

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 9 日現在

機関番号：15201

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2016

課題番号：26713025

研究課題名(和文) ZnOナノ粒子による毒性機序解明に関する法医学的研究

研究課題名(英文) Toxicity evaluation of ZnO nanoparticles

研究代表者

藤原 純子 (Fujihara, Junko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号：20346381

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 17,000,000円

研究成果の概要(和文)：ZnOナノ粒子はガンの診断や、ドラッグデリバリーの担体として応用が期待されている。ZnOナノ粒子の静脈内投与後の毒性影響 p型、n型の毒性の差異を明らかにした。

ZnOナノ粒子の静脈内投与により酸化亜鉛ナノ粒子は投与後早期に肝障害を引き起こすことが示された。また本研究で初めて酸化亜鉛ナノ粒子の炎症促進反応が明らかになり、酸化ストレスが関与することが示唆された。L929細胞におけるZnOナノ粒子の毒性はp型に比較してn型で強く、これはn型の還元作用によりROSがより生成されたためだと考えられる。また細胞中Zn濃度はn型が高く、細胞透過性の差異の関与も考えられる。

研究成果の概要(英文)： Tissue distribution of ZnO nanoparticles(NPs)and toxic effects were investigated after intravenous exposure in mice.The spleen, liver, and lungs are target organs. A dose-dependent increase in 8-OHdG was observed. The elevated levels of TNF- and IL1- in supernatants of spleen cell cultures of mice treated with ZnO NPs were observed. The serum GOT, GPT, and LDH levels increased by ZnO NPs treatment.SOD activities were elevated.These results show the ZnO induced pro-inflammatory response which may be related to oxidative stress, and to show hepatic damage.

Using L929 cells,cytotoxicity of n-type ZnO NPs and p-type NPs was investigated. Increased H2O2 and decreased glutathione were more evident in with n-type.Caspase-3/-7 activity was higher in cells treated with n-type ZnO NPs .The cellular Zn uptake of n-type ZnO NPs was higher than p-type NPs. These results show that n-type ZnO NPs have higher toxicity than p-type ZnO NPs.This may be due to a reductive effect of n-type ZnO NPs.

研究分野：法医学

キーワード：毒性評価 ナノ粒子 元素分析

1. 研究開始当初の背景

近年、酸化亜鉛 (ZnO) は LED やディスプレイなどの電子材料や光学材料として注目を浴びている。ZnO ナノ粒子は原料が豊富で安価で毒性が低い上に様々な特性を持つことから、抗菌剤、顔料、化粧品、ベビーパウダーなどの日用品に広く用いられている。ZnO ナノ粒子はバンドギャップが広く、室温で励起子が存在できるため UV 照射により青色に発光する。そのため、ガンの診断や、ドラッグデリバリーの担体として応用が期待されている。

Zn は必須元素であり毒性が低く、これまで ZnO ナノ粒子の *in vivo* における毒性影響は明らかになっていなかったが、最近の研究により経口投与、腹腔内投与による毒性影響が報告されている。ガン診断などのバイオイメージングに用いるためには静脈内投与を行う必要がある。しかしながら、これまでに ZnO ナノ粒子の 静脈内投与後の毒性影響 p 型、n 型の毒性の差異は明らかになっていない。

2. 研究の目的

(1) ZnO ナノ粒子をマウスに静脈内投与し、臓器内分布の精査 毒性影響の精査 (生化学データ・病理学的検査) ZnO ナノ粒子による毒性機序の解明 (酸化ストレスマーカー、炎症性サイトカイン) を行うことを目的とした。

(2) ZnO ナノ粒子には、p 型 (正孔を持つ) と n 型 (伝導電子を持つ) が存在するが、これらの毒性の差異は明らかになっていない。*in vitro* でのこれら ZnO ナノ粒子の毒性評価を行った。

