

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 9 月 1 日現在

機関番号：82629

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2015～2016

課題番号：15H06893

研究課題名(和文)二要素(取込み量+毒性)同時解析による新規ナノマテリアルリスク評価法の開発

研究課題名(英文)Development of new method for risk assessment of nanomaterials by concurrent analysis of uptake potential and toxicity using flowcytometer

研究代表者

豊岡 達士 (Toyooka, Tatsushi)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・産業毒性・生体影響研究グループ・任期付研究員

研究者番号：40423842

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：ナノマテリアルの健康リスク評価手法確立が国際的に緊喫な課題であることを背景に、これまでに、ナノ粒子の細胞内取込み量をフローサイトメーターの側方散乱光強度を指標に、Live cell のまま、迅速・簡易に評価できる *in vitro* の手法(SS法)を開発した。一方、当該SS法では取込み量は評価できても、実際にナノマテリアルを取込んだ細胞で、どのような毒性影響が生じているかは不明である。そこで、本研究ではSS法に、毒性反映指標を導入し、ナノマテリアルの細胞内取込み量に加えて、その毒性影響を同時解析できる新規ナノマテリアル評価手法の開発を行った。

研究成果の概要(英文)：Establishment of a health risk-assessment method for nanomaterials is an urgent issue internationally. So far, we have developed a method for measure the intracellular uptake of nanoparticles using the side scattered light of the flow cytometer. This method can quickly and easily evaluate uptake potential of nanoparticles. On the other hand, although the method can evaluate uptake potential of nanoparticles, it is unknown what type of toxic effect is occurred. Therefore, in this study, we tried to develop a new nanomaterial evaluation method that can simultaneously analyze its toxic effects in addition to the intracellular uptake of nanomaterials.

研究分野：遺伝毒性学

キーワード：遺伝毒性 ナノ毒性

1. 研究開始当初の背景

ナノマテリアルの健康リスク評価手法の確立が国際的に緊喫な課題であることを背景に、申請者はこれまでに、ナノ粒子の細胞内取込み量をフローサイトメーター (FCM) の側方散乱光 (Side-Scattered light) 強度を指標に、Live cell のまま、迅速・簡易に評価できる *in vitro* の手法 (SS 法) を開発した (図 1) (Environ. Sci. Technol. 2007)。本手法は、ナノ粒子の毒性影響研究を行う世界中の研究者らに使用されており (被引用回数 200 回ほど)、現在ではナノ粒子細胞内取込み量評価の標準的手法となっている (Methods Mol. Biol. 2012)。

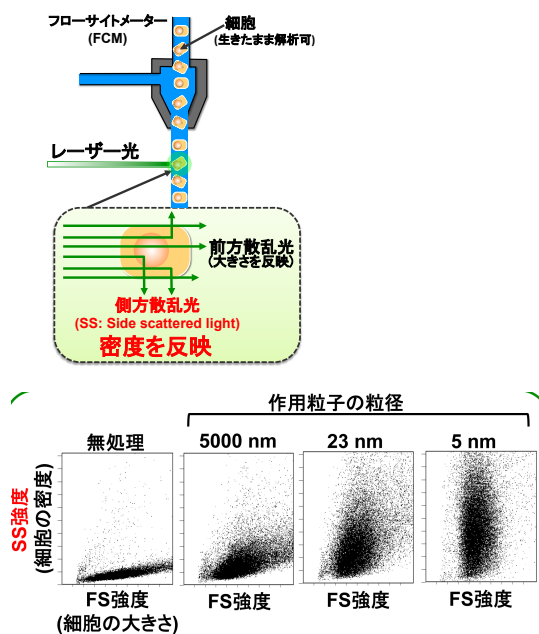


図 1 SS 法の概念

一方で、当該 SS 法では取込み量は評価できても、実際にナノマテリアルを取込んだ細胞で、どのような毒性影響が生じているかは不明である。また、取込み量が多くても毒性が低いナノマテリアル、逆に取込み量が少なくても毒性が高いナノマテリアルの評価 (取込み量に対する毒性のミスマッチ) には対応できず、取込み量評価のみではヒト健康影響に対するリスク評価には不十分である。そこで、本研究では SS 法に、毒性反映指標を導入し (細胞毒性、遺伝毒性、細胞内生理状態変化等を蛍光色素染色法や蛍光免疫染色法等)、ナノマテリアルの細胞内取込み量に加えて、その毒性影響を同時解析できる新規ナノマテリアル評価手法の開発に取り組む。

2. 研究の目的

ナノマテリアルの細胞内取込み量に加えて、その毒性影響を同時解析できる新規ナノマテリアル評価手法の開発を目的とする (図 2)。

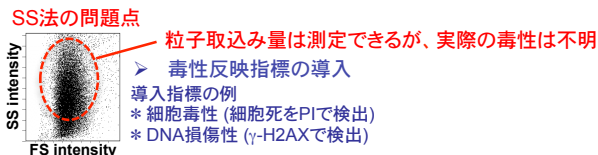


図 2 本研究の概念

3. 研究の方法

(a) 使用細胞

ナノ粒子ばく露における主要標的臓器として肺が予想されるため、本研究では肺細胞モデルである A549 細胞を使用した。すべての実験において対数増殖期の細胞を用いている。

(b) 研究に使用したナノ粒子

本研究で用いたナノ粒子は以下の通りであり、すべてシグマアルドリッチ社から入手した。括弧内のサイズは各ナノ粒子の一次粒径を示している。銀: Ag (<100nm), 酸化アルミニウム: Al₂O₃ (<50nm), 酸化ビスマス: Bi₂O₃ (90-210nm), 酸化セリウム: CeO₂ (<50nm), 酸化コバルト: Co₃O₄ (<50nm), 酸化クロム: Cr₂O₃ (<100nm), 酸化銅: CuO (<50nm), ダイヤモンド: Diamond (<10nm), 酸化エルビウム: Er₂O₃ (<100nm), 酸化鉄: Fe₃O₄ (50-100nm), 酸化ガドミウム: Gd₂O₃ (<100nm), 酸化ホロニウム: Ho₂O₃ (<100nm), 酸化インジウム: In₂O₃ (<100nm), 酸化ランタ: La₂O₃ (<100nm), 酸化マグネシウム: MgO (<50nm), 酸化モリブデン: Mo₃ (100nm), 酸化ネオジム: Nd₂O₃ (<100nm), 酸化ニッケル: NiO (<50nm), 酸化アンチモン: Sb₂O₃ (5nm; <250nm), 二酸化ケイ素: SiO₂ (10-20nm), 酸化サマリウム: Sm₂O₃ (<100nm), 酸化スズ: SnO₂ (<100nm), 酸化テルビウム: Tb₄O₇ (<100nm), 二酸化チタン: TiO₂ (anatase <25nm; brookite <100nm; rutile <100nm), 酸化タングステン: WO₃ (<100nm), 酸化イットルビウム: Yb₂O₃ (<100nm), Y₂O₃ (<50nm), 酸化亜鉛: ZnO (<50nm; <100nm), 酸化ジルコニウム: ZrO₂ (<100nm)

(c) ナノ粒子の作用

ナノ粒子を DMEM に 300 μg/mL となるように分散し、超音波処理後即座に細胞に作用した。

(d) 取込み量 + 細胞毒性の評価

ナノ粒子の作用後規定時間に細胞をトリプシンで回収、Propidium Iodide 染色を施し、フローサイトメータにて、細胞生存率と SS 強度を同時解析した。また、(取込み量) + (遺伝毒性: DNA 損傷性) の評価として、高感度 DNA 損傷マーカであるリン酸化ヒストン H2AX (蛍光免疫染色) と SS 強度を同時解析した。

なお、PI 染色による細胞生存率は作用 24 時間後、γ-H2AX による DNA 損傷性は作用 12 時間後に、ナノ粒子取込み量と同時に解析し

た。なお、ナノ粒子作用による γ -H2AXの誘導はウエスタンブロッティング法においても確認した。

4. 研究成果

従来からのSS法にて、約30種類のナノ粒子について細胞内取込み量を測定した(図3)。

図3 各種ナノ粒子の細胞内取込み量それぞれのFCMドットプロット図のSS intensityより、ナノ粒子の細胞内取込み量が少ない、中程度、多いグループに分類した。例えばCuO、Ag、TiO₂では、順に取込み量、少、中程度、多と分類された。この取込み量は必ずしもその一次粒径サイズとは一致しておらず、ナノ粒子の毒性を単純に一次粒径サイズと細胞取込み量のみで判断することは難しいことがわかる。

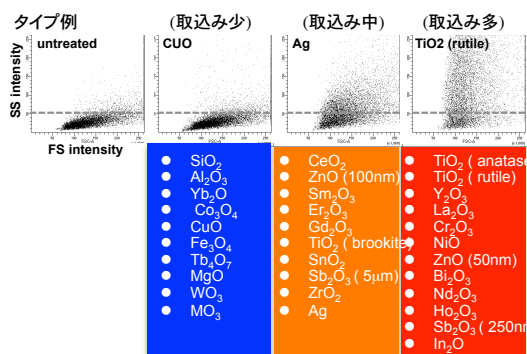


図3 各種ナノ粒子の細胞内取込み量

(b) 細胞取り込量と細胞毒性の同時解析

図4にナノ粒子の細胞内取込み量と細胞毒性の関係を同時解析した結果の例を示す。ドットプロット図に示す通り、「ナノ粒子の取り込み量が多く、毒性も高いもの(例: ZnO)」、「取り込み量が多いが毒性は低いもの(例: TiO₂ rutile)」、「取り込み量は少ないが毒性が高いもの(例: CuO)」が存在することが明らかとなり、細胞内取込み量と細胞毒性は必ずしも一致しないことが示唆された。

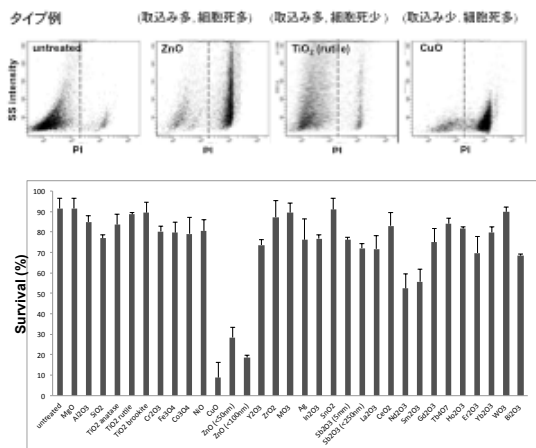
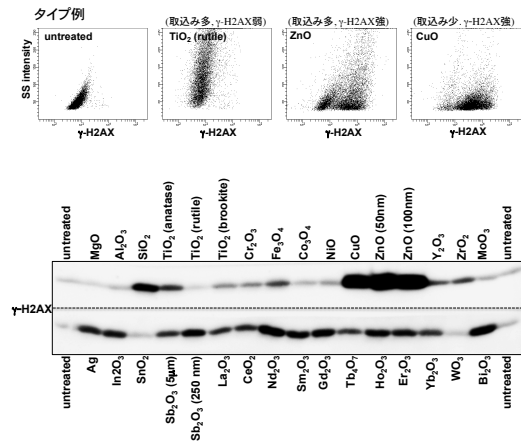


図4 ナノ粒子取込み量と細胞毒性の関係

(c) ナノ粒子取込み量とDNA損傷性の関係

図5には、細胞取り込量とDNA損傷性の同時解析ナノ粒子取り込み量とDNA損傷性を同時解析した例を示す。

こちらにも図4に示す結果と同様に、「ナノ粒子の取り込み量が多く、DNA損傷性も高いもの(例: ZnO)」、「取り込み量が多いがDNA損傷性は低いもの(例: TiO₂ rutile)」、「取り込



み量は少ないがDNA損傷性が高いもの(例: CuO)」と分類された。

図5 ナノ粒子取込み量とDNA損傷性の関係

(d) 結論と考察

図6にナノ粒子取り込み量と、細胞毒性、およびDNA損傷性の結果をまとめた。これらの結果より、ナノ粒子の細胞内取込み量と細胞毒性または遺伝毒性を同時解析することで、細胞内取込み量とその毒性影響が必ずしも一致しない、すなわち、取込み量が多くても細胞毒性または遺伝毒性が低い粒子、逆に取込み量が少なくても細胞毒性または遺伝毒性が高い粒子があることが判明した。また、細胞毒性と遺伝毒性の関係も必ずしも相関性があるとは限らないことが示唆された。

	SS	PI	γ -H2AX		SS	PI	γ -H2AX
MgO	Blue	Blue	Blue	Ag	Blue	Blue	Blue
Al ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue	In ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
SiO ₂	Blue	Blue	Blue	SnO ₂	Blue	Blue	Blue
TiO ₂ anatase	Blue	Blue	Blue	Sb ₂ O ₃ (5 μ m)	Blue	Blue	Blue
TiO ₂ rutile	Blue	Blue	Blue	Sb ₂ O ₃ (<250nm)	Blue	Blue	Blue
TiO ₂ brookite	Blue	Blue	Blue	La ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
Cr ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue	CeO ₂	Blue	Blue	Blue
Fe ₃ O ₄	Blue	Blue	Blue	Nd ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
CuO	Blue	Blue	Blue	Sm ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
NiO	Blue	Blue	Blue	Gd ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
ZnO (<50nm)	Blue	Blue	Blue	Tb ₄ O ₇	Blue	Blue	Blue
ZnO (<100nm)	Blue	Blue	Blue	Ho ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
Y ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue	Er ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
ZrO ₂	Blue	Blue	Blue	Yb ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
WO ₃	Blue	Blue	Blue	Bi ₂ O ₃	Blue	Blue	Blue
MO ₃	Blue	Blue	Blue				

