

機関番号：54101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21760600

研究課題名（和文） ヒト培養細胞アッセイによるめっき加工品からの重金属溶出と生体毒性との関連性の解明

研究課題名（英文） STUDY OF THE INTERACTION BETWEEN ELUTING HEAVY METALS AND CYTOTOXICITY BY HUMAN CULTURED CELLULAR ASSAY

研究代表者

小川 亜希子（OGAWA AKIKO）

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・助教

研究者番号：90455139

研究成果の概要（和文）：本研究は、めっき加工材料の表面形状や特性変化が生体機能に与える影響を明らかにすることを目的としている。その手段として、ヒト培養細胞を用いた *in vitro* アッセイ系を構築し、様々に加工しためっき材料を作用させた場合の細胞機能変化を比較検討した。結果、めっき加工材料の表面構造の変化は溶出特性に変化を与えるばかりでなく、細胞機能の変化を誘導することが分かった。

研究成果の概要（英文）：This study has aimed to clarify the influence of the surface conditions and the characteristic change of the plating on the biological functions. I developed the *in vitro* assay system using human cultured cells and I examined the change of cellular functions when the cells were treated with the plating. Changing the surface condition of plating not only influenced the feature of elution but also induced the change in the cellular functions.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：工学

科研費の分科・細目：材料工学・金属生産工学

キーワード：めっき加工材料、生体機能、溶出特性

1. 研究開始当初の背景

めっき加工は材料表面を改質し、耐熱性や耐腐食性といった新機能の付与に加え、装飾性の向上にも多用されてきた技術である。こうしためっき加工では、亜鉛やニッケル、コバルトといった生体金属元素も多く使用されており、めっき加工品から溶出する金属の生体への影響が懸念されている。このことに

関連し、ヨーロッパを中心として世界的に有害物質の使用を規制する動きがある。例えば、EUのRoHS指令（電気・電子機器における特定有害指定物質の使用制限に係る指令）が挙げられ、その規制対象となる技術分野は拡大している。一方、日本でも環境基本法に基づいた重金属の排出基準が定められ、ヒトや環境への被害抑制が行われている。

ところで従来、金属類の生体への影響評価には動物実験が行われてきた。しかし、動物実験は結果が得られるまでに時間がかかるばかりでなく、個体差のばらつきが多くコストもかさむといった問題点がある。こうした問題を克服する目的で、培養細胞による毒性試験が考案され、(1)細胞増殖に対する影響、(2)細胞(代謝)機能への影響、そして(3)変異原性(発がん性)が実施されてきた。金属は腐食・分解により溶出するイオンが生体毒性を引き起こすとされ、生体金属元素については体内への取り込み量と化合物状態が生体毒性に影響すると考えられているが、そのメカニズムについては不明な点が多い。加えて、実際の金属製品の多くは、金属が複合化あるいは混合された状態で使用され、実際に、生体毒性の無い金属も複合化によってアレルギー反応を引き起こす場合もある。

亜鉛やニッケルといっためっき加工で 사용되는重金属には、生体内で細胞機能維持に重要な役割を果たすものが多い。その一方で、こうした重金属の過剰な取り込みは、アレルギーや中毒を引き起こす原因ともなることから、使用が制限されつつある。しかし、めっき加工は耐腐食性や強度付与といった優れた効果を持ち、自動車部品から調理器具に至る幅広い産業分野で活用されており、必要不可欠な加工技術である。

2. 研究の目的

本研究では、めっき加工による材料表面の形状および特性変化と生体応答との関連性とを明らかにすることを目的とした。その手段として、哺乳類培養細胞による *in vitro* アッセイ系を利用し、広範囲かつハイスループットに機能評価を行い、その結果を元に生体毒性のないめっき品・加工技術の開発につなげる。

3. 研究の方法

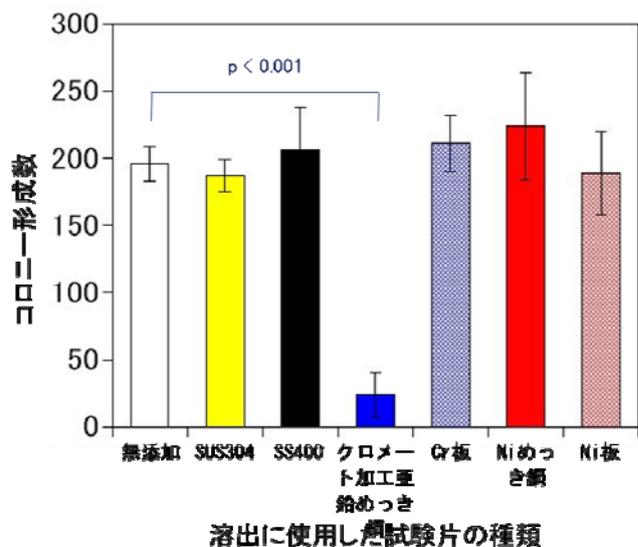
(1)めっき加工品について、細胞毒性評価系の構築し、実際のめっき加工品について評価した。ステンレス鋼(SUS304)、炭素鋼(SS400)、ニッケルめっき炭素鋼(基板はSS400)、市販クロメート加工亜鉛めっき鋼(基板はSS400)の各種圧延板および参考試験料として純ニッケル板、純クロム板を使用した。これらは、シアリングマシンで1センチ角に切断した後に高圧滅菌処理し、リン酸緩衝液に浸漬して溶出を行った。続いて、それら溶出液は、ハムスター由来肺細胞株 V79 (ヒューマンサイエンス研究資源バンクより入手)の培養系に添加して数日間培養した。培養後、ギムザ染色で生存細胞塊(コロニー)を染色し、各試験片間のコロニー数を比較した。