3. 研究の方法

(1) 静脈内投与後の毒性影響評価

8 週齢の ICR マウスの尾静脈から酸化亜鉛ナノ粒子分散液 (Sigma-Aldrich) を 0.2 mg/kg で単回投与した。6, 12, 24, 48, 72, および 96 時間後に血液と各臓器を採取した (各群 $n = 6$)。血清を分離し生化学的データを測定し、Super Oxide Dismutase (SOD) を測定した。8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG) 量を測定するとともに、病理組織学的検査を行った。脾臓細胞を 40 時間培養後、培養上清を採取し TFN- α 、IL1- β 測定を行い、細胞から RNA を抽出し real-time RT-PCR により TFN- α と IL1- β の mRNA の発現レベルを測定した。

(2) *in vitro* での p 型、n 型の毒性の差異

ZnO ナノ粒子はガス中蒸発法で作製した。作成した粒子の観察を走査型電子顕微鏡 (SEM) により行った。マウス皮下結合組織由来の繊維芽細胞 (L929) を 96well プレートに播種し、各 ZnO (p 型、n 型) の細胞毒性強度 (IC₅₀ 値) を MTT assay により求めた。ZnO 50 μ g/ml を添加し、Total

ROS/superoxide detection kit により生細胞中の活性酸素種 (ROS) の産出を、HT colorimetric PARP/Apoptosis Assay を用いてアポトーシスをそれぞれ評価した。細胞中 Zn 濃度を microwave plasma-atomic emission spectrometer により定量した。

4. 研究成果

(1) 静脈内投与後の毒性影響評価

酸化亜鉛ナノ粒子分散液単回投与により、血中亜鉛濃度は投与後 5 分で最高値を示し、60 分後には投与前のレベルとなった。臓器中亜鉛濃度は、肝臓では投与後 6 日、脾臓では投与後 1 日で有意に上昇した (図 1)。

生化学的データでは、GOT、GPT、LDH 1

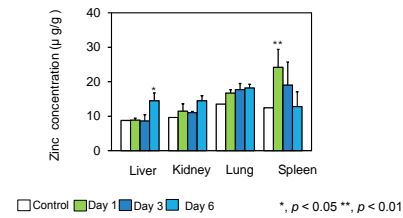


図 1. 臓器中 Zn 濃度

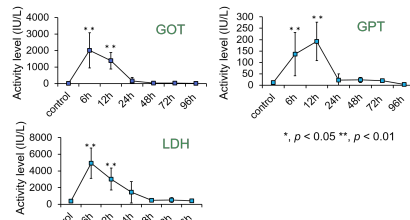


図 2. ZnO ナノ粒子投与後の生化学データ

が 6 時間、12 時間群で有意に上昇し ($p < 0.01$)、肝障害が示唆された (図 2)。一方、BUN と Cre に有意差は見られなかった。血清中 SOD 活性は 24 時間後、48 時間後に有意に上昇し

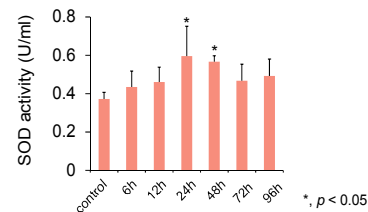


図 3. ZnO ナノ粒子投与後の SOD 活性

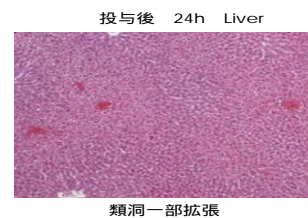


図 4. ZnO ナノ粒子投与後の肝臓の組織像

た($p < 0.05$) (図3)。尿中 8-OHdG は投与後 1 日で上昇した。病理学的検査では、肝臓で類洞一部拡張が投与後 1 日で観察された(図4)。培養上清中 TNF- α と IL1- β レベルは、24 時間後に有意に上昇し、これら mRNA の発現レベルも 12 時間後に有意に上昇していた(図5、図6)。

