

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 6 月 5 日現在

機関番号： 14101
 研究種目： 研究活動スタート支援
 研究期間： 2011 ～ 2012
 課題番号： 23890082
 研究課題名（和文） 食品含有ナノ粒子による腸管免疫機構の破綻を介した消化管炎症反応の
 解明とリスク評価
 研究課題名（英文） Analysis and risk assessment of intestinal inflammation induced by
 food-containing nanoparticles.
 研究代表者
 及川佐枝子（多田佐枝子）(OIKAWA SAEKO)
 三重大学・地域イノベーション学研究所・特任助教
 研究者番号： 90610585

研究成果の概要（和文）：食品に含有するナノ粒子の消化器系における炎症反応の誘導作用を
 解明するため、ヒトマクロファージ様細胞THP-1および大腸腺癌細胞Caco-2を用い、ナノ粒子
 曝露による生存率の変化、活性酸素種（ROS）および炎症性サイトカインの産生について解析
 を行った。二酸化チタンのナノ粒子曝露により、ROSおよび炎症性サイトカインIL-1 β の産生
 が増加する傾向が認められた。また一次粒径が同程度でも、酸化亜鉛の方が二酸化チタンより細
 胞の生存率の低下およびROSの産生を誘導する事が認められ、粒子の種類により細胞毒性作用、
 炎症反応誘導の機構に違いがあることが示唆された。

研究成果の概要（英文）： The present study investigated the cytotoxicity, production of reactive
 oxygen species (ROS) and inflammatory cytokine induced by nano-TiO₂ and nano-ZnO particles using
 human monocytic leukemia cells (THP-1) and human colon cancer cells (Caco-2). The viability of
 THP-1 macrophages exposed to nano-ZnO was lower than that to nano-TiO₂ THP-1. The production
 of ROS and IL-1 β showed a tendency to be increased by nano-TiO₂ particles. This study indicated
 that nano-TiO₂ particles may induce inflammation in THP-1 macrophages through production of ROS
 and IL-1 β , and nano- ZnO particles were suggested to be more toxic to THP-1 macrophages than
 nano-TiO₂.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2012 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,500,000	750,000	3,250,000

研究分野：衛生学、社会医学

科研費の分科・細目：衛生学

キーワード：ナノ粒子、二酸化チタン、酸化亜鉛、炎症

1. 研究開始当初の背景

近年、ナノ粒子製品として二酸化ケイ素（シリカ）や二酸化チタン、酸化亜鉛が広く用いられ、化粧品や食品、さらに医薬品にも使用されている。ナノ粒子製品として扱われている二酸化ケイ素は、主に非晶質性であり、これまで健康に悪影響を及ぼさないと考えられていた。しかし最近、ナノ粒子の非晶質二酸化ケイ素のマウス腹腔内投与により、マクロファージにおいて炎症性サイトカインの産生、酸化ストレスおよび一酸化窒素（NO）レベルの増加が引き起こされるとの報告がなされた（Park, *Toxicology Let*, 2009）。またナノサイズの二酸化チタン（TiO₂）は、これまでアナターゼ型二酸化チタンナノ粒子の曝露により、ヒト肺胞上皮細胞やマウス肝細胞における炎症性サイトカイン産生（Cui, *J Biomed Mater Res A*, 2011）、またルチル型二酸化チタンナノ粒子についてもラットへの投与で肺胞中のマクロファージ増加など（Nemmar, *Exp Biol Med*, 2007）、炎症反応を誘導する事が示されている。さらに、ナノサイズの酸化亜鉛（ZnO）は、ヒト大腸腺癌細胞などで細胞毒性作用が示されている（Angelis, *Nanotoxicology*, 2012）。ナノレベルの粒子は表面積が大きく、粒子そのものの表面性状が毒性に関連しており、活性酸素の産生、さらに酸化ストレスや炎症反応を惹起すると指摘されている（Nel, *Nat Mater*, 2009）。

近年我が国では、潰瘍性大腸炎やクローン病などの炎症性腸疾患（IBD）の罹患率が増加している。炎症性腸疾患は、腸内細菌叢に対する免疫応答機構の破綻に加え、遺伝因子や食餌、ストレスなどの環境因子が関与する多因子疾患であることが示されている（Loftus, *Gastroenterology*, 2004）。経口に

より取り込まれたナノ粒子は、消化管内腔の粘膜を通過し、腸上皮細胞および腸管免疫に重要な役割を果たしているパイエル板の microfold cell (M-細胞) に取り込まれると報告されている（Powell, *J Autoimmun*, 2010）。以上から、ナノ粒子は炎症性腸疾患誘導の過程で炎症反応を増強する可能性が強く示唆される。しかし現在、ナノ粒子として使用されているサイズの二酸化ケイ素の安全性評価は進んでおらず、生体影響については不明な点が多い。特に、消化管におけるナノ粒子の炎症反応誘導作用については未だ明らかにされていない。

