

## 科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 17 日現在

機関番号：24403

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2012

課題番号：23710081

研究課題名（和文）ほ乳類培養細胞を用いたナノ素材の遺伝毒性機構解明

研究課題名（英文）A study on genotoxicity of nanomaterials using mammalian cultured cells

研究代表者 川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)

大阪府立大学・理学系研究科・助教

研究者番号：70332963

研究成果の概要（和文）：

ナノマグネタイトのほ乳類培養細胞に対する遺伝毒性とそのメカニズムを調べた。ナノマグネタイトは細胞に小核と姉妹染色分体交換を誘導し、染色体異常誘発能を持つことが分かった。DNA 二重鎖切断も観察された。活性酸素種の誘導も認めた。抗酸化剤は小核頻度を低減した。これらのことはナノマグネタイトが細胞に活性酸素種を誘導し DNA 二重鎖切断を誘起、染色体異常を引き起こすことを示唆している。

研究成果の概要（英文）：

We examined the genotoxicity of magnetite nanoparticles (primary particle size: 10 nm) on human A549 and Chinese hamster ovary (CHO) AA8 cells. Six hours' treatment with the particles dose-dependently increased the frequency of micronuclei (MN) in the A549 and CHO AA8 cells up to 5.2% and 5.0% at a dose of 200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (34  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ), respectively. In A549 cells, treatment with the nanoparticles (2  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) for 1 hour induced H2AX phosphorylation, which is suggestive of DNA double strand breaks (DSB). Treating CHO AA8 cells with 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  magnetite for 1 hour resulted in a five times higher frequency of sister chromatid exchange (SCE) than the control level. We detected reactive oxygen species (ROS) in CHO cells treated with the particles. These findings indicate that magnetite nanoparticles induce ROS in mammalian cells, leading to the direct or indirect induction of DSB, followed by clastogenic events including MN and SCE.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：環境毒理学

科研費の分科・細目：細目：環境学・放射線・環境影響科学

キーワード：ナノマテリアル・ナノマグネタイト・遺伝毒性・培養細胞・小核試験・姉妹染色分体交換試験・DNA 二重鎖切断・活性酸素種

## 1. 研究開始当初の背景

その機能性から一般消費財への応用が急速に進行しているナノマテリアルの安全性は不明である。ナノマテリアルはその特異な性質・機能により、重要な産業材料になりつつある。主な用途は、家電・電気電子製品、化粧品及び塗料・インクである。ナノマテリアルはそのサイズゆえに一般の化学物質とは異なる性質を有することが示唆されており、生物影響も予測が難しい。しかし中皮腫誘発が明らかになったアスベストと大き

さ・形状が類似することから、その危険性が疑われている。現段階では、ナノマテリアルが人の健康に影響を及ぼすという報告はない。また、人の健康影響を評価するために必要十分なデータが得られた状況には至っていない。

今後は消費財における使用が顕著に増加すると予測されている。従ってナノマテリアルに対する曝露も、職業曝露から一般公衆への曝露へと、短期間のうちに拡大すると考えられる。従ってその生物影響基礎データを出

すことが急務である。

## 2. 研究の目的

ほ乳類培養細胞における、ナノマテリアルによる生体分子損傷から染色体異常・ゲノム機能不全へ至る分子メカニズムの解明が目的である。ナノマテリアルのうち、本稿では特にマグネタイト ( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ) ナノ粒子の研究を紹介する。これまでナノマグネタイトの遺伝毒性を評価した報告はいくつかあるが、研究グループにより結果は様々である。ナノマグネタイトの遺伝毒性の有無に対して統一した見解が存在するとは言えない。

そこで研究代表者は、ほ乳類培養細胞(ヒト・チャイニーズハムスター)に対してナノマグネタイトが遺伝毒性を示すか、染色体異常を指標に調べた。また DNA 損傷は染色体異常を誘発するが、ナノマグネタイトが DNA 損傷を産生するか DNA 鎖切断を指標に観察した。さらにナノマグネタイトが細胞に活性酸素種 (ROS) を誘導するかも測定した。ROS による生体分子損傷が染色体異常につながるかを考察した。

## 3. 研究の方法

用いたナノマグネタイトの平均粒径は 10 nm、比表面積は  $116 \text{ m}^2/\text{g}$  であった。Tween-80 の希釈溶液を用いて培養液に懸濁した。

ヒト肺癌由来 A549 細胞と、チャイニーズハムスター卵巣由来 CHO AA 株を用いた。染色体異常は小核形成 (MN) 試験と姉妹染色分体交換 (SCE) で評価した。標準的プロトコールに従って実施した。DNA 鎖切断は、蛍光顕微鏡を用いて  $\gamma\text{H2AX}$  蛍光抗体による foci 形成を観察することで、DNA 二重鎖切断 (DSB) を指標に評価した。ROS は、フローサイトメトリーを用いた ROS 蛍光検出試薬による蛍光シグナル解析で定量した。

