

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

新規 *in vitro* 評価系とマーカーの開発によるナノマテリアルのリスク評価

およびリスク低減化に関する研究

平成 27～29 年度 総合研究報告書

研究代表者 渡邊 昌俊

平成 30 (2018) 年 5 月

渡邊 昌俊	国立大学法人三重大学大学院医学系研究科 教授
林 幸壱朗	国立大学法人九州大学大学院歯学研究院 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. 総合研究報告

- 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 24
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 35
林 幸壺朗
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 42
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 50
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 76
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 101
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 116
河上 強志

- III. 研究成果の刊行に関する一覧表 137

I. 総合研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 27～29 年度総合研究報告書

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

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨： 分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞内動態と傷害機構の解明を目的とした。A549細胞の切片担体培養系の条件設定及び磁性体ナノ粒子(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。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築され、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境を再現できる系である可能性が考えられた。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量が変わることを認めた。細胞傷害機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

研究分担者：

林 幸孝朗 九州大学大学院歯学研究院 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

伊佐間 和郎 帝京平成大学 薬学部 教授

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。このような背景のもとに*in vitro*毒性評価に関して、われわれは、ナノマテリアルのDNA損傷性評価としてのDNA付加体網羅的解析(アダクトー

ム)法の有用性、3次元培養と切片担体培養系での幹細胞の分化促進、がん細胞の上皮間葉移行、ナノマテリアルの*in vitro*リスク評価に共培養が有効性を報告して来た。

本研究は、(i)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)、(ii)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、(iii)それらを用いたナノマテリアルのリスク評価、(iv)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目的とした。本研究の生体模倣*in vitro*評価系およびmicroRNA等の新規マーカーの抽出は他に類を見ず独創的であり、*in vitro*および*in vivo*の短期毒性試験を補完し、かつ、長期毒性・発がん性試験への橋渡しの存在となり得ると考えられた。このようなシステムの構築で、動物実験代替法の可能性が生じ、化学産業界に有用な実用的研究のみならず、広く行政および社会へ貢献できると考えられた。

分担研究者の具体的な研究目的は、(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、エピジェネティクスマーカーの検索、ナノマテリアルの細胞内動態の解析(渡邊)、(2)ナノマテリアルの作製およびキャラクタリゼーション(林)、(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(戸塚)、(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(中江)、(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(宮島)、(6)ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析(花方)、

(7)細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析(河上)である。以下に平成27~29年度の各分担研究の成果の概要を記載するが、詳細は各分担研究報告書を参照されたい。

B. 研究方法及び結果

B1 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、ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

エピジェネティクスマーカーの検索に関して、花方分担研究者の項目を参照されたい。

B1-1 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：SDラット(male, 21 week)より、各種臓器を採取し、組織切片を作製した。組織切片担体を4 well multidish(Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA)に入れ、4°C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、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。曝露前後の細胞のIntegrin- β 1および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイムPCRで解析をした。

A549細胞を用いた切片担体培養系は、組織切片担体の条件は4 μ m厚で作製したアセトン固定担体で、適切な培養日数は3日間であると決定した。Fe₃O₄NPs曝露時の各組織切片担体上のA549細胞の生存率は、2次元培養の時と異なり、統計学的有意差を示す減少は認められなかった。同様に、Fe₃O₄NPs曝露時の各組織切片担体上のA549細胞のROS産生も上昇するも、統計学的有意差は認められなかった。Integrin β -1およびEGFRの発現は2次元培養より有意差を持つ

て発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築された状態で培養されていると考えられた。

B1-2 ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析：

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。使用したナノマテリアルは、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs、 Fe_3O_4 NPs-COOH) である。生細胞の細胞数の変化を測定するために Alamar Blue (Alamar Bioscience, Sacramento, California, USA) を用いた。5- (and 6) -chloromethyl-2' , 7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester CM-H₂DCFDA (Invitrogen 社) を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定することにより MNPs- Fe_3O_4 の細胞内取り込みの定量化を行った。AFM による細胞上の NPs 観察を行った。透過型電子顕微鏡(TEM)により、 Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 NPs-COOH の細胞内の局在を観察した。細胞傷害の機構として、Apoptosis、autophagy の関与、NF- κ B の発現量の解析などを Flow cytometry や western blot 法により解析を行った。

細胞内に取り込まれた MNPs- Fe_3O_4 はエンドソームとみられる小胞内やミトコンドリアなどさまざまな細胞内小器官で観察された。また、多重膜を有する autophagosome とみられる小胞も確認された。表面修飾の有無で、局在が異なるのが確認された。特に非修飾の場合、細胞質での集積を顕著に認めた、修飾の場合は細胞内小器官への集積が認められた。Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定では、MNPs- Fe_3O_4 の濃度依存的に SSC が増大し、細胞内への取り込み量が増大することが確認された。被修飾の場合、やや取り込

み量が減少している傾向を認めた。AFM での観察では、非修飾に比べてカルボキシル基修飾の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。前立腺癌細胞株の細胞生存率は、 Fe_3O_4 NPs および Fe_3O_4 NPs-COOH の濃度依存的に細胞生存率は低下するも、両者の間に有意差は認めなかった。 Fe_3O_4 NPs 曝露では、濃度依存的に ROS 産生が確認されたが、 Fe_3O_4 NPs-COOH 曝露では、濃度に関係なく著大な上昇を認めなかった。NF- κ B の発現量の変化は、修飾により異なる挙動を認めた。磁性体ナノ粒子による細胞生存率の低下は、修飾の有無にかかわらず、apoptosis と autophagy が関与することが認められた。

B2 ナノマテリアルの作製およびキャラクターゼーション

B2-1 水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成

金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、hexadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) 水溶液を用いた、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成、すなわち金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指した。CTAB 水溶液の毒性を示すため、CTAB 非使用で、システインを用いた高濃度の金ナノ粒子および銀ナノ粒子分散液の作製を試みた。

CTAB 水溶液の使用で、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できた。また、金ナノ粒子の粒径は 10~20 nm であった。一方、一般的方法による作製した銀ナノ粒子水溶液の濃度を 0.02 mg/mL 以上にすると凝集し、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が、銀錯体形成を経由する方法で、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。これらは CTAB を使用するので、システインを使用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。

B2-2 酸化チタンナノ粒子の合成

ナノマテリアルの形状が毒性に与える影響を調べるために、球状以外の形状のナノ粒子の作製を試みた。酵素(ウレアーゼ)と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成(Ti 源: TiCl₄)では、針状粒子、中空構造の中空ナノ粒子、球状粒子の様々な形状のナノ粒子を得ることができた。TiCl₄以外の原料では、一次粒子の粒径は異なるが全て球状粒子の凝集体が得られ、一部中空粒子が確認された。

B3 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

B3-1 ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築

非修飾マグネタイト (BMS-10, 0.05% Tween20 に懸濁)を経気道的に曝露した ICR マウス(オス, 7 週齢)の肺を対象に LC-QToF-MS で DNA 付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が MGT 投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされた。これら付加体の同定は既に構築済みの DNA 付加体リストとの比較により行った。その結果、vehicle 投与群と比べて、MGT 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が MGT 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされた (図 3)。これら付加体の m/z 値を既知の DNA 付加体の標品と比較したところ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC(εdC)などであることが示唆された。

B3-2 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

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。その結果、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。

共培養系 (GDL1 細胞及び RAW264 細胞)及び GDL1 細胞の単培養系に MWCNT を曝露させ、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 λEG10 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、λEG10 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。その結果として、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

B3-3 マグネタイト(MGT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

ポリアクリル酸修飾を施したMGT(BMSC-5)と修飾を施していないMGT(BMS-10)を上記と同様の系に暴露し、解析を行った。解析の結果、MGT暴露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10では、単培養に比較してRAW264.7との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5では単培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件下ではMFが減少する傾向が観察された。また、両MGTを比較すると、BMSC-5の方が高い変異頻度を示していた。

また、GDL1及びRAW264細胞へのこれらナノ粒子の取り込みの解析を行った。BMS-10暴露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞もSS値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞であるRAW264.7の方がGDL1よりも取り込み量が多いことが観察された。対してBMSC-5暴露群は溶媒対照群と比較して、SS値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

B4 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

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)及び単層培養系

としては、正常ヒト表皮由来ケラチノサイトNKEK(クラボウ)またはヒト肝癌由来細胞HepG2を利用し、金属ナノ粒子(金、銀、酸化鉄ナノ粒子)を暴露し、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)、生細胞によるニュートラルレッド取り込み(NRアッセイ)、生細胞による3-(4,5-ジ-メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物取り込み(MTTアッセイ)、生細胞によるレザズリン取り込み(Alamar Blueアッセイ)を指標として、それぞれ生化学的に解析した。また、3Dヒト皮膚再構成系においては、さらに、以下の解析を行った。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病理組織学的に解析した。金属ナノ粒子の表皮透過性について解析するため、培地を回収して金・銀・鉄の含有量をICP-MSにより測定した(東海技術センター)。RNAを抽出し、表皮角質層の構成蛋白で皮膚の「バリア機能」に関与するとされるフィラグリン(FLG)、細胞接着因子で同じく皮膚の「バリア機能」に関与するクローディン1(CLDN1)、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子アルファ(TNF- α)遺伝子発現をreal-time PCRで解析した。

陽性対照物質としては、農薬として用いられるフタルイミド系殺菌剤で、皮膚毒性が報告されているフォルペット(N-(トリクロロメチルチオ)フタルイミド)(シグマ・アルドリッチ)を用いた。フォルペットは、3Dヒト皮膚再構成系において、MTT及びLDH assayで強い毒性を示し、また、組織学的変性像を認めた。LDN1に関して100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で濃度依存的に減弱し、一方、TNF- α に関して1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で増強した。加えて、NKEK単層培養系やHepG2単層培養系でも毒性を認めた。

金ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に金を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。

銀ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に銀を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。

酸化鉄ナノ粒子では、3D 皮膚再構成系において、毒性は認めず、ICP-MS 解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系（13 日培養品）の培地中に鉄を検出した。HepG2 単層培養系でも、毒性は認めなかった。しかしながら、NKEK 単層培養系では、強い毒性を示した。

B5 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

B5-1 2 種類の異なる ZnO ナノ粒子の THP-1 細胞などへの影響

物理化学的性状が異なる ZnO ナノ粒子の THP-1 細胞への影響を解析した。CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬を用いた細胞毒性評価、コロニー形成試験、THP-1 細胞表面マーカー(CD54, CD86)の測定、BD[™] Cytometric Bead Array (CBA) human inflammation kit (Becton Dickinson)による THP-1 細胞培養上清中のサイトカイン(IL-8, 1 β , 6, 10, TNF, 12p70)の測定、Flow cytometry を用いた細胞内への取り込みを測定した。

THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強いのを認めた。2 種類の ZnO は、CD54 を用量依存的に活性化し、ZnO(Sigma)の方が相対蛍光強度(RFI) は高かったが、CD86 においては ZnO による発現量の変化は認められな

かった。サイトカインの産生に関して、IL-8、IL-1 β 、TNF において産生の増加が認められ、その量は ZnO(Sigma)の方が多かった。IL-6、IL-10 は検出限界未満で、IL-12p70 は ZnO 50 μ g/mL 処理で僅かに検出できた程度であった。取り込みにかんして、SSC は、ZnO 処理により、用量依存的な増加が観察された。また、ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方がより SSC が増加するのを認めた。

B5-2 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の THP-1 細胞などへの影響

NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル（一次粒子径： <50 nm）を用い、サイズの異なる粉砕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砕機 NP-100（シンキー）にて、二次粒子径の異なる NiO 懸濁原液（10 mg/mL）を調製した。

これらのナノマテリアルの THP-1 細胞などへの影響を同様に解析した。

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認められた。THP-1 細胞における細胞表面マーカー CD54、CD86 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。細胞内への取り込みは、容量依存的に、そして懸濁液中の二次粒子径が大きいほど SSC の変化を大きく認めた。サイトカインの産生に関して、培養上清中の IL-8、IL-1 β 、TNF の上昇を認め、IL-6、IL-10、IL-12p70 は検出限界未満であった。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。

B5-3 2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルの再構築ヒト皮膚モデルへの影響

再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC)) を用いて、2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルの影響を解析した。細胞毒性は、MTT assay を使用し、培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1 β 、Tumor Necrosis Factor- α (TNF- α)、IL-1 α 、MIF を ELISA により測定した。

ZnO ナノ粒子では、細胞毒性は示さず、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、コントロールに比べて有意ではなく、また、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった。

NiO ナノ粒子では、同様に毒性は示さず、IL-8、IL-1 α 、MIF の産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった。

B6 ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析

B6-1 ナノマテリアル による曝露実験および microRNA マイクロアレイ解析

ヒト肺上皮細胞株 A549 を所定の濃度の非修飾磁性ナノ粒子あるいはカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後に全 RNA を抽出した。同様に DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ(CNT)を 24 時間曝露し、細胞から RNA を抽出した。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。

磁性体ナノ粒子による A549 の miRNA の変動に関して、ラスタリングの傾向から、磁性体ナノ粒子が miRNA 発現に及ぼす影響として、磁性体ナノ粒子の修飾の有無の方が、曝露濃度よりも影響が大きいことを認

めた。ヒートマップから特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した。Cluster-1 は、has-miR-1274_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時間曝露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

CNT に関して、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 188 個あり、これらについて階層的クラスタリングを行なっ

た。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long) の 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が与える影響の差は小さく、濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいことを認めた。続いて、CNT 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 (Log2 値が 1 以上もしくは -1 以下) miRNA は 129 個あった。この中から DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ により発現が亢進する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p の 3 つが見出された。

B6-2 リン酸カルシウムナノ粒子による曝露実験とエクソソームの解析

RAW264.7 及び THP-1 細胞を所定の濃度のリン酸カルシウムナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後にエクソソームを Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher) を用いて回収した。エクソソームの数は、EXOCET エクソソーム定量アッセイキット (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いて測定した。

リン酸カルシウム粒子がエクソソーム分泌を刺激するかどうかを調べるために、RAW264.7 および THP-1 細胞を 500 および 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度の CaP 粒子で 72 時間処理し、エクソソームを回収した。500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から放出されたエクソソームの数は、非処理細胞の約 2 倍であった。しかし、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子濃度において、エクソソーム

数に有意差は認められなかった。RAW264.7 細胞を 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ のリン酸カルシウム粒子で処理した場合、ほとんどのエクソソームは 24 時間以内に分泌された。一方、ほとんどのエクソソームは、リン酸カルシウム粒子非処理細胞において 6 時間以内に分泌された。72 時間培養した THP-1 細胞において、エクソソームの数は、非処理細胞と比較して、リン酸カルシウム粒子処理細胞において 2 倍以上高かった。さらに、大部分のエクソソームは、24 時間以内にリン酸カルシウム粒子処理細胞からも分泌されるのを認めた。

B7 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

2 種類の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma 及び NiO-Alfa) 及び 1 種類のニッケルナノマテリアル (Ni-Alfa) の計 3 種類を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。試験に先立ち、各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察した。これらのナノマテリアルについてその表面状態を X 線光電子分光法 (XPS) (島津製作所製 ESCA-3200) を用いた。透過型電子顕微鏡 (TEM) (日立ハイテクノロジー製 H-9500) にて粒子径及び形状観察を行った。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。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な光散乱法 (Dynamic Light Scattering: DLS) で、Zeta 電位は電気泳動光散乱法 (レーザー Doppler 法) にて測定した。細胞毒性試験には A549 細胞 (JCRB 細胞バンク) を用い、Cell Titer 96[®] Aqueous One Solution Reagent (MTS 試薬、Promega) を利用して、細胞生存率を算出した。NiO-sigma 及び Ni-alfa ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.1 mg/mL) につい

て、調製直後及び37°Cで24時間インキュベートしたものについてNiイオン濃度を測定した。

XPS分析より、Ni-Alfaを含め今回使用したナノマテリアルの表面はいずれも酸化ニッケルであることが確認できた。NiO-SigmaのTEM画像より、数nm程度の大きさの粒子と10~50nm程度の大きさの粒子との2群が混在して存在していた。Ni-AlfaはNiO-Sigmaと異なり、一次粒子径が10nm程度の比較的均一な粒子であった。平均粒子径が同程度のジルコニアボール径 ϕ 0.05mmで調製することにより、NiO-Sigma及びNi-Alfaの10%FBS-MEM懸濁液について、散乱強度分布及び個数分布共にほぼピークが一致したナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。

径が0.05mmのジルコニアボールを用いて調製したNiO-Sigma及びNi-Alfaの細胞毒性試験の結果を比較したが、ばらつきが大きいものの、Ni-Alfaの方が若干、細胞毒性が強い傾向を示した。培地懸濁液中のNiイオン濃度について、NiO-Sigma懸濁液とNi-Alfa懸濁液では、後者の方がNiイオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、Ni-Alfaの方が一次粒子径が小さいため、全体の表面積が大きくなり溶出しやすかったのではないかと推察された。

(倫理面への配慮)

本研究では、既に樹立された細胞株を用いる*in vitro*実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は当該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。動物実験に関しても、当該施設の委員会に申請を行い、動物愛護法などを遵守して行なった。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。

C. 結論

C1-1 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

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。すなわち、2次元培養より抵抗性を示していると考えられた。Integrin β -1およびEGFRの発現は2次元培養より切片担体上での細胞で、有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築され、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境を再現している可能性が考えられた。この培養系の評価は、GDL-1細胞を使用した遺伝子変異頻度・様式の解析が必要と考えられた。

C1-2 ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

電子顕微鏡、Flow cytometry及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量が変化することを認めた。文献的には、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、*in vitro*系での細胞傷害が報告されている。本研究での結果は、それと一致する。その機構は、ROSの産生の有無を起点として、細胞の生存シグナルとして重要なNF κ Bの発現への影響によるapoptosisやautophagyの誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROSの産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、同様にapoptosisやautophagyを誘導することも判明した。

磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞への影響は、粒子側の修飾によるROS産生の有無

を起点とした異なる signal を介するも apoptosis や autophagy が関与する細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

C2 ナノマテリアルの作製およ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を作製することができた。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かった。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ったが、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た。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。

原料や合成条件、またはこれらに依存する反応速度の違いが生成物の形状に影響を与えることが明らかになった。現在、新たな合成方法を検討している最中であり、安定的に中空構造のナノ粒子が得られつつある。今後、さらなる条件検討により、この方法を確立することを計画している。

C3 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

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び

酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。このようなナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた*in vitro*遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を考えた。本手法を用いてMWCNTの変異原性を評価してみた。まず、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。これらのことから、*in vitro*共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。

更に、この評価系を用い、遺伝毒性に対する表面修飾(ポリアクリル酸)の有無の影響を観察した。

表面修飾の異なるMGT(BMS-10及びBMSC-5)で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下で変異頻度が増加しており、対して、BMSC-5は単培養条件下で変異頻度の増加が観察された。このことから、BMS-10はRAW264.7による間接的な影響が強くでており、BMSC-5はGDL1への直接的な影響が強くでているた

め、遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMGTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各MGTで大きく異なる変異スペクトルが確認された。特にBMSC-5曝露群ではBMS-10曝露群では見られなかったGC>ATの変異が見られた。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5はBMS-10よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。今後は、これらナノマテリアルによるROS産生や炎症性サイトカインの放出などについて検討を行う予定である。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思われる。

C4 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

本研究で用いた、ヒト3D皮膚再構成系は、培養カップの底にメンブレンフィルターがあり、その上に表皮細胞が培養されている。表皮細胞は、*in vivo*の場合と同様、上部に向かって増殖・分化し、培養時間経過と共に表層部に角質層を構築する。したがって、組織学的には、ヒト正常皮膚と類似する。J-TEC, LabCyte EPI-MODELは他の表皮組織のみタイプのヒト3D皮膚再構成系に類似し、OECD TG431 (*in vitro* 皮膚腐食性試験)には記載されていないものの、OECD TG439 (*in vitro* 皮膚刺激性試験)には後から記載された。なお、OECD TG431/439は、定量的評価ができないという欠点がある。フォルペットは、フタルイミド系殺菌剤(農薬)

で、皮膚傷害性がある。角質層成熟再構成系(13日培養品)では2000 µg/mLの24時間暴露で細胞毒性を示したが、角質層未熟再構成系(6日培養品)では1000 µg/mL、単層培養ヒトケラチノサイトでは30 µg/mLから細胞毒性を示した。病理組織学的には、角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間暴露で、表皮細胞の変性がみられた。角質層成熟再構成系・2000 µg/mLの24時間暴露では、細胞毒性が検出できない100 µg/mLの濃度より濃度依存性に角質層バリア機能を示すFLGと、基底層のタイトジャンクションに関わるCLDN1の発現が減弱し、炎症性サイトカインであるTNF-αの発現が増強した。加えて、フォルペットは、ケラチノサイト単層培養系において、3D皮膚再構成系より強い細胞毒性を示す。以上より、表皮の重層構造はフォルペットの細胞毒性に対して防御効果を発揮し、(成熟した)角質層はさらに当該防御効果を増強する「バリア機能」を發揮することが示唆された。

金・銀ナノ粒子は角質層成熟再構成系の表皮組織を傷害せず、単層培養ヒトケラチノサイトも傷害しなかったが、角質層成熟再構成系の培地においては金・銀がそれぞれ検出された。したがって、金・銀ナノ粒子は、ケラチノサイトに対する毒性を示さないが、その一方で、(成熟した)角質層の存在や表皮の重層構造はこれらが表皮を通過することを防ぐことができないものと示唆された。

表面修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを傷害し、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出された。角質層成熟再構成系で、FLGの発現が減少した。したがって、表面修飾マグネタイトは、ケラチノサイトに対する毒性があるが、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を發揮するものの、角質層の存在や

表皮の重層構造はこの物質の表皮通過を防ぐことができないものと示唆された。

C5 ナノマテリアルの細胞毒性及び遺伝毒性発現メカニズムの解析

2種類のZnOナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答（細胞表面マーカーCD54及びCD86の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した結果、物理化学的性状が異なるZnOは、細胞毒性、細胞表面マーカーの発現、サイトカインの産生などTHP-1細胞に対して異なる影響を与えることが示された。

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、物理化学的性質について明らかにすると同時に、A549及びTHP-1の細胞毒性に対する影響を検討した結果、細胞毒性や細胞表面マーカーの変化、サイトカインの産生などにナノ粒子の二次粒子径が重要な要素であることを示した。

2種類のZnOナノマテリアル分散製品及び3種類の二次粒子径が異なるNiOナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデルLabCyte EPI-MODELに対する細胞毒性試験を実施した結果、ZnO、NiO共に最高濃度400 µg/mlにおいて細胞毒性を示さなかった。サイトカイン産生については、1% SDSでIL-1α、MIFの増加が観察されたが、ZnO、NiOによるサイトカイン産生の変化は認められなかった。以上より、LabCyte EPI-MODELでは、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

C6-1 ナノマテリアルによる曝露実験およびmicroRNAマイクロアレイ解析

磁性体ナノ粒子の曝露に対する影響よりも播種した細胞の初期状態や培養時間の経過に伴う発現変動の方が大きく、データの詳

細な信頼性に関する保証が得られなかった。異なる培養において再現性の実験を数度行った結果、miR-1260aおよびmiR-1260bに関しては比較的再現性が高いことが判明した。miR-1260b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。miR-1260bほどではないが、miR-1260aも同様な傾向を示した。miR-1260bの機能に関しては、SFRP1、DKK2、およびSMAD4がmiR-1260bの標的遺伝子であり、癌細胞の増殖と浸潤に関与している可能性があることが報告されている。また、miR-1260bの発現が、正常な腎臓組織と比較して腎臓癌組織において亢進しており、そして発現の上昇が患者の生存率に有意に関連していることが指摘されている。さらに、このmiRNAが非小細胞性肺癌のリンパ節への転移に関与する可能性も報告されている。本研究に用いられた細胞が肺癌由来のA549であることを考えると、磁性体ナノ粒子がmiR-1260bの発現のトリガーになることも考えられるが、正常な細胞でものmiRNAが発現するのかどうかは今後の検討が必要である。

A549細胞でCNT (Short) 200 µg/mLにより発現が亢進するmiRNAは計68個あったが、このうち多くで発現量がShort 200 µg/mL >> Long 200 µg/mL > Long 20 µg/mLの関係にあり、バイオマーカーの候補としてスクリーニングから外す理由はない。バイオマーカーの発見のためには、Short 200 µg/mLでの発現量が多い順になるべく多くのmiRNAについて定量PCRによりスクリーニングを行なうのが良いかもしれない。

上記の実験においてリン酸カルシウム粒子は、細胞から分泌されたエクソソームの数を増加させた。さらに、大部分のエクソソームは、リン酸カルシウム粒子による処理後24時間以内に細胞から分泌された。リン酸カルシウム粒子は分泌されたエクソソ

ームの数を増加させたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞から分泌されたエクソソーム中のカルシウム濃度は、未処理細胞とは有意に異ならなかった。この結果は、細胞質ゾルに放出されたリン酸カルシウム粒子またはリン酸カルシウム粒子由来カルシウムイオンの排泄に対してエクソソーム分泌が増強されないことを示唆している。エクソソームは、エンドソーム膜の内方発芽によって形成される小胞内小胞 (ILV) に由来する。これは、エクソソームの内容物が細胞質ゾル成分に由来することを意味する。リン酸カルシウム粒子で処理した細胞から単離したエクソソーム中のカルシウム濃度の増加を示さない結果は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂に起因する細胞質ゾル中のカルシウム濃度の増加前に ILV が形成されたことを示唆する。

C7 細胞応答に及ぼすナノマテリアルの物性解析

一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用した Ni-Alfa 表面は酸化皮膜に覆われていることを確認した。φ 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、10%FBS-MEM 培地中で一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。このナノマテリアル懸濁液について細胞毒性試験を実施したところ、Ni-Alfa の方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、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。懸濁液に溶出している Ni イオンについては、Ni-Alfa の方が NiO-Sigma よりも Ni イオン濃度がやや高い傾向を示した。Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられたが、先行研究で細胞毒性に違いが認め

られている、二次粒子径サイズの異なる NiO-Sigma 懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度には差は認められなかった。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

以上より、平成 27~29 年度の本研究において、ナノマテリアルの物理化学的性状の測定とその細胞への影響、様々な形状のナノマテリアル作製の制御、新規 *in vitro* 独紙絵評価系の構築、細胞内の局在及び有害性発現経路(Adverse Outcome Pathway)の解明につながる細胞内シグナリング、さらにそれに連関する可能性があり、またナノマテリアル暴露のバイオマーカーの可能性を示すことができた。本研究は、科学的根拠のある新規 *in vitro* リスク評価系とリスク低減方策を提示することにより、ナノマテリアルのリスク評価/管理に関する厚生労働行政に対して、最善の選択肢の提示に役立つと期待できる。また、これらの成果は、安全なナノマテリアルの普及を可能とすることで、市民の健康の維持に貢献すると共に、特に論文及び学会発表などはリスクコミュニケーションに利用することにより、市民の不安解消にも有用である。

D. 健康危害情報

なし

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, M. Watanabe, S. Morishita, T. Sakai. Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced ch

- ronic liver fibrogenesis. *J. Biol. Chem.*, 291(1), 72-88, 2016.
- (2) T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, M. Watanabe, K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takan o, N. Ohuchi, Y. Ichiyangi. AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn_{1-x}Zn_xFe₂O₄ nanoparticles for hyperthermia treatment. *J. Appl. Phys.*, 117, 17D157, 2015.
- (3) Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, M. Watanabe, M. Yao, H. Uemura. Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. *Prostate*. 75(10), 1009-19, 2015.
- (4) D. Kami, M. Toyoda, M. Watanabe, S. Gojo. Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy. Chapter 22, 547-55, *Nano Based Drug Delivery*, 2015, IAPC-OBP.
- (5) 岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊. 前立腺癌治療へのナノ粒子の応用. *医学のあゆみ*, 252(4), 303-8, 2015.
- (6) 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, 7098987, 2016.
- (7) 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*. 259(3) 215, 2016.
- (8) 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*. 259(3), 255-60, 2016.
- (9) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observation of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. *Chaos*. 27, 104602, 2017.
- (10) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapy agents on prostate cancer cells in vitro. *Appl. Sci.*, 8, 134, 2018.
- (11) 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.*, 26, 8613–22, 2016.
- (12) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy. *Adv. Funct. Mater.*, 26, 1708–18, 2016.
- (13) 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.*, 517, 21–9, 2016.
- (14) 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.*, 502, 133–40, 2016.
- (15) 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.*, 51, 3398–407, 2016.
- (16) 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.*, 108, 012907, 2016.
- (17) 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.*, 55, 10TA14-1, 2016.
- (18) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 124, 855–62, 2016.
- (19) 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.*, 3, 95–105, 2017.
- (20) 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.*, 492, 127–35, 2017.
- (21) K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels. *ACS Biomater. Sci. & Engin.*, 3, 1129–35, 2017.
- (22) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles. *Sci. Rep.*, 7, 3953, 2017.
- (23) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis. *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1706332, 2018.
- (24) K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis. *Biomater.*, 156, 45-55, 2018.
- (25) H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin, J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia. *Oncotarget*, 9, 10307-16, 2018.
- (26) K. Ishikawa, T. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru. Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres. *J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.*, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34117.
- (27) M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.*, 106(11), 1499-505, 2015.

- (28) 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*, 37, 817-26, 2016.
- (29) 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.*, 39, 12, 2017.
- (30) N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 32, 455-62, 2017.
- (31) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an in vivo simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.
- (32) T. Toyoda, Y. Totsuka, K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38, 537-43, 2018.
- (33) Y. Nakagawa, A. Inomata, A. Ogata, D. Nakae. Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organellae, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 1465-72, 2015.
- (34) J. Xu, D.B. Alexander, M. Iigo, H. Hamano, S. Takahashi, T. Yokoyama, M. Kato, I. Usami, T. Tokuyama, M. Tsutsumi, M. Tamura, T. Oguri, A. Niimi, Y. Hayashi, Y. Yokoyama, K. Tonegawa, K. Fukamachi, M. Futakuchi, Y. Sakai, M. Suzui, M. Kamijima, N. Hisanaga, T. Omori, A. Hirose, J. Kanno, D. Nakae, H. Tsuda. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos. A patient-based study. *Cancer Sci.*, 106, 825-32, 2015.
- (35) T. Okubo, M. Hosaka, D. Nakae. In vitro effects induced by diesel exhaust at an air-liquid interface in a human lung alveolar carcinoma cell line A549. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 67, 383-8, 2015.
- (36) T. Fujitani, A. Inomata, A. Ogata, Y. Sakamoto, A. Hirose, T. Nishimura, R. Ikeda, D. Nakae. Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice. *Toxicol. Rep.*, 2, 1404-8, 2015.
- (37) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、矢野範男、猪又明子、中江 大、栗田雅行. 磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす γ -オリザノールあるいはグリセロール投与の影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 315-21, 2015.
- (38) 田山邦昭、坂本義光、安藤 弘、海鉾藤文、久保喜一、高橋 博、長澤明道、湯澤勝廣、小縣昭夫、中江 大、猪又明子、栗田雅行. ナノ物質の腹腔内投与によるマウス雄性生殖器への影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 323-9, 2015.
- (39) 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 136, 1433-8, 2016.
- (40) 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.*, 39, 4, 2017.
- (41) 多田幸恵、中江 大、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海鉾藤文、長谷川悠子、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子. NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響. 東京都健安研セ研究年報 68, 277-84, 2017.
- (42) 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.*, 4, 31-35, 2017.
- (43) N. Hanagata, H. Morita. Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles. *J. Toxicol. Sci.* 40(5), 625-35, 2015.
- (44) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R.A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood-brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.* 10, 6105-19, 2015.
- (45) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata. Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery. *Mater. Express*, 6, 116-26, 2016
- (46) 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.*, 7, 2392-402, 2017.
- (47) 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*, 33, 591-9, 2017.
- (48) 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.*, 8, 13936, 2017.
- (49) 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, 134, 33-41, 2016.
2. 学会発表
- (1) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, health security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (2) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (3) 渡邊昌俊、中野 洋、白石泰三. 各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について. 第 62 回日本臨床検査医学会

- 学術集会、岐阜、2015年11月。
- (4) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N. Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。
- (6) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。
- (7) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015年10月。
- (8) 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.
- (9) 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。
- (10) 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。
- (11) 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。
- (12) 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.
- (13) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第76回日本癌学会学術総会、横浜、2017年9月。
- (14) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会、横浜、2017年9月。
- (15) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第76回日本癌学会学術総会、横浜、2017年9月。

- (16) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NF κ B signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.
- (17) 林 幸壱朗, 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.
- (18) 林 幸壱朗, 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.
- (19) 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.
- (20) 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (21) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Dual Stimulus-Responsive Degradable Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. BIT's 7th Annual World Congress of Nano Science & Technology 2017, Oct. 24-26, 2017, Fukuoka. 招待講演
- (22) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *2nd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development*, Sep. 29-Oct. 1, 2017, Nagoya. 招待講演
- (23) 林 幸壱朗. 多機能ナノ/マイクロ粒子の合成と診断・治療への応用. 第 7 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 2017 年 9 月 12 日, 京都大学. 招待講演
- (24) 林 幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演
- (25) 戸塚 ゆ加里, 中釜 斉. 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明. 第 42 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月.
- (26) Y. Totsuka, Y. Lin, M. Kato, Y. Totoki, T. Shibata, Y. Matsushima, H. Nakagama. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月.
- (27) 戸塚 ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索. 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月.
- (28) 秋場 望, 椎崎一宏, 遠藤 治, 三牧幸代, 土原一哉, 中釜 斉, 戸塚 ゆ加里. 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響. 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月.
- (29) 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.

- (30) 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.
- (31) 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.
- (32) 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.
- (33) 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.
- (34) 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.
- (35) 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関与する 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.
- (36) 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.
- (37) 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.
- (38) 戸塚 ゆ加里. DNA 付加体形成と突然変異誘発 第 44 回日本毒性学会、横浜、2017年7月.
- (39) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, EA. Izawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). EEMGS、ノースカロライナ、2017年9月.
- (40) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 2017年9月.
- (41) 今井俊夫、落合雅子、成瀬美衣、松浦哲也、戸塚 ゆ加里、筆宝義隆. マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系. 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 2017年9月.
- (42) 佐藤春菜、落合雅子、今井俊夫、戸塚 ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第 46 回日本環境変異原学会、東京、2017年11月.

- (43) 前迫裕也、善家 茜、アスマ エルザワハリ、古川英作、加藤 護、白石航也、河野隆志、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 次世代シークエンサーとDNAアダクトーム解析の統合による発がん要因の探索. 第46回日本環境変異原学会、東京、2017年11月.
- (44) 秋場 望、佐藤春菜、松田知成、遠藤治、稲葉一穂、戸塚 ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析. 第46回日本環境変異原学会、東京、2017年11月.
- (45) 神尾翔真、斎藤春吾、渡邊昌俊、椎崎一宏、戸塚 ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立. 第46回日本環境変異原学会、東京、2017年11月.
- (46) Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017、東京、2017年11月.
- (47) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis. 12thICEM-5thACEM、仁川、2017年11月.
- (48) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017、つくば、2017年12月.
- (49) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics、コルカタ、2018年1月.
- (50) 坂本義光、小縣昭夫、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、高橋 博、広瀬明彦、井上義之、橋爪直樹、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及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl nitron* (PBN)の影響. 第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月、石川県金沢市.
- (51) 藤谷知子、猪又明子、小縣昭夫、中江 大、安藤 弘、久保喜一、広瀬明彦、西村哲治、池田玲子. マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差. 第42回日本毒性学会学術年会、2015年6月、石川県金沢市.
- (52) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl nitron* (PBN)の影響. 第74回日本癌学会学術総会、2015年10月、愛知県名古屋市.
- (53) A. Hirose, Y. Sakamoto, A. Ogata, T. Nishimura, A. Inomata, D. Nakae. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. 7th International Symposium on Nanotechnology. Occupational and Environmental Health (NanOEHS 2015), 2015年10月、南アフリカ共和国 Limpopo州 Waterberg郡 Legend Safari Lodge.
- (54) 坂本義光、北條 幹、広瀬明彦、猪又明子、中江 大. 多層カーボンナノチューブを経気管投与したラットに見られた肺過形成病変. 第32回日本毒性病理学会学術総会、2016年1月、香川県高松市.
- (55) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海銚藤文、北條 幹、猪又明子、中江 大、栗田雅行. ラットにおける DHPN の発がん性に対して磁性ナノ粒子マグネタイトが

- 及ぼす影響. 第 32 回日本毒性病理学会学術総会、2016 年 1 月、香川県高松市.
- (56) 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、2016 年 7 月、愛知県名古屋市.
- (57) 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、2016 年 10 月、神奈川県横浜市.
- (58) 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、2016 年 11 月 6 日、東京都千代田区.
- (59) 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 nitrone (PBN) 併用が及ぼす影響. 第 33 回日本毒性病理学会学術集会、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市.
- (60) 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、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市.
- (61) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状. 第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、神奈川県横浜市.
- (62) 堀端克良、鶴飼明子、小縣昭夫、中江 大、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、湯澤勝廣、本間正充. F344 *gpt* delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による *in vivo* 遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第 46 回大会、2017 年 11 月 6-7 日、東京都千代田区.
- (63) H. Sato, Y. Sakamoto, D. Nakae, M. Watanabe, Y. Totsuka. Differences in physicochemical characteristics on genotoxic potency of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with 33rd Annual Meeting of Korean Society of Toxicology/Korean Environmental Mutagen Society, 2017 年 11 月 12-16 日、大韓民国仁川広域 (Incheon) 市.
- (64) 北條 幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、村上詩歩、前野 愛、広瀬明彦、中江 大. ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2018 年 1 月 25 日、沖縄県那覇市.
- (65) 坂本義光、北條 幹、鈴木俊也、猪又明子、広瀬明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織化学解析. 第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2018 年 1 月 26 日、沖縄県那覇市.
- (66) 河上強志、宮島敦子、小森谷 薫、加藤玲子、伊佐間 和郎、NiO ナノ粒子

の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響，第24回環境化学討論会，札幌市，2015年6月

- (67) 宮島敦子，河上強志，小森谷 薫，加藤玲子，新見伸吾，伊佐間 和郎，物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答，第42回日本毒性学会学術大会，石川，2015年6月
- (68) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016
- (69) 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
- (70) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, Y. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses, EuroTOX 2017, ブラチスラヴァ，2017年9月
- (71) S. Chinnathambi, N. Hanagata, Superparamagnetic CdSe/ZnS quantum dot micelles, International Symposium on Nanomedicine, Nov.24-26, 2016, Tsukuba, Japan.
- (72) 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.
- (73) 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.

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- 1) 林 幸壱朗，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 幸壱朗，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

- 1) 林 幸壱朗. “新ナノ粒子でがん狙い撃ち名大チーム”，中日新聞. 平成28年12月18日
- 2) 林 幸壱朗. “赤血球状の粒子 肝臓に薬剤運搬”，日経産業新聞，平成29年12月8日

II. 分担研究報告

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

切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築

エピジェネティックスマーカーの検索

ナノマテリアルの細胞内動態の解析

研究代表者 渡邊 昌俊 三重大学大学院医学系研究科 教授

研究要旨： 分担研究として、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築及び磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞内動態と傷害機構の解明を目的とした。A549細胞の切片担体培養系の条件設定及び磁性体ナノ粒子(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。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築され、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境を再現できる系である可能性が考えられた。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量に変化することを認めた。細胞傷害機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした apoptosis や autophagy の関与という細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

A. 研究目的

本研究グループの目的は、ナノマテリアルの物性解析後、新規 *in vitro* 評価系の確立、細胞内応答機構等の解析で従来の評価系との比較検討、新たなマーカーの確立、適切な動物実験等による妥当性の検証である。本研究の分担者は、細胞株を利用した *in vitro* 系での各種ナノ粒子の細胞毒性、遺伝毒性の解析、およびエピジェネティックおよびエピジェネティックな変化を解析する事によりその機構の解明を目指してきた。本研

究での分担は、(1)切片担体培養系を用いたナノマテリアルのリスク評価系の構築、(2)エピジェネティッ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、DU145 細胞の切片担体培養の条件を基に、A549 細胞の切片担体培養系を用いたナノリスクマテリアルの毒性評価系の構築を目的とした。(2)に関して、物質・材料研究機構の花方分担研究者と共同研究のため、この研究報告書では割愛させていただく。(3)について、ナノマテリアルの

細胞への影響について、細胞内動態と傷害機構について、病理学的及び分子生物学的に明らかにすることを目的とした。

B. 研究方法

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、ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析の研究方法について以下に示す。

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 γ -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 μ g/mL、10 μ g/mL、100 μ g/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。

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

3) 切片担体培養系の準備：

SD ラット(male, 21 week) 2匹をプロトコールに則り、麻酔下で安楽死させた。臓器(肺、肝臓など)を摘出し、Tissue-Tek cryomold(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)に OCT コンパウンド(フナコシ株式会社, Tokyo, Japan)を入れ、コンパウンド内に適当な大きさに切った組織を包埋した。組織を包埋した cryomold をドライアイス上で冷却した n-ヘキサン上に浮かべて OCT コンパウンドが固まるまで静置した。OCT コンパウンドが凍結し次第-80 °Cで保存した。凍結した組織を OCT コンパウンドでクライオスタット用のステージに貼り付けてセットしたのち、クライオスタット内(-20 °C~-30 °C)で組織を薄切した。切り出された切片は MAS コートスライドガラス(松浪硝子工業株式会社, Osaka, Japan)へ貼り付けた。組織を貼り付けたスライドガラスをアセトンに浸漬し固定、あるいは固定せず風乾し、アセトン固定したものは風乾したのち-80 °Cで保存した。組織切片担体を 4 well multi dish(Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, USA)に入れたのち、乾燥材と共に密閉容器に収納して 4 °Cの暗所で一晩静置し、組織切片を乾燥させた。

4) 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°Cで乾燥させた後に培養液を入れ、A549 細胞を 7x10⁴ 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。

5) 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。曝露前後の細胞の Integrin-β1 および上皮成長因子受容体(EGFR)の発現をリアルタイム PCR で解析をした。

ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

6) 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 1.0×10^4 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。

7) 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 社)を用いて、活性酸素種(ROS)の測定を行った。6 well plate に細胞濃度が 1.0×10^5 cells/well と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 plate の培地を吸引して、その well に PBS 1ml に 10 μM に調整した試薬を 200 μL 加えた。その後 30 分インキュベーターを行い、蛍光顕微鏡で観察を行った。

蛍光顕微鏡で撮影した画像を、Imaging

Soft (Photoshop Elements 8 ;Adobe)を用いて、画像の輝度と細胞の接着の面積(Pixel 数)を求めて、定量化を行った。

8) Flow cytometry による NPs の細胞内取り込みの確認 :

Flow cytometer (FCM)を用いて側方散乱光 (SSC) を測定することにより MNPs-Fe₃O₄ の細胞内取り込みの定量化を行った。

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が曝露 24 時間の場合は 1.5×10^5 cells/well、72 時間の場合は 8.0×10^4 cells/well となるように 6 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。曝露 24 時間後または 72 時間後、まず培養液を除去し、PBS を用いてナノ粒子をウォッシュアウトした後、Trypsin/EDTA 200 μL を用いて細胞を剥離して回収した。回収したすべての細胞を 1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清をアスピレータで吸引除去した。その後 PBS 2 mL に懸濁し、1000 rpm、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。その後、1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去してから PBS 600 μL に懸濁し、InCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて SSC の測定およびデータの解析を行った。

9) AFM による DU145 細胞上の NPs 観察 :

ゼラチン粉末+純水で 1 mg/mL (0.1%)のゼラチン溶液を作製し、オートクレーブで 120 °C、10 分で溶解させた。35 mm dish にガラス基板を入れて 3 mlゼラチン溶液を入れて 60 分静置し、最終的にゼラチン溶液を除去し、クリーンベンチUV下で乾燥させた。AFM観察用に細胞を培養するためガラス基板にゼラチンをコートした。ゼラチンコート済のガラス基板に細胞を播種した。播種24時間後、細胞をカバーガラス上に接着させたまま固定(グルタルアルデヒド)した。固定した細胞をAFM装置 (プローブス

ーションSPI3800N (NanoNavi II Station)、SIIナノテクノロジー社;顕微鏡ユニット：SPA-400、SIIナノテクノロジー社) で測定し、写真撮影を行った。

10) 透過型電子顕微鏡(TEM)による観察：所定の条件で各細胞に Fe_3O_4 NPs と Fe_3O_4 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)。

11) Apoptosis の解析：

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が曝露 24 時間の場合は 1.5×10^5 cells/well、72 時間の場合は 8.0×10^4 cells/well となるように 6 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子曝露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。曝露 24 時間後または 72 時間後、まず培養液を 2000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、非接着細胞を回収した。また接着している細胞は、PBS を用いてナノ粒子をウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 200 μL を用いて細胞を剥離して ice-cold 培地で回収した。回収したすべての細胞を 2000 rpm、5 分の条件で遠心分離し、上清をアスピレータで吸引除去した。その後 ice-cold PBS 2 mL に懸濁し、2000 rpm、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。その後 10 \times concentrated binding buffer (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) を DW (Distilled water) で 10 倍希釈した溶液 500 μL に細胞を懸濁した。ここに Propidium Iodide (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 2.5 μL と Annexin V-FITC solution (Invitrogen, Carlsbad, California, USA) 5 μl をそれぞれ加えて氷上・室温で 15 分間静置した。その後、InCyte (Merck Millipore, Darmstadt, Germany) を用いて測定およびデータの解析を行った。

12) NF- κB の発現量の測定：

細胞密度が 2.0×10^5 cells/well(24 時間曝露)、 0.8×10^5 cells/well(72 時間曝露)となるように細胞を 6 well plate に播種した。細胞接着後、

Fe_3O_4 NPs あるいは Fe_3O_4 NPs-COOH 曝露を行った。一定時間後、PBS を用いて NPs をウォッシュアウトし、Trypsin/EDTA 250 μL を添加して細胞を剥離し、回収した。回収した全ての細胞を 1000 rpm、5 分の条件で遠心分離し上清を除去した後、PBS に懸濁した。15000 \times g、3 分の条件で遠心分離し、細胞をペレット状にした後上清を除去した。RIPA buffer 30 $\mu\text{L}/\text{sample}$ に protease inhibitor, phosphatase inhibitor を 0.3 $\mu\text{L}/\text{sample}$ ずつ混ぜ Mix を作り、各サンプルに 30 μL ずつ添加したあとホモジナイズした。4 $^\circ\text{C}$ 、15000 \times g、30 分の条件で遠心分離し、その上清を WB sample とした。Sample のタンパク質濃度を Brad ford 法によって測定し、全量 10 μL 、タンパク質量が 10 μg となるように sample と PBS を混合した。そこに同量の 2 \times SDS sample buffer(10% メルカプトエタノール含有)を加え計 20 μL とし、95 $^\circ\text{C}$ 、5 分の条件でタンパク質を変性させた。その後、E SDS-PAGE(Sodium Dodecyl Sulfate Poly-Acrylamide Gel electrophoresis)を行い、タンパク質を分離した。電気泳動を行ったゲルから PVDF membrane に分離したタンパク質を転写し、吸着させた。転写後、membrane を TBS-T buffer(2% BSA 含有)に 1 時間振盪させ、ブロッキングを行った。ブロッキング後、Signal Booster を用いて、一次抗体である β -actin 抗体(abcam)を 5000 倍希釈、NF- κB 抗体を 1000 倍希釈し、membrane を浸透させ、4 $^\circ\text{C}$ で一昼夜処理した。その後、TBS-T buffer に membrane を 10 分振盪し、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。