以上のことから、酸化亜鉛ナノ粒子は投与後早期に肝障害を引き起こすことが示された。また本研究で初めて酸化亜鉛ナノ粒子の炎症促進反応が明らかになり、酸化ストレス

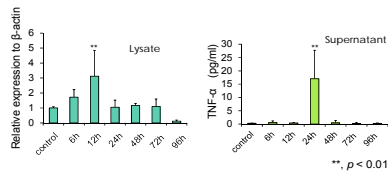


図5. ZnO ナノ粒子投与後の TNF- α mRNA 発現レベルと血清中 TNF- α

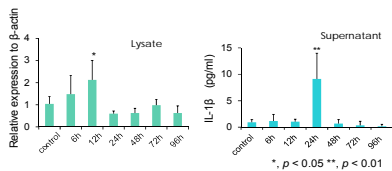


図6. ZnO ナノ粒子投与後の IL-1 β mRNA 発現レベルと血清中 IL-1 β

が関与することが示唆された。

(2) *in vitro* での p 型、n 型の毒性の差異

ガス中蒸発法で作製した p 型、n 型の ZnO ナノ粒子の形態を走査型電子顕微鏡(SEM)で観察した(図7)。その結果、これらの形態に差異はなかった。また粒子径はそれぞれ、40nm、41nm でサイズもほぼ同等であった。

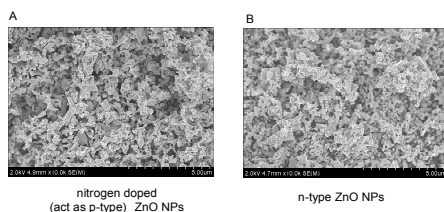


図7. ZnO ナノ粒子の SEM 像

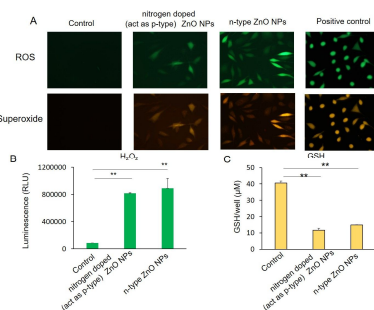


図8. ZnO ナノ粒子添加後の (A) 蛍光顕微鏡による ROS と superoxide の観察 (B) 細胞中 H₂O₂ (C) GSH レベル

p 型、n 型の ZnO ナノ粒子の IC₅₀ 値はそれぞれ、29.1 μ g/ml, 17.1 μ g/ml であった。また ROS と superoxide は両 ZnO ナノ粒子で生成されたが(図8A)、n 型でやや ROS が多く生成されていた。加えて細胞中 H₂O₂ は、n 型の ZnO ナノ粒子が p 型に比較して高く(図8B)、GSH の枯渇は両粒子で見られたが差異はなかった(図8C)。

caspase-3/7 は、アポトーシスに欠かせな

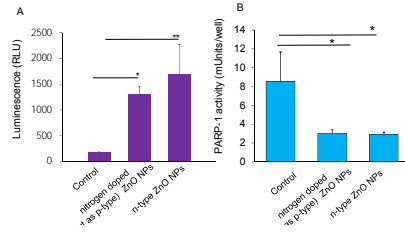


図9. ZnO ナノ粒子添加後の (A) caspase-3/7 activity (B) PARP-1 activity

いたんばくであるが、両 ZnO ナノ粒子により活性上昇が見られその程度は n 型で顕著であった(図9A)。また Poly (ADP-ribose) polymerase (PARP-1) 活性はアポトーシスにより低下することが知られるが両 ZnO ナノ粒子により低下が見られた(図9B)。

細胞中 Zn 濃度は n 型が p 型に比較して高

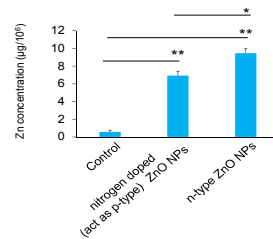


図10. ZnO ナノ粒子添加後の細胞中 Zn 濃度

値を示した(図10)。

p 型(正孔を持つ)は酸化作用を持ち、n 型(伝導電子を持つ)は還元作用を持つ。n 型がより毒性が強く ROS も多く生成されていた。これは n 型の還元作用により、フリーラジカルが産生されることで ROS がより生成されたためであると考えられる。また細胞中 Zn 濃度は n 型が高く、細胞透過性の差異の関与も考えられる。

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 13 件)

