

機関番号：37116

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2009～2010

課題番号：21890295

研究課題名（和文）：試験管内ヒト赤血球：粒子状物質などによる細胞傷害モデル

研究課題名（英文）：In Vitro Cytotoxicity Model of Particulate Matter on Human Red Blood Cells (RBCs)

研究代表者：ウィルソン ドナルド (WILSON DONALD)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：90507609

研究成果の概要（和文）：

我々の実験結果が示唆するには、二酸化チタン粒子の溶かし方及び分散方法は粒子の赤血球や他の細胞への毒性に影響を与える。だから、的確な、そして標準な分散方法を使用し、もっと安定した粒子懸濁液(suspension)を用意する必要がある。

現在まで行って来た二酸化チタンによる溶血の実験の結果が示すのは、二酸化チタン粒子のどの種類も溶血を起こす。さらに認められたことは、ヒト赤血球の場合は、二酸化チタンの粒子サイズより結晶構造が細胞障害を起こすのに、もっと大きい要因であると考えられます。

この溶血に酸化ストレスの関与を検討するにはグルタチオンの影響及び脂質の過酸化を調べたが酸化ストレスの関与は確定出来ていない。

電気泳動の結果、赤血球膜上に存在している低分子タンパク、コフィリン、の発現が抑制されることが示唆されたが結果に終始一貫的な再現性が見れなかったため、コフィリンを含む膜タンパクの同定には至っていない。

A549 肺胞上皮細胞に曝露させた二酸化チタンの2種類の微粒子は用量依存性にアポトーシスを誘発し、IL-8 mRNA と IL-8 タンパクの遊離をがわずかながら増加し、NF-kB DNA 結合の変化はなかった。

研究成果の概要（英文）：

Our results suggest that the method of suspension of titanium dioxide (TiO<sub>2</sub>) particles in solution influences the effects of the particles on red blood cells (RBCs) or any other cell line, therefore precise and standard dispersion methods must be employed. Our previous experiments and the current results demonstrate that any form of TiO<sub>2</sub> causes hemolysis. Although particle size is an important determinant of the level of hemolysis induced by TiO<sub>2</sub>, the particle type or polymorph plays a more significant role.

We investigated the involvement of oxidative stress in TiO<sub>2</sub>-induced hemolysis by examining the effects of particles on glutathione oxidation and lipid peroxidation, and the results were inconclusive.

Preliminary electrophoresis experiments with RBC membranes showed a probable effect of the TiO<sub>2</sub> particles on a low molecular weight protein, which was considered to be Cofilin. However, poor reproducibility of these results hindered our confirmation of this finding.

TiO<sub>2</sub> particles exposed to A549 lung epithelial cells caused dose-dependent apoptosis, slight increase in the release of IL-8 mRNA and IL-8 protein, but no effects on NF-kB DNA.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,070,000	321,000	1,391,000
2010年度	970,000	291,000	1,261,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,040,000	612,000	2,652,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：二酸化チタン、TiO<sub>2</sub> P90, TiO<sub>2</sub> P25 溶血、赤血球、酸化ストレス、赤血球膜、赤血球膜タンパク、脂質の過酸化、グルタチオン、マロンジアルデヒド、バイオマーカー、Cofilin、A549 肺胞上皮細胞、ネクローシス、アポトーシス、A549 細胞毒性、IL-8 遺伝子、IL-8 タンパク、NF-κB

### 1. 研究開始当初の背景

粒子状物質などによる細胞傷害研究における試験管内試験として、ヒト赤血球溶血が用いられることが少なくない。これには、試験材料（ヒト赤血球浮遊液）の入手・調整、溶血定量（細胞外ヘモグロビン量測定）が容易なことが関与している。しかし、赤血球浮遊液の調整、反応液の差異の影響などについて、必ずしも充分配慮されていない。標準的方法も確立されていない（これまでの例では、生理食塩水のみですべての調整・反応をおこなうもの、Ficollを用いて赤血球を分離するもの、使用期限の切れた輸血用血液を用いたものなど、多様）。さらに、結果の評価・比較において、定量性に欠けることが多い。