それぞれの抗体の動物種由来に対応する HRP 標識二次抗体を Signal Booster を用いて 10000 倍に希釈し、membrane を室温で 1 時間振盪した。その後、TBS-T buffer に membrane を 10 分振盪させ、洗浄した。この操作を 3 回繰り返した。洗浄後、発光試薬を membrane の表面に垂らし、5 分ほど反

応させ、検出器を用いて化学発光を検出し、バンドの検出を行った。各 Sample のバンドの定量化は Image J を用いて行った。

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

13) Autophagy の確認 :

細胞は 100 mm dish で予め培養を行い、細胞密度が暴露 24 時間の場合は 8.0×10^3 cells/well、暴露 72 時間の場合は 3.0×10^3 cells/well となるように 96 well plate に播種した。細胞接着後、ナノ粒子暴露や DTX 処理および阻害剤処理を行った。Positive control として、Tamoxifen (Cayman Chemical, Michigan, USA) 20 μ M で処理したサンプルも準備した。暴露 24 時間後および 72 時間後、まず plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離し、浮遊細胞を沈殿させ、上清を除去した。次に、MDC (Cayman Chemical, Michigan, USA) を Cell based assay buffer (Cayman Chemical, Michigan, USA) で 1000 倍希釈し、これを染色液として 100 μ L/well 加え、10 分間インキュベートした。その後、plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離し、上清を除去してから Cell based assay buffer を 100 μ L/well 加え、さらに plate ごと 400 \times g、5 分の条件で遠心分離して細胞を洗浄した。最後に、上清を除去し、Cell based assay buffer を 100 μ L/well 加え、蛍光顕微鏡を用いて観察および撮影を行った。撮影した画像は、画像ソフトウェア Image J を用いて細胞数、画像の輝度と発光面積を求め、定量化を行った。

(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* 実験主体である。また、遺伝子実験において、必要とする場合は当該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。動物実験に関しても、当該施設の委員会に申請を行い、動物愛護法などを遵

守して行なった。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。

C. 研究結果

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を示す (図 1,2)。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 μ m で実験を行う事に決定した。Fe₃O₄NPs 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 3 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 μ 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 4 に示す。スライドガラス上では曝露群 100 ± 20.2 %、100 μ 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。

細胞の状態を示す Integrinβ-1 および EGFR の発現を確認した。肺及び肝臓からの組織切片を切片担体として使用した。Integrinβ-1 および EGFR の発現は 2 次元培養より有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築された状態で培養されていると考えられた (図 5)。ナノ粒子の暴露により、肝臓組織切片担体上では、その発現が低下し、ナノ粒子の影響を受けたが、肺組織切片担体上の細胞では、ナノ粒子の細胞への影響は認めなかった。この切片担体培養系が生体内の臓器特異的 (あるいは組織特異的) 環境を再現できる系である可能性が考えられた。

ナノマテリアルの細胞内動態と傷害機構の解析

1) Fe₃O₄ NPs の DU145 細胞内の局在について:

細胞内に取り込まれた MNPs-Fe₃O₄ はエンドソームとみられる小胞内やミトコンドリアなどさまざまな細胞内小器官で観察された。また、多重膜を有する autophagosome とみられる小胞も確認された。表面修飾の有無で、局在が異なるのが確認された。特に非修飾の場合、細胞質での集積を顕著に認めた、修飾の場合は細胞内小器官への集積が認められた。

Flow cytometer (FCM) を用いて側方散乱光 (SSC) を測定では、MNPs-Fe₃O₄ の濃度依存的に SSC が増大し、細胞内への取り込み量が増大することが確認された。被修飾の場合、やや取り込み量が減少している傾向を認めた。

AFM での観察では、非修飾に比べてカルボキシル基修飾の方が細胞表面に付着している粒子量が多いことが認められた。細胞表面に付着している NPs 凝集体の粒径については、表面修飾の有無による違いは認められなかった。

2) 細胞生存率

前立腺癌細胞株において (図 6)、Fe₃O₄NPs および Fe₃O₄NPs-COOH の曝露量が増えるに従い、ともに細胞生存率は低下し、200 µg/mL 曝露時には有意に低下した (p<0.05)。しかし、Fe₃O₄NPs 曝露時に比べ、Fe₃O₄NPs-COOH 曝露時は細胞生存率の低下は抑制されるも両者の間に有意差は認めなかった。

3) ROS 生成の測定

細胞内の ROS の生成量について、定量化した結果を図 7 に示す。ROS の産生量を、Control 時を 1.00 [-] として数値化を行った。Fe₃O₄ NPs 曝露では、100 µg/mL 曝露時より有意に ROS 産生が確認された (p<0.05)。一方、Fe₃O₄ NPs-COOH 曝露では、濃度に関係なく著大な上昇を認めなかった。

4) NF-κB の発現量の測定

Control 時 1.00 [-]、DTX 1 nM 処理時 1.89 [-]、Fe₃O₄NPs-COOH 100 µg/mL 曝露時 1.65 [-]、DTX 1nM と Fe₃O₄NPs-COOH 100 µg/mL 曝露時 1.29 [-]、Fe₃O₄ NPs 100 µg/mL 曝露時 0.86 [-]、DTX 1nM と Fe₃O₄ NPs 100 µg/mL 曝露時 0.80 [-] であった (図 8)。NF-κB の発現量の変化は、修飾により異なる挙動を認めた。

5) Apoptosis について

暴露 24 時間後においては、Control 3.73%、DTX 1 nM 処理時 4.96%、MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露時 4.72%、DTX 1nM と MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露時 5.74% であった。また、暴露 72 時間後においては、Control 5.41%、DTX 1 nM 処理時 9.12%、MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/ml 曝露時 7.37%、DTX 1nM と MNPs-Fe₃O₄ 100 µg/mL 曝露

時 14.75%であった。

6) Autophagy について

ナノ粒子の修飾にかかわらず、濃度依存的及び時間依存的に autophagy を誘導し (図9)、ナノ粒子暴露により活性酸素種を産生する場合は、有意に apoptosis が加わり、細胞傷害をもたらすと考えられた。

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(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。Integrin β -1 および EGFR の発現は 2 次元培養より切片担体上での細胞で、有意差を持って発現量が上昇し、切片担体と細胞との相互関係が構築され、ナノ粒子曝露実験の結果からも、切片担体培養系が生体内の組織特異的環境を再現できる系である可能性が考えられた。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。

電子顕微鏡、Flow cytometry 及び原子間力顕微鏡を用いて、磁性体ナノ粒子の局在及び取り込みを確認した。修飾の有無により、その局在や取り込み量に変化することを認めた。文献的には、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)は、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上で、in vitro 系での細胞傷害が報告されている。本研究での結果は、それと一致する。その機構は、ROS の産生を起点として、細胞の生存シグナルとして重要な NF κ B の発現への影響による apoptosis や autophagy の誘導であることが判明した。一方、カルボキシル基修飾で、ROS の産生を抑制するも、細胞生存率の減少を若干抑制するのみで、apoptosis や autophagy を誘導することも判明した。

磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)の細胞への影響は、粒子側の修飾による ROS 産生の有無を起点とした異なる signal を介するも apoptosis や autophagy が関与する細胞側と粒子側の複合的関わりと考えられた。

E. 研究発表

1. 論文発表

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

- 邊昌俊.前立腺癌治療へのナノ粒子の応用.医学のあゆみ, 252(4), 303-8, 2015.
- (6) 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, 7098987, 2016.
- (7) 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. 39, 12, 2017.
- (8) 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. 259(3) 215, 2016.
- (9) 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. 259(3), 255-60, 2016.
- (10) 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., 39, 12, 2017.
- (11) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Sobti, M. Watanabe. Combined effects of Fe₃O₄ nanoparticles and chemotherapeutic agents on prostate cancer cells in vitro. Appl. Sci., 8, 134, 2018.
- (12) T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, M. Watanabe, T. Yamaguchi. Primordial oscillations in life: Direct observantion of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells. Chaos. 27, 104602, 2017.
- (1) M. Watanabe. Application of nanoparticles in prostate cancer theranostics (Invited Lecture). International symposium on innovation in animal sciences for food security, heath security and livelihood-2015, Oct.29-31, 2015, Lucknow, India.
- (2) M. Watanabe, N. Furuta, S. Hashimoto, K. Kojima, Y. Endo, T. Nittami, R. C. Sobti. Nanomedicine for prostate cancer therapy. Global Cancer Summit-2015, Nov.18-20, 2015, Bengaluru, India.
- (3) 渡邊昌俊, 中野洋, 白石泰三.各種方法を用いた前立腺癌細胞株 DU145 における磁性体ナノ粒子の取り込みの解析について.第 62 回日本臨床検査医学会学術集会、岐阜、2015 年 11 月.
- (4) N. Furuta, S. Hashimoto, J. Seo, K. Kojima, S. Yamaguchi, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic nanoparticles affect expression of cancer stem cell-related surface antigens in malignant cells. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (5) K. Kojima, S. Hashimoto, S. Yamaguchi, N. Furuta, Y. Endo, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, H. Ishiguro, H. Uemura, M. Watanabe. Combined effect of carboxylated magnetic nanoparticles and docetaxel on prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (6) S. Hashimoto, S. Yamaguchi, K. Kojima, N. Furuta, T. Nittami, K. Kawai, H. Kasai, M. Watanabe. Cellular effects of magnetic nanoparticles as determined by cell type and surface coating. 日本癌学会学術総会、名古屋、2015 年 10 月.
- (7) S. Yamaguchi, S. Hashimoto, N. Furuta, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Effects of magnetic nanoparticles on doxorubicin-based chemotherapy in prostate cancer cells (II). 日本癌学会学術総会、名古屋、

2. 学会発表

- 2015年10月.
- (8) 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.
- (9) 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.
- (10) 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.
- (11) 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.
- (12) 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.
- (13) S. Takahashi, S. Saito, K. Kanako, T. Nittami, M. Watanabe. MicroRNAs profiling of cancer cells after iron oxide nanoparticles exposure. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (14) K. Kojima, S. Saito, S. Takahashi, T. Nittami, M. Watanabe. Combination treatment of Iron oxide nanoparticles and docetaxel enhances docetaxel-induced apoptosis through inhibition of Nuclear Factor kappa B- and PI3K/Akt pathway in prostate cancer cells. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (15) S. Saito, S. Takahashi, K. Kojima, T. Nittami, M. Watanabe. Application of the substrata made of tissue/organ sections for histopathology (TOSHI) based systems for toxicity of nanomaterials. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜, 2017年9月.
- (16) K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, T. Nittami, M. Watanabe. Magnetic iron oxide nanoparticles induce apoptosis and autophagic cell death in prostate cancer cells treated with docetaxel *via* ROS generation and NFκB signaling. AACR annual meeting 2018, April.14-18, 2018, Chicago.

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

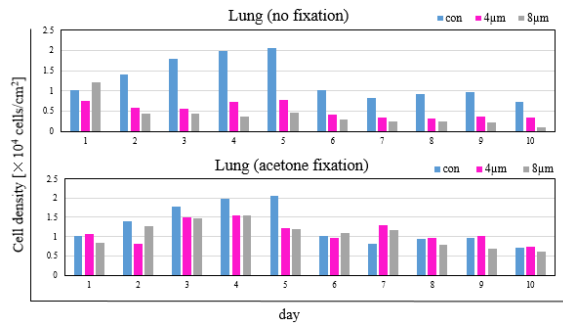


図 1. 肺組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

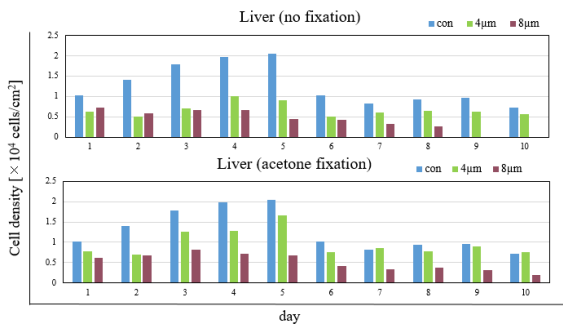


図 2. 肝組織切片担体上での A549 細胞の細胞密度の変化

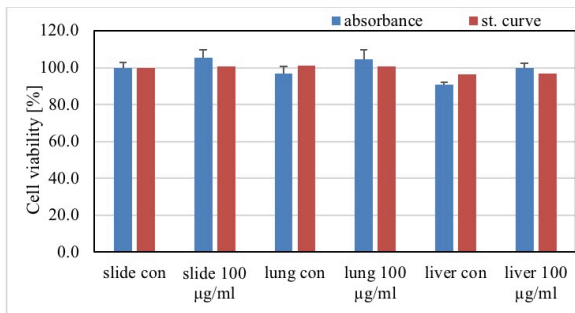


図 3. 磁性体ナノ粒子曝露による切片担体における細胞生存率

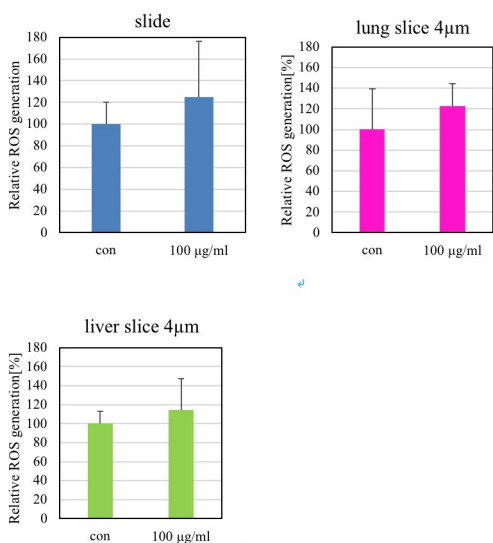


図 4. 組織切片担体上での A549 細胞の ROS 産生量

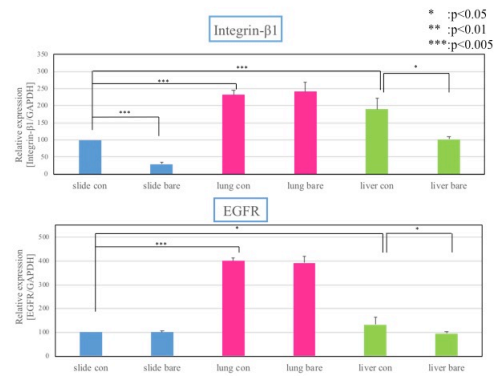


図 5. 切片担体と Integrin 及び EGFR 発現

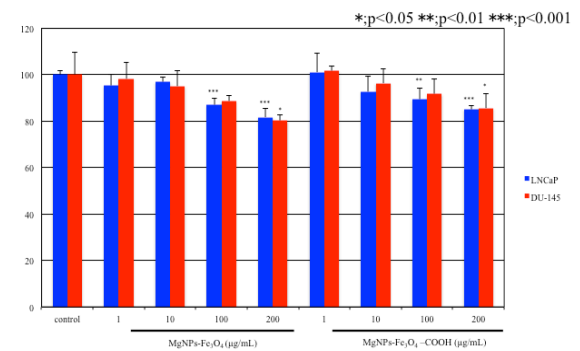


図 6. 磁性体ナノ粒子の表面修飾の有無と細胞生存率

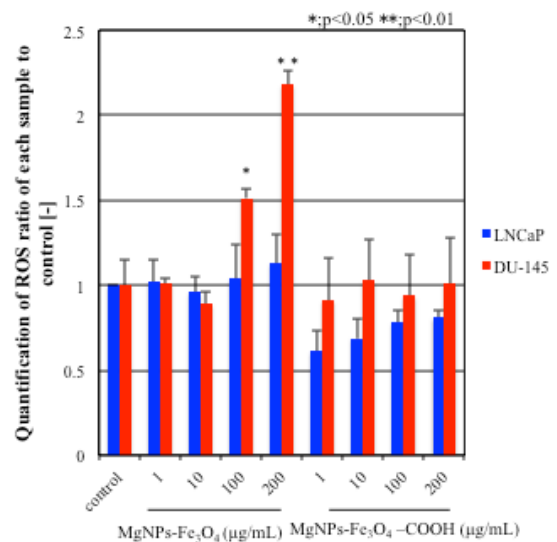


図 7. 磁性体ナノ粒子の表面修飾の有無と ROS 産生

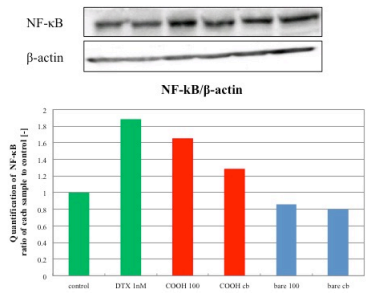


図 6. 磁性体ナノ粒子の表面修飾と NF-κB 発現量

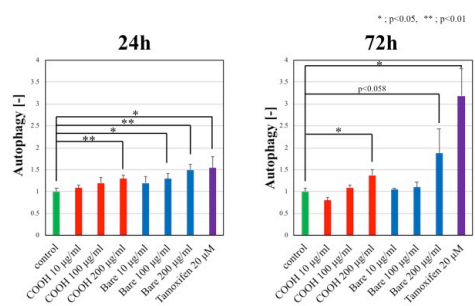


図 7. 磁性体ナノ粒子の表面修飾と Autophagy

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 幸壱朗 九州大学大学院歯学研究院 助教

研究要旨：分担研究として、ナノマテリアルの作製およびキャラクタリゼーションを目的とした。金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成した。金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指した。exadecyltrimethylammonium bromide (CTAB) を界面活性剤として用いて金および銀ナノ粒子を作製したが、CTAB が毒性を示す可能性があるということから、CTAB の代わりとなる物質を探索したところ、アミノ酸であるシステインが有用であった。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た。酸化チタンナノ粒子に関しては、酸化チタンナノ粒子の粒径や形状が毒性に与える影響を調べるために、酸化チタンナノ粒子の形状および粒径制御に取り組んだ。酸化チタンナノ粒子を作製する際に酵素であるウレアーゼを使用し、さらに尿素を触媒として使用することで、針状、ウニ状、中空状のナノ粒子が得られた。また、ウレアーゼや尿素の添加量を調節することで、ナノ粒子のサイズ制御が可能であった。今後、合成条件を最適化することにより、より精密な形状制御およびサイズ制御が可能になると考えられた。

A. 研究目的

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した。分担研究として、ナノマテリアルの作製及びキャラクタリゼーションを担当した。具体的には、金ナノ粒子および銀ナノ粒子の毒性を評価するために、水中分散安定性の高い金ナノ粒子および銀ナノ粒子を合成、すなわち金ナノ粒子水溶液および銀ナノ粒子水溶液の各粒子濃度は毒性試験が可能な 2 mg/mL を目指した。また、酸化チタンナノ粒子に関しては、ナノマテリアルの形状が毒性に与える影響を調べるために、球状以外の形状のナノ粒子の作製およびキャラクタリゼーシ

ョンを目的とした。

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 NaBH_4 水溶液（濃度 5.3 M）100 μ L を 1 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（I）水溶液、50 mM CTAB 水溶液をそれぞれ 5 mL ずつ調製した。硝酸銀（I）水溶液を CTAB 水溶液に一滴ずつ攪拌をしながら加えた。これにより溶液は黄色の銀錯体溶液となった。次にグルコース水溶液に対して水酸化ナトリウム水溶液を加え、さらに銀錯体溶液を加えた。反応により溶液は黄褐色となった。この溶液を 50°C で 5 時間超音波処理し、遠心分離によって未反応の CTAB を回収し、目的とする銀ナノ粒子溶液を得た。

4) CTAB 非使用で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) 酵素(ウレアーゼ)と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成(Ti 源: TiCl_4)

表 1 の条件で尿素とウレアーゼを蒸留水 10 mL に溶解した。この水溶液に TiCl_4 230 μ L をドラフト内で加え、発煙が収まったら溶液をよく攪拌し、60 °C の条件で 3 日間反応を行った。

各条件により得られた生成物を TiO_2 NPs-1 ~ 10 とする。

6) TiCl_4 以外の原料からの TiO_2 NPs の作製

尿素 96 mg およびウレアーゼ 50 mg を水 10 mL に溶解させた。この水溶液に tetrabutyl orthotitanate 717 μ L または bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium 1019 μ L または tetrabutyl orthotitanate tetramer

1851 μ L または tetraisopropyl orthotitanate 636 μ L を加え溶液をよく攪拌し、

60 °C の条件で 3 日間反応を行った。反応終了後、生成物を水で 3 回洗浄し最終的に 10 mL の水に分散させた。Ti 原料の構造式を図 1 に示す。また、生成物はいった原料によってそれぞれ TiO_2 NPs-11, 12, 13, 14 と記す。

C. 研究結果

一般的な方法で作製した金ナノ粒子の特性

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、分担研究者より 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。

一般的な方法で作製した銀ナノ粒子の特性

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 以上にすると凝集し、沈降してしまっただ。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。

高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法で作製した銀ナノ粒子の特性

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。

CTAB 非使用で作製した金ナノ粒子および銀ナノ粒子の特性

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。一方、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。

これら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。

酵素(ウレアーゼ)と尿素を用いた酸化チタンナノ粒子の合成(Ti 源:TiCl₄)

得られた粒子の TEM 像を図 7 に示す。TiO₂ NPs-1~3 は針状粒子の集合体を形成していた。TiO₂ NPs-4 と 5 は中空構造の中空ナノ粒子であり、それぞれ粒径が約 600 nm, 10 nm であった。TiO₂ NPs-6~8 は針状粒子からなる不規則な凝集体であった。TiO₂ NPs-9 と 10 は球状粒子であった。

TiCl₄以外の原料からの TiO₂ NPs の作製

図 8 に生成物の TEM 像を示す。一次粒子の粒径は異なるが全て球状粒子の凝集体であった。TiO₂ NPs-13 において、一部中空粒子が確認された。

以上の 1 および 2 の結果から、原料や合成条件、またはこれらに依存する反応速度の違いが生成物の形状に影響を与えることが明らかになった。現在、新たな合成方法を検討している最中であり、安定的に中空構造のナノ粒子が得られつつある。今後、さらなる条件検討により、この方法を確立することを計画している。

D. まとめ

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た。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かった。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ったが、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た。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。

原料や合成条件、またはこれらに依存する反応速度の違いが生成物の形状に影響を与えることが明らかになった。現在、新たな合成

方法を検討している最中であり、安定的に中空構造のナノ粒子が得られつつある。今後、さらなる条件検討により、この方法を確立することを計画している。

E. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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.*, 26, 8613–22, 2016.
- (2) K. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy, *Adv. Funct. Mater.*, 26, 1708–18, 2016.
- (3) 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.*, 517, 21–9, 2016.
- (4) 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.*, 502, 133–40, 2016.
- (5) 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.*, 51, 3398–407, 2016.
- (6) 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.*, 108, 012907, 2016.
- (7) 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.*, 55, 10TA14-1, 2016.
- (8) K. Hayashi. Multifunctional hybrid nanoparticles for biomedical applications. *J. Ceram. Soc. Jpn.*, 124, 855–62, 2016.
- (9) 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.*, 3, 95–105, 2017.
- (10) 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.*, 492, 127–35, 2017.
- (11) K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels, *ACS Biomater. Sci. & Engin.*, 3, 1129–35, 2017.
- (12) M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo. Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles, *Sci. Rep.*, 7, 3953, 2017.
- (13) K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and

repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis, *Adv. Funct. Mater.*, 28, 1706332, 2018.

- (14) K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo. Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis, *Biomater.*, 156, 45-55, 2018.
- (15) H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin, J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe. Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia, *Oncotarget*, 9, 10307-16, 2018.
- (16) K. Ishikawa, T. Arifta, K. Hayashi, K. Tsuru. Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres, *J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.*, 2018. doi: 10.1002/jbm.b.34117.

2. 学会発表

- (1) 林幸壱朗, 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) 林幸壱朗, 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. 林幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と

生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演

- (4) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Dual Stimulus-Responsive Degradable Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *BIT's 7th Annual World Congress of Nano Science & Technology 2017*, Oct. 24-26, 2017, Fukuoka. 招待講演
- (5) K. Hayashi. One-Pot Synthesis of Organic-Inorganic Hybrid Hollow Nanoparticles for Fluorescence Image-Guided Trimodal Therapy. *2nd International Symposium on Creation of Life Innovation Materials for Interdisciplinary and International Researcher Development*, Sep. 29-Oct. 1, 2017, Nagoya. 招待講演
- (6) 林幸壱朗. 多機能ナノ／マイクロ粒子の合成と診断・治療への応用. 第 7 回 ナノカーボンバイオシンポジウム, 2017 年 9 月 12 日, 京都大学. 招待講演
- (7) 林幸壱朗. 多機能性ナノ・マイクロ粒子の作製と生物医学応用. 日本ゾルーゲル学会第 15 回討論会, 2017 年 8 月 7 日-8 日, 大阪. 招待講演

F. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許出願

- (1) 林幸壱朗, 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 28 日, 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) 林幸壱朗, 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方法”, 出願番号 (国内: 特願 2016-91359, 2016 年 04 月 28 日, 国際: 2017 年 2 月 10 日, PCT/JP2017/4981), 国立大学法人名古屋

屋大学, 倉敷紡績株式会社, 日本国.

3. その他

- 1) 林幸壺朗. “新ナノ粒子でがん狙い撃ち 名大チーム”, 中日新聞. 平成28年12月18日
- 2) 林幸壺朗. “赤血球状の粒子 肝臓に薬剤運搬”, 日経産業新聞, 平成29年12月8日

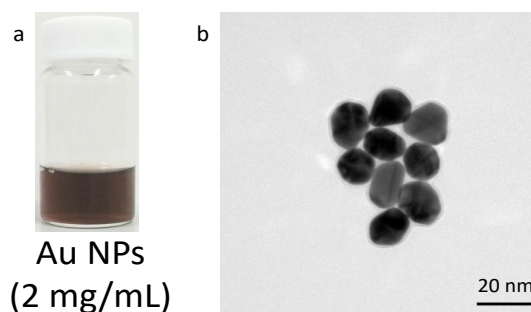


図 2 (a). 金ナノ粒子水溶液 (2 mg/mL) の写真, (b) 金ナノ粒子の TEM 像

表 1. TiO₂ NPs の合成条件

サンプル	尿素 (mg)	ウレアーゼ (mg)
TiO ₂ NPs-1	12	50
TiO ₂ NPs-2	24	50
TiO ₂ NPs-3	48	50
TiO ₂ NPs-4	96	50
TiO ₂ NPs-5	192	50
TiO ₂ NPs-6	12	100
TiO ₂ NPs-7	24	100
TiO ₂ NPs-8	48	100
TiO ₂ NPs-9	96	100
TiO ₂ NPs-10	192	100

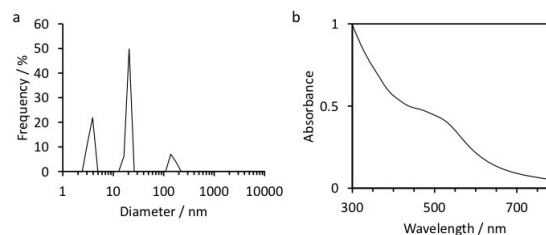


図 3 (a). 金ナノ粒子の水中での粒度分布, (b) 金ナノ粒子水溶液の吸収スペクトル

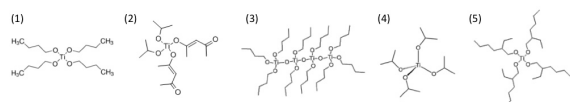


図 1. 原料の構造 : (1) tetrabutyl orthotitanate, (2) bis(2,4-pentanedionato)-bis(2-propanolato)titanium, (3) tetrabutyl orthotitanate tetramer, (4) tetraisopropyl orthotitanate, (5) titanium 2-ethylhexyloxide

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



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

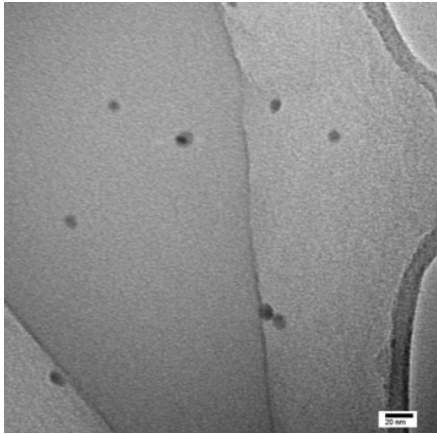


図 5 高濃度の銀ナノ粒子分散液を作製する方法による銀ナノ粒子の TEM 像

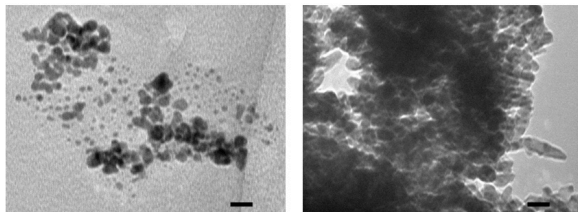


図 6. CTAB 非使用の方法により作製した金ナノ粒子（左）と銀ナノ粒子（右） TEM 像（スケールバー：20 nm）

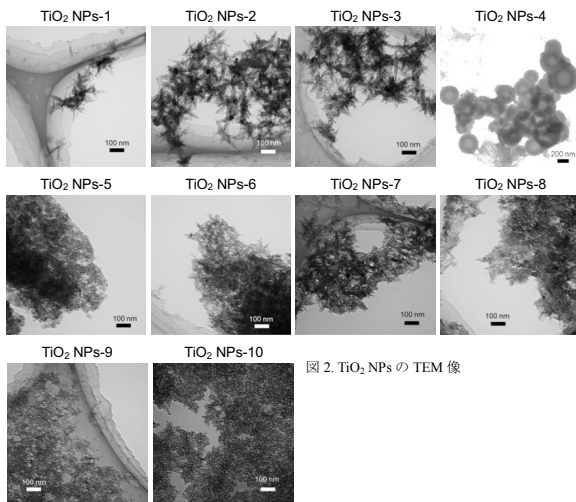


図 2. TiO₂ NPs の TEM 像

図 7.酸化チタンナノ粒子の TEM 像

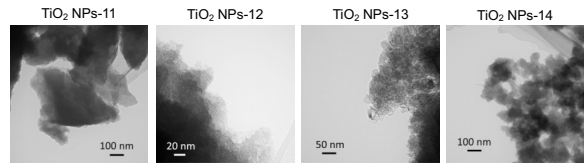


図 3. TiO₂ NPs-11～14 の TEM 像

図 8.酸化チタンナノ粒子 No.11-14 の TEM 像

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

研究要旨：ナノマテリアルのより適切な安全性評価系の構築を目指し、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、ナノマテリアルにより誘発される DNA 損傷のより詳細な評価を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってナノマテリアル投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。この結果に基づき、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 遺伝毒性評価法として、マウス肺由来の GDL1 細胞とマクロファージ様の RAW264 を共培養する系の構築を行った。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。更に、この評価系を用い、遺伝毒性に対する表面修飾（ポリアクリル酸）の有無の影響を観察した。表面修飾の異なる MGT (BMS-10 及び BMSC-5) で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10 は共培養条件下で変異頻度が増加しており、対して、BMSC-5 は単培養条件下で変異頻度の増加が観察された。このことから、BMS-10 は RAW264.7 による間接的な影響が強くており、BMSC-5 は GDL1 への直接的な影響が強くているため、遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いた MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各 MGT で大きく異なる変異スペクトルが確認され、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。これら MGT の細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5 は BMS-10 よりも細胞内への取り込みが低いことがわかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなったと考えられる。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強くなるメカニズムについて検討を行なっている。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思われる。引き続き、本解析システムの妥当性を更に検討するとともに、形状やサイズの異なるナノマテリアルや様々な表面修飾を施したナノマテリアルの毒性評価を行なうことが、有用なナノマテリアルのリスク低減化を検討する上で重要と思われた。

A. 研究目的

既存の *in vitro* 遺伝毒性試験としては、Ames 試験（変異原性試験）、コメットアッセイ（DNA 損傷試験）、小核試験（染色体異常試験）などが簡便な試験法として汎用されている。しかしながら、これらの *in vitro* 試験のみでは微粒子などの化学物質の遺伝毒性評価は難しく、別の視点から遺伝毒性を評価する試験法を更に追加することが必要であると考えられる。そこで我々は、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検討を行った。

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。本研究では、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)、マグネタイトナノ粒子 (MGT)を用いて共培養系を用いた *in vitro* 気道毒性試験系の妥当性検討を行った。また、毒性の低減化も考慮して表面修飾の有無やサイズ違いなどの物理化学的な状態変化が遺伝毒性に対する影響についても観察した。

B. 研究方法

● 使用したナノマテリアル

本研究では、繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L; 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)、ポリアクリル酸修飾を施した MGT (BMSC-5)と修飾を施していない MGT(BMS-10)を使用した。

◆ 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

非修飾マグネタイト(BMS-10, 0.05% Tween20 に懸濁)を経気道的に ICR マウス(オス, 7 週齢)に曝露した。その際、同時に 0.05% Tween20 のみを投与したマウスを準備しコントロールとした。投与から 24 時間後に屠殺し、肺を摘出した。肺から DNaseI、ヌクレアーゼ P1、アルカリホスファターゼ、ホスホジエステラーゼによりモノデオキシリボヌクレオシドに消化した後、水-メタノールの溶媒系を用い LC-QToF-MS で DNA 付加体を網羅的に分析した。得られたデータの主成分解析から複数の付加体が MGT 投与群に特徴的なものとしてスクリーニングされた。これら付加体の同定は既に構築済みの DNA 付加体リストとの比較により行った。

◆ 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

本研究では繊維長の異なる MWCNT (MWCNT-L① 85~200 nm, MWCNT-S; 40~70 nm)を使用した。

① *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。

② 共培養システムによる遺伝毒性試験法

本研究で用いた共培養システムを図 1 に示す。

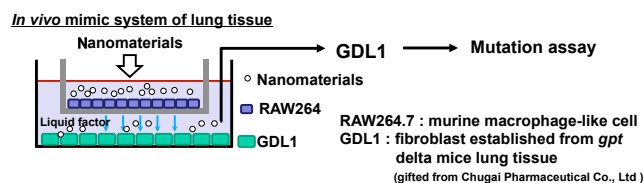


図 1 共培養システムによる *in vitro* 気道毒性試験

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 λEG10 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、λEG10 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°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。

マグネタイト(MGT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

本研究ではポリアクリル酸修飾を施した MGT (BMSC-5)と修飾を施していない MGT(BMS-10)を使用した。

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。BMSC-5 及び BMS-10 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細胞から DNA を抽出し、前述の方法に従って *gpt* 遺伝子の変異を解析した。

② ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

6well plate に GDL1 及び RAW264.7 を 1.0×10^6 cells/well 及び 2.0×10^6 cells/well で播種し、24 時間前培養した。各細胞に BMS-10 及び BMSC-5 を 50 μg/mL で 24 時間曝露した後、トリプシン処理によ

り細胞を回収し、1mL の PBS で再懸濁した後、10%ホルマリン溶液を入れ細胞固定を行なった。フローサイトメーター(FCM)を用いて、得られた細胞固定サンプルの解析を行った。

(倫理面への配慮)

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がん研究センターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

C. 研究結果

◆ ナノマテリアルによる DNA の直接及び間接的損傷性評価系の構築

BMS-10 をマウスに経気道曝露し、投与後 24 時間後に肺を摘出し DNA を抽出後、HPLC-QToF-MS を用いて DNA 付加体を分析した。その結果、^① vehicle 投与群と比べて、MGT 投与群においてより多くの DNA 付加体が生成されていた(図2)。PCA 解析の結果、幾つかの付加体が MGT 投与に特徴的なものとしてスクリーニングされた(図3)。これら付加体の m/z 値を既知の DNA 付加体の標品と比較したところ、酸化ストレス及び炎症由来の付加体であるエテノ-dC(ϵ dC)などであることが示唆された(表1)。

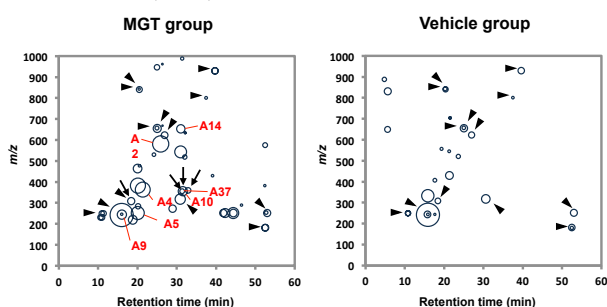


図2 MGT投与群及びコントロール群のDNA付加体マップ

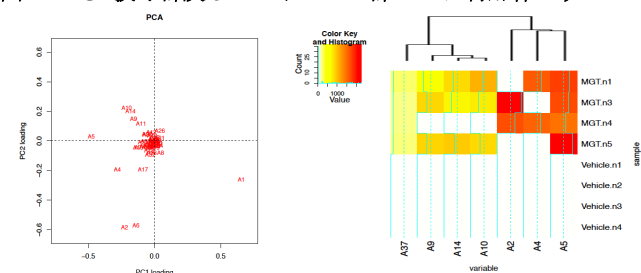


図3 PCA解析の結果

表1 MGT曝露に特徴的な付加体としてスクリーニングされたもの

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

◆ 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

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4)。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5)。

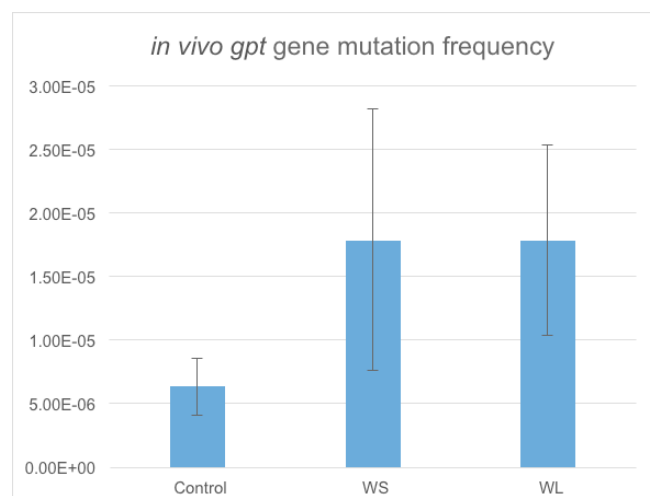


図4 繊維長の異なる MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性

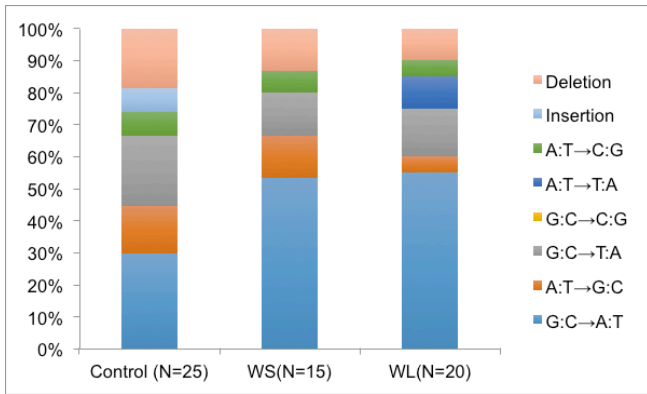


図5 *gpt delta* マウス肺に観察された変異スペクトル

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 時間暴露し、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 (図 6)。

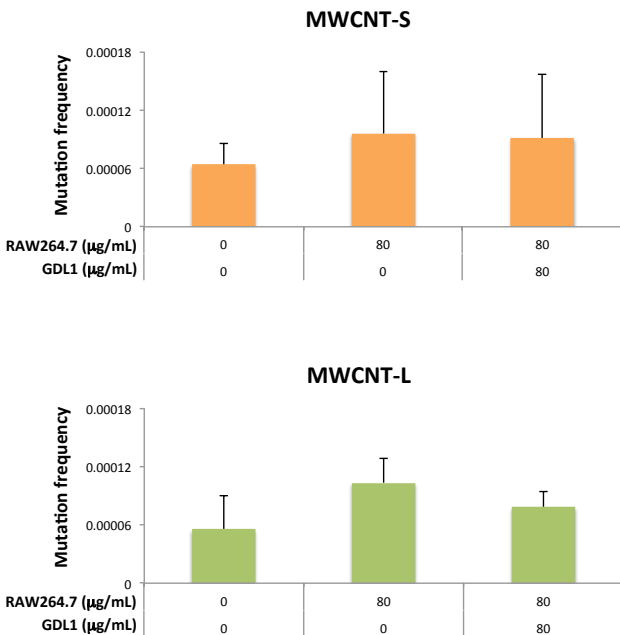


図6 単培養及び共培養下に GDL1 細胞に観察された *gpt* 変異頻度

次に、繊維長の異なる MWCNT による変異スペクトルを解析した。その結果、MWCNT-S ではコントロールと比較して G:C→C:G および A:T→C:G が、MWCNT-L では G:C→T:A および A:T→C:G が増加しており、繊維長の異なる MWCNT では変異スペクトルのパターンに違いが観察された (図 7)。

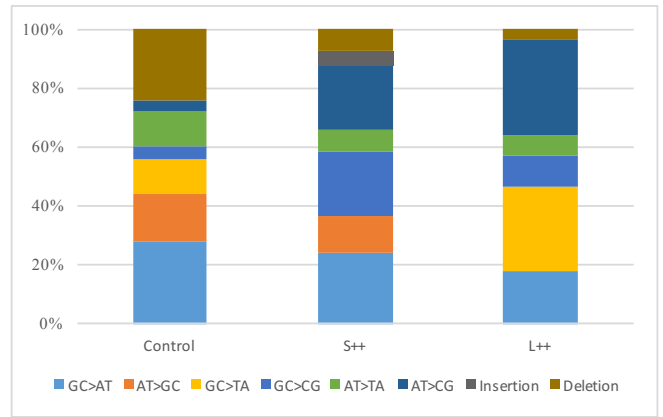


図7 GDL1 細胞に観察された変異スペクトル

マグネタイト(MGT)による共培養系 *in vitro* 気道毒性試験の妥当性検討

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 の両細胞に各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間暴露し、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。結果を図 8 に示す。MGT 曝露群では溶媒対照群と比較して変異頻度が増加する傾向が観察された。また、BMS-10 では、単培養に比較して RAW264.7 との共培養条件下で変異頻度が上昇する傾向が観察されたが、BMSC-5 では単培養条件下で高い変異頻度が観察されており、共培養条件下では MF が減少する傾向が観察された。また、両 MGT を比較すると、BMSC-5 の方が高い変異頻度を示していた (図 9)。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 MGT により誘発される変異スペクトルの解析を試みた。その結果、両者では観察された変異スペクトルが大きく異なることがわかった。これらのことから、ポリアクリル酸の表面修飾が遺伝毒性発現に何かしらの影響を及ぼしていることがわかった。

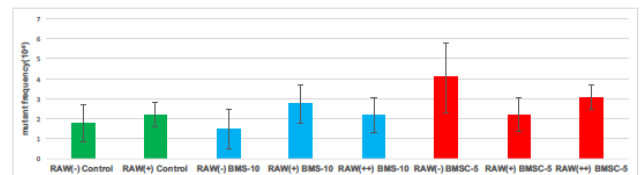


図8 GDL1細胞に観察された変異頻度

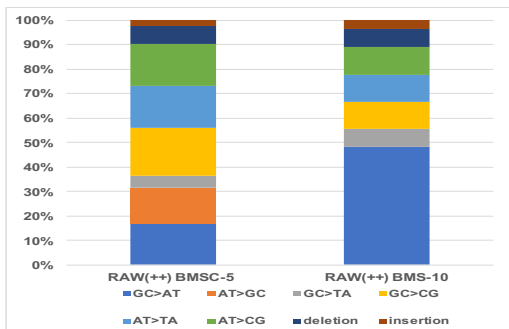


図9 MGT 暴露により GDL1 細胞に観察された変異スペクトル

② ナノマグネタイト粒子の細胞への取り込み

各 MGT(BMS-10、BMSC-5)を 24 時間暴露した各細胞固定サンプルをフローサイトメーターで解析を行った。FCM では、細胞の大きさの指標である前方散乱光(FS)と細胞内の複雑さの指標である側方散乱光(SS)を測定した。結果を図 10 に示す。BMS-10 暴露群は溶媒対照群と比較してどちらの細胞も SS 値が増加した細胞数が増加し、細胞内取り込み量が増加した。また貪食細胞である RAW264.7 の方が GDL1 よりも取り込み量が多いことが観察された。対して BMSC-5 暴露群は溶媒対照群と比較して、SS 値が増加した細胞数に変化がなく、細胞内に殆ど取り込まれていないことが観察された。

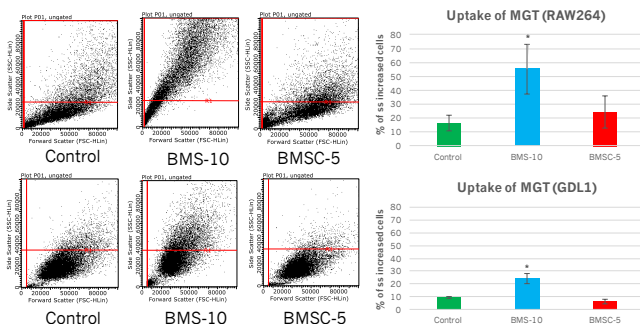


図 10 各 MGT の細胞への取り込み

D. 考察

MGTを投与したマウスの肺からDNAを抽出し、アダクトーム法を用いてDNA付加体の網羅的な解析を行なったところ、炎症及び酸化ストレスに起因する付加体が複数個抽出された。よってMGT投与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。このようなナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた*in vitro*遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系を考えた。本手法を用いてMWCNTの変異原性を評価してみた。まず、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。これらのことから、*in vitro*共培養系を用いた遺伝毒性評価は生体を模倣した新たな遺伝毒性評価システムとして、ナノマテリアルなどの化学物質の毒性評価に有用であることが示唆された。

更に、この評価系を用い、遺伝毒性に対する表面修飾(ポリアクリル酸)の有無の影響を観察した。表面修飾の異なるMGT (BMS-10及びBMSC-5)で異なる変異頻度の増加が観察された。BMS-10は共培養条件下で変異頻度が増加しており、対して、BMSC-5は単培養条件下で変異頻度の増加が観察された。このことから、BMS-10はRAW264.7による間接的な影響が強くており、BMSC-5はGDL1への直接的な影響が強くてしているため、遺伝毒性メカニズムが異なり、遺伝毒性に違いが出たと考えられる。変異原性誘発のメカニズム探索のため、本研究で用いたMGTにより誘発される変異スペクトルの解析を試みたところ、各MGTで大きく異なる変異スペクトルが確認された。特にBMSC-5暴露群ではBMS-10暴露群では見られなかったGC>ATの変異が見られた。表面修飾の違いにより大きく異なる変異スペクトルを示したことから、表面修飾が遺伝毒性発現に強い影響を示していると考えられる。さらに、細胞への取り込みを観察した結果、BMSC-5はBMS-10よりも細胞内に取り込まれなかった。このことからポリアクリル酸の表面修飾を施すことによって、貪食細胞に認識されず貪食されにくくなり、細胞内に取り込まれにくくなったと考えられる。今後は、これらナノマテリアルによるROS産生や炎症性サイトカインの放出などについて検討を行う予定である。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思われる。

E. 結論

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

与により、マウス肺に炎症及び酸化ストレスが誘発され、これにより変異原性が誘発されることが推測された。この結果に基づき、ナノマテリアルの遺伝毒性メカニズムに基づいた *in vitro* 遺伝毒性評価法として、マウス肺由来のGDL1細胞とマクロファージ様のRAW264を共培養する系の構築を行った。この手法を用いて、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。

更に同システムを用い、遺伝毒性に対する表面修飾の違いが及ぼす影響についても観察した。表面修飾を施していないMGTと比較して、ポリアクリル酸の表面修飾を施したMGTは細胞内には取り込まれにくい、遺伝毒性は強く、また観察された変異スペクトルは両者で全く異なるという結果となった。現在、ポリアクリル酸修飾により毒性が強くなるメカニズムについて検討を行っている。

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

F. 健康危険情報

特になし。

(分担研究報告書には記入せずに、総括研究報告書にまとめて記入)

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, Y. Totsuka, K. Fujimoto, M. Mutoh. Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice. *Cancer Sci.*, 106(11), 1499-505, 2015.