Fujihara J, Fujita Y, Yamamoto T, Nishimoto N, Kimura-Kataoka K, Kurata S, Takinami Y, Yasuda T, Takeshita H, Blood identification and discrimination between human and nonhuman blood using portable Raman spectroscopy. International Journal

of Legal Med 査読有 2017; 131(2): 319-322.
doi: 10.1007/s00414-016-1396-2.
Fujihara J, Nishimoto N, Yoshino K. Biocompatibility of GaSb thin films grown by RF magnetron sputtering. Applied surface science 査読有 2017; 409: 375-380.
http://doi.org/10.1016/j.apsusc.2017.03.099
Fujihara J, Yasuda T, Iwata H, Tanabe S, Takeshita H, Association of XRCC1 polymorphisms with arsenic methylation. Archives of Toxicology. 査読有 2016; 90(4): 1009-1012.
doi: 10.1007/s00204-015-1490-0.
Fujihara J, Kimura K, Yasuda T, Sano R, Kominato Y, Takeshita H. Association of a single nucleotide polymorphism (rs6180) in *GHR* gene with plural tissue weight. Journal of Genetics 査読有 2016; 95(1): 189-192.
Fujihara J, Ueki M, Kimura-Kataoka K, Iida R, Takeshita H, Yasuda T. Functional single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the genes encoding the human deoxyribonuclease (DNase) family potentially relevant to autoimmunity. Immunological Investigations 査読有 2016; 45(5):406-419.
doi: 10.3109/08820139.2016.1157813.
Fujihara J, Tongu M, Hashimoto H, Yamada T, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Fujita Y, Takeshita H, Distribution and toxicity evaluation of ZnO dispersion nanoparticles in single intravenously exposed mice. Journal of Medical Investigation 査読有 2015;62 (1, 2): 45-50.
doi: 10.2152/jmi.62.45.
Fujihara J, Tongu M, Hashimoto H, Fujira Y, Nishimoto N, Yasuda T, Takeshita H, Pro-inflammatory responses and oxidative stress induced by ZnO nanoparticles *in vivo* following intravenous injection. The European Review for Medical and Pharmacological Sciences 査読有 2015; 19 (24): 4920-4926.
Fujihara J, Yasuda T, Iida R, Ueki M, Sano R, Kominato Y, Inoue K, Kimura-Kataoka K, Takeshita H, Global analysis of genetic variations in a 56-bp variable number of tandem repeat polymorphisms within the human deoxyribonuclease I gene. Legal Medicine 査読有 2015;17(4): 283-286.
doi: 10.1016/j.legalmed.2015.01.005.
Nishimoto N, Fujihara J, Yoshino K, Kuninori K, Evaluation of ZnO-MgO Mixed Thin Films Grown by Metal-Organic Decomposition. e-J. Surf. Sci. Nanotech. 査読有 2015; 13: 185-189.
Nishimoto N, Fujihara J, Yoshino K, Growth of TiO₂-Nb₂O₅ mixed thin films by metal-organic decomposition. International

Journal of modern physics B 査読有 2015; 29, 1550215.
http://dx.doi.org/10.1142/S021797921550215X
Takeshita H, Fujihara J, Yasuda T, Kimura-Kataoka K. World-wide distribution of four SNPs in X-ray and repair and cross-complementing group 1 (XRCC1). Clinical and Translational Science 査読有 2015; 8 (4): 347-350.
doi: 10.1111/cts.12237.
Takeshita H, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Ueki M, Fujihara J. Distribution of the rs 3136794 polymorphism of the DNA polymerase β involved in the base excision repair pathway, in world-wide population. Indian Journal of Clinical Biochemistry 査読有 2015; 30: 445-448.
Tongu M, Hashimoto H, Yamada T, Kimura-Kataoka K, Yasuda T, Akiyoshi H, Fujira Y, Takeshita H, Fujihara J. Comparison of Acute Toxicity of ZnO and Silica-coated ZnO Nanoparticles in Mice after Single Intravenous Injection: Preliminary Experiment to Apply to Biological Imaging. Shimane J Med Sci ; 査読有 2014; 31(1): 7-11.