図6 細胞内取り込み量と細胞毒性およびDNA損傷性の関係

本研究のようにナノ粒子の細胞内取込み量に加えてその毒性情報を同時に提供する手法は優先的にリスク評価を進めるべきナノマテリアルのスクリーニング等に有用であると考えられる。また、現状、ナノマテリアルの標準的な毒性評価法は存在せず、今後、本研究によって得られた知見・技術は、ナノマテリアルの有害性評価手法等に重要な指針を示すものになると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Toyooka T, Yanagiba Y, Suda M, Ibuki Y, Wang RS. 1,2-Dichloropropane generates phosphorylated histone H2AX via cytochrome P450 2E1-mediated metabolism. *Toxicol Lett.* 2017 Apr 15;272:60-67. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.03.009.
2. Kato T, Toyooka T, Ibuki Y, Masuda S, Watanabe M, Totsuka Y. Effect of physicochemical character differences on the genotoxic potency of kaolin. *Genes Environ.* 2017 May 1;39:12. doi: 10.1186/s41021-017-0075-y. eCollection 2017.
3. Zhao X, Toyooka T, Ibuki Y. Silver nanoparticle-induced phosphorylation of histone H3 at serine 10 is due to dynamic changes in actin filaments and the activation of Aurora kinases. *Toxicol Lett.* 2017 May 9. pii: S0378-4274(17)30186-8. doi: 10.1016/j.toxlet.2017.05.009.

[学会発表] (計 5 件)

1. 豊岡達土, 趙曉旭, 三浦信彦, 伊吹裕子, 王 瑞生 (2016) 二要素 (取込み量 + 毒性) 同時解析による新規ナノマテリアルリスク評価法の開発. 第 43 回日本毒性学会, *J. Toxicol. Sci. (Suppl.)*, 323.
2. 豊岡達土, 伊吹裕子, 柳場由絵, 王 瑞生 (2016) リン酸化ヒストン H2AX を指標としたトリクロロエチレンの DNA 損傷性の検討. 第 86 日本衛生学会, 日衛誌 71 (Suppl.), 214.
3. 豊岡達土, 伊吹裕子, 山口さち子, 王 瑞生 (2016) リン酸化ヒストン H2AX を指標とした新規化学物質遺伝毒性試験法構築に向けた基礎的検討-各種 DNA 損傷型に対する γ -H2AX 応答について. 第 89 回日本産業衛生学会, *産業衛生学雑誌* 58 (Suppl.) 421.
4. 豊岡達土, 柳場由絵, 山口さち子, 伊吹裕子, 王 瑞生, (2016) リン酸化ヒストン H2AX を指標としたトリクロロエチレンの DNA 損傷誘導メカニズムの解析. 第 44 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会, 抄録集, p14.

5. 豊岡達土, 柳場由絵, 須田恵, 王 瑞生, (2016) 1,2-ジクロロプロパンの DNA 損傷性とその誘導機構の検討. 第 45 日本環境変異原学会, 抄録集, p45.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

豊岡達土 [Tatsushi Toyooka]

(研究者番号: 40423842)

独立行政法人労働者健康安全機構
労働安全衛生総合研究所: 産業毒性・生体影響研究グループ: 任期付
研究員

(2) 研究分担者

本研究は日本学術振興会科学研究費助成事業研究活動スタート支援による研究課題であり、制度上、研究分担者はいない。

(3) 連携研究者

同上理由より連携研究者はいない。

(4) 研究協力者

- 三浦伸彦 [Nobuhiko Miura]

(研究者番号: 20229644)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所: 産業毒性・生体影響研究グループ: 上席研究員

- 王瑞生 [Rui-sheng Wang]

(研究者番号: 10321895)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所: 産業毒性・生体影響研究グループ: 上席研究員

- 伊吹裕子 [Yuko Ibuki]

(研究者番号: 30236781)

静岡県立大学: 品栄養環境科学研究院
教授