- (2) 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*, 37, 817-26, 2016.
- (3) 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.*, 39, 12, 2017.
- (4) N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, Y. Totsuka. Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane. *Mutagenesis*, 32, 455-62, 2017.
- (5) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.
- (6) T. Toyoda, Y. Totsuka, K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa. γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline. *J. Appl. Toxicol.*, 38, 537-43, 2018.

2. 学会発表

- (1) 戸塚ゆ加里、中釜 齊. 質量分析機器を用いた DNA 付加体の網羅的解析による中国の食道癌発症要因の解明. 第 42 回日本毒性学会学術大会. 2015 年 7 月.
- (2) Yukari Totsuka, Yingsong Lin, Mamoru Kato, Yasushi Totoki, Tatsuhiro Shibata, Yoshitaka Matsushima, Hitoshi Nakagama. Exploration of cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). 日本癌学会学術総会. 2015 年 10 月.
- (3) 戸塚ゆ加里. ゲノム解析および DNA 付加体の網羅的解析による発がん要因の探索. 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月.
- (4) 秋場 望、椎崎一宏、遠藤 治、三牧幸代、土原一哉、中釜 齊、戸塚ゆ加里. 職業性胆管癌の候補物質、ジクロロメタン及び 1,2-ジクロロプロパンの変異原性に対するグルタチオン-S-転移酵素の影響. 第 44 回日本環境変異原学会. 2015 年 12 月.
- (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関与する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) 戸塚ゆ加里. DNA付加体形成と突然変異誘発. 第44回日本毒性学会, 横浜, 2017年7月. 1.
- (15) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, EA. Izawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using comprehensive DNA adduct analysis (DNA adductome analysis). EEMGS、ノースカロライナ、2017年9月.
- (16) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜 2017年9月.
- (17) 今井俊夫, 落合雅子, 成瀬美衣, 松浦哲也, 戸塚ゆ加里, 筆宝義隆. マウス正常上皮の3次元培養系を用いる化学発がん家庭の早期変化検出系. 第76回日本癌学会学術総会, 横浜 2017年9月.
- (18) 佐藤春菜, 落合雅子, 今井俊夫, 戸塚ゆ加里. マウス正常組織由来オルガノイドを用いた遺伝毒性解析法の構築. 第46回日本環境変異原学会, 東京, 2017年11月.
- (19) 前迫裕也, 善家茜, アスマ エルザワハリ, 古川英作, 加藤護, 白石航也, 河野隆志, 椎崎一宏, 戸塚ゆ加里. 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46回日本環境変異原学会, 東京, 2017年11月.
- (20) 秋場望, 佐藤春菜, 松田知成, 遠藤 治, 稲葉一穂, 戸塚ゆ加里. モデル生物を用いた化学物質により誘発される変異シグネチャーの解析. 第46回日本環境変異原学会, 東京, 2017年11月.
- (21) 神尾翔真, 斎藤春吾, 渡邊昌俊, 椎崎一宏, 戸塚ゆ加里. 生体を模倣したナノマテリアルの新規毒性評価システムの確立. 第46回日本環境変異原学会, 東京, 2017年11月.
- (22) Y. Totsuka. Adductomics IWGT 2017 (東京, 2017年11月)
- (23) Y. Totsuka, Y. Lin, Y. He, H. Sato, T. Matsuda, Y. Matsushima, M. Kato, A. Elzawahry, Y. Totoki, T. Shibata, B. Shan, H. Nakagama. Exploration of esophageal cancer etiology using DNA adductome analysis. 12thICEM-5thACEM、仁川、2017年11月.
- (24) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. International Conference on Environmental Health and Environmental-related Cancer Prevention 2017、つくば、2017年12月.
- (25) Y. Totsuka. Exploration of cancer etiology using genome analysis and comprehensive DNA adduct analysis. 18th All India Congress of Cytology and Genetics、コルカタ、2018年1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。

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学部食品安全健康学科 助教

研究要旨：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。本研究は、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フォルペット（農薬，陽性対照物質）と金ナノ粒子・銀ナノ粒子およびカルボキシル基による表面修飾をされた、またはされていないマグネタイトの表皮傷害性と表皮侵入性について、正常ヒト表皮由来ケラチノサイト NKEK（クラボウ）またはヒト肝癌由来細胞 HepG2 の単層培養系において、それら化学物質の細胞傷害性について、それぞれ解析した。その結果、再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、金属ナノ粒子はいずれも皮膚障害性が低かったが、マグネタイトは単層培養ケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、（成熟した）角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を *in vitro* で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D 皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の発揮には成熟した角質層の存在が（少なくとも部分的に）関与している。表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質（今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無）が関与し、その状況（今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと）によっては表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在が表皮通過を防御できることも判明した。マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。以上より、3D ヒト皮膚再構成系は、*in vivo* に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

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べ

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

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

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。実験時の培養条件は、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、実験には、角質層が成熟した13日培養品のほか、角質層が未成熟の3日培養品および6日培養品を用いた。

1-2) 単層培養系

単層培養系としては、正常ヒト表皮由来ケラチノサイトNKEK（クラボウ）またはヒト肝癌由来細胞HepG2を、適宜継代したものを用いた。実験時の培養条件は、前項と同様とした。

2) 被験物質

2-1) 陽性対照物質

陽性対照物質としては、農薬として用いられるフタルイミド系殺菌剤で、皮膚毒性

が報告されているフォルペット（*N*-（トリクロロメチルチオ）フタルイミド）（シグマ・アルドリッチ）を、ジメチルスルホキシド（DMSO）を溶媒として用いた。

2-2) 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 幸壺朗 博士（名古屋大学エコトピア科学研究所）が、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。

マグネタイト（酸化鉄ナノ粒子）は、本研究の研究代表者である渡邊 昌俊 博士（三重大学大学院医学系研究科）が、本研究班全体に分配したものである。詳細は、渡邊博士の報告書を参照されたい。マグネタイトは、一次粒径1-100 nmのマグヘマイト（ Γ -Fe₂O₃）およびマグネタイト（Fe₂O₄）粒子から成り、蒸留水（pH 9.6）を媒体とし、表面をカルボキシル基で修飾されたもの（表面修飾マグネタイト）が2.2%、されていないもの（表面非修飾マグネタイト）が2%の濃度の懸濁液として供給された。

3) 実験および解析

被験物質への曝露は、3Dヒト皮膚再構成系において表皮組織上面から（図1）、単層培養系において培地中へ、それぞれ行った。詳細な実験条件は、結果の項に記す。

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）、生細胞によるニュートラルレッド取り込み（NRアッセイ）、生細胞による3-（4,5-ジ-

メチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウム臭化物取り込み (MTTアッセイ)、生細胞によるレサズリン取り込み (Alamar Blueアッセイ) を指標として、それぞれ生化学的に解析した。

3Dヒト皮膚再構成系においては、さらに、以下の解析を行った。

3-1) 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病理組織学的に解析した。

3-2) 金属ナノ粒子の表皮透過性について解析するため、培地を回収して金・銀・鉄の含有量をICP-MSにより測定した (東海技術センター)。

3-3) RNAを抽出し、表皮角質層の構成蛋白で皮膚の「バリア機能」に関与するとされるフィラグリン (FLG)、細胞接着因子で同じく皮膚の「バリア機能」に関与するクローディン1 (CLDN1)、炎症性サイトカインである腫瘍壊死因子アルファ (TNF- α) 遺伝子発現をreal-time PCRで解析した。

(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) フォルペット

1-1) 3Dヒト皮膚再構成系

フォルペットは、最終濃度0・100・1000・2000 (遺伝子発現解析のみ1500) $\mu\text{g/mL}$ で24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系 (13日培養品) では2000 $\mu\text{g/mL}$ のみで、角質非成熟再構成系 (6日培養品)

では1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で、それぞれ強い細胞毒性を示した (図2)。

病理組織学的解析では、角質層成熟再構成系 (13日培養品) において、2000 $\mu\text{g/mL}$ 群のみで基底層細胞の配列の乱れと、有棘層・基底層細胞の肥大を観察した (図3)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系 (13日培養品) において、FLGとCLDN1に関して100 $\mu\text{g/mL}$ 以上で濃度依存的に減弱し、一方、TNF- α に関して1000 $\mu\text{g/mL}$ 以上で増強した (図4)。

1-2) NKEK単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 $\mu\text{g/mL}$ で24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、30 $\mu\text{g/mL}$ 以上で強い細胞毒性を示した (図5)。

1-3) HepG2単層培養系

フォルペットは、最終濃度0・1・10・30・60・100 $\mu\text{g/mL}$ で24時間曝露した。MTTアッセイを試みた結果、60 $\mu\text{g/mL}$ 以上で強い細胞毒性を示した (図5)。

2) 金ナノ粒子

2-1) 3D皮膚再構成系

金ナノ粒子は、最終濃度1・3・7・15・31・62.5・125・250・500・1000 $\mu\text{g/mL}$ で24時間曝露した。LDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系 (13日培養品) において、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった (図6)。

病理組織学的解析において、金ナノ粒子は、角質層成熟再構成系 (13日培養品) の表皮内に侵入せず、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7)。

ICP-MS解析は、金ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系 (13日培養品) の培地中に金を検出した。

2-2) HepG2単層培養系

金ナノ粒子は、最終濃度0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mLで24時間曝露した。LDHアッセイおよびNRアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図8)。

3) 銀ナノ粒子

3-1) 3D皮膚再構成系

銀ナノ粒子は、最終濃度31・125・500・1000 µg/mLで24時間曝露した。LDHアッセイおよびNRアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)において、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図9)。

病理組織学的解析において、銀ナノ粒子は、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、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10)。

ICP-MS解析は、銀ナノ粒子の投与用量に依存して、角質層成熟再構成系(13日培養品)の培地中に銀を検出した。

3-2) HepG2単層培養系

銀ナノ粒子は、最終濃度0.3・0.7・1.5・3.1・6.2・12.5・25・50・100 µg/mLで24時間曝露した。LDHアッセイおよびNRアッセイを試みた結果、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図11)。

4) マグネタイト

4-1) 表面修飾マグネタイト

4-1-1) 3D皮膚再構成系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)(図12)・角質非成熟再構成系(6または3

日培養品)のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系(13日培養品)の表皮内に侵入せず、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13)。

ICP-MS解析は、表面修飾マグネタイトの投与用量に依存して、角質層成熟再構成系(13日培養品)培地中に鉄を検出した(図14)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系(13日培養品)の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF-αに関して変化しなかった(図15)。

4-1-2) NKEK単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24時間培養ではいずれの用量でも細胞毒性を示さなかったが、72時間培養では200 µg/mL群で強い細胞毒性を示した(図16)。

4-1-3) HepG2単層培養系

表面修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 µg/mLで24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった(図17)。

4-2) 表面非修飾マグネタイト

4-2-1) 3D皮膚再構成系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・2・6.7・20 mg/mLで24時間曝露した。MTTアッセイおよびLDHアッセイを試みた結果、角質層成熟再構成系(13日培養品)

(図12) ・角質非成熟再構成系 (6または3日培養品) のいずれにおいても、いずれの用量でも細胞毒性を示さなかった。

病理組織学的解析において、表面非修飾マグネタイトは、角質層成熟再構成系 (13日培養品) の表皮内に侵入せず、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13)。

ICP-MS解析は、表面非修飾マグネタイトのいずれの用量でも、角質層成熟再構成系 (13日培養品) 培地中に鉄を検出しなかった (図14)。

遺伝子発現については、角質層成熟再構成系 (13日培養品) の20 mg/mL群において、FLGに関して低下し、CLDN1とTNF- α に関して変化しなかった (図15)。

4-2-2) NKEK単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 $\mu\text{g/mL}$ で24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24時間培養では200 $\mu\text{g/mL}$ 群で、72時間培養では100および200 $\mu\text{g/mL}$ 群で用量依存性に、それぞれ強い細胞毒性を示した (図18)。

4-2-3) HepG2単層培養系

表面非修飾マグネタイトは、最終濃度0・1・10・100・200 $\mu\text{g/mL}$ で24または72時間曝露した。Alamar Buleアッセイを試みた結果、24または72時間培養のいずれにおいても、いずれの用量でも明らかな細胞毒性を示さなかった (図19)。

D. 考察

本研究で用いた、ヒト3D皮膚再構成系は、培養カップの底にメンブレンフィルターがあり、その上に表皮細胞が培養されて

いる。表皮細胞は、*in vivo*の場合と同様、上部に向かって増殖・分化し、培養時間経過と共に表層部に角質層を構築する。したがって、組織学的には、ヒト正常皮膚と類似する。J-TEC, LabCyte EPI-MODELは他の表皮組織のみタイプのヒト3D皮膚再構成系に類似し、OECD TG431 (*in vitro*皮膚腐食性試験) には記載されていないものの、OECD TG439 (*in vitro*皮膚刺激性試験) には後から記載された。なお、OECD TG431/439は、定量的評価ができないという欠点がある。

フォルペットは、フタルイミド系殺菌剤 (農薬) で、皮膚傷害性がある。角質層成熟再構成系 (13日培養品) では2000 $\mu\text{g/mL}$ の24時間曝露で細胞毒性を示したが、角質層未熟再構成系 (6日培養品) では1000 $\mu\text{g/mL}$ 、単層培養ヒトケラチノサイトでは30 $\mu\text{g/mL}$ から細胞毒性を示した。病理組織学的には、角質層成熟再構成系・2000 $\mu\text{g/mL}$ の24時間曝露で、表皮細胞の変性がみられた。角質層成熟再構成系・2000 $\mu\text{g/mL}$ の24時間曝露では、細胞毒性が検出できない100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度より濃度依存性に角質層バリア機能を示すFLGと、基底層のタイトジャンクションに関わるCLDN 1の発現が減弱し、炎症性サイトカインであるTNF- α の発現が増強した。加えて、フォルペットは、ケラチノサイト単層培養系において、3D皮膚再構成系より強い細胞毒性を示す。以上より、表皮の重層構造はフォルペットの細胞毒性に対して防御効果を発揮し、(成熟した) 角質層はさらに当該防御効果を増強する「バリア機能」を發揮することが示唆された。

金・銀ナノ粒子は角質層成熟再構成系の表皮組織を傷害せず、単層培養ヒトケラチノサイトも傷害しなかったが、角質層成熟再構成系の培地においては金・銀がそれぞれ検出された。したがって、金・銀ナノ粒

子は、ケラチノサイトに対する毒性を示さないが、その一方で、（成熟した）角質層の存在や表皮の重層構造はこれらが表皮を通過することを防ぐことができないものと示唆された。

表面修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを傷害し、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出された。角質層成熟再構成系で、FLGの発現が減少した。したがって、表面修飾マグネタイトは、ケラチノサイトに対する毒性があるが、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を発揮するものの、角質層の存在や表皮の重層構造はこの物質の表皮通過を防ぐことができないものと示唆された。

以上の3種類の金属ナノ粒子について、表皮通過性については、後述の通り表面非修飾マグネタイトが培地に検出されなかったことから、表皮とカップの間をすり抜けたことによるアーティファクトでないことが担保されている。表皮通過性は、これらの金属ナノ粒子が真皮細胞を傷害したり、*in vivo*なら脈管に入って全身影響を發揮したりする恐れを否定できないことを示唆している。

表面非修飾マグネタイトは角質層成熟再構成系で表皮組織を傷害しなかったが、単層培養ケラチノサイトを表面修飾マグネタイトより強く傷害し、しかし、角質層成熟再構成系の培地においては鉄が検出されなかった。したがって、表面非修飾マグネタイトはケラチノサイトに対する毒性が表面修飾マグネタイトより強く、表皮の重層構造はその細胞毒性に対して防御効果を発揮し、また、角質層の存在や表皮の重層構造は「バリア機能」を發揮して、この物質の表皮通過を防ぐことができるものと示唆さ

れた。

E. 結論

成熟した角質または未成熟な角質を持つヒト3D皮膚再構成系は、ヒトケラチノサイト単層培養系と併用することにより、ナノマテリアルを含む化学物質の皮膚一般毒性を定量的に評価する系として有用である可能性が示された。

再構成表皮は化学物質の皮膚毒性の強さに応じた傷害性を示し、金属ナノ粒子はいずれも皮膚傷害性が低かったが、マグネタイトは単層培養したケラチノサイトに対して弱い傷害性を示した。

表皮の重層構造は化学物質の皮膚毒性に対する防御効果があり、（成熟した）角質層は当該防御効果を増強するものと判明した。したがって、皮膚一般毒性を*in vitro*で評価する目的に対して、単層培養系のみでは不十分であり、3D皮膚再構成系を用いることが有用である可能性が示された。

再構成系の表皮組織は化学物質の傷害性に対して一定の「バリア機能」を有しており、当該機能の發揮には成熟した角質層の存在が（少なくとも部分的に）関与している。

表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在は、金属ナノ粒子の表皮通過を必ずしも防御できないことが判明した。しかし、金属ナノ粒子の表皮通過性には物理化学的性質（今回の場合はマグネタイトの表面修飾の有無）が関与し、その状況（今回の場合は、マグネタイトの表面修飾がないこと）によっては表皮の重層構造や（成熟した）角質層の存在が表皮通過を防御することも判明した。

マグネタイトの表面修飾は、単層培養ケ

ラチノサイト傷害性を減弱させ、また、再構成系における表皮組織通過性を獲得させた。

以上より、3Dヒト皮膚再構成系は、*in vivo*に外挿できる皮膚一般毒性評価系として有用である可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Y. Nakagawa, A. Inomata, A. Ogata, D. Nakae. Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organelles, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes. *J. Appl. Toxicol.*, 35, 1465-72, 2015.
- (2) J. Xu, D.B. Alexander, M. Iigo, H. Hamano, S. Takahashi, T. Yokoyama, M. Kato, I. Usami, T. Tokuyama, M. Tsutsumi, M. Tamura, T. Oguri, A. Niimi, Y. Hayashi, Y. Yokoyama, K. Tonegawa, K. Fukamachi, M. Futakuchi, Y. Sakai, M. Suzui, M. Kamijima, N. Hisanaga, T. Omori, A. Hirose, J. Kanno, D. Nakae, H. Tsuda. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos. A patient-based study. *Cancer Sci.*, 106, 825-32, 2015.
- (3) T. Okubo, M. Hosaka, D. Nakae. *In vitro* effects induced by diesel exhaust at an air-liquid interface in a human lung alveolar carcinoma cell line A549. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 67, 383-8, 2015.
- (4) T. Fujitani, A. Inomata, A. Ogata, Y. Sakamoto, A. Hirose, T. Nishimura, R. Ikeda, D. Nakae. Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice. *Toxicol. Rep.*, 2, 1404-8, 2015.
- (5) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤弘、久保喜一、長澤明道、矢野範男、猪又明子、中江 大、栗田雅行. 磁性ナノ粒子マグネタイト気管内スプレー投与によるラット肺病変に及ぼす γ -オリザノールあるいはグリセロール投与の影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 315-21, 2015.
- (6) 田山邦昭、坂本義光、安藤 弘、海鉦藤文、久保喜一、高橋 博、長澤明道、湯澤勝廣、小縣昭夫、中江 大、猪又明子、栗田雅行. ナノ物質の腹腔内投与によるマウス雄性生殖器への影響. *東京都健安研セ研究年報* 66, 323-9, 2015.
- (7) 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* 136, 1433-8, 2016.
- (8) 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.*, 39, 4, 2017.
- (9) 多田幸恵、中江 大、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海鉦藤文、長谷川悠子、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子. NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響. *東京都健安研セ研究年報* 68, 277-84, 2017.
- (10) E. Fukai, H. Sato, M. Watanabe, D. Nakae, Y. Totsuka. Establishment of an *in vivo* simulating co-culture assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Sci.*, 109, 1024-31, 2018.

2. 学会発表

- (1) 坂本義光、小縣昭夫、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、高橋 博、広瀬明彦、井上義之、橋爪直樹、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及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl* nitron (PBN) の影響。第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月、石川県金沢市。
- (2) 藤谷知子、猪又明子、小縣昭夫、中江 大、安藤 弘、久保喜一、広瀬明彦、西村哲治、池田玲子。マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差。第 42 回日本毒性学会学術年会、2015 年 6 月、石川県金沢市。
- (3) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大。多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl *N-tert-butyl* nitron (PBN) の影響。第 74 回日本癌学会学術総会、2015 年 10 月、愛知県名古屋市。
- (4) A. Hirose, Y. Sakamoto, A. Ogata, T. Nishimura, A. Inomata, D. Nakae. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. 7th International Symposium on Nanotechnology. Occupational and Environmental Health (NanOEh 2015), 2015 年 10 月、南アフリカ共和国 Limpopo 州 Waterberg 郡 Legend Safari Lodge.
- (5) 坂本義光、北條 幹、広瀬明彦、猪又明子、中江 大。多層カーボンナノチューブを経気管投与したラットに見られた肺過形成病変。第 32 回日本毒性病理学会学術総会、2016 年 1 月、香川県高松市。
- (6) 多田幸恵、高橋 博、湯澤勝廣、安藤弘、久保喜一、長澤明道、海鋒藤文、北條 幹、猪又明子、中江 大、栗田雅行。ラットにおける DHPN の発がん性に対して磁性ナノ粒子マグネタイトが及ぼす影響。第 32 回日本毒性病理学会学術総会、2016 年 1 月、香川県高松市。
- (7) 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, 2016 年 6 月、兵庫県淡路市。
- (8) 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、海鋒藤文、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、2016 年 7 月、愛知県名古屋市。
- (9) 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、2016 年 10 月、神奈川県横浜市。
- (10) 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、2016 年 11 月 6 日、東京都千代田区。

- (11) 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* nitrene (PBN) 併用が及ぼす影響。第 33 回日本毒性病理学会学術集会、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市。
- (12) 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、2017 年 1 月 27 日、大阪府堺市。
- (13) 坂本義光、広瀬明彦、中江 大。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状。第 76 回日本癌学会学術総会、2017 年 9 月 29 日、神奈川県横浜市。
- (14) 堀端克良、鶴飼明子、小縣昭夫、中江 大、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、湯澤勝廣、本間正充。F344 *gpt* delta rats を用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による *in vivo* 遺伝毒性評価。日本環境変異原学会第 46 回大会、2017 年 11 月 6-7 日、東京都千代田区。
- (15) H. Sato, Y. Sakamoto, D. Nakae, M. Watanabe, Y. Totsuka. Differences in physicochemical characteristics on genotoxic potency of multi-walled carbon nanotubes (MWCNT). The 12th International Conference and 5th Asian Congress on Environmental Mutagens with 33rd Annual Meeting of Korean Society of Toxicology/Korean Environmental Mutagen Society, 2017 年 11 月 12-16 日、大韓民国仁川広域 (Incheon) 市。
- (16) 北條 幹、坂本義光、山本行男、長谷川悠子、村上詩歩、前野 愛、広瀬明彦、中江 大。ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2018 年 1 月 25 日、沖縄県那覇市。
- (17) 坂本義光、北條 幹、鈴木俊也、猪又明子、広瀬明彦、中江 大。多層カーボンナノチューブの経気管反復投与によりラット肺に誘発された増殖性病変の免疫組織化学解析。第 34 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2018 年 1 月 26 日、沖縄県那覇市。
- (18)
- 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

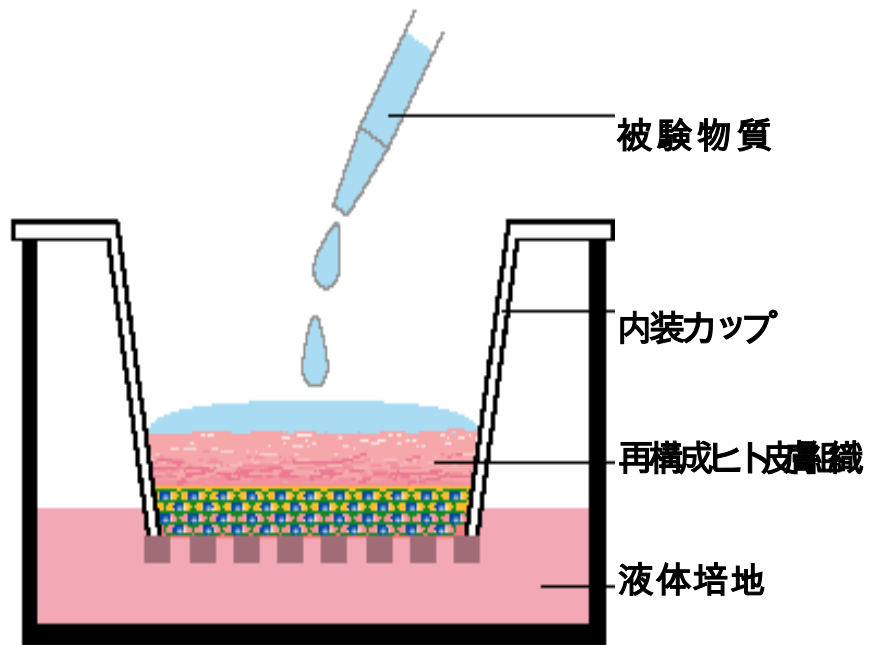
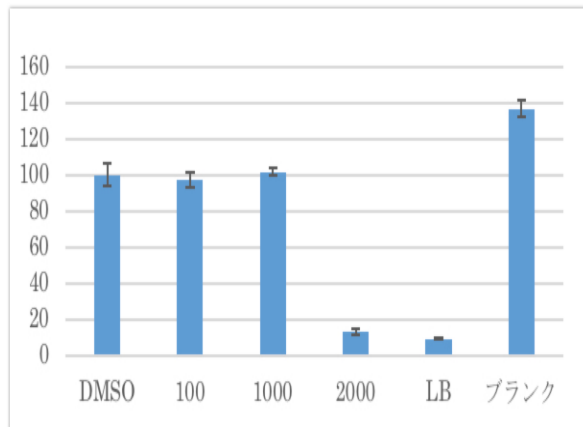
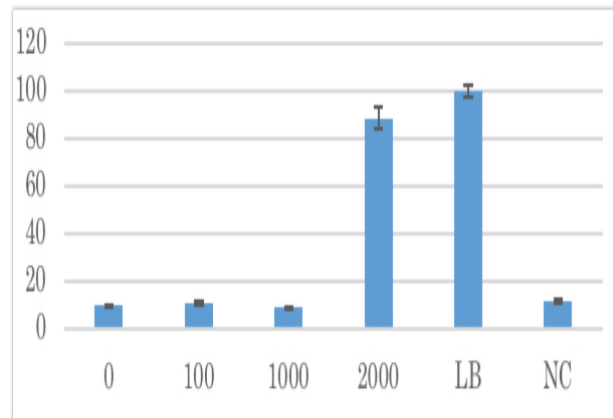


図1. LabCyte EPI 24 モデル

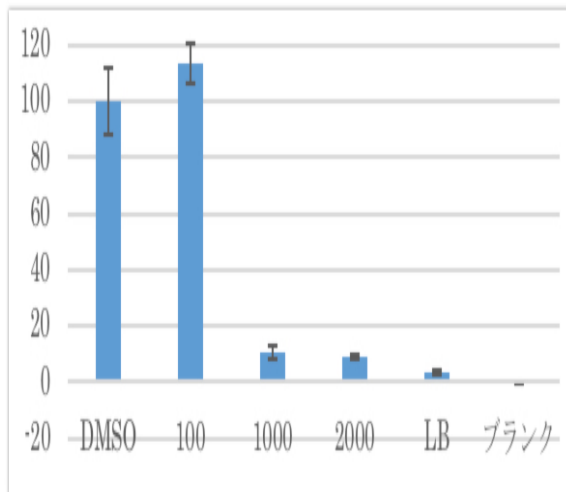
13 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ



6 日培養品
MTT アッセイ



LDH アッセイ

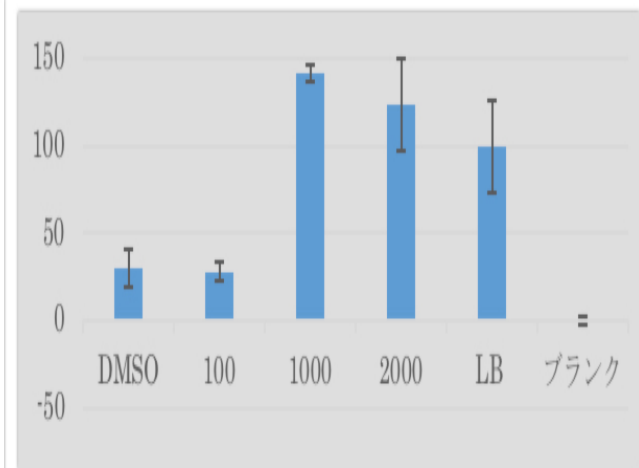


図 2. フォルペット, 3D 皮膚再構成系, 細胞毒性 (縦軸, % ; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

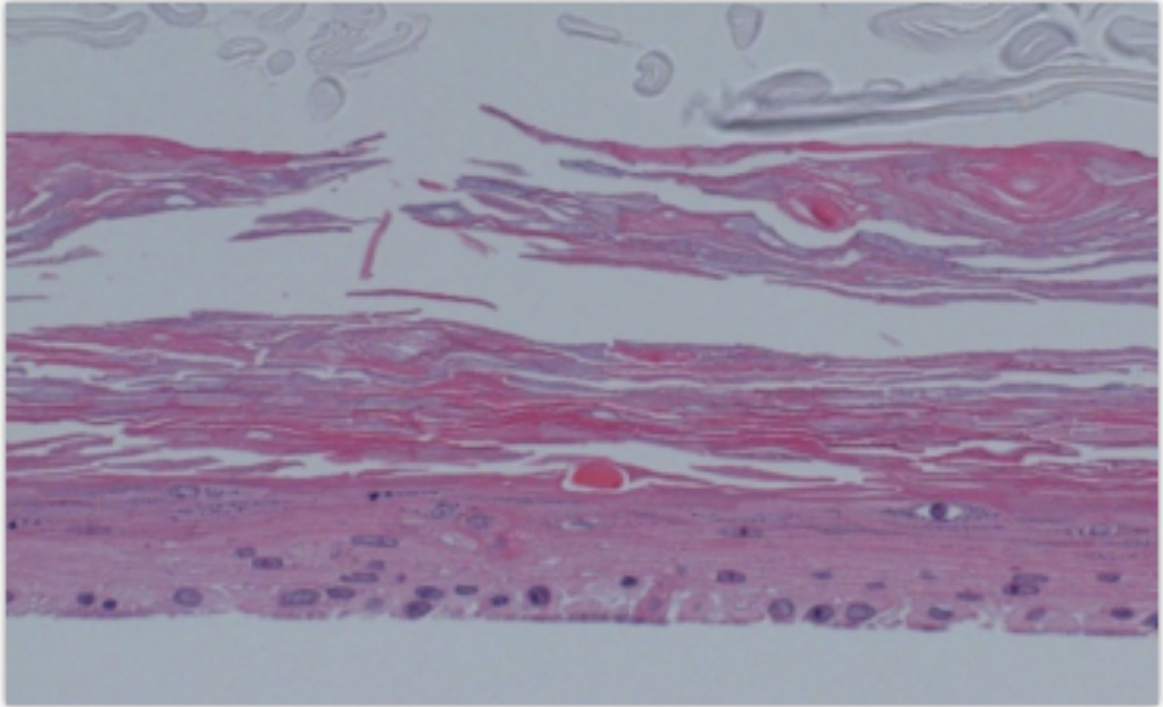
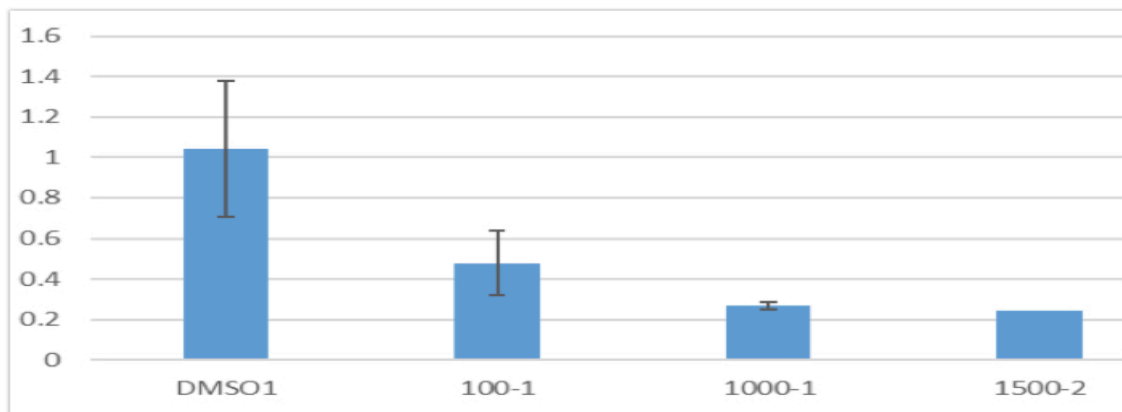


図3. フォルペット, 3D皮膚再構成系13日培養品, 病理組織学的解析 (HE ; 2000 $\mu\text{g/mL}$)

FLG
CLDN1



TNF- α

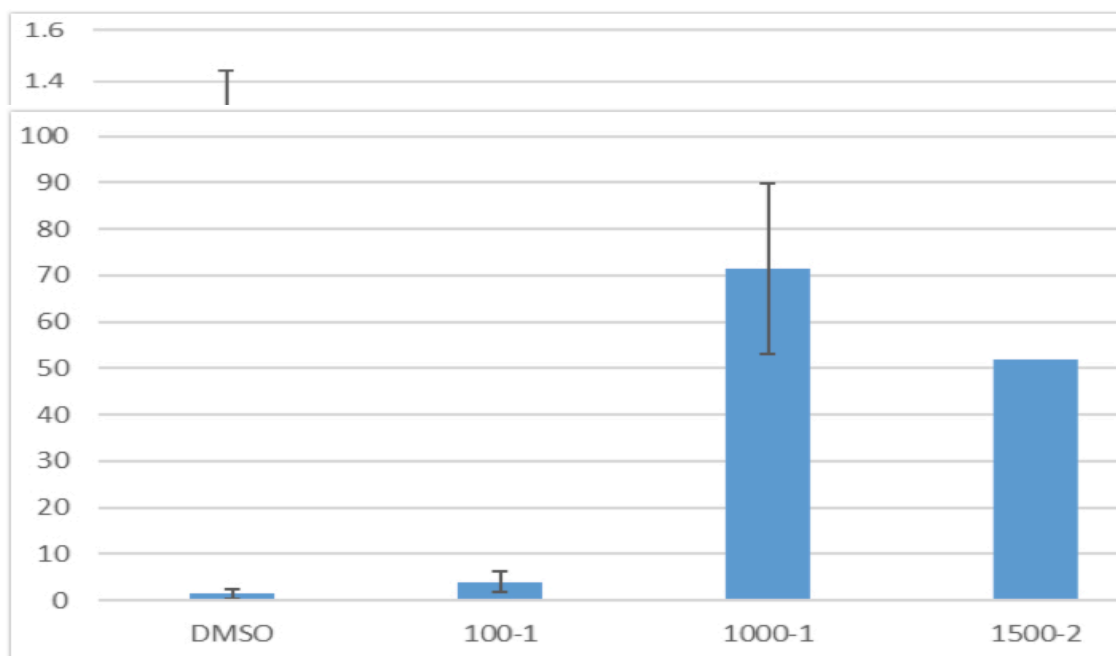
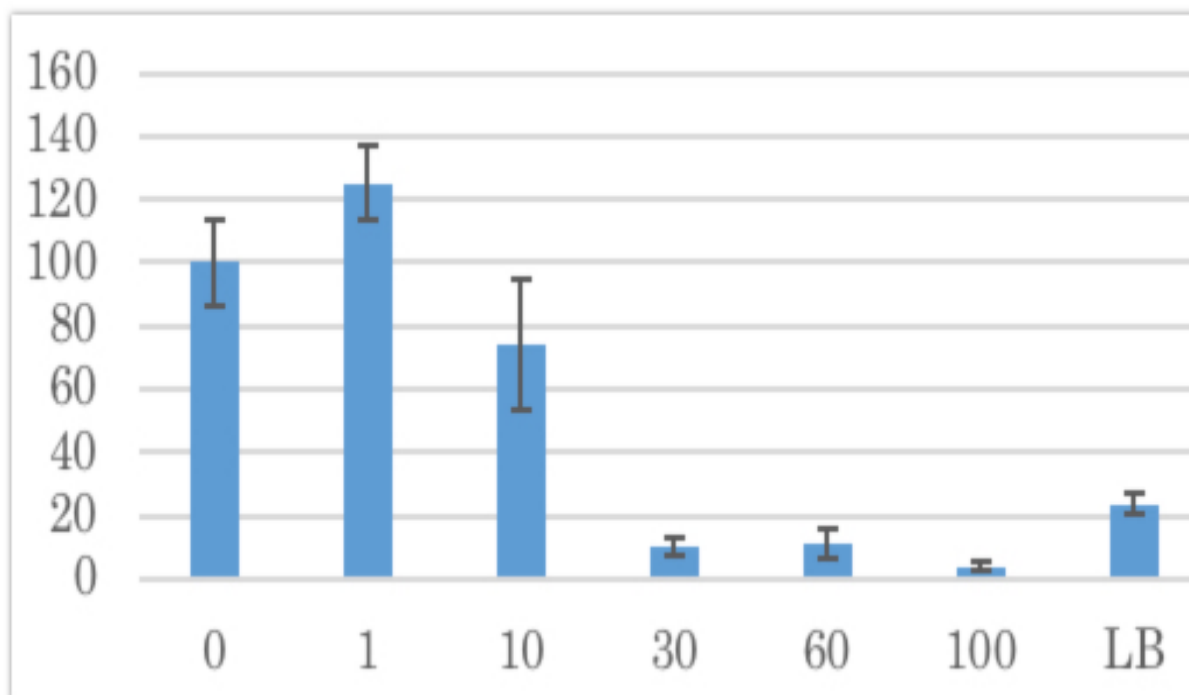


図4. フォルペット, 3D皮膚再構成系13日培養品, 遺伝子発現(縦軸, 任意単位; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

NKEK



HepG2

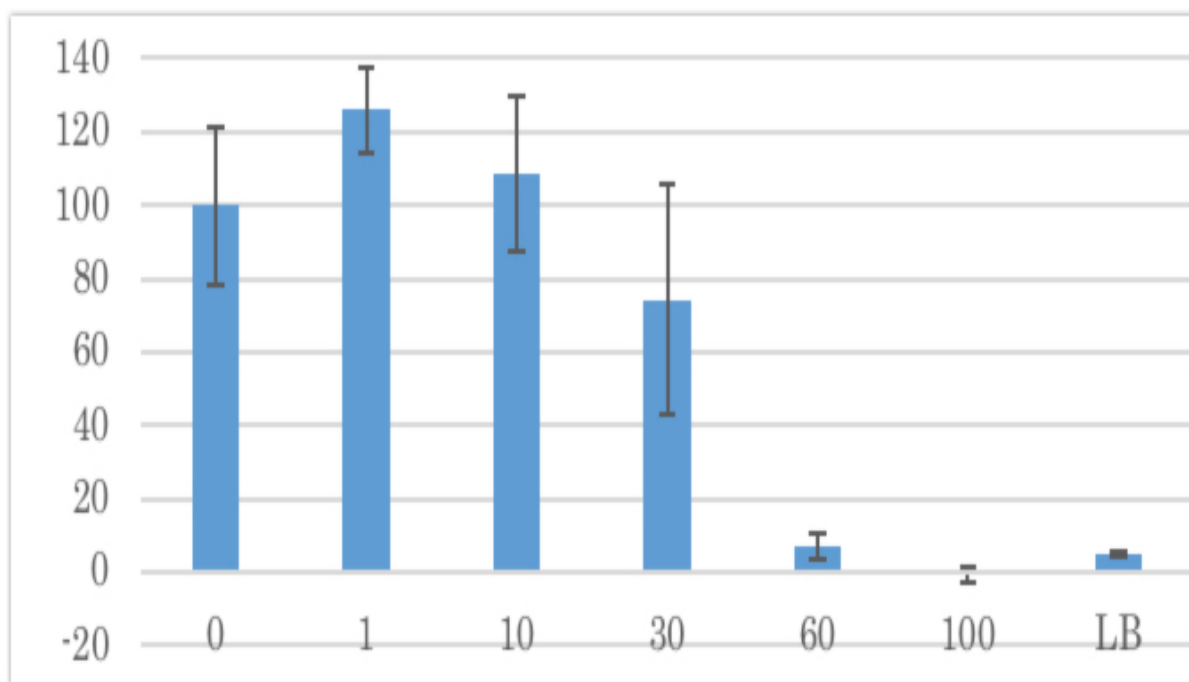


図5. フォルペット，単層培養系，細胞毒性（MTTアッセイ；縦軸，%；横軸，µg/mL）

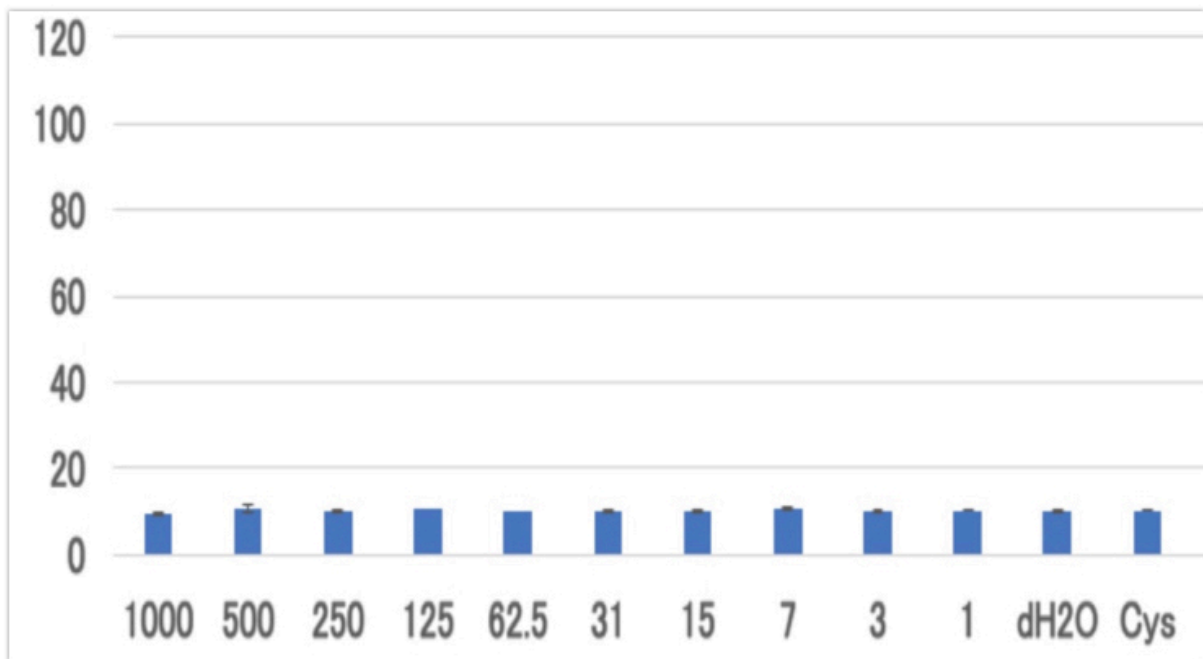


図 6. 金ナノ粒子, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 細胞毒性 (LDH アッセイ; 縦軸, %; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

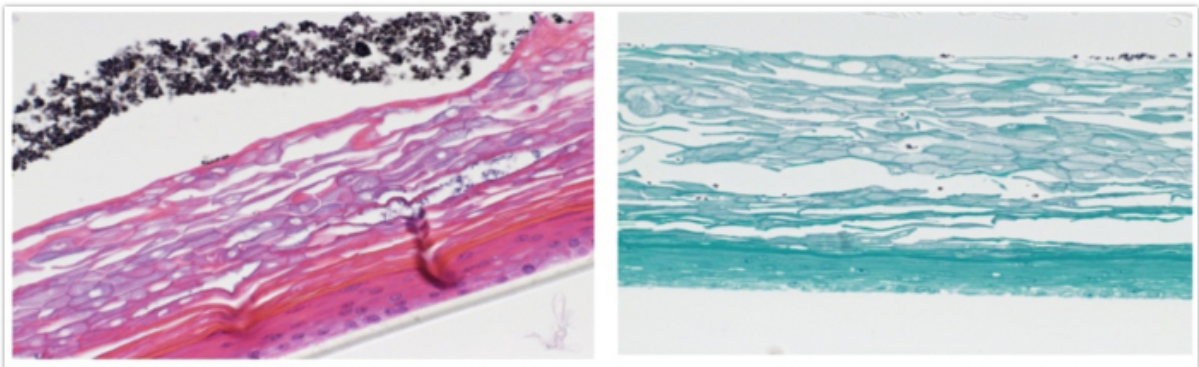
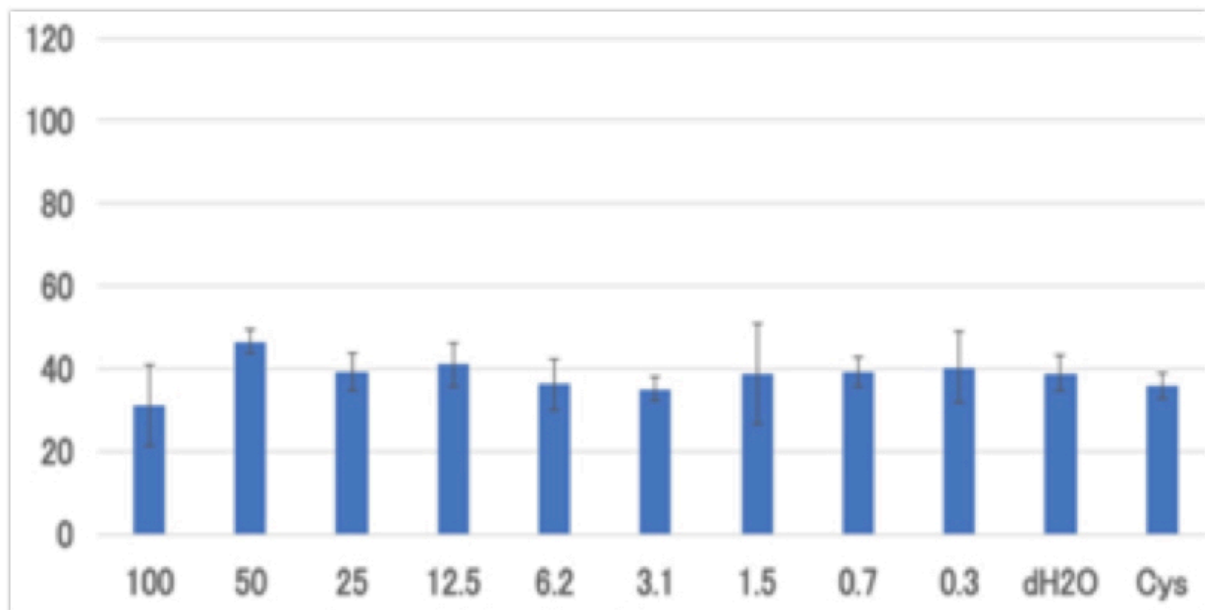