(2)めっき加工品の物性分析ならびに細胞毒性との関連性づけを行った。亜鉛めっき加工炭素鋼を基板とし、その表面にすずを成膜させ熱処理しためっき加工品を試料とした。各亜鉛-すずめっき加工品は高圧滅菌処理後、リン酸緩衝液に浸漬し 37℃で抽出液を作製し、その抽出液を V79 の培養系に添加して培養した。数日間培養後にギムザ染色法で細胞を染色し、試験片間のコロニー数を比較した。また、抽出液中の亜鉛濃度も決定した。

4. 研究成果

(1)クロメート加工亜鉛めっき鋼からの抽出物を添加した場合のコロニー数は、溶出液添加が無い通常培養の約 10分の1であった(下図参照)。一方、クロム板溶出液を添加した場合のコロニー数は、通常培養とほぼ同数であった。他の試験片の溶出液に対するコロニー数は、通常培養と同等であった。これらの結果からクロメート亜鉛めっき鋼は、細胞のコロニー形成を大幅に抑制すること、一方、クロム板は他の試験片と同様に細胞のコロニー形成には影響しないことがわかった。その原因として、クロメート亜鉛めっき鋼表面はめっき層に微小孔が存在しており、局部電池作用によってクロム板に比べて溶出が起りやすくなっているからではないかと推定される。

動物細胞を利用した *in vitro* 評価系は、金属・めっき加工品の生体毒性の比較に有効な手段である。また、金属・めっき加工品の生体毒性は金属元素の種類だけでなく、その組成や加工方法に依存すると考えられる。



(2) 亜鉛板 (Zn 100%) や亜鉛めっき加工品の抽出液を添加した場合、コロニー形成は見られなかった。一方、すず板 (Sn 100%) の抽出液を添加した場合、金属抽出液を添加しない場合とほぼ同数のコロニー形成が確認された。また、亜鉛-すずめっき加工品の場合、すずの厚みと熱処理条件の違いによりコロニー数が大きく異なっていた。亜鉛めっき上にすずを成膜し熱処理することで亜鉛とすずが合金化し、亜鉛の溶出が低下したものと考えられた。以上の結果、亜鉛とすずとの合金化は亜鉛溶出の抑制に有効であることがわかった。

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4件)

- ① Akiko OGAWA, Sadaharu FUKUI, Satoshi TERADA, Study of growth factors in spent medium for better mammalian cell culture, Proceedings of the 21st Annual Meeting of the European Society for Aal Cell Technology, Dublin, Ireland, June 7-10, 2009, 査読有、印刷中
- ② Seiji YOKOYAMA, Akito SUZUKI, NIK Hisyamudin Bin Muhd Nor, Hideyuki KANEMATSU, Akiko OGAWA, Toshiyuki TAKAHASHI, Masanobu IZAKI, Minoru UMEMOTO, Serial batch elution of electric arc furnace oxidizing slag discharged from normal steelmaking process into fresh water, ISIJ International, 査読有、50巻、2010、pp. 630-638
- ③ 横山誠二、鈴木玲人、ニク・ヒシャムディン、ビンムハンマド・ノル、兼松秀行、小川亜希子、高橋利幸、伊崎昌伸、梅本実、普通鋼精錬プロセスから排出された電気炉酸化スラグの淡水への繰返し溶出試験、鉄と鋼、査読有、96巻、2010、pp. 698-705
- ④ 兼松秀行、生貝初、黒田大介、吉武道子、柳生進二郎、小川亜希子、熱処理合金化めっき法によるすず-パラジウム合金皮膜の形成プロセスと皮膜の抗菌性発現、熱処理 査読有、49巻、2009、pp. 274-278

[学会発表] (計17件)

- ① Akiko Ogawa, Ryota Akatsuka, Hideazu Tamauchi, Katsuya Hio, Hideyuki Kanematsu, Influence of the nickel titanium alloy components on biological functions, 22th ESACT Meeting, 2011年5月15-18日、オーストリア
- ② 高橋利幸、横山誠二、兼松秀行、小川亜希子、水域使用時における電気炉スラグの化

