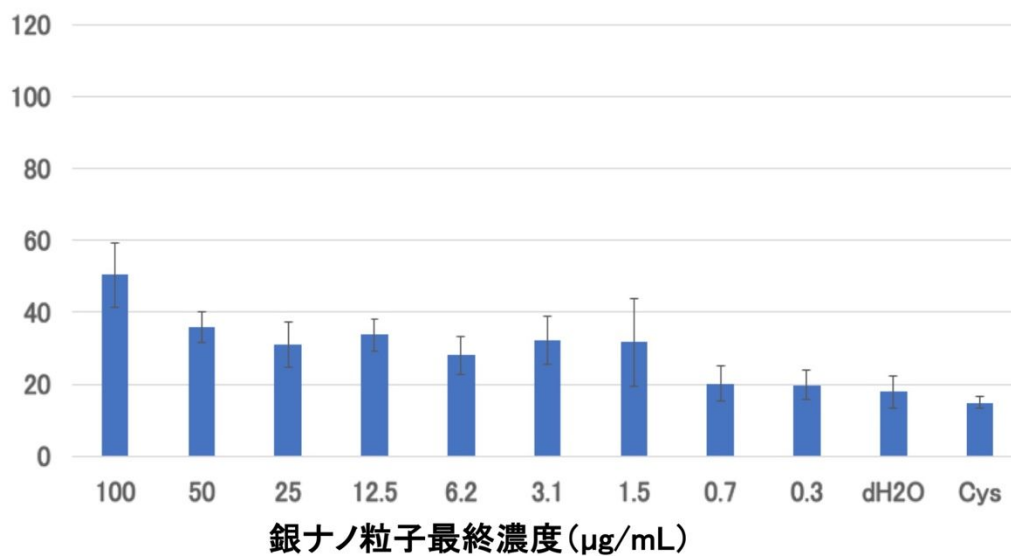


図8. 単層培養系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (LDH アッセイ) 平均±標準偏差.

細胞生存百分率

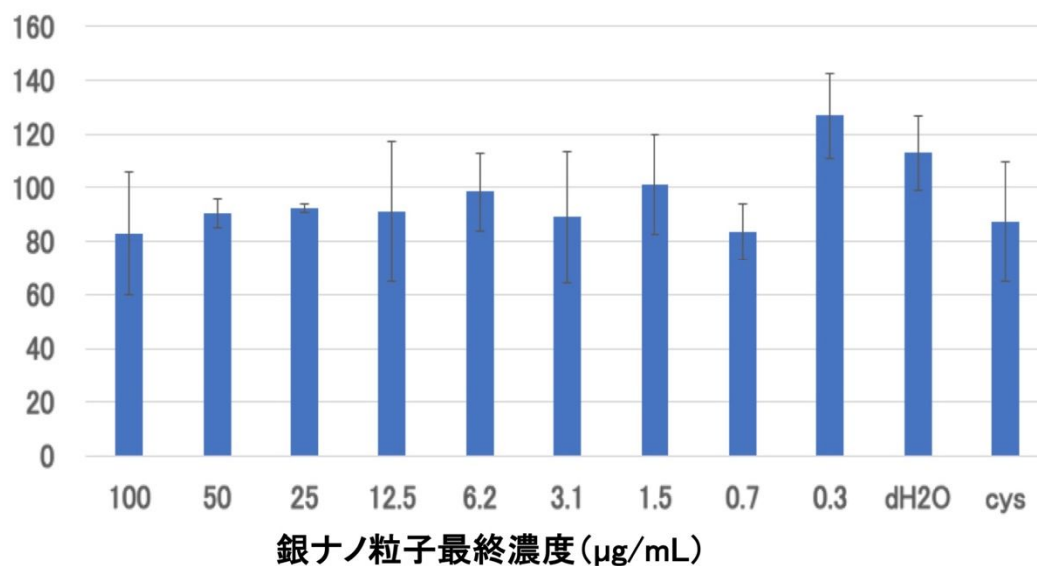


図9. 単層培養系における銀ナノ粒子の表皮傷害性 (NR アッセイ) 平均±標準偏差.

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	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

研究要旨：一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル（NiO）ナノマテリアル懸濁液を用いて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 及びヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。NiO 処理による THP-1 細胞の細胞表面マーカー CD54 及び CD86 の変化についてフローサイトメトリーにより解析した結果、CD54 の相対蛍光強度（RFI）は、用量依存的に上昇が観察されたが、二次粒子径による差異は認められなかった。NiO 処理後の THP-1 細胞をフローサイトメトリーにより前方散乱光（FSC）強度及び側方散乱光（SSC）強度について解析した結果、SSC 強度の分布の変化が観察された。さらに、NiO 処理により培養上清中のサイトカインは IL-8, IL-1 β , TNF の増加が観察され、TNF, IL-1 β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。以上より、NiO の二次粒子径サイズの違いが、THP-1 細胞の細胞毒性や免疫応答に影響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。

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。ナノマテリアルの生体影響には、化学組成に加えて、形状、粒子径、凝集状態、面積、表面荷電など、様々な物理化学的要因

が関与している。我々は、培養細胞を用い、十分にキャラクタリゼーションされたナノマテリアルによる細胞応答を捉え、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てきた。

平成 28 年度は、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる酸化ニッケル（NiO）懸濁

液を用いて、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価して、ヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性及び細胞表面マーカー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への NiO ナノマテリアルの二次粒子径サイズの影響について検討した。

B. 研究方法

1) 材料及び物理化学的特性の測定

NiO ナノマテリアル (Sigma-Aldrich, 一次粒子径 : <50 nm) を用い、サイズの異なる粉碎用ジルコニアボール (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) と遊星ボールミル型粉碎機 NP-100 (シンキー) にて二次粒子径の異なる NiO 懸濁原液を調製した。この懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁液及び培地懸濁液中での平均粒子径、粒径分布等を、動的光散乱光度計 ELSZ-2NPA (大塚電子) 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 CdSO₄ (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、1-Chloro-2,4-dinitrobenzene (DNCB) (Sigma-Aldrich), NiCl₂ (WAKO) を用いた。

2) 細胞株及び培養方法

ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 (JCRB) は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) を含む MEM (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は、3-4 日ごとに継代培養した。

ヒト白血病由来単球細胞株 THP-1 (ATCC) は、10% 非働化 FBS、penicillin-streptomycin (PS)、0.055 mM 2-mercaptoethanol を含む RPMI 1640 (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は、 1×10^5 から 8×10^5

cells/mL の範囲で継代培養した。実験には、培養開始後 2 週間以降 2 ヶ月以内の細胞を用いた。

3) 細胞毒性試験 (MTS 法)

A549 細胞は、96-well プレートに播種し (5×10^3 cells/well) 24 時間後に被験液を添加し、48 時間培養した。培地を除去後、100 μ L の Phenol Red-free 培地及び 20 μ L の MTS 試薬 (CellTiter 96[®] Aqueous One Solution Reagent, Promega) を添加し、5% CO₂ インキュベーターで 37°C、1 時間反応した。生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー (490 nm) で測定した。

THP-1 細胞は、96-well プレートに Phenol Red-free 培地を用いて播種し (2×10^4 cells/well) 24 時間後に被験液を添加し、48 時間培養した。40 μ L の MTS 試薬を添加し、同様に生成されるフォルマザンをマイクロプレートリーダー (490 nm) で測定した。

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 μ L 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 μ L 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 μ L の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400 μ L 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) で測定し、FlowJo (Tomy Digital Biology) により解析した。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、以下の式に基づいて相対蛍光強度 (Relative fluorescence intensity (RFI)) により行なった。

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

MFI = Geometric mean fluorescence intensity

5) FSC-SSC ドットプロット解析

NiO 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、NiO で処理した THP-1 細胞をフローサイトメトリーで解析し、10,000 細胞について、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解析した。

6) 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、培養上清を蛋白低吸着チューブに移し、液体窒素で凍結後、-80°C 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、FCAP Array™ Software (Becton Dickinson) により解析した。(検出限界 IL-8 ; 3.6 pg/mL、IL-1β ; 7.2 pg/mL、IL-6 ; 2.5 pg/mL、IL-10 ; 3.3 pg/mL、TNF ; 3.7 pg/mL、IL-12p70 ; 1.9 pg/mL)

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 結果

1) NiO ナノマテリアルの A549 及び 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、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、その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。) ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 細胞及びヒト血球系細胞株 THP-1 細胞を用いた評価系を用いて、細胞毒性について検討した。図 1 及び図 2 に、NiO ナノマテリアルの懸濁原液及び血清含有培地中での粒度分布 (散乱強度分布) を示した。3 種類のジルコニアボールを用いて調製した NiO 懸濁原液 (10 mg/mL) の平均粒子径は、それぞれ 102, 172, 310 nm であった。培地中では懸濁原液より若干平均粒子径は大きくなったものの、同様の傾向を示した。粒径分布も同様の傾向を示した。研究に用いた NiO ナノマテリアルの懸濁液中での平均粒子径と A549 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。A549 及び THP-1 細胞を用いて、細胞毒性試験を実施した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。

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

図 3 に、NiO 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。MTS 試薬を用いて細胞毒性について検討した結果と同様、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められたが、その差は僅かであった。図 4 及び図 5 に NiO 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。CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、NiO 用量依存的に上昇が観察され、NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 783~883 % であったが、NiO 二次粒子径による差異は認められなかった。一方、CD86 の RFI は NiO 処理により NiO 50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ まで NiO 用量依存的な上昇が観察され、その RFI の程度は NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 216~260 % であった。

3) NiO 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、NiO 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。NiO 処理 24 時間後の THP-1 細胞について解析した結果を、図 6 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、NiO 処理により変化がなかったのに対して、SSC は、NiO 処理により用量依存的な分布変化が観察された。また、懸濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど SSC の変化は大きかった。

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

NiO 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、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、NiO 処理により培養上清中の IL-8, IL-1 β , TNF の上昇が観察された (図 7)。IL-6, IL-10, IL-12p70 は検出限界未満であった。IL-8 産生量は、NiO 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で顕著に観察され、400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 処理群の方が産生量が多かった。IL-1 β 及び TNF 産生量は NiO 用量依存的に上昇が観察され、IL-1 β は、NiO (粉碎ジルコニアボールの直径 0.5mm) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において産生量が高かった。TNF 産生量は、NiO (直径 0.5 mm) 200, 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において、NiO (直径 0.05 mm) に比べると産生量が高かったが、IL-8, IL-1 β , TNF のいずれのサイトカインにおいても、NiO の二次粒子径の差異は影響しなかった。

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、一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO 懸濁液を用いて、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒径分布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、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。

細胞毒性試験の結果を、A549 及び THP-1 細胞とで比較すると、どちらの細胞株も懸

濁液中の NiO の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められ、その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。昨年度実施した、2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を用いた A549 及び THP-1 細胞に対する細胞毒性試験では、ZnO (sigma) と ZnO (alfa) を比較すると、どちらの細胞株も ZnO (sigma) の細胞毒性が強いという結果が得られた。IC50 値を比較すると、A549 細胞の方が ZnO の毒性の差が顕著に観察され NiO と同様であった。A549 及び THP-1 細胞は、共にヒトの細胞株であるが由来の組織が異なるため、ナノマテリアルに対する感受性や応答が異なることが予想される。また、細胞の培養状態に関しても接着と浮遊で異なるため、ナノマテリアルとの接触の状態が異なることが、細胞内への取り込み等へ影響を与えている可能性も考えられる。

THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54 の発現量は、NiO の用量依存的に増加したが、二次粒子径による差異は認められなかった。陽性対照物質として用いた NiCl₂ の応答と比較すると、NiO (粉碎用ジルコニアボールの直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 µg/mL と NiCl₂ 250 µM の CD54 RFI が同程度、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 400 µg/mL と NiCl₂ 500 µM の CD54 RFI が同程度であった。また、CD86 RFI においても、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 µg/mL と NiCl₂ 250 µM が同程度であった。THP-1 細胞において、Ni イオンは感作性物質として CD54 及び CD86 の応答に関与することが知られており、NiO ナノマテリアルに対する応答においても Ni イオンが作用している可能性が考えられる。NiO 処理 THP-1 細胞を、フローサイトメトリーにより 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。懸濁液中の NiO の二次粒

子径が大きくなるほど SSC の変化は大きく、細胞内に取り込まれている量が多いと考えられ、細胞内に取り込まれた NiO 量と細胞毒性との間に関連があると考えられた。サイトカイン産生は、NiO により、IL-8, IL-1β, TNF において用量依存的なサイトカイン産生の増加が観察された。TNF, IL-1β 産生量は NiO (直径 0.5 mm) において最も産生が多かったが、NiO (直径 0.05 mm) と NiO (直径 0.1 mm) 間では、二次粒子径による差が認められなかった。また、IL-8 産生量は、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 間で、二次粒子径による差が認められなかったことから、NiO によるサイトカイン産生に二次粒子径は影響を及ぼさないと考えられた。

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

1. 一次粒子径が同じで二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアル懸濁液を用いて、ヒト肺由来上皮様細胞株 A549 及びヒト血球系細胞株 THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、懸濁液中の二次粒子径が大きくなるほど毒性が強くなる傾向が認められた。その傾向は、A549 細胞において顕著に観察された。
2. NiO 処理による THP-1 細胞の細胞表面マーカー CD54 及び CD86 の変化についてフローサイトメトリーにより解析した結果、CD54 の相対蛍光強度 (RFI) は、用量依存的に上昇が観察されたが、二次粒子径による差異は認められなかった。NiO 処理後の THP-1 細胞をフローサイトメトリーにより前方散乱光 (FSC) 強度及び側方散乱光 (SSC) 強度について

解析した結果、SSC 強度の分布変化が観察された。NiO 処理により培養上清中のサイトカインは IL-8, IL-1 β , TNF の増加が観察され、TNF, IL-1 β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。

なし

以上より、NiO の二次粒子径サイズの違いが、THP-1 細胞の細胞毒性や免疫応答に影響していると考えられた。

F. 研究発表

1. 論文発表

1) M. Usami, M Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, A. Miyajima, T. Irie, O. Doi, T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi, Proteomic analysis of valproic acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos., Fundam. Toxicol. Sci., 2017, 4(1), 31-5.

2. 学会発表

1) 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, 二次粒子径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の細胞応答, 第 43 回日本毒性学会学術大会, 名古屋, 2016 年 6 月

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

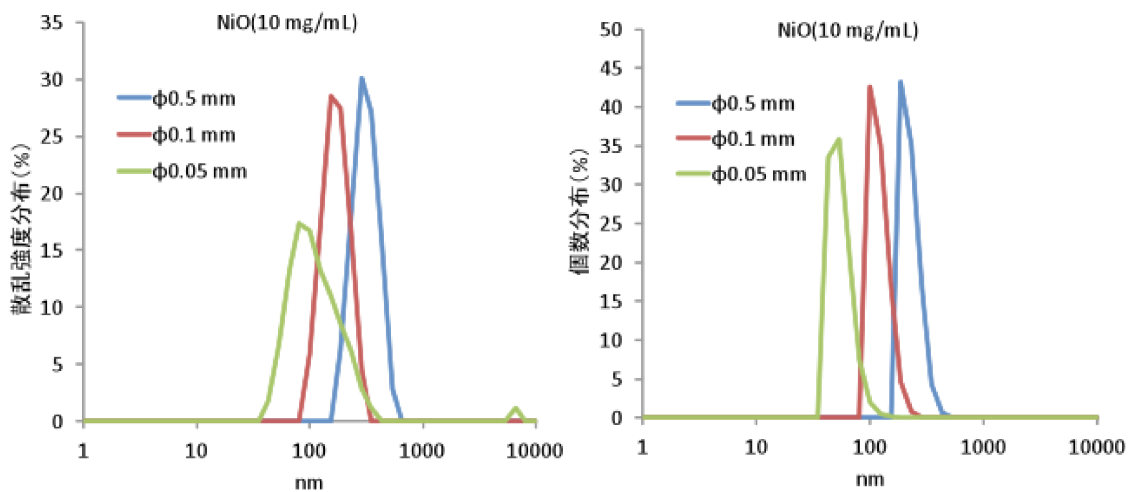


図1 NiO 懸濁原液(10 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

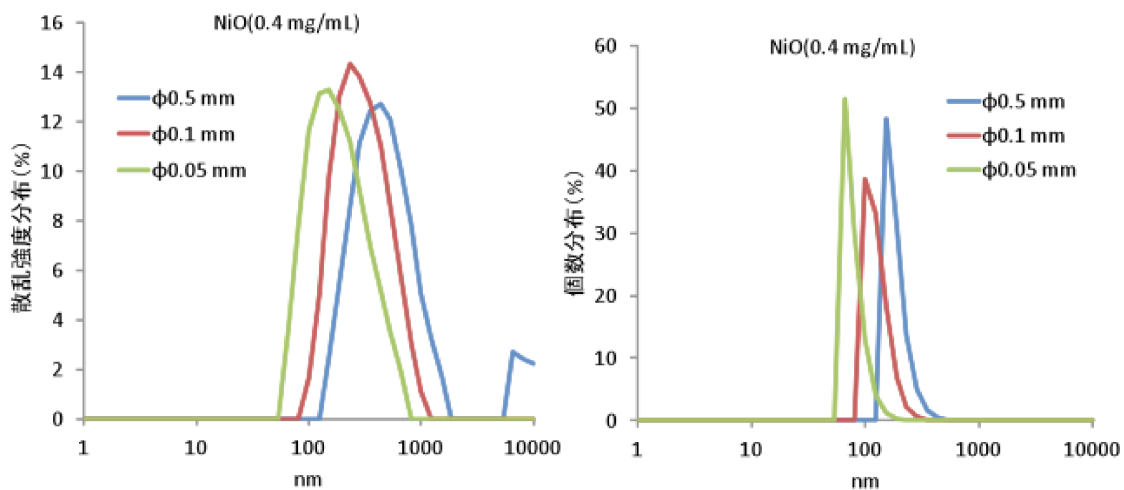


図2 NiO 懸濁液(培地中 0.4 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

表1 NiOナノ粒子の物理化学的特性とA549, THP-1細胞に対する細胞毒性

	懸濁液中平均粒子径 ^a (nm ± SD) ^c					細胞毒性 (IC50)	
	注射用水	10%FBS-MEM培地				A549細胞	THP-1細胞
	(10 mg/ml)	(0.4 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(0.1 mg/ml)	(0.05 mg/ml)	MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$)	MTS法 (48h) ($\mu\text{g/ml}$)
NiO (ϕ 0.05nm) ^b	102.0 ± 0.5	154.8 ± 1.2	152.6 ± 2.5	151.2 ± 3.0	135.2 ± 1.5	147.5	35.8
NiO (ϕ 0.1nm) ^b	172.0 ± 2.8	234.7 ± 2.2	249.9 ± 4.2	258.0 ± 1.5	234.5 ± 17.8	83.5	34.2
NiO (ϕ 0.5nm) ^b	310.4 ± 6.7	373.1 ± 0.6	411.9 ± 13.1	345.1 ± 15.4	414.2 ± 5.8	33.4	30.0

^a 測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA ^b 粉体を秤量後、各サイズのジルコニアボールを用い遊星ボールミル型湿式破砕処理により調製。Tween80(0.1%(w/v))含有。