2. 研究の目的

食品因子として消化管に取り込まれた二酸化ケイ素や二酸化チタン、酸化亜鉛のナノ粒子は、炎症反応の増強物質として腸管免疫機構の破綻を引き起こし、炎症性腸疾患の発症・増悪に関与する可能性が考えられる。従って本研究では、ヒトマクロファージ様細胞 THP-1 とヒト大腸腺癌細胞 Caco-2 を用い、消化管における炎症反応誘導作用について解析を行う。また、炎症性腸疾患モデルマウスを用いて、各種ナノ粒子の経口投与による大腸炎増悪作用についても解析を行う。

3. 研究の方法

(1) 各種ナノ粒子の分散評価

ナノ粒子は、その種類と溶媒によって様々な凝集パターンを形成することから、実験に用いるナノ粒子の分散状態の評価を行う必要がある。各種ナノ粒子（二酸化ケイ素、二酸化チタン、酸化亜鉛）に培地を加え、超音波破碎装置を用いて分散後、動的光散乱法（Dynamic Light Scattering : DLS）により粒度の測定を行

った (Malvern 社, Zetasizer Nano Z)。

(2) 各種ナノ粒子による細胞毒性作用の解析

各種ナノ粒子による細胞毒性作用を明らかにするため、ナノ粒子をヒトマクロファージ様細胞およびヒト大腸腺癌細胞に曝露し、MTS assay (CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay, Promega) により生存率の変化を解析した。

(3) 各種ナノ粒子による細胞内活性酸素種 (ROS) 産生の解析

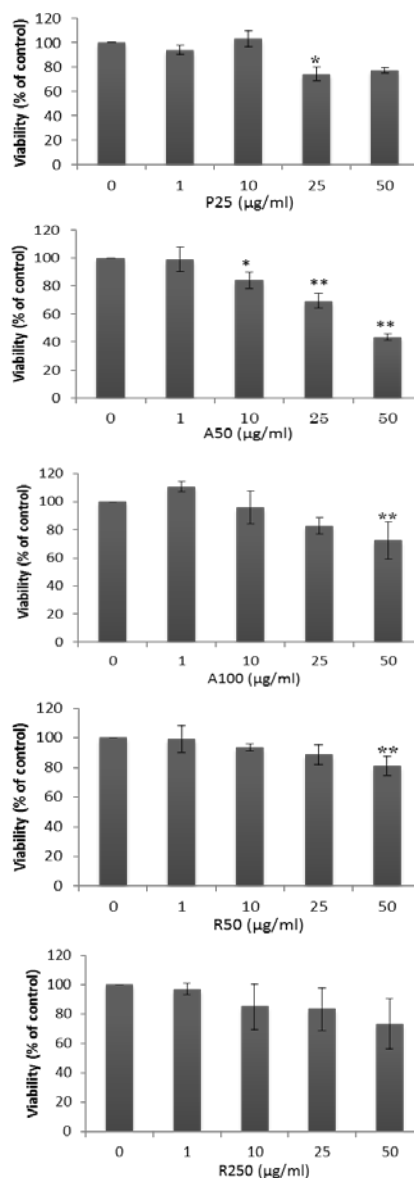
ナノ粒子をヒトマクロファージ様細胞およびヒト大腸腺癌細胞に曝露し、細胞内 ROS の検出プローブ、CM-H₂DCFDA (5-(and-6)-chloromethyl-2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate, acetyl ester) で染色後、フローサイトメーター (FACS CantoII, BD) を用いて解析した。

(4) 各種ナノ粒子による炎症関連サイトカイン産生の検出

THP-1 マクロファージ様細胞を、分散させたナノ粒子で 3 時間処理後、培養上清を回収し、ELISA 法により炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を解析した

4. 研究成果

(1) アナターゼ型粒子 (一次粒径, A50 : 50nm, A100 : 100nm) の 24 時間曝露により、THP-1 マクロファージ様細胞の生存率の低下が認められ、ルチル型粒子 (一次粒径, R50 : 50nm, R250:250nm) でも、R50 により高濃度で低下が認められた。Caco-2 細胞では、24 時間曝露ではどの粒子でも生存率の低下は認められなかったが、72 時間曝露で P25 (一次粒径 21nm, アナターゼ型 80%/ルチル型 20%) およびアナターゼ型粒子 (A50, A100)、またルチル型粒子 (R50) でも高濃度で低下が認められた (図 1)。



Values are means \pm SD

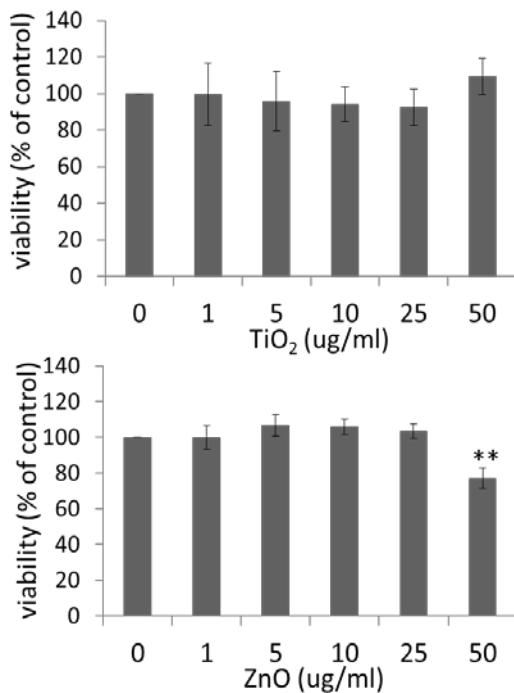
** $p < 0.01$; * $p < 0.05$: significant differences from controls (0 $\mu\text{g/ml}$) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test

図 1 二酸化チタンによる Caco-2 における生存率の変化 (72 時間曝露)

(2) 細胞内活性酸素種の産生を CM-H₂DCFDA 染色により解析した結果、どのナノ粒子においても増加する傾向にあった。

(3) THP-1 マクロファージ様細胞において、どの二酸化チタンのナノ粒子についても ROS および炎症性サイトカイン IL-1 β の産生を増加させる傾向が認められた。

さらに、二酸化チタンと酸化亜鉛について THP-1マクロファージ様細胞における生存率への影響およびROSの産生を比較した。同程度の粒子径でも酸化亜鉛の方が二酸化チタンよりマクロファージ様細胞の生存率の低下(図2)、ROSの産生量の増加を引き起こす事が認められた。本研究により、ナノ粒子は強い細胞毒性作用がなくても炎症反応を引き起こす可能性が示唆された。また、同じサイズの粒子でも、種類の違いにより細胞毒性作用、炎症反応誘導作用の違いが認められた。現在さらにナノ粒子の種類、サイズの違いによる影響についての解析を行っており、炎症性腸疾患モデルマウスを用いた消化管炎症の増強作用についても検討していく予定である。



Values are means \pm SD

** $p < 0.01$: significant differences from controls (0 μ g/ml) by one-way ANOVA with Dunnett's post-comparison test

図2 酸化亜鉛、二酸化チタンのナノ粒子曝露による THP-1 マクロファージ様細胞における生存率の変化

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. Yamaguchi T, Kitamori K, Ichihara G, Suzuki Y, Ochiai M, Yamada Y, Tada-Oikawa S, Tsuchikura S, Yamori Y, Ichihara S. Serial changes in adipocytokines and cardiac function in a rat model of the metabolic syndrome. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, 査読有, 2013, 印刷中
2. Chang J, Oikawa S, Ichihara G, Nanpei Y, Hotta Y, Yamada Y, Tada-Oikawa S, Iwahashi H, Kitagawa E, Takeuchi I, Yuda M, Ichihara S. Altered gene and protein expression in liver of the obese spontaneously hypertensive/NDmcr-cp rat. 査読有, *Nutrition & Metabolism (Lond)*. 9 巻1号, 2012, pp.87-97, DOI: 10.1186/1743-7075-9-87.

[学会発表] (計16件)

1. 及川(多田)佐枝子、鈴木悠加、出岡淑、市原学、市原佐保子、ナノ酸化亜鉛によるマクロファージの変性LDL取り込み作用への影響、第83回日本衛生学会学術総会、金沢、2013年3月25日
2. 鈴木悠加、及川(多田)佐枝子、出岡淑、市原学、市原佐保子、ナノ酸化亜鉛による血管内皮障害への影響、第83回日本衛生学会学術総会、金沢、2013年3月25日
3. 呉雯婷、市原学、及川(多田)佐枝子、鈴木悠加、常杰、橋本直純、長谷川好規、ガバザコリナ、ガバザエステバン、市原佐保子、ナノ酸化亜鉛が、ブレオマイシンによって誘導されるマウスの肺線維症に与える影響、第83回日本衛生学会学術総会、金沢、2013年3月25日