〔学会発表〕(計 14 件)

藤原純子、木村かおり、竹下治男、瀧波慶和、安田年博：ポータブルラマン分光器を用いた血痕の人獣鑑別法の予備的検討 第100次 日本法医学会総会・学術集会 2016,6月17日(東京)きゅりあん
藤原純子、藤田恭久、安田年博、長谷川正紀、竹下治男：p型およびn型半導体ZnO ナノ粒子の毒性評価 日本法中毒学会第35年会 講演要旨集, 2016, 7月26日(大阪)大阪産業創造会館
藤原純子、木村かおり、竹下治男、藤田恭久、安田年博：UV照射後のp型・n型酸化亜鉛ナノ粒子の毒性精査 第33回 日本法医学会中四国地方会. 2016, 10月1日(広島)広島大学医学部
藤原純子、竹下治男、木村かおり、藤田恭久、安田年博、倉田さつき：ポータブルラマン分光器を用いた非破壊の血痕検査法と人獣鑑別法の確立 日本DNA多型学会第25回学術集会 抄録集, 2016, 12月2日(柏)東京大学大気海洋研究所
Fujihara J, Tongu M, Hashimoto H, Fujira Y, Nishimoto N, Yasuda T, Takeshita H, Pro-inflammatory responses and oxidative stress induced by ZnO nanoparticles *in vivo* following intravenous injection. International Symposium on Environmental Chemistry and Toxicology – To accelerate a Global Network of Environmental Researchers. 2015, 19th March, (Matsuyama) Ehime Univ.
藤原純子、木村かおり、竹下治男、飯田

礼子、安田年博、佐野利恵、小湊慶彦：酸化亜鉛ナノ粒子の静脈投与後の毒性精査 第99次日本法医学会総会・学術集会 2015.6月12日(高知)かるぼーと
藤原純子、安田年博、竹下治男：DNAを修復するXRCC1多型とヒ素代謝との関連 第34回日本法中毒学会講演要旨集 2015,6月26日(福岡)九州大学医学部
藤原純子、木村かおり、竹下治男、安田年博、倉田さつき：DNase I遺伝子内VNTR多型頻度分布の世界比較 第32回日本法医学会中四国地方集会講演要旨集 2015,10月30日(岡山)岡山大学医学部
藤原純子、竹下治男、木村かおり、植木美鈴、安田年博、佐野利恵、小湊慶彦、倉田さつき：Growth hormone receptor (GHR)遺伝子におけるSNP(rs6180)と臓器重量との関連 第24回DNA多型学会学術集会抄録集 2015,11月20日(岡山)岡山大学津島キャンパス
藤原純子、竹下治男、木村かおり、植木美鈴、飯田礼子、安田年博、倉田さつき：尋常性乾癬など不全角化病変のリスクファクターとなるDNase I-like 2遺伝子におけるfunctional SNPsの同定 第24回DNA多型学会学術集会 2015, (岡山)岡山大学津島キャンパス
藤原純子、木村かおり、竹下治男、安田年博：酸化亜鉛ナノ粒子の静脈投与により毒性影響 第31回日本法医学会中四国地方集会 2014,11月1日(高松)アルファあなぶきホール
Nishimoto N, Fujihara J, Kitahara K, Yoshino K. Evaluation of ZnO-MgO mixed thin films grown by metal-organic decomposition. The 7th International Symposium on Surface Science. 2014, 4th November (Matsue) Kunibiki Messe
藤原純子、木村かおり、竹下治男、植木美鈴、安田年博：ヒ素のメチル化能に關与するXRCC1多型とその頻度の世界比較 日本DNA多型学会 第23回DNA多型学会学術集会 2014,11月27日(名古屋)ウインクあいち
藤原純子、竹下治男、木村かおり、植木美鈴、飯田礼子、安田年博、河合康幸：自己免疫疾患関連DNase I遺伝子におけるfunctional SNPs; 遺传的リスクファクターの検索 第23回DNA多型学会学術集会 2014,11月27日(名古屋)ウインクあいち

〔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

藤原 純子 (FUJIHARA, Junko)

島根大学・医学部・助教

研究者番号 20346381

(4) 研究協力者

竹下 治男 (TAKESHITA, Haruo)

島根大学・医学部・教授

研究者番号 90292599

藤田 恭久 (FUJITA, Yasuhisa)

島根大学・総合理工学研究科(研究院)・教授

研究者番号 10314618