^c cumulant法より算出

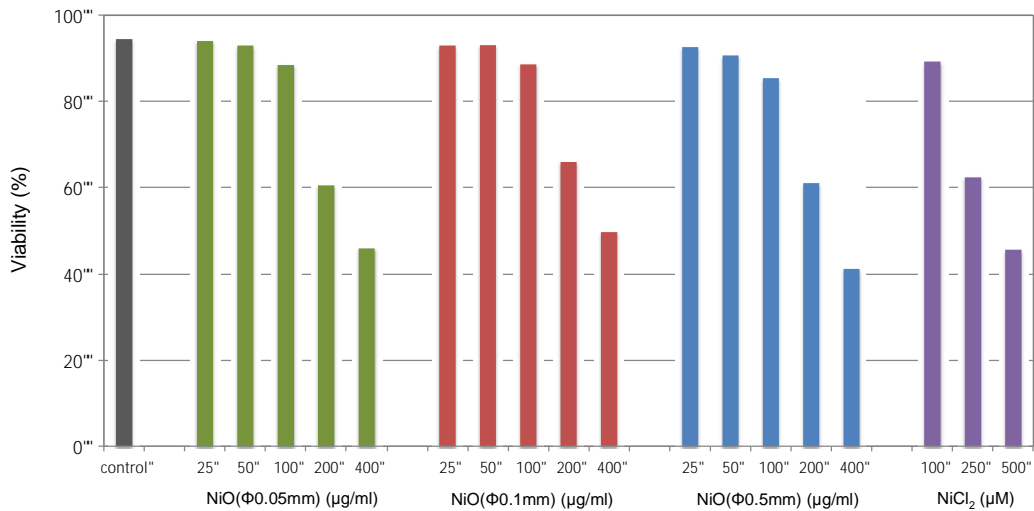


図3 NiO処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

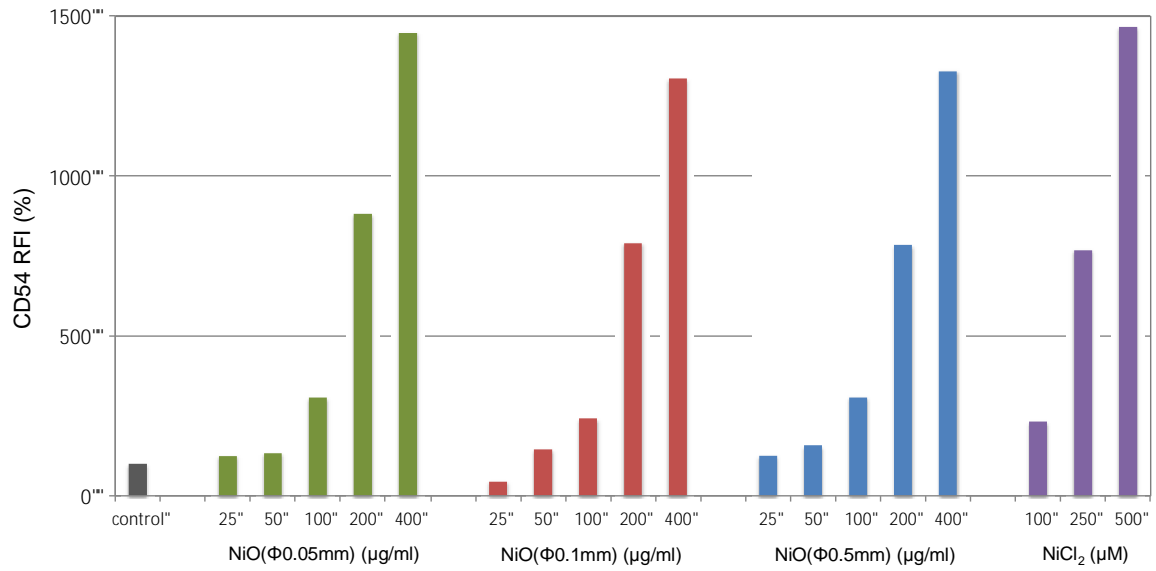


図4 NiO処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

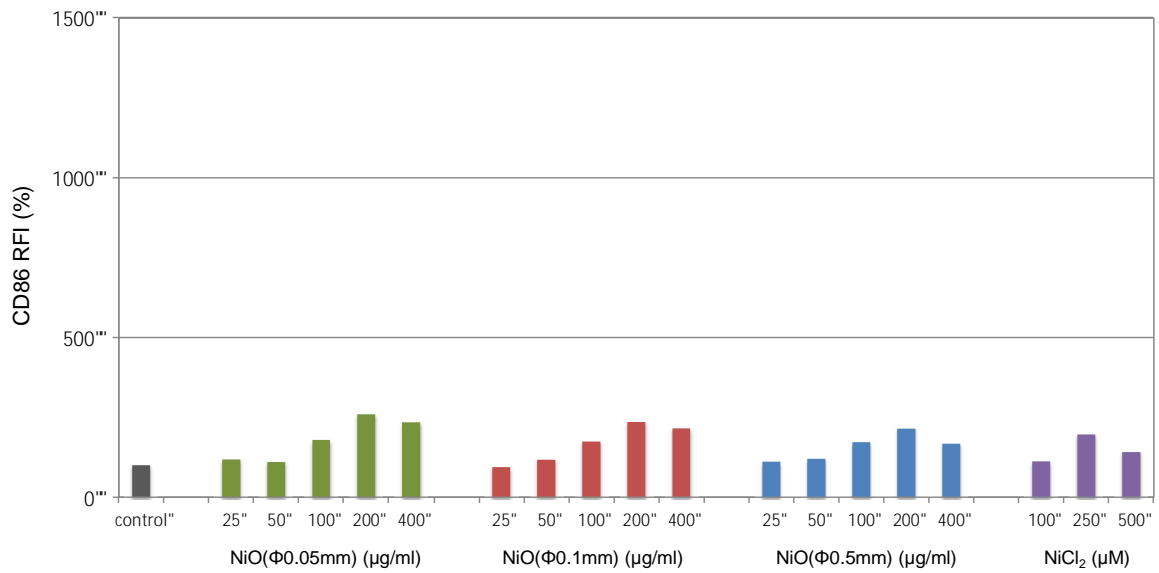


図5 NiO処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

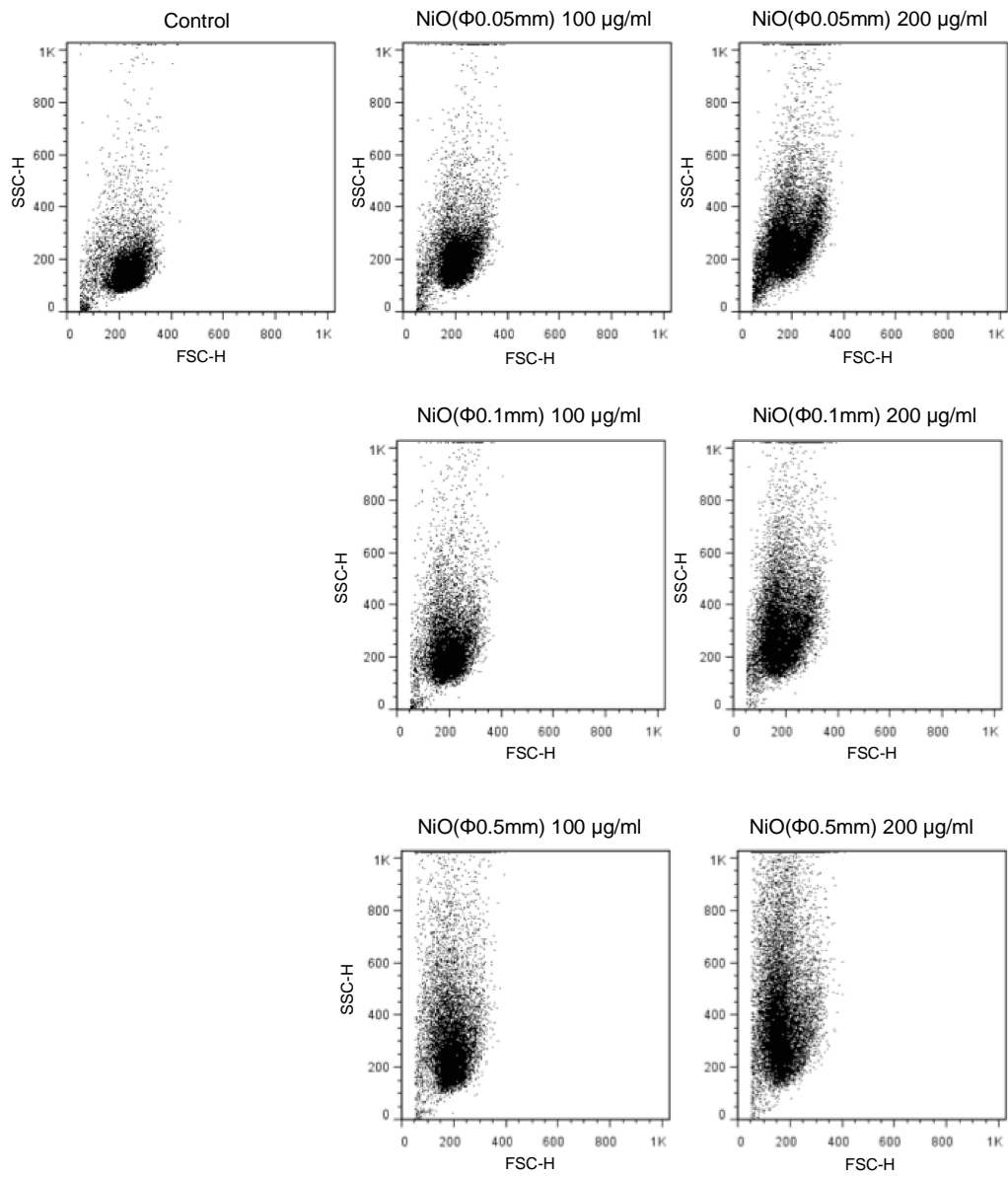


図6 NiO処理24時間後のTHP-1細胞のFSC-SSC ドットプロット

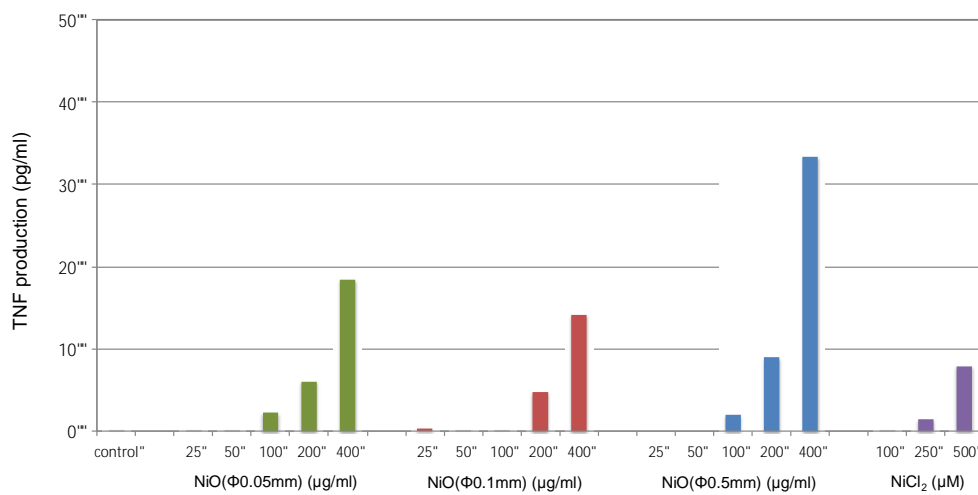
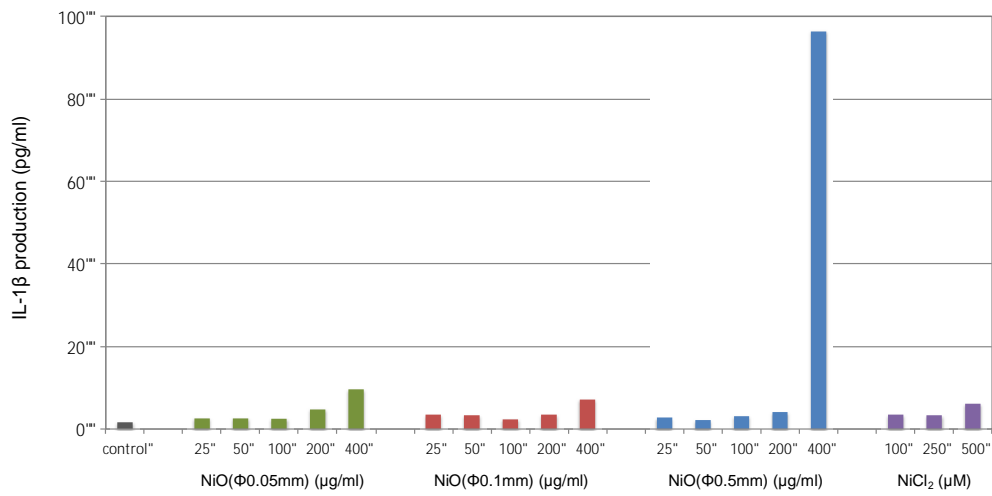
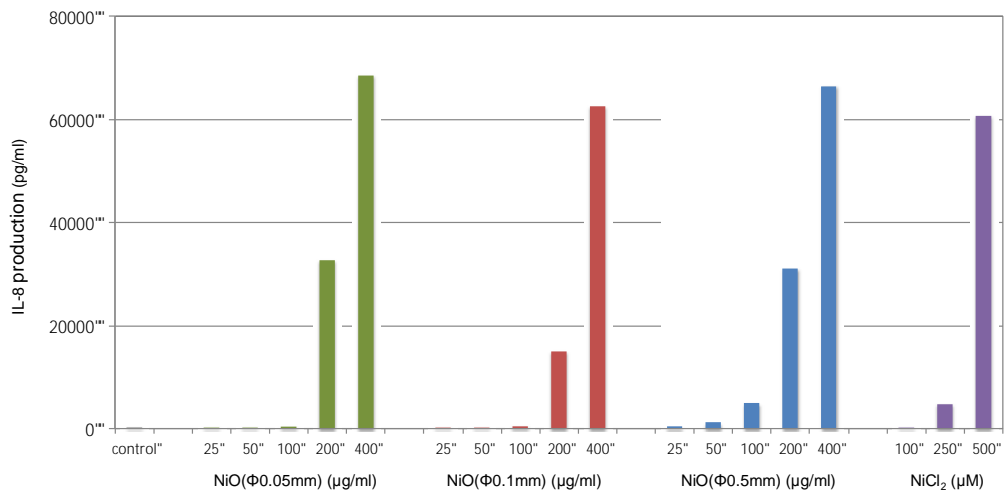