図 7. 金ナノ粒子, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (左, HE; 右, 金染色; $500 \mu\text{g/mL}$)

LDH アッセイ



NR アッセイ

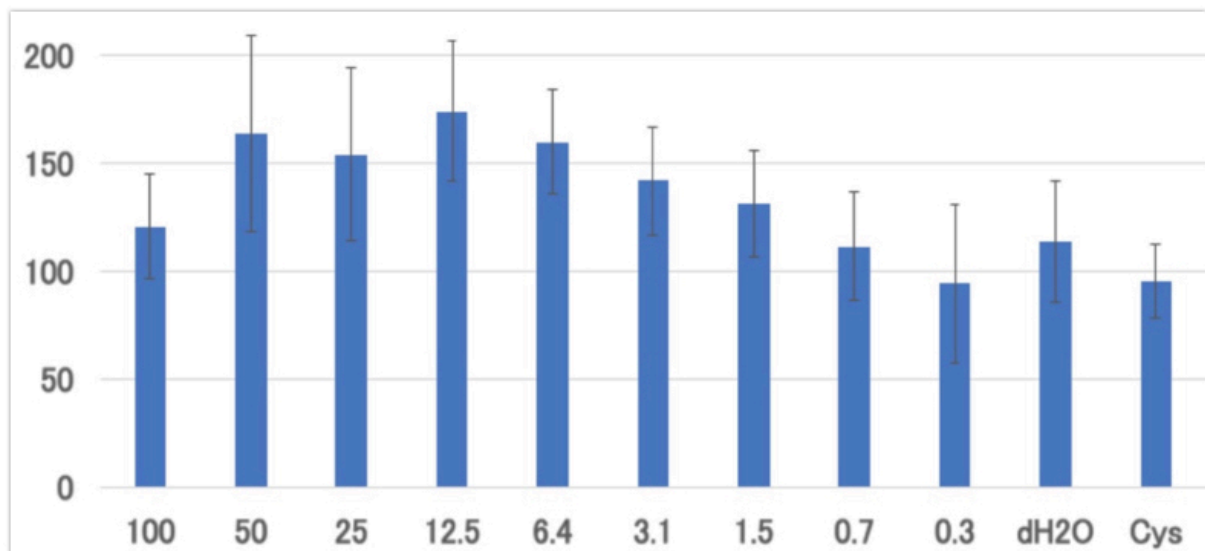


図 8. 金ナノ粒子, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (縦軸, % ; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

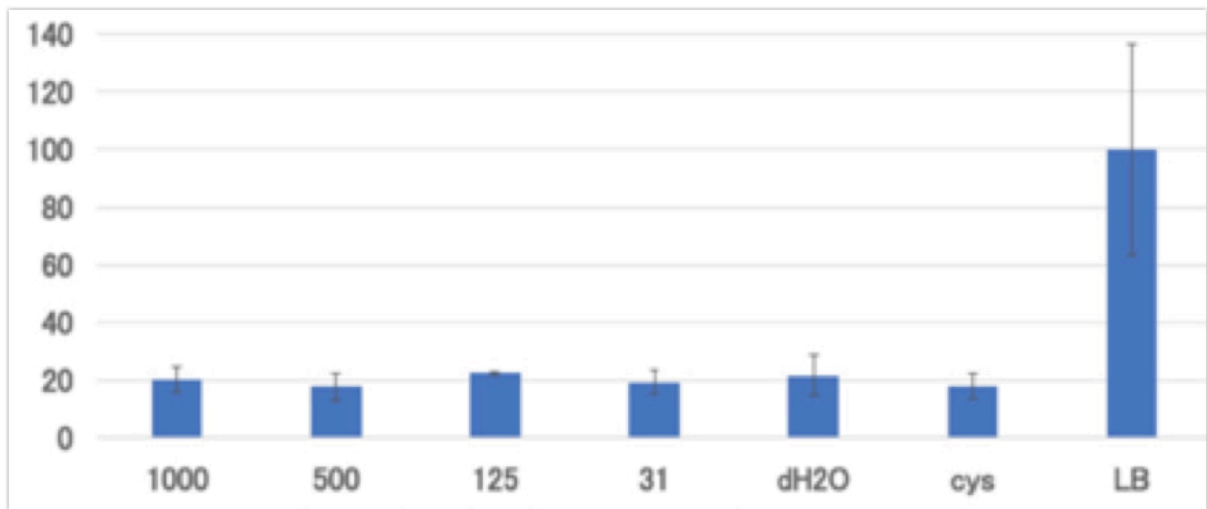


図 9. 銀ナノ粒子, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 細胞毒性 (LDH アッセイ; 縦軸, % ; 横軸, $\mu\text{g}/\text{mL}$)

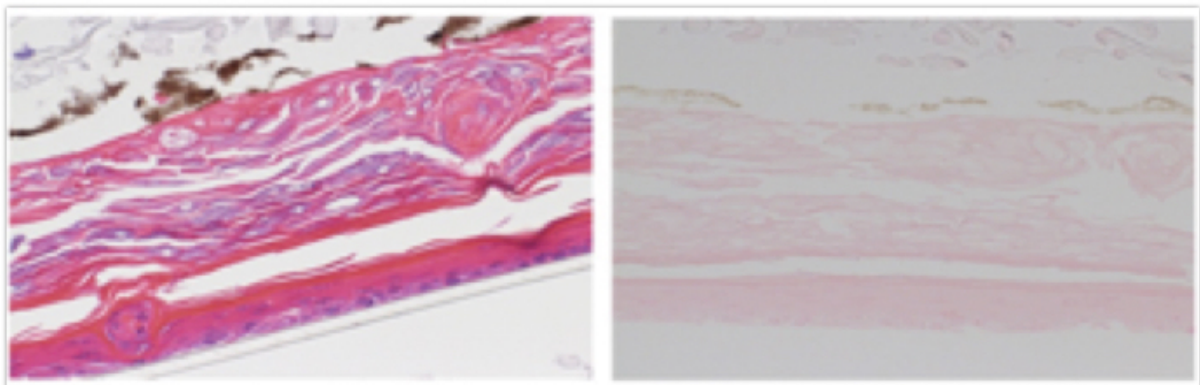
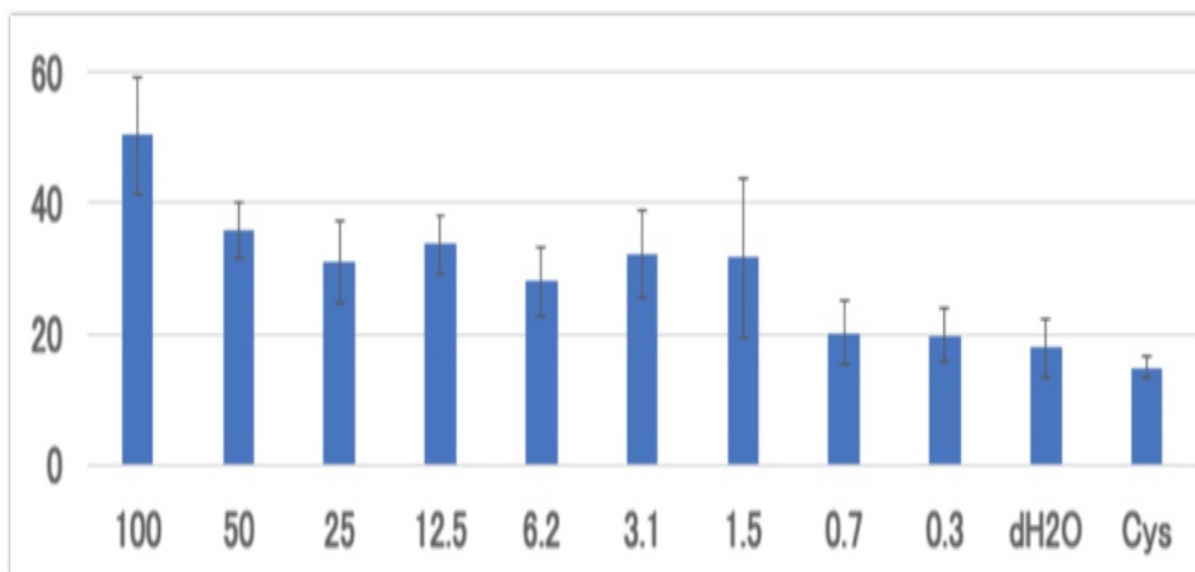


図 10. 銀ナノ粒子, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 病理組織学的解析 (左, HE ; 右, 銀染色 ; $500 \mu\text{g}/\text{mL}$)

LDH アッセイ



NR アッセイ

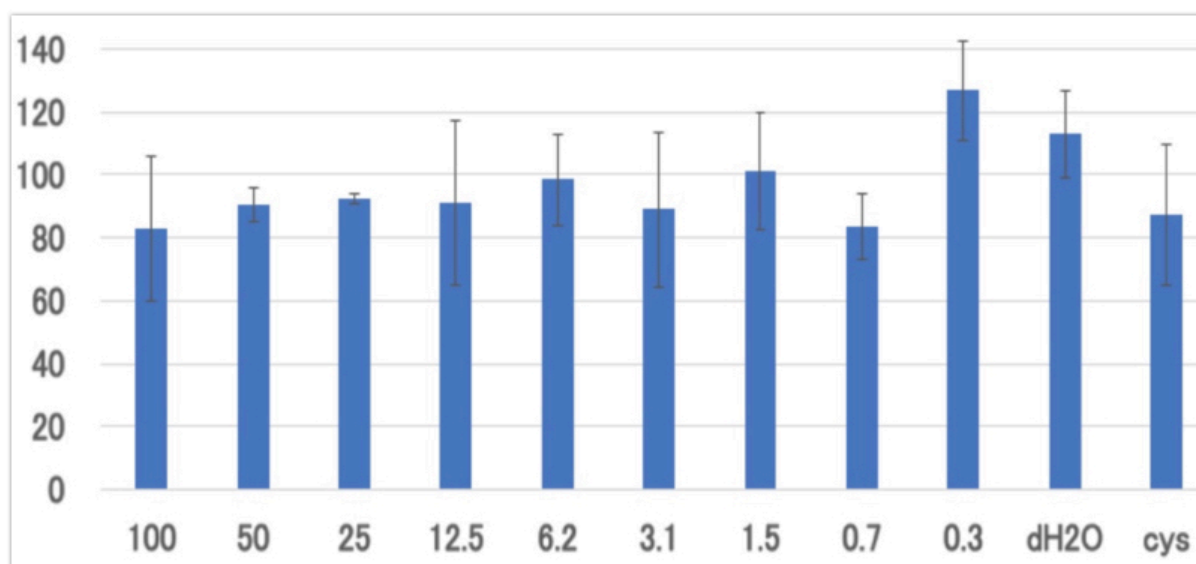
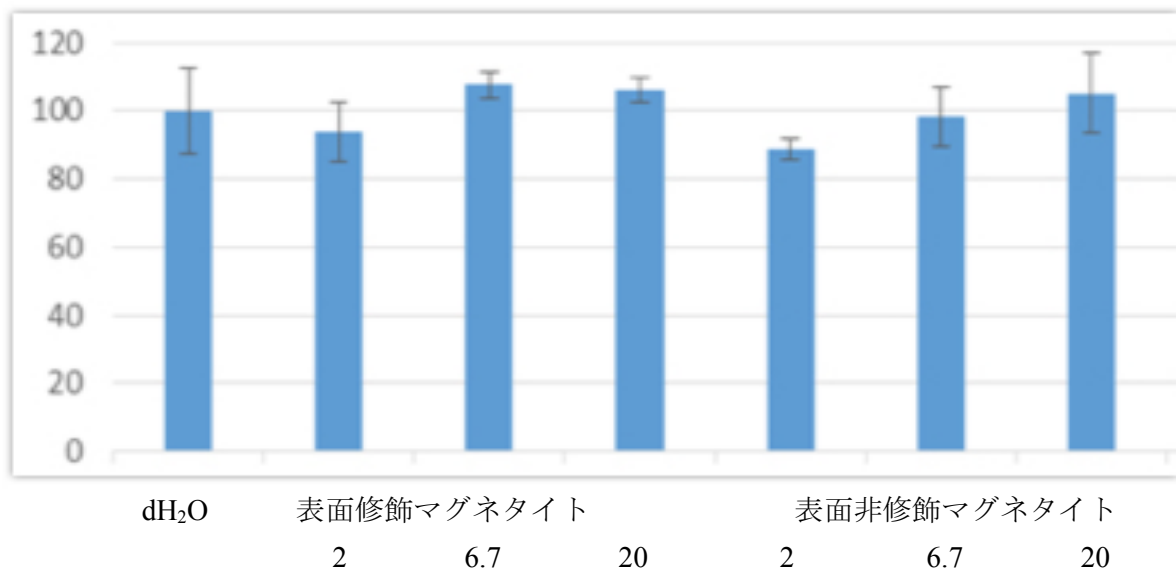


図 11. 銀ナノ粒子, HepG2 単層培養系, 細胞毒性 (縦軸, % ; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

MTT アッセイ



LDH アッセイ

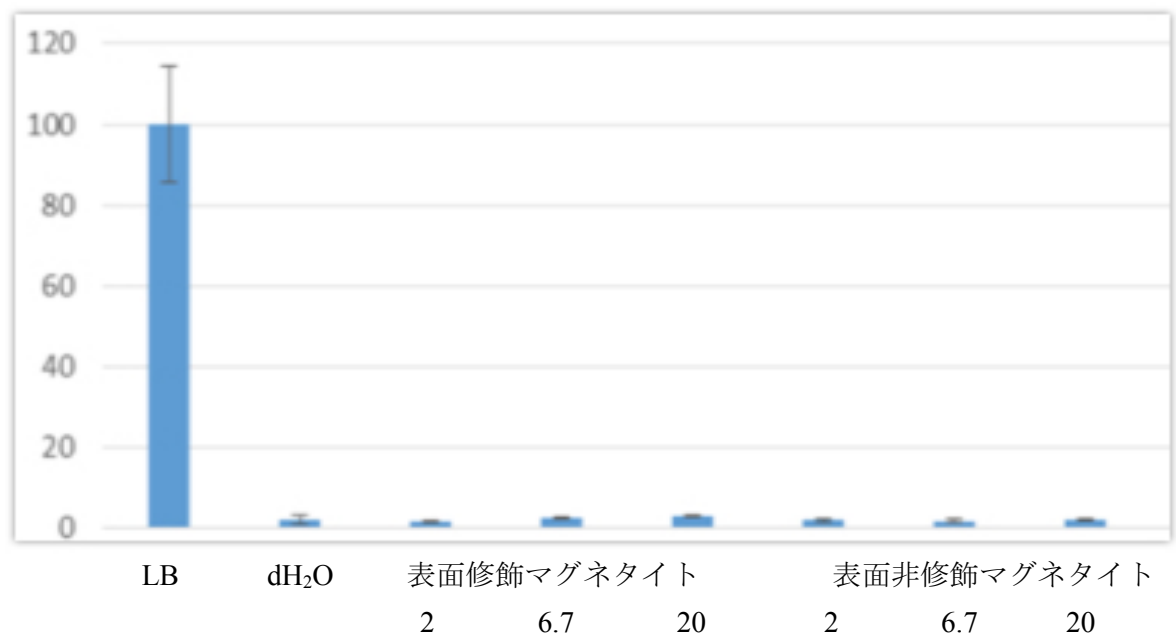
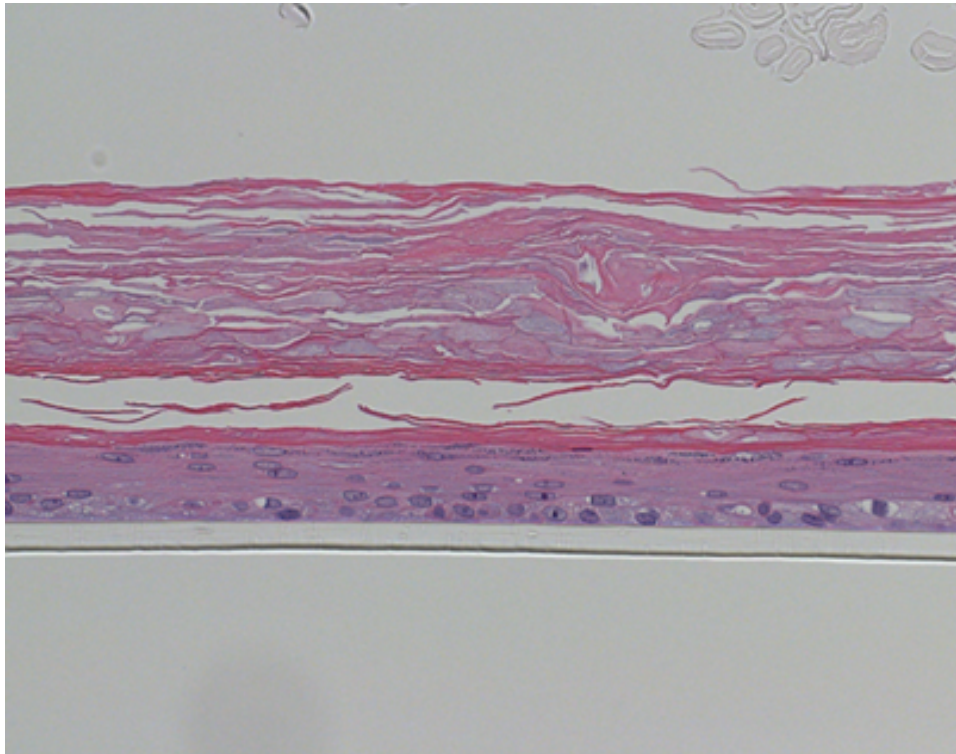


図 12. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 細胞毒性 (縦軸, % ; 横軸, mg/mL)

表面修飾マグネタイト



表面非修飾マグネタイト

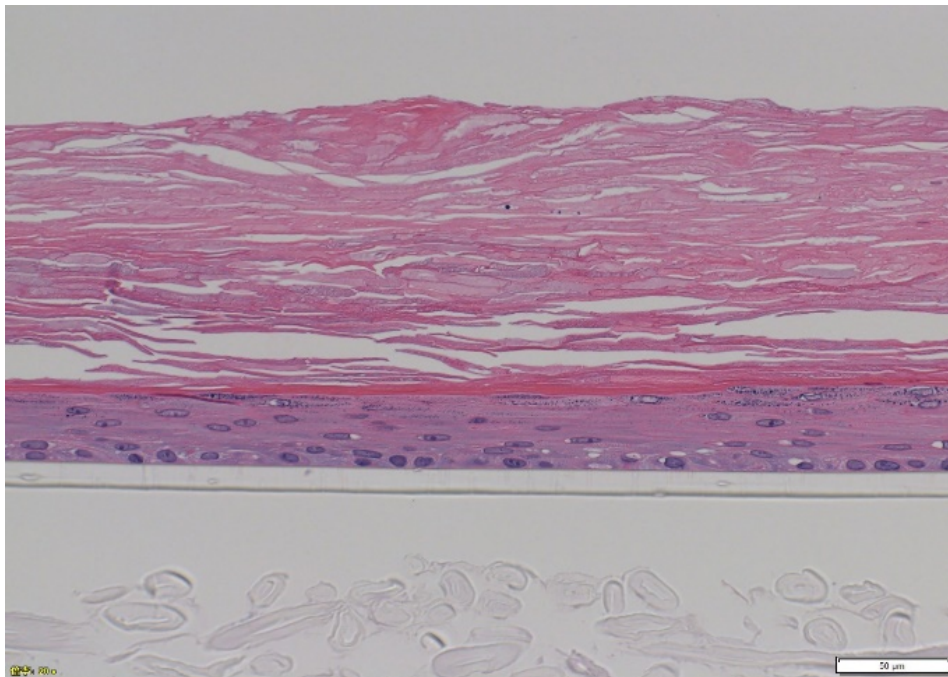


図 13. マグネタイト，3D 皮膚再構成系 13 日培養品，病理組織学的解析（HE；20 mg/mL）

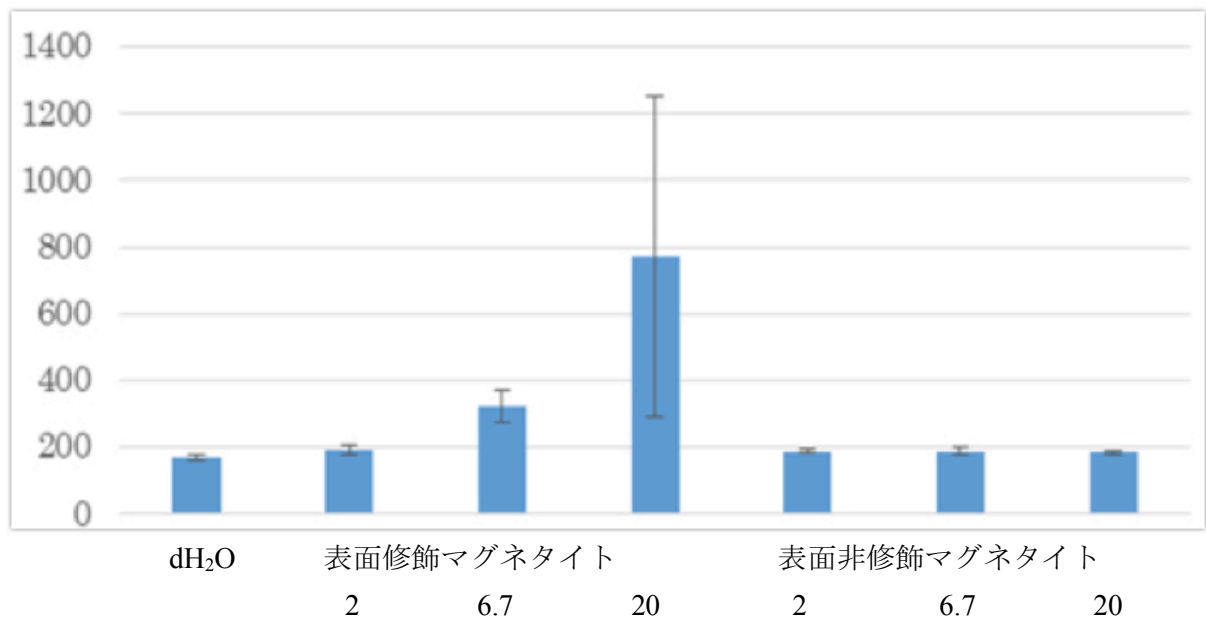
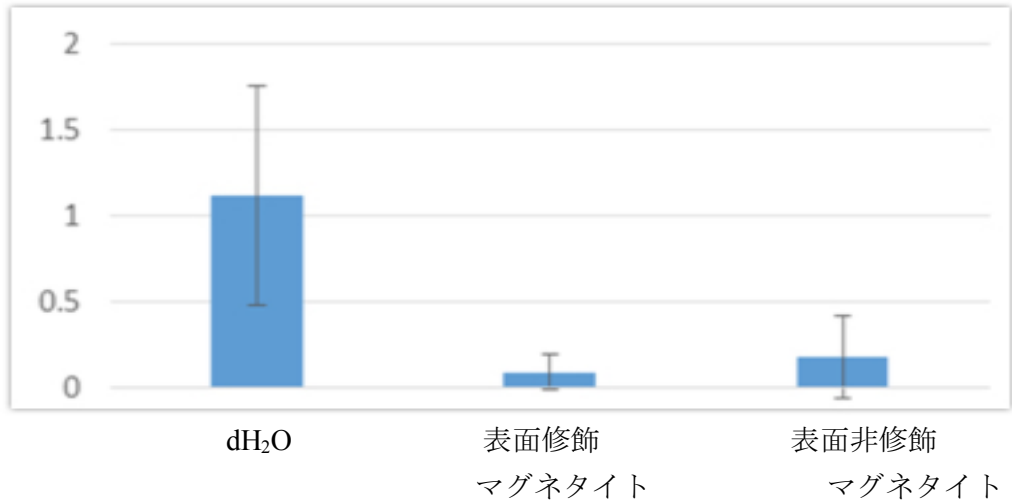
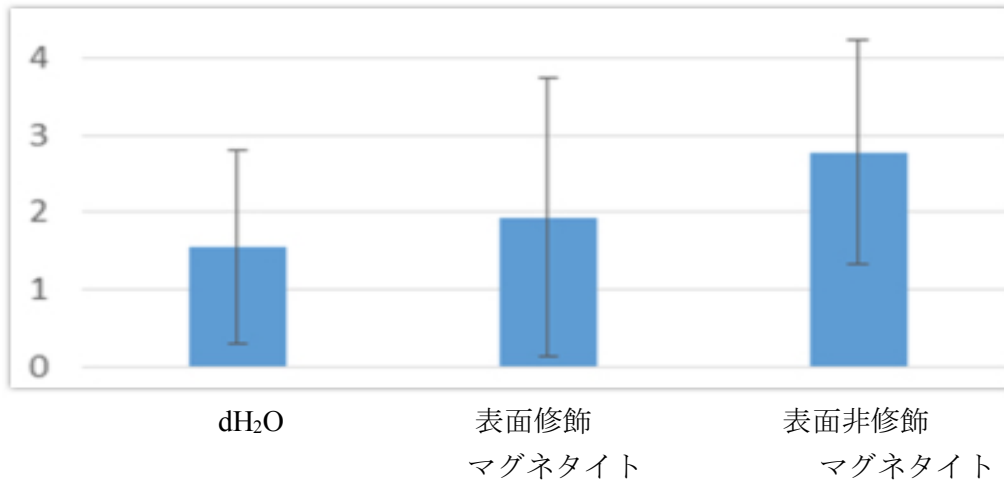


図 14. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 培地中铁含有量 (縦軸, $\mu\text{g}/\text{kg}$; 横軸, mg/mL)

FLG



CLDN1



TNF- α

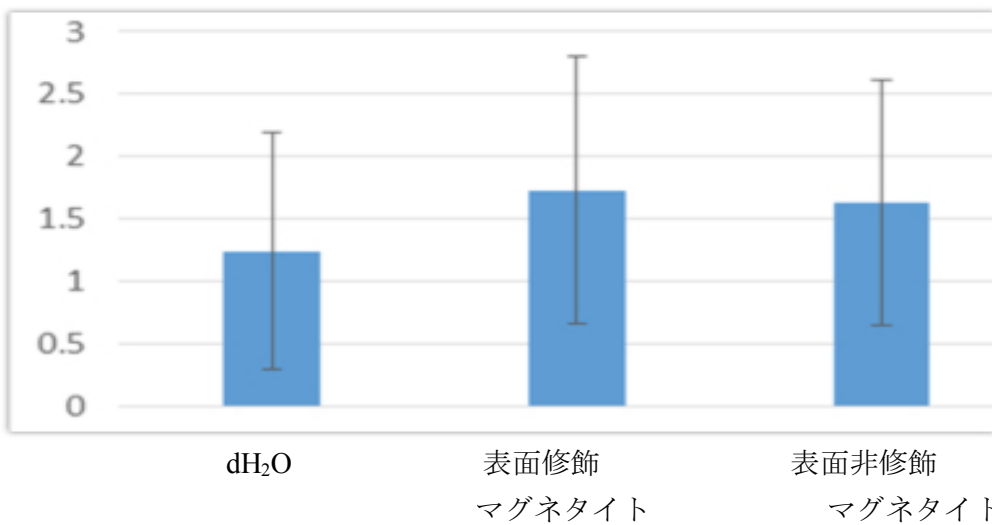
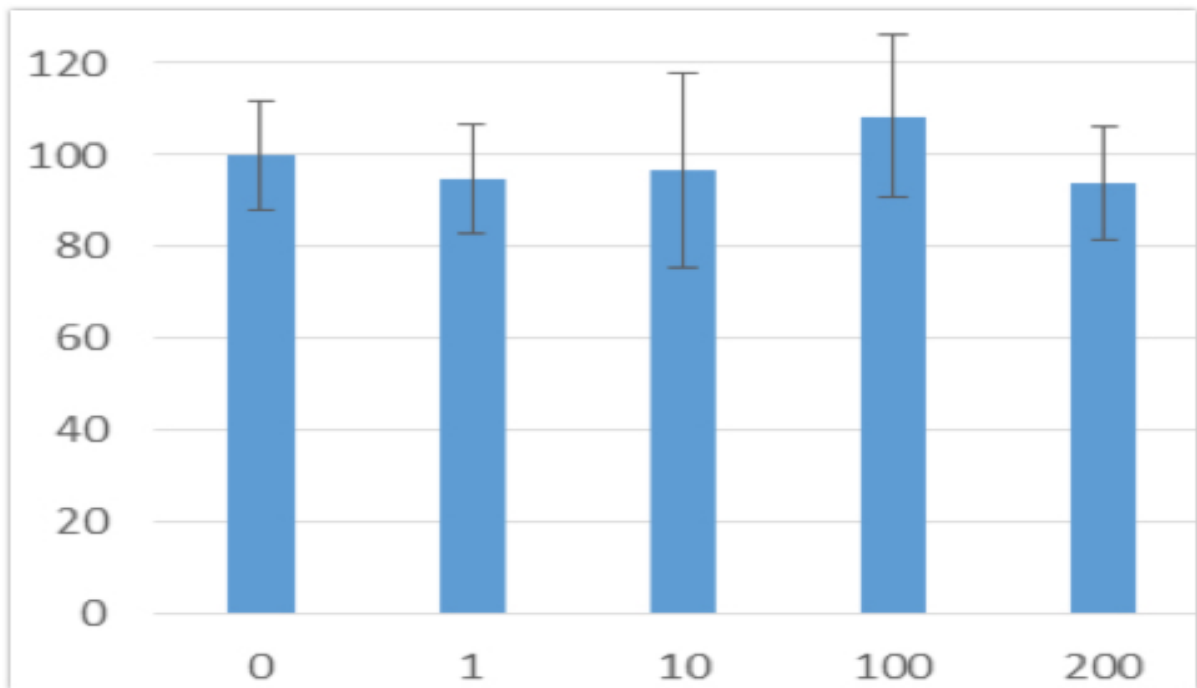


図 15. マグネタイト, 3D 皮膚再構成系 13 日培養品, 遺伝子発現 (20 mg/mL; 縦軸, 任意単位; 横軸, $\mu\text{g/mL}$)

24 時間培養



72 時間培養

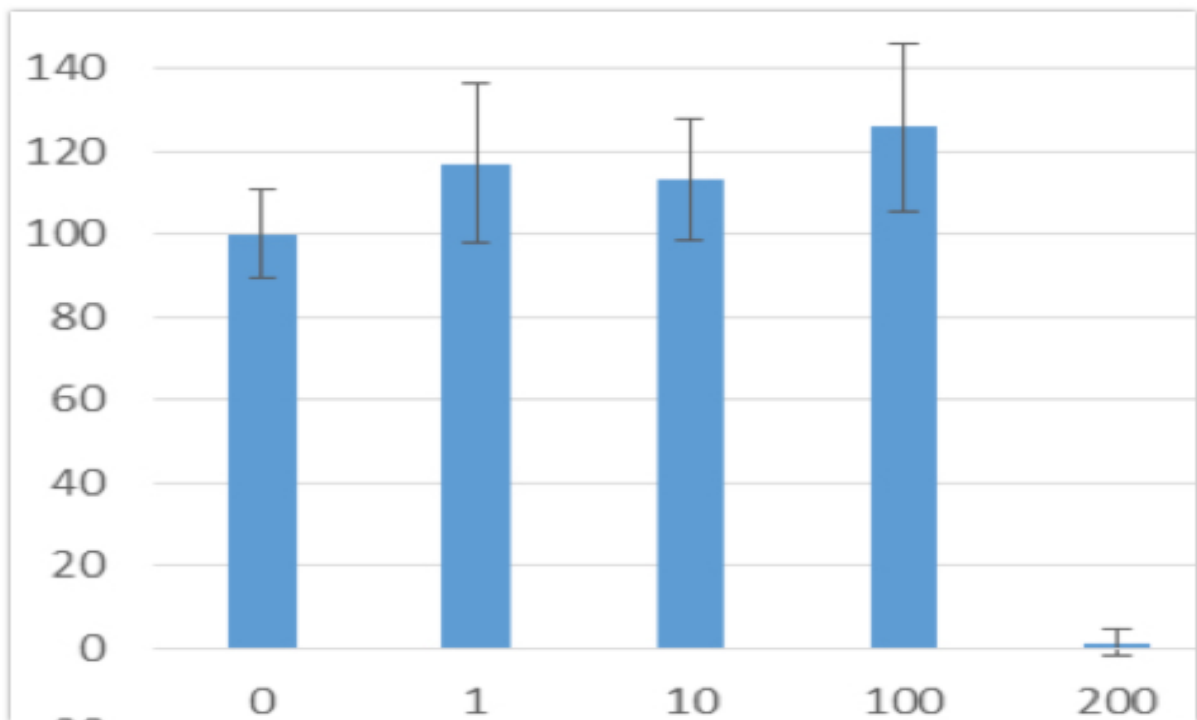
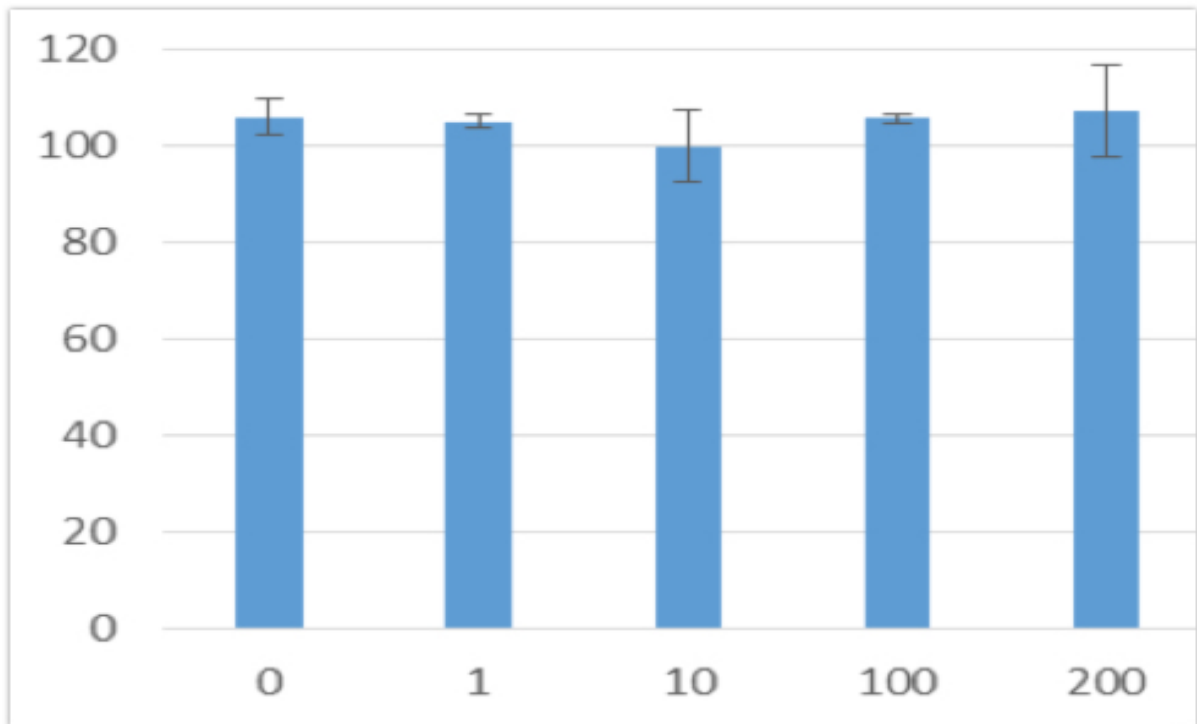


図 16. 表面修飾マグネタイト，NKEK 単層培養系，細胞毒性（Alamar Blue アッセイ；縦軸，%；横軸，µg/mL）

24 時間培養



72 時間培養

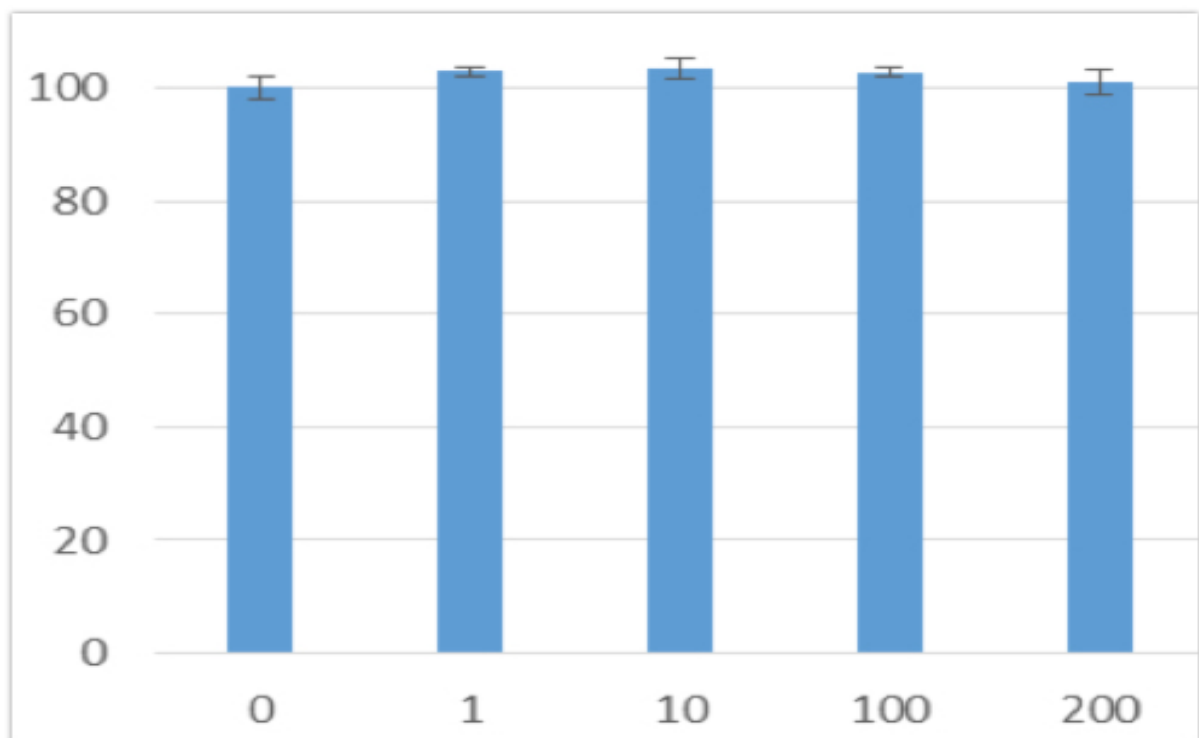
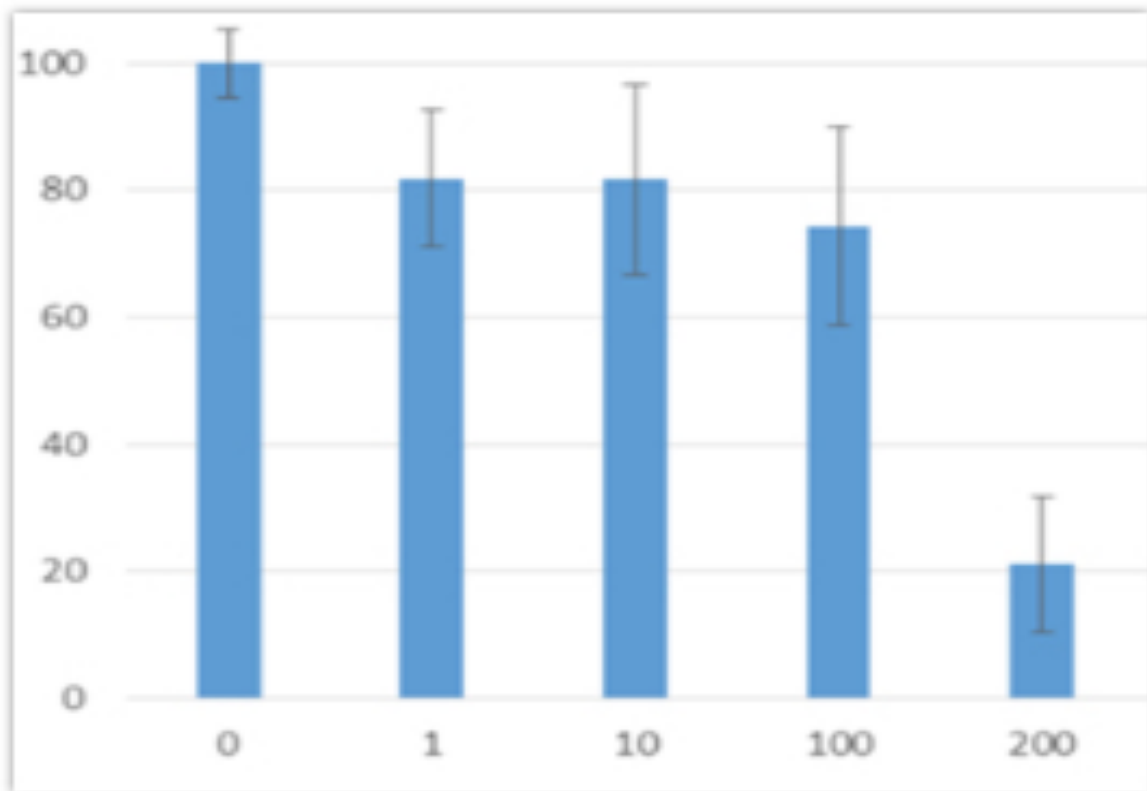


図 17. 表面修飾マグネタイト，HepG2 単層培養系，細胞毒性（Alamar Blue アッセイ；縦軸，%；横軸，µg/mL）

24 時間培養



72 時間培養

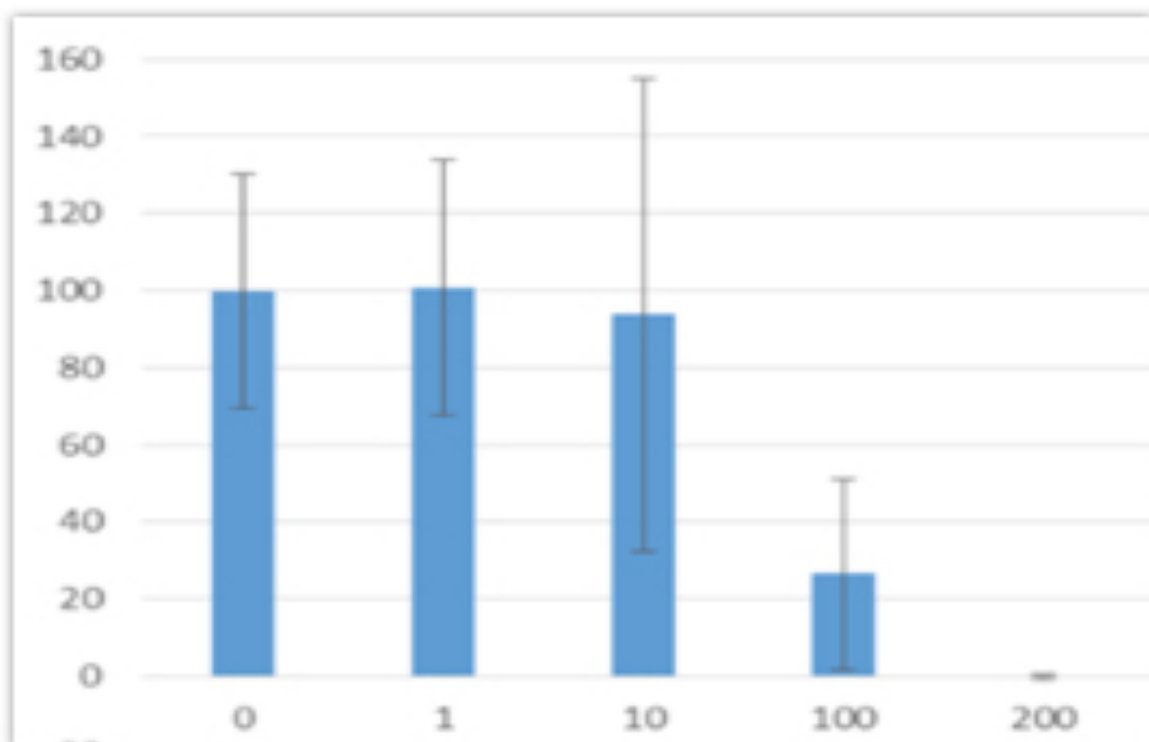
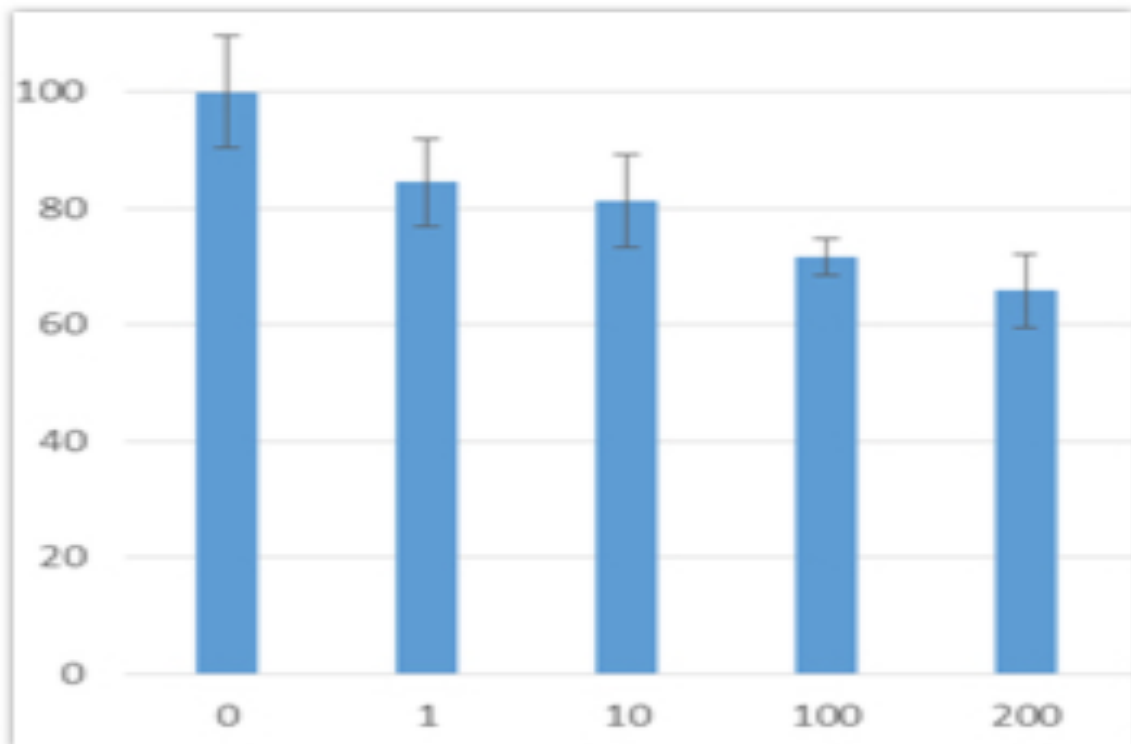


