

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 23 日現在

機関番号：54101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26550084

研究課題名(和文)動物細胞の生理機能変化を利用した六価クロムと三価クロムの定量分析法の構築

研究課題名(英文)Development of quantitative analytical method for hexavalent chromium and trivalent chromium by detection of mammalian cellular physiological changes

研究代表者

小川 亜希子(Ogawa, Akiko)

鈴鹿工業高等専門学校・その他部局等・准教授

研究者番号：90455139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、動物細胞の生理機能変化を利用し、六価クロムと三価クロムとを別々に定量するための検出系を構築した。三価クロム単独で検出するのは、本法が初めてである。さらに、本研究で構築した六価クロム検出系は、既存の評価法に比べてより低濃度な六価クロムを検出できることが分かった。また、構築した検出系は、鉄鋼資材のクロム評価に適応できることが示された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed analytical methods for hexavalent chromium and trivalent chromium separately using detection systems of mammalian cellular functional changes. The developed analytical method of trivalent is a new method to detect trivalent chromium directly and individually. The developed analytical method of hexavalent chromium can detect lower concentration than existing one. Additionally, these developed analytical methods can be applied for measuring chromium of iron and steel.

研究分野：生物化学工学

キーワード：六価クロム 三価クロム クロム検出

1. 研究開始当初の背景

工業製品に利用されるクロムには、六価クロム化合物と三価クロム化合物がある。特に六価クロムは RoHS 指令 (EU) に指定されたり、排水基準 (日本) が設けられたりするなど、環境リスクが高い物質として知られ、その使用や排出が厳密に規制されている。また三価クロムについても、環境リスクの観点から排出基準が設けられている。その一方で、三価クロムは生体内で微量必須元素として重要だと知られており、動物では主に食料から腸管上皮を通して体内に吸収される。その存在量は成人で 2 mg であるが、このわずかな (三価) クロムは、糖質や脂質、タンパク質の正常な代謝維持に重要な役割を果たしていることが知られている¹⁾。したがって、どのような状態のクロム (イオン) 化合物がどの程度、対象物に存在しているかを把握することは大変重要である。

現在、クロムの分析では、呈色反応による吸光度測定法、イオンクロマトグラフィーや ICP-MS など分析機器による検出法が利用されている。六価クロムと三価クロムを区別して検出するには、いくつかの分析法を組み合わせ総クロム量と六価クロム量を定量し、その差から三価クロムを算出する方法がとられている。しかし、六価クロムと三価クロムとを同時に検出する簡便な方法は確立されていない。

報告者は、これまでに鉄鋼をはじめとする様々な金属材料について、動物細胞の生理機能変化を利用した材料特性評価を行ってきた^{2) 3)}。この過程で、動物細胞は種々の金属について濃度依存的に生理機能が変化すること、亜鉛やクロムといった重金属に対する感受性 (つまり、生理機能に変化を生じる濃度) は、動物細胞の種類によって大きく異なっていることが分かった。

参考文献

- 1) Cefalu, W.T. *et al.*, Role of Chromium in Human Health and in Diabetes, *Diabetes Care*, **27**, 2741 (2004).
- 2) A. Ogawa *et al.*, The monitoring possibility of some mammalian cells for zinc concentration on metallic materials, *Cytotechnology*, **64**, 341-347 (2011)
- 3) 小川亜希子ら, 動物細胞の生理機能変化による亜鉛, ニッケルおよびクロム (VI) の検出への適用と有効金属濃度, *CAMP-ISIJ*, **26**, 644-646 (2013)

2. 研究の目的

以上を踏まえ本研究では、動物細胞の生理機能変化を利用し、六価クロムと三価クロムとを別々に定量可能な検出系の構築を目指した。次に、構築した検出系と既存のクロム分析法の両方について、実際のクロム含有サンプル中の六価クロムと三価クロムの測定を行って、構築した検出系の有効性および利点を評価した。

3. 研究の方法

本研究では、三価クロム / 六価クロム、各々に対して感受性の高い (低濃度の対象クロム添加によって生理機能が変化する) であろう動物細胞 3 種類について、クロム添加による生理活性変化を計測し、三価クロムあるいは六価クロムに対する感受性が高い細胞を選別した。