## 4. 研究成果

様々な濃度のナノマグネタイトで 6 時間処理した A549 細胞で観察される MN 保有細胞出現頻度を図 1 に示す。MN 頻度はナノマグネタイト処理濃度依存的に上昇し、200  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の処理では溶媒対照の約 2 倍になった。また図 5A に示すように CHO 細胞でも MN 頻度の上昇が観察された。これはナノマグネタイトがほ乳類培養細胞に遺伝毒性 (染色体異常) を示すことを意味している。

MN 形成の原因の一つに DSB が知られている。そこでナノマグネタイトが A549 細胞に DSB を誘導するか、 $\gamma\text{H2AX}$  foci 形成を指標に調べた (図 2)。ナノマグネタイト 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上の処理で、陰性対照に比べ有意に高い  $\gamma\text{H2AX}$  発現が観察された。ナノマグネタイトは A549 細胞に DSB を誘発することがわかった。

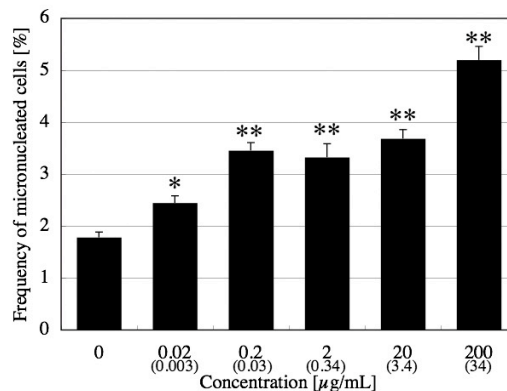


図 1. ナノマグネタイトはヒト肺 A549 細胞に小核を誘導する

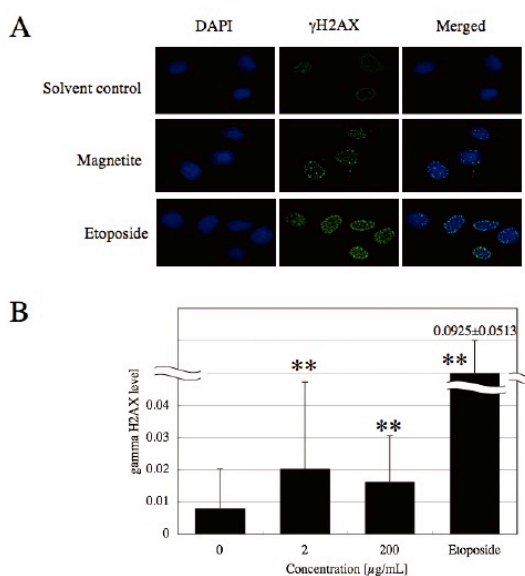


図 2. ナノマグネタイト処理はヒト肺 A549 細胞に  $\gamma\text{H2AX}$  を誘導する

DSB は、染色体異常の一つである高頻度の SCE の原因になりうる。そこでナノマグネタイト

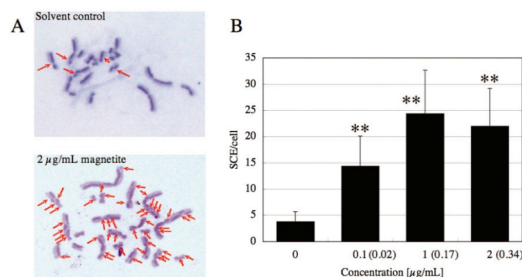


図 3. ナノマグネタイト処理は CHO AA8 細胞に SCE を誘発する

処理が SCE を誘発するか調べた。染色体の観

察が容易な CHO 細胞を試験に用いた。その結果、図 3 に示すように処理濃度依存定期に SCE 頻度が上昇した。

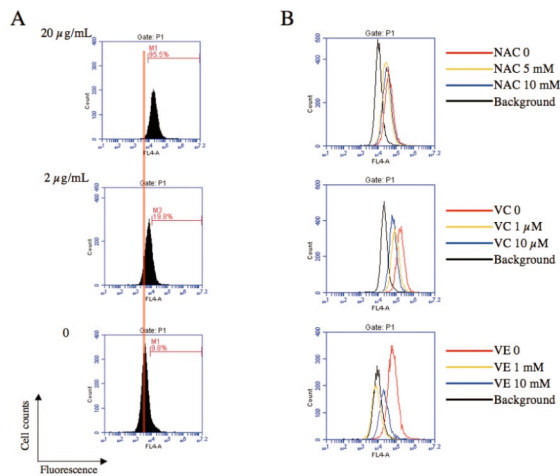


図 4. ナノマグネタイト処理は CHO AA8 細胞に ROS を誘発する

いくつかの先行研究はナノマグネタイトの ROS 生成を報告している。そこで研究代表者もナノマグネタイト処理した CHO AA8 細胞中の ROS を定量した。図 4A に示すように、処理濃度依存的に ROS シグナルが増加した。またこの ROS シグナルは、図 4B に示すように、抗酸化剤 (N-アセチルシステイン, NAC; ビタミン C, VC; ビタミン E, VE) 共存により減弱した。