近年まで、二酸化チタンは毒性のないものだと考えられたため、日常的に広く使われる物に含まれて作られて来た。本研究室でこの粒子による溶血が起こることが確認されたが二酸化チタンによるこの溶血のメカニズムがはっきり説明出来てない。

そして、予備実験の結果は、二酸化チタン粒子は赤血球膜及びその膜タンパクに影響を起す可能性があるが再現性を確認する必要がある。

さらに、実験方法に関する最近分かったことであるが、現在まで使用して来た粒子の懸濁液(suspension)は、粒子が直接バッファ液に溶かされた物で、うまく分散されていない理由で粒子の影響は単なる生理的反応になり、粒子による細胞被害を正しく測定出来ないことになると考えられる。

### 2. 研究の目的

二酸化チタンによるもっと信用出来る毒性の結果を得るには、的確な、そして標準な分散方法を使用し、もっと安定した粒子

suspension を用意する必要がある。

二酸化チタンによる溶血のメカニズムに酸化ストレスの関与を検討するため、生物化学的検査のグルタチオンの影響及び脂質の過酸化を調べる。

二酸化チタンが赤血球膜タンパクに影響するかを電気泳動によるタンパク発現で検討する。二酸化チタン粒子による溶血に伴う何らかの特定タンパク質が同定されれば、次のステップとしてその物質を分離することで、これらの粒子による細胞障害のバイオマーカーを特定することに繋げることが可能かと考えられる。予備実験の電気泳動と Western blotting の結果として、粒子の暴露により小さい分子量の辺りに蛋白発現に量依存的な阻害が見られまして、23キロダルトン分子量の Cofilin だと考えられる。

本研究室に A549 肺胞上皮細胞があるため、この A549 肺胞上皮細胞における二酸化チタン粒子の影響を検討する。

### 3. 研究の方法

赤血球の分離、浮遊、さらに、粒子などとの反応は、すべて本研究室が用いてきた、生理的条件に近く pH、イオン濃度、浸透圧が調整された液(30 mM Tris-HCl pH7.4, 120 mM NaCl, 5 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>)を用いる。血液は、健康男子より得、一部の実験を除いて、ただちに処理を開始する。

二酸化チタンナノ粒子を滅菌超純水に分散し、超音波ホモジナイザーを用いてホモジナイズを行った後、遠心分離ろ過を行った。平均粒径が 35.3 nm (DLS 測定) で安定した分散状態であることを確認した。サイズの異なる二酸化チタンナノ粒子 P90 (14nm) 及び P25 (56nm) を用いて赤血球に暴露させて溶血度を検討した。

酸化ストレスの関与を定めるため、グルタチオンへの影響及び脂質の過酸化を調べた。粒子状物質がどのような機構でヒト赤血球膜破壊（溶血）をもたらすか、特に膜にどのような変化（膜蛋白質、膜構成脂質など）を生じているかを明らかにする。なお、この時、膜からの蛋白質遊離の可能性が考えられる場合、蛋白質（ペプチド）質量分析（peptide mass fingerprinting）も行う。（この方法は、細胞からの熱ショック蛋白質遊離解明において、有効であった。Sumizawa T, Igisu H.: J Toxicol Sci. 2008;33:117-22）。このステップの始めとしては、粒子に曝露した赤血球膜を電気泳動及び Western blot 解析によるタンパク発現の影響を検討した。A549 肺胞上皮細胞も二酸化チタンと6から24時間インキュベートさせた後、細胞毒性、IL-8 遺伝子の発現、IL-8 タンパクの遊離及び NF- $\kappa$ B 活性を検討した。この実験のため、二酸化チタン粒子は serum-free DMEM に溶かされ、使用直前にウォーターバスに15分間ソニケートして使用した。シリカ粒子の Min-U-Sil をポジティブコントロールとして使った。アッセイは、A549 細胞を6, 12 及び24時間、二酸化チタンと曝露した。粒子の最終濃度が2, 10, 50, 250ug/mL で、Min-U-Sil の最終濃度が48, 96, 192, 384ug/mL であった。これらの細胞を10%の fetal bovine serum に80%密度まで培養してから、24時間飢餓させた。細胞死亡率は DNA Fragmentation ELISA Kit を使用して検討した。アポトーシス及びネクローシスの結果を450nmの級光度で表現した。細胞内に合成されたヒト IL-8 mRNA は半定量的測定 RT-PCR 方法によって測定された。IL-8 mRNA のレベルは GAPDH mRNA のレベルに対する増加として表現された。IL-8 タンパクは Human IL-8 ELISA Kit 使用により測定した。二酸化チタンと24時間インキュベート後、遠心し、上清を取り、Kit のマニュアル通りに IL-8 タンパクの発現を検討した。ELISA plate reader で450nm 及び550nm の級光度を測定し、結果を示した。