次に、選別した細胞について、六価クロムまたは三価クロムの濃度変化と生理活性変化との関連性を明らかにし、クロム定量の検出系を構築した。

4. 研究成果

4-1. 動物細胞の代謝活性測定によるクロム検出

動物において、三価クロムは糖代謝や脂質代謝、タンパク質の正常な維持に働くことが知られている。この情報を元にし、さらに細胞バンクから入手できること、世界中で広く使用されていること、を条件として動物細胞の選定を行い、次の 3 種類の動物細胞を選別した。1) Hep G2 (ヒト肝実質細胞株): アルブミン産生能および薬剤代謝能を有しており、細胞の代謝活性が高いと考えられた。2) PANC-1 (ヒト膵癌由来細胞株): 膵臓はグルコース代謝制御に関わっており、糖質代謝との関連が深いクロムの検出に適していると考えられた。そして、3) V79 (チャイニーズハムスター肺由来線維芽細胞株): 我々の先行研究において、ニッケルや亜鉛に対する感受性が高かったことから、クロムに対しても感受性が高いと期待した。なお、動物細胞の代謝活性測定には、MTT 活性測定系と乳酸デヒドロゲナーゼ (lactate hydrogenase, LDH) 活性測定法による細胞毒性評価を行った。また、六価クロムの供給源には $K_2Cr_2O_7$ を使用し、三価クロムの供給源には $CrCl_3$ -EDTA 錯体を使用した。なお、 $CrCl_3$ -EDTA 錯体は、血清入り培地中で沈殿してしまった。そこで、三価クロム検出では無血清培養下で実験を行った。

六価クロムの場合、試験した 3 種類の動物細胞のうち PANC-1 と V79 について、MTT 活性測定では六価クロム濃度依存的な吸光度の減少が確認された。また、PANC-1 の方が V79 に比べ、より低濃度な六価クロムを検出できた。一方、LDH 活性測定法では、いずれの細胞についても六価クロム濃度依存的な細胞活性変化は確認されなかった。この原因として、六価クロムによる LDH 反応阻害が考えられる。LDH 活性測定では、障害を受けた細胞から放出される LDH 量に応じてホルマゼン色素が形成される。まず、LDH が試薬中の乳酸をピルビン酸へと還元する。この反応において、NADH が還元されて NAD^+ が同時に産生される (図 1 の Step 1)。この Step 1 で生成した NAD^+ は、試薬中のテトラゾリウム塩を酸化してホルマゼン色素を形成する (図 1 の Step 2)。しかし、六価

クロムが存在すると、Step 1 で生成された NAD⁺ が六価クロムの強力な酸化によって NADH に還元されてしまい、反応が進行しなくなると考えられた (図 2)。

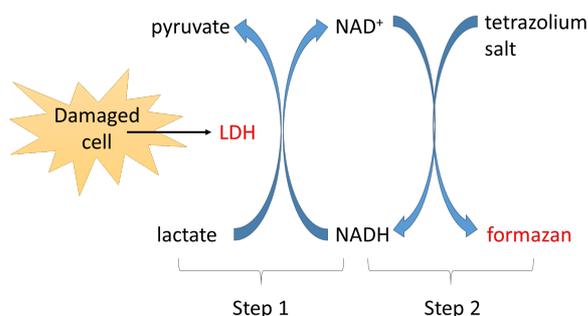


図 1 . LDH 測定の原理

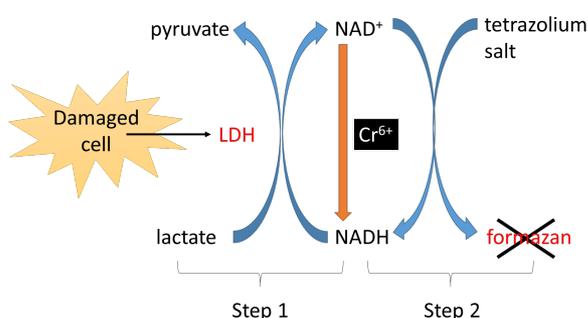


図 2 . 六価クロムによる予測される LDH 活性測定の障害

三価クロムの場合、PANC-1 では LDH 活性測定法にて三価クロム濃度が 4 – 10 nM で細胞障害性が低下した。一方、MTT 活性測定では三価クロム濃度依存的な変化は確認されなかった。Hep G2 と V79 については、MTT 活性測定と LDH 活性測定のどちらについても三価クロム濃度依存的な活性変化は確認されなかった。

以上より、六価クロム検出には PANC-1 による MTT 活性測定を利用し、三価クロム検出には PANC-1 による LDH 活性測定を利用するのが有効であることが分かった。

4 - 2 . クロム含有資材でのクロム検出

本研究では、クロム含有資材として鉄鋼資材である SUS304 と SK4、および鉄板 (99.5%) を使用した。なお、SUS304 にはクロムが 18-20% 含有しているのに対し、SK4 はクロム不含であることが知られている (表 1)。これらのサンプルを 70% エタノール溶液に浸漬して滅菌後、フェノールレッドフリー RPMI 培地に浸漬し、CO₂ インキュベーター (5%) 内で、36 °C の雰囲気下で 14 日間保温した。その後、各溶液から鉄鋼資材を無菌的に取り出し、その溶液を試験液として PANC-1 を用いて MTT 活性測定、LDH 活性測定を行った。また細胞による評価と同時に、ジフェニルカルバジド吸光光度法による六価クロム検出と、ICP-AES による金属検

出を行った。ICP-AES では、クロム、鉄、マンガンおよびニッケルについて濃度を測定した。

表 1 . SUS304 と SK4 の組成
単位 : (%) JIS 規格を参考にした

	C	Si	Mn	P
SUS304	≤ 0.08	≤ 1.00	≤ 2.00	≤ 0.045
SK4	0.90 - 1.00	0.10 - 0.35	0.10 - 0.50	≤ 0.030
	S	Ni	Cr	Cu
SUS304	≤ 0.030	8.00	18.00	0
SK4	≤ 0.030	≤ 0.25	≤ 0.30	≤ 0.25

PANC-1 による MTT 活性測定では、0.1 μM 以上で六価クロムが検出された。この時、SUS304 溶出液から六価クロムが検出され、鉄板溶出液と SK4 溶出液では検出されなかった。一方、ジフェニルカルバジド吸光光度法では、0.2 μM 以上で六価クロムが検出されたが、試験したいずれの溶出液からも六価クロムは検出されなかった。以上の結果から、SUS304 溶出液中の六価クロム濃度は、ジフェニルカルバジド吸光光度法の検出限界以下であって、MTT 活性測定で検出される量であったといえる。

一方、PANC-1 による LDH 活性測定では、4 – 10 nM の三価クロムが検出された。この時、全ての鉄鋼溶出液から三価クロムが検出された。一方、ICP-AES で総クロム量を測定したところ、いずれの溶出液についてもクロムが検出されなかった。これは、ICP-AES のクロム検出限界が 1.9 μM であり、推定される溶出液中のクロム濃度よりも高いことが原因だと考えられる。

4 - 3 . まとめ

本研究では、動物細胞として PANC-1 を用いて、六価クロムの検出・定量には MTT 活性測定を利用し、三価クロムの検出・定量には LDH 活性測定を利用することで、六価クロムと三価クロムとを別々に測定可能なことが示された。また、MTT 活性測定法による六価クロム検出は、既存のジフェニルカルバジド吸光光度法に比べ、より低濃度な六価クロム検出が可能である。加えて、これらの測定法は、鉄鋼資材中から溶出されるクロム検出への応用が可能である。

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 1 件)

寺村侑奈, 小川亜希子, 鉄鋼存在下での動物細胞(V79)の増殖、材料とプロセス(CD-ROM)

〔学会発表〕(計7件)

小川亜希子、山田悠介、岩田果久、亜鉛による細胞増殖抑制と細胞の亜鉛取り込み能との関連、第66回日本生物工学会大会、2014年9月9-11日、日本生物工学会

保坂浩章、小川亜希子、動物細胞の生理機能変化を利用した6価クロムの検出、第17回化学工学会学生発表会(徳島大会)、2015年3月7日、化学工学会

田中雄士、小川亜希子、動物細胞の生理機能変化を利用した三価クロムの検出、第17回化学工学会学生発表会(徳島大会)、2015年3月7日、化学工学会

岩田果久、小川亜希子、細胞膜の細胞膜上亜鉛トランスポーターの発現量比較と亜鉛による増殖抑制との関連、第17回化学工学会学生発表会(徳島大会)、2015年3月7日、化学工学会

細川貴史、小川亜希子、PANC-1とHep G2の亜鉛感受性とメタロチオネイン量との関連、第17回化学工学会学生発表会(徳島大会)、2015年3月7日、化学工学会

小川亜希子、保坂浩章、田中雄士、動物細胞の機能変化を利用したクロム検出、第68回日本生物工学会大会、2016年9月29日、日本生物工学会

小川亜希子、ウルジバートル サランゲア、細胞の代謝活性変化を利用したクロム検出、化学工学会第82年会、2017年3月6日、化学工学会

〔図書〕(計1件)

小川亜希子 (担当:分担執筆)

Corrosion Control and Surface Finishing Part IV Novel Biological Environmental Evaluation Processes: The Application of Mammalian Cells for Assessment of Metallic Products (*in vitro* Process)、Springer Japan、2016年4月、ISBN:978-4-431-55957-3

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

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・准教授

研究者番号: 26550084

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者
なし

(4)研究協力者
なし