図7 NiO処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生

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 技術開発・共用部門 副部門長

本研究では、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への曝露実験において、マイクロRNA (miRNA) の網羅的発現解析を行い、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の同定を試みた。miRNAの発現挙動は、培養バッチや培養時間に大きく依存したが、カルボキシ修飾の有無は曝露量よりもmiRNA発現に影響することが明らかとなった。また、磁性ナノ粒子により変動するmiRNAとしてmiR-1260が同定された。このmiRNAは、曝露72時間において発現量が増加するが、現在のところ、このmiRNAが細胞機能にどのように影響しているのかは不明である。

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 $\mu\text{g/ml}$ 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 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で 72 時間曝露した細胞
M200-72h : 修飾した (modified) NPs を 200 $\mu\text{g/ml}$ 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。

マイクロアレイに搭載されている miRNA プローブ 2549 種類に対して、各曝露条件において検出された miRNA 数は 103 ~ 166 個であった。昨年度の同様な条件での検出数は 77 ~ 111 個であったので、今年度の検出数の方が若干多い。これは、使用したマイクロアレイのバージョンが変わったことに依存すると考えられる。すなわち、昨年度使用したマイクロアレイ (旧版の G4870A, v16) はプローブ数が 1347 種類であったのに対して、今年度使用した新バージョンでは、2549 種類のプローブが搭載されている。新旧で共通するプローブは 1189 個、旧版から削除されたプローブは 158 個、新版に追加されたプローブは 1360

個であり、プローブ構成が変わっている。これが昨年度と今年度の検出数に影響を与えたと考えられる。

各曝露条件において、いずれか 1 つ以上の条件でシグナル強度が得られた miRNA プローブは 68 個あり、この 68 個について階層的クラスタリングを行なった。得られた clustering tree を図 1a に示す。この 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。すなわち、前者は、磁性ナノ粒子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、後者は磁性ナノ粒子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。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、磁性ナノ粒子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磁性ナノ粒子と修飾磁性ナノ粒子に曝露された細胞での miRNA 発現パターンは異なるが、これらの磁性ナノ粒子の濃度の違いは 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、修飾磁性ナノ粒子に曝露された細胞の miRNA 発現パターンは

磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞と大きな違いはないが、非修飾磁性ナノ粒子に暴露された細胞の miRNA 発現パターンは磁性ナノ粒子に暴露されていない細胞とは異なることを示唆している。今年度の clustering tree を昨年度の clustering tree (図 1b) と比較すると、tree の形状は全く同一であった。これは、上記した miRNA の発現に与える培養および暴露条件の影響が再現性あるものであることを意味している。これら 2 つの trees の再現性が確認されたことから、磁性ナノ粒子が細胞に与える影響は、培養時間における細胞の生理的变化よりも小さいことがわかる。

さらに、昨年度と今年度の miRNA 発現データを使って clustering tree を作成した。昨年度使用した旧版のマイクロアレイと今回使用した新版のマイクロアレイで共通するプローブ 1189 個のうち昨年度と今年度のデータを合わせた 16 条件のいずれか 1 つ以上でシグナル強度が得られた miRNA プローブ 142 個について階層的クラスタリングを行なった。その結果、昨年度と今年度の結果は別々のグループに分配された (図 2)。これは、昨年度と今年度の培養の違いが miRNA の発現パターンに大きな影響を及ぼしていることが判明した。すなわち、昨年度と今年度では、同じ培養時間においても細胞の生理状態が大きく異なっていることを示している。さらに、今年度の tree の形状は、図 1a に示した単独でクラスタリング解析したときの形状とは異なっていた。特に、今年度の tree では磁性ナノ粒子で暴露していないコントロールの 24 時間と 72 時間がクラスターを形成していることから、今年度の培養時間の影響は、昨年度に比べて小さいことが示唆された。昨年度と今年度の培養の違いが大きかったので、142 プローブについて条件ごとに昨年度と今年度のピアソンの相関係数を求めたとこ

ろ、特に 72 時間後のコントロールとカルボキシル基修飾磁性ナノ粒子の再現性が低いことが示された (表 1)。

次に、磁性ナノ粒子の影響で発現が変化する miRNA の同定を試みた。いずれかの条件で発現量がコントロールに比べて変動した miRNA のリストを表 2 に示す。このリストから磁性ナノ粒子の影響が顕著に反映されている miRNA を見出すことは困難であったが、昨年度のリストとの比較から miR-1260b が昨年度と同様の傾向を示すことが見出された。すなわち、この miRNA は 72 時間曝露されると修飾の有無にかかわらず、24 時間曝露のときよりも発現量が高くなる傾向を示す。ただし、昨年度の結果では、この miRNA は 24 時間ではコントロールと同程度であり、72 時間で発現量が増加したのに対し、今年度では、24 時間の曝露で発現量が低下し、72 時間で発現量が増加してコントロールと同程度になった。昨年度と今年度では、72 時間曝露されると修飾の有無にかかわらず、24 時間曝露のときよりも発現量が高くなるという傾向は同じであるが、その内容は異なっている。miR-1260b ほどではないが、miR-1260a も同様な傾向を示した。

D. 考察

miRNA マイクロアレイによる網羅的な解析から、本研究の問題点が明らかになった。すなわち、磁性ナノ粒子の影響は、培養の違いあるいは培養時間の違いによる細胞の生理的变化よりも小さいため、培養条件の影響により隠れてしまうことである。これは、磁性ナノ粒子の miRNA 発現に与える影響は、非常に小さいことを示唆している。磁性ナノ粒子の細胞活性に与える影響も 100 あるいは 200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高い曝露量においても 10~20% 程度の低下であるため、細胞全体の平均として考えると、

細胞機能あるいは細胞の生理状態にほとんど影響していないとすることができる。すなわち、磁性ナノ粒子でアポトーシスやネクローシスが誘導されても、あるいは細胞活性が低下しても、それは特定の細胞に起こった現象であり、全体から見ると無視してもよい程度のものであると考えることができる。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata, Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery, *Mater. Express*, 2016, 6, 116-26.
- (2) S. Chinnathambi, N. Abu, N. Hanagata, Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin. *RSC Adv.*, 2017, 7, 2392-402.
- (3) X. Yao, Z. Tian, J. Liu, Y. Zhu, N. Hanagata, Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots for potential chemo-photothermal synergistic cancer therapy, *Langmuir*, 2017, 33, 591-9.
- (4) X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. Hanagata, X. Wang, Q. Weng, A. Ito, Y. Bando, D. Golberg, Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment, *Nat. Commun.*, 2017, 8, 13936.

2. 学会発表

- (1) S. Chinnathambi, N. Hanagata, Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.

- (2) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata, Calcium phosphate induce exosome release of human monocyte for exosomal-based drug delivery systems, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (3) Y-J. Shyong, F-H. Lin, N. Hanagata, Calcium Phosphate Induce Exosome Release of Human Monocyte for Exosomal-based Drug Delivery Systems, Nano S&T-2016, Oct. 26-28, 2016, Singapore.

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

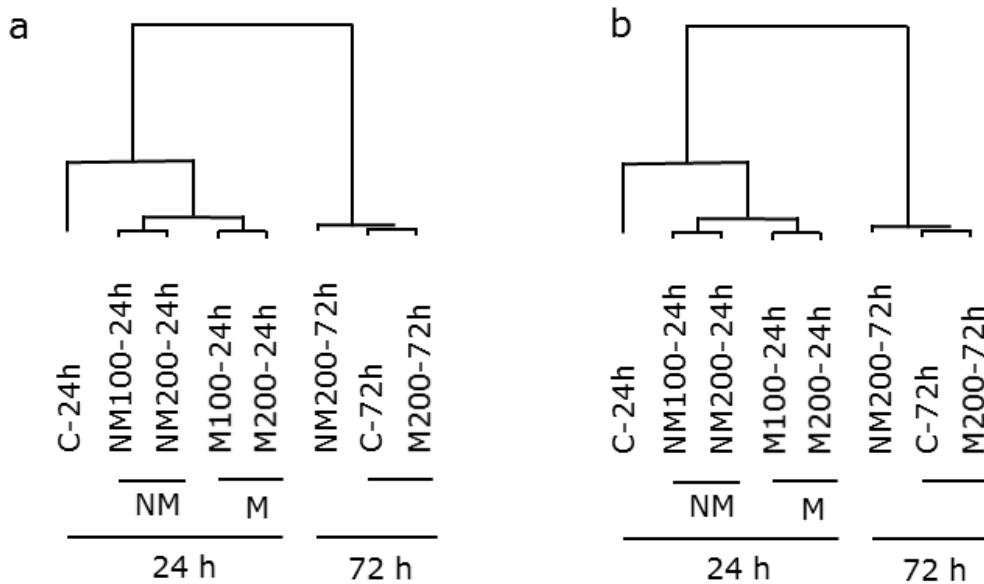


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー.

a, 今年度のマイクロアレイデータの階層型クラスタリングから得られたツリー. b, 昨年度のマイクロアレイデータの階層型クラスタリングから得られたツリー.

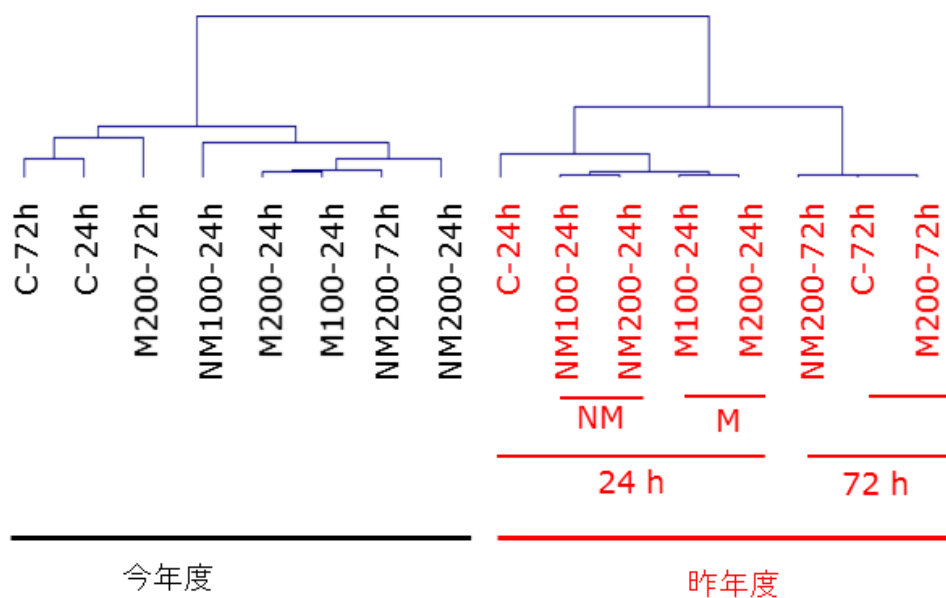


図 2. 昨年度と今年度の miRNA 発現データを階層型クラスタリングして得られたツリー.

表1 各条件ごとに求めた昨年度と今年度の発現データにおけるピアソンの相関係数

Sample	24h Control	24h Bare 100	24h Bare 200	24h COOH 100	24h COOH 200	72h Control	72h Bare 200	72h COOH 200
相関係数(142プローブについて)	0.881	0.895	0.941	0.891	0.878	0.678	0.820	0.661

表2 発現がコントロールに比べて変動した(Log2値が1以上または-1以下) miRNA のリスト

SystematicName	24h Bare100 / Control	24h Bare 200 / Control	24h COOH 100 / Control	24h COOH 200 / Control	72h Bare 200 / Control	72h COOH 200 / Control
hsa-miR-26a-2-3p				3.39		
hsa-miR-34b-3p						1.82
hsa-miR-1281	-0.32		-1.01	-0.34	0.11	1.56
hsa-miR-595	-0.76		-0.68	-0.59	0.03	1.54
hsa-miR-4726-5p						1.40
hsa-miR-513b-5p	0.31	-0.24		1.25	-0.10	-0.12
hsa-miR-5001-5p	1.19	0.50	0.38	0.34	-0.10	-0.16
hsa-miR-572	1.07	0.49			0.27	-0.02
hsa-miR-4430	-0.77	-1.01				
hsa-miR-6739-5p	-0.46	0.10	-0.50	0.00	-1.03	0.29
hsa-miR-6130	-1.08		-0.90		-0.63	0.35
hsa-miR-4465	0.05	-0.10	-1.08	-0.03	0.30	0.19
hsa-miR-320e	-0.98	-0.38	-1.10	-0.93	-0.77	-0.44
hsa-miR-320d	-1.12	-0.65	-1.05	-1.02	-0.80	-0.71
hsa-miR-5006-5p	-1.13	0.06	-0.81	0.24		0.72
hsa-miR-4284	-1.16	-0.79	-0.36	-0.27	-0.63	-0.79
hsa-miR-6514-3p	-0.37		-1.19		-0.39	0.61
hsa-miR-4669	-1.20					
hsa-miR-1273g-3p	-1.14	-1.00	-0.50	-0.49	-0.54	-1.20
hsa-miR-3591-3p	-0.39		-1.25		-0.23	0.70
hsa-miR-8071	-1.12		-0.98	-1.33	-0.43	0.69
hsa-miR-7641	-1.05	-1.08	-1.37	-0.63	0.18	-0.54
hsa-miR-574-5p	-0.13	-1.40	-0.43	-0.34	-0.24	0.35
hsa-miR-6132	-0.10	0.86		0.16	-1.29	-1.45
hsa-miR-320b	-1.16	-0.77	-1.47	-1.18	-0.93	-0.37
hsa-miR-1260b	-1.35	-1.01	-1.51	-0.85	0.00	-0.33
hsa-miR-6847-5p	-1.60					0.63
hsa-miR-7977	-1.45	-0.74	-1.60	-0.91	0.57	-0.54
hsa-miR-197-3p	-1.57		-1.47	-1.67	-0.12	1.32
hsa-miR-331-3p	-1.35	-1.21	-1.04	-0.80	-1.18	-1.77
hsa-miR-7975	-1.01	-0.78	-1.81	-0.66	0.28	-0.95
hsa-miR-205-3p	-1.85					1.24
hsa-miR-1260a	-1.77	-1.82	-1.86	-1.26	-0.11	-0.26
hsa-miR-6740-5p	-1.19	-1.87				
hsa-miR-6817-5p	-1.91					0.50
hsa-miR-4701-3p	-0.59	-1.95	-0.22	-1.16		
hsa-let-7e-5p	-1.97	-0.46	-0.99	-1.24	-1.58	-1.55
hsa-miR-6807-5p	-1.12		-1.32	-2.02	-0.74	0.42
hsa-miR-4455	-0.08	-2.06	-0.50	-0.43	0.03	0.42
hsa-miR-6805-5p	-1.10		-2.07		-1.77	0.57
hsa-miR-5194	-0.92		-2.14	-2.23	-0.70	-0.25
hsa-miR-8485	-0.53	-2.35	-0.86	-0.73	-0.19	0.76
hsa-miR-32-3p	0.11	-2.63	-0.09	-0.23	0.04	0.09
hsa-miR-574-3p	-0.60	-3.15	-0.87	-0.98	0.00	0.99
hsa-miR-4730	0.13	-4.32	0.02	-0.75	-0.29	0.00

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

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	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	比留間 瞳	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

本研究では、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度のナノマテリアル懸濁液を用いて、細胞毒性に対する一次粒子径の影響を評価することを目的としている。試験に供試しているナノマテリアルの一次粒子径については、これまでメーカーからの情報で NiO-Sigma が 50 nm 未満、Ni-Alfa が 5 ~ 20 nm としてきたが、より詳細な一次粒子サイズの把握が必要と考え、TEM による観察を行った。その結果、NiO-Sigma では数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在して存在していた。これら大きさの異なる 2 群について、元素組成を STEM-EDS にて測定した結果、どちらの群の粒子もニッケル及び酸素の存在割合が同程度 (1:1) となり、全て NiO であることが確認できた。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、全て一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の細胞毒性試験を実施したところ、ばらつきが大きい Ni-Alfa の方が若干、細胞毒性が強い傾向を示し、二次粒子径が同程度の場合には一次粒子径が小さいほど毒性が強くなる可能性が示唆された。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。今後は Ni イオン溶出量の測定や細胞内の粒子濃度の測定などが必要と考えられた。

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、ナノマテリアルの安全性が研究され、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、欧州委員会の共同研究センター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 及び 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、培地の影響及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。昨年度は、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調製を検討した。2種類の NiO ナノマテリアル及び表面が酸化被膜でおおわれている Ni ナノマテリアルの3種類について検討し、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の2種類について、濃度 1 mg/mL で懸濁原液の調製が可能であることを見出した。本年度は、電子顕微鏡観察による一次粒子径及び形状の確認と、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験を実施した。

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 及びニッケルナノマテリアル (NiO-Alfa 及び 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、メーカー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、昨年度に酸化皮膜の存在を確認し、NiO と同等に扱えるものと考えた¹¹⁾。これらのナノマテリアルの一次粒子径は、NiO-Sigma (<50 nm) 及び Ni-Alfa (5 ~ 20 nm) であった。

B.2 電子顕微鏡観察によるナノマテリアルの一次粒子径及び形状観察

各ナノマテリアルをエタノールに懸濁させ超音波処理した後、マイクログリッド (コロジオン膜) 上に滴下して乾燥させ、透過型電子顕微鏡 (TEM) にて粒子径及び形状観察を行った。用いた TEM は日立ハイテクノロジーズ製 H-9500 で加速電圧は 200 kV とした。また、各ナノマテリアルの元素組成について、日立ハイテクノロジーズ製 HD2300A を用いた、走査型透過電子顕微鏡-エネルギー分散型 X 線分光法 (STEM-EDS) により測定した。これらの分析は東芝アナリティクス株式会社にて実施した。

B.3 ナノマテリアル懸濁源液の調製

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砕機を用いた方法に従い懸濁液の調製を行った。粉砕機は NP-100 (シンキー製) を用い、粉砕容器はジルコニア製であった。粉砕には、直径が 0.5、0.1 及び 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 分間粉砕を行った。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% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、1% non-essential amino acid (NEAA) (GIBCO) を含む Minimum Essential Medium (MEM) (GIBCO) (以降: 10%FBS-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) 及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。平均粒子径及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.4 細胞毒性試験

細胞毒性試験には A549 細胞 (ヒト肺基底上皮腺癌由来細胞: JCRB 細胞バンク) を用いた。細胞は 10%FBS-MEM を用いて、37 °C、5%CO₂ インキュベーターで培養したものをを用いた。試験液には、各ナノマテリアル懸濁原液を前述の液体培地で希釈したものをを用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後に試験培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 µL の Phenol Red-free MEM 培地及び 20 µL の Cell Titer 96[®] Aqueous

One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を添加し、5%CO₂ インキュベーターで 37 ℃、1 時間反応させた。その後、生成したフォルマザンをマイクロプレートリーダーにて測定 (波長 440 nm) した。そして、培地のみで細胞を培養した well を対照として、細胞生存率を算出した。試験は 1 回に n=3 で実施し、それを 3 回行って平均値化した。

C. 結果及び考察

C.1 電子顕微鏡観察によるナノマテリアルの一次粒子径及び形状観察

メーカーのカタログでは、実験に供試している各ナノマテリアルの一次粒子径は NiO-Sigma が 50 nm 未満、Ni-Alfa が 5 ~ 20 nm と記載されている。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ナノマテリアル懸濁液の毒性評価を目的としており、より詳細な一次粒子サイズの把握が必要と考え、TEM による観察を行った。

NiO-Sigma の TEM 画像を図 1 に示した。数 nm 程度の大きさの粒子と 10 ~ 50 nm 程度の大きさの粒子との 2 群が混在して存在していた。また、粒子カウントによる平均粒子径測定を試みたが、粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部がはっきりしないことなどから断念した。大きさの異なる 2 群について、元素組成を STEM-EDS にて測定した結果を図 2 に示した。その結果、どちらの群の粒子もニッケル及び酸素の存在割合が同程度 (1:1) となり、どちらの粒子も NiO であることが確認できた。

Ni-Alfa の TEM 画像を図 3 に示した。Ni-Alfa は NiO-Sigma と異なり、一次粒子径が 10 nm 程度の比較的均一な粒子であった。ただし、粒子カウントによる平均粒子径測定については、NiO-Sigma と同様に粒子の凝集度合いが強いこと、粒子の輪郭部

がはっきりしないことなどから断念した。

C.2 各ナノマテリアルの細胞毒性

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果について図 4 に示した。また、各懸濁液中のナノマテリアルの物性に関しては表 2 に示した。

NiO-Sigma の各試料の半数致死濃度 (IC₅₀) は、調製に用いたジルコニアボール径 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 23.1、29.3 及び 39.0 µg/mL であった。NiO-Sigma については、ジルコニアボール径が 0.1 mm 及び 0.05 mm の試料では差が認められず、0.5 mm の試料では他に比べてやや細胞毒性が強くなる傾向を示した。

Ni-Alfa に関しては、各試料の IC₅₀ は調製に用いたジルコニアボール径が 0.5、0.1 及び 0.05 mm の試料で 18.9、24.0 及び 32.6 µg/mL であった。Ni-Alfa については、各濃度でのデータのばらつきが大きく、二次粒子径サイズが細胞毒性に及ぼす影響については評価できなかった。

昨年度、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いることで、二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた¹¹⁾。そこで、同一条件で調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験結果を図 5 に示した。ばらつきが大きいのが、Ni-Alfa の方が若干、細胞毒性が強い傾向を示した。この要因として、二次粒子径が同程度であれば、一次粒子径が小さいほど一つの二次粒子を構成している一次粒子の数は多くなり、表面積も大きくなる。そのため、細胞内に取り込まれるナノマテリアルの一次粒子の数が多くなったり、細胞との接触面積や溶出する Ni イオン量が多くなったりし、結果として細胞毒性に違いが生じたものと考えられた。そのため、今後は培地への Ni イオン溶出量や細胞内の粒子濃度の測定などが必要と考えられた。

今年度の細胞毒性試験では、NiO-Sigma

及び Ni-Alfa について、各試験回における細胞毒性データのばらつきが大きく、それぞれの条件での詳細な比較はできなかった。細胞毒性試験のデータのばらつきが大きい要因としては、懸濁原液を 10 mg/mL で調製していた以前の研究の時よりも、粒子の分散状態が不安定であることが考えられる。そのため、今後、安定した分散方法の再検討も必要と思われる。

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) 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 27 年度厚生労働科学研究費補助金分担研究報告書 (H27-化学-一般-008)

G. 研究発表

G.1 論文発表

1. 松岡厚子・児玉幸夫・吉田緑・伊佐間和郎・中嶋富士雄・井上薫・河上強志・松田良枝・五十嵐良明: シリカ, 銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の *in vitro* 及び *in vivo* 毒性学的評価, 国立衛研報, 2016, 134, 33-41.

G.2 学会発表

1. 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: 二次粒子

径の異なる酸化ニッケルナノ粒子に対する THP-1 細胞の応答, 第 43 回日本毒性学会学術年会, 名古屋市, 2016 年 6 月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

なし

表1. 実験に用いた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
ニッケル	Ni-Alfa	Alfa Aesar	5-20	シルバーグレー

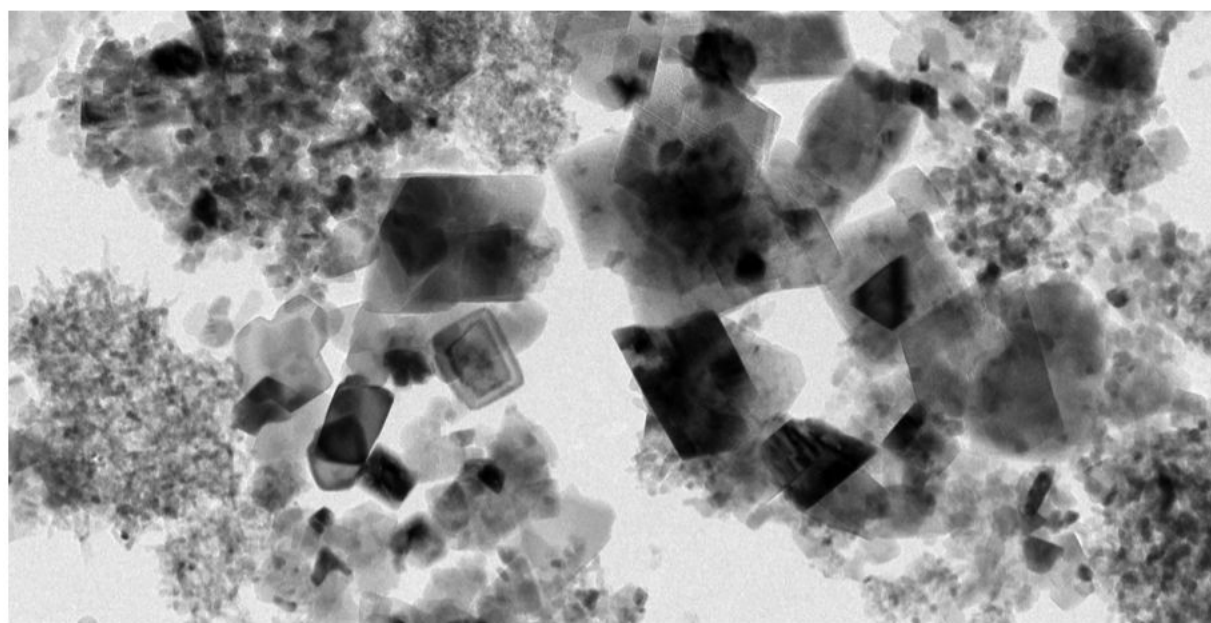
^a 各メーカーカタログより(エアロダイナミックパーティクルサイザー(APS)によるデータ)

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¹⁾

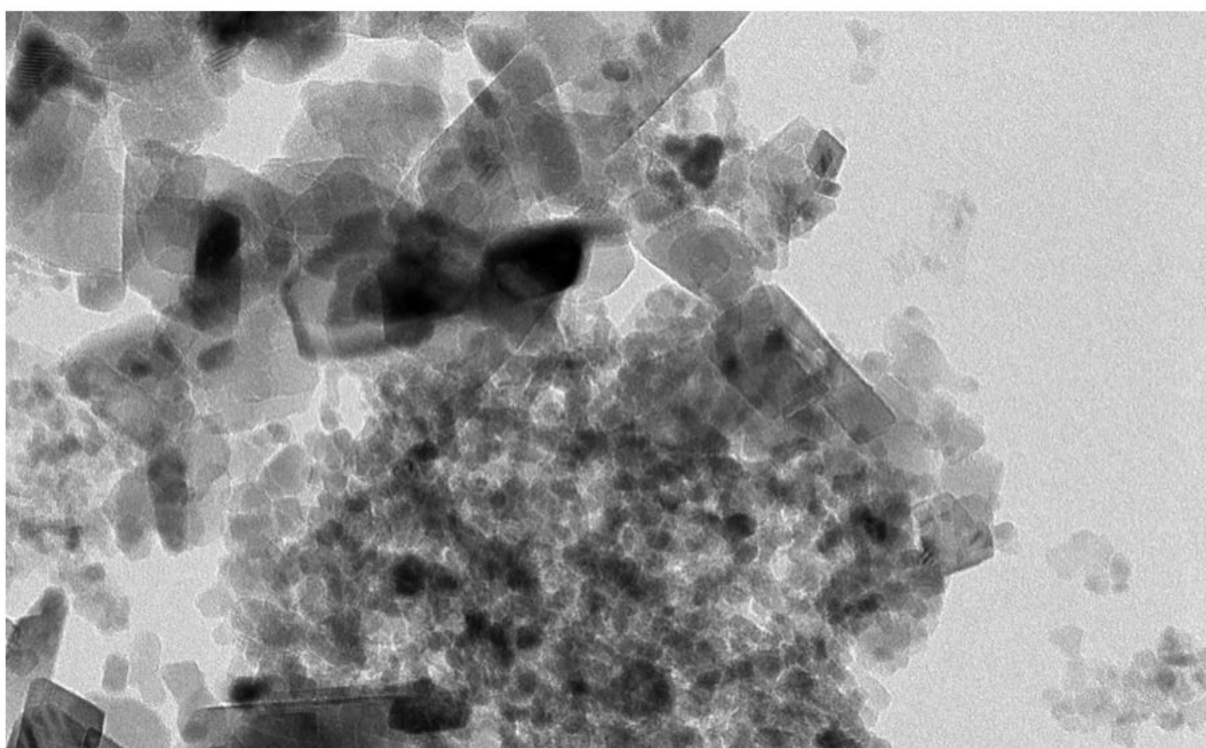
ナノマテリアル ^b	平均粒子径 (nm)		Zeta電位 (mV)		
	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	懸濁原液 (1 mg/mL)	10%FBS-MEM (0.2 mg/mL)	
NiO-Sigma	(0.05 mm)	149.9 ± 3.2	249.1 ± 9.1	19.8 ± 0.1	-11.7 ± 0.6
	1day ^a		229.2 ± 19.6		
	(0.1 mm)	216.7 ± 8.7	266.1 ± 4.5	24.8 ± 0.4	-10.7 ± 0.2
	1day		323.7 ± 13.3		
Ni-Alfa	(0.5 mm)	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



50nm



20 nm

図 1. NiO-Sigma の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

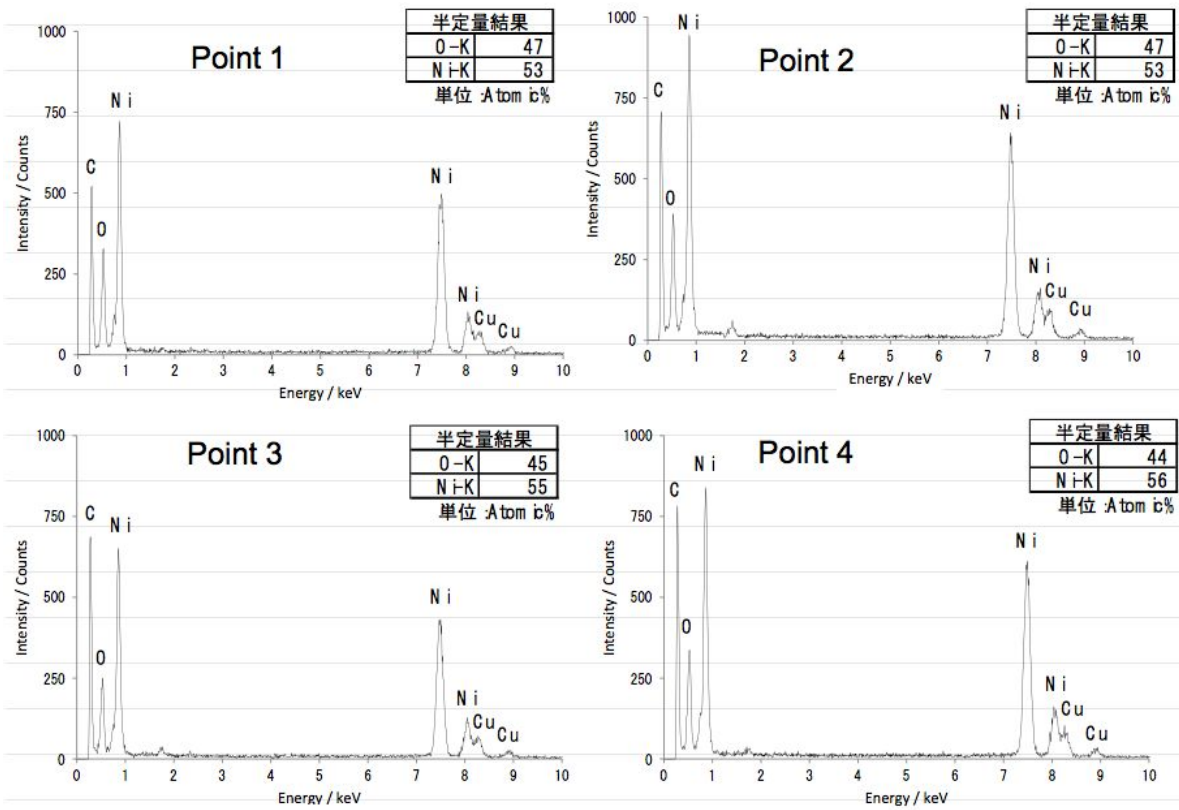
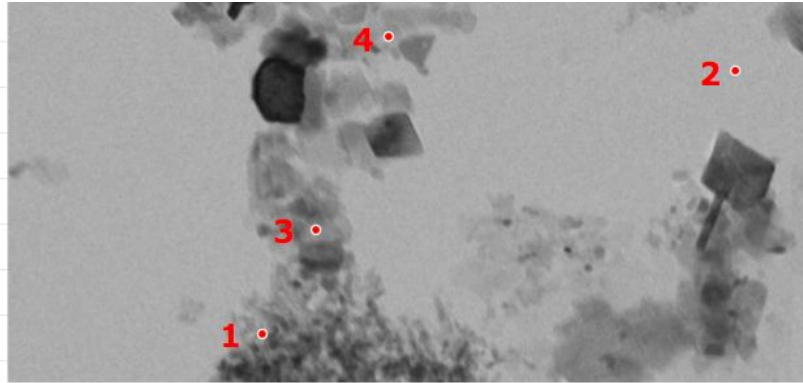


図 2. NiO-Sigma の大きさの異なる二次粒子の STEM-EDX 分析結果
(Cu は試料ホルダー起因のバックグラウンド)

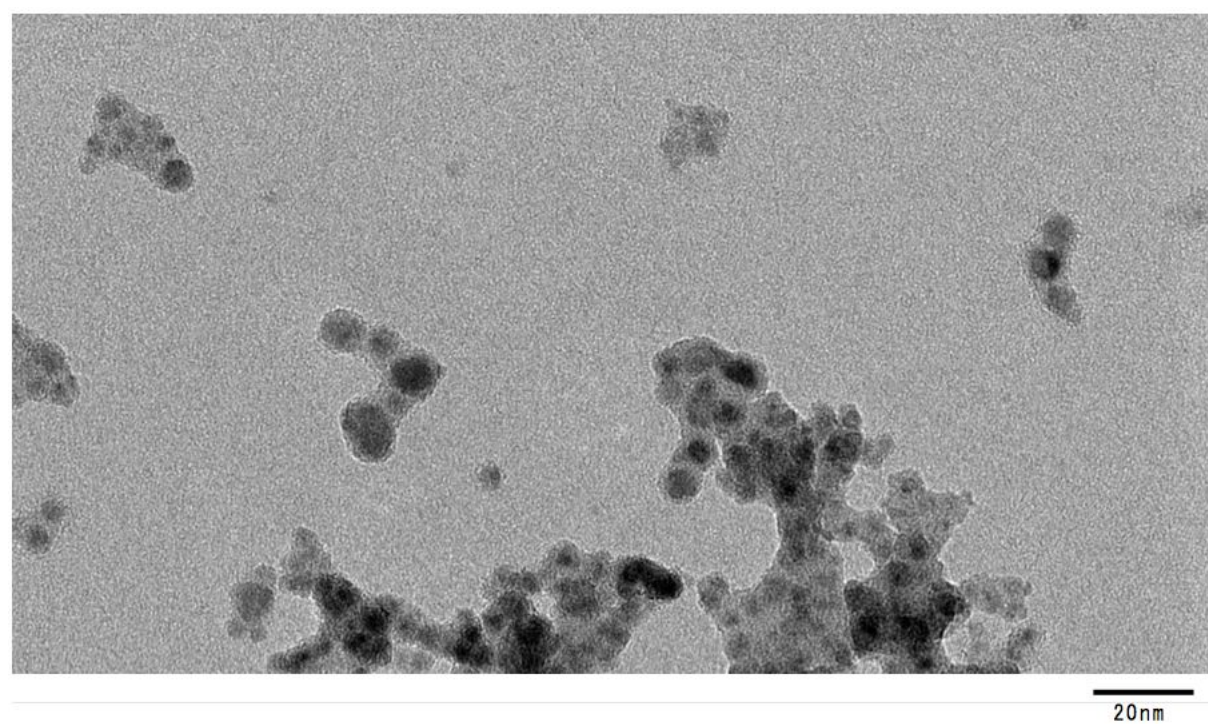
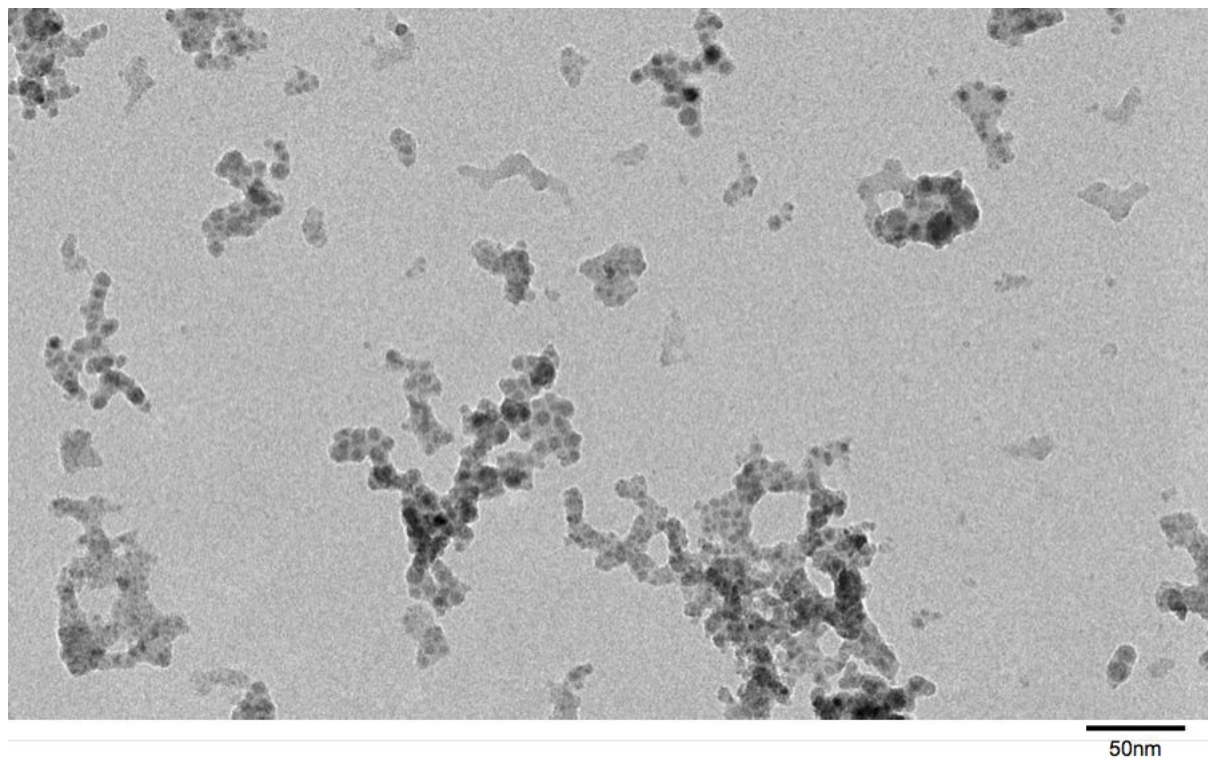