図 18. 表面非修飾マグネタイト，NKEK 単層培養系，細胞毒性（Alamar Bule アッセイ；縦軸，%；横軸，µg/mL）

24 時間培養



72 時間培養

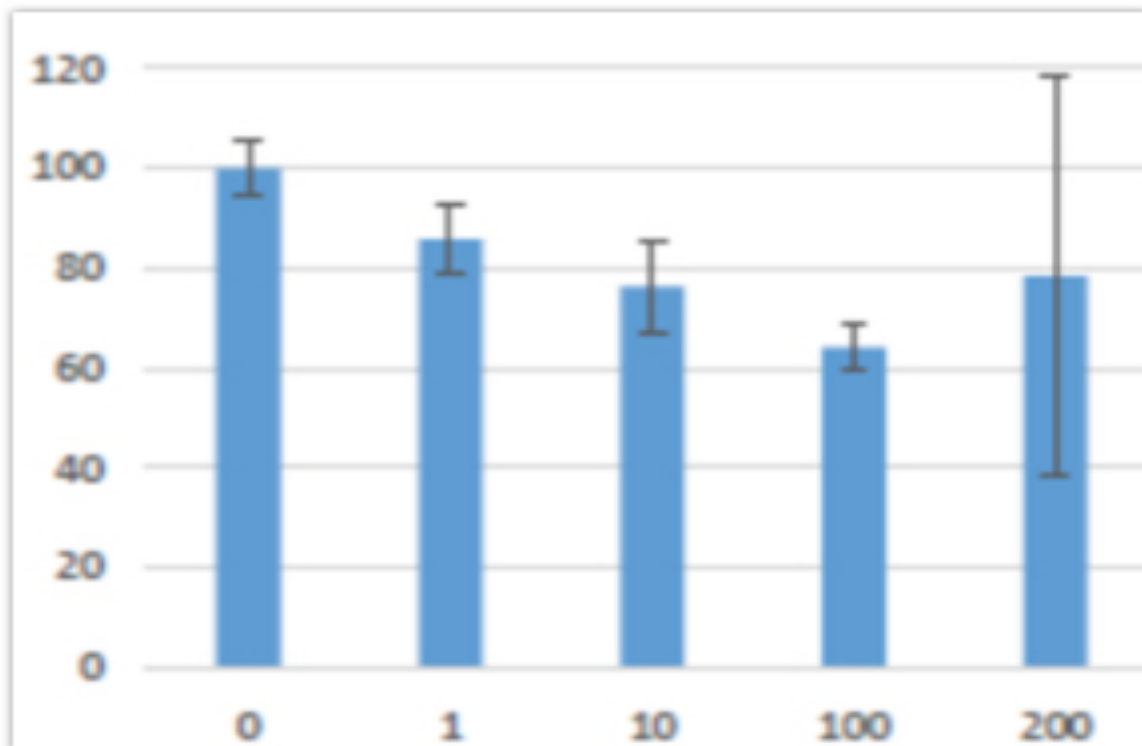


図 19. 表面非修飾マグネタイト，HepG2 単層培養系，細胞毒性（Alamar Blue アッセイ；縦軸，%；横軸， $\mu\text{g/mL}$ ）

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： 2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル及び 3 種類の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) ナノマテリアルを用いて、物理化学的性質について明らかにすると同時に、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 及び再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答について検討した。THP-1 細胞を用いた検討では、ZnO(sigma) 及び ZnO(alfa) において、ZnO(sigma) が強い細胞毒性を示した。免疫応答に関しては、ZnO 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、ZnO は用量依存的に CD54 発現量を増加させ、相対蛍光強度 (RFI) は ZnO(sigma) の方が高かった。サイトカイン産生は、IL-8、IL-1 β 、TNF において産生の増加が観察され、その量は ZnO(Sigma) の方が多かった。ZnO 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 強度の変化が用量依存的に観察され、その変化は ZnO(sigma) 処理細胞で多かった。NiO を用いて 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。NiO 処理により CD54 の 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 細胞の FSC 強度及び 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。サイトカイン産生は 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。これらの結果は 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。次に、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した結果、LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ において細胞毒性を示さなかった。LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産生について確認した結果、1% SDS で IL-1 α 、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

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、表面積、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 27 年度は、2 種類の酸化亜鉛 (ZnO) ナノマテリアル分散製品について、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) 懸濁液について、水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位等の物理化学的性質について動的光散乱光度計により明らかにすると同時に、ナノマテリアルの *in vitro* 生体影響評価系として、ヒト血球系細胞株 THP-1 を用いた評価系を用いて、ATP 法により細胞毒性を、細胞表面マーカー CD54、CD86 の発現、培養上清中のサイトカイン測定により免疫応答について検討した。平成 29 年度は、2 種類の ZnO ナノマテリアル及び 3 種類の NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング) に対する細胞毒性試験を実施した。また、培養上清中のサイトカインを測定し免疫応答へ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

酸化亜鉛ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich 及び NanoTeK Alfa Aesar のナノ分散製品を用いた (以下、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)と略す)。注射用水にて 10 mg/mL

に調製し、懸濁原液とした。NiO ナノマテリアル懸濁液は、Sigma-Aldrich の NiO ナノマテリアル (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 (10 mg/mL) を調製した。これらの懸濁原液を血清を含む液体培地で希釈した。懸濁原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。細胞表面マーカー測定の陽性対照物質として、2,4-ジニトロクロロベンゼン(DNCB) (Sigma-Aldrich)を用いた。

2) 細胞株及び培養方法、細胞毒性試験方法

ヒト白血病由来単球細胞株 THP-1 (ATCC)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS)、penicillin-streptomycin (PS)、0.055 mM 2-Mercaptoethanol を含む RPMI 1640 (GIBCO) にて、37°C、5% CO₂ インキュベーターで培養した。細胞株は 3 - 4 日ごとに継代し、 1×10^5 から 8×10^5 cells/mL の範囲で培養した。実験には、培養開始後 2 週間以降の 2 ヶ月以内の細胞を用いた。細胞毒性試験は、THP-1 細胞を 96-well プレートに播種し (2×10^4 cells/well)、24 時間後に被験液を添加し、4, 24 及び 48 時間培養した。プレートを 30 分間室温間平衡化させた後、50 μ L の CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay 試薬 (ATP 試薬, Promega) を添加し、遮光、室温で 45 分または 90 分間反応させた。発光シグナルをルミノメーターで測定した。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。

チャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 (JCRB)は、10% heat-inactivated fetal bovine serum (非働化 FBS) 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。コロニー形成試験は、ISO 10993-5:2009 に従い、24-well プレートに細胞を播種し (50 cells/ well)、24 時間後に培地を除き、被験液を添加し、さらに 4 日間培養した。培養終了後、培地を除去し、MeOH を添加して細胞を固定後、ギムザ染色液によりコロニーを染色した。陰性対照材料として PE シート、陽性対照材料として A (0.1% zinc diethyldithio-carbamate (ZDEC)-PU シート)、B (0.1% zinc dibutyldithio-carbamate (ZDBC) -PU シート) (食品薬品安全センター秦野研究所) を用いた。

3) 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。THP-1 細胞 (1 x 10⁶ cells/ 1 mL/ well/24-well plate) を各ナノマテリアルと 24 または 48 時間培養した。細胞を遠心により回収し、冷 FACS buffer (0.1% BSA 含有 PBS) にて 2 回洗浄後、600 μL の 0.01% ヒト γ グロブリン含有 PBS に懸濁し、4°C で 15 分間静置して FcR のブロッキングを行なった。ブロッキング後、遠心して上清を除き、120 μL の冷 FACS buffer に懸濁し、3 種類の抗体で染色した。抗体は FITC ラベルされた、anti-human CD54 (clone: 6.5B5, DAKO) 3/5 希釈、anti-human CD86 (clone: Fun-1, BD PharMingen) 3/5 希釈、アイソタイプコントロールとして mouse IgG1 (clone: DAK-G01, DAKO) 3/10 希釈を使用した。4°C で 30 分間静置して抗体染色後、200 μL の冷 FACS buffer にて 2 回洗浄、400 μL の冷 FACS

buffer に再懸濁し、2.5 μg/mL の Propidium Iodide (PI, Life Technologies) を添加して、5 分後にフローサイトメトリー (FACS Calibur Cell Quest, Becton Dickinson) で解析した。死細胞は PI により染め分け、生細胞が 10,000 個になるまで測定した。細胞の生存率は、PI 陰性細胞の割合より算出した。

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

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

MFI= Geometric Mean fluorescence intensity

4) THP-1 細胞培養上清中のサイトカインの測定

THP-1 細胞の表面マーカー測定試験を実施する際に、培養上清を別のチューブに移し、液体窒素で凍結後、-80°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た。

5) FSC-SSC ドットプロット解析

各ナノマテリアルの細胞内への取り込みについて検討するため、ZnO または 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、前方散乱光 (forward scattered light (FSC)) 強度及び、側方散乱光 (side scattered light (SSC)) 強度の相関について検討した。10,000 細胞について解析した。

6) 再構築ヒト皮膚モデル及び培養方法、細胞毒性試験方法

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL (ジャパン・ティッシュ・エンジニアリング (以下 J-TEC)) を用いた。前培養は、LabCyte EPI-MODEL を、維持培地が入った 4-well プレートへ移し、5% CO₂ インキュベーターで 15-30 時間、前培養した。試験液の添加は、溶媒コントロール、陽性対照、各試験液を 100 µL ずつ皮膚モデルの上に添加し、新しい維持培地が入った well へ皮膚モデルを移し、5% CO₂ インキュベーターで 18 時間、培養した。皮膚モデルを、維持培地が入った新しい 24-well プレートに移した後、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。皮膚モデルは、PBS で 10 回、ピペットを用いて洗浄し、MTT 溶液が入った 24-well プレートに移し、37°C、3 時間、反応させた。皮膚モデルを、0.5 mL のイソプロパノールが入った 1.5 mL tube に移し、2 時間、振とうしながら色素を抽出した。96-well プレートへ抽出液 200 µL を移し、OD 570 nm/ 650 nm を測定した。

7) 再構築ヒト皮膚モデル培養上清中のサイトカインの測定

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL の培養上清中の Interleukin-8 (IL-8)、IL-1β、Tumor Necrosis Factor-α (TNF-α)、IL-1α、MIF を ELISA により測定した。測定キットは、IL-8 (Human IL-8 ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1β (Human IL-1β ELISA Kit、Invitrogen)、TNF-α (Human TNF-α ELISA Kit、Invitrogen)、IL-1α (Human IL-1α/IL-1F1 Quantikine ELISA kit、R&D systems)、MIF (Human MIF Quantikine ELISA kit、R&D systems) を用いた。(検出限界 IL-8 ; 1.0 pg/mL、IL-1β ; 5.0 pg/mL、TNF-α ; 1.7

pg/mL、IL-1α ; 1.0 pg/mL、MIF ; 0.068 ng/mL)

(倫理面への配慮)
該当なし。

C. 結果及び考察

1) ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性評価

2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品を対象として、その物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性について検討した。研究に用いた ZnO ナノマテリアルの一次粒子径、懸濁液中での粒径分布、ゼータ電位、形状・凝集状態等の物理化学的性質と A549 細胞及び THP-1 細胞に対する細胞毒性について表 1 にまとめた。また、図 1 に、ZnO ナノマテリアルの水懸濁液及び血清含有培地懸濁液中での粒度分布 (散乱強度分布) を示した。(ナノマテリアル溶液の物理化学的性質の測定に関しては、分担研究者・河上の報告参照。) 血清含有培地懸濁液中 (0.2 mg/mL) では、ZnO (sigma) は粒径が変化した。ZnO (alfa) は殆ど変化せず、ゼータ電位は共に血清含有培地に近い値を示した。図 2 に、ZnO ナノマテリアルの THP-1 細胞に対する細胞毒性試験の結果を示した。細胞毒性の検討は、THP-1 が浮遊細胞であり、細胞の血球系の細胞で大きさも小さいことから、ATP 法により測定した。THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO (sigma) が ZnO (alfa) より強かった。

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

THP-1 細胞の表面マーカーの測定は、Human Cell Line Activation Test (h-CLAT 法) の改変法により実施した。図 3 に、ZnO ナ

ノマテリアルによる THP-1 細胞に対する細胞毒性を PI 染色により評価した結果を示した。ZnO 処理 24 時間では、ZnO(alfa) は細胞毒性を示さず、ZnO(sigma) 50 μ g/mL 処理で弱い細胞毒性を示した。図 4, 5 に ZnO ナノマテリアルによる THP-1 細胞における細胞表面マーカーの変化について検討した結果を示した。ZnO は共に、CD54 を用量依存的に活性化し、ZnO(Sigma)の方が相対蛍光強度(RFI) は高かった。

ZnO(sigma) 50 μ g/mL 処理では、24 時間で RFI は 1270%まで上昇し、48 時間目でも殆ど同じ結果を示した。ZnO(alfa)では、RFI は 750%まで上昇した。これに対して、CD86 においては ZnO による発現量の変化は観察されなかった。

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

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

4) ZnO ナノマテリアルの細胞内への取り込み

フローサイトメトリーにより、ZnO ナノマテリアル処理 THP-1 細胞の前方散乱光(FSC)強度及び側方散乱光(SSC) 強度について検討した。ZnO 処理 48 時間後に、10,000 細胞について解析した結果を、図 7 に示した。FSC 強度は、レーザーの光軸に対して前方で検出される光で、細胞の面積、大きさに関連する指標である。SSC 強

度は、レーザーの光軸に対して 90°の角度で検出される光で、細胞の顆粒性状、内部構造に関連する指標である。FSC は、ZnO 処理により変化がなかったのに対して、SSC は、ZnO 処理により、用量依存的な増加が観察された。また、ZnO(sigma)と ZnO(alfa)を比較すると、ZnO(sigma)の方がより SSC が増加しており、細胞内に取り込まれた ZnO 量と細胞毒性との間に関連があると考えられた。ZnO(sigma)と ZnO(alfa)の細胞影響の違いは、両 ZnO の物理化学的な性質が関連していると考えられた。

5) 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

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 8 及び図 9 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。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 2 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。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。

6) 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 10 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 11 及び図 12 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 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。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 NiCl_2 の応答と比較すると、NiO (粉砕用ジルコニアボールの直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 250 μM の CD54 RFI が同程度、NiO (直径 0.05, 0.1, 0.5 mm) 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 500 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と NiCl_2 250 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

7) 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 FSC 強度及び 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 13 に示した。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。

8) 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 14)。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 (粉砕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。

9) 再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL を用いた細胞毒性試験系の構

築

化学物質の皮膚刺激性評価については、ヒト正常表皮角化細胞から構成された再構築ヒト皮膚モデルを用いた *in vitro* 試験法の検証が完了し、既に動物試験代替法として適用されている (OECD TG439) (表 3)。医療機器及び医用材料の刺激性はウサギを利用した皮膚刺激性試験及び皮内反応試験により評価されているが、動物愛護の観点より再構築ヒト皮膚モデルによる評価の検討が進められてきた。ISO/TC194/WG8 において、2 種類の皮膚刺激性 *in vitro* 試験法の性能を検証する国際ラウンドロビンスタディ(RRS)を実施することになり、当部は昨年度、EPI-200 を用いた RRS に参加し (MatTek 社製 EpiDerm™ EPI-200 RhE モデル：22 施設、EPISKIN 社製 SkinEthic™ RHE モデル：7 施設が参加)、ISO 10993-23, Biological evaluation of medical devices -- Part 23: Determination of skin irritation of medical device extracts using Reconstructed human Epidermis (RhE)に収載準備中である。

一方、医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価においても、ナノマテリアルに対する評価について ISO/TC194/WG17 において検討がなされ、本年 4 月に、ISO 10993-22, Biological evaluation of medical devices -- Part 22: Guidance on nanomaterials が発出された。その中では、*in vitro* 評価法として従来の細胞毒性試験、遺伝毒性試験、刺激性試験法が引用されているが、今後、ナノマテリアルの *in vitro* 評価法についても、新規評価法の有用性が検証されれば、参照される可能性がある。

再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL は、J-TEC により開発された日本製の培養表皮モデルである。RRS で用いられたモデルにおいては、医療機器の皮膚刺激性試験用としてそれぞれ試験プロトコルの改良が行われたことから、当部と J-

TEC で LabCyte EPI-MODEL 24 の医療機器試験用に向けたプロトコルの改良を行った (表 4)。LabCyte EPI-MODEL は EpiDerm™ EPI-200、SkinEthic™ に比べると細胞毒性の感受性が高い傾向があることから、被験物質暴露後の細胞の洗浄の際に、他のモデルと同様に洗浄瓶を用いて洗浄を行うと、陽性対照物質として用いた 1% SDS では、三次元皮膚モデルが剥がれ、組織がボロボロになってしまったため、ピペットを用いて洗浄を行う方法に変更した。

10) ZnO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により ZnO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、ZnO(sigma)の IC₅₀ は 9.8 µg/mL、ZnO(alfa)の IC₅₀ は 12.6 µg/mL で、ZnO(sigma)の方が ZnO(alfa)より細胞毒性が強かった (図 15)。IC₅₀ の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

11) ZnO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(J-TEC)に、2 種類の ZnO ナノ分散製品(sigma, alfa)を、100 及び 400 µg/mL で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、ZnO では今回実施した最高濃度 400 µg/mL においても細胞毒性を示さなか

った (図 16)。

12) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL における ZnO ナノマテリアルによる サイトカイン産生

ZnO ナノマテリアルによる培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL(におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により、5 種類のサイトカインを同時に測定した。その結果、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった (図 17)。IL-8 は、陰性対照(PBS)、陽性対照 (1% SDS)、ZnO(sigma)及び ZnO(alfa)の暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)の暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-1 α 、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、ZnO(sigma)、ZnO(alfa)では、産生量の上昇は観察されなかった。

13) NiO ナノマテリアル処理による V79 細胞の細胞毒性の検討

医療機器及び医用材料の生物学的安全性評価において、細胞毒性の評価に汎用されているチャイニーズハムスター肺線維芽細胞 V79 を用いて、コロニー形成試験法により NiO ナノマテリアルの細胞毒性を評価した。その結果、NiO (粉砕ジルコニアボールの直径 0.05mm)の IC₅₀は 29.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NiO (同直径 0.1mm)の IC₅₀は 13.3 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、NiO (同直径 0.5mm)の IC₅₀は 2.7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で、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 (図 18)。IC₅₀の値は、V79 細胞を用いたコロニー形成試験法では、A549 細胞の MTS 法、THP-1 細胞の ATP 法に比べて小さかった。

14) NiO ナノマテリアルの三次元皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性の検討

培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL に、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアル懸濁液を、100, 200 及び 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ で 18 時間暴露し、ピペットを用いて PBS で 10 回洗浄後、MTT 試薬により細胞毒性について検討した。陰性対照として PBS を暴露した細胞の生存率を 100%として示した。その結果、陽性対照の 1% SDS では強い細胞毒性を示したが、NiO では、ZnO 同様、今回実施した最高濃度 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ においても細胞毒性を示さなかった (図 19)。NiO では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、A549、THP-1 細胞と同様の結果を示した。LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

15) 培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL 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培養表皮モデル LabCyte EPI-MODEL におけるサイトカインの産生について、今回、ELISA kit により 5 種類のサイトカインを測定した。その結果、IL-8、IL-1 α 、MIF は、LabCyte EPI-MODEL においてサイトカインの産生が観察されたが、IL-1 β 及び TNF- α は検出限界以下であった (図 20)。IL-8 は、陰性対照 (PBS)、陽性対照 (1% SDS)、二次粒子径が異なる 3 種類の NiO ナノマテリアルの暴露により産生が観察されたが、PBS、1% SDS 間で産生量に差はなく、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルの暴露により陰性対照に比べて産生量の増加傾向が観察されたが、有意な差はなかった。IL-

1α、MIF では、陽性対照 (1% SDS)において、各サイトカイン産生の上昇が観察されたが、二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルにより、産生量の上昇は観察されなかった。THP-1 においては、ZnO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、その量は、ZnO(sigma)の方が多かった。NiO ナノマテリアルの暴露では、IL-8、IL-1β、TNF において産生の増加が観察され、TNF、IL-1β 産生量は NiO の二次粒子径により差異が認められた。□これらは、再構築ヒト皮膚モデルと血球系細胞株では、共にヒトの細胞由来であるが、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。さらに、再構築ヒト皮膚モデルでは、皮膚のバリア機能があり、ナノマテリアルの細胞内への取り込みが異なり、細胞毒性が異なることが、サイトカインの産生へも影響を与えたと考えられた。

D. まとめ

1. 2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品について、物理化学的性質について明らかにすると同時に、THP-1 を用いた評価系を用いて、細胞毒性及び免疫応答（細胞表面マーカーCD54 及び CD86 の発現、培養上清中のサイトカイン量）について検討した結果、
 - THP-1 細胞に対する細胞毒性は、A549 細胞同様、ZnO(sigma)が ZnO(alfa)より強かった。
 - ZnO は共に用量依存的に CD54 発現量を増加させ、RFI は ZnO(sigma)の方が高かった。
 - ZnO 処理により THP-1 細胞における IL-8、IL-1β、TNF の産生が観察され、その量は ZnO(sigma)の方が多かった。
 - ZnO 処理後の THP-1 細胞をフローサイ

トメーターで解析した結果、SSC 強度の変化が、用量依存的に観察された。

2. 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、物理化学的性質について明らかにすると同時に、A549 及び THP-1 の細胞毒性に対する影響を検討した結果、
 - THP-1 細胞に対する細胞毒性は、NiO 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 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-1β、TNF の増加が観察され、TNF、IL-1β 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。

3. 2 種類の ZnO ナノマテリアル分散製品及び 3 種類の二次粒子径が異なる NiO ナノマテリアルを用いて、再構築ヒト皮膚モデル LabCyte EPI-MODEL に対する細胞毒性試験を実施した結果、
 - LabCyte EPI-MODEL は、陽性対照の 1% SDS で細胞毒性を示したが、ZnO、NiO 共に最高濃度 400 µg/ml において細胞毒性を示さなかった。
 - LabCyte EPI-MODEL のサイトカイン産

生について確認した結果、1% SDS で IL-1 α 、MIF の増加が観察されたが、ZnO、NiO によるサイトカイン産生の変化は観察されなかった。

以上より、LabCyte EPI-MODEL では、皮膚のバリア機能が高く、今回実施した最高濃度でも、表皮内に侵入しない可能性が考えられた。

E. 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.*, 4, 31-35, 2017.

2. 学会発表

- 1) 河上強志, 宮島敦子, 小森谷薫, 加藤玲子, 伊佐間和郎, NiO ナノ粒子の二次粒子径が細胞毒性に及ぼす影響, 第24回環境化学討論会, 札幌市, 2015年6月
- 2) 宮島敦子, 河上強志, 小森谷薫, 加藤玲子, 新見伸吾, 伊佐間和郎, 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルの細胞応答, 第42回日本毒性学会学術

大会, 石川, 2015年6月

- 3) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, S. Niimi, K. Isama. Effects of zinc oxide nanomaterials on the cellular responses in THP-1 cells, The 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016
- 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 細胞の細胞応答, 第43回日本毒性学会学術大会, 名古屋, 2016年6月
- 5) A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, Y. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses, EuroTOX 2017, ブラチスラヴァ, 2017年9月

F. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

表1 ZnOナノマテリアルの物理化学的特性とA549細胞、THP-1細胞に対する細胞毒性、遺伝毒性

種類	製造(販売)元	1次粒子径 ^a (nm)	懸濁液中平均粒子径 ^a (nm ± SD) ^c		Zeta電位 ^a (mV ± SD) ^d		細胞毒性 (IC50)		遺伝毒性
			注射用水	10%FBS-MEM培地	注射用水	10%FBS-MEM培地	A549細胞	THP-1細胞	A549細胞
			(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	(10 mg/ml)	(0.2 mg/ml)	MTS法 (48h) (μg/ml)	ATP法 (48h) (μg/ml)	小核試験 (20 μg/ml)
ZnO ^e	Sigma-Aldrich	<35	65.8 ± 0.7	184.9 ± 0.8	44.9 ± 0.5	-13.9 ± 0.6	31.7	49.4	陽性
ZnO	Alfa Aesar	40	164.9 ± 0.5	163.9 ± 1.8	-7.5 ± 0.5	-10.7 ± 0.5	72.5	63.0	陽性

^a測定機器: 大塚電子ELSZ-2NPA ^bカタログより ^ccumulant法より算出 ^d10%FBS-MEM培地のZeta電位(-9.6±1.6 mV) ^e2%の3-Aminopropyltriethoxysilane含有

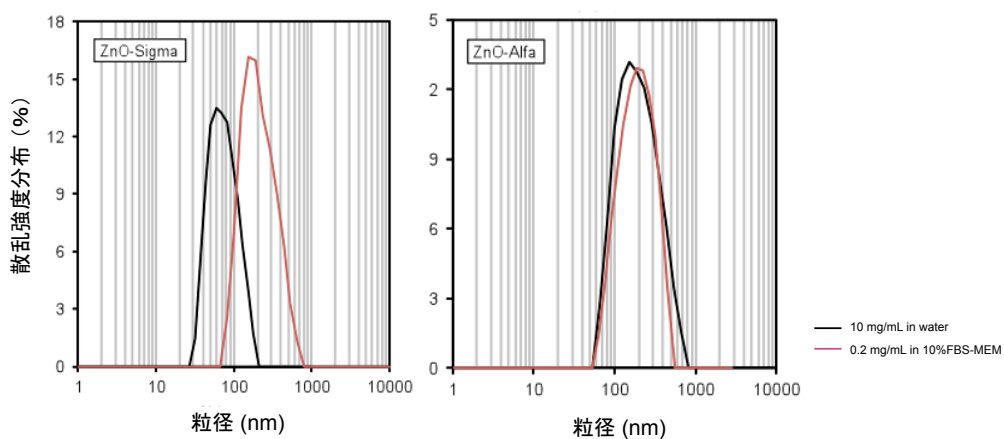


図1 ZnOナノマテリアル懸濁液中の粒径分布(散乱強度分布)

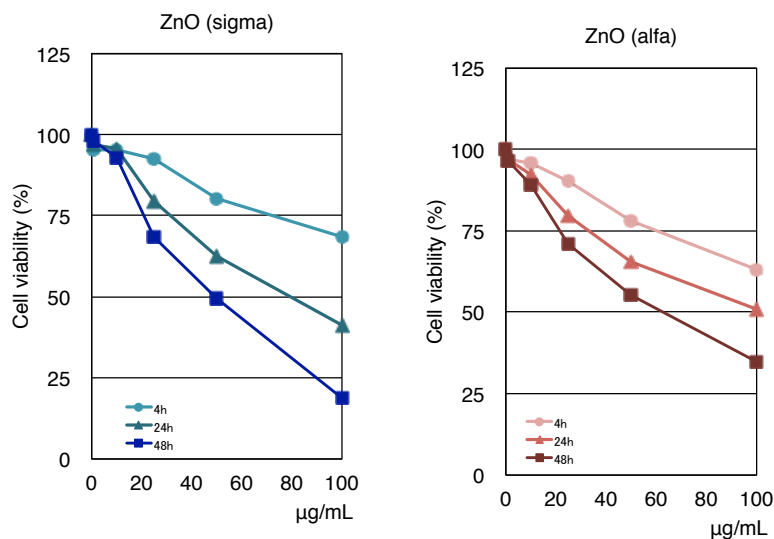


図2 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(ATP法)

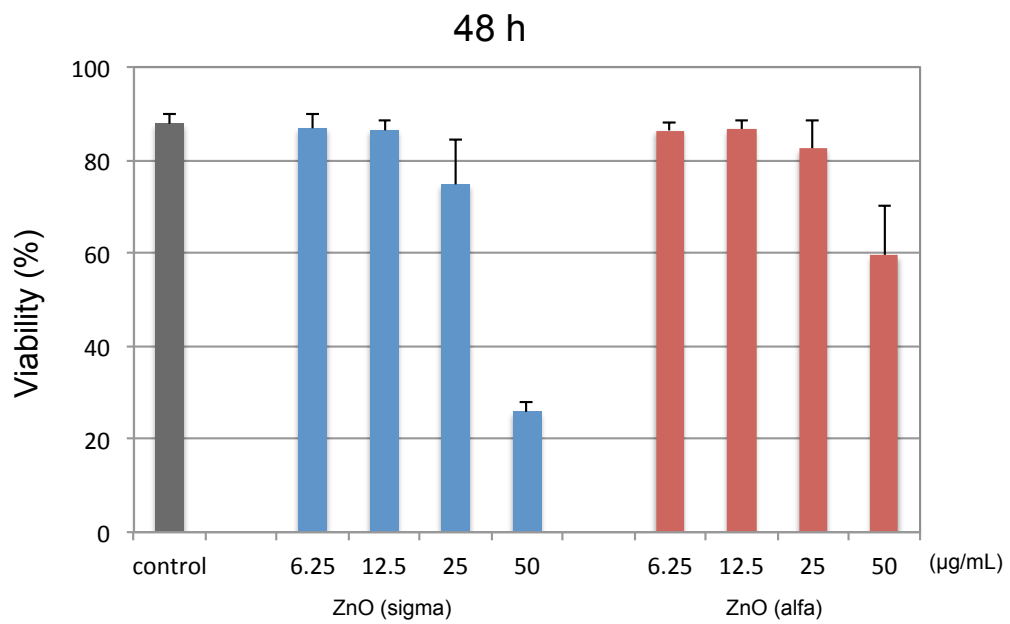
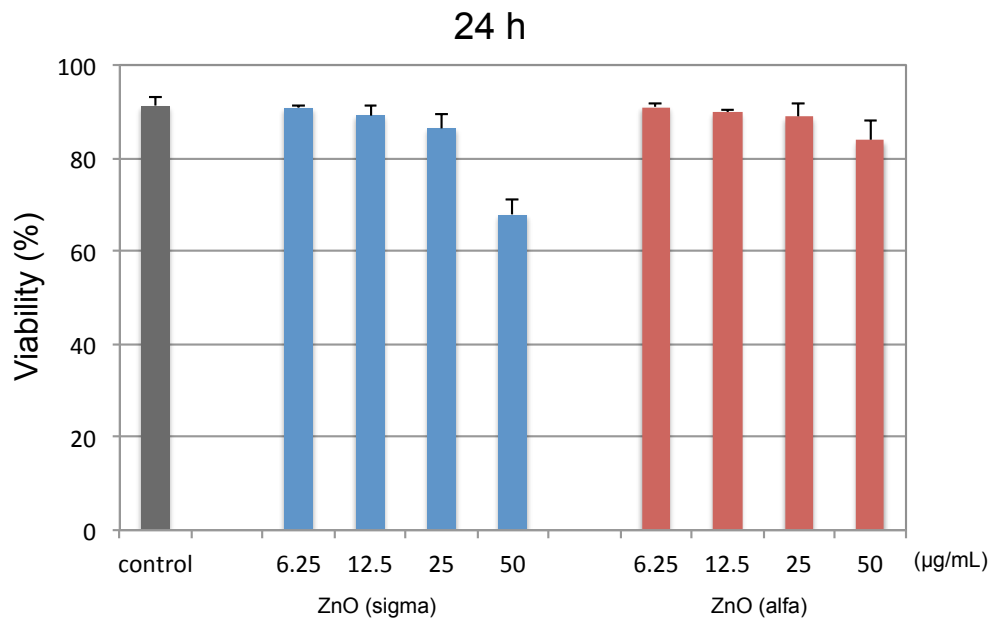


図3 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞の細胞毒性(PI法)

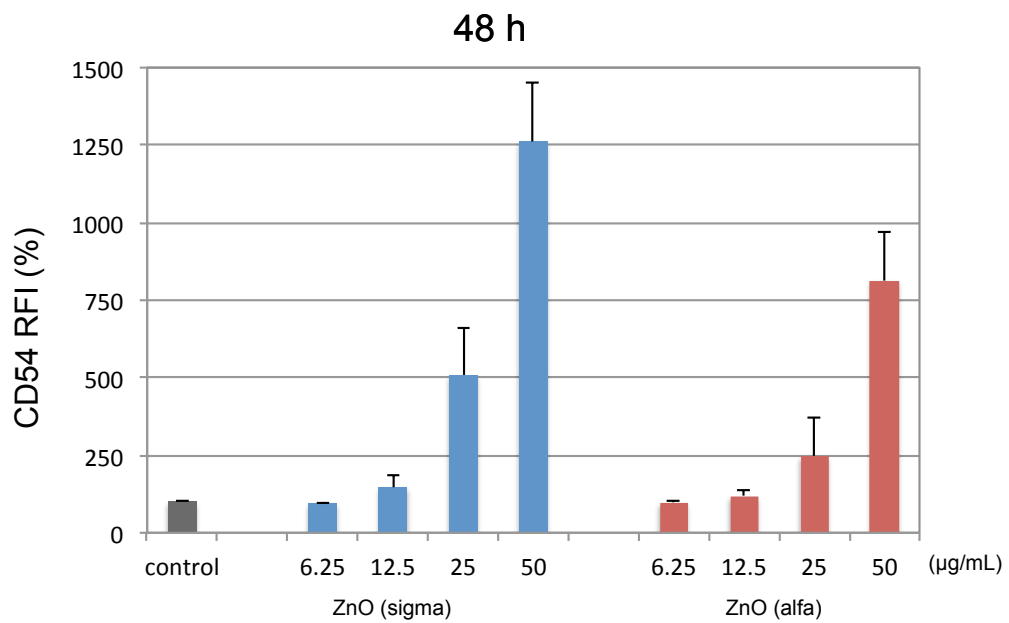
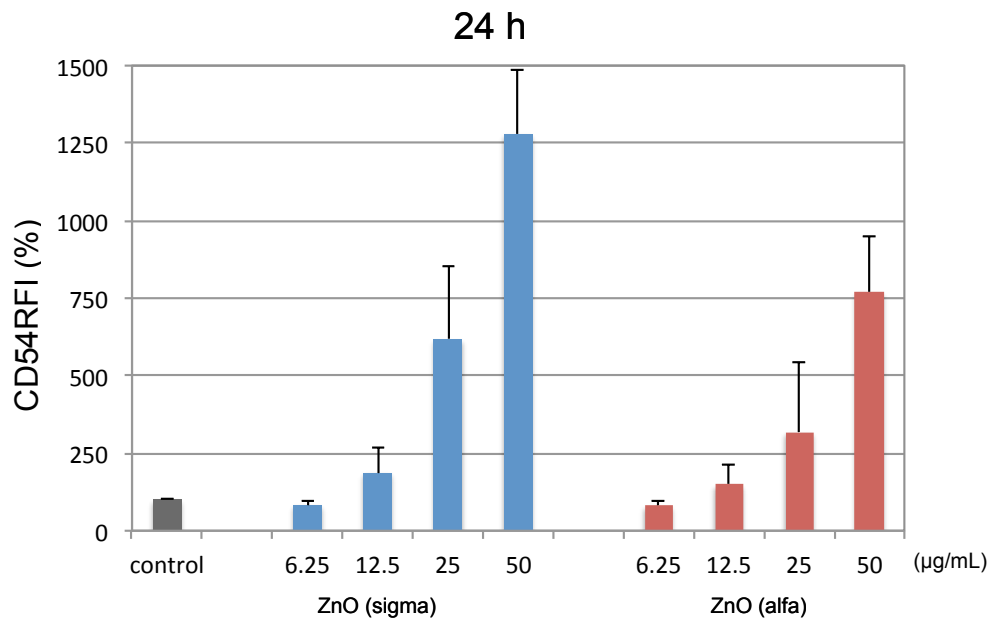


図4 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD54の発現強度

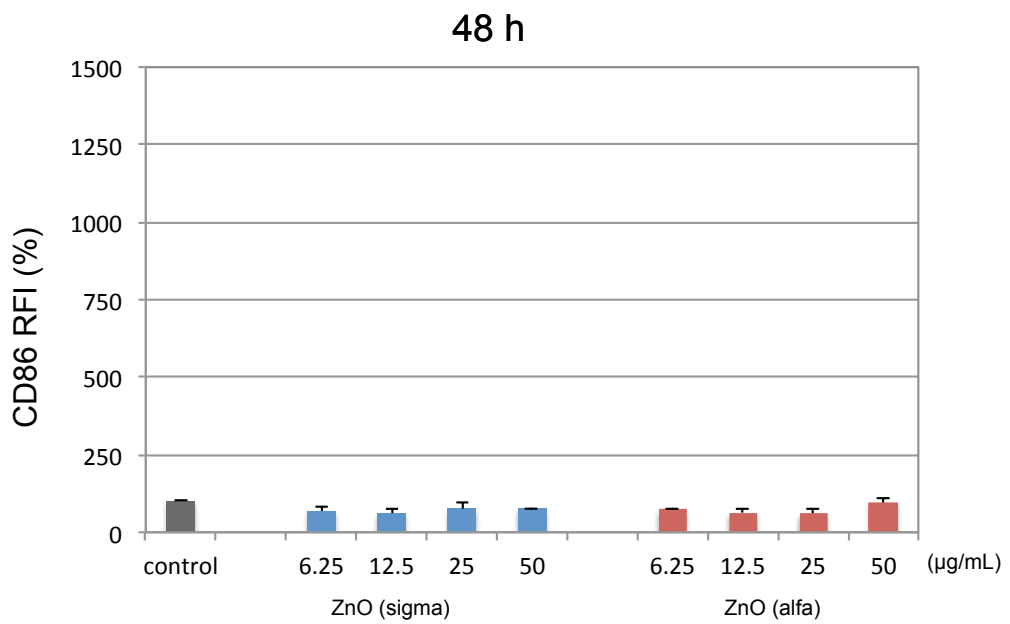
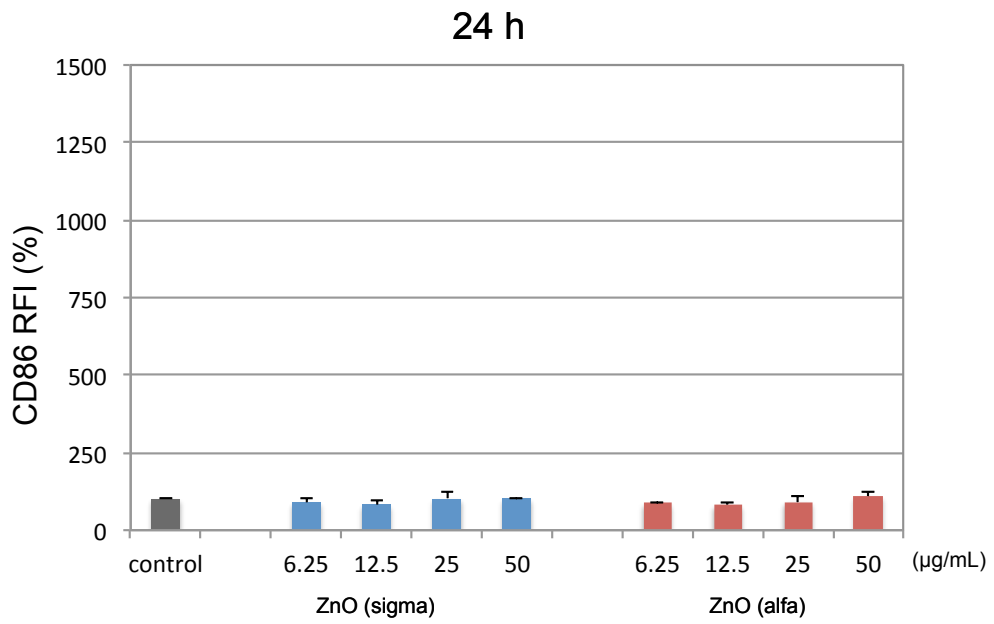


図5 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のCD86の発現強度

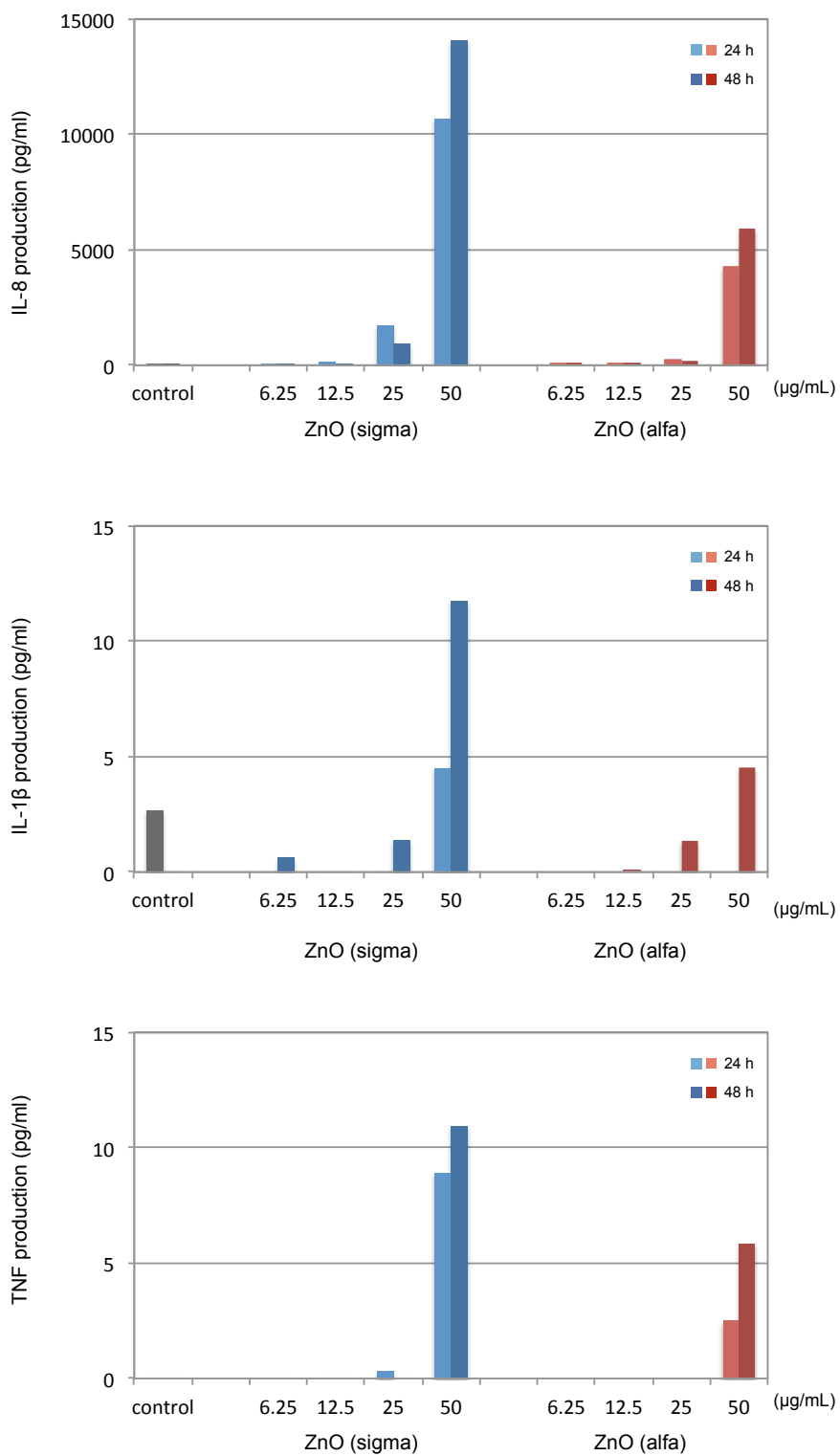


図6 ZnO(sigma)及びZnO(alfa)処理によるTHP-1細胞のサイトカイン産生

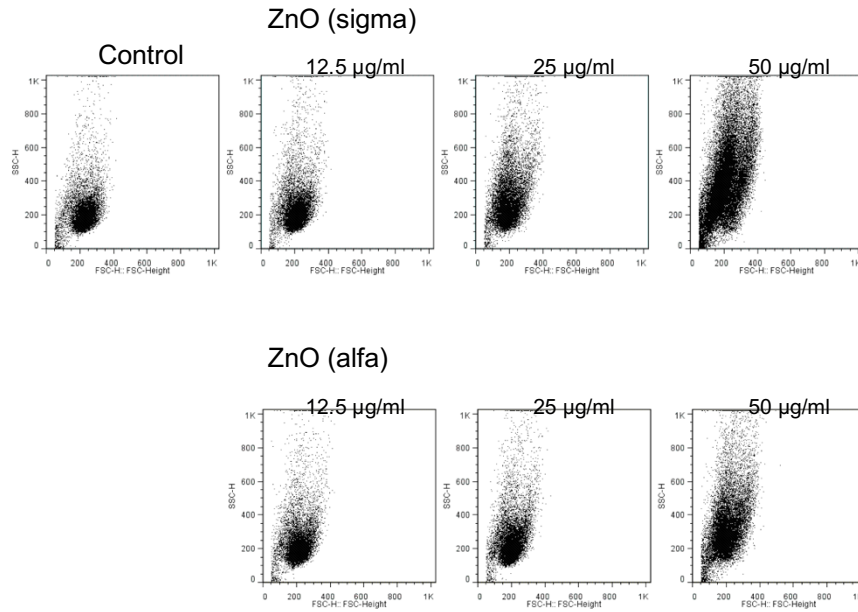


図7 酸化亜鉛ナノマテリアル処理 48 h 後の THP-1 細胞の FSC-SSC ドットプロット

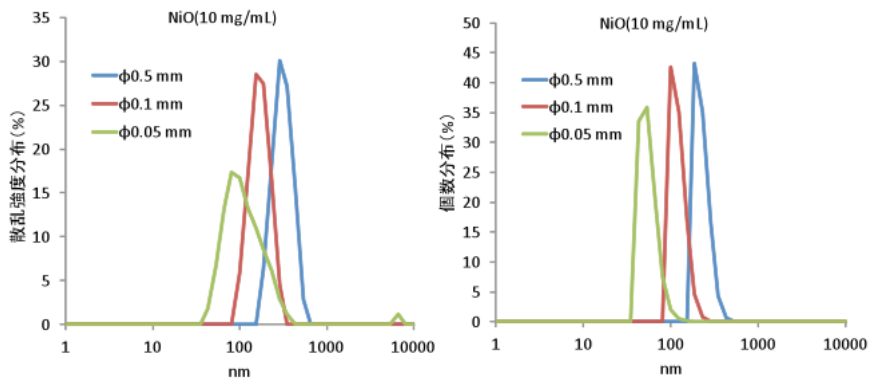


図8 NiO 懸濁原液(10 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

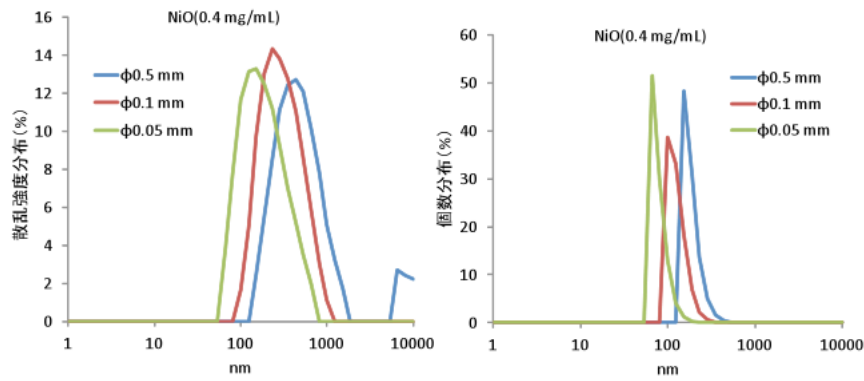


図9 NiO 懸濁液(培地中 0.4 mg/mL)の散乱強度分布及び個数分布

表 2 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) (μg/ml)	MTS法 (48h) (μg/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ELSZA-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碎処理により調製。Tween80(0.1%(w/v)含有。
^c cumulant法より算出

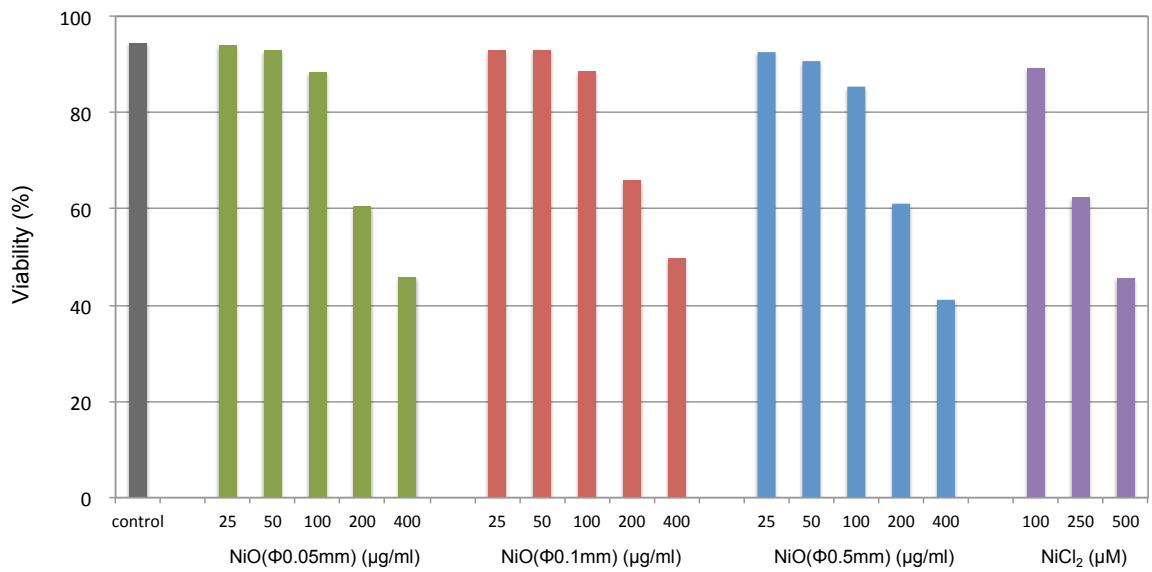


図 10 NiO 処理による THP-1 細胞の細胞毒性(PI 法)

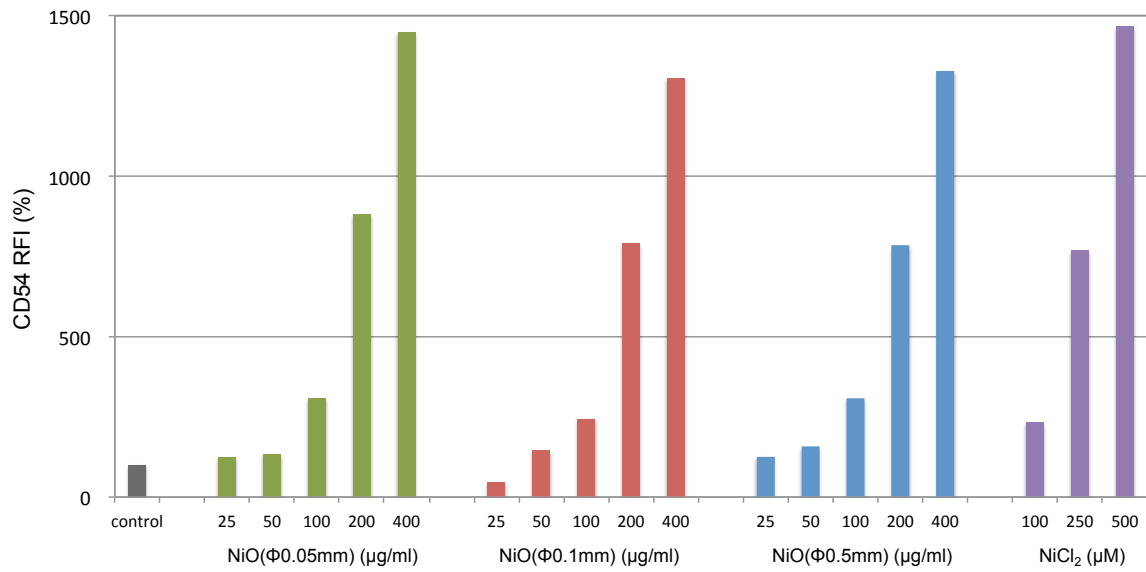


図 11 NiO 処理による THP-1 細胞の CD54 の発現強度

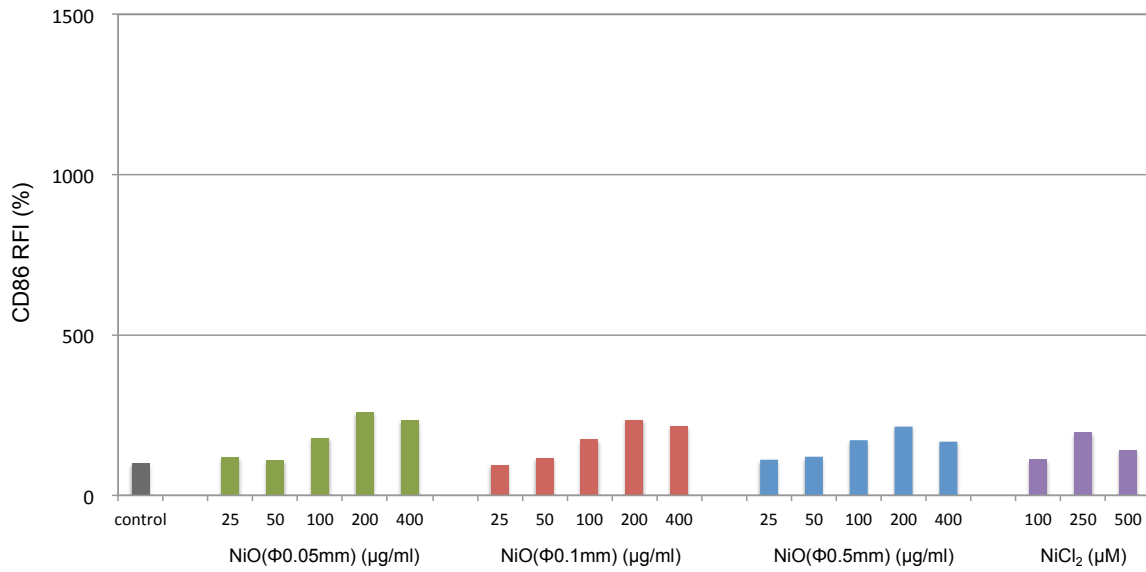


図 12 NiO 処理による THP-1 細胞の CD86 の発現強度

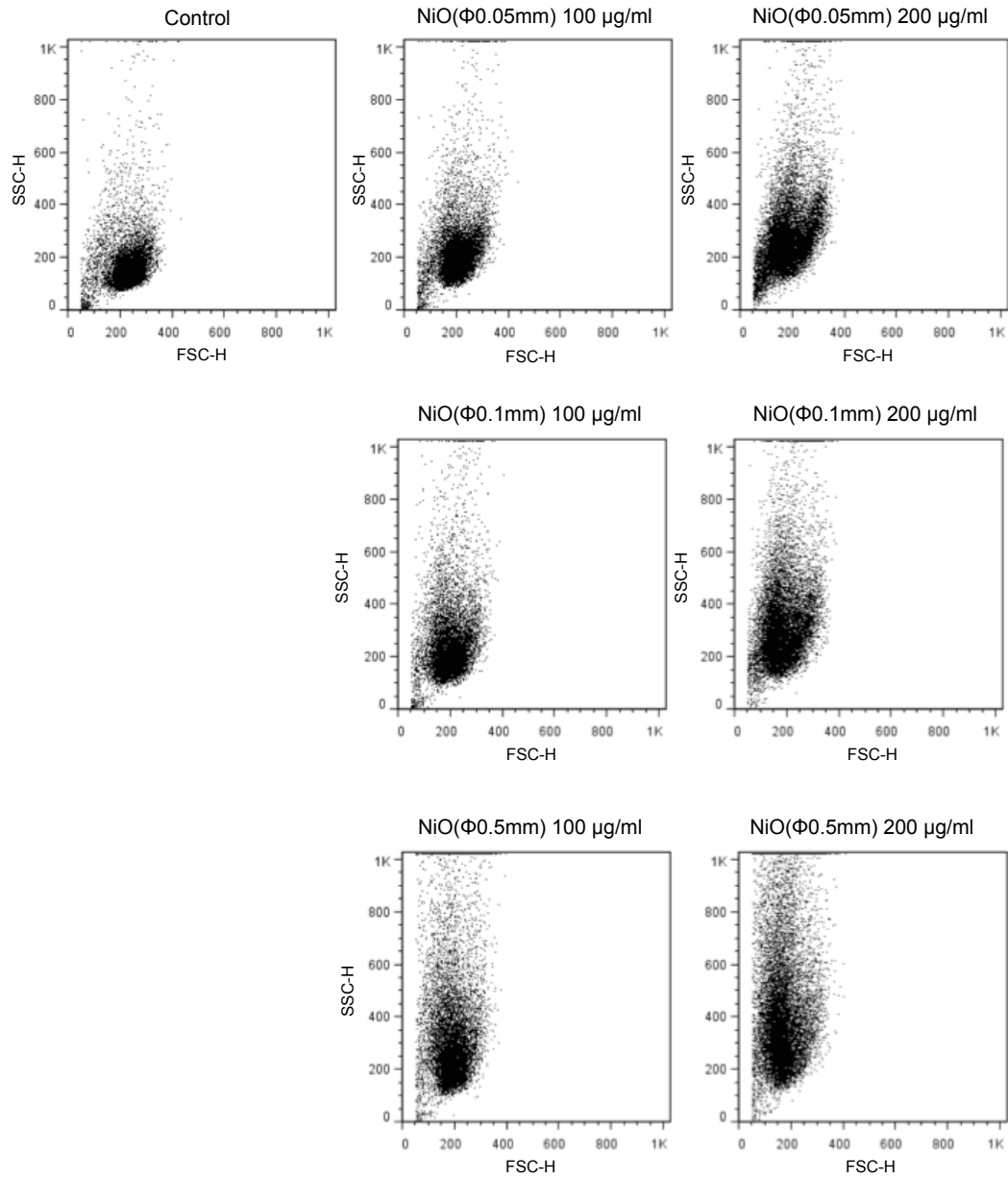


図 13 NiO 処理 24 時間後の THP-1 細胞の FSC-SSC ドットプロット

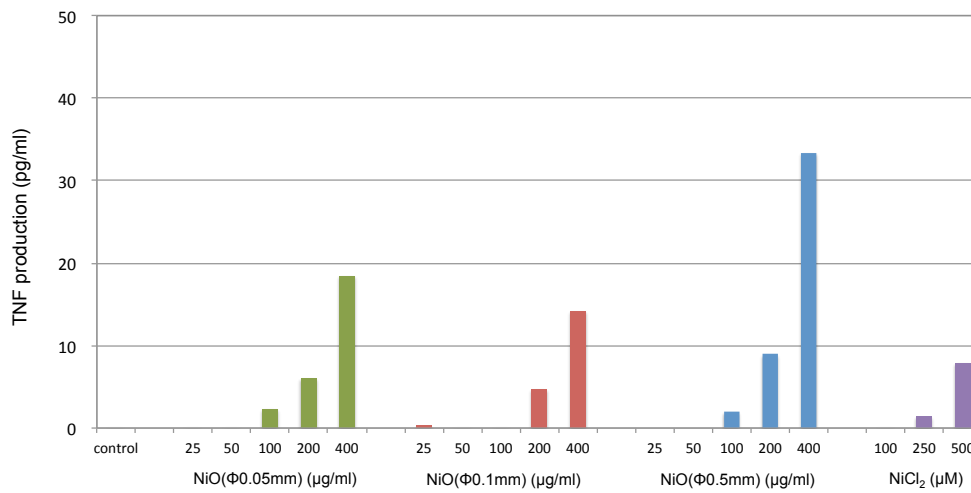
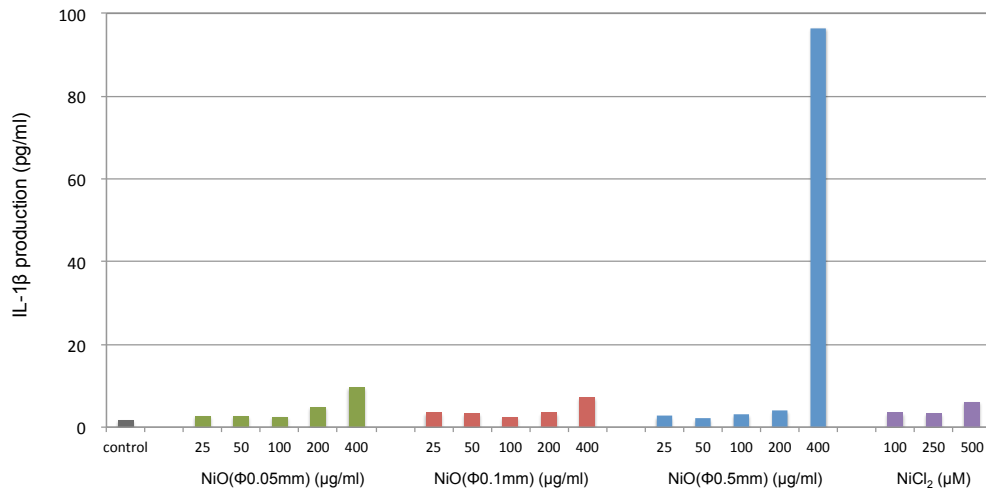
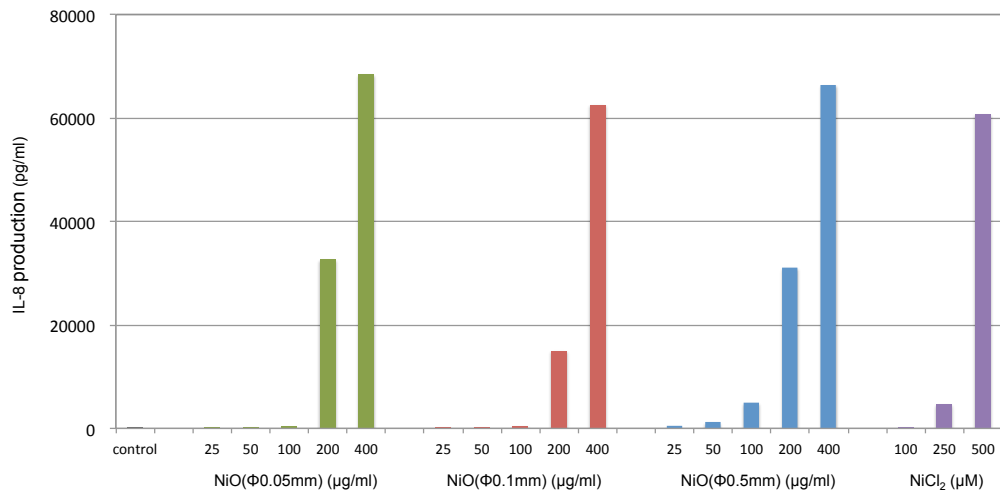


図 14 NiO 処理による THP-1 細胞のサイトカイン産生

表 3 OECD TG439 における各試験法のプロトコルパラメータ

	EpiSkin™ (SM)	EpiDerm™ SIT (EPI-200)	SkinEthic RHE™	LabCyte E PI-MODEL2 4 SIT
A) インキュベーション前				
インキュベーションの時間	18~24 時間	18~24 時間	2 時間未満	15~30 時間
培地量	2 mL	0.9 mL	0.3 mL	0.5 mL
B) 化学物質の適用				
液体の場合	10 µL (26 µL/cm ²)	30 µL (47 µL/cm ²)	16 µL (32 µL/cm ²)	25 µL (83 µL/cm ²)
固体の場合	10 mg (26 mg/cm ²) + DW (5 µL)	25 mg (39 mg/cm ²) + DPBS (25 µL)	16 mg (32 mg/cm ²) + DW (10 µL)	25 mg (83 mg/cm ²) + DW (25 µL)
ナイロンメッシュの使用	使用しない	適宜使用する	使用する	使用しない
総適用時間	15 分間	60 分間	42 分間	15 分間
適用温度	室温	a) 室温で 25 分間 b) 37°C で 35 分間	室温	室温
C) インキュベーション後の量				
培地量	2 mL	0.9 mL x 2	2 mL	1 mL
D) 最大許容変動				
連間の標準偏差	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18	SD ≤ 18

表 4 ISO/TC194 WG8 Round Robin Study における各試験法のプロトコルパラメータ

	MatTek	Episkin	J-TEC
	EPI-200-SIT	SkinEthic	LabCyte
	0.63 cm ²	0.5 cm ²	0.32 cm ²
前培養	preincubation 1 : 60 ± 5 min	2 hr / 0.3 ml or -24 hr / 1 ml	15-30 hr
	preincubation 2 : 18-24 hr		
被験物質容量	100 µl	100 ± 2 µl	100 µl
共培養時間	18 hr ± 30 minutes	24 hr ± 1 hr	18 hr ± 1 hr
適用温度	37 ± 1°C	37°C	37°C
CO ₂	5 ± 1%	5%	5%
RH	95%	95%	high humidity
MTT	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate	1 mg/ml, 0.3 ml / well of 24 well plate
	37 ± 1°C, 5 ± 1% CO ₂ , 95% RH	37°C, 5 % CO ₂ , 95% RH	37°C, 5 % CO ₂ , high humidity
	3 hr ± 5 minutes	3 hr ± 15 minutes	3 hr
Extraction	2 ml isopropanol/well of 24 well plate	1.5 ml isopropanol/well of 24 well plate	0.5 ml isopropanol in 1.5 ml tube
	2 hr at RT with shaking (-120 rpm)	2 hr ± 5 min at RT with shaking (-150 rpm)	2 hr at RT with shaking

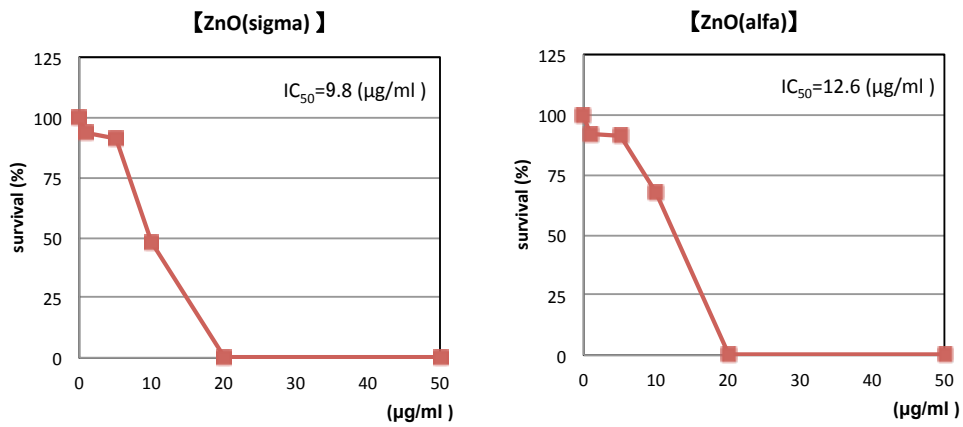


図 15 ZnO 処理による V79 細胞の細胞毒性(コロニー法)

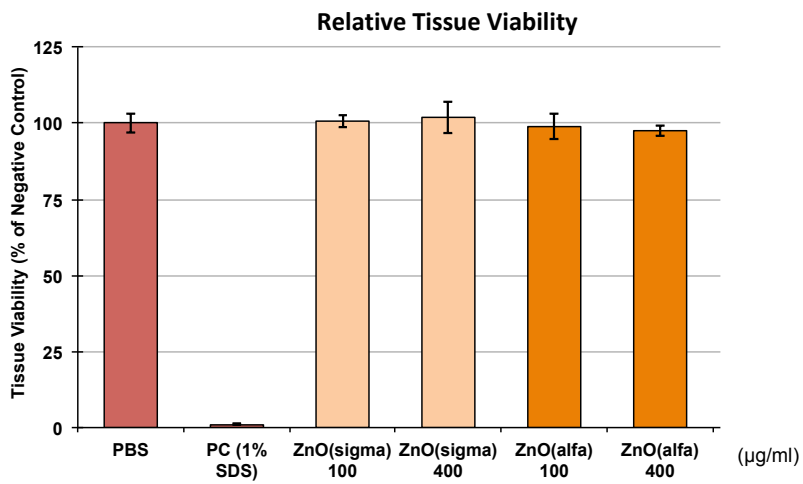
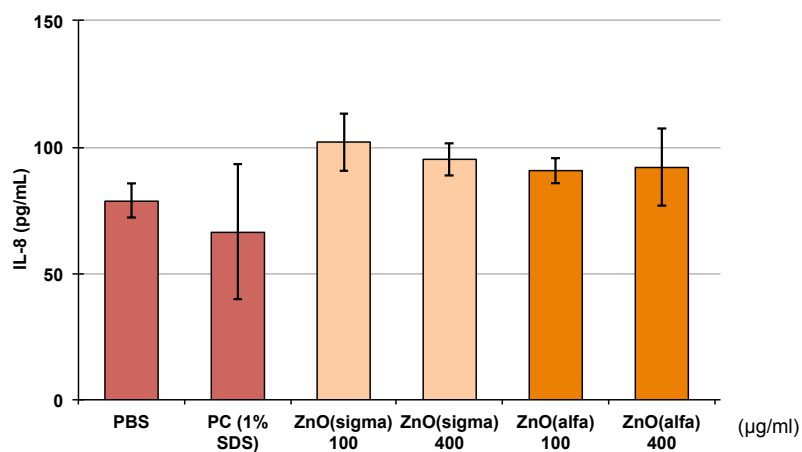
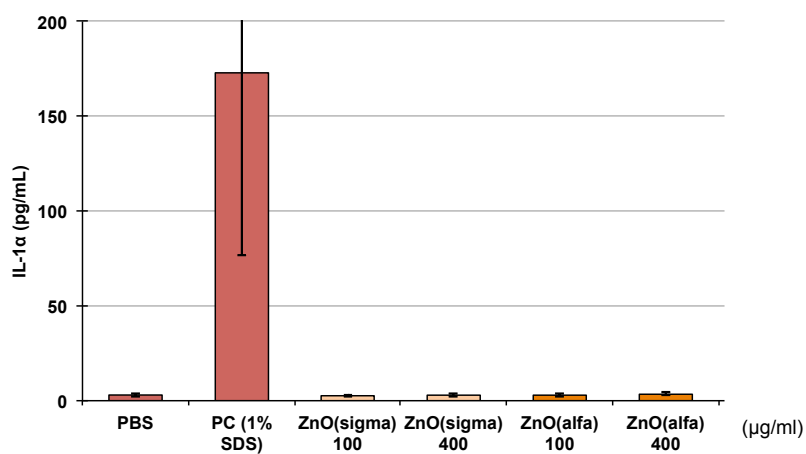


図 16 ZnO 処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT 法)

(A) IL-8



(B) IL-1 α



(C) MIF

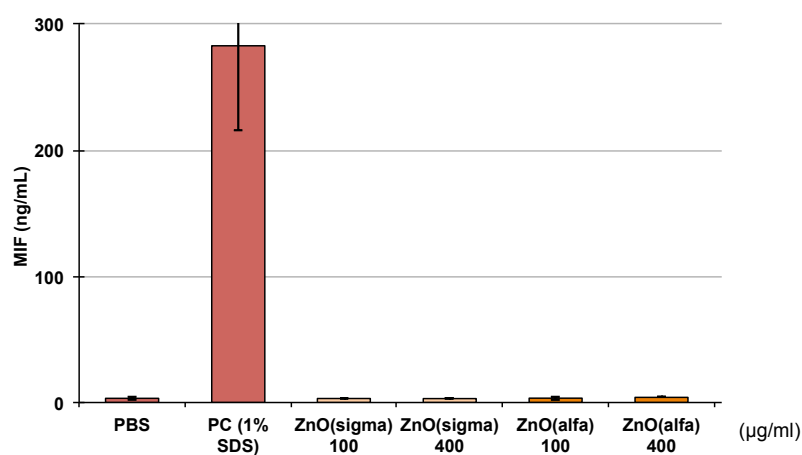


図 17 ZnO 処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

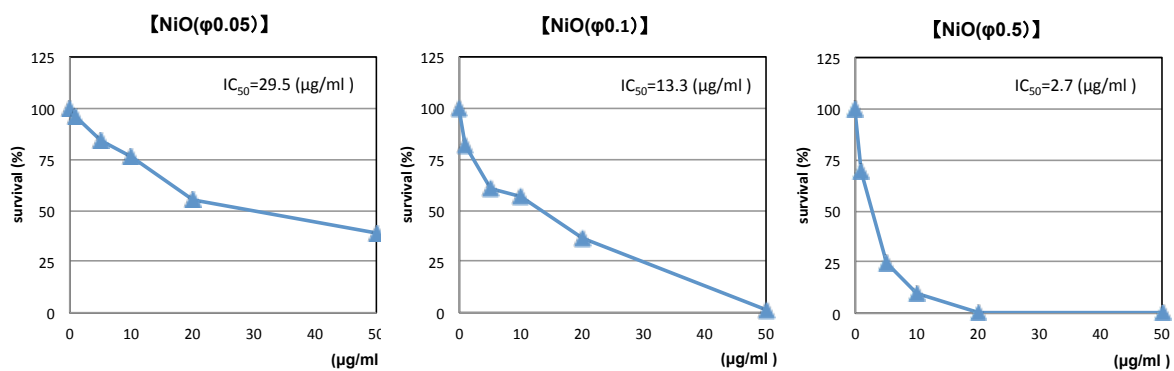


図 18 NiO 処理による V79 細胞の細胞毒性(コロニー法)

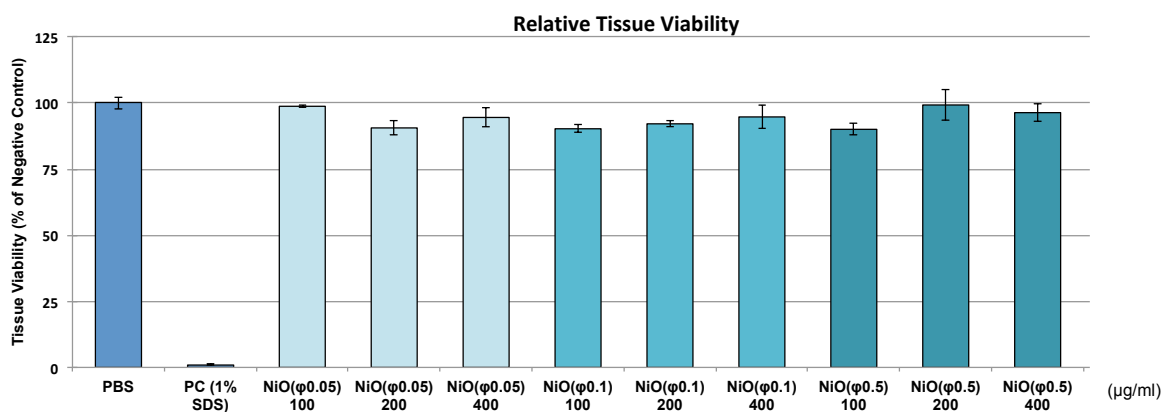
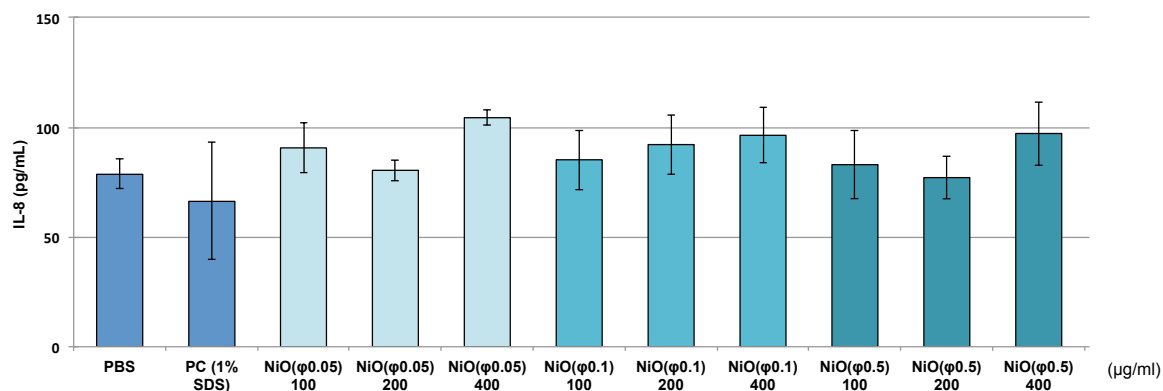
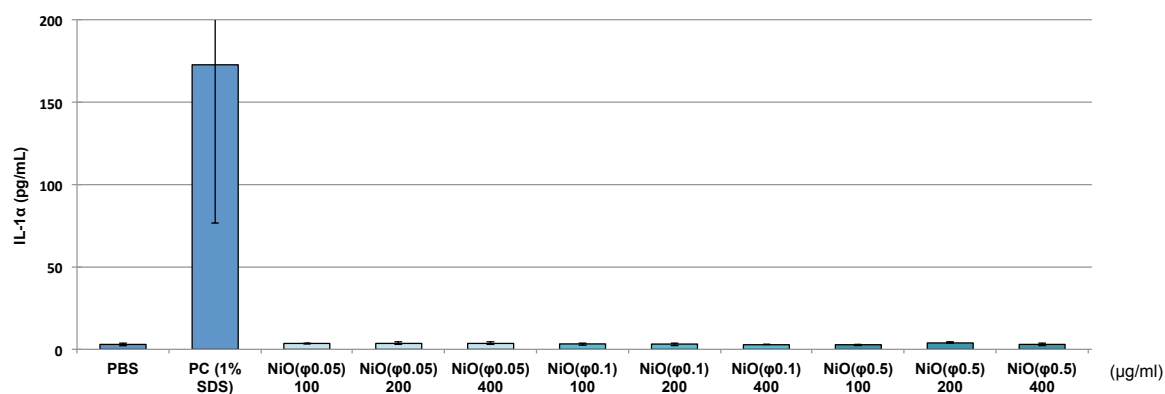


図 19 NiO 処理による再構築ヒト皮膚モデルの細胞毒性(MTT 法)

(A) IL-8



(B) IL-1α



(C) MIF

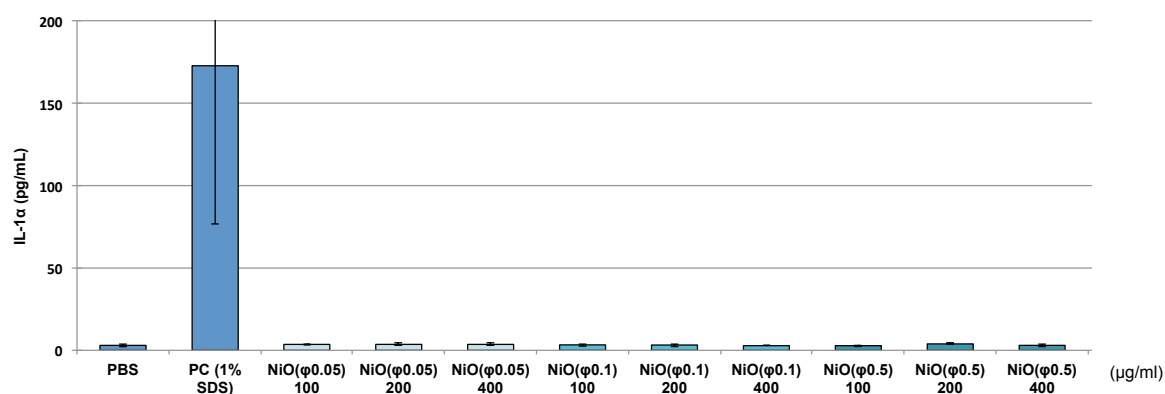


図 20 NiO 処理による再構築ヒト皮膚モデルのサイトカイン産生

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

研究要旨：本研究では、磁性体ナノ粒子の表面修飾が肺上皮細胞の microRNA(miRNA)発現に及ぼす影響、およびナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響について調べた。

まず、非修飾磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs}$)およびカルボキシル基修飾磁性体ナノ粒子($\text{Fe}_3\text{O}_4\text{NPs-COOH}$)の肺上皮細胞A549への *in vitro* 曝露実験を行い、網羅的miRNA発現解析によりこれら非修飾およびカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子によって変動するmiRNAを抽出するとともに、クラスタリング解析から変動にともなう特徴的なmiRNA群を探索した。その結果、磁性体ナノ粒子の修飾の有無にかかわらず、miR-1260aおよびmiR-1260bの2つのmiRNAが特徴的な変動挙動を示すことが明らかとなった。これら2つのmiRNAの発現量は曝露後24時間で減少し、曝露後72時間では回復した。これらのmiRNAが細胞機能にどのような影響を及ぼしているかについては現在のところ不明である。また、クラスタリング解析から、miRNAの発現変動から、磁性体ナノ粒子においては曝露量よりもカルボキシ修飾の有無の方が細胞に及ぼす影響は大きいことが判明した。しかしながら、これら磁性ナノ粒子の影響よりも培養時間に伴うmiRNAの変動量の方が大きく、磁性ナノ粒子の細胞の生理機能に及ぼす影響はそれほど大きくないと考えられた。

カーボンナノチューブ(CNT)のヒト肺上皮細胞A549またはヒト前立腺がん細胞DU145への曝露実験において、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、細胞株の違いに大きく依存し、カーボンナノチューブの形状の違いも発現に影響することが明らかとなった。また、ナノカーボンチューブにより変動するmiRNAとしてhsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5pなどが同定された。特にhsa-miR-5787は昨年度の昨年度の研究でナノ粒子を曝露したときも発現が亢進しており、ナノマテリアルのバイオマーカーとなる可能性がある。

近年、エクソソーム中のmiRNAが遠隔細胞の制御に関与していることが示唆されている。様々なナノ粒子がエクソソームの放出に及ぼす影響を調べた結果、単球およびマクロファージがリン酸カルシウム粒子を取り込むと、放出するエクソソーム量が増加することを見出した。リン酸カルシウム粒子はこれらの細胞にファゴサイトーシスで取り込まれるが、取り込まれた直後からエンドソームでの多胞体形成が促進されることが示唆されたが、今後、多胞体形成のトリガーの解明が必要である。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの進歩により、ナノ物質 (nanomaterials) は様々な産業に利用され、ナノ物質を利用した製品の数は、この数年で急激に増加している。ナノ物質のサイズ、形状、表面積 (large surface area) や表面活性 (surface activity) は、ナノ物質を利用する上で魅力的な特性である反面、これらの性質は毒性にも寄与することが懸念される。ナノ物質は、呼吸や傷口等から容易に体内に侵入し、様々な組織に影響を及ぼすところが考えられる。しかしながら、ナノ物質に関する安全性に関しては、明確な基準は設けられていない。

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。本研究グループでの担当は、ナノマテリアル曝露における網羅的遺伝子発現解析である。

我々は先に、ヒト肺上皮細胞株 A549 においてナノ粒子の取り込みによって変動する遺伝子群の同定を DNA マイクロアレイによって解析した。その結果、細胞毒性の大きいナノ粒子は大きな遺伝子発現変動を誘導すること、それら変動する遺伝子群の多くは細胞周期の制御に関与していること、溶解により金属イオンの溶出をともなうナノ粒子では metallothioneins の大きな変動が観察されること、ナノ粒子の細胞毒性を低減する方法があることなどを明らかにした。近年、microRNA(miRNA)が様々な細胞機能に関与していることが示唆されている。miRNA は 21-25 塩基長の 1 本鎖 RNA 分子であり、遺伝子の転写後発現調節に関与する。ヒトゲノムには 1000~2000 の miRNA がコードされていると考えられている。miRNA はその標的 mRNA に結合し、

標的遺伝子の 3'UTR を認識して、翻訳抑制を行うことでタンパク質産生を抑制する。miRNA が様々な疾患に関与していることが明らかになるにつれて、疾患の新しいマーカー分子としての miRNA に期待が寄せられている。ナノマテリアルに暴露された細胞においても、miRNA の変動があれば、分子マーカーとなる可能性がある。本研究の第 1 の目的は、磁性体ナノ粒子(Fe_3O_4 NPs)あるいはカーボンナノチューブ(CNT)をモデルマテリアルとして、肺上皮細胞株 A549 あるいは前立腺癌細胞株 DU145 でこれらナノマテリアルによって変動する miRNA 群の抽出とした。磁性体ナノ粒子によって発現が変動する miRNA 群を見出すことができれば、マーカー分子のみならず、磁性体ナノ粒子の生理機能への影響も推測できる可能性がある。

miRNA は様々な疾患に関与していることが報告されているが、特出した機能として遠隔細胞への情報伝達が挙げられる。遠隔細胞への情報伝達にはエクソソームが関与している。miRNA を含むエクソソームが細胞から分泌され、体液の移動とともに運ばれ、離れた細胞に取り込まれることにより遠隔細胞の生理的状態の制御を行っている。ナノ粒子がエクソソームに含有されたり、あるいはエクソソームの形成や放出、あるいはエクソソームに含有される miRNA の構成に影響を及ぼしているかどうかは現在のところ不明である。本研究の第 2 の目的はナノ粒子がエクソソームの形成に及ぼす影響を調べることを目的とした。

B. 研究方法

B1. ナノマテリアルの調整

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)は横浜国立

大学工学部渡邊研究室から得た。調製法等について研究代表者の年次報告書を参照のこと。また、CNT は分担研究者である戸塚ユニット長（国立がん研究センター研究所）より供与された。

B2. ナノマテリアル による曝露実験

ヒト肺上皮細胞株 A549 を非修飾磁性ナノ粒子あるいはカルボキシ修飾磁性体ナノ粒子で曝露し、24 時間後および 72 時間後に全 RNA を抽出した。A549 の磁性体ナノ粒子による曝露濃度は 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ および 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ とした。培養条件および曝露方法は研究代表者の年次報告書に詳しい。曝露細胞から得た RNA サンプルは、以下のようにサンプル名を付した。

C-24h：磁性体ナノ粒子で曝露せずに 24 時間培養した細胞。

NM100-24h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

NM200-24h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

M100-24h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

M200-24h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 24 時間曝露した細胞。

C-72h：磁性体ナノ粒子で曝露せずに 72 時間培養した細胞。

NM200-72h：修飾していない (non-modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 72 時間曝露した細胞。

M200-72h：修飾した (modified) 磁性体ナノ粒子を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で 72 時間曝露した細胞。

DU145 細胞及び A549 細胞にカーボンナノチューブ(CNT)を 24 時間曝露し、細胞から RNA を抽出した。

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。

DU145 Ctrl: DU145 細胞のコントロール。

DU145 L20: DU145 細胞に CNT(Long)を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

DU145 L200: DU145 細胞に CNT(Long)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

DU145 S200: DU145 細胞に CNT(Short)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 Ctrl: A549 細胞のコントロール。

A549 L20: A549 細胞に CNT(Long)を 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 L200: A549 細胞に CNT(Long)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

A549 S200: A549 細胞に CNT(Short)を 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で曝露。

B3. miRNA マイクロアレイ

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。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。

B4. リン酸カルシウム粒子の調整

180mL の 11mM CaCl_2 溶液 (pH = 9) を 20mL の 66mM Na_2HPO_4 溶液 (pH = 11) に毎分 1mL の速度で添加した。混合物の pH を NaOH の添加により 10 を超えて維持した。この操作で得られたリン酸カルシウムの沈殿を、8000 $\times\text{g}$ で 30 分間の遠心分離によって回収し、0.1mM NaOH 溶液、続いてアセトンで洗浄した。その後、リン

酸カルシウムを再び水で3回洗浄し、次いで凍結乾燥した。

B5. リン酸カルシウムによる曝露実験

RAW264.7 および THP-1 細胞を、 5×10^4 細胞/mL の密度で、12 ウェルプレート中の 2mL 培地に播種した。24 時間後、培地を、500 および 1000 μ g/mL の濃度のリン酸カルシウム粒子を含むエクソソーム枯濁 FBS (Thermo Fisher) を補充した培地と交換した。別の1、2、4、6、24、48および72時間培養した細胞を、遠心分離によって培地から除去した。培地中のエクソソームは、Total Exosome Isolation Kit (Thermo Fisher) を用いて集めた。エクソソームの数は、EXOCETエクソソーム定量アッセイキット (System Biosciences, Palo Alto, CA, USA) を用いて測定した。

B6. カルシウム濃度の測定

収集したエクソソーム (1×10^6 個のエクソソーム) または細胞 (3×10^5 個の細胞) に 70% HNO₃ 3500 μ L、37% HCl 200 μ L および 30% H₂O₂ 100 μ L を Ca フリー PBS -) (Thermo Fisher) を添加し、次いで混合物をマイクロ波 (1000W) で2時間処理し、次いで ICP-OES でカルシウム濃度を測定した。

C. 研究結果と考察

C1. 磁性体ナノ粒子による miRNA 発現の変動

磁性体ナノ粒子による A549 の miRNA の変動に関する研究は本プロジェクトの研究期間である3年間にわたって行ったが、磁性体ナノ粒子の曝露に対する影響よりも播種した細胞の初期状態や培養時間の経過に伴う発現変動の方が大きく、データの詳細な信頼性に関する保証が得られなかった。しかしながら、図1に示すクラスタリングの傾向から、磁性体ナノ粒子が miRNA 発現に及ぼす影響として、磁性体ナノ粒子の修

飾の有無の方が、曝露濃度よりも影響が大きいことはほぼ間違いないと思われる。細胞毒性の結果も、非修飾磁性体ナノ粒子の細胞毒性の方がカルボキシ修飾した磁性体ナノ粒子よりも毒性が大きいことが示されている。曝露濃度は 100 μ g/ml および 200 μ g/ml であったが、これらの濃度では細胞内に取り込まれる量の限界値を超えていると思われる。いずれの濃度であっても細胞内の粒子濃度は同じであると考えられ、そのために miRNA の発現パターンの相違が小さかった可能性がある。図 1a に示したヒートマップから特徴的な発現パターンを示す miRNA のクラスター (cluster-1, 2, 3, and 4) を抽出した (図 1a)。Cluster-1 は、has-miR-1274_v16.0, has-miR-4286, has-miR-1260b, および has-miR-1260a からなり、この cluster に含まれる miRNA は、M200-72h と NM200-72h で発現量が増加する傾向を示している (図 2, 表 1)。この傾向は has-miR-1260b において特に顕著であった。Cluster-2 は、has-miR-765 および has-miR-622 からなっている (図 2, 表 2)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示している。Cluster-3 は、has-miR-513a-5p, has-miR-1181 および has-miR-3141 からなっている (図 2, 表 3)。これらの miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも 72 時間培養した細胞で発現量が増加するが、NM200-72h の発現量が C-72h および M200-72h の発現量よりも低い傾向を示すことは cluster-2 に含まれる miRNA の特徴と同じである。しかしながら、cluster-2 の miRNA は C-24h で発現していないか、あるいは若干しか発現していないのに対し、cluster-3 の miRNA は C-24h で発現が認められる。また、非修飾および修飾した NPs で 24 時

間暴露した細胞 (NM100-24h, NM200-24h, M100-24h, M200-24h) におけるこれらの miRNA の発現量は C-24h よりも低い傾向を示している。Cluster-4 は 12 個の miRNA からなり、そのうちの 6 個は let-7 family の miRNA であった (図 2, 表 4)。この cluster に含まれる miRNA は、24 時間培養したいずれの細胞よりも C-72h で発現量が低下するが、NM200-72h および M200-72h では発現量が C-72h ほど低下しない傾向を示している。

ここで得られた特徴的な発現パターンを示した cluster 1、2、3 および 4 の 21 個の miRNA について、異なる培養において再現性の実験を数度行った結果、miR-1260a および miR-1260b に関しては比較的再現性が高いことが判明した。miR-1260b 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、1 回目の実験において、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、2 回目の実験では、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。1 回目と 2 回目では、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。

miR-1260b の機能に関しては、SFRP1、DKK2、および SMAD4 が miR-1260b の標的遺伝子であり、癌細胞の増殖と浸潤に関与している可能性があることが報告されている。また、miR-1260b の発現が、正常な腎臓組織と比較して腎臓癌組織において亢進しており、そして発現の上昇が患者の生存率に有意に関連していることが指摘されている。さらに、この miRNA が非小細胞

性肺癌のリンパ節への転移に関与する可能性も報告されている。本研究に用いられた細胞が肺癌由来の A549 であることを考えると、磁性体ナノ粒子が miR-1260b の発現のトリガーになることも考えられるが、正常な細胞でもの miRNA が発現するのかどうかは今後の検討が必要である。一方、miR-1260a の細胞機能への影響に関する情報を見出すことはできなかった。

C2. カーボンナノチューブによる miRNA 発現の変動：

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、75 パーセンタイルシフトで各サンプルのシグナル強度をノーマライゼーションした。

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 232~309 個であった。条件は少し異なるが昨年度は同じバージョンのマイクロアレイを使って検出数が 103~166 個であったので、今年度の検出数は 2 倍くらいに増えている。これは、細胞からの RNA 抽出条件の最適化ができたためと考えられる。

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 188 個あり、これら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 3 に示す。この clustering tree において、A549 細胞に CNT (Short) 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ を曝露したサンプルが他と挙動が大きく異なっている。また、clustering tree の高さ方向の長さの違いから DU145 細胞は A549 細胞より CNT の影響を受けにくいことが分かる。さらに CNT (Long) の 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ が与える影響の差は小さく、

濃度よりも CNT の形状の違い (Short か Long か) の方が細胞に与える影響が大きいと分かる。

次に、各条件のコントロールに対する発現比 (2を底とする対数で表現した Log2 値) を求めた。その分布を表 1 に示す。DU145 細胞は A549 細胞よりも CNT の影響を受けにくいことから分布の幅が狭くなっている。続いて、CNT 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 (Log2 値が 1 以上もしくは -1 以下) miRNA は 129 個あった。そのうちの一部を表 5 に示す。このリストから DU145 細胞と A549 細胞で共通して、CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA として hsa-miR-5787, hsa-miR-7110-5p, hsa-miR-3679-5p の 3 つが見出された。hsa-miR-5787 は細胞増殖や細胞分化に関与する遺伝子 ELF5 をターゲット遺伝子とする。昨年度の研究で非修飾ナノ粒子を曝露したときも hsa-miR-5787 の発現が亢進した。このため、hsa-miR-5787 は CNT やナノ粒子以外のナノマテリアルに対しても発現が亢進するかもしれない。また、A549 細胞で CNT (Short) 200 μ g/mL により発現が亢進する miRNA は計 68 個あったが、このうち多くで発現量が Short 200 μ g/mL \gg Long 200 μ g/mL $>$ Long 20 μ g/mL の関係にあり、バイオマーカーの候補としてスクリーニングから外す理由はない。バイオマーカーの発見のためには、Short 200 μ g/mL での発現量が多い順になるべく多くの miRNA について定量 PCR によりスクリーニングを行なうのが良いかもしれない。

C3. ナノ粒子がエクソソームに及ぼす影響：

次に、全エクソソーム単離試薬を用いて 500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から分泌された小胞を

回収した。リン酸カルシウム粒子で処理された細胞から集められた小胞は、エクソソームマーカー分子 CD9 を発現し (図 4A)、これらの小胞はエクソソームであることが示唆された。回収された小胞はまた、後期エンドソームおよびリソソームのマーカーである LAMP-1 を発現した (図 4B)。

リン酸カルシウム粒子がエクソソーム分泌を刺激するかどうかを調べるために、RAW264.7 および THP-1 細胞を 500 および 1000 μ g/ml の濃度の CaP 粒子で 72 時間処理し、エクソソームを回収した。500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した RAW264.7 細胞から放出されたエクソソームの数は、非処理細胞の約 2 倍であった (図 5A)。しかし、500 μ g/ml ~ 1000 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子濃度において、エクソソーム数に有意差は認められなかった。RAW264.7 細胞を 500 μ g/ml のリン酸カルシウム粒子で処理した場合、ほとんどのエクソソームは 24 時間以内に分泌された (図 5B)。一方、ほとんどのエクソソームは、リン酸カルシウム粒子非処理細胞において 6 時間以内に分泌された。72 時間培養した THP-1 細胞において、エクソソームの数は、非処理細胞と比較して、CaP 粒子処理細胞において 2 倍以上高かった (図 5C)。さらに、大部分のエクソソームは、24 時間以内にリン酸カルシウム粒子処理細胞からも分泌された (図 5D)。これらの結果は、リン酸カルシウム粒子が RAW264.7 および THP-1 細胞の両方においてエクソソーム分泌を刺激する可能性を有することを示唆している。

本実験においてリン酸カルシウム粒子で曝露した細胞から分泌されたエクソソームは、リン酸カルシウム粒子由来のカルシウムイオンを含むかどうかを調べた。その結果、リン酸カルシウム粒子で処理した細胞と処理していない細胞の間で、エクソソーム中

のカルシウム濃度に有意差は観察されなかった (図 6A、B)。すなわち、リン酸カルシウム粒子もリン酸カルシウム住む粒子から放出されたカルシウムイオンも、リン酸カルシウム粒子で曝露された細胞から分泌されたエクソソームには含まれていない。細胞内のカルシウム濃度を分析すると、細胞内カルシウム濃度はリン酸カルシウム粒子濃度依存的に増加したことから (図 6C)、リン酸カルシウムあるいはリン酸カルシウム粒子から溶出したカルシウムイオンは細胞内にとどまっていることが示唆された。

上記の実験においてリン酸カルシウム粒子は、細胞から分泌されたエクソソームの数を増加させた。さらに、大部分のエクソソームは、リン酸カルシウム粒子による処理後 24 時間以内に細胞から分泌された。リン酸カルシウム粒子は分泌されたエクソソームの数を増加させたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞から分泌されたエクソソーム中のカルシウム濃度は、未処理細胞とは有意に異ならなかった。この結果は、細胞質ゾルに放出されたリン酸カルシウム粒子またはリン酸カルシウム粒子由来カルシウムイオンの排泄に対してエクソソーム分泌が増強されないことを示唆している。エクソソームは、エンドソーム膜の内方発芽によって形成される小胞内小胞 (ILV) に由来する。これは、エクソソームの内容物が細胞質ゾル成分に由来することを意味する。リン酸カルシウム粒子で処理した細胞から単離したエクソソーム中のカルシウム濃度の増加を示さない結果は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂に起因する細胞質ゾル中のカルシウム濃度の増加前に ILV が形成されたことを示唆する。ILV の形成は、リン酸カルシウム粒子による処理後 4 時間で後期エンドソームまたはリソソームが破裂し始めたので、リン酸カルシウム粒子での処理後 4 時間以内に起こると

考えられる。

エクソソームは、エンドソーム膜の陥入によって形成され、エンドソームに保持された ILV に由来する。ILV を含むエンドソームは、多胞体 (MVB) と呼ばれる。ILV は MVB と細胞膜との融合により細胞からエクソソームとして放出される。リン酸カルシウム粒子による処理による分泌されたエクソソームの数の増加は、MVB 形成の促進および/または MVB と細胞膜との融合に起因する。細胞質 Ca^{2+} 濃度の増加は、MVB と細胞膜の融合を促進することが報告されている。大部分のエクソソームはリン酸カルシウム粒子非処理細胞で 6 時間以内に分泌されたが、リン酸カルシウム粒子処理細胞ではエクソソーム分泌は 24 時間まで続き、大部分のエクソソームは処理後 6 時間から 24 時間に分泌された。上記のように、リン酸カルシウム粒子処理細胞における細胞質カルシウム濃度は、後期エンドソームまたはリソソームの破裂のために 6 時間後に増加すると考えられ、これは、リン酸カルシウム粒子処理細胞におけるエクソソーム分泌レベルの増加が促進に起因することを示唆する細胞質カルシウム濃度の増加による MBV の細胞膜との融合の可能性がある。上記のように、カルシウムを含まない ILV は、リン酸カルシウム粒子処理細胞において 4 時間前に形成されると考えられているが、リン酸カルシウム粒子が ILV および MBV の形成を刺激するかどうかの直接の証拠はない。

D. 研究発表

1. 論文発表

- (1) N. Hanagata, H. Morita. Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles. *J. Toxicol. Sci.* 40(5), 625-35, 2015.