学的特性の解析と植物プランクトンへの影響評価、日本鉄鋼協会第161回春季大会、2011年3月25-27日、東京都市大学

- ③ 小川亜希子、兼松秀行、樋尾勝也、哺乳類動物細胞の培養系を利用した鉄鋼・めっき加工材料の物性評価、日本鉄鋼協会第161回春季大会、2011年3月25-27日、東京都市大学
- ④ Seiji Yokoyama, Tetsuya Shimomura, Hisyamdin Mohd Nor Nik, Hideyuki Kanematsu, Toshiyuki Takahashi, Akiko Ogawa, Junji Sasano, Masanobu Izaki, Safety assessment of oxidizing slag discharged from EAF used in normal steelmaking by conventional leaching test and biological evaluation, 17th Asian symposium on ecotechnology, 2010年11月11-13日、宇奈月国際ホール (富山)
- ⑤ 小川亜希子、玉内秀一、兼松 秀行 尾 勝也、ニッケルチタン合金の材料特性と生体への影響、日本鉄鋼協会第160回秋季大会、2010年9月25-27日、北海道大学
- ⑥ 間世田英明、生貝初、黒田大介、小川亜希子、兼松秀行、伊勢湾岸における鉄鋼材料海洋浸漬と付着微生物の遺伝子解析、日本鉄鋼協会第160回秋季大会、2010年9月25-27日、北海道大学
- ⑦ 黒田大介、鎌倉渚、小松真也、生貝初、兼松秀行、小川亜希子、海洋環境下における種々の金属材料への海洋生物付着、日本鉄鋼協会第160回秋季大会、2010年9月25-27日、北海道大学
- ⑧ 生貝初、黒田大介、兼松秀行、小川亜希子、緑膿菌バイオフィルムによる鉄鋼材料表面の腐食作用、日本鉄鋼協会第160回秋季大会、2010年9月25-27日、北海道大学
- ⑨ 小川亜希子、寺田聡、汎用性と安全性に優れた新規血清代替物を利用した哺乳動物由来因子不含の細胞培養技術、第42回化学工学会秋季大会、2010年9月6-8日、同志社大学
- ⑩ Akiko Ogawa, Satoshi Terada, Yasuhiro Chida, Shinya Mizui, Akiko Sakuma, Kana Yanagihara, Tsuyoshi Ohura, Kyoichi Koyayashi, Nobuyuki Moriyama, Saori Yasukawa, Application of rakkyo fructan for serum-free culture, JAACT2010, 2010年9月1-4日、北海道大学
- ⑪ Akiko Ogawa, Naoaki Okuda, Hideyuki Kanematsu, Katsuya Hio, Influence of alloy plating corrosion of cellular functions, JAACT2010, 2010年9月1-4日、北海道大学
- ⑫ Satoshi Terada, Kana Yanagihara, Aki

ko Sakuma, Akiko Ogawa, Novel mitogenic factors for serum-free culture, Cell Culture Engineering XII, 2010年4月25-30日、カナダ

- ⑬ 小川亜希子、奥田直明、兼松秀行、生貝初、黒田大介、哺乳類動物細胞による各種金属材料の生体毒性評価、化学工学会 第75年会、2010年3月18—20日、鹿児島大学
- ⑭ 水井慎也、千田泰史、寺田聡、佐久間紹子、柳原佳奈、小林恭一、大浦剛、小川亜希子、森山展行、安川沙織、多糖フルクタンを利用した哺乳動物由来因子を含まない細胞培養、化学工学会 第75年会、2010年3月18—20日、鹿児島大学
- ⑮ 小川亜希子、奥田直明、兼松秀行、亜鉛-すず合金めっき加工法と生体毒性との関連、日本鉄鋼協会第159回秋季大会、2009年9月18日、京都大学
- ⑯ 小川亜希子、奥田直明、兼松秀行、各種複合金属材料の腐食と生体毒性との関係について、日本動物細胞工学会2009年度大会、2009年7月24-25日、つくば国際会議場
- ⑰ Akiko Ogawa, Naoaki Okuda, Hideyuki Kanematsu, Comparison of biological toxicity of several plating products by mammalian cells, Sur/Fin 2009, 2009年6月16-17日、アメリカ合衆国

〔図書〕(計2件)

- ① 小川亜希子、寺田聡(監修:大政健史)、株式会社シーエムシー出版、抗体医薬のための細胞構築と培養技術「第3編 細胞の代謝および培地設計 第3章 植物由来多糖を利用した新規培地添加剤と抗体精製後廃液の再生利用、2010、309
- ② HACCP対応抗菌環境福祉材料開発研究会 編、米田出版、安心・安全・信頼のための抗菌材料、2010、154

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称:動物細胞培養用の再生培地添加剤とその製造方法

発明者:小川亜希子、寺田聡

権利者:国立高等専門学校機構、福井大学

種類:特許

番号:特許公開2010-51173

出願年月日:2008年8月26日

国内外の別:国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小川 亜希子 (OGAWA AKIKO)

鈴鹿工業高等専門学校・生物応用化学科・助教

研究者番号:90455139

(3) 研究協力者

兼松秀行 (KANEMATSU HIDEYUKI)

鈴鹿工業高等専門学校・材料工学科・教授

研究者番号:10185952

玉内秀一 (TAMAUCHI HIDEKAZU)

北里大学・医学部・助教

研究者番号:60188414