#### 4. 研究成果

50%溶血を起こすには P90 の 0.86mg/ml と P25 の 1.75mg/ml が必要で、14nm の P90 粒子が56nm の P25 粒子より約2倍の溶血力を持つと認められた。生物化学的検査の結果、酸化ストレスを起こすと知られている硫酸銅 (CuSO<sub>4</sub>) と違って二酸化チタンの2種類とも能動を上げても、グルタチオンに影響しなかったが、脂質の過酸化はどの粒子も起こすと認められ、小さい14nm 粒子がもっとも脂質の過酸化を起こす傾向が見られた。

電気泳動の結果、二酸化チタンのナノ微粒子を曝露することで赤血球膜上に存在している低分子タンパク (Mw=27~37kDa) の発現が抑制されることが基礎実験の結果より示唆された。基礎実験ではこのタンパクがコフィリン (Mw=23kDa) と想定されたため、その同定作業を行った。しかしながら、結果に終始一貫的な再現性が見れなかったため、我々は溶血反応を誘発する二酸化チタンに対するコフィリンを含む膜タンパクの同定には至っていない。

二酸化チタン (P25 および P90 粒子) とシリカ陽性対照 (Min-U-Sil) の微粒子をそれぞれ A549 細胞に24時間投与したところ、Min-U-Sil 粒子の場合のみがネクローシスの誘発に有意差は認められた。一方で、これら3種類の微粒子は用量依存性にアポトーシスを誘発した。

IL-8 遺伝子の発現に関しては、投与6時間後、P25 および P90 において IL-8 mRNA の数がわずかながら増加した (250ug/ml)。その一方で、Min-U-Sil においては IL-8 mRNA の数が用量依存性に著しく増加した。さらに、IL-8 mRNA の発現に関して、Min-U-Sil は P25 や P90 よりも強く影響していると考えられる。

IL-8 タンパクの遊離を調べたところ、投与24時間後、Min-U-Sil は遊離 IL-8 タンパクを用量依存性に増加させ、P25 や P90 よりも高い値を示した。P25 (250 ug/ml) において、遊離 IL-8 タンパクはわずかに上昇した。A549 細胞における NF- $\kappa$ B 活性に関しては、投与6時間後、P25、P90 及び Min-U-Sil の投与による NF- $\kappa$ B DNA 結合の変化はなかった。

#### 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0件)

[学会発表] (計2件)

##### ①

発表者名: ウィルソン ドナルド  
発表タイトル: ナノ粒子とヒト赤血球と赤血球膜の関与作用

学会名: 産業医科大学学会

発表年月日: 平成22年10月12日

発表場所: 北九州市 (産業医科大学)

##### ②

発表者名: ウィルソン ドナルド  
発表タイトル: Interaction of Nanoparticles with Human Erythrocytes and Their Membranes

学会名: 第20回アジア産業衛生学会

発表年月日: 平成23年3月9~11日

発表場所: タイ、バンコク (Emerald Hotel)

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

なし

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者：

ウィルソン ドナルド (WILSON DONALD)

産業医科大学・産業生態科学研究所・助教

研究者番号：90507609