

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：54101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24710035

研究課題名(和文) 哺乳類動物細胞の生理機能を利用した鉄鋼資材の環境負荷度評価

研究課題名(英文) The environment assessment of iron and steel using physiological change of mammalian cells

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・講師

研究者番号：90455139

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：鉄鋼には、亜鉛やニッケルといった生体金属が多数使用されており、鉄鋼からの生体金属類が環境に及ぼす影響が懸念されている。しかし、それらの有効な評価法は確立されていない。本研究では、哺乳動物細胞の生理機能を用いて鉄鋼資材のための簡便な環境負荷評価法の構築をめざし、チャイニーズハムスター肺由来細胞V79の細胞増殖能を指標とした評価系を確立した。続いて構築した評価系で鉄鋼資材の環境負荷度を検討した結果、鉄鋼の腐食の進行に伴って細胞増殖が抑制されることが分かった。

研究成果の概要(英文)：Essential metals such as zinc and nickel are used for the iron and steel and they may affect on the environment. However, an effective method for evaluating steel has not been established. In this study, we established a simple environmental assessment method for the iron and steel using physiological measurement of mammalian cells. Chinese hamster lung-derived cell, V79, was the most sensitive to concentration change of zinc, nickel and chromium (VI), and V79 was suitable cell for quantitative assessment of the iron and steel. In addition, this method was revealed that corrosion of iron and steel would correlate with the index of proliferation of V79.

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：環境学・環境影響評価・環境政策

キーワード：影響評価手法 鉄鋼 生体金属

1. 研究開始当初の背景

鉄鋼には、クロムやニッケルを添加して耐食性を付与したステンレス鋼や、亜鉛めっきなどの表面加工処理を施して高機能付加されたものなど、用途に応じて様々な鋼がある。こうした鉄鋼用の添加剤や表面加工で使用されている金属には、生体内で組織・臓器の機能維持に重要な役割を担っているもの(生体金属)が多い。例えば、亜鉛は多くの加水分解反応に関連した酵素にみられるし、発生や分化を司る遺伝子制御でも重要な役割を担っている。また、クロムやニッケルは、種々の代謝調節に関与している。一方で、こうした「生体金属」は、その化合物状態や金属濃度によって生体に炎症やガンなどの悪影響を引き起こす場合もある。これを受け、ヨーロッパを中心として、世界的に生体金属である亜鉛やニッケル、クロムの使用を規制する動きがある。例えば、EUでは化学物質リスク評価が実施され、それはREACH規制に反映されている。日本では近年、水質汚濁の生活環境基準に亜鉛が追加され、中国では、食用農産物産地の総量基準に亜鉛やニッケル、クロム等の評価が策定されている。このように、人類の健康はもちろん、環境保護や保全のため、今後ますます環境負荷が軽減された鉄鋼需要は高まっていくと予想される。

これまで、多くの研究者が個々の生体金属に対する生理機能や生体毒性について調査した結果、生体金属は、生体内での化合物状態とその濃度が生体機能に大きく影響することが分かってきた。このことは、ある鉄鋼資材の環境負荷度を評価する場合には、鉄鋼資材の劣化で生じた生体金属の溶出量、そして金属化合物の状態変化の程度を把握することが重要であることを示している。

本研究代表者は先行研究にて、亜鉛一すず合金めっき加工した炭素鋼について、めっきの合金化温度が哺乳動物細胞のコロニー形成能(細胞増殖能)に与える影響について調査した。その結果、亜鉛一すず合金めっき表面が亜鉛リッチの場合、細胞のコロニー形成が抑制されたのに対し、亜鉛一すず合金めっき表面がすずリッチの場合または酸化亜鉛リッチの場合、細胞のコロニー形成は影響を受けなかった。このとき、亜鉛一すず合金めっき炭素鋼から溶出した金属濃度について、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)で測定したところ、細胞のコロニー形成阻害は、溶出した亜鉛濃度と相関があることが分かった。以上のことから、哺乳動物細胞のコロニー形成能を利用し、すず一めっき合金の表面形状の違いが環境に与える影響の程度(環境負荷度)が簡便に評価できることが分かった。

そこで本研究では、哺乳動物細胞のもつ様々な生理機能を利用し、各種鉄鋼資材から溶出する生体金属やそ(れら)の化合物状態の変化が生体に与える影響について、簡便かつ定量的な評価法の構築を目指した。その結