- (2) L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R.A. Yokel, T. Takemura, N. Hanagata, M. Niwa, D. Watanabe. Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model. *Int. J. Nanomed.* 10, 6105-19, 2015.
- (3) Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, N. Hanagata, Investigation of dendritic mesoporous silica nanoparticles for cytosine-phosphate-guanosine oligodeoxynucleotide delivery, *Mater. Express*, 6, 116-26, 2016
- (4) 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.*, 7, 2392-402, 2017.
- (5) 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*, 33, 591-9, 2017.
- (6) 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.*, 8, 13936, 2017.

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.

E. 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

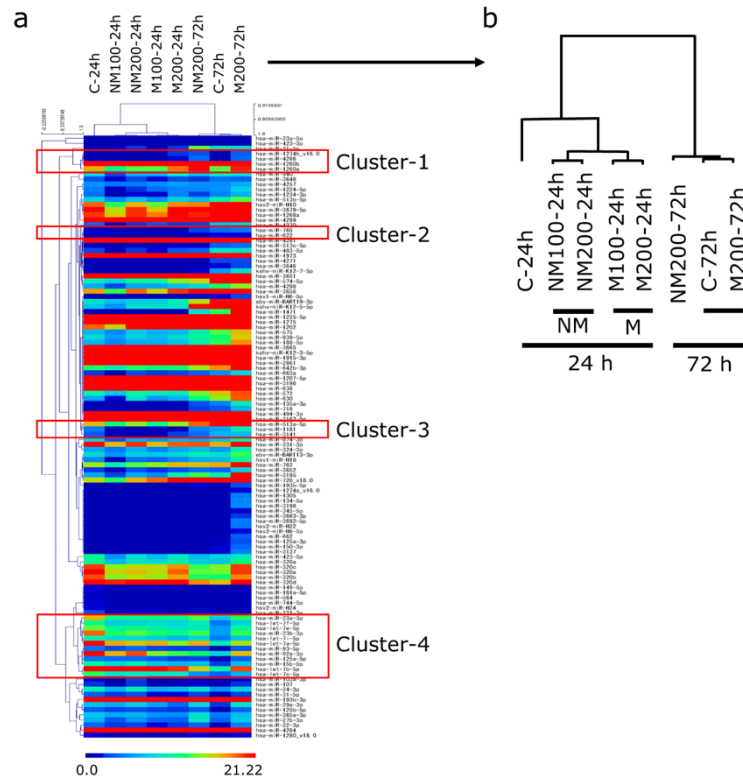


図 1. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリーとヒートマップ

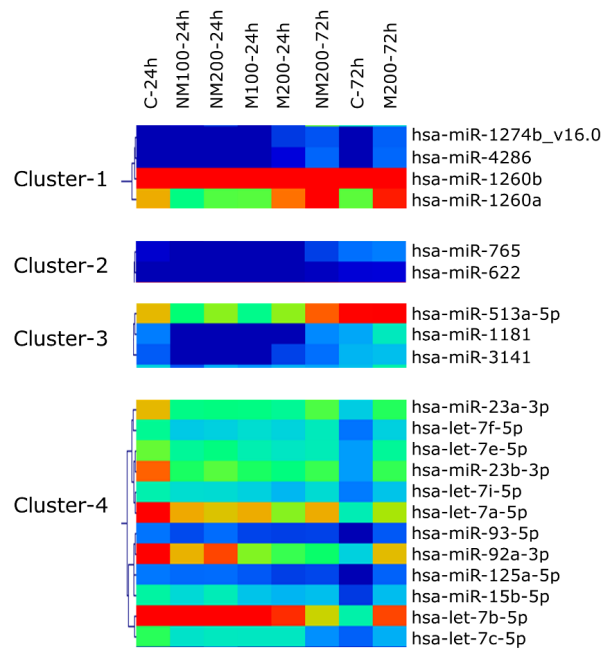


図 2. 各クラスターのヒートマップとクラスターを構成する miRNA

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

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

ND, not detected

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

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

ND, not detected

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

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

ND, not detected

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

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

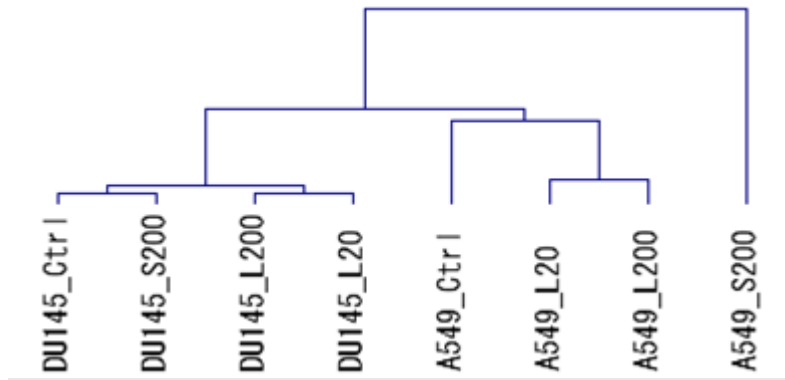


図 3. miRNA の網羅的解析から得られたクラスタリングツリー

表 5. 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 (一部)

SystematicName	DU145 Long20 /Ctrl	DU145 Long200 /Ctrl	DU145 Short200 /Ctrl	A549 Long20 /Ctrl	A549 Long200 /Ctrl	A549 Short200 /Ctrl	Target Gene (m RTaBase) Strong evidence		
hsa-m R-7110-5p	-0.818	0.367	1.080	3.583	3.753	6.390	---		
hsa-m R-5787	-1.239	1.586	2.162	3.273	3.848	6.193	ELF5		
hsa-m R-7107-5p	-0.688	-0.150	0.716	2.518	2.990	5.466	---		
hsa-m R-4281	-0.313	0.514	0.862	1.765	2.096	4.345	---		
hsa-m R-3679-5p	-0.247	0.282	1.019	2.271	2.761	4.313	---		
hsa-m R-1207-5p	-0.644	0.084	0.759	1.826	2.208	4.159	TERT		
hsa-m R-6088	-0.576	0.147	0.586	1.921	2.184	3.975	---		
hsa-m R-642a-3p	-1.159	-0.504	0.192	1.051	1.398	3.966	---		
hsa-m R-4687-3p	-0.457	0.251	0.338	3.101	3.153	3.939	---		
hsa-m R-4466	-0.723	-0.233	-0.168	2.574	2.856	3.723	---		
hsa-m R-1225-5p	-0.687	0.072	0.499	1.762	1.866	3.567	---		
hsa-m R-1973	-0.699	0.277	-0.358	2.170	2.234	3.401	---		
hsa-m R-642b-3p	-0.884	-0.329	0.440	0.731	1.173	3.167	---		
hsa-m R-3960	-0.460	0.431	0.166	2.055	2.131	3.165	---		
hsa-m R-4516	-0.773	-0.094	0.081	1.424	1.742	3.060	STAT3		
hsa-m R-6090	-0.678	0.228	0.061	1.846	1.982	3.023	---		
hsa-m R-4485-5p	-0.623	0.229	-0.049	1.490	1.709	2.989	---		
hsa-m R-1268a	-0.882	0.119	0.226	1.575	2.090	2.963	---		
hsa-m R-6769b-5p				0.708	1.333	2.911	---		
hsa-m R-4485-3p	-0.976	-0.433	-0.382	1.710	1.825	2.870	---		
hsa-m R-4530	-0.440	0.119	0.453	1.516	2.097	2.829	---		
hsa-m R-1246	-0.483	0.504	0.426	2.760	2.174	2.345	DYRK1A		
hsa-m R-3656	-0.580	-0.233	-0.018	1.156	1.894	2.757	---		
hsa-m R-1275	0.253	0.867	0.523	0.994	1.340	2.742	---		
hsa-m R-762	-1.101	0.254	0.066	1.580	1.753	2.739	AMD1	FTM5	
hsa-m R-6869-5p	-0.585	0.164	0.193	2.707	2.577	2.661	---		
hsa-m R-6749-5p	0.163	0.674	0.744	1.052	1.134	2.613	---		
hsa-m R-4515	-1.078	0.141	0.147	1.853	1.778	2.568	---		
hsa-m R-1915-3p	-0.487	0.310	0.076	1.759	2.056	2.534	BCL2		
hsa-m R-5006-5p	-0.633	-0.237	-0.533	1.759	2.013	2.520	---		
hsa-m R-6821-5p	-0.552	0.195	0.051	1.681	1.903	2.485	---		
hsa-m R-3135b		0.390	-0.195	1.849	2.086	2.423	---		
hsa-m R-6724-5p	-1.504	-0.307	-0.274	1.796	1.939	2.419	---		
hsa-m R-6740-5p	-0.730	0.148	0.045	1.087	1.041	2.377	---		
hsa-m R-2861	-0.632	0.034	0.163	1.735	2.372	2.214	---		
hsa-m R-5001-5p	0.069	0.072	0.072	1.429	2.260	1.917	---		
hsa-m R-1202	0.116	0.436	0.519	0.681	0.894	2.232	GRM4		
hsa-m R-3198	-0.917	-0.133	-0.118	1.839	1.595	2.225	---		
hsa-m R-638	-0.477	-0.236	0.097	1.623	2.221	2.213	OSCP1	SP2	SOX2
hsa-m R-6800-5p	-0.288	0.327	0.062	1.874	2.065	2.188	---		
hsa-m R-6780b-5p	-0.625	0.280	0.292	1.230	1.132	2.158	---		
hsa-m R-494-3p	-0.588	0.551	0.182	1.050	1.368	2.117	PTEN	CDK6	ARNTL
hsa-m R-1268b	-0.300	0.145	0.138	1.665	2.046	2.111	---		
hsa-m R-6879-5p	-0.651	0.033	0.057	1.425	1.204	2.102	---		
hsa-m R-7704	-0.359	0.158	0.158	1.722	2.025	2.065	---		
hsa-m R-4728-5p	-0.982	0.003	-0.072	1.392	1.499	2.048	---		
hsa-m R-4459	-0.729	-0.136	0.195	0.543	1.109	2.045	---		
hsa-m R-6089	-0.275	0.485	0.292	1.651	1.917	2.024	---		
hsa-m R-455-3p				-0.195	-1.646	-2.058	---		
hsa-m R-1260b	0.358	0.319	-0.245	-1.307	-0.861	-2.107	---		
hsa-m R-4763-3p	-2.129	-0.949	-0.290				---		
hsa-m R-1260a	0.105	-0.587	-0.643	-0.766	-0.843	-2.174	---		

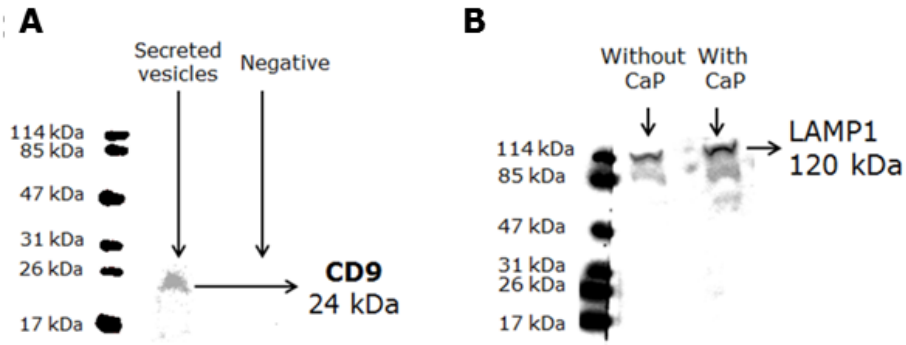


図4. ウェスタンブロット A.リン酸カルシウム粒子（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）で処理したRAW264.7細胞から分泌されたエクソソーム中のCD9の発現。ネガティブ、ミディアムだけ。B.リン酸カルシウム粒子（500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ）または未処理のRAW264.7細胞から分泌されたエクソソーム中のLAMP-1の発現。

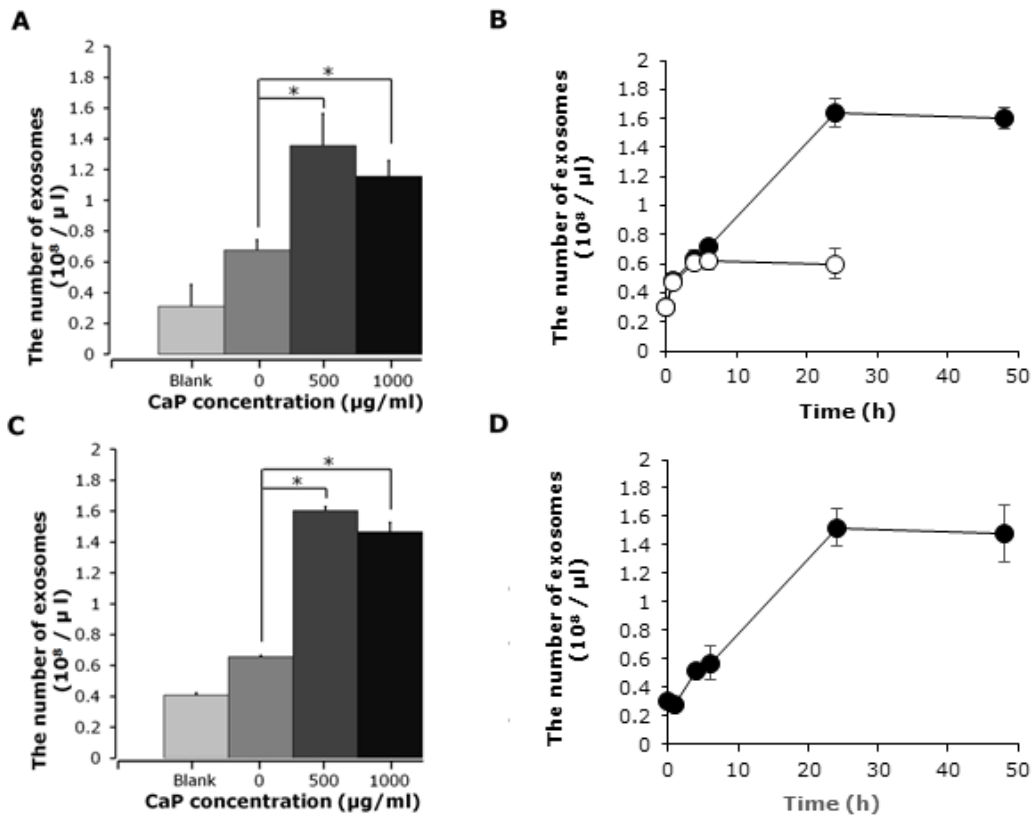


図5. エクソソームの分泌 A. 72時間の培養後にRAW264.7細胞から分泌されたエクソソームの数。空白、培地のみ。B.500 $\mu\text{g}/\text{L}$ のリン酸カルシウム粒子で処理（黒丸）および非処理（白丸）のRAW264.7細胞からのエクソソーム分泌の時間経過。C. 72時間の培養後にTHP-1細胞から分泌されたエクソソームの数。B.500 $\mu\text{g}/\text{L}$ のリン酸カルシウム粒子で処理したTHP-1細胞からのエクソソーム分泌の時間経過。

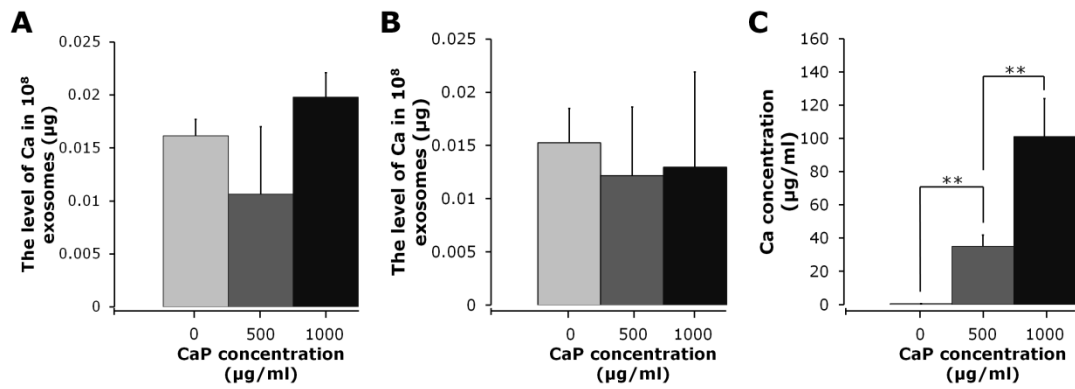


図 6. エキソソームおよび細胞におけるカルシウム含量 A.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/mL で処理した RAW264.7 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. B.リン酸カルシウム粒子の 0、500、および 1000µg/mL で処理した THP-1 細胞から分泌された 1×10^8 個のエキソソーム中のカルシウムの量. C. 0、500、および 1000µg/mL のリン酸カルシウム粒子で 72 時間処理した RAW264.7 細胞のカルシウムの量.

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
研究協力者 伊佐間 和郎 帝京平成大学薬学部 教授

本研究では、一次粒子径が異なり二次粒子径が同程度の NiO 及び Ni 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。我々はこれまで NiO ナノマテリアルについて、遊星ボールミル型湿式ナノ粉碎機を用いた一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製法を開発し、NiO ナノマテリアルの細胞毒性に対する二次粒子径サイズの影響評価を行ってきた。本研究ではその調製法を利用し、2 種類の NiO ナノマテリアル (NiO-Sigma 及び NiO-Alfa) 及び 1 種類のニッケルナノマテリアル (Ni-Alfa) の計 3 種類を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。試験に先立ち、各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用した Ni-Alfa 表面は酸化皮膜に覆われていることを確認し、酸化ニッケルと同等として扱った。そして、φ0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、10%FBS-MEM 培地中で一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。このナノマテリアル懸濁液について細胞毒性試験を実施したところ、Ni-Alfa の方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、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。懸濁液に溶出している Ni イオンについては、Ni-Alfa の方が NiO-Sigma よりも Ni イオン濃度がやや高い傾向を示した。Ni イオンの細胞毒性試験の結果から、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。一方で、先行研究で細胞毒性に違いが認められている二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、懸濁液中の Ni イオン濃度には差は認められなかった。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

分野の製品に使用されてきた。

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

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ていない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、①状態（粒子径・粒径分布・凝集体・形状）、②材料（化学組成・結晶性・表面組成・純度）、③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量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砕機の粉砕ボール径を変えることで、一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズの異なる懸濁液の調製法を開発した。さらに、それらの懸濁液について A549 細胞（ヒト肺胞基底上皮腺癌由来細胞）を用いた細胞毒性試験を実施し、二次粒子径サイズが大きいほど細胞毒性が強くなることや、その要因が NiO ナノマテリアルの細胞内への取り込み量に起因する可能性を明らかにしてきた。

一方で、前述のように金属酸化物ナノマテリアルの細胞毒性に一次粒子径サイズが影響していることが報告されている⁸⁾。そこで、本研究では NiO ナノマテリアルの A549 細胞に対する細胞毒性について、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液を作成し、一次粒子径サイズがその細胞毒性に及ぼす影響を評価することを目的とした。

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

B.2 ナノマテリアルの表面状態と形状観察

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

また、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。電子顕微鏡分析は東芝ナノアナリシ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¹⁰⁾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。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（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用いた。試験には、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、及び和光純薬工業製の塩化ニッケル六水和物を用いた。

始めに、A549 細胞を 96-well プレートに播種 (5×10^3 cell/well) し、24 時間後にナノマテリアルもしくは塩化ニッケルを含む液体培地を添加して 48 時間培養した。培地除去後、100 μ L 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°C、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。

B.5 培地懸濁液中の Ni イオン濃度測定

NiO-sigma 及び Ni-alfa ナノマテリアルの 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.1 mg/mL) について、調製直後及び 37°C で 24 時間インキュベートしたものについて Ni イオン濃度を測定した。また、先行研究¹⁰⁾で細胞毒性試験を実施した一次粒子径サイズが同じで二次粒子径サイズが異なる NiO-sigma ナノマテリアル懸濁液 (懸濁原液の調製濃度 10 mg/mL) についても、比較検討のため、培地中の Ni イオン濃度を測定した。

金属イオン濃度測定の前処理として、懸濁原液及び 10%FBS-MEM 懸濁液を冷却超遠心機 (himac CP65 β 、日立工機製) にてアングルローター (P70AT2) を用いて、20°C、50000 rpm (約 170000 \times g) で 1 時間遠心した。その上清 0.5 mL を採取し、5%硝酸水溶液 4.5 mL を加えて試験溶液とした。なお、5%硝酸水溶液は、和光純薬工業製の有害金属測定用硝酸を Milli-Q 水で希釈して調製した。超遠心処理により得られた試験溶液を、5%硝酸水溶液により適切な濃度に希釈した後に、孔径 0.45 μm のメンブレンフィルター (ザルトリウス) を用いてろ過してから金属イオン濃度を測定した。金属イオン濃度の測定には、誘導結合プラズマ質量分析計 (Inductively Coupled Plasma Mass spectrometry: ICP-MS) を用いた。また、金属酸化物ナノマテリアルを含まない 10%FBS-MEM について、同様の操作を行ったものを対照試料と

して測定した。試験は 4 連 (n=4) で実施した。

ICP-MS には Agilent 7500ce (Agilent Technologies, Inc.) を用いた。測定条件は、高周波出力: 1500W、プラズマガス: Ar 15 L/min、キャリアガス: Ar 0.7 L/min、メイクアップガス: 0.33 L/min、コリジョンガス: He 5mL/min、サンプリング位置: 8 mm、スプレーチャンバー温度: 2°C、積分時間 0.1 sec/element、測定回数: 3 times とした。Ni の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を、5%硝酸溶液で段階希釈し標準溶液とした。また、Ag の 1000 mg/L 標準液 (和光純薬工業製) を 5%硝酸で 5 $\mu\text{g/L}$ に希釈したものを内部標準液として用いた。Ni 及び Ag の測定質量電荷比 (m/z) は、60 及び 107 とした。Ni のバックグラウンド濃度は、0.536 $\mu\text{g/L}$ であった。

C. 結果及び考察

C.1 ナノマテリアルの表面状態と形状観察

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

NiO-Sigma の TEM 画像を図 2 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 3 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 4 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 各ナノマテリアル懸濁液中の二次粒子径の平均粒子径及び粒径分布

各ナノマテリアル懸濁原液の作製にあたって、NiO-Sigma を用いた先行研究条件¹⁰⁾ (10 mg/mL での調製)を試みた。その結果、NiO-Alfa 及び Ni-Alfa の各ナノマテリアル懸濁液は調製後、速やかに凝集し試験に供試できなかった。そこで、ナノマテリアル濃度を変えて検討した結果、Ni-Alfa については 1 mg/mL で懸濁液の調製が可能であった。一方、NiO-Alfa については、細胞毒性試験等に安定して使用出来得る濃度での調製ができなかった。NiO-Sigma 及び Ni-Alfa について、1 mg/mL で調製した懸濁原液中ナノマテリアル粒子の平均粒子径を表 2 に、粒径分布を図 5 にそれぞれ示した。

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa は、どちらについてもこれまでの研究と同様に、粉碎に用いるジルコニウムボール径が小さくなるほど、懸濁原液中ナノマテリアルの二次粒子の平均粒子径が小さくなる傾向が認められた。また、粒径分布についてもジルコニウムボール径が小さくなるほど、散乱強度分布及び個数分布共にピークが粒径の小さい側に分布していた。このように、NiO-Sigma だけでなく Ni-Alfa についてもナノマテリアルの二次粒子径サイズが異なる懸濁液の作製できた。

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁原液 (1 mg/mL) について、10%FBS-MEM にて 0.2 mg/mL に希釈し、平均粒子径及び粒径分

布への影響を検討した (表 2 及び図 6)。全ての懸濁液で懸濁原液よりもナノマテリアルの平均粒子径は大きくなり、10%FBS-MEM による凝集の影響が考えられた。ただし、その平均粒子径は懸濁原液と同様に粉碎に用いたジルコニウムボール径が小さくなるにつれて小さくなる傾向を示した。一方、粒径分布では散乱強度分布で NiO-Sigma 及び Ni-Alfa とともにピークが一部重なる傾向が認められた。また、個数分布でも Ni-Alfa では $\phi 0.1$ mm と $\phi 0.5$ mm でピークが重なっていた。

次に、10%FBS-MEM で希釈して調製した懸濁液を 37°C で一日静置した後のナノマテリアルの平均粒子径及び粒径分布を表 2 及び図 7 に示した。懸濁液中ナノマテリアルの平均粒子径は NiO-Sigma では $\phi 0.05$ mm で若干小さくなり、その他は若干大きくなる傾向を示した。一方、Ni-Alfa では一日後のほうが全て平均粒子径は小さくなり、その変化も NiO-Sigma よりも大きかった。ただし、その平均粒子径は粉碎に用いたジルコニウムボール径に応じた傾向を維持していた。また、粒径分布では Ni-Alfa の個数分布で調製直後と同様に $\phi 0.1$ mm と $\phi 0.5$ mm でピークが重なっていた。

本研究では、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の調製を目的としている。そこで、平均粒子径が同程度のジルコニアボール径 $\phi 0.05$ mm で調製された、NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の 10%FBS-MEM 懸濁液について、粒径分布を比較してみた (図 8)。その結果、散乱強度分布及び個数分布共にほぼピークが一致しており、ナノマテリアルの一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。

C.3 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 9 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かった。

次に、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いて調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa の細胞毒性試験の結果を比較した (図 10)。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た。

C.4. 培地懸濁液中の Ni イオン濃度

NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 濃度を 0.1 mg/mL に調製した 10%FBS-MEM 培地懸濁液中の Ni イオン濃度を表 3 に示した。NiO-Sigma 懸濁液中の Ni イオン濃度は 2.2 ~ 4.2 µg/mL (直後) 及び 6.1 ~ 8.4 µg/mL (1 日後) で溶出率は 2.8 ~ 5.4% (直後) 及び 7.8 ~ 11% (1 日後) であった。一方、Ni-Alfa 懸濁液中の Ni イオン濃度は 13 ~ 18 µg/mL (直後) 及び 23 ~ 25 µg/mL (1 日後) で溶出率は 13 ~ 18% (直後) 及び 23 ~ 25% (1 日後) であった。なお、ナノマテリアル無しで同じ操作を行ったブランク試料中の Ni イオン濃度は、定量下限値以下 ~ 0.15 µg/mL であった。

調製直後と 1 日後では、どちらの懸濁液でも 1 日後の方が Ni イオン濃度は高く、培地中で継時的に Ni イオンが溶出していることが明らかとなった。NiO-Sigma 懸濁液と Ni-Alfa 懸濁液では、後者の方が Ni

イオン濃度はやや高い傾向を示した。これは、Ni-Alfa の方が一次粒子径が小さいため、全体の表面積が大きくなり溶出しやすかったのではないかと推察された。

先行研究¹⁰⁾条件 (懸濁原液の調製濃度: 10 mg/mL) における NiO-Sigma 懸濁液の Ni イオン濃度を表 4 に示した。調製直後の Ni イオン濃度は 0.82 ~ 19 µg/mL で溶出率は 1.0 ~ 24% であった。また、調製から 1 日後では Ni イオン濃度は 3.3 ~ 36 µg/mL で溶出率は 4.2 ~ 46% であった。懸濁液中の NiO-Sigma 濃度が高くなるほど、懸濁液中に溶出した Ni イオン濃度も高くなっていった。一方で、一次粒子径が同じで二次粒子径サイズの異なる各ナノマテリアル懸濁液について、ナノマテリアルの濃度が同じ懸濁液同士を比較すると、Ni イオン濃度に差は認められなかった。

C.5 細胞毒性と一次粒子径サイズ及び Ni イオン濃度について

本研究では、径が 0.05 mm のジルコニアボールを用いることで、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。そして、一次粒子径サイズが小さいと細胞毒性が強い可能性が示唆された。この懸濁液中の Ni イオン濃度を比較すると、前述のように一次粒子径が小さい Ni-Alfa の方が Ni イオン濃度は高い傾向を示した (表 3)。また、Ni イオンそのものの細胞毒性を評価したところ、IC₅₀ 値は 43 µg/mL であった (図 11)。そのため、Ni イオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられた。しかしながら、NiO-Sigma の二次粒子径サイズの異なる懸濁液では、細胞毒性には違いが認められているが¹⁰⁾、懸濁液中の Ni イオン濃度に差は認められなかった (表 4 及び図 12)。そのため、一連の細胞毒性について、溶出した Ni イオンの影響だけでなく、各ナノマ

テリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

D. まとめ

本研究では先行研究でのナノマテリアル懸濁液調製法を利用し、2種類のNiOナノマテリアル(NiO-Sigma及びNiO-Alfa)及び1種類のニッケルナノマテリアル(Ni-Alfa)の計3種類を用いて、一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液の作製を試みた。各ナノマテリアルの表面状態及び形状等を観察し、試験に使用したNi-Alfa表面は酸化皮膜に覆われていることを確認した。φ0.05 mmのジルコニアボールで調製したNiO-Sigma及びNi-Alfaについて、10%FBS-MEM培地中で一次粒子径サイズが異なり二次粒子径サイズが同程度の懸濁液が調製できた。このナノマテリアル懸濁液について細胞毒性試験を実施したところ、Ni-Alfaの方が細胞毒性はやや強い傾向を示し、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。懸濁液に溶出しているNiイオンについては、Ni-Alfaの方がNiO-SigmaよりもNiイオン濃度がやや高い傾向を示した。Niイオンの細胞毒性試験の結果から、Niイオンの溶出が細胞毒性に影響している可能性が考えられたが、先行研究で細胞毒性に違いが認められている、二次粒子径サイズの異なるNiO-Sigma懸濁液では、懸濁液中のNiイオン濃度には差は認められなかった。そのため、一連の細胞毒性について、溶出したNiイオンの影響だけでなく、各ナノマテリアルの細胞への取り込み量も影響しているものと考えられた。

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) R.W. Whatmore. Nanotechnology - what is it? Should we be worried? *Occup. Med.*, 56, 295-299, 2006.
- 2) M. Ema, N. Kobayashi, M. Naya, S. Hanai, J. Nakanishi. Reproductive and developmental toxicity studies of manufactured nanomaterials. *Reprod. Toxicol.*, 30, 343-352, 2010.
- 3) C.W. Schmidt. Nanotechnology-related environment, health, and safety research: examining the national strategy, *Environ. Health Perspect.*, 117, A158-A161, 2009.
- 4) A. Dhawan, V. Sharma. Toxicity assessment of nanomaterials: methods and challenges, *Anal. Bioanal. Chem.*, 398, 589-605, 2010.
- 5) D.R. Boverhof, R.N. David. 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) H. Yuan, F. Gao, Z. Zhang, L. Miao, R. Yu, H. Zhao, M. 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) N. Kobayashi, M. Naya, S. Endoh, J. Maru, K. Yamamoto. 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、酒井恵子、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総合報告書 (H23-化学-一般-006)

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, 134, 33-41, 2016.

G.2 学会発表

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

cellular responses in THP-1 cells, 55th Annual Meeting of the Society of Toxicology, New Orleans, USA, March, 2016

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. A. Miyajima-Tabata, T. Kawakami, K. Komoriya, R. Kato, H. Haishima, K. Isama. Effects of different secondary particle sized nickel oxide nanomaterials on cytotoxicity and immune responses. EUROTOX 2017, Bratislava, Slovak, Sep., 2017
6. 宮島敦子、河上強志、小森谷薫、加藤玲子、薮島由二、伊佐間和郎. 物理化学的性質の異なる酸化亜鉛ナノマテリアルに対する THP-1 の細胞応答, 日本薬学会第 138 年会, 2018 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

H.1 特許取得

なし

H.2 実用新案登録

なし

H.3 その他

なし

表1. 実験に用いた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 (μm)	外観(色) ^a
酸化ニッケル	ND-Sigma	Sigma-Aldrich	< 50	黒色
	ND-Alpha	Alpha Aesar	100	緑色
ニッケル	Ni-Alpha	Alpha 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^a

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

表3. ND-S gma及びNi-A lfa懸濁液 (0.1 mg/mL) 中のNiイオン濃度及び溶出率

ナノマテリアル ^a		直後		1日後 ^b	
		Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)	平均値	溶出率 (%)
ND-S gma	(ϕ 0.05 mm)	4.2 \pm 0.15	5.4	8.4 \pm 0.27	11
	(ϕ 0.1 mm)	3.3 \pm 0.066	4.2	6.1 \pm 0.28	7.8
	(ϕ 0.5 mm)	2.2 \pm 0.17	2.8	7.0 \pm 0.46	8.9
Ni-A lfa	(ϕ 0.05 mm)	18 \pm 0.58	18	25 \pm 0.58	25
	(ϕ 0.1 mm)	16 \pm 0.84	16	23 \pm 1.6	23
	(ϕ 0.5 mm)	13 \pm 0.64	13	23 \pm 0.90	23

^a カッコ内は粉碎に用いたジルコニアボールの粒子径

^b 37°Cで一日放置後

表4. 先行研究¹⁰⁾条件におけるND-S gma懸濁液中のNiイオン濃度及び溶出率^a

粉碎ジルコニア ボール径	ナノマテリアル 濃度	直後		1日後 ^b	
		Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)	Niイオン濃度 ($\mu\text{g/mL}$)	溶出率 (%)
ϕ 0.5mm	0.05 mg/mL	0.82 \pm 0.084	1.0	3.9 \pm 0.27	5.0
	0.1 mg/mL	1.8 \pm 0.19	2.3	5.7 \pm 1.5	7.3
	0.2 mg/mL	4.5 \pm 0.15	5.7	14 \pm 0.85	18
	0.4 mg/mL	8.0 \pm 0.46	10	30 \pm 2.2	38
ϕ 0.1mm	0.05 mg/mL	1.5 \pm 0.71	1.9	3.3 \pm 0.50	4.2
	0.1 mg/mL	4.1 \pm 0.89	5.2	6.1 \pm 0.63	7.8
	0.2 mg/mL	5.3 \pm 0.77	6.8	11 \pm 0.95	14
	0.4 mg/mL	11 \pm 1.0	14	25 \pm 2.2	32
ϕ 0.05mm	0.05 mg/mL	2.4 \pm 0.043	3.1	4.7 \pm 0.41	6.0
	0.1 mg/mL	4.9 \pm 0.23	6.3	8.8 \pm 0.49	11
	0.2 mg/mL	8.0 \pm 0.35	10	18 \pm 1.6	23
	0.4 mg/mL	19 \pm 1.4	24	36 \pm 2.2	46

^a 懸濁原液濃度は10 mg/mL

^b 37°Cで一日放置後

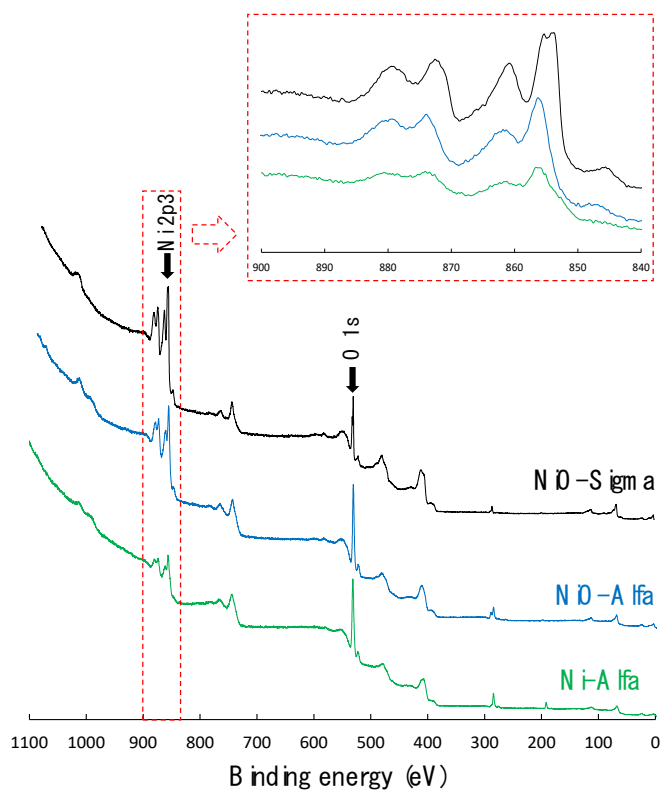
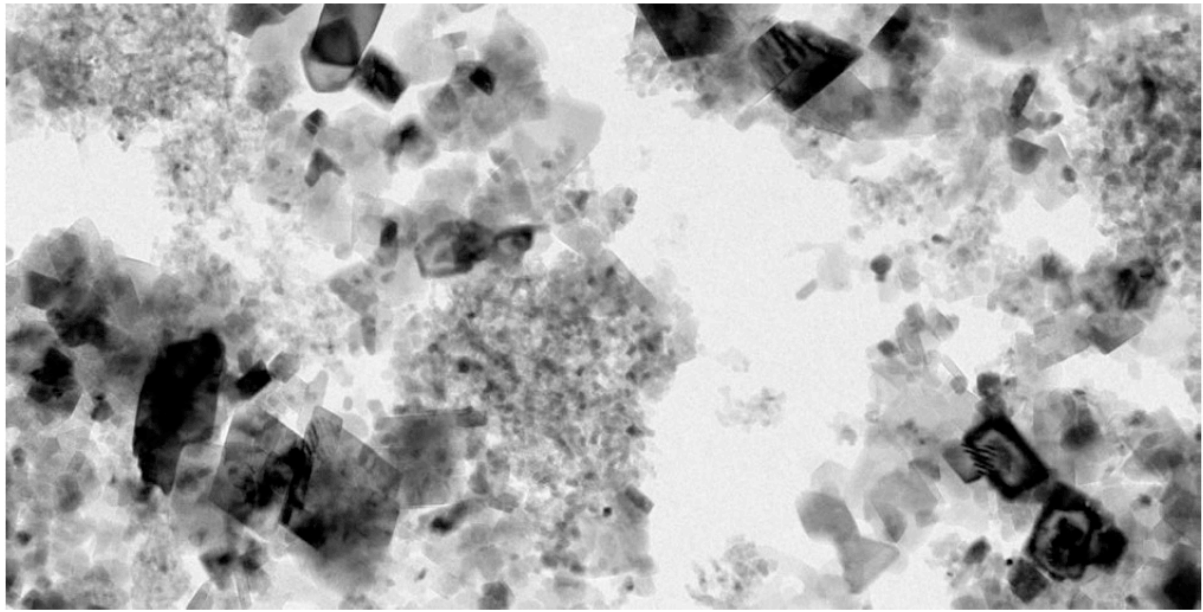
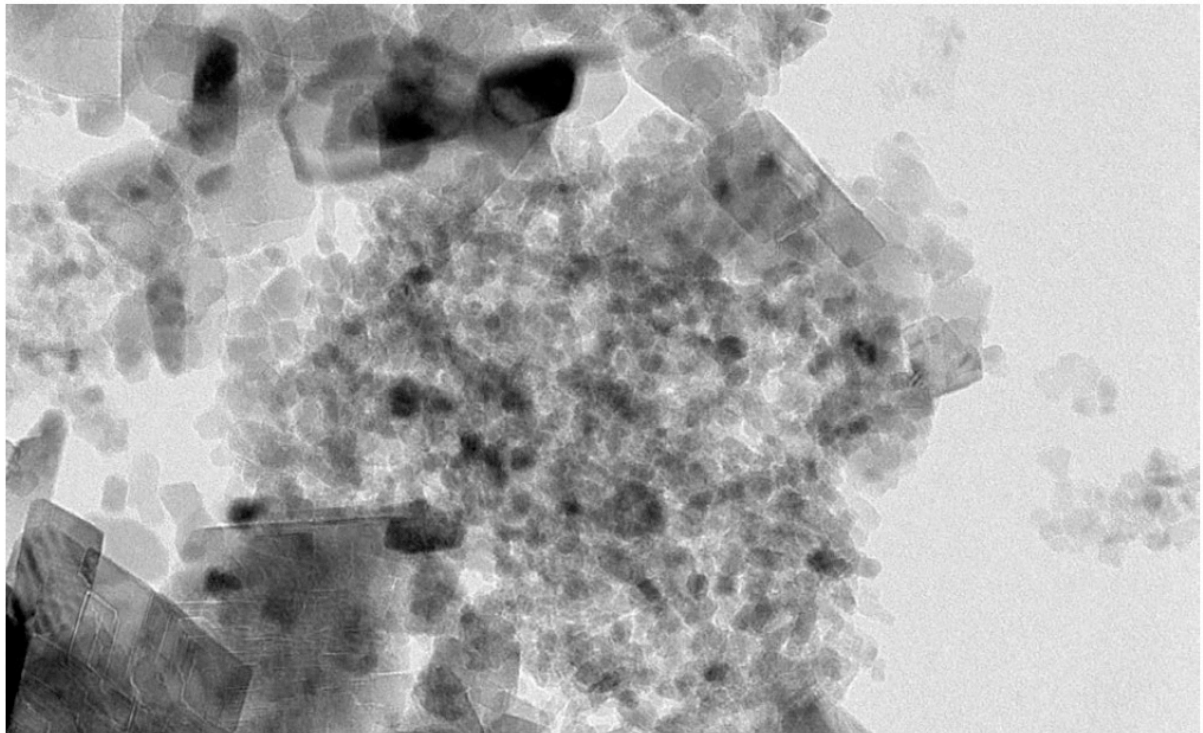