図 3. Ni-Alfa の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

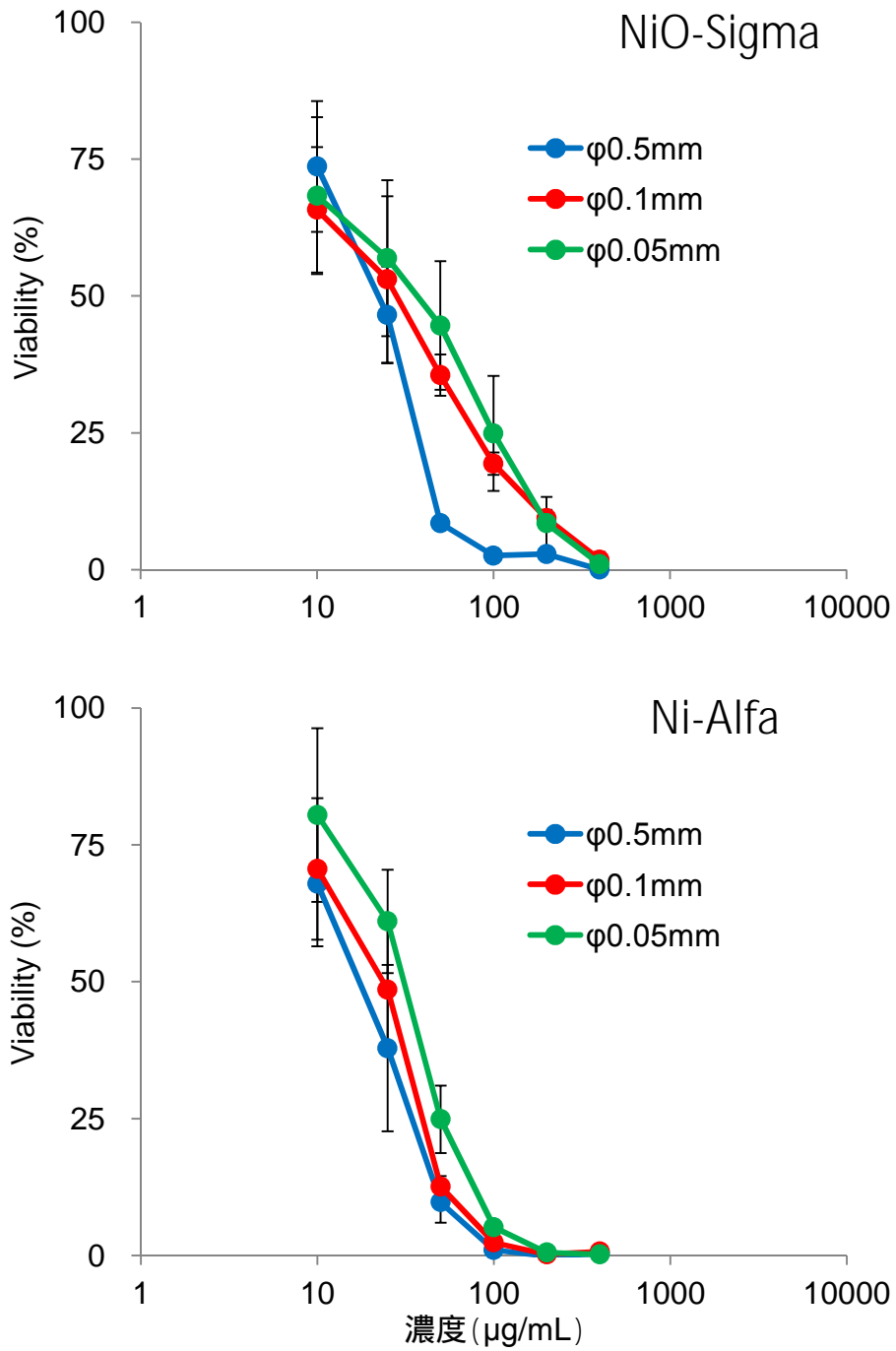


図4. 径の異なるジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

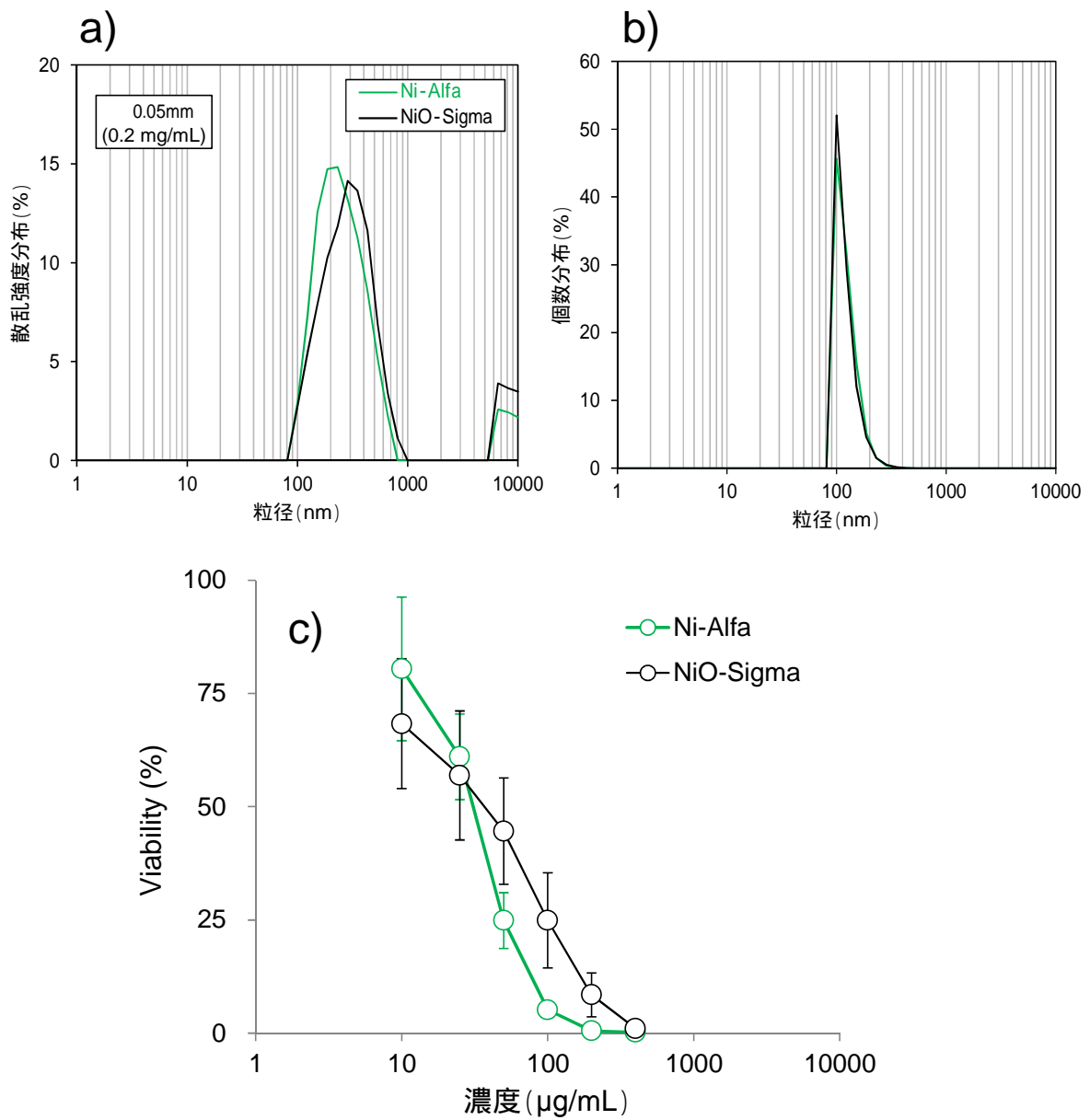


図 5. 径 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の粒子径分布 (a: 散乱強度分布、b:個数分布)¹¹⁾及び細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

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

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
<u>K. Hayashi</u> , Y. Sato, W. Sakamoto, T. Yogo.	Theranostic Nanoparticles for MRI-Guided Thermochemotherapy: Tight Clustering of Magnetic Nanoparticles Boosts Relaxivity and Heat-Generation Power.	ACS Biomater. Sci. Eng.	3	95-105	2017
M. Nakamura, <u>K. Hayashi</u> , H. Kubo, T. Kanadani, M. Harada, T. Yogo.	Relaxometric Property of Organosilica Nanoparticles Internally Functionalized with Iron Oxide and Fluorescent Dye for Multimodal Imaging.	J. Colloid Interf. Sci.	492	127-35	2017
林幸彦朗	光と生体物質に応答する有機 - 無機ハイブリッド中空ナノ粒子の新規合成法とイメージガイド下三種同時治療.	セラミックス	52	130-3	2017
<u>K. Hayashi</u> , T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo.	One-Pot Synthesis of Dual Stimulus - Responsive Degradable Hollow Hybrid Nanoparticles for Image-guided Trimodal Therapy.	Adv. Funct. Mater.	26	8613-22	2016
<u>K. Hayashi</u> , W. Sakamoto,	Smart Ferrofluid with Quick Gel Transformation	Adv. Funct. Mater.	26	1708-18	2016

T. Yogo.	in Tumors for MRI-Guided Local Magnetic Thermochemotherapy.				
N. Ozawa, <u>K. Hayashi</u> , S. Yamaura, W. Zhang, W. Sakamoto, T. Yogo.	Synthesis of Inorganic-Organic Hybrid Membranes Consisting of Triazole Linkages Formed by the Azide-Alkyne Click Reaction.	J. Membr. Sci.	517	21-9	2016
T. Hoshino, <u>K. Hayashi</u> , W. Sakamoto, T. Yogo.	One-Pot Synthesis of Proton-Conductive Inorganic–Organic Hybrid Membranes from Organoalkoxysilane and Phosphonic Acid Derivatives.	J. Membr. Sci.	502	133-40	2016
K. Takahashi, J. Umeda, <u>K. Hayashi</u> , W. Sakamoto, T. Yogo.	One-Pot Synthesis of Inorganic/Organic Hybrid Membranes from Organoalkoxysilane, Hydroimidazole Derivative, and Cyclic Sulfonic Acid Ester.	J. Mater. Sci.	51	3398-407	2016
S. Zhukov, Y.A. Genenko, J. Koruza, J. Schultheiß, H. von Seggern, W. Sakamoto, H. Ichikawa,	Effect of Texturing on Polarization Switching Dynamics in Ferroelectric Ceramics.	Appl. Phys. Lett.	108	012907	2016

T. Murata, <u>K. Hayashi</u> , T. Yogo.					
R. Maruyama, W. Sakamoto, I. Yuitoo, T. Takeuchi, <u>K. Hayashi</u> , T. Yogo.	Photocurrent Enhancement of Chemically Synthesized Ag Nanoparticle-Embedded BiFeO ₃ Thin Films.	Jpn. J. Appl. Phys.	55	10TA14-1	2016
<u>K. Hayashi</u> .	Multifunctional Hybrid Nanoparticles for Biomedical Applications.	J. Ceram. Soc.Jpn.	124	855-62	2016
松岡厚子, 児玉幸夫, 吉田緑, 伊佐間和郎, 中嶋富士雄, 井上薫, 河上強志, 松田良枝, 五十嵐良明.	シリカ, 銀及び酸化亜鉛のナノ分散液の <i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 毒性学的評価.	国立衛研報	134	33-41	2016
M. Usami, M. Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, <u>A. Miyajima</u> , T. Irie, O. Doi, T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi	Proteomic analysis of valproic acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos.	Fundam. Toxicol. Sci.	4(1)	31-5	2017
S. Mimaki, <u>Y. Totsuka</u> , Y. Suzuki, C.	Hypermutation and unique mutational signatures of occupational	Carcinogenesis	37	817-26	2016

Nakai, M. Goto, M. Kojima, H. Arakawa, S. Takemura, S. Tanaka, S. Marubashi, T. Matsuda, T. Shibata, H. Nakagama, A. Ochiai, S. Kubo, S. Nakamori, H. Esumi, K. Tsuchihara	cholangiocarcinoma in printing workers exposed to haloalkanes				
T. Kato , T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, <u>M.</u> <u>Watanabe, Y.</u> <u>Totsuka.</u>	Effect of Physicochemical Character Differences on the Genotoxic Potency of Kaolin.	Genes Environ.	39	12	2017
大久保智子 , 保坂三継 , <u>中</u> <u>江大.</u>	ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ば く露による細胞傷害に 関する研究.	薬学雑誌	136(10)	1433-38	2016
K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, <u>D.</u> <u>Nakae,</u> H. Ando, Y. Kubo, A. Nagasawa, K.	Absence of <i>in vivo</i> mutagenicity of multi-walled carbon nanotubes in single intratracheal instillation study using F344 <i>gpt</i> delta rats.	Genes Environ.	39	4	2017

Yuzawa, M. Honma.					
Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. <u>Hanagata.</u>	Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery.	Mater. Express	6	116-26	2016
S. Chinnathambi , N. Abu, N. <u>Hanagata.</u>	Biocompatible CdSe/ZnS quantum dot micelles for long-term cell imaging without alteration to the native structure of the blood plasma protein human serum albumin.	RSC Adv.	7	2392-402	2017
X. Yao, Z. Tian, J. Liu, Y. Zhu, N. <u>Hanagata.</u>	Mesoporous Silica Nanoparticles Capped with Graphene Quantum Dots for Potential Chemo-Photothermal Synergistic Cancer Therapy	Langmuir	33	591-9	2017
X. Li, X. Wang, J. Zhang, N. <u>Hanagata,</u> X. Wang, Q. Weng, A. Ito, Y. Bando, D. Golberg	Hollow boron nitride nanospheres as boron reservoir for prostate cancer treatment	Nat. Commun	8	13936	2017
H. Tone, S. Yoshioka, H.	Embryoid body-explant outgrowth cultivation	BioMed Res. Int.	2016	7098987	2016

Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, <u>M.</u> <u>Watanabe</u> , A. Umezawa.	from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform				
<u>渡邊昌俊</u> , <u>菅野純</u>	特集ナノトキシコロジー「はじめに」	医学のあゆみ	259(3)	215	2016
小島佳奈子, 齊藤春五, <u>渡邊昌俊</u>	ナノトキシコロジーにおける in vitro 評価試験：現状と将来	医学のあゆみ	259(3)	255-60	2016

IV. 研究成果の刊行物・別刷