果得られたデータは、新たな環境負荷軽減型鉄鋼資材の設計に役立つものである。

2. 研究の目的

(1) 哺乳動物細胞の生理機能を用いて、鉄鋼資材のための簡便な環境負荷評価法を構築していく。

(2) 鉄鋼資材の物性分析を実施し、物性と環境負荷との関連性について解明していく。

以上により、環境負荷軽減に有効な鉄鋼資材設計が可能となる。

3. 研究の方法

(1) 哺乳動物細胞の生理機能を用いた鉄鋼資材のための簡便な環境負荷評価法を構築していく

鉄鋼資材に使用される亜鉛やニッケルなどの金属が生体金属として、哺乳動物細胞の生理機能維持に働くことに着目し、こうした金属が作用した時の生理活性変化を定量的に検出する評価系を利用した。

まず、この目的に適した哺乳動物細胞を選定した。次に、「光化学反応」と「顕微鏡画像」を利用した検出系で生理活性変化を定量した。

(2) 鉄鋼資材の物性分析と環境負荷との関連性について

(1)で構築した哺乳動物細胞の生理活性評価系を利用し、鉄鋼資材の環境負荷度を評価した。環境負荷が問題となるのは、鉄鋼資材の劣化・腐食によって金属が溶出するからだと考えられるため、培養器を半透膜で上下に分離し、上部に鉄鋼資材の切片を入れ、下部に哺乳動物細胞を入れ培養し、細胞の生理活性変化を計測した。

続いて、生理活性変化が確認された時点で培養系から鉄鋼資材を取り出し、鉄鋼資材の物性分析を実施した。物性分析については、蛍光X線分析装置とレーザー顕微鏡による表面分析を行い、誘導結合プラズマ発光分光分析装置(ICP-AES)による培養液中の生体金属濃度を測定した(三重県工業研究センターの樋尾博士の協力)。

4. 研究成果

(1) 哺乳動物細胞の生理機能を用いた鉄鋼資材のための簡便な環境負荷評価法を構築していく

我々は、V79、HepG2およびPC-12という3種の哺乳動物細胞を使用した。V79はチャイニーズハムスター肺由来細胞、HepG2はヒト由来肝実質細胞(理研細胞バンク)、PC-12はラット副腎髄質由来褐色細胞(理研細胞バンク)である。各々の培養系に、硫酸亜鉛あるいは塩化ニッケルを添加した結果、金属イオン濃度が高くなるにつれて、紡錘状形態を示す細胞の割合が減少し、球状形態を示す細胞が増加した(図1)。

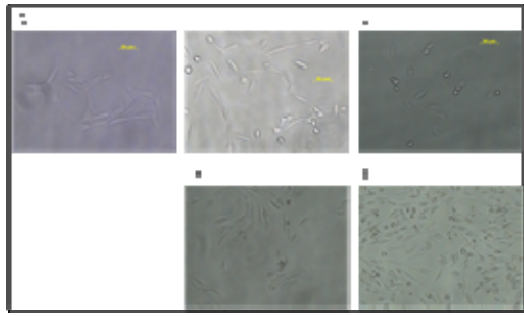


図1 ニッケル濃度添加に伴う V79 細胞の形態変化 (A はコントロール、B - C: 硫酸亜鉛添加; B は 83 μM 、C は 125 μM 、D - E: 塩化ニッケル添加; D は 44 μM 、E は 174 μM)

この時、各金属濃度下で培養した細胞の平均面積を比較した結果、硫酸亜鉛添加については、細胞面積の減少と亜鉛濃度との間で高い相関が確認された。一方、塩化ニッケル添加については、ニッケル濃度の増加とともに細胞面積の減少が確認されたものの、その濃度との間に相関性は無かった。

続いて、細胞増殖を指標として試験した。各金属濃度における V79 の生細胞数を比較した結果、硫酸亜鉛添加または塩化ニッケル添加により生細胞数は減少し、金属イオン濃度との間で高い相関が得られた。なお、初めて生細胞数が減少を示した金属イオン濃度は、硫酸亜鉛添加した場合の方が塩化ニッケル添加の場合よりも低かった。一方、細胞生存を指標とした試験については、硫酸亜鉛添加と塩化ニッケル添加どちらの場合においても生存率の減少が確認された。しかしながら、初めて生存率が減少を示した金属濃度は、初めて生細胞数の減少が確認された濃度より高く、また生存率との相関性も低かった。また、3種類の細胞間 (V79、HepG2 および PC-12) で亜鉛、ニッケルおよびクロム (VI) に対する増殖変化を比較した。亜鉛添加した場合、V79 が最も低濃度で増殖抑制され、PC-12 が最も高濃度で増殖抑制された。この時、細胞への亜鉛取り込み量を比較したところ、亜鉛取り込み能が高い細胞は細胞増殖抑制効果も強い傾向がみられた。一方、ニッケル添加した場合には、V79 が最も低濃度で増殖抑制され、HepG2 が最も高濃度で増殖抑制された。クロム (VI) については、V79 と PC-12 が同濃度で増殖抑制され、その濃度は HepG2 が増殖抑制された濃度よりも低かった。