4. Yuka Suzuki, Saeko Tada-Oikawa, Gaku Ichihara, Sahoko Ichihara, Zinc oxide particles induced migration of monocytes and increased macrophage cholesterol uptake. 52th Annual Meeting SOCIETY OF TOXICOLOGY, San Antonio, USA, 2013年3月13日
5. 鈴木悠加、及川(多田)佐枝子、出岡淑、市原学、市原佐保子、ナノ酸化亜鉛による単球遊走作用とマクロファージのコレステロール取り込み作用への影響、第12回分子予防環境医学研究会、筑波、2013年2月1日
6. 常杰、市原学、及川(多田)佐枝子、島田康人、田中利男、市原佐保子、The effects of metal oxide nanoparticles on angiogenesis in transgenic zebrafish. 第12回分子予防環境医学研究会、筑波、2013年2月1日
7. Wenting Wu, Gaku Ichihara, Yuka Suzuki, Kiyora Izuoka, Saeko Oikawa-Tada, Jie Chang, Kiyoshi Sakai, Kunichi Miyazawa, Dale Porter, Vincet Castranova, Masami Kawaguchi, Sahoko Ichihara. Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. 第40回産業中毒・生物学的モニタリング研究会、東京、2012年11月16日
8. Saeko Tada-Oikawa, Masayuki Yabata, Kiyora Izuoka, Jie Chang, Yuka Ota, Wenting Wu, Sahoko Ichihara, Gaku Ichihara, Cytotoxicity and inflammatory responses induced by nano-sized metal oxide nanoparticles in human monocytic leukemia cells. International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies, Helsinki, Finland, 2012年10月29日
9. Saeko Tada-Oikawa, Sahoko Ichihara, Kiyora Izuoka, Masayuki Yabata, Jie Chang, Yuka Ota, Wenting Wu, Gaku Ichihara. Cytotoxicity induced by nano-sized titanium dioxide in human monocytic leukemia cells (THP-1). International Union of Materials Research societies-International Conference on Electronic Materials 2012, Yokohama, 2012年9月24日
10. Wenting Wu, Gaku Ichihara, Yuka Suzuki, Kiyora Izuoka, Saeko Oikawa-Tada, Jie Chang, Kiyoshi Sakai, Kunichi Miyazawa, Dale Porter, Vincet Castranova, Masami Kawaguchi, Sahoko Ichihara. Dispersion Method for Safety Researches on Manufactured Nanomaterials. International Union of Materials Research societies-International Union of Materials Research societies-International Conference on Electronic Materials 2012, Yokohama, 2012年9月26日
11. Sahoko Ichihara, Saeko Tada-Oikawa, Masayuki Yabata, Kiyora Izuoka, Jie Chang, Yuka Ota, Wenting Wu, Gaku Ichihara. Cytotoxicity and inflammatory responses induced by nano-sized metal oxide nanoparticles in human monocytic leukemia cells. The 6th International Conference on Nanotoxicology, Beijing, China, 2012年9月5日
12. Wenting Wu, Gaku Ichihara, Yuka Suzuki, Kiyora Izuoka, Saeko

Oikawa-Tada, Jie Chang, Kiyoshi Sakai, Kunichi Miyazawa, Dale Porter, Vincet Castranova, Masami Kawaguchi, Sahoko Ichihara. Dispersion method for safety research on manufactured nanomaterials. The 6th International Conference on Nanotoxicology, Beijing, China, 2012年9月5日

- 1 3. Wenting Wu, Sahoko Ichihara, Saeko Tada-Oikawa, Jie Chang, Gaku Ichihara. Dispersion method for in vivo safety reseaches on manufactured nanomaterials. The 6th International Congress of Asia Society of Toxicology, Sendai, Japan, 2012年7月20日
- 1 4. Sahoko Ichihara, Jie Chang, Saeko Tada-Oikawa, Chisa Ando, Kentaro Kuzuya, Gaku Ichihara, Shinji Oikawa. Oxidative modification leads to the left ventricular dysfunction in cardiomyopathy. The 49th Congress of the European Societies of Toxicology, Stockholm, Sweden, 2012年6月19日.
- 1 5. 及川(多田)佐枝子、呉雯婷、市原学、常杰、矢端将行、及川伸二、市原佐保子：二酸化チタンナノ粒子による細胞毒性作用および炎症反応誘導作用の解析、第85回日本産業衛生学会、名古屋、2012年5月31日
- 1 6. 呉雯婷、市原佐保子、常杰、及川(多田)佐枝子、太田有香、矢端将行、市原学、工業ナノマテリアル安全性研究のための分散法、第85回日本産業衛生学会、名古屋、2012年5月31日

6. 研究組織

(1)研究代表者

及川佐枝子(多田佐枝子)

(OIKAWA SAEKO)

三重大学・地域イノベーション学研究所・

特任助教

研究者番号： 90610585