図 1. ナノマテリアルの XPS スペクトル



50nm



20 nm

図 2. NiO-Sigma の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

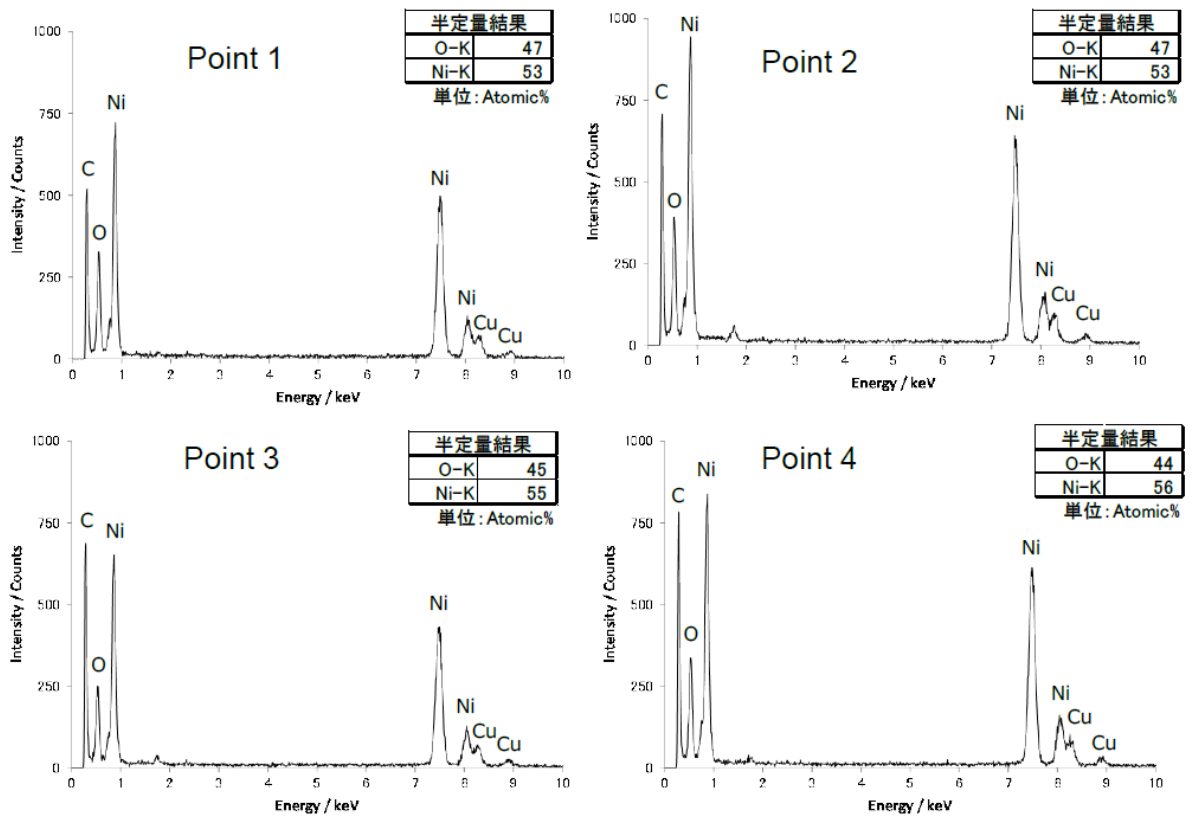
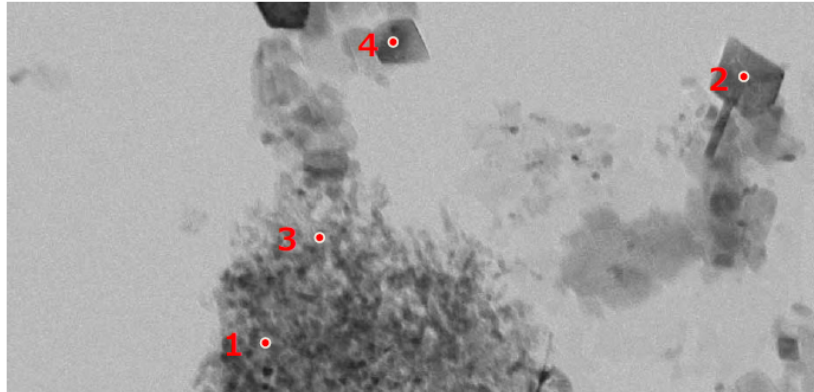
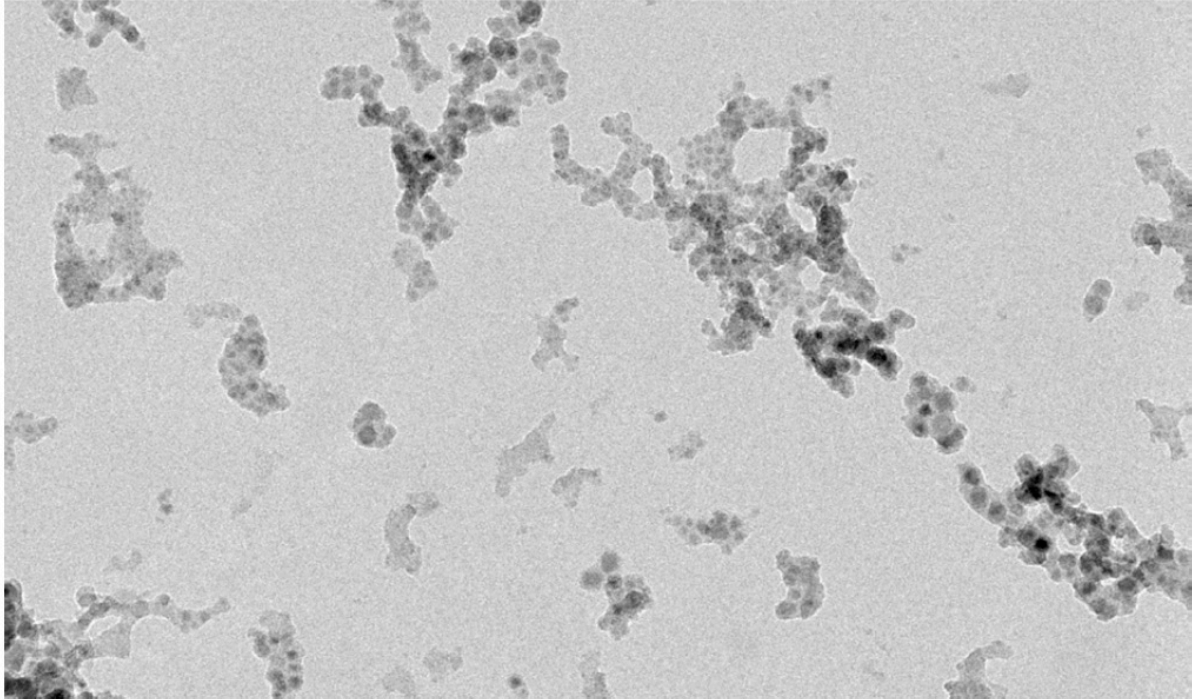
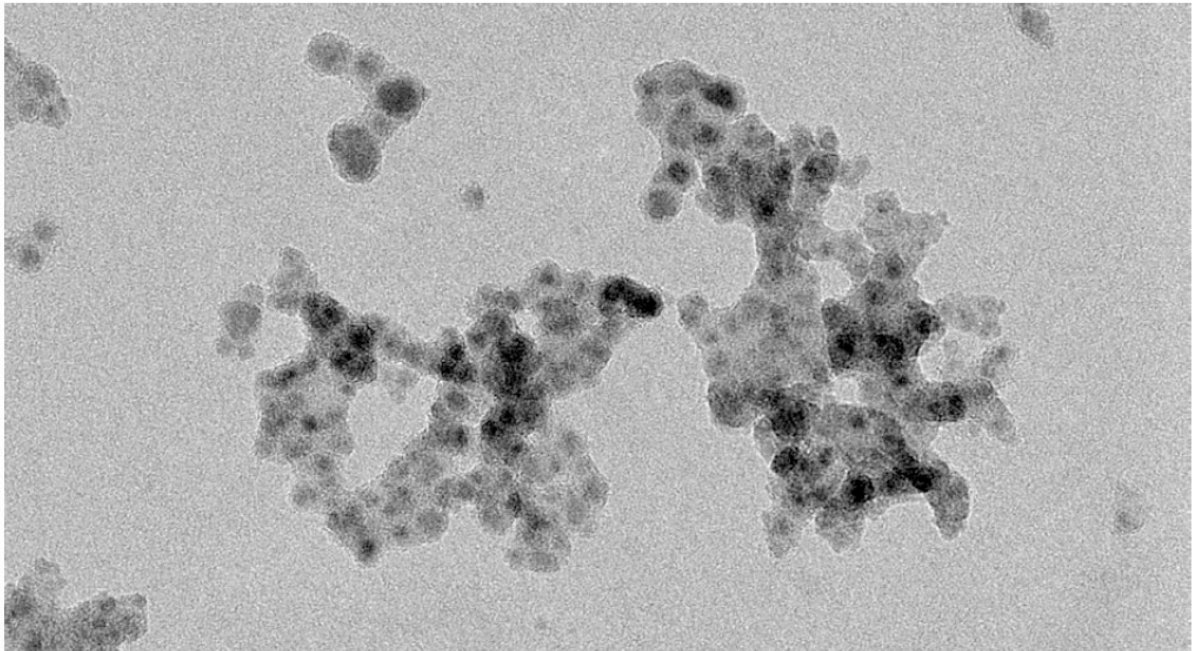


図 3. NiO-Sigma の大きさの異なる二次粒子の STEM-EDX 分析結果
(Cu は試料ホルダー起因のバックグラウンド)



50nm



20nm

図 4. Ni-Alfa の TEM 画像
(上 : 400 倍、下 : 1000 倍)

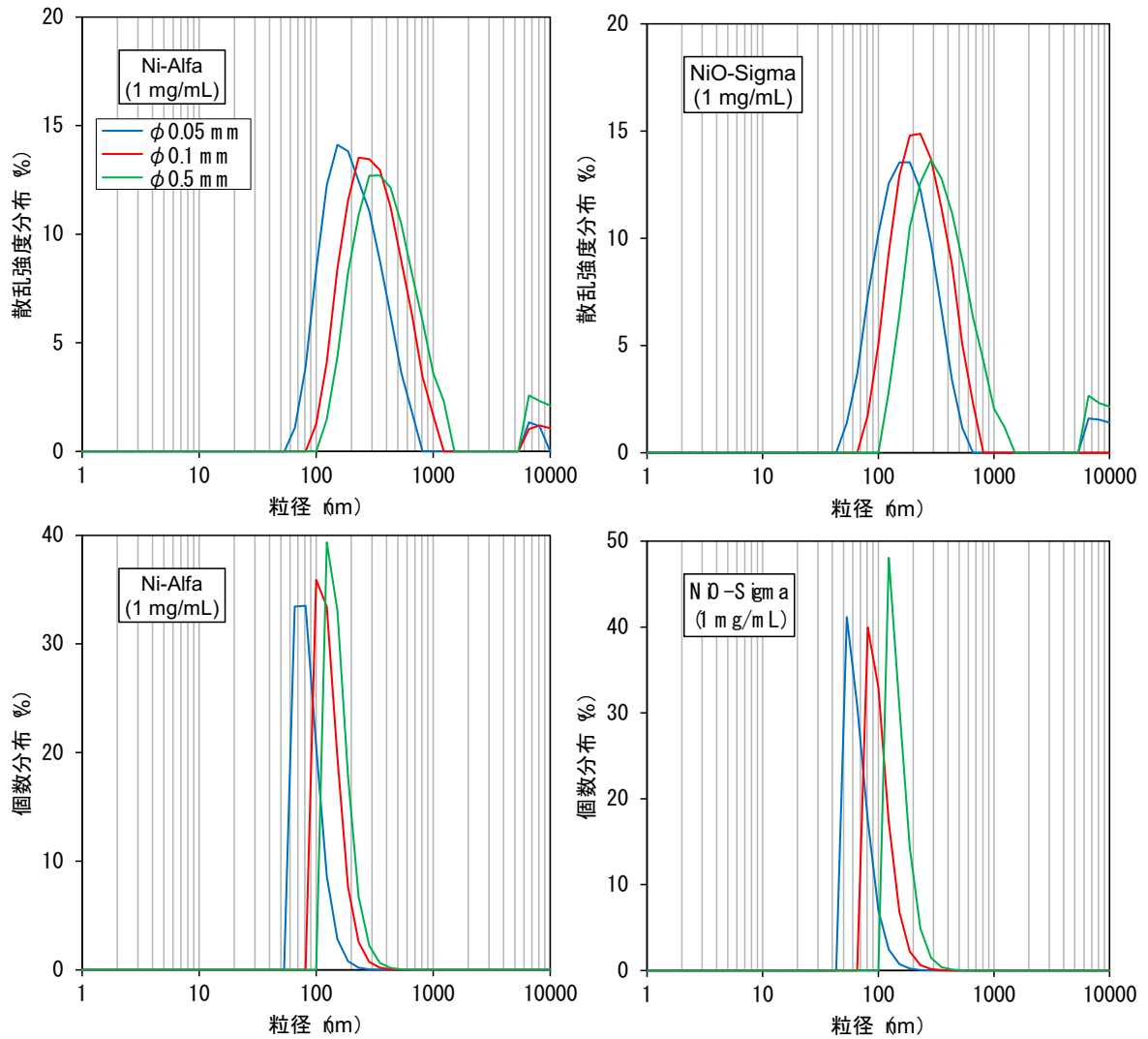


図 5.Ni-Alfa および Ni-Sigma 懸濁原液 (1 mg/mL) の粒径分布
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

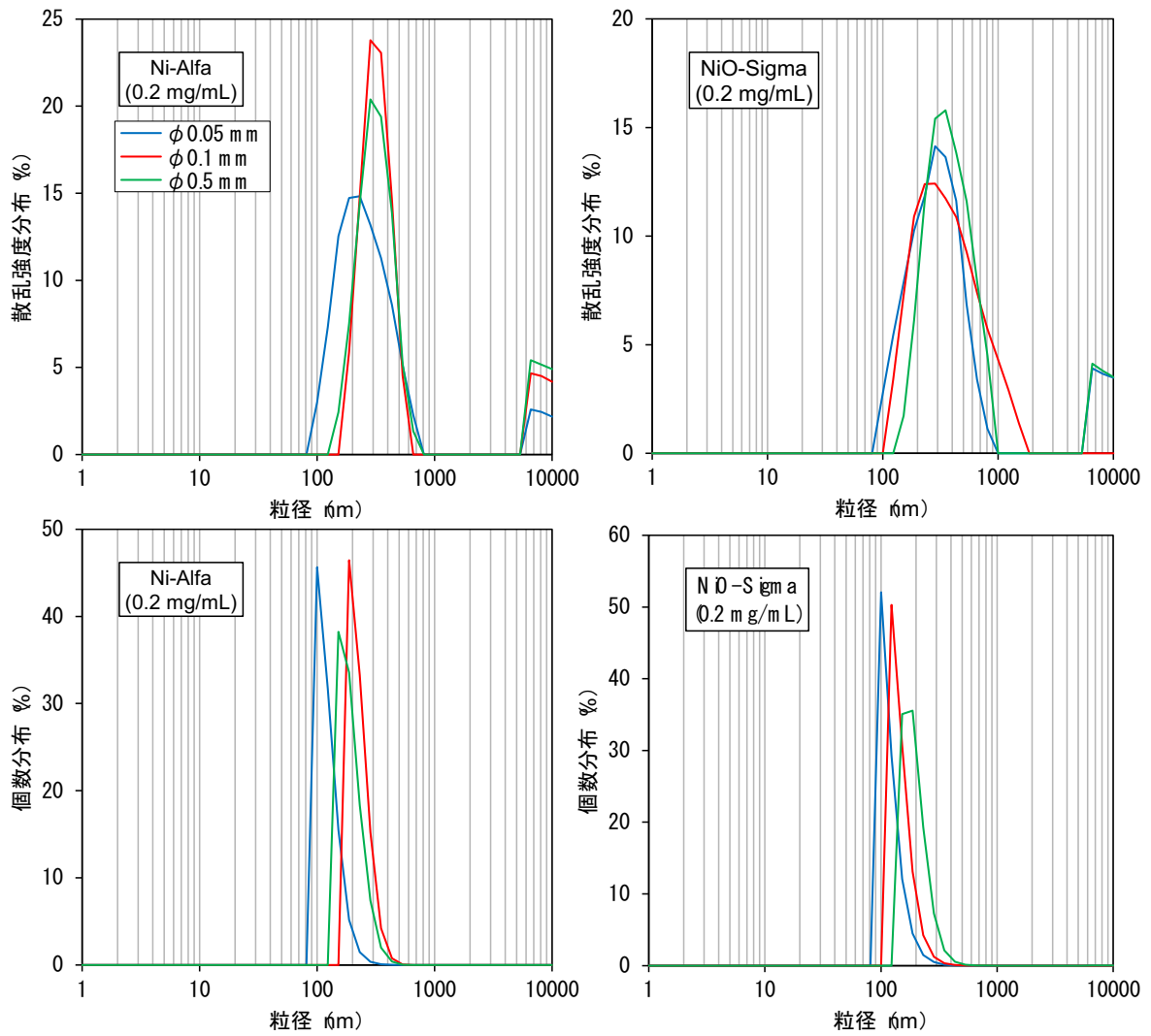


図 6. Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液 (0.2 mg/mL) の粒径分布
(上：散乱強度分布、下：個数分布)

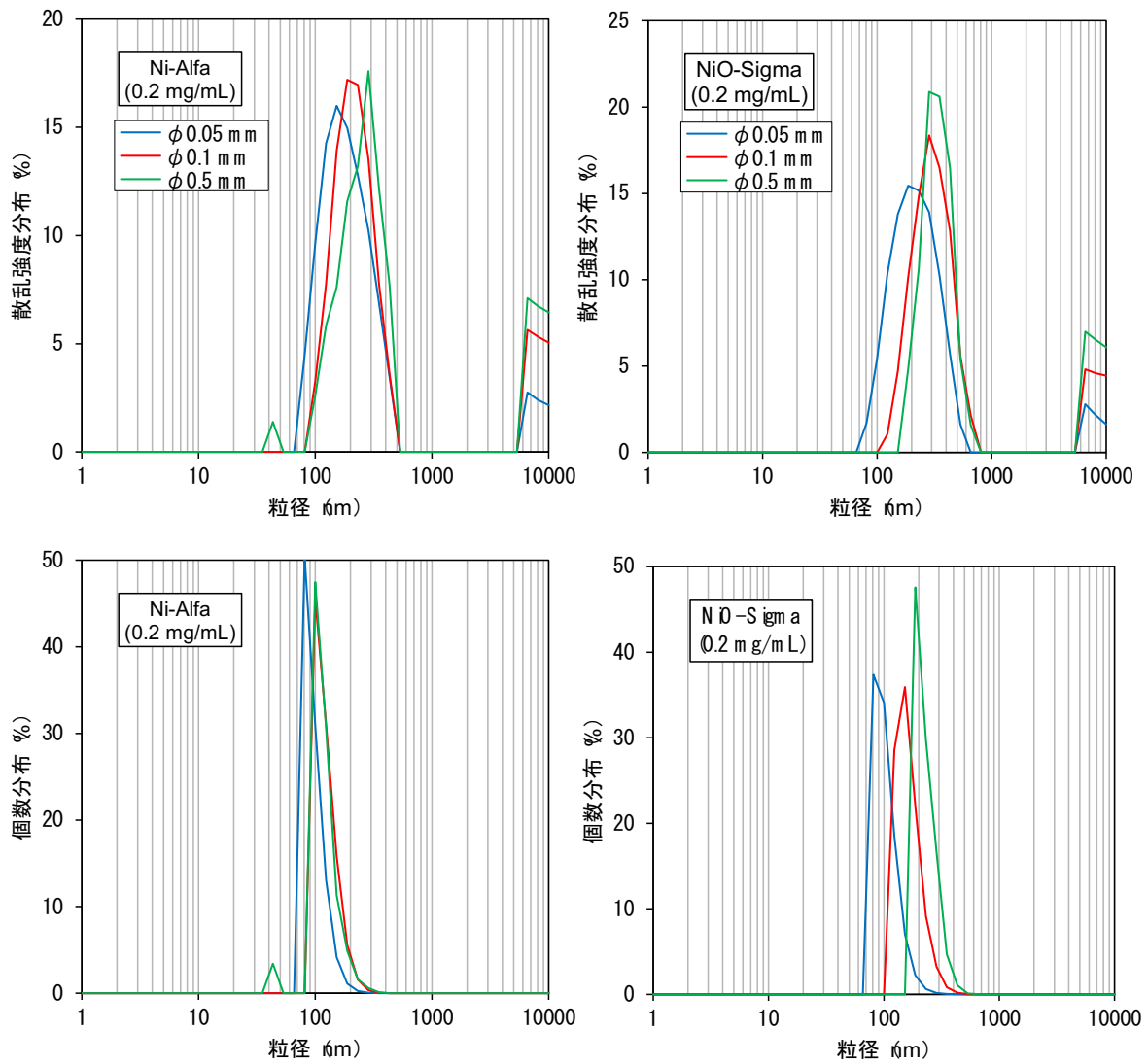


図 7. 37°Cで1日静置後のNi-AlfaおよびNiO-Sigmaの
10%FBS-MEM懸濁液(0.2 mg/mL)の粒径分布
(上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

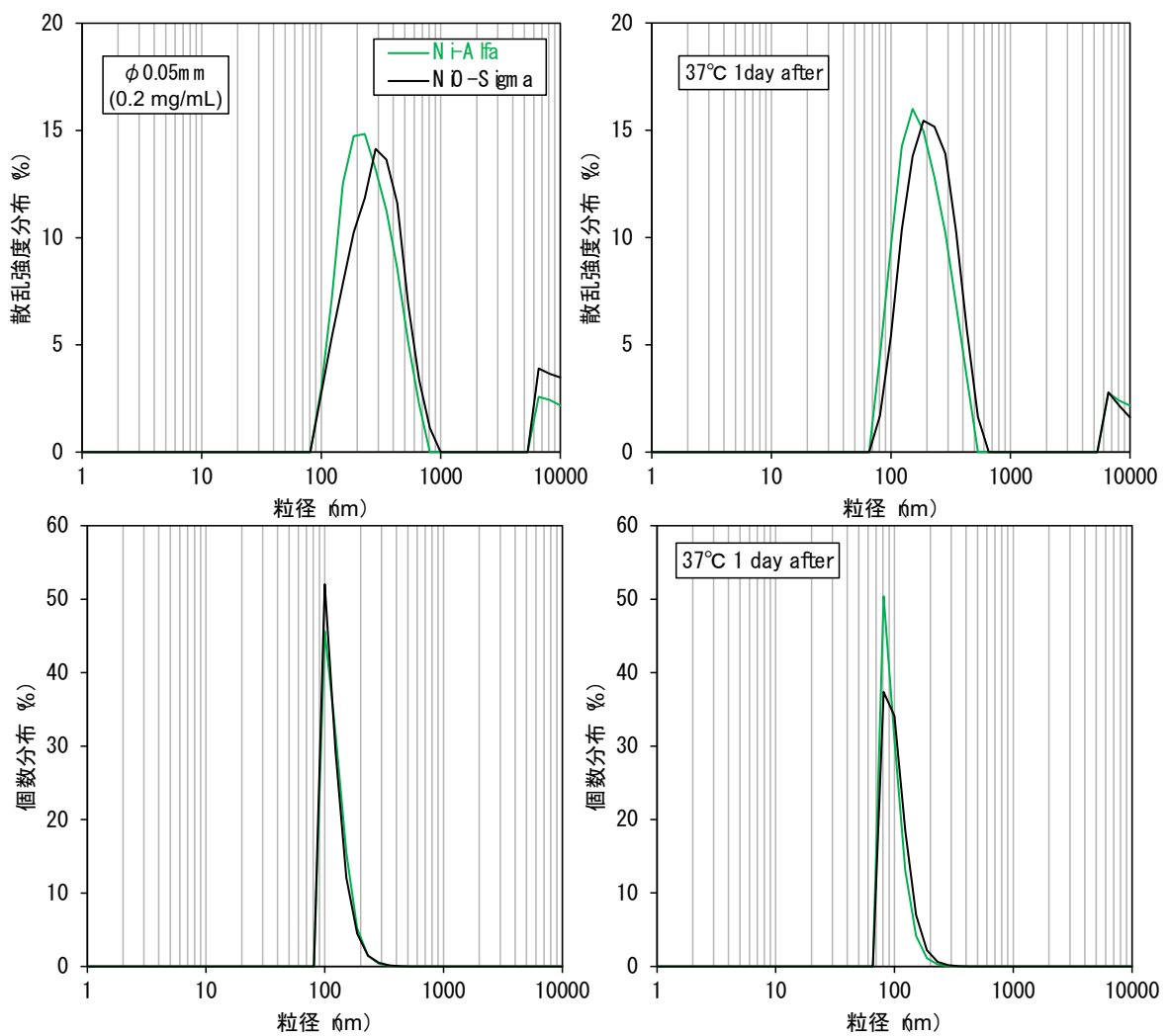


図 8. 粉碎に $\phi 0.05 \text{ mm}$ のジルコニアボールを用いた Ni-Alfa および NiO-Sigma の 10%FBS-MEM 懸濁液の調製後 (左) および 37°C で 1 日静置後 (右) の粒径分布 (上: 散乱強度分布、下: 個数分布)

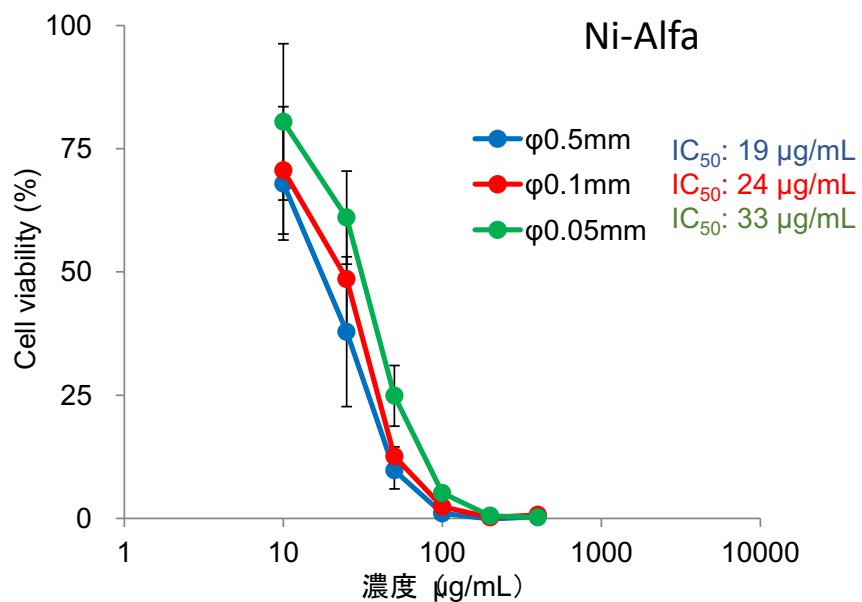
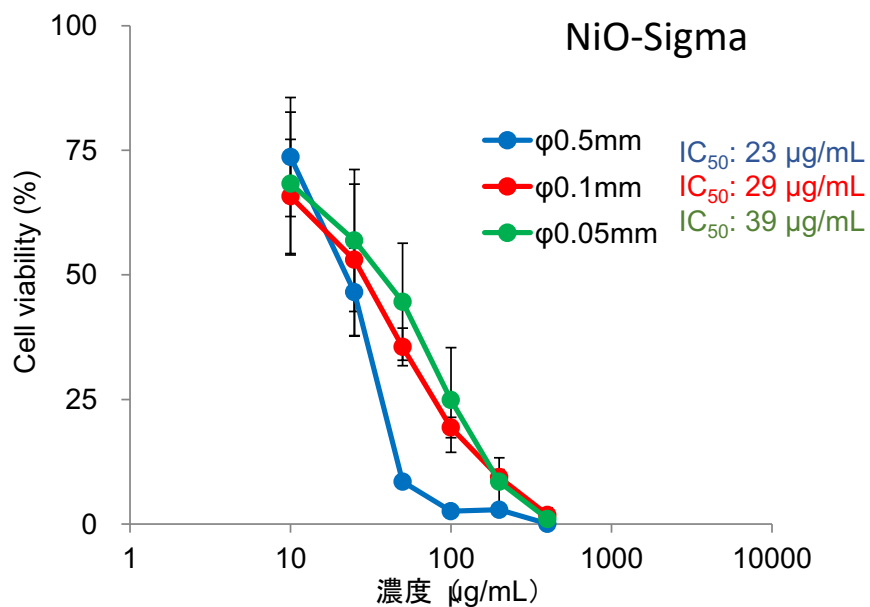


図 9. 径の異なるジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

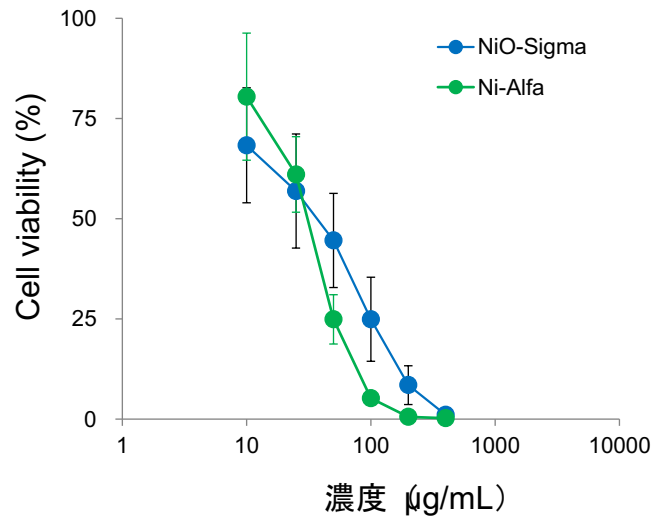


図 10. 径 0.05 mm のジルコニアボールで調製した NiO-Sigma 及び Ni-Alfa 懸濁液の細胞毒性曲線 (エラーバーは標準偏差)

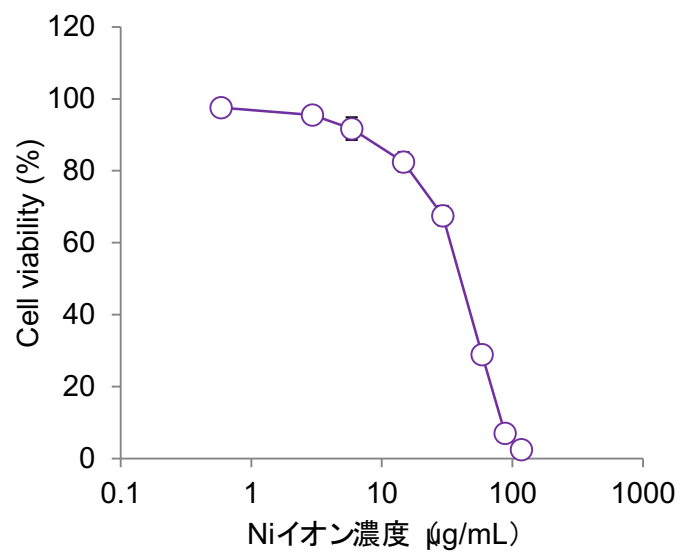


図 11. Ni イオンの細胞毒性試験結果

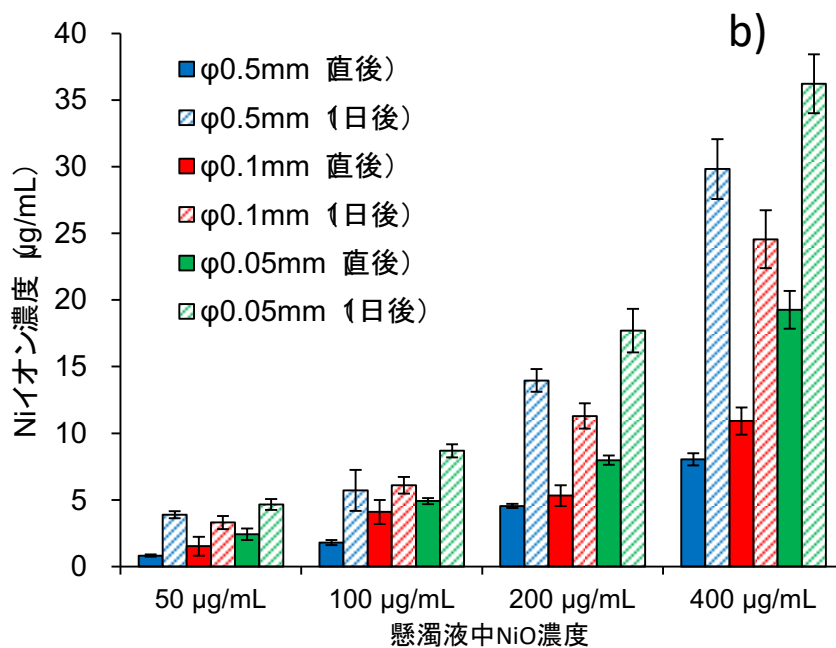
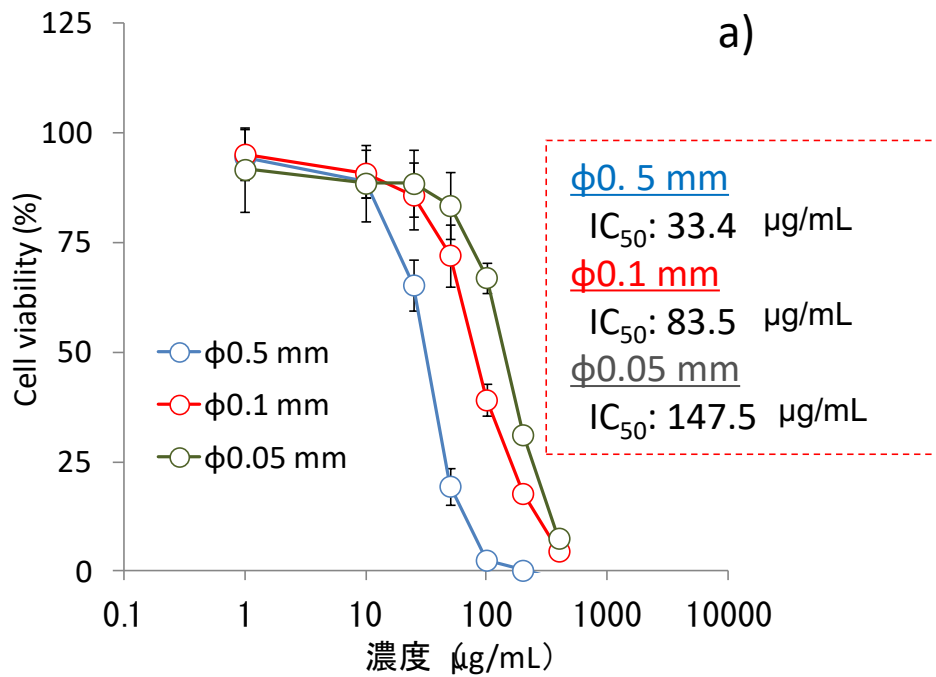


図 12. 二次粒子径の異なる NiO-Sigma 懸濁液を用いた a) 細胞毒性試験 (A549 細胞、48 時間 MTS アッセイ)¹⁰⁾及び b) 懸濁液中 Ni イオン濃度

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
A. Iwasaki, K. Sakai, K. Moriya, T. Sasaki, D. R. Keene, R. Akhtar, T. Miyazono, S. Yasumura, <u>M. Watanabe</u> , S. Morishita, T. Sakai.	Molecular mechanism responsible for fibronectin-controlled alterations in tissue stiffness in advanced chronic liver fibrogenesis.	J. Biol. Chem.	291	72-88	2016
T. Kondo, K. Mori, M. Hachisu, T. Yamazaki, D. Okamoto, <u>M. Watanabe</u> , K. Gonda, H. Tada, Y. Hamada, M. Takano, N. Ohuchi, Y. Ichiyangi.	AC magnetic susceptibility and heat dissipation by Mn1-xZnxFe ₂ O ₄ nanoparticles for hyperthermia treatment.	J. Appl. Phys.	117	17D157	2015
Y. Ito, H. Ishiguro, N. Kobayashi, H. Hasumi, <u>M. Watanabe</u> , M. Yao, H. Uemura.	Adipocyte-derived monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) promotes prostate cancer progression through the induction of MMP-2 activity. Prostate.	Prostate	75	1009-19	2015
D. Kami, M. Toyoda, <u>M. Watanabe</u> , S. Gojo.	Pleiotropic functions of magnetic nanoparticles for ex vivo gene transfer and cell transplantation therapy	Nano Based Drug Delivery, 2015, IAPC-OBP.	Chapter 22	547-55	2015
岩崎有由美、岡本大樹、遠藤宣弘、渡邊昌俊	前立腺癌治療へのナノ粒子の応用.	医学のあゆみ	252	303-8	2015
H. Tone, S. Yoshioka, H. Akiyama, A. Nishimura, M. Ichimura, M. Nakatani, T. Kiyono, M. Toyoda, <u>M. Watanabe</u> , A. Umezawa.	Embryoid body-explant outgrowth cultivation from induced pluripotent stem cells (iPSCs) in an automated closed platform.	BioMed Res. Int.	2016	7098987	2016

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	259	215	2016
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	259	255-60	2016
T. Amemiya, K. Shibata, Y. Itoh, K. Itoh, <u>M. Watanabe</u> .	Primordial oscillations in life: Direct observantion of glycolytic oscillations in individual HeLa cervical cancer cells.	Chaos	27	104602	2017
K. Kojima, S. Takahashi, S. Saito, Y. Endo, T. Nittami, T. Nozaki, R.C. Solti, <u>M. Watanabe</u> .	Combined effects of Fe ₃ O ₄ nanoparticles and chemotherapy agents on prostate cancer cells in vitro.	Appl. Sci.	8	134	2018
<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, T. Yogo.	Smart ferrofluid with quick gel transformation in tumors for MRI-guided local magnetic thermochemotherapy.	Adv. Funct. Mater.	26	1708-18	2016
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	1133-40	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, T. Murata, <u>K. Hayashi</u> , T. Yogo.	Effect of texturing on polarization switching dynamics in ferroelectric ceramics.	Appl. Phys. Lett.	108	012907	2016
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
<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

K. Hayashi, Y. Sato, H. Maruoka, W. Sakamoto, T. Yogo.	Organic-inorganic hybrid nanoparticles for tracking the same cells seamlessly at the cellular, tissue, and whole body levels.	ACS Biomater. Sci. & Engin.	3	1129-35	2017
M. Nakamura, K. Hayashi, H. Kubo, M. Harada, K. Izumi, Y. Tsuruo, T. Yogo.	Mesoscopic multimodal imaging provides new insight to tumor tissue evaluation: An example of macrophage imaging of hepatic tumor using organosilica nanoparticles.	Sci, Rep.	7	3953	2017
K. Hayashi, T. Maruhashi, W. Sakamoto, T. Yogo.	Organic-inorganic hybrid hollow nanoparticles suppress oxidative stress and repair damaged tissues for treatment of hepatic fibrosis.	Adv. Funct. Mater.	28	1706332	2018
K. Hayashi, S. Yamada, H. Hayashi, W. Sakamoto, T. Yogo.	Red blood cell-like particles with the ability to avoid lung and spleen accumulation for the treatment of liver fibrosis.	Biomater.	156	45-55	2018
H. Miki, S. Nakamura, A. Oda, H. Tenshin, J. Teramachi, M. Hiasa, A. Bat-Erdene, Y. Maeda, M. Oura, M. Takahashi, M. Iwasa, T. Harada, S. Fujii, K. Kurahashi, S. Yoshida, K. Kagawa, I. Endo, K. Aihara, M. Ikuo, K. Itoh, K. Hayashi, M. Nakamura, M. Abe.	Effective impairment of myeloma cells and their progenitors by hyperthermia.	Oncotarget	9	10307-16	2018

K. Ishikawa, T. Arifita, <u>K. Hayashi</u> , K. Tsuru.	Fabrication and evaluation of interconnected porous carbonate apatite from alpha tricalcium phosphate spheres.	J. Biomed. Mater. Res. Part B – Appl. Biomater.		doi: 10.1002/jbm.b.34117.	2018
M. Komiya, G. Fujii, S. Miyamoto, M. Takahashi, R. Ishigamori, W. Onuma, K. Ishino, <u>Y. Totsuka</u> , K. Fujimoto, M. Mutoh.	Suppressive effects of the NADPH oxidase inhibitor apocynin on intestinal tumorigenesis in obese KK-Ay and Apc mutant Min mice.	Cancer Sci.	106	1499-505	2015
S. Mimaki, <u>Y. Totsuka</u> , 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	37	817-26	2016
T. Kato, T. Toyooka, Y. Ibuki, S. Masuda, <u>M. Watanabe</u> , <u>Y. Totsuka</u> .	Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of Kaolin.	Genes Environ.	39	12	2017
N. Akiba, K. Shiizaki, Y. Matsushima, O. Endo, K. Inaba, <u>Y. Totsuka</u> .	Influence of GSH S-transferase on the mutagenicity induced by dichloromethane and 1,2-dichloropropane.	Mutagenesis	32	455-62	2017
E. Fukai, H. Sato, <u>M.</u>	Establishment of an in vivo simulating co-culture	Cancer Sci.	109	1024-31	2018

<u>Watanabe, D.</u> <u>Nakae, Y.</u> <u>Totsuka.</u>	assay platform for genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes.				
T. Toyoda, <u>Y. Totsuka</u> , K. Matsushita, T. Morikawa, N. Miyoshi, K. Wakabayashi, K. Ogawa.	γ -H2AX formation in the urinary bladder of rats treated with two norharman derivatives obtained from o-toluidine and aniline.	J. Appl. Toxicol.	38	537-43	2018
Y. Nakagawa, A. Inomata, A. Ogata, <u>D. Nakae</u> .	Comparative effects of sulfhydryl compounds on target organellae, nuclei and mitochondria, of hydroxylated fullerene-induced cytotoxicity in isolated hepatocytes.	J. Appl. Toxicol.	35	1465-72	2015
J. Xu, D.B. Alexander, M. Figo, H. Hamano, S. Takahashi, T. Yokoyama, M. Kato, I. Usami, T. Tsubuyama, M. Tsutsumi, M. Tamura, T. Oguri, A. Nimi, Y. Hayashi, Y. Yokoyama, K. Tmegawa, K. Fukamachi, M. Futakuchi, Y. Sakai, M. Suzui, M. Kamijima, N. Hisanaga, T. Omori, A. Hirose, J. Kamio, <u>D. Nakae</u> , H. Tsuda.	Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos. A patient-based study.	Cancer Sci.	106	825-32	2015
T. Okubo, M. Hosaka, <u>D. Nakae</u> .	In vitro effects induced by diesel exhaust at an air-liquid interface in a human lung alveolar	Exp. Toxicol. Pathol.	67	383-8	2015

	carcinoma cell line A549.				
T. Fujitani, A. Inomata, A. Ogata, Y. Sakamoto, A. Hirose, T. Nishimura, R. Ikeda, <u>D. Nakae</u> .	Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice.	Toxicol. Rep.	2	1404-8	2015
多田幸恵、 高橋 博、湯 澤勝廣、安 藤 弘、久 保喜一、長 澤明道、矢 野範男、猪 又明子、 <u>中 江 大</u> 、栗田 雅行.	磁性ナノ粒子マグネタ イト気管内スプレー投 与によるラット肺病変 に及ぼすγ-オリザノー ルあるいはグリセロー ル投与の影響.	東京都健安研 セ研究年報	66	315-21	2015
田山邦昭、 坂本義光、 安藤 弘、海 鉦藤文、久 保喜一、高 橋 博、長澤 明道、湯澤 勝廣、小縣 昭夫、 <u>中江 大</u> 、猪又明 子、栗田雅 行.	M ナノ物質の腹腔内投 与によるマウス雄性生 殖器への影響.	東京都健安研 セ研究年報	66	323-9	2015
大久保智 子、保坂三	ヒト肺上皮由来細胞 A549 における有機酸ば	薬学雑誌	136	1433-8	2016

継、 <u>中江大</u> .	く露による細胞傷害に関する研究.				
K. Horibata, A. Ukai, A. Ogata, <u>D. Nakae</u> , 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.	39	4	2017
多田幸恵、 <u>中江大</u> 、北條 幹、湯澤勝廣、安藤 弘、久保喜一、長澤明道、海鉾藤文、長谷川悠子、鈴木俊也、猪又明子、守安貴子.	NNK イニシエートによる A/J マウスの肺における磁性ナノ粒子マグネタイト気管内投与の影響.	東京都健安研セ研究年報	68	277-84	2017
M. Usami, M. Takamatsu, S. Kazama, K. Mitsunaga, <u>A. Miyajima</u> , T. Irie, O. Doi,	Proteomic analysis of valproic-acid-induced embryotoxicity in cultured post-implantation rat embryos.	Fundam. Toxicol. Sci.	4	31-5	2018

T. Takizawa, T. Nagi, M. Sunouchi.					
<u>N. Hanagata</u> , H. Morita.	Calcium ions rescue human lung epithelial cells from the toxicity of zinc oxide nanoparticles.	J. Toxicol. Sci.	40	625-35	2015
L. Xu, M. Dan, A. Shao, X. Cheng, C. Zhang, R.A. Yokel, T. Takemura, N. <u>Hanagata</u> , M. Niwa, D. Watanabe.	Silver nanoparticles induce tight junction disruption and astrocyte neurotoxicity in a rat blood–brain barrier primary triple coculture model.	Int. J. Nanomed.	10	6105-19	2015
Y. Xu, Y. Zhu, X. Li, H. Morita, <u>N.</u> <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, <u>N.</u> <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, <u>N.</u>	Mesoporous silica nanoparticles capped with graphene quantum dots	Langmuir	33	591-9	2017

<u>Hanagata.</u>	for potential chemo–photothermal synergistic cancer therapy.				
X. Li, X. Wang, J. Zhang, <u>N. 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
松岡厚子、児玉幸夫、吉田 緑、伊佐間和郎、中嶋富士雄、井上 薫、 <u>河上強志</u> 、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,	134	33-41	2016