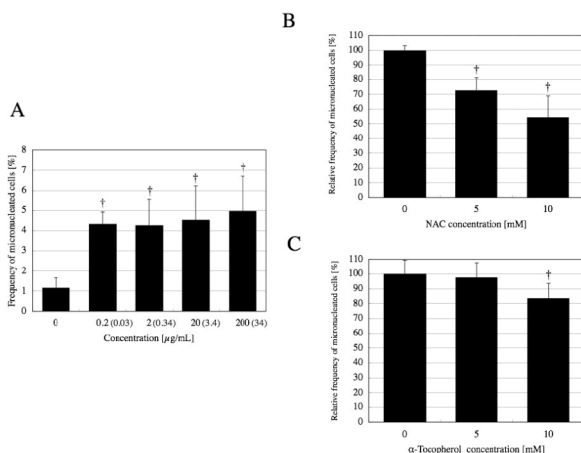


図 5. 抗酸化剤はナノマグネタイト誘導小核頻度を低下させる

最後に、抗酸化剤 (NAC, ビタミン E,  $\alpha$ -Tocopherol) がナノマグネタイトによる MN 頻度を低下させるか調べた。その結果、図 5B, C に示すように抗酸化剤は MN 頻度を低下

させた。

以上のことから、ナノマグネタイトはほ乳類細胞に ROS を誘導し、DSB を介して MN や SCE といった染色体異常を誘発する機構が示唆される。しかし図 4B ではビタミン E に比べ NAC の ROS 消去能は低いにも拘わらず、図 5B, C ではビタミン E に比べ NAC の MN 抑制能が高い。ROS の多寡と MN 頻度の高低は一致しない。ROS 以外にも染色体異常誘発機構が存在するのかもしれない。

## 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 2 件)

(1) Genotoxicity and reactive oxygen species production induced by magnetite nanoparticles in mammalian cells. (2013) Masanobu Kawanishi, Sayaka Ogo, Miho Ikemoto, Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, Journal of Toxicological Sciences, 38(3), 印刷中, 査読あり

(2) Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. (2013) Tatsuya Kato, Yukari Totsuka, Kousuke Ishino, Yoko Matsumoto, Yukie Tada, Dai Nakae, Sumio Goto, Shuichi Masuda, Sayaka Ogo, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Tomonari Matsuda, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Nanotoxicology, 7:452-61. doi: 10.3109/17435390.2012.674571, 査読あり

[学会発表] (計 4 件)

(1) カオリンの遺伝毒性発現メカニズムの解明, 池本実穂, 川西優喜, 戸塚ゆかり, 若林敬二, 八木孝司, 日本環境変異原学会第 41 回大会, 静岡, 2012 年 11 月 29-30 日

(2) Genotoxicity of nanomaterials mediated by ROS generation in vitro, Miho Ikemoto, Masanobu Kawanishi, Yukari Totsuka, Keiji Wakabayashi, Takashi Yagi, 3rd Asian Conference of Environmental Mutagens, China, 2012 年 10 月 23-26 日

(3) Genotoxicity induced by nanoparticles, Yukari Totsuka, Tatsuya Kato, Kousuke Ishino, Shuichi Masuda, Dai Nakae, Yukie Tada, Masanobu Kawanishi, Takashi Yagi, Masatoshi Watanabe, Keiji Wakabayashi, Hitoshi Nakagama, 41st European

Environmental Mutagen Society annual  
conference, Barcelona, Spain, 2011年7月  
4-7日

(4) ナノ材料による小核誘導における相同  
組換え修復の関与, 池本実穂, 川西優喜,  
戸塚ゆ加里, 若林敬二, 八木孝司, 日本環  
境変異原学会第40回大会, 東京, 2011年11  
月21-22日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

川西 優喜 (KAWANISHI MASANOBU)  
大阪府立大学・理学系研究科・助教  
研究者番号 : 70332963

### (2) 研究分担者

なし ( )

研究者番号 :

### (3) 連携研究者

なし ( )

研究者番号 :