以上の結果から、亜鉛検出やニッケル検出に適した生理機能は、細胞増殖であり、検討した3種の細胞のうち亜鉛、ニッケルおよびクロム (VI) に対する感受性が最も高い細胞は、V79 であることが分かった。

(2) 鉄鋼資材の物性分析と環境負荷との関連性について

(1) より、V79 細胞の細胞増殖を指標とし、SUS304、SS400、SK4 および鉄板 (純度 99%) の各種圧延板 (1 - 2 mm 厚) について鉄鋼資材の分析を行った。試験した鉄鋼資材

は、SUS304 を除き、腐食しているのが確認された。また、細胞増殖については、コントロール (鉄鋼資材なし) 培養と比較して、腐食した鉄鋼資材が存在した方が少なかった。さらに、腐食した鉄鋼資材間については、溶出したマンガン量が多い場合に細胞増殖が強く抑制されていた。

以上により、V79 の増殖抑制効果は鉄鋼の腐食の進行に伴って大きくなること、また腐食に伴って培養液中に溶出された金属のうち、特にマンガン溶出量が多い場合に増殖抑制効果が高い傾向になることが分かった。

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 2 件)

① Satoshi Terada, Shinya Mizui, Yasuhito Chida, Masafumi Shimizu, Akiko Ogawa, Takeshi Ohura, Kyo-ichi Kobayashi, Saori Yasukawa, Nobuyuki Moriyama, Cryopreservative solution using rakkyo fructan as cryoprotectant, 23rd European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting: Better Cell for Better Health, 査読有, 7 巻, 2013, 105

② Akiko Ogawa, Shinya Mizui, Yasuhito Chida, Masafumi Shimizu, Satoshi Terada, Takeshi Ohura, Kyo-ichi Kobayashi, Saori Yasukawa, Nobuyuki Moriyama, Rakkyo fructan as a cryoprotectant for serum-free cryopreservation of mammalian cells, Journal of Bioscience and Bioengineering, 査読有, 掲載決定

[学会発表] (計 9 件)

① 小川亜希子、樋尾勝也、玉内秀一、兼松秀行、動物細胞を利用した鉄鋼材料から調製した溶出液中の亜鉛定量法、日本鉄鋼協会第 164 回秋季講演大会、2012 年 09 月 18 日、愛媛大学

② 小川亜希子、平井信充、樋尾勝也、玉内秀一、兼松秀行、亜鉛による細胞の形態変化の可視化と亜鉛定量への応用、第 64 回日本生物工学会大会、2012 年 10 月 23~25 日、神戸国際会議場

③ 丹羽祐太、小川亜希子、金属 (Zn, Ni, Cr) イオンが肝細胞の増殖に与える影響、日本鉄鋼協会第 165 回春季講演大会、2013 年 03 月 27~2013 年 03 月 29 日、東京電機大学

④ Satoshi Terada, Shinya Mizui, Yasuhito Chida, Masafumi Shimizu, Akiko Ogawa, Takeshi Ohura, Kyo-ichi Kobayashi, Saori Yasukawa, Nobuyuki Moriyama, Cryopreservative solution using rakkyo fructan as cryoprotectant, 23rd European Society for Animal Cell Technology (ESACT) Meeting: 2013 年 6 月 23~26 日、Lille (France)

⑤小川亜希子、兼松秀行、樋尾勝也、玉内秀一、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、日本鉄鋼協会第166回秋季講演大会、2013年9月17~19日、金沢大学

⑥小川亜希子、細胞機能を利用した亜鉛およびニッケル検出法、第26回日本動物細胞工学会2013年度大会、2013年7月18日~19日、ホテルフジタ福井

⑦寺村侑奈、市川美登里、小川亜希子、動物細胞の増殖を指標とした鉄鋼資材の評価方法、日本鉄鋼協会第167回春季講演大会、2014年3月21~23日、東京工業大学大岡山キャンパス

⑧寺村侑奈、市川美登里、小川亜希子、鉄鋼存在下での動物細胞(V79)の増殖、日本鉄鋼協会第167回春季講演大会、2014年3月21~23日、東京工業大学大岡山キャンパス

⑨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)、2014年9月9~11日、札幌コンベンションセンター

〔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〕

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・講師

研究者番号：90455139

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし