

ナノ粒子の生体影響に対する抗酸化物質の効果

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2016-12-02 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 福井, 浩子 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12099/51018

ナノ粒子の生体影響に対する 抗酸化物質の効果

2014 年

岐阜大学大学院連合農学研究科
生物資源科学
(岐阜大学)

福井 浩子

ナノ粒子の生体影響に対する抗酸化物質の効果

福井 浩子

目次

第一章 緒論

1-1. ナノ粒子について	1
1-1-1. ナノ材料の定義	1
1-1-2. ナノテクノロジーの需要	1
1-1-3. ナノ粒子の安全性	2
1-2. 粉体(粉塵)による生体影響	4
1-2-1. アスベスト、シリカによる生体影響	4
1-2-2. 粉体による生体影響の個体評価	7
1-3. ナノ粒子による細胞毒性メカニズム	8
1-3-1. 細胞毒性評価項目	8
1-3-2. ナノ粒子による細胞毒性要因	10
1-4. 酸化ストレスと抗酸化物質	11
1-4-1. 酸化ストレスの定義	11
1-4-2. 生体内におけるフリーラジカル・活性酸素の発生	11
1-4-3. 酸化ストレスに対する生体内防御システム	12
1-5. 本研究の目的	13
図表	15

第二章 酸化亜鉛ナノ粒子の気管内注入によって誘導される

ラット肺の酸化ストレスと亜鉛イオン放出の関連性	26
緒言	26
実験材料および実験方法	29
1. 気管内注入用 ZnO ナノ粒子の分散液の調製とキャラクタリゼーション	29
2. ZnO ナノ粒子の気管内注入	30
3. BALF 中の LDH 活性の測定	31
4. BALF 中の tHODE の測定	32
5. BALF 中の HO-1 の測定	33
6. BALF 中の α -トコフェロール濃度測定	33
7. リアルタイム PCR	33
8. A549 細胞の培養	34
9. 細胞試験用 ZnO ナノ粒子分散液の調製	35
10. ZnO-DMEM-FBS 分散液のキャラクタリゼーション	35
11. 細胞生存率と細胞増殖率の測定	36
12. 細胞内 ROS レベルの測定	37
13. 細胞内 Zn^{2+} レベルの測定	38
14. 統計処理	39

結果	40
1. ZnO ナノ粒子(一次粒子)のキャラクタリゼーション	40
2. ZnO ナノ粒子の気管内注入によってラット肺組織中で引き起こされた酸化 ストレス	41
3. 培養細胞に対する ZnO ナノ粒子および ZnCl ₂ の曝露影響	42
4. ZnO ナノ粒子の曝露による細胞内 ROS と Zn ²⁺ レベル	43
考察	44
図表	51

第三章 ZnO ナノ粒子が引き起こす急性期ラット肺の酸化ストレスおよび

炎症に対するアスコルビン酸の防御効果	63
緒言	63
実験および実験方法	65
1. 気管内注入用 ZnO ナノ粒子分散液の調製とキャラクタリゼーション	65
2. ZnO ナノ粒子の気管内注入と AA の給水	65
3. BALF 中のバイオマーカーの測定	66
4. リアルタイム PCR	66
5. 血漿中の AA 濃度の測定	66

6. 統計処理	67
結果	68
1. ZnO ナノ粒子分散液のキャラクタリゼーション	68
2. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の傷害に対する AA 給水の効果	68
3. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の酸化ストレスに対する AA 給水の効果	69
4. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の炎症応答に対する AA 給水の効果	70
5. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の MT-1 遺伝子発現に対する AA 給水の効果	70
6. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット血漿中の AA 濃度の変化	70
考察	71
図表	75
第四章 ZnO ナノ粒子が誘導する細胞毒性に対する AA の防御的效果と そのメカニズム	81
緒言	81

実験材料および実験方法	83
1. ZnO ナノ粒子と細胞曝露用分散液の調製	83
2. A549 細胞の培養	83
3. 細胞内 ROS レベルの測定	83
4. リアルタイム PCR	84
5. A549 細胞内への AA 取込みの評価	85
6. A549 細胞内の Zn^{2+} レベルの測定	85
7. ZnO、 Zn^{2+} に対する AA の反応性の確認	86
8. 統計処理	87
結果	
1. ZnO ナノ粒子による細胞毒性に対する AA の効果	87
2. A549 細胞内への AA の取込み	88
3. 細胞内の Zn^{2+} 濃度に対する AA の効果	88
4. ZnO ナノ粒子および Zn^{2+} に対する AA の反応性	89
考察	89
図表	94
第五章 総合考察	104

謝辞	113
文献	114

第一章 緒論

1-1. ナノ粒子について

1-1-1. ナノ材料の定義

ナノ材料(ナノマテリアル)とは、少なくとも一次元がナノスケール(1-100 nm)の物質自体、もしくは内部あるいは表面構造中にナノスケールの物質を含む物質であるとISO/TS 27687(2008)によって定義されている。一般的に認識されている「少なくとも一次元が 100nm より小さい」物質は、ナノマテリアルの中におけるナノオブジェクトに該当し、更にナノオブジェクトにはナノ粒子、ナノファイバー、ナノプレートが属することとなる。一方で内部もしくは表面構造中にナノスケールの物質が含まれる物質をナノ構造物質と呼ぶ(図 1-1)。

1-1-2. ナノテクノロジーの需要

ナノテクノロジーとは、物質をナノスケールの領域において操作・制御する技術を指す。その技術はカーボンナノチューブ等の材料・半導体材料等のエレクトロニクス・高性能燃料電池等の環境エネルギー・ナノバイオデバイス等のバイオと多岐に渡って応用されている。経済産業省はナノテクノロジー分野の導入シナリオにおいて、① 世界に先駆けてナノテクノロジーを活用した非連続的な技術革新を達成し、ナノテクノロジーによる世界最先端のものづくり国家を目指す。② ナノテクノロジーを活用し、多

くの産業分野に資する高機能部材を数多く開発し、我が国産業の国際競争力の強化や解決困難な社会的課題を克服する。③ 知財、標準化等の国際的な枠組みで我が国のリーダーシップを発揮する。以上の3項目を2030年までの目標として掲げている。そのため、国際競争力の強化や知的基盤・環境整備等の研究開発の取り組み、あるいは関連施策の取り組みとして、人材育成や標準化の取り組みなどが各研究機関で現在行われている。(経済産業省 技術戦略マップ 2010 ナノテクノロジー分野)。更にナノテクノロジーの需要は、2010年現在の4兆2128億円に対して、2030年には26兆2645億円に拡大すると予測されている(経済産業省 平成17年度超微細技術開発産業発掘戦略調査「ナノテク関連市場規模動向調査」報告書)。

1-1-3. ナノ粒子の安全性

ナノテクノロジーの需要の増大に伴い、ナノ粒子の製造量も増加している。一般的にナノ粒子は、単位面積当りの比表面積が大きいことなどから、同じ化学式を持つ微粒子よりも物理的、化学的活性が大きいという特性により様々な工業用途へ応用されている。一方で、これらの工業的に有益なナノ粒子の特性は、毒性影響を含む生物学的影響を示す可能性も指摘されている。ナノオブジェクトによるヒト健康影響に関する特徴は、

1) サイズと表面積の関係・・・ナノオブジェクトはサイズが小さいため、重量当たりの表面積が大きいことにより、組成が同じであってもサイズの大きい物質とは異なる有害性を示すことが懸念される。

2) 表面活性等・・・ナノオブジェクト表面の荷電状況等の表面特性がナノオブジェクト自体の有害性に関与している可能性がある。

3) 形状等・・・ナノオブジェクトの有害性には、特に繊維状か否かといった、形状が関与していると見られている。

4) 皮膚の透過性・・・ナノオブジェクトの曝露経路の一つとして想定される経皮曝露に関連し、ナノオブジェクトの皮膚の透過性を示す報告がある。

5) 体内での分布、移動・・・ナノオブジェクト特異的な体内での分布、移動についての報告がある。

6) 毒性の発現機序・・・ナノオブジェクトの毒性の発現機序として、酸化ストレス及び炎症、細胞の傷害を引き起こすという指摘がある。

以上のように分類できる。それぞれの項目について報告されている代表的な事例を表1-1 にまとめた。このようにナノスケールの物質は、これまでに報告されている同じ化学組成でより大きなサイズの物質とは異なる有害性影響を持つ可能性が考えられることから、それぞれのナノオブジェクトが持つ有害性影響を正確に把握することが重要である。

1-2. 粉体(粉塵)による生体影響

1-2-1. アスベスト、シリカによる生体影響

1-1-3 に述べたようにナノオブジェクトは従来の大きなサイズの物質と比較して特異的な生物影響を持つ可能性がある。最もナノオブジェクトに曝露される機会が多いと考えられる場所はナノオブジェクトの製造現場やナノオブジェクトを使用した製品の加工現場であり、その曝露形態は空気中に舞い上がった原末や加工過程で出たナノオブジェクトを含んだ屑が空気中に舞い上がり、鼻や口から体内に取込まれると考えられることから、ナノオブジェクトによるヒトへの健康影響は主に呼吸器系を介する。これまでにも作業環境において呼吸器官より曝露された物質が、ヒトの健康に深刻な影響を及ぼした例がある。その代表的な例として、アスベスト関連疾患と珪肺が挙げられる。

アスベストは天然に存在するケイ酸塩で、耐熱性が高く、構造特性により建設や造船の材料、自動車のブレーキ、一部の織物に組み込むなど需要の多い材料であった。アスベストは粉砕や加工により長く細く柔軟で強い繊維に分離する石綿様形態の特性を持つ結晶であり、次の特徴を持つ (Sotoyama 2011)。

- a) 長さ 5 μm 以上の線維でアスペクト比 0 から 100 以上
- b) 通常 0.5 μm 以下の細い繊維へ縦方向に分裂する性質

上記に加えて、以下の特徴のいずれかが観察されることが、線維が石綿様形態であることの追加的確認となる。

- 平行に並ぶ繊維が集まった繊維束
- 端がほころびた繊維束
- 細い針状の繊維
- 個々の繊維がからみあった塊
- 曲率を持った繊維

アスベストは飛散すると空気中に浮遊しやすく、ヒトの肺胞に沈着しやすい特徴がある。

吸い込んだ石綿の一部は痰の中に混ざり体外へ排出されるが、肺に留まったアスベストは長く滞留し、肺の繊維化や肺がんの原因となり、更に、肺の外側にある胸膜に移行して悪性中皮腫などの原因となりうる(Abe et al., 2013)。アスベストの有害性のメカニズムは、肺における長期間の持続的な炎症により繊維化が生じ、さらに発生した活性酸素種により DNA が損傷された結果遺伝子異常が起こり、細胞ががん化すると考えられている。白石綿(クリソタイル)、青石綿(クロシドライト)、アモサ石綿(アモサイト)が疾患の原因となる3つの主なアスベストの種類が挙げられる。

珪肺症は結晶性シリカ(ケイ酸)の粉塵を吸入することで生じる職業性肺疾患の一種であり、塵肺の一種に分類される。珪肺は、最も古くから知られる職業性肺疾患で、結節を伴う肺上葉の炎症と瘢痕を特徴とする。炭鉱労働者や採石場労働者、研磨

作業員、ガラス職人などが珪肺のリスクが最も高い労働者として挙げられる。珪肺症の発症の要因には曝露期間および強度、ケイ素の形状（結晶形の曝露は結合形より大きなリスクをもたらす）、表面の特徴（コーティングが無いものの方が、コーティング有のものより大きなリスクをもたらす）、粉砕により塵が空中に浮遊してから吸入までの速さ（粉砕直後の曝露は遅延曝露より大きなリスクをもたらす）などがある（Iler 1979, IARC 1997）。吸入によって肺に取込まれた浮遊シリカは肺胞マクロファージによって包み込まれ、リンパ節や間質組織に入り込む（IARC 1997）。肺胞マクロファージはサイトカイン（TNF- α 、IL-1）、成長因子（TNF- β ）、ROS を放出し、肺実質の炎症とコラーゲンの合成を通じて、最終的には線維症を促す。本研究においても、関連試験として結晶性シリカをラットの気管内に注入し、注入から 3 日後までの急性期肺への影響を評価した（Fukui et al., 2014a）。その結果、結晶性シリカナノ粒子の気管内注入により、注入直後の肺では激しい傷害と脂質の酸化が認められた。しかしながらそれらの応答は注入から 3 日後には収束していたことから、珪肺症に見られるシリカが引き起こす肺への有害影響は、シリカの持続的な曝露が大きな要因となることが示唆された。

以上のように、アスベスト関連疾患および珪肺症はどちらも塵肺として認定されている肺に深刻な症状をもたらす疾患である。しかしながら、その疾患のメカニズムはそれぞれ異なり、その結果として引き起こされる症状も異なる。そのため、形状や表面

状態などの特性が多岐に亘るナノオブジェクトの吸入曝露によって引き起こされる症状も、曝露物質によって大きく異なる可能性が考えられる。

1-2-2. 動物による粉体の生体影響評価

粉体による生体影響を評価するためには、まず粉体を生体に曝露しなければならない。前項に述べたとおり粉体の生体への曝露経路として最も可能性が高い経路は呼吸器系である。生体に対する呼吸器系の曝露方法において、ヒトの曝露形態と同様の生理的投与であるのが吸入曝露法である。吸入曝露によって得られる有害性評価の結果は、ヒトの生体影響に関わる極めて重要な情報を提供する。しかしながら一方で、曝露装置として大型機器の設備、取扱者の熟練、安定した曝露物質の供給、など困難な要素が多く、また一度に多くの物質の有害性評価を行うことが不可能であるという難点がある。一方で、吸入物質のリスク評価においてより多用される方法として、気管内注入がある。対象物質を直接気管内に投与する気管内注入法は、低コストで実施でき、既知量投与による用量反応関係や生体反応機序の解明にも適している。その方法は動物を経気麻酔で十分に麻酔を浸透させた後、喉頭鏡にてラットを開口させ、ゾンデを気道に挿入し、シリンジ内の試料溶液を単回注入するといった簡便な操作である(図 1-2)。しかしながら一方で、気管への挿管やゾンデを挿入する深さなどが適切に行われなければ、曝露物質の肺胞への到達度が低下し、肺内での分布が不均

一になるなど、操作には熟練性が必要となる。また、同じ物質を曝露した際に吸入曝露と比較して異なる反応性を示す場合があることが確認されている (Morimoto et al., 2013)。表 1-2 に Morimoto らが報告した気管内注入と吸入曝露試験の結果の相違点を示した。相違点として気管内注入試験には Bolus effect による人工的反応、肺内分布の不均一性、肺からのクリアランスに閾値を認めないこと、肺以外の臓器への移行のうち、脳や胎児への沈着が少ないこと、分散剤の影響を認めることが挙げられた。上記の報告から気管内注入による有害性評価を行う際には、分散性の保持、至適投与量の決定、低濃度の分散剤使用が重要であると考えられる。

以上の注意点を踏まえて本研究ではナノ粒子の個体評価に対する評価を、気管内注入法を用いて実施した。筆者らが以前に実施したフラーレンの気管内注入試験における注入直後の肺内への到達量と各肺葉への分布度から、気管内注入の技術は十分に習得していると判断した (Shinohara et al., 2010)。

1-3. ナノ粒子による細胞毒性メカニズム

1-3-1. 細胞毒性評価項目

ナノ粒子による細胞毒性を評価するために、細胞毒性の指標となる毒性マーカーの選択が必須となる。1-1-3 項より、これまでに報告されているナノオブジェクトの毒

性の発現機序には、ROSの生成と酸化ストレスの誘導が深く関与していることが分かっている。このことから細胞毒性評価において細胞内におけるROSの生成および酸化ストレスを評価することが不可欠であると考えた。更にインビボ試験における炎症の誘導や、インビトロ試験におけるサイトカインの分泌の亢進などの報告から、炎症関連マーカーについても評価を行った。本研究においては細胞毒性評価として酸化ストレスおよび炎症関連マーカーを中心に評価を実施した。

細胞内のROS生成レベルの評価には、Dichlorofluorescein (DCFH)法を用いた(図1-3)。DCFH法では、DCFH-DAを細胞に処理することによって、DCFH-DAを細胞内に取込ませ、DCFHを細胞内エステラーゼにより脱アセチル化し非蛍光型のDCFHに変化させる。脱アセチル化されたDCFHは細胞膜を通過することなく、細胞内に留まる。DCFHは、ROSの存在により酸化され、蛍光物質であるDCFとなる。この蛍光強度を測定することで、細胞内のROSレベルを知ることができる。

ヘム分解酵素であるヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)は、活性酸素や重金属などによるストレスによって誘導されるストレス応答タンパクである。HO-1は酸化ストレスが原因と考えられている様々な疾病において発現異常が報告されていることから、HO-1の発現誘導には酸化ストレスが深く関わっていると考えられている(Choi et al., 1996)。更に、HO-1はROSの生成を促進して細胞傷害の悪化の原因となる遊離ヘムを分解する。この分解生成物である、COには抗アポトーシス作用が、フェリチンにはフ

ェントン反応抑制作用が、ビリベリジンには ROS の除去作用があり、HO-1 はヘムの分解によって細胞保護作用をもたらす。以上のことを踏まえ、本研究では HO-1 の遺伝子発現の挙動を酸化ストレスの指標と考えて評価を行った。

その他、評価を実施した細胞毒性評価項目は、炎症関連マーカーとして好中球遊走因子であるインターロイキン-8 (IL-8)、生細胞中のミトコンドリアの脱水素酵素活性をベースにした細胞生存評価方法である Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide (MTT)アッセイ、カドミウム、水銀、亜鉛、銀、銅、金などの金属によって合成が誘導される低分子の細胞質タンパクである(鉄では誘導されない)メタロチオネイン(MT)の遺伝子発現などについて評価を実施した。

1-3-2. ナノ粒子による細胞毒性要因

1-1-3 項に述べたように、ナノ粒子は同じ化学式を持つサイズの大きな粒子とは異なる生体影響を及ぼす可能性がある。Horie らは、工業ナノ粒子の生体影響メカニズムを調べるために、数種類のナノ粒子について細胞影響を調べた (Horie et al., 2012a)。その結果、ナノ粒子による細胞毒性メカニズムには、1) 溶解性の増大、2) 吸着性の増大、3) 表面活性の増大、4) 細胞への取込、4 つの要因が関与することが報告されている。特に「溶解性の増大」については、従来の大きいサイズの同じ物質では不溶性・難溶性であっても、ナノサイズの粒子となることで細胞培地中や生体液中にお

いて金属イオンを溶出するナノ粒子が存在する。培地中への金属イオンの溶出は、細胞生存率の低下や細胞内 ROS レベルの上昇との間に相関性を持つことが報告されている。NiO の例では、サブミクロン微粒子 (<100 nm) とナノ粒子はどちらも細胞内への取り込みが確認された一方で、溶解性の認められたナノ粒子でのみ細胞毒性が確認され、不溶性のサブミクロン微粒子では細胞毒性が認められなかったことから、細胞内へ取込まれたナノ粒子が、金属を放出することで ROS の生成が亢進され、細胞毒性影響が誘導されと考えられる(図 1-4)。

1-4. 酸化ストレスと抗酸化物質

1-4-1. 酸化ストレスの定義

生体内では常に酸化反応と抗酸化反応が起こっており、健康状態ではこれらのバランスがとれた状態となっている。しかしながら加齢やストレス、喫煙などによってこのバランスが崩れ、酸化反応が過剰に引き起こされることを酸化ストレス状態という。酸化ストレスは生体の不調や老化、疾病が惹起される原因となる。

1-4-2. 生体内におけるフリーラジカル・活性酸素の発生

酸化ストレスは、活性酸素種やフリーラジカル、金属、酸化酵素などによって惹起される。フリーラジカルは、安定している原子や分子から電子を一つ奪うことによって、

新たなフリーラジカルを生み出し連鎖反応を引き起こす。一方で活性酸素種は自らがフリーラジカルのもと、フリーラジカル反応の発生源になるものがある。生体内におけるフリーラジカル・活性酸素の発生について表 1-3 にまとめた。

1-4-3. 酸化ストレスに対する生体内防御システム

生体内では酸化反応に対して常に抗酸化反応も起こっている。図 1-5 に生体内の酸化毒性に対する防御システムの段階を表した。酸化毒性の進行に従って、その段階に適した抗酸化物質が働くことによって生体は酸化毒性から防御されている (Takahashi et al., 1998)。更に各段階で働く抗酸化物質を表 1-4 にまとめた。

本研究で使用した抗酸化物質のアスコルビン酸(AA、別名;ビタミン C)は、古くから壊血病を予防するビタミンとして知られてきた。1969 年以降に、生体ラジカルの研究の発展によって AA が内在性の水溶性抗酸化剤として活性酸素・ラジカル種の消去に優れた特性を持つことが明らかにされ (Nishikimi et al., 1975, Cabelli et al., 1983, Bendich et al., 1986, Frei et al., 1989)、今日では AA が動物、植物の酸化ストレス防御に重要な機能を果たすことが広く認識されている (Asada et al., 1992, Sauberlich. 1994, Shigeoka 1996, Jacob 1996)。AA が示す抗酸化作用には主として AA から酸化型 AA への酸化過程 (AA の電子供与過程) が関与しており、その際 AA は活性酸素種の消去という重要な役割も果たしている (Kurata 1998)。AA は生体内において生成す

ると考えられている各種の活性酸素、例えば一重項酸素($^1\text{O}_2$)、ヒドロキシラジカル($\cdot\text{OH}$)、過酸化水素(H_2O_2)などと反応し、それらの消去剤として作用することが知られている。AA は生体中において特に水系で生じるラジカルを捕捉して生体膜の酸化・傷害防止に役立っていると考えられるが、膜脂質部位など疎水的環境下で必要とされる抗酸化作用に関してもビタミン E などとの協力のもとに関与している。

1-5. 本研究の目的

工業ナノオブジェクトの市場の拡大に伴って、製造・加工工程における作業従事者のナノオブジェクトへの曝露機会は増加している。1-3-2 項に述べたように、工業ナノ粒子による細胞毒性影響にはナノ粒子から溶出する金属イオンが深く関与している(Horie et al., 2012a, 2012b)。特に酸化亜鉛(ZnO)、酸化銅(CuO)、酸化ニッケル(NiO)のような溶けるナノ粒子は、インビボ試験およびインビトロ試験のどちらにおいても酸化ストレスを誘導することが分かっている(Karlsson et al., 2008, Horie et al., 2011, Fukui et al., 2012, Toduka et al., 2012, Alarifi et al., 2013)。ナノ粒子による毒性影響やそのメカニズムが明らかになる一方で、その毒性に対する予防・防御に関する研究報告はない。そこで本研究では、溶けるナノ粒子の毒性影響と酸化ストレスの関与に注目し、細胞あるいは生体を酸化ストレスから防御することによって、溶けるナノ粒子が誘導する毒性影響を抑えることが出来ないか検討した。検討には工業的利用価値が

高く年間 480 t が使用される(2006 年 国内使用量)ZnO ナノ粒子を使用して、その毒性影響に対する予防・防御について研究した。

第二章ではラットを使用したインビボ(気管内注入)試験、および細胞を使用したインビトロ試験における ZnO ナノ粒子の生体および細胞への毒性影響を確認した。特に ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される酸化ストレスと、その要因と考えられる Zn^{2+} の溶出の関連性を調べると共に、メカニズムの解明を目指した。第三章では、第二章で確認した ZnO ナノ粒子による生体影響について、酸化ストレスを抑制することによって影響全体が抑えられるかどうかについて検討した。酸化ストレスの防御のために、ZnO ナノ粒子の気管内注入直後から AA 水溶液をラットに給水し、ZnO ナノ粒子が誘導する生体影響に対する AA の効果を確認した。第四章では ZnO ナノ粒子が引き起こす細胞毒性に対して、AA を細胞に処理することで毒性が抑えられるかどうか検証すると共にそのメカニズムの解明を目指した。これらの研究から、ナノ粒子による毒性の初期段階で起こる酸化ストレスの抑制によって、毒性全体の予防・防御が可能であるかを検証し、将来的にはナノ粒子の曝露によって起こりうるヒト健康への影響を、天然由来の抗酸化物質の摂取によって軽減することを目的とした。

表 1-1. ナノオブジェクトによるヒト健康影響に関する特徴

ナノオブジェクトのヒト健康影響に関する特徴について	
サイズおよび表面積の関係	• 同じ成分のより大きな粒子よりも、重量当たりの毒性が強い。 • 経気道投与した場合、重量よりも表面積が毒性あるいは病理学的な反応に対する良い指標になる。 • ナノスケールの二酸化チタン (TiO₂) の毒性は、粒子のサイズや表面積には関連が無く、特異な結晶構造および酸化活性の能力が重要である。(以上、U.S.EPA(2007))
	• 類似の性質を持つナノ粒子では、同じ投与量でも粒子径の低下、同じ投与量でも粒子径が小さくなることによって、つまり表面積が増大することによって毒性が大きくなる。一方で用量-作用関係は粒子の種類および科学特性によって異なる。 • ラットの試験では、同じ重量でも同じ化学組成のより大きな粒子と比較して、ナノ粒子の方が肺の炎症や組織の傷害および肺炎の誘発といった影響が大きく、難溶性で毒性の低い物質では、用量-作用関係は粒子の表面積で表された粒子サイズと一定の関係があった。 • 吸入毒性が小さいと思われるTiO₂等の粒子でも、粒子の表面の用量に応じて、肺の炎症、組織の傷害、線維化を示す。 • ヒトにおいて、大きな粒子に比べて、ナノ粒子は吸入されると呼吸器に沈着する率が高い。(以上、U.S.NIOSH(2006))
表面活性等	• ナノ粒子の毒性には多種類の要素が関与しており、サイズや形状、荷電状況といった表面特性等の物理化学的特性に影響されていることが分かっている。 • ナノスケールのTiO₂の毒性は、粒子のサイズや表面積では無く、特異な結晶構造および酸化活性の能力が重要な要因となっている。(以上、U.S.EPA(2007))
	• 動物実験の結果では、ナノ物質は単位重量当たりの表面積が大きいため、同じ化学組成のより大きな粒子よりも生物学的活性が大きい(以上、U.S.NIOSH(2006)) • ナノ粒子の荷電は、皮膚透過性の要因であり、樹状細胞やリンパ節を介して血液に達することが分かっている。 • ナノ粒子そのものの毒性は低くても、その毒性および酸化ストレスや炎症を誘導する能力は、ナノ粒子の表面積および反応性に由来する可能性が示唆されている。(以上、EC. SCENIHR(2007))

	- カーボンナノチューブ類の肺への影響に関する試験では、意図的に製造されたナノ物質はそれぞれ得意な毒性を示し、粒子の大きさのみでは説明できなかった。またナノスケールのTiO₂の毒性は粒子の大きさや表面積とは関係なく、特異な結晶構造及び酸化活性の能力が重要である。(U.S.EPA(2007)) - 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のような繊維状のナノ材料については、ラットの腹腔内注射により中皮腫の発現が確認されており、さらにそのへっ言には繊維の長さが関与する(一定の長さのものが短いものよりも中皮腫の発現性が高い)。(Poland et al. (2008), Takagi et al. (2008)) - 単層カーボンナノチューブ(SWCNT)のマウスへの曝露により、一時的な肺の炎症、酸化ストレス、肺機能の低下、および初期の間質の繊維化が生じた。凝集体の沈着によって肉芽腫の形成が認められたが、分散性の良いナノチューブの沈着は間質で急速な繊維化が認められ(7日以内)、曝露後60日間以上も進行した。(以上、U.S.NIOSH11(2006))
皮膚の透過性	- 皮膚に塗布したサブミクロン粒子がヒトの皮膚の角質膜を透過したことにより、ナノ粒子の皮膚曝露によってヒトの免疫系が影響を受ける可能性がある。 - 表面の硬くなった細胞に生じた割れ目を通してナノ粒子が吸収されることが考えられる。隙間に侵入したナノ粒子はより深部に進み、皮膚の下に到達することで血流にのって吸収される可能性がある。(以上、U.S.EPA(2007))
体内での分布、移動	- ナノ粒子の健康影響では、最初の沈着部位だけではなく、広い範囲での毒性反応が認められる。 - ナノ粒子の模擬ワックスを用いた試験では、ナノ粒子の荷電が血液脳関門の完全性および透過性を変化させた。(以上、U.S.EPA(2007)) - ヒトや動物を使った実験では、大気中に浮遊したナノ粒子は吸入され、気管支に沈着する。動物実験のデータから、ナノ粒子は血流によって他の器官に移行する。 - 鼻部に沈着してナノ粒子が嗅覚神経に沿った輸送で脳に入り込むことがラットの実験で観察されている。(以上、U.S.NIOSH(2006)) - 浮遊粒子の主要な侵入経路は呼吸器官である。非溶解性粒子が沈着する気道内の部位は、粒子の空学的挙動およびそれらの粒子に依存し、マクロファージおよび粘膜炎毛系による排出によって消化管へ排出される可能性がある。 - 特定の粒子は肺の間質へ侵入し、リンパ節へ移行する可能性がある。(以上、EC.SCENIHR(2007))

毒性の発現機序	•ヒトの上皮角質細胞に対するSWCNTの曝露試験において、酸化ストレス及び細胞生存率の低下を含む細胞毒性がもたらされた。 (以上、U.S.EPA(2007)) •呼吸器系に関する毒性的研究から、肺においてナノ粒子は酸化ストレス及び炎症を引き起こし呼吸器へ影響を及ぼす可能性が示唆されている。 •ナノ粒子に関するインベトロの研究から、活性酸素種 (ROS) の生成および酸化ストレスを誘導する可能性が示唆されている。しかし、その後が生じる疾患については不明である。 (以上、EC.SCENIHR(2007))
----------------	---

表 1-2. 吸入曝露試験と比較した気管投与試験の結果の相違点

気管内投与試験		吸入曝露試験
Bolus effectによる 人工的反応	分散性が低いとき、分散度が保持されていても 高用量 (1-3 mg/rat) で認める。	なし
肺内分布の不均一性	曝露直後の主病変は小葉中心性 分散性が低いとき、気道に病変が集積	曝露直後の主病変は小葉中心性。但し、一部 胸膜付近、全周性の肺胞壁病変を認める。
肺からのクリアランス	高用量で遅延 クリアランスの閾値無し*	高用量で遅延 クリアランスの閾値有り
他臓器への移行	肝臓、腎臓、脾臓、精巣への移行有り 脳への沈着は軽度か認めない* 児動物への肝臓DNA損傷なし* 高用量でリンパ節移行遅延あり	肝臓、腎臓、脾臓、精巣への移行有り 脳への沈着あり 児動物への肝臓DNA損傷あり 高用量でリンパ節移行遅延あり
溶媒や分散剤の影響	0.2%以上のTriton懸濁液で肺内好中球浸潤有	一般的にはなし

Morimoto et al (2006) *Jpn. J. Hyg.* 68, 161-167より抜粋

表 1-3. 生体内におけるフリーラジカル・活性酸素の発生

		生成する活性種	生成する場	
ラジカル	$O_2^{\cdot-}$ スーパーオキシド	内因性 (細胞内)	ミトコンドリア	
			小胞体	
			核	
		内因性 (細胞外へ放出)	マクロファージ	
			好中球	
		外因性	皮膚など	
	$HO^{\cdot}$ ヒドロキシル	外因性	皮膚など	
非ラジカル	H_2O_2 過酸化水素	外因性	肝細胞小胞体	
			肝臓、消化管	
			肺胞、口腔、食道	
	H_2O_2 過酸化水素	内因性 (細胞外へ放出)	マクロファージ	
			好中球	
非ラジカル	H_2O_2 過酸化水素	内因性 (細胞外へ放出)	血管内皮細胞	

表 1-4. 生体の防御・還元システム表 1-4. 生体の防御・還元システム

予 防 的 抗 酸 化 型	ヒドロペルオキシド、 過酸化水素非ラジカ ルの分解	カタラーゼ	過酸化水素の分解
		グルタチオンペルオキシダーゼ (細胞質)	過酸化水素、脂肪酸ヒドロペルオキシドの分 解
		グルタチオンペルオキシダーゼ (血漿)	過酸化脂質、リン脂質ヒドロペルオキシドの分 解
		リン脂質ヒドロペルオキシドグルタチ オンペルオキシダーゼ	リン脂質ヒドロペルオキシドの分解
		ペルオキシダーゼ	過酸化水素、脂質ヒドロペルオキシドの分解
		グルタチオン-S-トランスフェラーゼ	脂質ヒドロペルオキシドの分解
	金属イオンのキレート 化、不活性化	トランスフェリン、ラクトフェリン	鉄イオンの固定
		ハプトグロビン、	ヘモグロビンの安定化
		ヘモベキシン	ヘムの安定化
		セルロプラスミン、アルブミン	銅イオンの安定化、鉄イオンの酸化
	活性酸素の消去、不 均化	スーパーオキシドディスムターゼ	スーパーオキシドの不均化
		カロテノイド	一重項酸素の消去
ラ ジ カ ル 捕 捉 型	水溶性	ビタミンC、尿酸、ビリルビン、 アルブミン	水溶性ラジカルの捕捉、ビタミンEなど脂溶性 ラジカル捕捉型抗酸化物の再生
	脂溶性	ビタミンE、ユビキノール、 カロテノイド	脂溶性ラジカルおよび水溶性ラジカルの捕捉 安定化
修復・再生機能		リパーゼ、プロテアーゼ、DNA修復酵 素など	損傷した膜脂質、タンパク、遺伝子の修復
		アシルトランスフェラーゼ	再生
適応機能		必要に応じて抗酸化酵素を産生	特定場に遊走

図 1-1. ISO/TS 27687 (2008) に基づいたナノ材料の定義

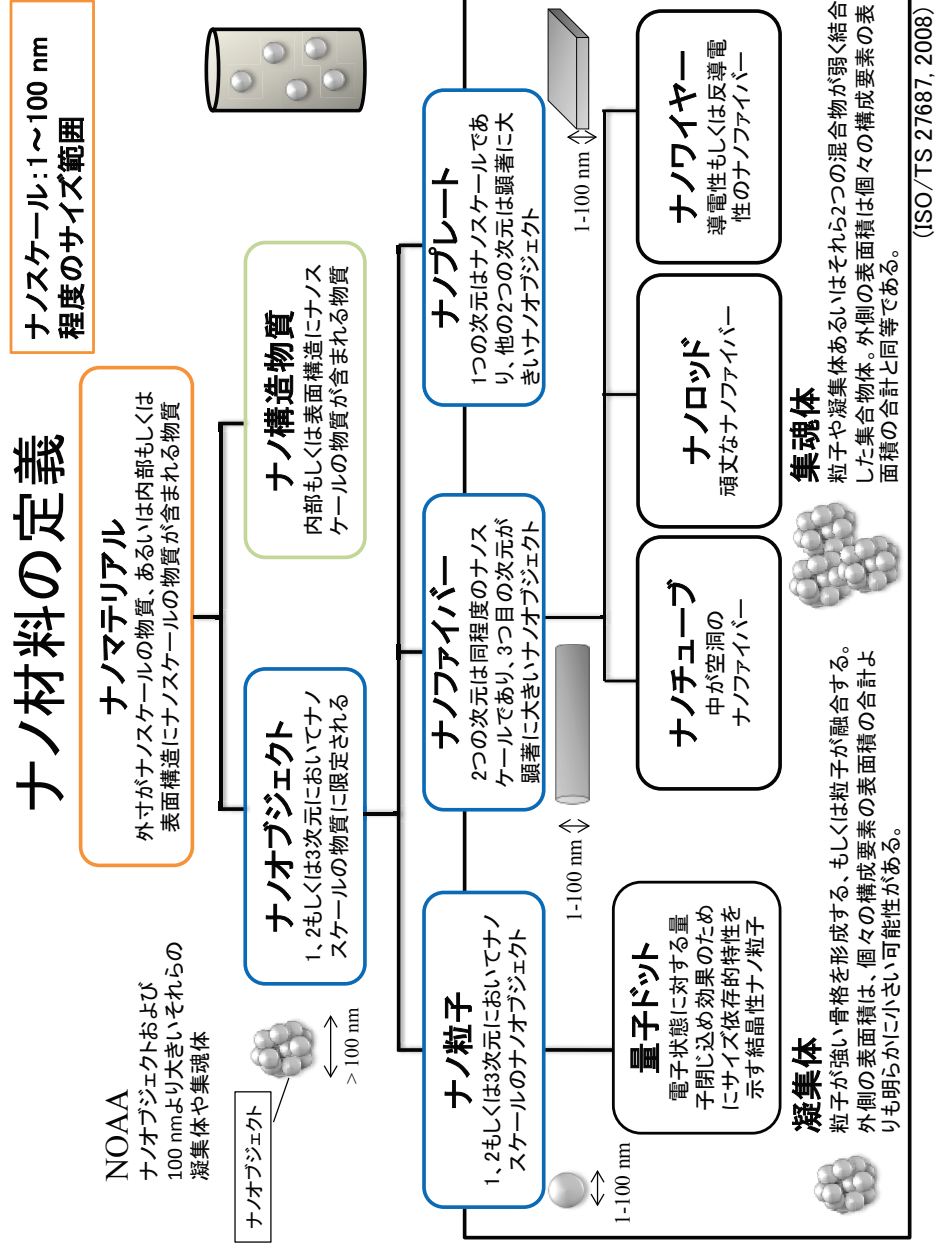


図 1-2. ラットへの気管内注入操作

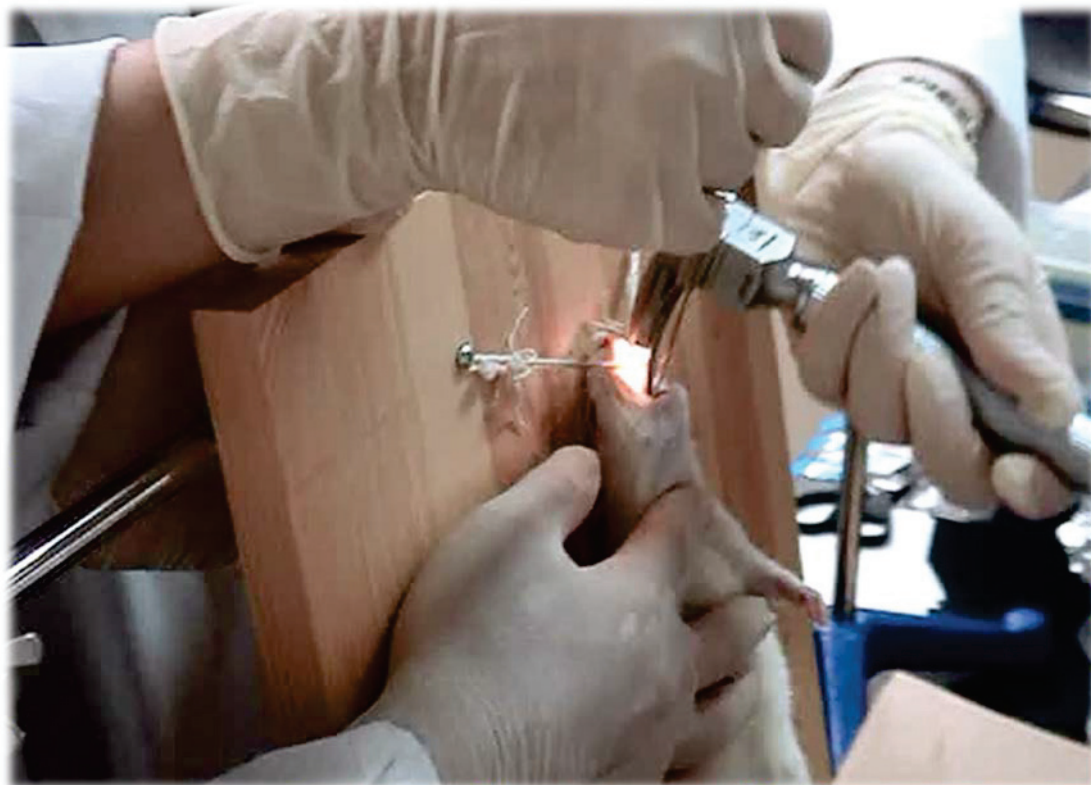


図 1-3. Dichlorofluorescein (DCFH) 測定法の原理

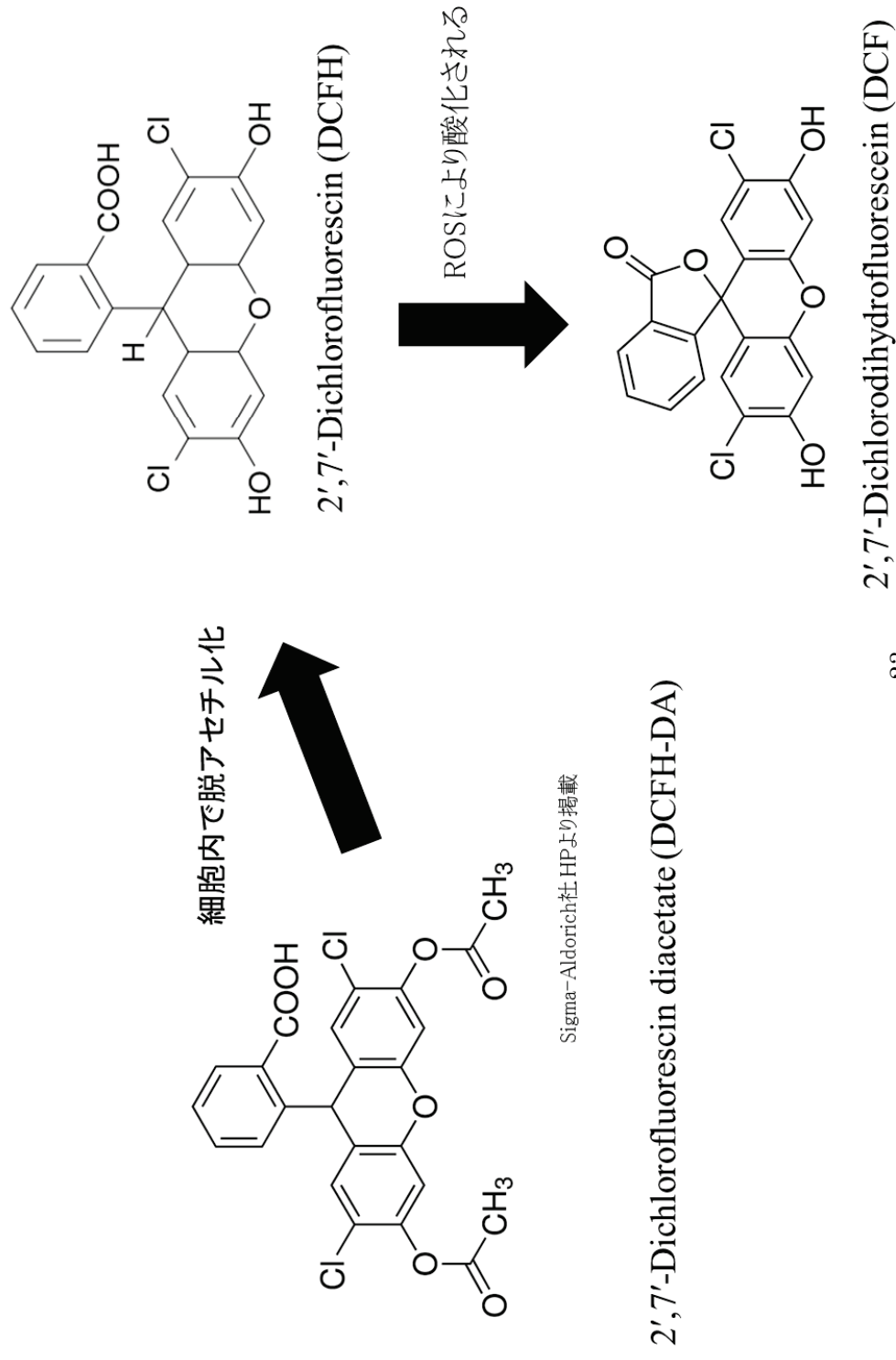


図 1-4. 工業ナノ粒子による細胞毒性メカニズム

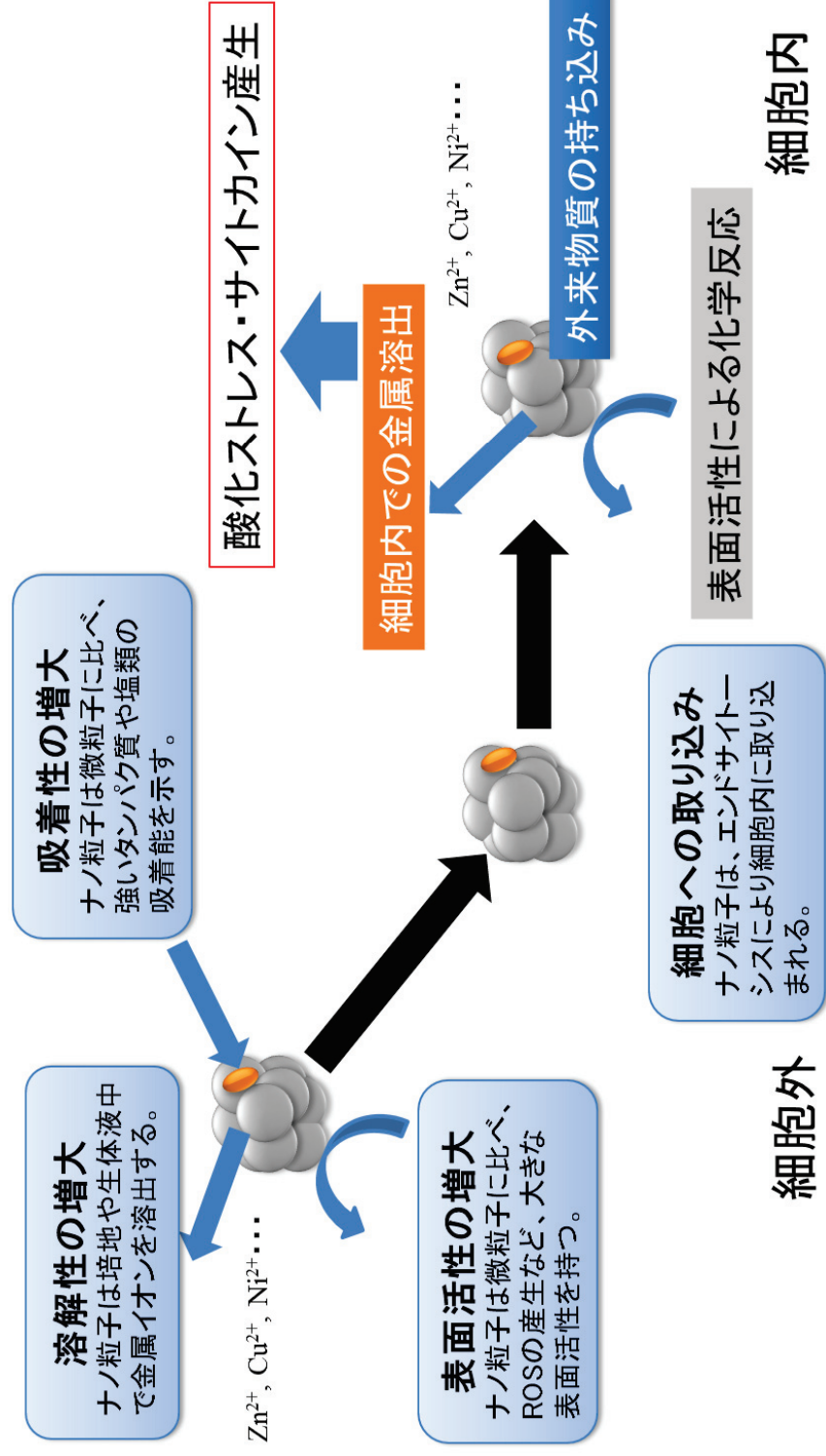
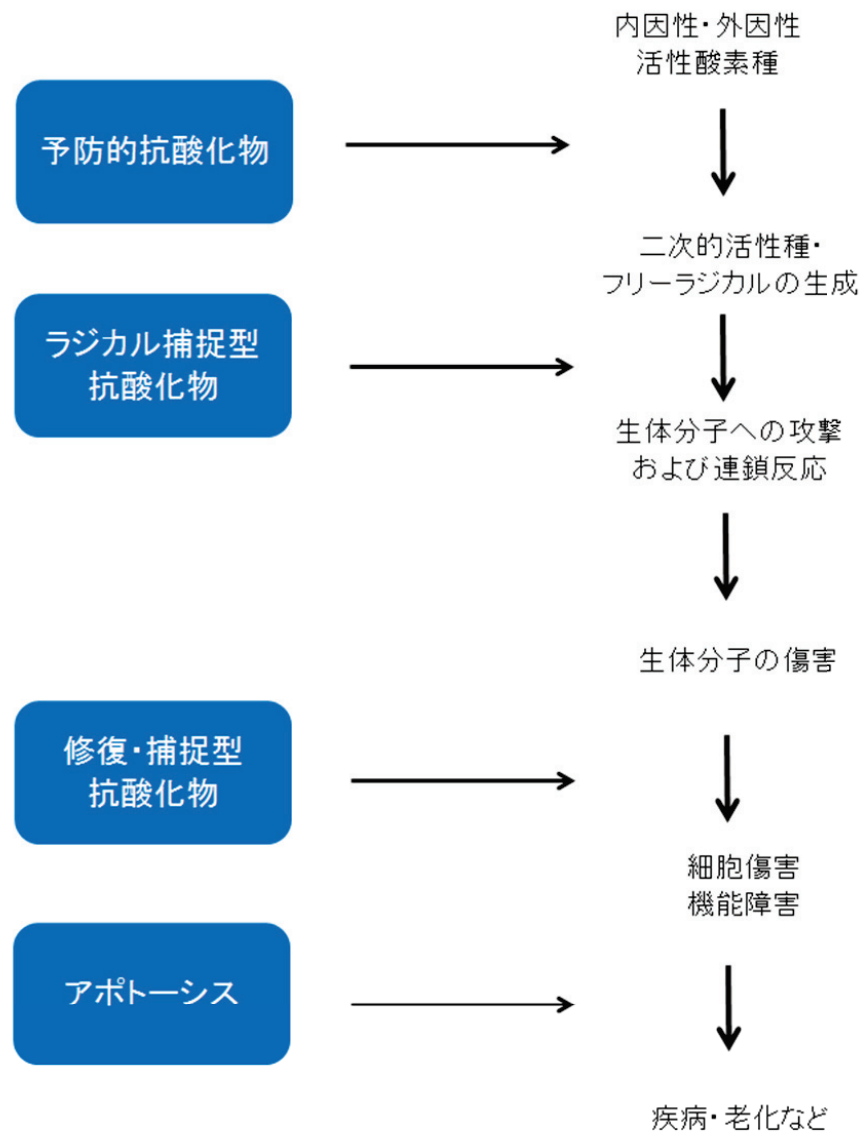


図 1-5. 生体の酸素毒性に対する防御システム



吉川敏一 編著(1998)『抗酸化物質の全て』(先端医学社)

第二章 酸化亜鉛ナノ粒子の気管内投与によって誘導されるラット肺の酸化ストレスと亜鉛イオン放出の関連性

緒言

酸化亜鉛 (ZnO) は分子量が 81.37 の白色粉末であり、水・有機溶媒にほとんど不溶である。ZnO ナノ粒子は主要な工業ナノ粒子の一つであり、生産量も非常に多く、白色顔料、電子材料、日焼け止め等、広範囲に利用されている。その一方で、ZnO ナノ粒子が毒性を示すという報告も多い (Heng et al., 2011, Huang et al., 2010, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2011, Song et al., 2010, Tsou et al., 2010, Xia et al., 2008)。

第一章に述べたように、ナノ粒子は培地を含む溶液中において溶解性が増大する特徴を持つことが報告されている。ZnO 粒子についても大きいサイズの ZnO 粒子は不溶性であるが、ZnO ナノ粒子は培地中に Zn イオン (Zn^{2+}) を放出し、酸化ストレスを含む強い細胞毒性を示すことが知られている (Osman et al., 2010, Roy et al., 2011, Yang et al., 2009)。培地中に放出された Zn^{2+} は、細胞内の ROS レベルの上昇を誘導し、その結果として細胞死が起こる (Heng et al., 2011, Huang et al., 2010, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2011, Song et al., 2010, Tsou et al., 2010, Xia et al., 2008)。更に ZnO ナノ粒子の表面を二酸化チタン (TiO_2) でコーティングした場合 (Hsiao et al., 2011) や、ポリメチルアクリル酸によるコーティングと鉄のドーピングに

よって(Xia et al., 2011, Yin et al., 2010) ZnO ナノ粒子からの Zn^{2+} の溶出が抑えられ細胞毒性が抑制されたと報告されていることから、ZnO ナノ粒子による細胞毒性に、ZnO ナノ粒子からの Zn^{2+} 溶出は深く関与していると考えられる。インビトロにおける ZnO ナノ粒子による細胞毒性ならびに、そのメカニズム(酸化ストレスの誘導および ZnO ナノ粒子からの Zn^{2+} の溶出)に関する多くの研究が報告されていることに加え、インビボにおいてラットに対する ZnO ナノ粒子の吸入曝露が、肺の 8-OHdG の増加や炎症を誘導することも報告されている(Ho et al., 2011)。しかしながら、インビボにおける ZnO ナノ粒子による影響、特に肺における Zn^{2+} 溶出と酸化ストレスの関連性については不明である。

NiO ナノ粒子はインビトロ試験において細胞内の酸化ストレスを誘導し、更にインビボにおいてもラットの肺への気管内投与によって、急性期の酸化ストレスを引き起こした(Horie et al. 2011)。NiO ナノ粒子もまた、培地を含む溶液中に Ni^{2+} を溶出することから(Horie et al., 2011, Horie et al., 2012a)、この結果は ZnO ナノ粒子も肺において酸化ストレスを引き起こす可能性があることを示唆している。ZnO が引き起こす主な影響にヒューム熱が挙げられる。亜鉛がコートされたスチールプレートの溶接や、亜鉛の精製によって生じた亜鉛ヒュームを吸入した場合肺に炎症が起こり、場合によっては熱を感じるか、筋肉痛や呼吸が困難になるような症状が引き起こされる(Cooper et al., 2008, Gordon et al., 1993)。しかしながら亜鉛ヒュームは一時的な症状であり

(Kuschner et al., 1995)、ZnO ナノ粒子の曝露による肺への影響は不明な点が多い。Warheit et al (2009)は、ZnO ナノ粒子と ZnO サブミクロン微粒子をラットの肺に気管内投与および吸入曝露し、その影響を比較した。その結果、ZnO ナノ粒子も ZnO サブミクロン微粒子も同様に肺で炎症を引き起こし、その差は認められなかった。更にそれらの粒子による炎症は短期間収束した。この現象は亜鉛ヒュームと同様であった。次に肺上皮細胞および肺胞マクロファージ細胞の、サイトカイン分泌への影響も評価したところ、どちらの粒子もサイトカインの分泌を誘導しなかった。このインビトロの試験結果からは、インビボの試験結果との関連性は得られなかった。

多くのインビトロの研究において、ZnO ナノ粒子によって引き起こされる細胞毒性の主な要因が酸化ストレスであると報告されている(Heng et al., 2011, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2011, Song et al., 2010, Tsou et al., 2010, Xia et al., 2008)。一方で ZnO ナノ粒子は肺で炎症を引き起こすが、それらの肺毒性と酸化ストレスの関連性は不明である。更に酸化ストレスと ZnO ナノ粒子から溶出された Zn^{2+} の関連性も明らかではない。ZnO ナノ粒子が誘導する急性期の肺における酸化ストレスと Zn^{2+} の関連性を調べるため、ZnO ナノ粒子および ZnCl_2 を気管内投与した。またそれらの細胞への影響についても評価した。

実験材料および実験方法

1. 気管内注入用 ZnO ナノ粒子分散液の調製とキャラクタリゼーション

本研究で使用した ZnO ナノ粒子は石原産業株式会社から入手した。一次粒子径は走査型透過電子顕微鏡 (STEM; TITAN 80-300; FEI Company, Hillsboro, OR, USA) によって確認した。STEM の加速電圧は 300 kV であった。一次粒子の比表面積は、Brunauer, Emmett and Teller (BET) 方法によって測定した。BET 方法による測定の前処理として、ZnO ナノ粒子を予め 120 °C で 8 時間脱気した。粒子の純度は、誘導結合プラズマ原子発光 (ICP-AES; SPS4000, セイコーインスツル株式会社) 分析により決定した。

分散液を調製するために、ZnO ナノ粒子原末 0.5 g を、5%ウシ胎仔血清 (FBS; CELLect GOLD; MP Biomedicals Incorporated, Solon, OH) を含む 50 mL のエンドトキシンフリー蒸留水に懸濁した。懸濁液を超音波槽 (Branson 5510J-MT, 135W, 42 kHz) にて 3 時間超音波分散した。超音波処理は、30°C 以下の水温条件で行った。次に懸濁液中の粒子のサイズを調節するために、16,000g、5 分間、室温の条件で遠心処理を施した。30-40 mL の上清を分散液として回収し、ZnO 濃度を 380-700 nm の紫外線吸収によって決定した。分散液中のエンドトキシン汚染の有無は Limulus Amebocyte Lysate Assay (Pyrotell: Associates of Cape Cod, Incorporated, East Falmouth, MA) によってネガティブであることを確認した。分散液中の ZnO ナノ粒子の

サイズ分布は、Zetasizer Nano machine (Malvern Instruments Limited, Malvern, United Kingdom)を用いて動的光散乱法(dynamic light scattering; DLS)によって測定した。

分散液中に溶出した Zn 濃度は、2-(5-bromo-2-pyridylazo)-5-[*N*-n-propyl-*N*-(3-sulfopropyl) amino] phenol, disodium salt, and dehydrate (5-Br-PAPS) (株式会社 同仁化学研究所)を使用し、Makino et al. (1982)の手順に従って吸光度分析法にて測定した。ZnO ナノ粒子分散液を、16,000g で 20 分間遠心処理し上清を回収した。適度に希釈した上清 400 μ l と、100 μ l の 5 mM APS、100 μ l の 1 mM DTCS および 50 μ l の 1 mM 5-Br-PAPS を 2.0 ml の測定用緩衝液(0.5 M HEPES 500 ml/(水酸化ナトリウム 6 g 含む、pH 7.8))に添加した。混合液をよく混ぜた後、室温で 10 min インキュベートした。測定は DU530-spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA)を用いて、555 nm の波長における吸光度を測定した。溶け出した Zn 濃度は、亜鉛標準液(和光純薬)による標準曲線から算出した。塩化亜鉛(ZnCl_2)は和光純薬から購入した。

2. ZnO ナノ粒子の気管内注入

全ての動物実験は、独立行政法人産業技術総合研究所の動物倫理委員会の承認を得て実施した。8 週齢の Wistar ラットを日本クレア株式会社から購入した。ラット

には標準食を給餌し、購入から試験開始まで 1 週間の馴化期間を設けた。馴化期間後、ZnO 濃度 0.2 mg/0.4 ml の ZnO ナノ粒子分散液あるいは、28 μ g/ml (70 μ g/ml) の ZnCl₂ 溶液をラットの気管内に単回注入した。気管内注入は、ジエチルエーテル (和光純薬) による吸入麻酔下で行われた。陰性対照群には、0.4 ml の 5% FBS 溶液を注入した。各群少なくとも 4 匹のラットに対し注入を行い、投与 1、24、72 時間または 1 週間後に 50 mg/ml の 5-ethyl-5-(1-methylbutyl)-2,4,6-trioxohexahydropyrimidine (Pentobarbital sodium salt: Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, MO) の腹腔内投与によって、ラットを麻酔下にて解剖した。解剖時にラットの腹部大動脈より血液を採取した後、肺を生理食塩水にて灌流した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) は、左の主気管支をクランプした上で、右肺へ 5 ml の生理食塩水を注入した後に回収する操作を 3 回繰り返して、合計 15 ml の BALF を回収した。回収した BALF に対し、440g、10 分間の条件で遠心処理を行い、細胞片を除去した。遠心上清は回収し、各バイオマーカーの測定に使用した。左肺組織は、real-time polymerase chain reaction (PCR) に使用した。

3. BALF 中の LDH 活性の測定

BALF 中の lactate dehydrogenase (LDH) 活性は、Cytotoxicity Detection KitPLUS (LDH) (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) を用いてメーカーの説明書に従い測定した。測定には Multiskan Ascent plate reader (Thermo Labsystems,

Helsinki, Finland)を使用した。LDH 活性は、既知の濃度のブタ心臓由来 LDH (Serva Electrophoresis GmbH, Heidelberg, Germany) による標準曲線から算出した。

4. BALF 中のtHODE 測定

BALF 中の tHODE は Yoshida et al. (2008) の手順にいくつかの修正を加えて、四重極質量分析装置を接続した高速液体クロマトグラフィー (LC-MS/MS) を用いて測定した。内部標準の 13-HODE は Cayman Chemical Company (Ann Arbor, MI) から購入した。0.5 ml の BALF に 5 μ l (50 ng) の内部標準を含む 0.5 ml のメタノールを加えた。次に液中に 20 mg の水酸化ホウ素ナトリウムを添加し、5 分間窒素を吹き付けた。その後窒素下において、1 M の水酸化カリウムを含む 0.5 ml のメタノールを混合し、40°C、暗下で 30 分間サンプルを振盪インキュベートした。30 分後、サンプルを氷中で冷却し、2 ml の 10%酢酸を添加して中和した。中和したサンプルにクロロホルム:酢酸エチル(4:1)を 5 ml 添加し 30 秒間ボルテックスで混和した。次にサンプルを、4°C、3000g で 10 分間遠心し、遠心後アスピレーターにより遠心上清とタンパク質を取り除いた。その後、ロータリーエバポレーターを使用してサンプルを乾固した。サンプルを 300 μ l のメタノール:水 (70:30) で再溶解し、四重極質量分析装置 (Finnigan TSQ Quantum Discovery Max; Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Ma) を接続した高速液体クロマトグラフィー LC-20AB システム (島津株式会社) にかけた。流速は 0.2 ml/分

であり、測定には Hypersil Gold カラム (25003-102130, 100 × 2.1 mm, 3- μ m particle size, Thermo Scientific)を使用した。

5. BALF 中の HO-1 の測定

BALF 中の HO-1 濃度は、ラット ヘムオキシゲナーゼ-1 EIA キット(タカラバイオ株式会社)を用いてメーカーの取扱説明書に従い酵素結合免疫吸着測定法 (ELISA)にて評価した。

6. BALF 中の α -トコフェロール濃度測定

50 μ l の BALF に 150 μ l のクロロホルム:メタノール (2:1)を添加し混和した。その後、4℃で 20,400g、10 分間遠心処理を行い、電気化学的電流測定検出器 (NANOSPACE S1-1, 資生堂株式会社)を用いて WakopakWakosil-II 5C18R カラム (4.6 mm × 250 mm、和光純薬工業)により α -トコフェロールを測定した。エレントは 50 mM の過塩素酸ナトリウム/メタノールを 0.7 ml/分の流速で流した。

7. リアルタイム PCR

肺組織中の HO-1 およびメタロチオネイン 1 (MT-1) の遺伝子発現をリアルタイム PCR で測定した。トータル RNA は RNeasyProtect Mini kit (Qiagen GmbH, Hilden,

Germany)を用いて抽出した。cDNA 合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA)を使用した。リアルタイムPCRは Step One real time-PCR system (Applied Biosystems)により行い、PCR 増幅は power SYBR Green PCR master mix (Applied Biosystems)を用いて検出した。内在性のコントロールとして、ラット ribosomal protein L32 (*RiboL32*)を使用した。使用した増幅プライマーについて表 2-1 にまとめた。MT-1 のプライマー配列は Banni et al. (2010) によった。

8. A549 細胞の培養

ヒト肺腺がん細胞 (A549) は理研バイオリソースセンターから入手した。細胞は 10% 熱非動化処理済 FBS、100 units/ml のペニシリン、100 μ g/ml のストレプトマイシンおよび 250 ng/ml のアンホテリシン B (ナカライテスク株式会社) を添加したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM; Gibco, Thermo Fisher Scientific) 中で培養した。本研究には、この DMEM 混合培地を DMEM-FBS と表記する。

細胞は 5% CO₂ 条件下、37°C で DMEM-FBS 中で培養した。細胞試験のために細胞を 6 ウェルマルチプレート (Corning Incorporated, Corning, NY) に 2×10^5 個/ml になるように播種し 24 時間培養した。その後培地交換を行い、ZnO ナノ粒子分散液を添加し 24 時間培養した。

9. 細胞試験用 ZnO ナノ粒子分散液の調製

細胞試験に使用する ZnO 培地分散液は、前吸着と遠心操作によって分散した。まず ZnO ナノ粒子を FBS 中に 80 mg/ml となるように懸濁した。これは ZnO ナノ粒子を培地中に分散した際に、培地の構成成分が粒子の表面に吸着することを防ぐためである。次に 16,000g で 20 分間遠心処理を行った。沈殿した ZnO ナノ粒子を DMEM-FBS で洗浄し、新たに等量の DMEM-FBS を加え再分散した。ZnO ナノ粒子 DMEM-FBS 分散液を 8,000g で 20 分間遠心し上清を除去した。遠心後の沈殿は、再度等量の DMEM-FBS で再分散し、4,000g で 20 分間遠心した。遠心処理で得られた上清を回収し、DMEM-FBS で 1.5 倍に希釈した後に、この希釈液を ZnO-DMEM-FBS 分散液として試験に使用した。

10. ZnO-DMEM-FBS 分散液のキャラクタリゼーション

細胞試験に使用した ZnO-DMEM-FBS 分散液の Zn 濃度測定、粒径分布の測定を行った。DLS による ZnO-DMEM-FBS 分散液の二次粒径測定は、Kato et al. (2010) の測定手順に従って行った。

分散液中の Zn 総濃度は X 線蛍光分析 (XRF) によって測定した。まず 13 ml の ZnO-DMEM-FBS 分散液を 0.1 mg/ml の Fe (内部標準) を含む 13 ml の標準液に

添加し混合した。次に 5 ml の混合液を 200°C のオーブン中に 24 時間置いて乾燥させた。乾燥させたサンプルをめのう乳鉢中ですり潰し、エネルギー分散 X 線蛍光分析装置 JSX-3201 (日本電子株式会社) で分析した。Zn 量は Zn と内部標準のモル比から算出した。溶出した Zn 濃度は限外濾過した後、ICP-AES (ICP; SPS4000, セイコーインスツル株式会社) で測定した。粒子を完全に除去するために、分散液を 24 時間立てて静置した後、10 ml を限外濾過膜 (分子量 50,000 カットオフ: Vivaspin 20-50k, GE Healthcare UK Limited, Buckinghamshire, United Kingdom) に通し、6000g で 60 分間遠心した。膜は 5 ml のミリ Q 水で 3 回洗った。フィルター中の Zn 量は ICP-AES で測定した。

11. 細胞生存率と細胞増殖率の測定

3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) アッセイによりミトコンドリア活性の測定を行った。ZnO 分散液を除去した後に、0.5 mg/ml の MTT (ナカライテスク株式会社) を含む新たな DMEM-FBS で 37°C、2 時間、細胞を培養した。2 時間後、40 mM の HCl を培地に添加し、ホルマザンが完全に溶解するまでピペettingで混和した。ホルマザンの光学密度は Multiskan Ascent プレートリーダー (Thermo Labsystems) を使用し 570 nm の波長で測定した。試験によっては、細胞に予め *N*-アセチルシステイン (NAC; シグマアルドリッチ) を前処理した。細胞は 1×10^5

個/mlとなるように播種し 24 時間培養した後、培地を交換し 2 mM の NAC を含む新たな培地で 12 時間培養した。その後、培地を取り除き、2 mM の NAC を含む ZnO 分散液を 6 時間細胞に曝露した。

コロニー形成能(細胞増殖能)は Herzog et al. (2007)と Franken et al. (2006)の手順に従い、クローン形成法により測定した。細胞は 6 ウェルプレート (Corning Incorporated)に 300 個/ウェルとなるように播種した。いずれのウェルにも 2 ml の培地を添加した。約 14 時間で細胞が接着すると、2 ml の ZnO 分散液を曝露した。細胞をコントロール群がコロニーを形成するまで(コロニーは 50 個以上の細胞で形成されると定義する)7 日間培養した。培養が完了した後、分散液を取り除き、2 ml の PBS で細胞を洗った。100%のメタノールで 15 分間細胞を固定し、水で 1:50 に希釈したギムザ染色液(ナカライテスク株式会社)で 15 分間染色後、蒸留水で洗い流しコロニー数をカウントした。

12. 細胞内 ROS レベルの測定

細胞内 ROS レベルは 2',7'-dichlorofluorescein diacetate (DCFH-DA; Sigma-Aldrich)を使用して測定した。DCFH-DA は、ジメチルスルフォキシド(DMSO)で 5 mM に調製し-20°Cで保存した。保存溶液を、試験時に血清フリー培地で 500 倍に希釈して使用した。ZnO 分散液もしくは ZnCl₂ 溶液を 2 時間および 6 時間曝露した

後、培地を 10 μ M の DCFH-DA を含む血清フリーDMEM 培地に交換し 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 1 回洗浄し 0.25% のトリプシン処理によって回収した後、再度 PBS で洗浄し、500 μ l の PBS に再懸濁した。Cytomics FC500 フローサイトメトリーシステム(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)の 488-nm のアルゴンイオンレーザーによって励起し、2',7'-dichlorofluorescein (DCF)の蛍光強度を 525-nm の波長で測定した。1 サンプルにつき 5000 個の細胞について測定した。

13. 細胞内 Zn^{2+} レベルの測定

細胞内の Zn^{2+} レベルは ZnAF-2 DA(積水メディカル株式会社)を使用して測定した。試験時には、ZnAF-2 DA の保存液(DMSO 中に 5 mM となるように溶解した)を血清フリー培地で 500 倍希釈して使用した。ZnO 分散液を 2 時間あるいは 6 時間曝露した後、10 μ M の ZnAF-2 DA を含む血清フリーDMEM 培地に交換し、更に 30 分間 37°C の条件でインキュベートした。その後、細胞を PBS で 1 回洗浄し、0.25% のトリプシン処理によって回収し、再度 PBS で洗浄し、500 μ l の PBS で再懸濁した。Cytomics FC500 フローサイトメトリーシステム(Beckman Coulter, Inc., Brea, CA)の 488-nm のアルゴンイオンレーザーによって励起し、ZnAF-2 の蛍光強度を 525-nm の波長で測定した。1 サンプルにつき 5000 個の細胞について測定した。

14. 統計処理

データは、少なくとも 3 回の異なる試験から平均値±SD を算出した。統計分析は多重比較に対するダネット検定を使用し、分散分析 (ANOVA) によって有意差を決定した。細胞内 ROS レベルと Zn^{2+} レベルの相関関係は、IBM SPSS Statics (IBM Corporation, Armonk, New York, USA) を使用してピアソンの積率相関係数により算出した。

表 2-1 ラット肺組織中の MT-1 遺伝子発現評価に使用した PCR プライマー配列

プライマー	配列
RiboL32 (forward)	5'-GAA ACT GGC GGA AAC CCA-3'
RiboL32 (reverse)	5'-GGA TCT GGC CCT TGA ACTTC-3'
HO1 (forward)	5' -CAC CTT CCC GAG CAT CGA-3'
HO1 (reverse)	5'-TGT TCA TGC GAG CAC GAT AGA-3'
MT-1 (forward)	5' -CAC CGT TGC TCC AGA TTCAC-3'
MT-1 (reverse)	5' -GCA GCA GCA CTG TTCGTCAC-3'

結果

1. ZnO ナノ粒子(一次粒子)のキャラクタリゼーション

メーカー提供のデータシートによると、ZnO ナノ粒子の一次粒径は 21 nm、純度は 97.4%、表面積は 49.6 m²/g であった。本研究における測定結果では、TEM の観察によって一次粒径は 20-50 nm という結果が得られた。純度は 96.5%、表面積は 31.5 m²/g であった。

2. ZnO ナノ粒子の気管内注入によってラット肺組織中で引き起こされた酸化ストレス

気管内注入に使用した ZnO ナノ粒子分散液中の二次粒径を DLS で測定した。その結果、散乱強度による平均粒径は 101 nm であった。分散液中に溶出した Zn²⁺ の濃度は約 70 μg/ml であった。この Zn²⁺ 濃度を基準にして 70 μg/ml の ZnCl₂ 溶液を調製し、ラットへの気管内注入試験に使用した。BALF は気管内注入から 1, 24, 72 時間後および 1 週間後に回収した。

BALF 中の LDH 活性は ZnO 注入から 72 時間後に増加する傾向が認められた(図 2-1)。しかしながら LDH 活性は、ばらつきが大きかったため、コントロール群との間に顕著な差は認められなかった。注入から 1 週間後には、ZnO を注入した群の LDH 活性はコントロール群のレベルまで減少した。次にリノール酸の酸化生成物である BALF 中の tHODE レベルを、肺組織の脂質過酸化マーカーとして測定した(図 2-2)。

BALF 中の tHODE レベルは、ZnO 注入から 1 週間後に顕著な上昇を見せた。ZnCl₂ を注入した群では、tHODE レベルの増加傾向が認められたもののコントロール群との間に顕著な差は認められなかった。

主要な抗酸化物質の一つである BALF 中の α -トコフェロール濃度を測定した (図 2-3)。ZnO を注入した群の α -トコフェロール濃度は、注入 24 時間から 1 週間後まで継続してコントロール群より高かった。ZnCl₂ を注入した群の BALF 中の α -トコフェロール濃度についても、注入から 72 時間から 1 週間後まで継続して高かった。

酸化ストレス応答タンパク質の一つである HO-1 の BALF 中の濃度を測定した (図 2-4)。ZnO ナノ粒子を注入した群の BALF 中の HO-1 タンパク質の濃度は、注入 24 時間から 72 時間後までコントロール群と比較して顕著に増加し、1 週間後にはコントロールレベルまで減少した。ZnCl₂ を注入した群では、注入から 24 時間後の時点でのみ HO-1 濃度に顕著な増加が認められた。更に肺組織中の *ho-1* 遺伝子発現レベルをリアルタイム PCR で測定した (図 2-5A)。ZnO および ZnCl₂ を注入した群の *ho-1* 遺伝子発現レベルは、注入 1 時間後から顕著な増加が認められた。ZnCl₂ を注入した群では、注入 1 週間後にはコントロールレベルまで減少していることが確認された。ZnCl₂ を注入した群と比較して、ZnO を注入した群の *ho-1* 遺伝子発現レベルは、注入 1 週間後まで継続した増加が認められた。更に Zn を含む重金属と特異的に結合し、金属によって遺伝子発現が誘導されるストレス応答タンパク質 MT-1 についても評価

を実施した(図 2-5B)。ZnO および ZnCl₂ を注入した群の *mt-1* 遺伝子発現レベルは、注入 1 時間後で既に顕著な上昇が認められた。ZnO を注入した群では *ho1* と同様に、注入 1 週間後までコントロール群と比較して高い発現レベルを持続した。これらの結果から ZnO ナノ粒子と ZnCl₂ の注入によって、急性期の肺において酸化ストレスが誘導されることが示唆された。

3. 培養細胞に対する ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の曝露影響

ZnO ナノ粒子による Zn²⁺ の溶出と酸化ストレスの誘導の関連性について培養細胞を用いた実験を行った。分散液中の“Zn”濃度は $77.4 \pm 7.7 \mu\text{g}/\text{mL}$ (1.18 mM) であった。分散液中の ZnO ナノ粒子の濃度は $68.6 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.84 mM) であり、 $22.3 \mu\text{g}/\text{mL}$ (0.34 mM) の Zn²⁺ が含まれていた。インビトロ試験用の ZnO 培地分散液中の 2 次粒径について表 2-2 にまとめた。培地分散液中の ZnO ナノ粒子の平均 2 次粒径は 69.8 nm であった。分散液が試験期間中は安定であったことを確認した。DMEM-FBS 中に ZnO ナノ粒子を 0.1、0.5、1.0、5.0、10.0 mg/mL 懸濁した際の溶解性を測定した(図 2-6)。ZnO ナノ粒子の濃度が 5.0 mg/mL 以上の際に、Zn²⁺ 溶出濃度の著しい上昇が認められたが、低濃度の場合も Zn²⁺ の溶出は認められた。

ZnO ナノ粒子を細胞に曝露した時の、細胞生存率を MTT アッセイで評価した(図 2-7A)。その結果 ZnO ナノ粒子の曝露時間の経過と共に、細胞生存率の低下が

認められた。更に可溶性の Zn 化合物である ZnCl_2 を細胞に曝露した際の細胞生存率への影響も調べた(図 2-7B)。24 時間の曝露によって、Zn 濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 以上で生存率の低下が認められた。特に Zn 濃度 $20 \mu\text{g/ml}$ 以上の曝露により激しい細胞死が認められた。コロニー形成能はクローン形成法によって評価された(図 2-7C)。ZnO を曝露した細胞ではコロニー形成が抑制された。 ZnCl_2 を曝露した群では、Zn 濃度 $10 \mu\text{g/ml}$ 以下ではコロニーの形成が認められたものの、Zn 濃度 30、 $50 \mu\text{g/ml}$ ではコロニー形成は完全に抑制された。

4. ZnO ナノ粒子の曝露による細胞内 ROS と Zn^{2+} レベル

ZnO ナノ粒子および ZnCl_2 を曝露した細胞内の ROS レベルを DCFH 方法により測定した(図 2-8A)。ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の ROS レベルは、曝露時間依存的に顕著な上昇が確認された。 ZnCl_2 を曝露した細胞内の ROS レベルは、 Zn^{2+} 濃度が 10、15、20、 $25 \mu\text{g/ml}$ の場合増加は認められなかったが、30 および $50 \mu\text{g/ml}$ の場合は細胞内 ROS レベルの著しい増加が認められた。ZnO ナノ粒子および ZnCl_2 を曝露した細胞内の Zn^{2+} レベルは Zn-AF を使用して測定した(図 2-8B)。 Zn^{2+} 曝露濃度 25、30、 $50 \mu\text{g/ml}$ の場合、細胞内の Zn^{2+} レベルは顕著に上昇した。何も曝露していない細胞と比較すると、ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の Zn^{2+} レベルは、2 時間後には 14 倍、6 時間後には 15 倍高い結果となった。ZnO ナノ粒子を 12 時間曝露した細胞内

の Zn^{2+} レベルは、曝露を行っていない細胞と比較して 245 倍高い結果となった(データ未掲載)。もし細胞外の Zn^{2+} 濃度が同様の値であれば、細胞影響は Zn^{2+} 曝露群より非常に大きいだろう。細胞内の ROS レベルや Zn^{2+} レベルに対する細胞外の Zn^{2+} による影響の閾値レベルは非常に狭かった。細胞内の ROS レベルおよび Zn^{2+} レベルのどちらも、 $30 \mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の Zn^{2+} 曝露濃度において顕著に増加した。細胞外の Zn^{2+} 濃度による細胞内の ROS レベルおよび Zn^{2+} レベルへの影響を比較すると、ZnO ナノ粒子による影響は ZnCl_2 よりはるかに大きかった。このことから、細胞内の ROS レベルと Zn^{2+} 濃度には相関性があることが分かった(図 2-8C)。ピアソンの積率相関係数により算出した細胞内の ROS レベルと Zn^{2+} レベルの相関係数は 0.989 であった。これらの結果から ZnO ナノ粒子が誘導する酸化ストレスは Zn^{2+} の溶出に起因することが示唆された。

ZnO ナノ粒子および ZnCl_2 による酸化ストレスに対する抗酸化物質の効果を調べた。グルタチオンの前駆物質である NAC を 2 mM 前処理した細胞では、ZnO および ZnCl_2 による細胞死が減少した(図 2-9)。この結果から ZnO ナノ粒子が誘導する細胞死は酸化ストレスを介して起こることが示された。

考察

インビボおよびインビトロにおいて、ZnO ナノ粒子は強い酸化ストレスを誘導した。インビトロ試験では、ZnO ナノ粒子の曝露時間とともに細胞生存率が減少した。特に

ZnO ナノ粒子曝露 12 時間後では、非常に多くの細胞死が誘導された。ZnO ナノ粒子の曝露 2 時間後と比較すると、曝露 6 時間後の細胞内 Zn^{2+} レベルは顕著に増加していた。同様の結果は、可溶性の Zn 化合物である ZnCl_2 の曝露試験でも得られた。これらの結果から、 Zn^{2+} の溶出が ZnO ナノ粒子による細胞毒性の重要な要因であると言える。一般的に ZnO 粒子は難溶性の物質であると分類されている。しかしながら、ZnO ナノ粒子は培地中に Zn^{2+} を溶出した。「水に不溶性」とされるナノ粒子から金属イオンが溶出するという報告は、ZnO だけではなく NiO や酸化クロム(Ⅲ)についても報告されている(Horie et al., 2009、Horie et al., 2013)。これまでの研究において、ZnO ナノ粒子は Zn^{2+} の溶出を介して高い細胞毒性を示すことが報告されている(Song et al., 2010、Xia et al., 2008)。溶解性の増大は金属酸化物ナノ粒子が持つ大きな特徴の一つであり、金属イオンの溶出はナノ粒子の細胞毒性における最も重要な要素である。本研究において細胞内 ROS レベルと細胞内 Zn^{2+} レベルの間に明確な関連性が認められた。細胞内 ROS レベルの増加は、細胞内 Zn^{2+} レベルの増加に付随して起こり、それに伴って細胞生存率が減少した。更に NAC の前処理によって細胞死が減少することが確認された。これらの結果は、ZnO ナノ粒子からの Zn^{2+} の溶出が酸化ストレスを誘導したことと、酸化ストレスの顕著な上昇によって細胞死が誘導されたことを示唆している。ZnO ナノ粒子による培養細胞への強い酸化ストレスの誘導は以前にも報告されている(Sharma et al., 2011、Xia et al., 2008、Yin et al., 2010)。本研究は ZnO ナノ粒

子が、培養細胞(インビトロ)だけではなく急性期の肺(インビボ)に対しても酸化ストレスを誘導することを明らかにした。ROS(酸化ストレス)によって遺伝子発現が誘導され、抗酸化酵素としての機能も持つストレス応答タンパク質である HO-1 については、ZnO ナノ粒子気管内注入から 24、72 時間後に BALF 中での濃度の増加が認められた。そして 1 週間後にはコントロール群と同レベルまで減少した。一方で ZnO ナノ粒子を注入したラットの肺組織中の *ho-1* の遺伝子発現は、コントロール群と比較して 1 週間後まで継続的に高いままであった。この BALF 中の HO-1 タンパク質の濃度と肺組織中の *ho-1* 遺伝子発現の結果の違いは、肺内の細胞の損傷を反映していると考えられる。なぜなら HO-1 は細胞内タンパク質であるため、BALF 中の HO-1 は肺組織中の細胞膜の損傷によって細胞外へ漏出したと考えられるからである。ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の注入後における、BALF 中の LDH 活性は測定誤差が大きかったため顕著な差異は認められなかった。ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ はインビトロにおいて強い酸化ストレスと細胞毒性を誘導するが、インビボにおける細胞傷害は一過性であるか小さいと考えられる。ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の注入から 1 時間後における、*ho-1* の遺伝子発現の上昇は顕著であったが、同時点において LDH は BALF 中に漏出していなかった。それゆえに、HO-1 タンパク質もまた細胞質に留まっていたと考えられる。反対に、ZnO ナノ粒子を注入した群において、強い抗酸化効果を持つ α -トコフェロールの濃度はコントロール群の動物と比較して注入 24 時間後から 1 週間後まで継続して高かつ

た。更に ZnO ナノ粒子を注入した群では、脂質過酸化生成物である tHODE のレベルについても注入から 1 週間後において増加が認められた。tHODE レベルの上昇はリノール酸の脂質過酸化を示している。これらの応答は ZnCl₂ を注入した群においても観察された。ZnCl₂ の注入液中の Zn²⁺濃度は ZnO ナノ粒子注入液中の量と同じであったが、ZnCl₂ の注入による生体影響は ZnO ナノ粒子による影響と比較して小さかった。例えば、ZnCl₂ の注入から 1 週間後に BALF 中の tHODE レベルは増加したが、コントロール群と比較すると顕著な差は認められなかった。ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の注入によって MT-1 の遺伝子発現レベルは上昇した。MT-1 は Zn やカドミウムのような重金属との結合能を有し、それらの金属毒性から細胞を防御するとともに、MT-1 は金属の存在下で発現が誘導される。また MT-1 は抗酸化能も有する。ZnCl₂ を注入した群では、肺組織中の *mt-1* 遺伝子発現は注入 1 時間後から 24 時間後まで上昇し、72 時間後にはコントロールレベルまで減少した。一方で ZnO ナノ粒子を注入した群においては、*mt-1* 遺伝子の発現は注入から 1 週間経過しても、何も注入していない群と比較して顕著な増加が認められた。可溶性の化合物である ZnCl₂ は、肺組織からのクリアランス速度が速いため、酸化ストレスなどの生体影響からの回復も早いと考えられる。ZnCl₂ と比較して、ZnO ナノ粒子の肺組織からのクリアランスは遅いことが考えられる。そのため、肺組織中で ZnO ナノ粒子が持続的に Zn²⁺を放出し、このことが肺組織中の ZnO ナノ粒子による継続的な生体影響につながっていると考えられる。*mt-1* の発現

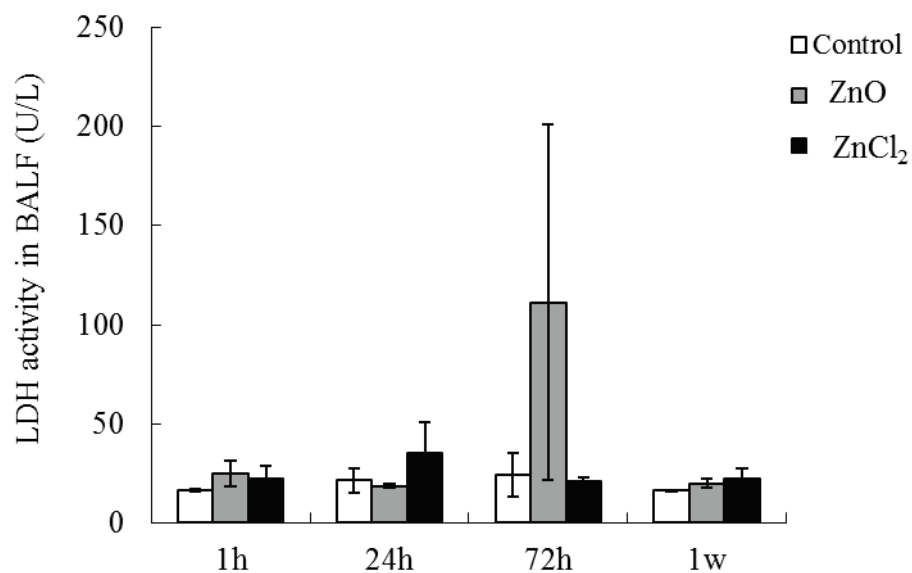
もまた酸化ストレスに関与している (Abbassi et al., 2010)。 *mt-1* の発現は 4-hydroxy-2-nonenal のような脂質過酸化生成物によっても促進されることが報告されている (Braithwaite et al., 2010)。 Zn^{2+} による初期の強い酸化ストレスは *mt-1* や *ho-1* の発現上昇を促し、このことによって酸化ストレスが抑制される。 ZnO ナノ粒子の場合、 ZnO ナノ粒子が肺組織中に留まり継続的に Zn^{2+} が溶出されていたため、 *mt-1* の遺伝子発現が持続すると共に α -トコフェロールが集積した。急性期の酸化ストレスによって肺がひどい損傷を受けなかったのは、 MT-1 や HO-1 および α -トコフェロールによる抗酸化機能のためである。培養細胞で観察された ZnO ナノ粒子による顕著な細胞毒性がインビボにおいて認められないのは、生体には抗酸化防御機構や免疫システムなど様々な防御システムが存在することが一因であろう。生体にとって Zn は必須元素であり、Zn に対し生体は様々な反応機構を有する。インスリンの合成に不可欠な膵臓特異的 Zn トランスポーターである ZnT-8 は、膵臓の β 細胞で発現する (Chimienti et al., 2004)。また Zn は様々な酵素の構造を維持する役割を持ち、Cu-Zn SOD などの酵素の活性には必須である。Zn はこれらの酵素活性を介して様々な生体反応に寄与している。また生体は Zn の流出メカニズムも有する。Zip ファミリーや ZnT ファミリーなど細胞膜上には Zn トランスポーターが存在する (Kambe et al., 2011)。生体内の Zn 濃度はこれらのトランスポーターやメタロチオネインによって直接的にコントロールされる。本研究において ZnO ナノ粒子や ZnCl_2 の注入後、 *mt-1* の遺伝子発現

が24時間後に上昇し、その後コントロールレベルまで減少した。この *mt-1* 遺伝子発現の挙動は、肺からの Zn^{2+} のクリアランスを示唆している。基本的に、肺における ZnO ナノ粒子による生体影響には酸化ストレスが含まれる。ZnO によって肺の酸化ストレスが誘導され、傷害や炎症が引き起こされる。この結果はインビトロの試験でも同じである。ZnO ナノ粒子による肺のダメージは Zn^{2+} の溶出に起因し、そのダメージは ZnCl_2 と同様に一過性である。ZnCl₂ と比較すると ZnO は粒子であるため肺からのクリアランスには時間がかかり、継続的な Zn^{2+} の溶出は酸化ストレスの持続につながる。加えてナノ粒子を除去するために、上皮細胞ではサイトカインが分泌され、マクロファージの集積によって ROS が生成される (Brehm et al., 1996, Friedlander et al., 1994)。Ho et al (2011) によると、ZnO ナノ粒子をラットへ吸入曝露すると好中球の遊走が誘導され、8-OHdG が増加する。一方でインビトロにおいては、ZnO ナノ粒子による酸化ストレスの増大は Zn^{2+} の溶出に起因する。Song et al (2010) は、マウスのマクロファージ細胞である Ana-1 では細胞内の ROS の上昇を介して ZnO による酸化ストレスが認められたことを報告している。彼らは、ZnO ナノ粒子自体は ROS を生成できないため、細胞内 ROS の顕著な上昇は Zn^{2+} によるものであると説明している。インビトロにおいて、 Zn^{2+} はフェントン型の反応もしくはハーバー・ワイス反応を介した過酸化水素由来のラジカルを生成する可能性がある (Leonard et al., 2007)。インビボではまず、ラジカルは Zn^{2+} とフェントン型の反応によって生成され、その後好中球の遊走やマクロファージの集積

によって酸化ストレスが誘導されと考えられる。引き続いて、好中球やマクロファージの集積によって ROS が生成され 2 次的な酸化ストレスが起こることが考えられる。その結果として、tHODE のような酸化生成物や α -トコフェロールのような抗酸化物質が増加する。ゼブラフィッシュに対する ZnO ナノ粒子の毒性について、その毒性の主要因は Zn^{2+} であるが、粒子も毒性の中で主要な要因となっていることが報告されている (Yu et al., 2011)。細胞内に取り込まれた ZnO は Zn^{2+} の源となる。しかしながら、粒子の溶解性は粒子サイズや表面積、表面修飾などの様々な物理学的性質に影響される。そのため、化学的には同じ「ZnO」であっても、その細胞影響は個々の「ZnO ナノ粒子」製品によって異なる。ZnO ナノ粒子の毒性において Zn^{2+} は主要な要因であるため、その毒性評価には溶解性の定量が不可欠である。

以上のことから、ZnO ナノ粒子はインビボ(肺)およびインビトロ(培養細胞)において酸化ストレスを誘導し、その酸化ストレスは Zn^{2+} の溶出に起因すること、 Zn^{2+} の溶出による酸化ストレスの誘導には、インビトロとインビボのどちらでも起こることが分かった。

図 2-1. ZnO ナノ粒子を気管内注入がラット BALF 中の LDH 活性に与える影響



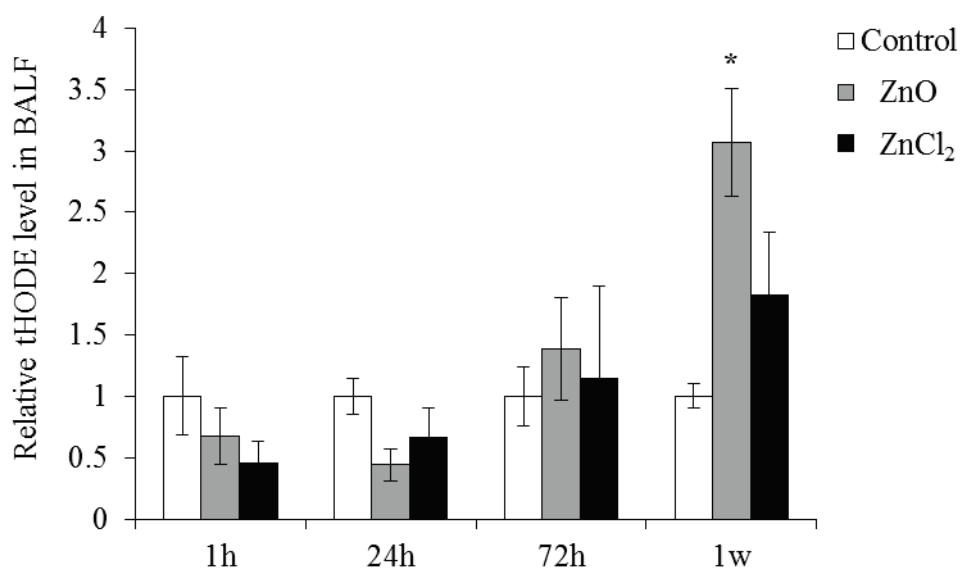
0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 mL の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g/mL}$) をラットに気管内注入した。

注入から 1、24、72 時間および 1 週間後に BALF を回収した。ZnCl₂ 群には濃度が $70 \mu\text{g/mL}$ の溶

液を注入した。コントロール群には 5% FBS 溶液を 0.4 mL 注入した。ZnO を注入した群とコントロー

ル群の間で、LDH 活性に顕著な差は認められなかった。

図 2-2. ZnO ナノ粒子の気管内注入がラット BALF 中のtHODE レベルに与える影響



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g}/\text{ml}$) をラットに気管内注入した。

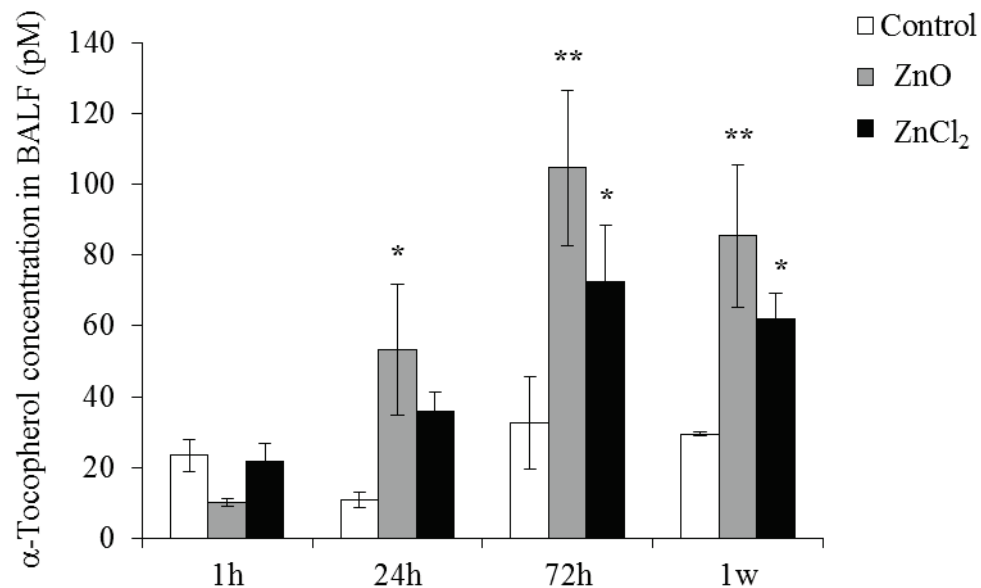
注入から 1、24、72 時間および 1 週間後に BALF を回収した。ZnCl₂ 群には濃度が $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶

液を注入した。コントロール群には 5% FBS 溶液を 0.4 ml 注入した。BALF 中の tHODE レベルは

LC-MS/MS によって測定した。棒グラフの上に示した*はコントロール群の tHODE レベルと比較し

て $p < 0.05$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 2-3. ZnO ナノ粒子の気管内注入がラット BALF 中の α -トコフェロール濃度に与える影響



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g}/\text{ml}$) をラットに気管内注入した。

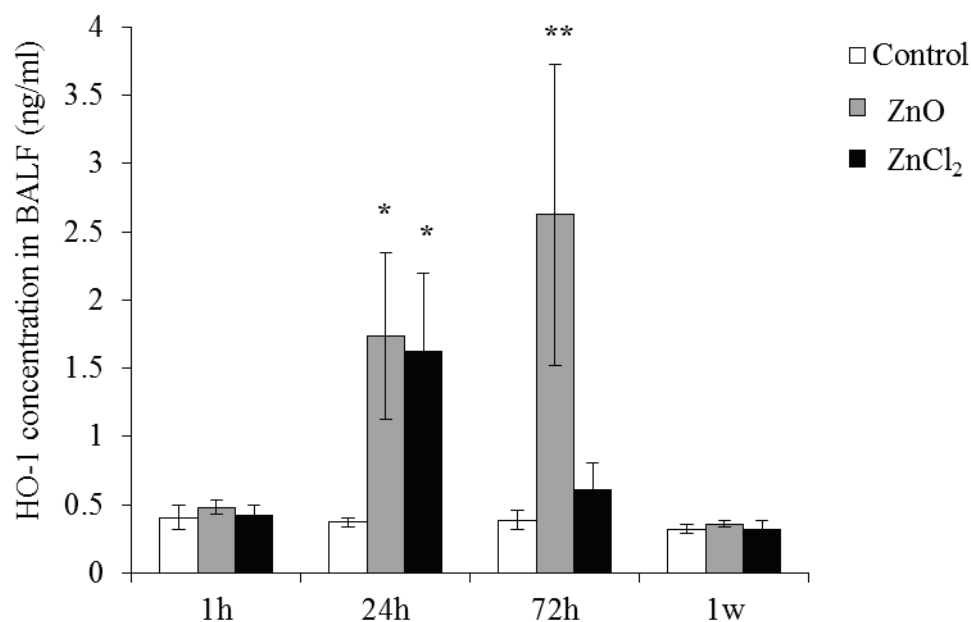
注入から 1、24、72 時間および 1 週間後に BALF を回収した。ZnCl₂ 群には濃度が $70 \mu\text{g}/\text{ml}$ の溶

液を注入した。コントロール群には 5% FBS 溶液を 0.4 ml 注入した。 α -トコフェロール濃度は HPLC

によって測定した。棒グラフの上に示した*および**はそれぞれコントロール群の α -トコフェロール

濃度と比較して $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 2-4. ZnO ナノ粒子の気管内注入がラット BALF 中の HO-1 濃度に与える影響



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn²⁺濃度: 70 μ g/ml) をラットに気管内注入した。

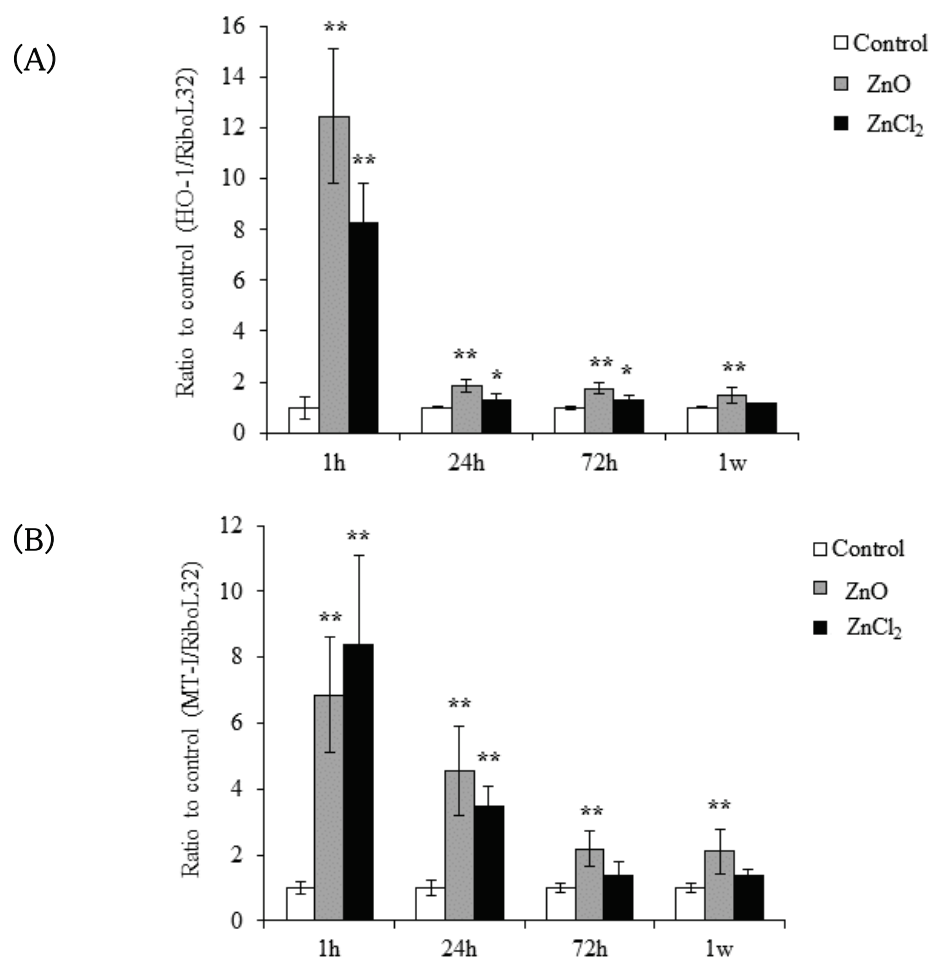
注入から 1、24、72 時間および 1 週間後に BALF を回収した。ZnCl₂ 群には濃度が 70 μ g/ml の溶

液を注入した。コントロール群には 5% FBS 溶液を 0.4 ml 注入した。HO-1 濃度は ELISA 法によっ

て測定した。棒グラフの上に示した*および**はそれぞれコントロール群の α -トコフェロール濃度と

比較して p < 0.05 および p < 0.01 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 2-5. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の *ho-1* 遺伝子および *mt-1* 遺伝子発現に与える影響



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn²⁺濃度: 70 μ g/ml) をラットに気管内注入した。注入から 1、24、72 時間および 1 週間後に BALF を回収した。ZnCl₂ 群には濃度が 70 μ g/ml の溶液を注入した。コントロール群には 5% FBS 溶液を 0.4 ml 注入した。*ho-1*(A) および *mt-1*(B) の遺伝子発現をリアルタイム PCR により評価した。数値はコントロール群の HO-1/RiboL32 もしくは MT-1/RiboL32 を 1 とした時の相対値を表している。棒グラフの上に示した**はコントロール群と比較して $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

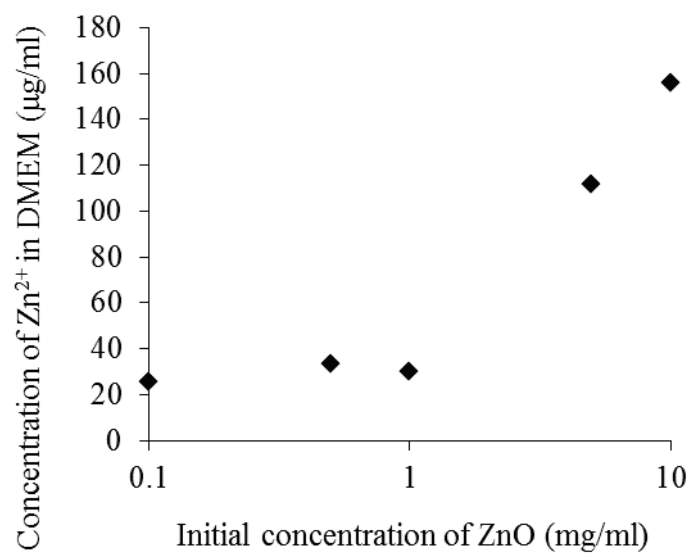
表 2-2. DMEM-FBS 分散液中の ZnO ナノ粒子の二次粒径

Sample	size (nm)	u (nm)	u_{line} (nm)	u_{app} (nm)	u_{method} (nm)	
ZnO	d_l	147.8	7.9	2.0	5.9	4.9
	d_n	69.7	14.8	1.6	12.2	8.2

d_l : light scattering intensity-averaged diameter; d_n : number-averaged diameter.

Refer to the paper reported by Kato et al (2009) for details of values.

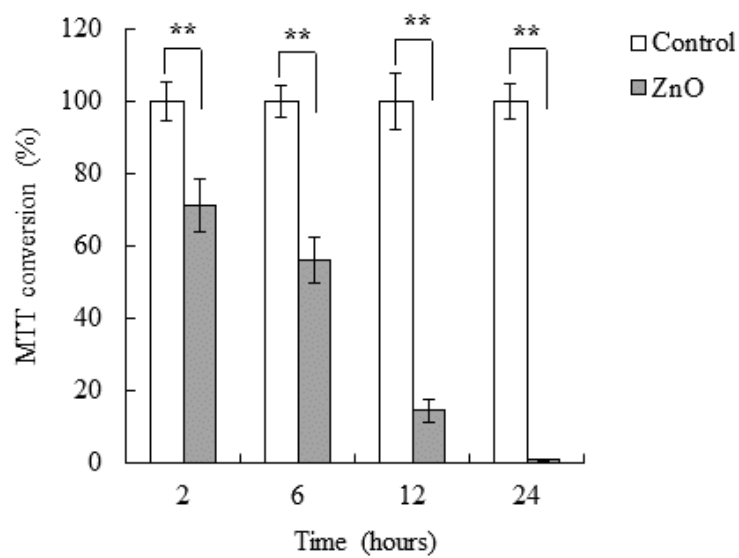
図 2-6. DMEM 培地中で ZnO ナノ粒子から溶出した Zn^{2+} 濃度



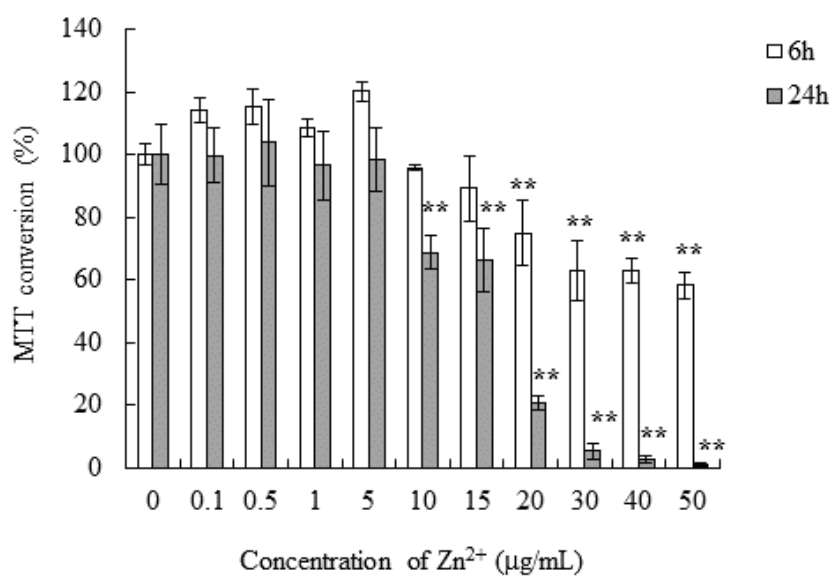
ZnO ナノ粒子を DMEM-FBS 中に分散し、37°C の条件下で 24 時間静置した。その後、分散液を限外濾過にかけて粒子中の Zn と溶解した Zn を分離した。濾液中の Zn (溶出した Zn) の量は、5-Br-PAPS により測定した。DMEM 中の Zn 濃度は検出限界以下であった。

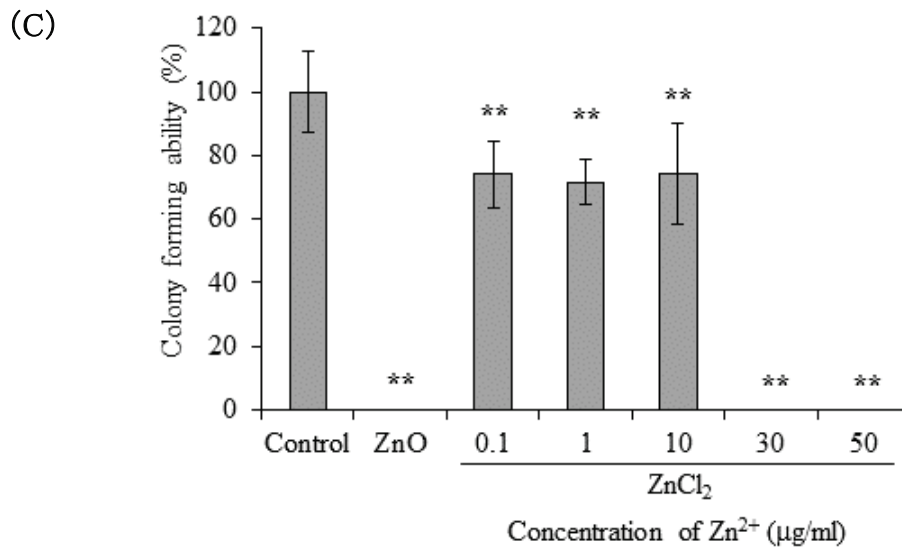
図 2-7. ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の曝露が A549 に与える影響

(A)



(B)

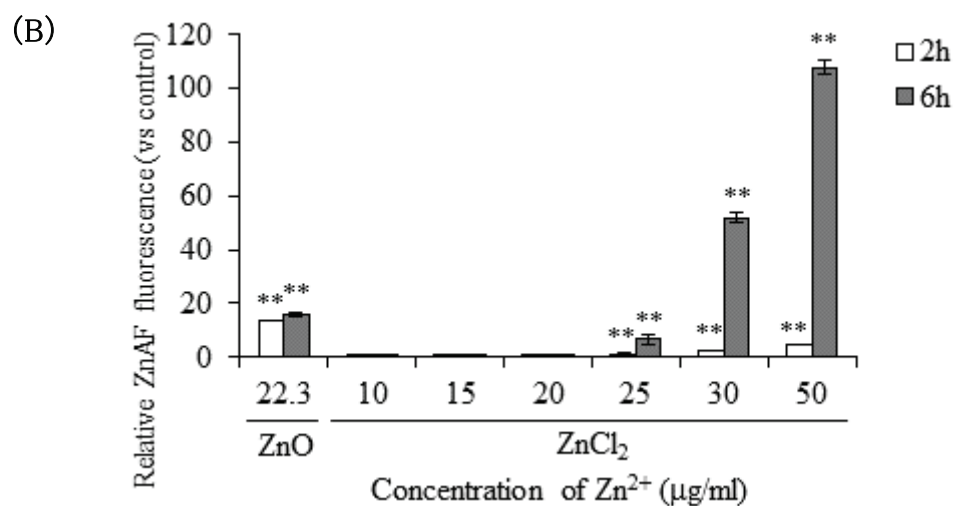
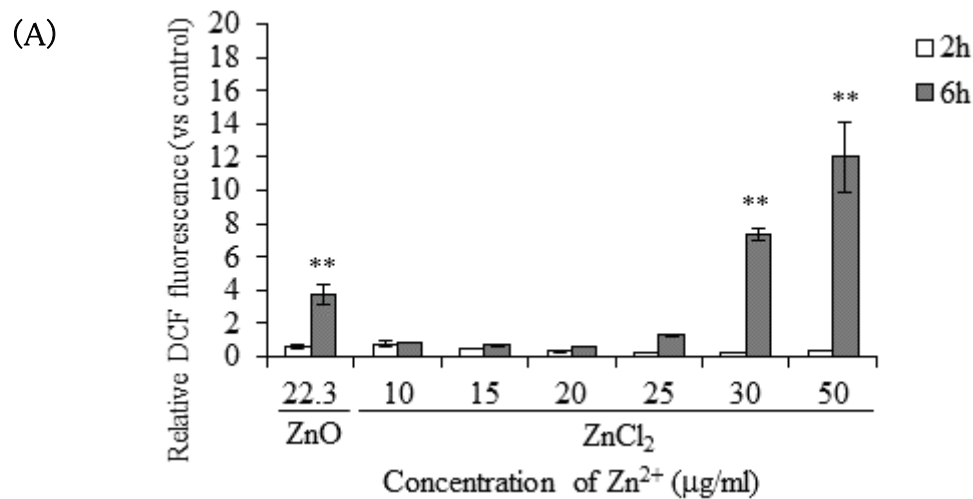




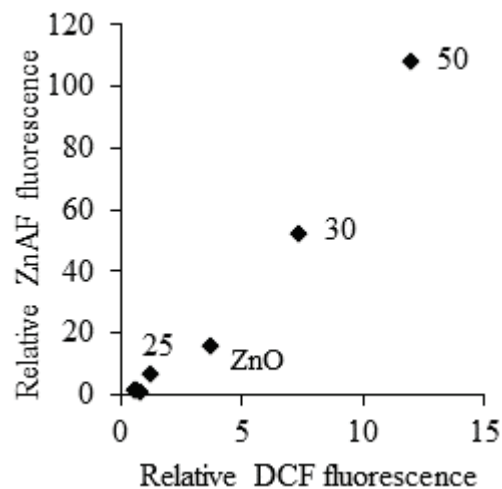
MTT アッセイにより A549 のミトコンドリアの酵素活性に対する ZnO ナノ粒子(A) および ZnCl₂(B) の曝露の影響を測定した。A549 細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液もしくは ZnCl₂ 培地溶液を 2、6、12、24 時間曝露した。グラフの数値はコントロール群のミトコンドリアの酵素活性を 100%とした時の相対的なパーセンテージである。(C) ZnO ナノ粒子と ZnCl₂ の曝露がコロニー形成能に与える影響をクロノジェニックアッセイにより評価した。コロニー数の計測前に、細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液もしくは ZnCl₂ 培地溶液を 7 日間曝露した。コントロール細胞の増殖能を 100%とした。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 68.6 µg/ml であり、Zn²⁺濃度は 22.3 µg/ml であった。棒グラフの上に示した**はコントロール群と比較して p<0.01 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 2-8. ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の曝露による細胞内 ROS レベルと細胞内 Zn²⁺レ

ベルの関連性

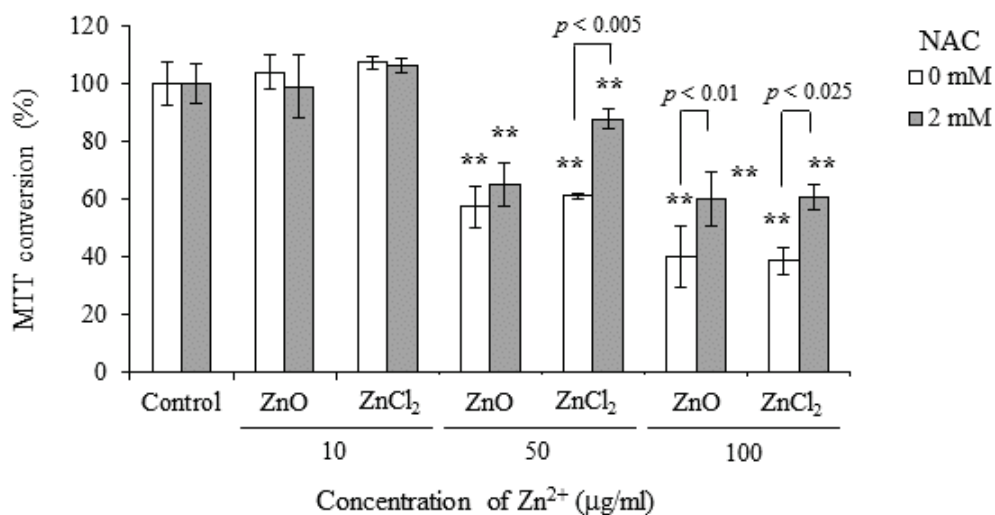


(C)



(A) ZnO ナノ粒子および ZnCl_2 の曝露後における細胞内の ROS レベルと、(B) 細胞内の Zn^{2+} レベルを測定した。A549 細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液もしくは ZnCl_2 培地溶液を 2 もしくは 6 時間曝露した。その後 DCFH 法により細胞内の ROS レベルを、フローサイトメーターで測定した。次に細胞内の Zn^{2+} レベルを ZnAF-DA を使用してフローサイトメーターで測定した。(C) 細胞内 ROS レベルと細胞内 Zn^{2+} レベルの相関性をグラフ化した。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は $68.6 \mu\text{g/ml}$ であり、 Zn^{2+} 濃度は $22.3 \mu\text{g/ml}$ であった。棒グラフの上に示した**はコントロール群と比較して $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 2-9. ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の曝露による A549 の細胞生存率への影響に対する NAC 処理の効果



ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ の曝露による細胞影響に対する NAC 処理の効果を MTT アッセイにより調べた。A549 細胞に 2 mM の NAC を 12 時間前処理した後に、ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ を 6 時間曝露した。ZnO ナノ粒子および ZnCl₂ 曝露液中の Zn²⁺濃度は、10、50、100 µg/ml であった。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 68.6 µg/ml であり、Zn²⁺濃度は 22.3 µg/ml であった。棒グラフの上に示した*および**はそれぞれ無処理群と比較して p<0.05 および p<0.01 水準で統計的に有意差のあることを示す。

第三章 ZnO ナノ粒子が引き起こす急性期ラット肺の酸化ストレスおよび炎症に対するアスコルビン酸の防御効果

緒言

第二章では、ZnO ナノ粒子の気管内注入によってラットの肺で引き起こされる酸化ストレスには、ZnO ナノ粒子から放出される Zn^{2+} が関与していることを明らかにした。インビボの試験では ZnO ナノ粒子の注入による主な酸化ストレス応答としてリノール酸の脂質過酸化生成物である tHODE がラット肺中で顕著に増加した。インビトロの試験では、 ZnCl_2 の A549 細胞への曝露によって、曝露した Zn 濃度依存的に細胞内の ROS レベルが上昇することと、細胞内 ROS レベルと細胞内 Zn^{2+} レベルに相関性があることが分かった。一方で ZnO ナノ粒子による酸化ストレス以外の生体反応として、ヒトの細胞への曝露によって IL-8 の発現上昇 (Gojova et al., 2007, Wu et al., 2010, Barardis et al., 2010, Kermanizadeh et al., 2013) が誘導されという報告がある。特に Gojova et al. (2007) の報告によると、ヒトの大動脈上皮細胞への ZnO ナノ粒子の曝露によって、Zn の細胞内取込みが曝露量依存的に増加した。同様に炎症関連マーカーの mRNA レベルも曝露量依存的に上昇した。これらの報告は、ZnO ナノ粒子からの Zn^{2+} の放出は、炎症応答にも関与している可能性を示唆する。実際に、ZnO ナノ粒子の曝露によるインビトロでの ROS 生成能は、インビボにおける ZnO ナノ粒子による炎症誘導能に関与していると思われる (Landsiedel et al., 2010)。これらのことから ZnO ナノ粒子から

放出される Zn^{2+} が、酸化ストレスや炎症の誘導に関与していることが考えられる。

ZnO ナノ粒子による生体影響のメカニズムが明らかになりつつある一方で、その影響から生体を防御するための研究報告は無い。 ZnO ナノ粒子は工業ナノ粒子の中でも顔料や化粧品など多くの需要があり生産量は多い。そのため ZnO ナノ粒子の生体影響に対する防御に関する研究、工場での労働衛生の観点からも必須である。 ZnO ナノ粒子による毒性影響の中で酸化ストレスは重要な役割を担っている。このことから ZnO ナノ粒子が誘導する酸化ストレスを防御することが、毒性影響全体の防御につながるのではないかと考えた。本研究では酸化ストレスの防御のために、ラジカルスカベンジャーである抗酸化物質のアスコルビン酸 (AA) を使用した。AA はラジカルを捕捉することによって ROS による細胞膜の酸化ストレスを抑え傷害を防ぐ。A549 細胞に対するタルクナノ粒子の曝露が誘導する細胞内脂質過酸化が、AA の処理によって減少するという報告もある (Akhtar et al., 2010)。また Ahman et al. (2012) によると、AA はシリカナノ粒子が誘導する ROS の生成とアポトーシス伝達系の活性を抑えることが分かっている。更に AA には酸化ストレスだけではなく炎症を抑える効果も持つ。Tebbe et al. (1997) は、ヒトケラチノサイトに対する UV 照射が引き起こす後炎症サイトカイン IL-1 α 、IL-6 の分泌が、AA の処理によって減少したことを報告している。

本研究は ZnO ナノ粒子の気管内注入による肺の急性期毒性に対する AA の防御効果を調べることを目的として、酸化ストレスおよび炎症関連バイオマーカーの測

定を行った。

実験材料および実験方法

1. 気管内注入用 ZnO ナノ粒子分散液の調製とキャラクタリゼーション

本研究で使用した ZnO ナノ粒子とその特性、および分散液の調製方法とキャラクタリゼーションの方法については第二章に記した。

2. ZnO ナノ粒子の気管内注入と AA の給水

試験に使用したラットの購入、飼育については第二章に記した。第二章の結果から ZnO ナノ粒子分散液 0.2 mg/0.4 ml/個体の単回注入によりラットの肺で急性期の酸化ストレスが誘導されたことから、本研究でも同条件で ZnO ナノ粒子の気管内注入を行った。気管内注入の手順は第二章と同じである。コントロール群のラットには ZnO ナノ粒子分散液と等量の 5% FBS 水溶液を注入した。気管内注入後コントロール群と ZnO ナノ粒子注入群のそれぞれの中で、引き続き水道水を給水した群と、1% AA を給水した群に分けた(表 3-1)。一群当り 4 匹以上のラットで試験を行い、全てのラットが自由に飲水できる環境で飼育した。

気管内注入から 24 時間、もしくは 1 週間後にラットを解剖し、血液、BALF および肺の採取を実施した。解剖および BALF の回収方法は第二章と同様の手順で行

った。

3. BALF 中のバイオマーカーの測定

BALF 中の LDH 活性および HO-1 の測定手順は第二章に記した。BALF 中のインターロイキン-6 の濃度は Quantikine^(R) IL-6 ELISA キット (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN)を使用して付属の手順書に従って測定した。

4. リアルタイム PCR

肺組織中の HO-1 およびラット好中球走化性因子 (CINC)-1、CINC-2、CINC-3 および MT-1 の遺伝子発現をリアルタイム PCR によって検出した。肺組織からの RNA 抽出およびリアルタイム PCR は第二章に述べた手順と同様に行った。遺伝子発現レベルの分析は $\Delta \Delta Ct$ 法で行った。肺組織の PCR 増幅は、ラットの β -アクチンを内部標準として、TaqMan[®] gene expression assays (Life Technologies Corp.)を用いて分析した。HO-1、CINC-1、CINC-2、CINC-3、MT-1 の遺伝子発現解析 ID を表 3-2 にまとめた。

5. 血漿中の AA 濃度の測定

血漿中の AA 濃度は UV 検出器を備えた HPLC システム (SPD-10AV, 263nm;

Shimadzu)を用いて測定した。測定には NH₂ カラム (Wakosil 5NH₂, 5 μm, 250×4.6 mm; 和光純薬)を使用し、40 mM PBS/メタノール (1/9, vol/vol)を 1 ml/分の速度で流した。解剖時に採取したラットの血液を 2,400g×10 分間の条件で遠心し、血漿を回収した。血漿 1 に対してメタノール 4 を加え、1 分間ボルテックスミキサーで混和した後、20,400×10 分間の条件で遠心し、遠心上清を測定に使用した。

6. 統計処理

データは、少なくとも 3 回の異なる試験から平均値±SE を算出した。統計分析は多重比較に対するチューキー検定を使用し、分散分析 (ANOVA)によって有意差を検定した。

表 3-1 本試験におけるラットの群分け

Group	気管内注入	注入後の給水条件
Non-treated	-	-
Group 1	Vehicle ^a	Water
Group 2		AA ^c
Group 3	ZnO NPs ^b	Water
Group 4		AA ^c

^a 5% BSA を含む 0.4 ml の蒸留水

^b 0.2 mg nZnO ナノ粒子 (溶媒: 5% BSA を含む 0.4 ml の蒸留水)

^c 1%アスコルビン酸溶液

表 3-2 ラット肺組織中の HO-1、CINC_s、MT-1 遺伝子発現解析 ID

遺伝子	ID
HO-1	Rn00561387_ml
CINC-1	Rn00578225_ml
CINC-2	Rn00593435_ml
CINC-3	Rn00586403_ml
MT-1	Rn00821759_gl

結果

1. ZnO ナノ粒子分散液のキャラクタリゼーション

本研究で使用した ZnO ナノ粒子分散液は、第二章で使用した分散液と同じものを使用した。TEM で観察した粒子の一次粒径は約 20-50 nm で、DLS で測定した散乱強度基準の二次粒径は 101 nm であった。ZnO ナノ粒子分散液中の Zn^{2+} 濃度は 70 $\mu\text{g/ml}$ であった。

2. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の傷害に対する AA 給水の効果

肺の傷害は BALF 中の LDH 活性によって評価した(図 3-1)。ZnO ナノ粒子の注入から 1 日後において、グループ 3 の LDH 活性は無処理群と比較して顕著に増加していた。その一方で ZnO ナノ粒子の注入後に AA を給水したグループ 4 では、無処

理群との間に顕著な差は認められなかった。注入から 1 週間は何れの群も LDH 活性について無処理群との間に顕著な差は認められなかった。

3. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の酸化ストレスに対する AA 給水の効果

酸化ストレス応答タンパク質の1つである HO-1 について BALF 中の濃度(図 3-2A)と肺組織中の遺伝子発現(図 3-2B)を測定することによって、ZnO ナノ粒子による肺の酸化ストレスを評価した。注入から 1 日後の BALF 中の HO-1 濃度は、ZnO ナノ粒子を注入したグループ 3 およびグループ 4 のどちらも無処理群と比較して顕著な増加が認められた。グループ 3 とグループ 4 の注入 1 日後の HO-1 濃度を比較すると、グループ 3 と比較してグループ 4 の濃度は有意に低かった。同様に肺組織中の *ho-1* 遺伝子発現レベルも、グループ 3 は注入から 1 日後において非常に高い発現レベルであったが、グループ 4 の *ho-1* 遺伝子発現レベルはグループ 3 より顕著に低いレベルであった。注入から 1 週間後においては、BALF 中の HO-1 濃度および *ho-1* 遺伝子発現レベルのどちらも、グループ間における顕著な差は認められなかった。

4. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の炎症応答に対する AA 給水の効果

炎症サイトカインである BALF 中の IL-6 を測定した。ZnO ナノ粒子の注入から 1 日後において、グループ 3 の IL-6 濃度は著しい増加を示したが(図 3-3A)、グループ

4 の IL-6 濃度は無処理群と同レベルのままであった。同じく 1 日後の時点において、グループ 3 の好中球走化性因子である CINC-1 および CINC-3 の遺伝子発現レベルについても増加傾向が確認されたが、グループ 4 では増加の程度が軽減されていた(図 3-3B、3D)。CINC-2 については、何れの群においても遺伝子発現レベルに変化は認められなかった(図 3-3C)。注入から 1 週間後においては、IL-6 および CINC-3 共に何れの群間にも明確な差は認められなかった。

5. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の MT-1 遺伝子発現に対する AA 給水の効果

ZnO ナノ粒子の注入 1 日後において、グループ 3 およびグループ 4 の肺組織中の MT-1 遺伝子発現は無処理群と比較して顕著な増加を示した(図 3-4)。ZnO 注入後から AA を給水したグループ 4 の MT-1 発現レベルは、グループ 3 と比較して僅かな減少が認められた。注入から 1 週間においては、いずれの群間にも MT-1 の遺伝子発現レベルに顕著な差異は認められなかった。

6. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット血漿中の AA 濃度の変化

ZnO ナノ粒子の気管内注入から 1 日後のラット血漿中の AA 濃度は、注入後 AA を給水したグループ 2 およびグループ 4 において顕著な増加が認められた(図 3-5)。

しかしながら、注入 1 週間後では AA 濃度の増加はグループ 4 のみで認められ、グループ 2 の AA 濃度は無処理群と同レベルであった。

考察

第二章で、我々は ZnO ナノ粒子が、急性期に肺毒性を示し、酸化ストレスが関与することを明らかにした (Fukui et al., 2012)。ZnO ナノ粒子は更に培養細胞に対しても細胞毒性影響を示す (Heng et al., 2011, Huang et al., 2011, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2012, Song et al., 2010, Tsou et al., 2011, Xia et al., 2011)。金属酸化物ナノ粒子の毒性には金属イオンの放出が関与していることが近年報告されている (Horie et al., 2011, Horie et al., 2012b)。ZnO ナノ粒子から培地中に Zn^{2+} が溶出され、それによって細胞内の ROS 生成が誘導される。更に細胞試験によって、細胞内における Zn^{2+} の溶出および酸化ストレスの誘導が、細胞死の誘導といった ZnO ナノ粒子による細胞影響の鍵となることが分かっている (Osman et al., 2010, Roy et al., 2011, Yang et al., 2009)。インビボおよびインビトロの研究から、ZnO ナノ粒子のラットへの気管内注入は、肺の酸化ストレスと一過性の傷害を誘導に加え (Fukui et al., 2012)、BALF 中の好中球を増加させることが分かっている (Chuang et al., 2014)。ヒトの細胞への ZnO ナノ粒子の曝露は、マクロファージの集積を誘導することで知られる炎症性サイトカインやケモカインの増加といった炎症性応答を誘導する (De Barardis

et al., 2010, Gojova et al., 2007, Kermanizadeh et al., Wu et al., 2010)。炎症性サイトカインやケモカインの増加は結果として、好中球のような他の貪食細胞と同様に ROS を生成する(Forman et al., 2011, Peake et al., 2004)。すなわち ZnO が肺で誘導する酸化ストレスには、 Zn^{2+} の放出による初期のストレス(直接的)と、好中球やマクロファージの集積による二次的(間接的)ストレスがある。

本研究では、ラジカル捕捉的抗酸化物質として知られる AA が、ZnO ナノ粒子の気管内注入から 1 日後において肺で誘導される酸化ストレス、傷害および炎症を抑えることを確認した。HO-1 の 肺組織中遺伝子発現および BALF 中の濃度は ZnO ナノ粒子の注入によって増加したが、AA の給水によって抑えられた。これらの結果から、AA は ZnO ナノ粒子の注入が誘導する酸化ストレスを抑えることが分かった。BALF の分析によって AA は IL-6 濃度の増加を抑え、肺組織中の CINC の遺伝子発現も抑えることができた。BALF 中の LDH 活性についても同様に AA の給水によって抑制された。すなわち、AA は ZnO ナノ粒子が誘導する肺の炎症や傷害も抑えることが分かった。対照的に、MT-1 の遺伝子発現は第二章で ZnO および ZnCl_2 で示した通り(Fukui et al., 2012)、ZnO ナノ粒子の注入で誘導され、AA を給水しても高いレベルのままだった。これらの結果は、ZnO ナノ粒子から放出された Zn^{2+} が MT-1 を誘導することを示している。そのため AA の給水は ZnO ナノ粒子の注入による肺中の酸化ストレスや炎症、傷害といった反応に対して抑制効果を持つが、 Zn^{2+} の放出は抑制しないと結

論づけた。AA による酸化ストレスの抑制と炎症の抑制の相互関係は不明である。しかしながら、AA による炎症の抑制は、好中球やマクロファージによる貪食作用による ROS の生成を抑えた結果である可能性がある。本研究において AA は CINC の遺伝子発現を抑えた。CINC は好中球走化性因子として知られているため、その発現の抑制は好中球の働きやその結果として起こる ROS の生成を抑制することにつながる。

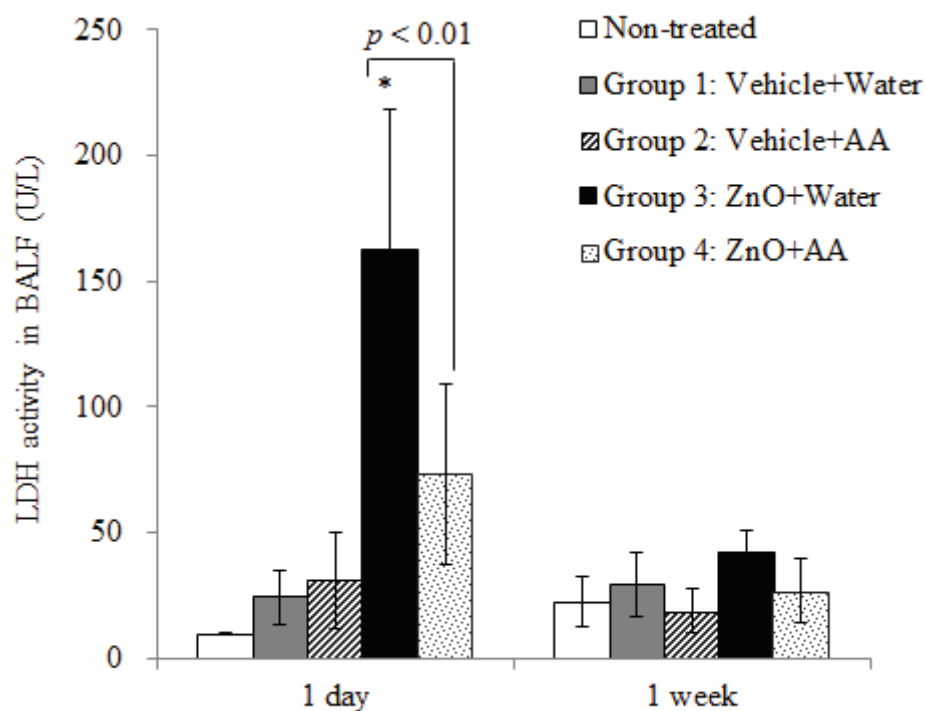
AA には生体が持つ抗酸化システムを拡大することによって間接的に炎症を抑制する可能性がある。酸化ストレスは炎症と非常に強い関わりを持ち、ROS は炎症調節剤としての役割を持つ (Lee et al., 2012)。一般的に口から取込まれた AA は、小腸で再吸収されて、血中から組織へと取込まれる。本研究においては、AA を給水した群の血漿中の AA 濃度が増加した。一方で ZnO ナノ粒子を曝露した後に、細胞内の Zn^{2+} 濃度が上昇することが明らかとなっている (Fukui et al., 2012)。そのため、ZnO ナノ粒子による肺の酸化ストレスおよび炎症の誘導は、ZnO ナノ粒子の細胞内への取込の結果だといえる。AA もまた膜輸送体の SVCT を通して細胞内へ取込まれる (Tsukaguchi et al., 1999)。ヒトの肺組織には SVCT1 および SVCT2 の両方が存在する (Savini et al., 2008)。このことから、細胞内に取込まれた AA が、ZnO ナノ粒子による細胞毒性に対する防御機能を示す可能性があると考えられる。更に、AA はタルクナノ粒子による細胞内の脂質過酸化を抑制し、また他の報告では AA はシリカナノ粒子による細胞内 ROS の生成を抑えることが分かっている (Akhtar et al., 2010, Ahmad et

al., 2012)。従って、給水によって体内に取込まれた AA は血中から肺組織に運ばれ、ZnO ナノ粒子によって生成が誘導された ROS を除去したと考えた。AA がラジカルを捕捉することによって、ROS によって介在される炎症応答の誘導が抑えられた可能性がある。しかしながら、ZnO ナノ粒子による ROS 生成の誘導メカニズムは不明である。メカニズムには 2 つの可能性が考えられる。まず 1 つ目に、フェントン様反応による直接的なメカニズムである。2 つ目は細胞内に取込まれた ZnO ナノ粒子から放出された Zn^{2+} によって、ミトコンドリアの電子伝達系が攪乱されて引き起こされる間接的なメカニズムである。ZnO ナノ粒子による ROS の生成メカニズムおよび、AA による防御効果のメカニズムを明らかにすることが次の研究課題となる。

本研究をまとめると、ZnO ナノ粒子の気管内注入によって注入から 1 日後にラットの肺で誘導される急性期酸化ストレス、炎症および傷害は、注入直後からの AA の給水によって抑制されることが分かった。しかしながら、その防御メカニズムは不明である。

図 3-1. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット BALF 中の LDH 活性に対する AA

給水の効果



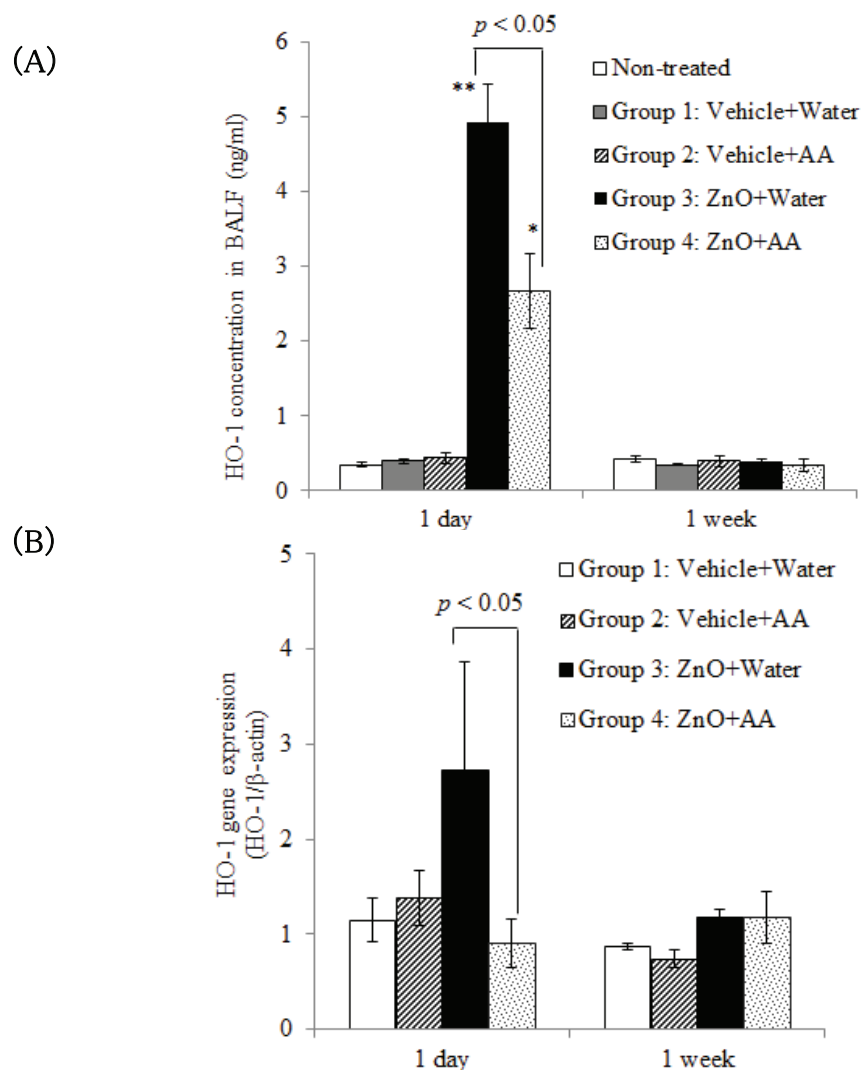
0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 mL の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g/mL}$) をラットに気管内注入した。

注入から 1 日後および 1 週間後に BALF を回収し遠心処理によって細胞を取り除いた後、LDH 活

性を測定した。棒グラフの上に示した*は無処理群の LDH 活性とと比較して $p < 0.05$ 水準で統計的

に有意差のあることを示す。

図 3-2. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の HO-1 への影響に対する AA 給水の効果



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g}/\text{ml}$) をラットに気管内注入した。

注入から 1 日後および 1 週間後に BALF と肺を回収した。(A) BALF 中の HO-1 濃度を ELISA 法

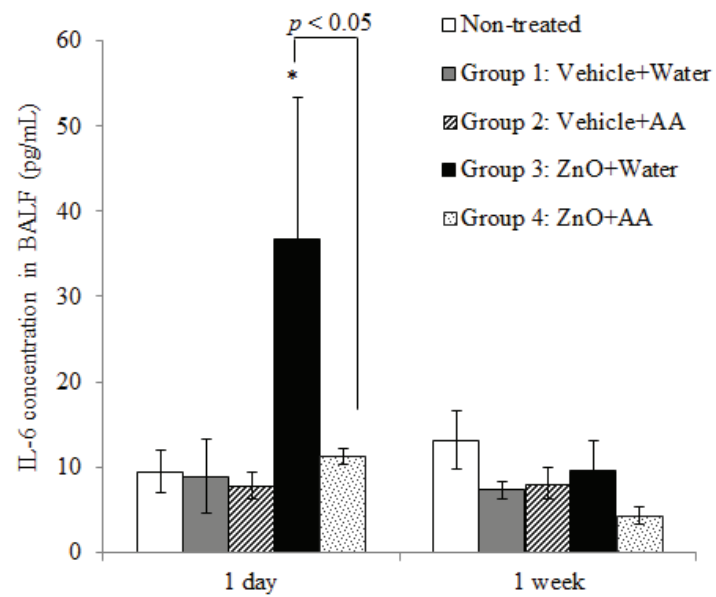
により測定した。(B) 肺組織中の *ho-1* 遺伝子発現をリアルタイム PCR により検出した。グラフ上の

数値は、無処理群を 1 とした時の相対比である。棒グラフの上に示した*および**は無処理群と比

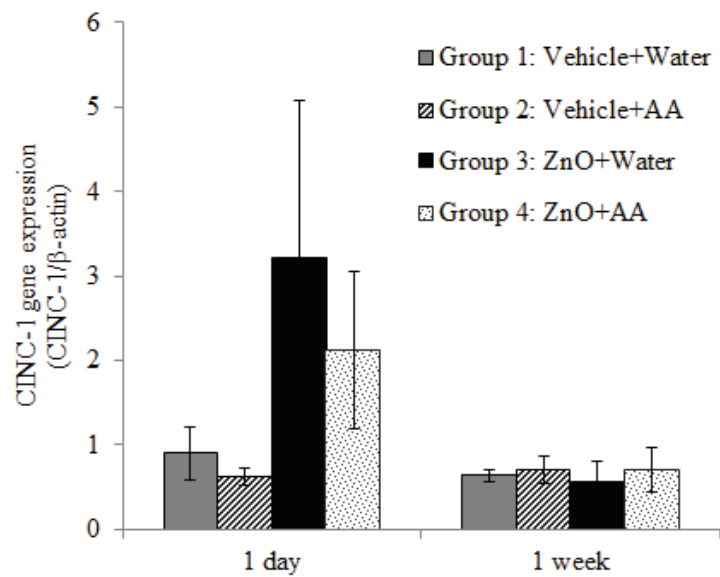
較して $p < 0.05$ および $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 3-3. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の炎症関連応答遺伝子の発現に対する AA の給水効果

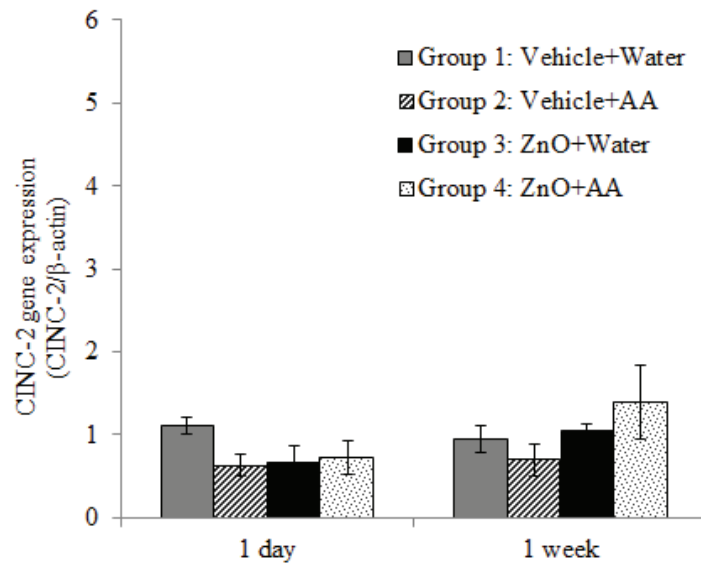
(A)



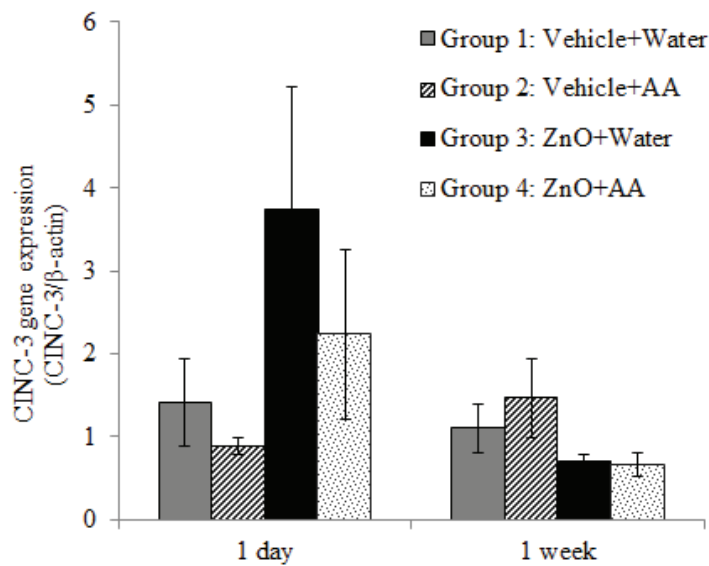
(B)



(C)



(D)



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g}/\text{ml}$) をラットに気管内注入した。

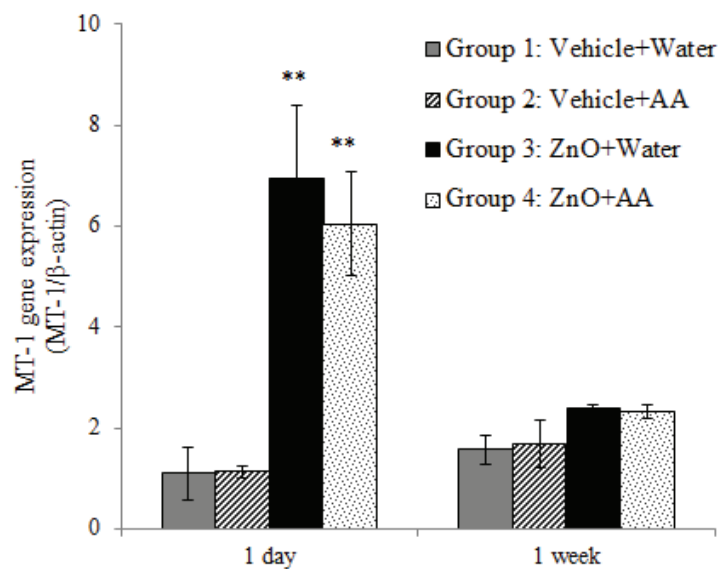
注入から 1 日後および 1 週間後に肺組織を回収した。 *il-6* (A)、 *cinc-1* (B)、 *cinc-2* (C)、 *cinc-3* (D)

の遺伝子発現をリアルタイム PCR により検出した。グラフ上の数値は、無処理群を 1 とした時の相

対比である。棒グラフの上に示した*は無処理群と比較して $p < 0.05$ 水準で統計的に有意差のある

ことを示す。

図 3-4. ZnO ナノ粒子の気管内注入によるラット肺の *mt-1* 遺伝子発現に対する AA 給水の効果



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g/ml}$) をラットに気管内注入した。

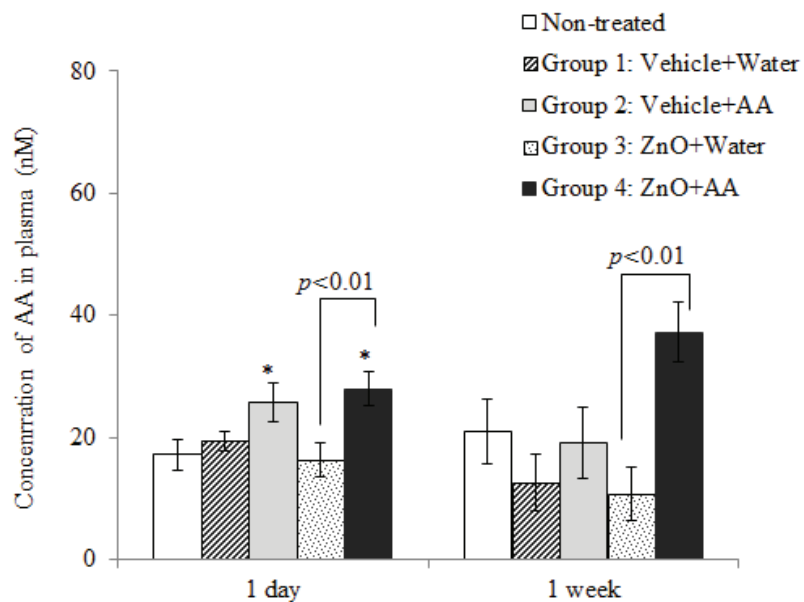
注入から 1 日後および 1 週間後に肺組織を回収し、*mt-1* の遺伝子発現をリアルタイム PCR により

検出した。グラフ上の数値は、無処理群を 1 とした時の相対比である。棒グラフの上に示した**は

無処理群と比較して $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 3-5. ZnO ナノ粒子の気管内注入および AA 給水によるラット血漿中の AA 濃度

への影響



0.2 mg の ZnO ナノ粒子を含む 0.4 ml の分散液 (Zn^{2+} 濃度: $70 \mu\text{g/ml}$) をラットに気管内注入し、1

日もしくは 1 週間ラットに水または 1% の AA 溶液を給水した。注入から 1 日後および 1 週間後に血

液を回収し HPLC にて血漿中の AA 濃度を測定した。棒グラフの上に示した*は無処理群と比較し

て $p < 0.05$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

第四章 ZnO ナノ粒子が誘導する細胞毒性に対するAAの防御的効果とそのメカニズム

緒言

第二章において、インビボおよびインビトロの両方でZnOナノ粒子が酸化ストレスを誘導することを明らかにした(Fukui et al., 2012)。これまでの報告から、ZnOナノ粒子から溶出した Zn^{2+} がZnOナノ粒子による毒性に深く関与していることが明らかにされている(Osman et al., 2010, Roy et al., 2011, Yang et al., 2009)。細胞内のROSレベルは、ZnOナノ粒子から細胞内で溶出した Zn^{2+} と相関して増加し、その結果細胞死が起こる(Heng et al., 2011, Huang et al., 2011, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2012, Song et al., 2010, Tsou et al., 2011, Xia et al., 2011)。ROSの生成はインビボおよびインビトロにおいて酸化ストレスへとつながる。ZnOナノ粒子が誘導する細胞毒性の主たる要因として酸化ストレスは重要であり、酸化ストレスの亢進はZnOナノ粒子による生体影響においても主たる要因である。第二章の結果から、ラットへのZnOナノ粒子の気管内注入によって急性期に肺で酸化ストレスや炎症が誘導された。また、この肺の毒性には Zn^{2+} が関与していることが分かった。これらの結果からZnOナノ粒子による肺毒性のメカニズムとして、1) ZnOナノ粒子からの Zn^{2+} の放出、2) 酸化ストレスの誘導の2つが重要であると考えられる。このうち、第三章ではZnOナノ粒子による酸化ストレスの誘導、に着目し酸化ストレスを抑えることでZnOナノ粒子によ

る肺毒性が軽減できるかどうかを検討した。

AA にはラジカルを捕捉することによって細胞膜の酸化や傷害を防ぐ効果がある。更に AA には亜鉛や銅、カドミウムといった重金属をキレートすることで (Tajmir-Riahi et al., 1991)、金属がもたらす酸化ストレスを抑える。更に AA は酸化ストレスだけではなく、ヒトのケラチノサイトで紫外線がもたらす IL-1 α や IL-6 といった炎症サイトカインの分泌を減少させるなど、炎症を抑える効果も持つ (Tabbe et al., 1997)。

第三章では、ZnO ナノ粒子の気管内注入によってラットの急性期肺で起こる酸化ストレス、炎症および傷害が、注入直後からの AA の給水によって軽減することを明らかにした (Fukui et al., 2014)。しかしながら ZnO ナノ粒子が誘導する毒性に対する AA による防御メカニズムが ROS の除去効果によるものか、Zn²⁺ のキレート効果によるものかは不明である。AA による防御メカニズムを明らかにすることは、ZnO ナノ粒子がもたらす生体へのリスクの軽減を考察するために必須である。

そこで本章では、ZnO ナノ粒子が誘導する細胞毒性に対する AA の効果を検証すると共に、ZnO ナノ粒子がもたらす肺の毒性に対する AA の防御的効果が、ROS を除去する抗酸化効果によるものか、あるいは ZnO ナノ粒子から放出された Zn²⁺ をキレートすることによるものか、そのメカニズムを解明する。

実験材料および実験方法

1. ZnO ナノ粒子と細胞曝露用分散液の調製

第二章と同様の ZnO ナノ粒子を使用した。ZnO ナノ粒子は 10 mg/ml のウシ血清アルブミン (BSA: ナカライテスク株式会社) に粒子濃度が 10 mg/ml となるように分散した。次に超音波槽 (シャープマニュファクチャリングシステム株式会社) で 30 分間容器を手で振りながら超音波処理を行った。出来上がった ZnO-BSA 分散液を DEMEM-FBS で 10 倍希釈し、この ZnO 培地分散液を基に、細胞応答試験を実施した。分散液中の ZnO ナノ粒子のサイズ分布は DLS によって測定した。AA は WAKO および関東化学から入手した。

2. A549 細胞の培養

A549 細胞の培養は第二章と同様の方法で行った。細胞試験のために細胞を 6 ウェルマルチプレート (Corning Incorporated) に 2×10^5 個/ml になるように播種し 24 時間培養した。培地交換を行った後に、ZnO ナノ粒子分散液を曝露し 6 時間培養した。AA を処理した群には、5 mM の AA を含む ZnO-DMEM 分散液を曝露した。

3. 細胞内 ROS レベルの測定

細胞内 ROS レベルは第二章で述べた方法と同様に DCFH-DA を用いて測

定した。ZnO-DMEM 分散液もしくは AA を含む ZnO-DMEM 分散液を 6 時間細胞に曝露した後、培地を 10 μ M の DCFH-DA を含む血清フリーDMEM 培地に交換し 37°C で 30 分間インキュベートした。その後、細胞を PBS で 1 回洗浄し 0.25% のトリプシン処理によって回収、PBS で 1 回洗浄し、500 μ l の PBS に再懸濁した。Cytomics FC500 フローサイトメトリーシステム(Beckman Coulter)の 488-nm のアルゴンイオンレーザーにより、DCF の蛍光強度を 525-nm の波長で測定した。1 サンプルにつき 5000 個の細胞について測定した。

4. リアルタイム PCR

ターゲット遺伝子の発現レベルはリアルタイム PCR によって評価した。RNeasy (Qiagen GmbH) を使用して細胞からトータル RNA を精製した。cDNA 合成には High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystems, Carlsbad, CA) を使用した。リアルタイム PCR は Step One real time-PCR system (Applied Biosystems) を利用して行い、遺伝子発現レベルの分析は $\Delta\Delta$ Ct 法で行った。細胞の PCR 増幅は、ヒトの β -アクチンを内在性の遺伝子として、TaqMan® gene expression assays (Life Technologies Corp.) を用いて分析した。HO-1、インターロイキン-8 (IL-8)、メタロチオネイン-2 (MT-2) の遺伝子発現解析 ID を表 4-1 にまとめた。

5. A549 細胞内への AA 取込みの評価

A549 細胞内の AA 濃度測定には、第 3 章の AA 測定方法と同様に UV 検出器を備えた HPLC システム (SPD-10AV, 263nm; Shimadzu) を使用した。測定には NH_2 カラム (Wakosil 5 NH_2 , 5 μm , 250 $\times$ 4.6 mm; 和光純薬) を使用し、40 mM PBS/メタノール (1/9, vol/vol) を 1 ml/分の速度で流した。1 mM および 5 mM の AA を 6 時間処理した A549 細胞を PBS で洗浄後、0.25 % のトリプシンにより回収した。回収した細胞を再度 PBS で洗浄し、100 μl の PBS に再懸濁した。次に細胞 1 に対してメタノール 4 を加え、1 分間ボルテックスミキサーで混和した後、20,400 $\times$ 10 分間の条件で遠心し、遠心上清を測定に使用した。

6. A549 細胞内の Zn^{2+} レベルの測定

細胞内の Zn^{2+} レベルの測定は、第二章と同様の方法で行った。A549 細胞に AA を含むもしくは含まない ZnO 分散液を 6 時間曝露した後、10 μM の ZnAF-2 DA を含む血清フリー DMEM 培地に交換し、更に 30 分間 37 $^{\circ}\text{C}$ の条件でインキュベートした。その後、細胞を PBS で 1 回洗浄し、0.25% のトリプシン処理によって回収、PBS で 1 回洗浄し、500 μl の PBS で再懸濁した。Cytomics FC500 フローサイトメトリーシステム (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA) の 488-nm のアルゴンイオンレーザーにより、ZnAF-2 による蛍光強度を 525-nm の波長で測定した。1 サンプル当り 5000 個の細胞

について測定した。

7. ZnO、Zn²⁺に対する AA の反応性の確認

ZnO に対する AA の反応性を評価するために、PBS 中に AA の濃度が 40 μ M となるように懸濁した。AA-PBS 溶液に対して ZnO ナノ粒子を 0、50、100、1000 μ M 添加し走査型分光光度計 (モデル UV-3100PC UV-VIS-NIR; 島津製作所) を使って 244 nm の波長の吸光度を測定した。AA と Zn²⁺ の反応性は直接的および間接的の 2 つの方法により評価した。直接的な測定方法は、PBS 中に AA の濃度が 40 μ M となるように懸濁し、その中に濃度が 0、50、100、1000 μ M となるように ZnCl₂ を加えた後、走査型分光光度計によって 244 nm の波長における吸光度を測定した。間接的な測定方法は、PBS 中に ZnCl₂ および 5-Br-PAPS をそれぞれ濃度が 10 μ M、50 μ M となるように懸濁し、そこに 0 から 40 μ M の AA を添加した。その後、走査型分光光度計を使って 5-Br-PAPS の吸収波長である 555 nm における吸光度を測定した。

さらに AA 添加有/無の条件下における、ZnO DMEM-FBS 分散液中の Zn²⁺ の溶出濃度を 5-Br-PAPS を使用して、調製 0 時間後および 6 時間後に測定した。測定方法は第二章と同様であり、測定は DU530-spectrophotometer (Beckman Coulter Inc., Miami, FL, USA) を用いて、555 nm の波長における吸光度を測定した。

8. 統計処理

データは、少なくとも 3 回の異なる試験から平均値±SE を算出した。統計分析は多重比較に対するダネット検定を使用し、分散分析 (ANOVA) によって有意差を検定した。

表 4-1. A549 細胞中の HO-1、IL-8、MT-2 遺伝子発現解析 ID

遺伝子	ID
HO-1	Hs01110250_ml
IL-8	Hs00174103_ml
MT-2	Hs02379661_gl

結果

1. ZnO ナノ粒子による細胞毒性に対する AA の効果

本研究で使用した ZnO ナノ粒子分散液中の二次粒径を DLS で計測した結果、個数基準で 90.16 nm であった。この分散液を用いて AA の処理の有無が、ZnO ナノ粒子が誘導する細胞内 ROS 生成に与える影響を DCFH 法で評価した(図 4-1)。AA 処理無しで ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の ROS レベルはコントロール群と比較して顕著な増加が認められた。一方で AA の処理と共に ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内

の ROS レベルの増加は抑えられていた。主要な酸化ストレス応答タンパクの一つである HO-1 の遺伝子発現レベルは ZnO ナノ粒子の曝露によって上昇したが、AA 処理と共に ZnO ナノ粒子を曝露した群では発現の上昇が抑えられた(図 4-2A)。同様にヒトの好中球遊走因子である IL-8 の遺伝子発現レベルについても、ZnO ナノ粒子の曝露によって上昇する一方で、AA の処理によって抑えられた(図 4-2B)。

2. A549 細胞内への AA の取込み

細胞内への AA の取込みを確認するため、細胞内の AA 濃度を測定した(図 4-3)。AA の処理から 6 時間後の細胞内の AA 濃度は、処理濃度依存的に増加していた。

3. 細胞内の Zn^{2+} 濃度に対する AA の効果

主な金属結合タンパク質である MT-2 の遺伝子発現レベルは、ZnO ナノ粒子の曝露によって上昇したが、AA の処理によって抑えられた(図 4-4A)。一方で細胞内の Zn^{2+} レベルは、AA 処理の有無に関わらず ZnO ナノ粒子の曝露によって上昇した(図 4-4B)。特に AA の処理と共に ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の Zn^{2+} レベルは、AA 処理無しで ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の Zn^{2+} レベルよりも有意に高かった。

4. ZnO ナノ粒子および Zn^{2+} に対する AA の反応性

ZnO ナノ粒子に対する AA の反応性を 244 nm の AA の吸光度の測定によって評価した(図 4-5)。ZnO ナノ粒子の濃度が 0 から 1 mM の範囲において、AA の吸光度に変化は認められなかった。また、細胞への曝露試験で使用した ZnO DMEM-FBS 中の Zn^{2+} 濃度は AA の添加の有無に関わらず、分散液の調整 0 時間後から 6 時間後では変化は認められなかった(表 4-2)。一方で 244 nm における AA の吸光度は、 Zn^{2+} 濃度依存的に変化を示し、波長範囲が 200 から 290 nm までの間における AA の吸光曲線も Zn^{2+} 濃度依存的に変化した(図 4-6A、B)。更に 555 nm における Zn^{2+} と 5-Br-PAPS の複合物の吸光度は AA の添加濃度の増加と共に減少する逆相関性を示した(図 4-6C)。

考察

これまでの研究から、生体内および細胞内において ZnO ナノ粒子が強い酸化ストレスを引き起こすことが分かっている。ZnO ナノ粒子の気管内注入によって起こる酸化ストレスはラットの肺で起こる炎症や傷害と関与している。一方で ZnO ナノ粒子は細胞培地中で Zn^{2+} を放出し、このことが ROS の生成レベルの上昇につながっている(Fukui et al., 2012)。ROS は炎症応答の誘導に関与していると共に、炎症反応による組織のダメージ影響にも寄与している(Pawliczak 2003, Cuzzocrea et al., 2000, Leiro

et al., 2004)。更に Zn^{2+} による細胞内の ROS レベルの上昇は細胞死につながる (Heng et al., 2011, Huang et al., 2011, Kim et al., 2010a, Kim et al., 2010b, Sharma et al., 2012, Song et al., 2010, Tsou et al., 2011, Xia et al., 2011)。それゆえに、 Zn^{2+} の放出と細胞内の ROS 生成は ZnO ナノ粒子による細胞毒性の主要な要因である。ZnO ナノ粒子による細胞毒性から細胞を防御するためには Zn^{2+} の放出を抑制することや、ROS の生成を抑えることが重要である。

第三章において ZnO ナノ粒子の気管内注入によってラットの肺で起こる脂質過酸化、炎症、傷害が AA の給水によって軽減することが分かった (Fukui et al., 2014)。本研究では、A549 細胞への ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される細胞内の ROS レベルの上昇が AA の処理によって抑えられた。更に HO-1 の遺伝子発現上昇も AA の処理によって軽減した。これらの結果はインビボ試験で得られた結果と一致していた。

一方で、本試験では A549 細胞内に AA が取り込まれることを確認した。AA はラジカルを捕捉することによって抗酸化効果をもたらす主要な抗酸化物質であり、また Zn などの金属に対するキレート能も持つ (Tajmir-Riahi et al., 1991)。そのため ZnO ナノ粒子による細胞毒性に対する AA の防御的効果の要因には2つの可能性が考えられる。一つ目の可能性は、細胞内で ZnO ナノ粒子から放出された Zn^{2+} が AA によってキレートされることによって Zn^{2+} を要因とする ROS の生成が抑えられることである。もう

一つの可能性は、細胞内の ROS を AA が除去することによって、引き続いて起こるはずの酸化ストレスの誘導や炎症応答が抑えられるということである。

AA のキレート作用の影響については、メタロチオネインの発現に着目した。メタロチオネインは、亜鉛やカドミウム、銅、水銀などの重金属と特異的に結合する (Tsukaguchi et al., 1999)。特に Zn が誘導する *mt-2* の遺伝子発現レベルは非常に高い (Savini et al., 2008)。しかしながら本研究においては、ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導された *mt-2* の遺伝子発現レベルの上昇は、AA の処理によって抑制された。そのため細胞内で ZnO ナノ粒子から溶出した Zn^{2+} が AA によって減少させられた、つまり AA が Zn^{2+} をキレートしたことによって細胞内のフリーな Zn^{2+} が減った可能性が考えられる。

AA 処理によって ZnO ナノ粒子が誘導する *mt-2* 遺伝子発現レベルの上昇が抑えられた一方で、細胞内の Zn^{2+} レベルは顕著に増加した。この結果は AA による Zn^{2+} のキレートによって細胞内の Zn^{2+} が減少したという考えに相反する結果であった。そのため、次に Zn の細胞内への取込みに注目した。AA 処理による細胞内 Zn^{2+} レベルの上昇は、細胞外の Zn^{2+} の取込みが誘導された結果であると考えた。そこで AA と ZnO および Zn^{2+} の反応性を調べた。AA が Zn^{2+} に対して (キレート) 反応性を持つことは分かっているが、ZnO に対して反応性を持つかどうかは不明であった。今回の研究から、AA は pH7.0 の PBS 中において ZnO ナノ粒子に対する反応性を示さず、AA を添

加した ZnO DMEM-FBS 分散液中の Zn^{2+} 濃度は 6 時間後も変化が認められなかった。すなわち AA は ZnO の溶解性には関与しないことが分かった。更に、AA は PBS 中に溶けた状態の Zn^{2+} に対しては反応性を示した。そのため、細胞外において ZnO ナノ粒子からの放出された Zn^{2+} は AA にキレートされ細胞内に取り込まれた可能性がある。更に ZnO ナノ粒子として細胞内に取り込まれ、細胞内で ZnO ナノ粒子から放出された Zn^{2+} も AA にキレートされると考えられる。そのため、AA 処理と共に ZnO ナノ粒子を曝露した細胞内の Zn^{2+} 濃度が、AA 処理を行わず ZnO ナノ粒子を曝露した細胞と比較して高い結果となった要因は、細胞外で溶出した Zn^{2+} が AA にキレートされ、AA と共に細胞内に取り込まれたためであると考えた。またインビボの抗酸化メカニズムにおいて Zn は重要な役割をはたす。酸化ストレス条件下において AA は Zn^{2+} の取込みを増大させ、 Zn^{2+} の欠乏条件下において AA は Zn^{2+} の取込みを抑制する (Agte et al., 2004)。このことから本研究において、 Zn^{2+} によって誘導された酸化ストレスが結果として Zn^{2+} の取込みを加速させた可能性もある。細胞内の Zn^{2+} 濃度の上昇によって起こる酸化ストレスや炎症応答が抑えられたのは、おそらく AA が Zn^{2+} をキレートし Zn がフリーではなくなったためであると考えられる。

本章をまとめると、ZnO ナノ粒子の曝露が A549 細胞内で誘導する酸化ストレスおよび炎症関連応答は、AA の処理によって軽減された。これらの結果は第三章のインビボ試験の結果と一致する。ZnO ナノ粒子から放出された Zn^{2+} が AA によってキ

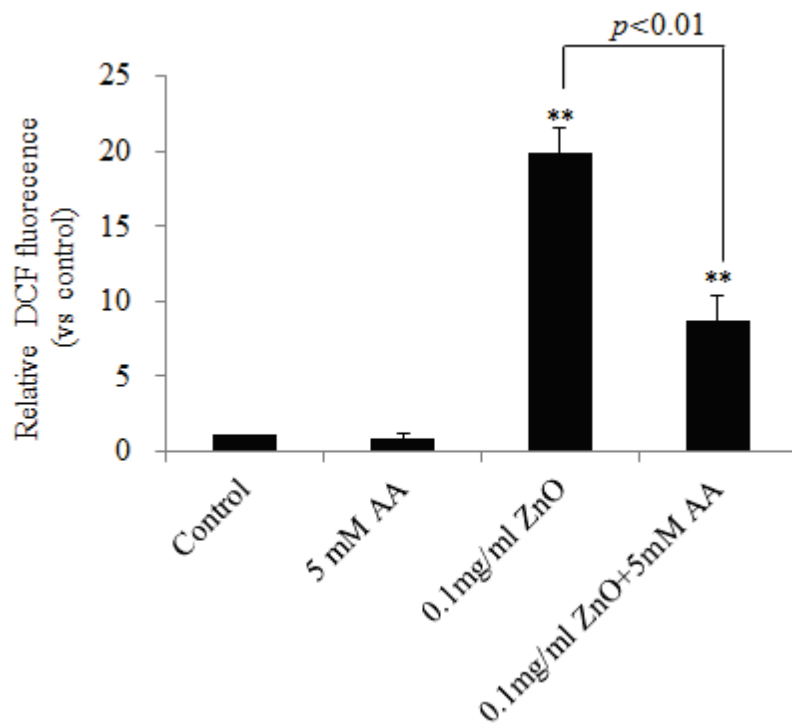
レートされたことが、ZnO ナノ粒子の曝露がもたらす細胞毒性が抑制されたことに深く
関与している。すなわち、酸化ニッケルや酸化銅等のナノ粒子から放出される金属に
よる毒性は、キレート剤によって抑制できる可能性がある。これらの知見は今後のナノ
粒子による毒性に対する防御の研究に寄与するであろう。

表 4-2. ZnO DMEM-FBS 分散液中に溶出した Zn^{2+} 濃度の変化

	Concentration of Zn^{2+} ($\mu\text{g/ml}$)	
	0 h	6 h
ZnO DMEM-FBS dispersion	17.8	14.6
	<i>SD</i>	<i>0.616</i>
ZnO DMEM-FBS dispersion with adding 5 mM AA	16.46	15.00
	<i>SD</i>	<i>0.782</i>

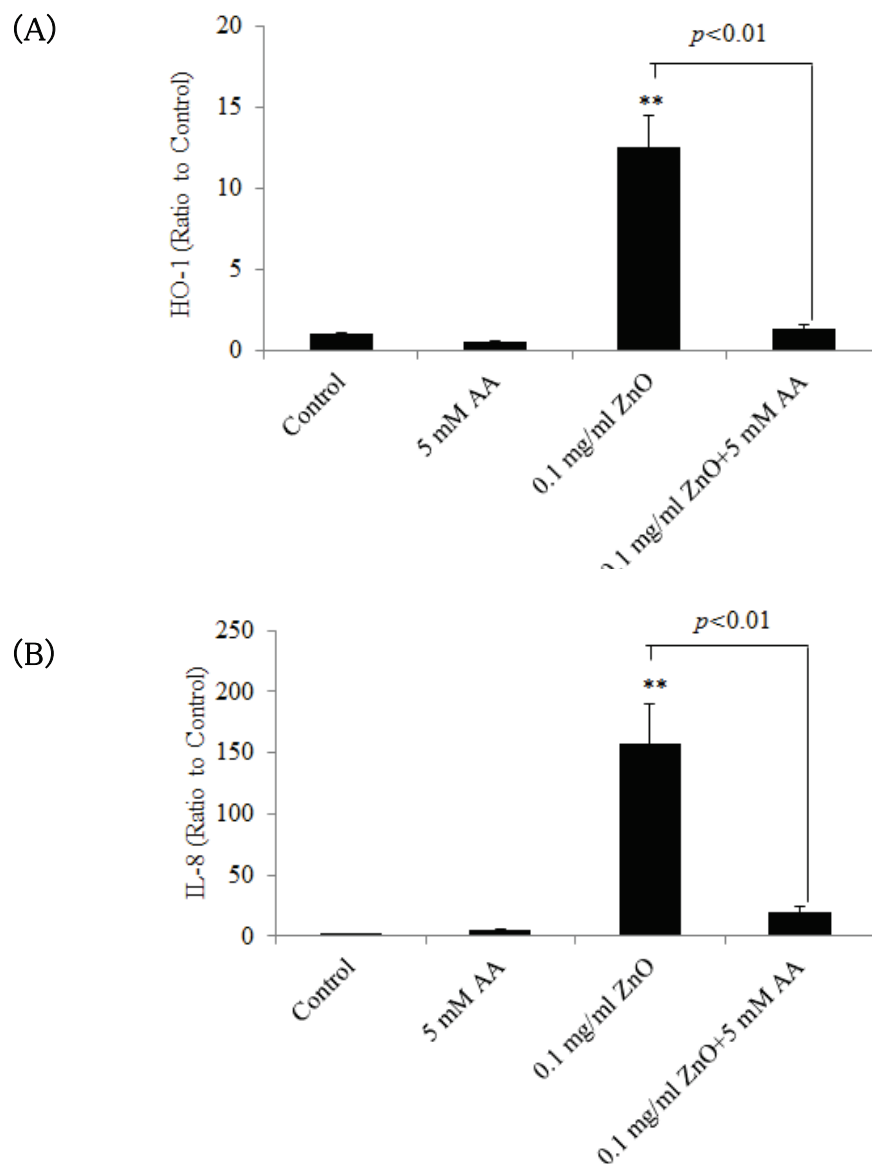
- ・分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 0.1 mg/ml であった。
- ・分光蛍光光度計によって 555 nm における 5-Br-PAPS の吸光度を測定し、 Zn^{2+} 濃度を算出した。

図 4-1. ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される細胞内 ROS レベルに対する AA の効果



A549 細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液を 6 時間曝露した。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 0.1 mg/ml であり、AA 処理を行った群の曝露液には 5 mM の AA が含まれていた。細胞内の ROS レベルを DCFH 法によりフローサイトメーターを使用して測定した。棒グラフの上に示した**はコントロール群と比較して $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

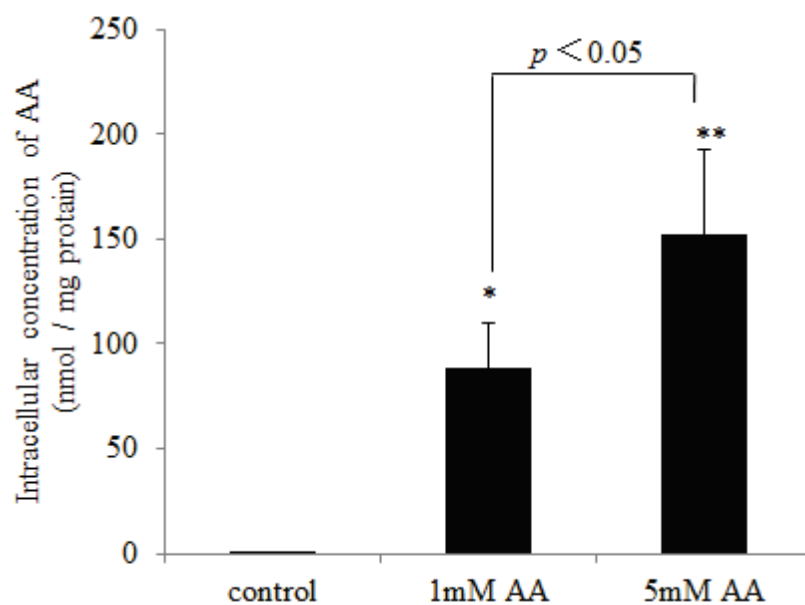
図 4-2. ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される A549 細胞中の HO-1 および IL-8 の遺伝子発現レベルの上昇に対する AA の効果



A549 細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液を 6 時間曝露した。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 0.1 mg/ml であり、AA 処理を行った群の曝露液には 5 mM の AA が含まれていた。ZnO ナノ粒子の曝露から 6 時間後の *ho-1*(A) および *il-8*(B) の遺伝子発現をリアルタイム PCR 法にて評価した。棒グ

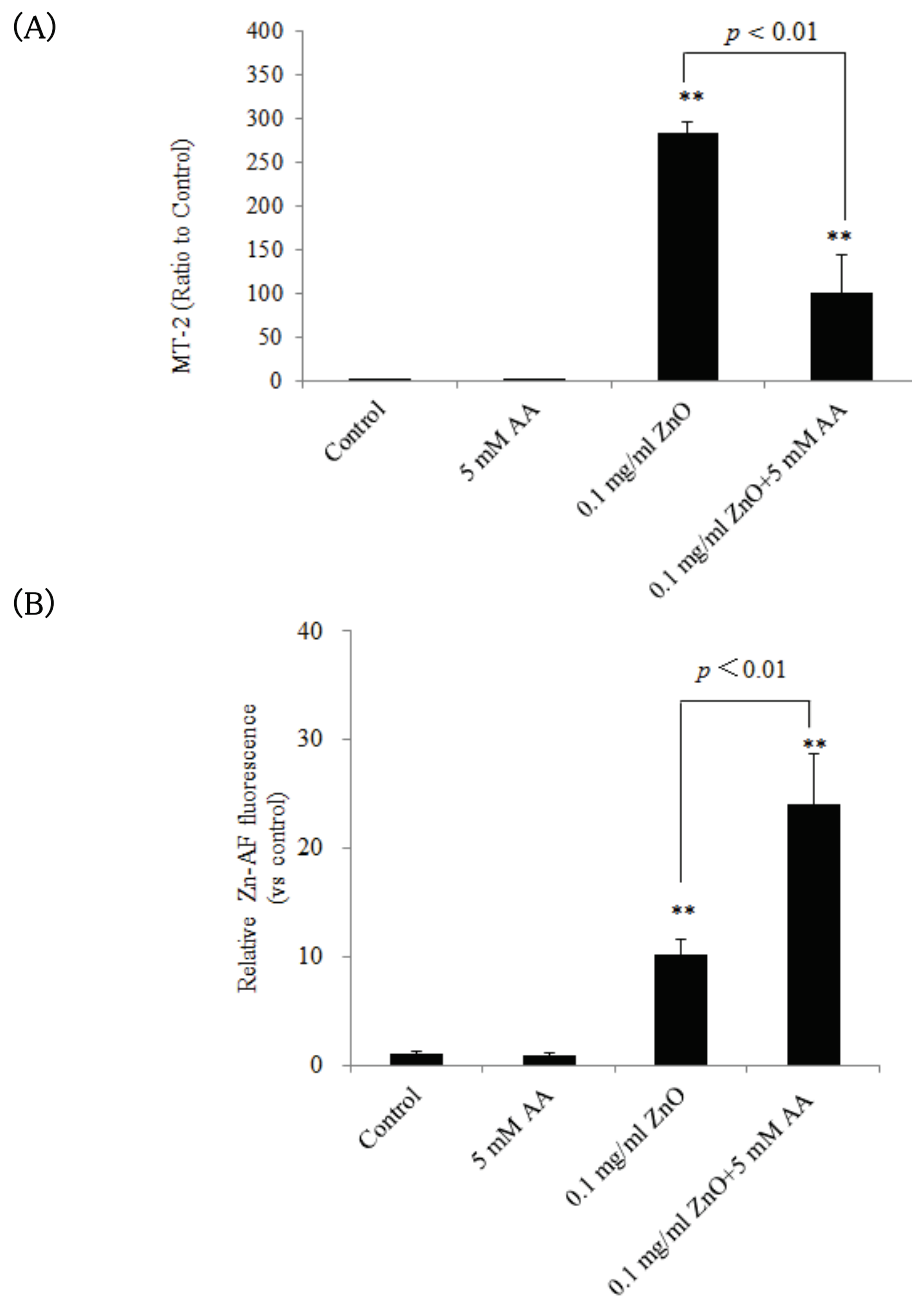
ラフの上に示した*および**はコントロール群と比較してそれぞれ $p<0.05$ 、 $p<0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 4-3. AA の細胞内取込み



A546 細胞に対し、1 mM および 5 mM の AA を処理し、6 時間後に細胞を回収した細胞内の AA 濃度を HPLC で測定した。棒グラフの上に示した*および**はコントロール群と比較してそれぞれ $p < 0.05$ 、 $p < 0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

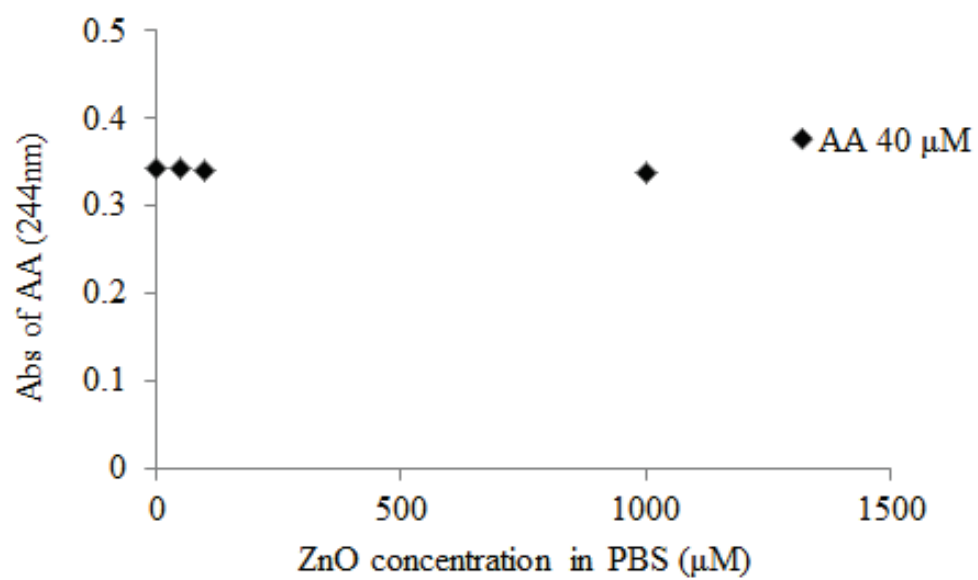
図 4-4. ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される A549 細胞中の MT-2 遺伝子発現レベルおよび細胞内の Zn²⁺ レベルの上昇に対する AA の効果



A549 細胞に ZnO-DMEM-FBS 分散液を 6 時間曝露した。分散液中の ZnO ナノ粒子濃度は 0.1 mg/ml であり、AA 処理を行った群の曝露液には 5 mM の AA が含まれていた。ZnO ナノ粒子の曝

露から6時間後の $mt-1$ (A)遺伝子発現レベルをリアルタイムPCR法にて、ならびに細胞内の Zn^{2+} レベル(B)を蛍光分光光度計を用いて測定した。棒グラフの上に示した**はコントロール群と比較して $p<0.01$ 水準で統計的に有意差のあることを示す。

図 4-5. ZnO ナノ粒子に対する AA の反応性

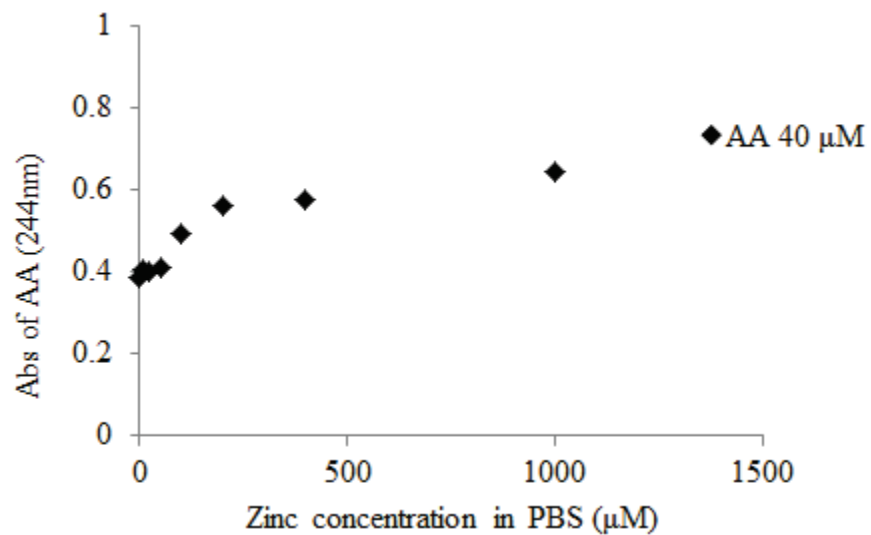


40 μ M の AA 濃度の PBS (pH7.0) 中に、0 から 1000 μ M の ZnO ナノ粒子を添加した。

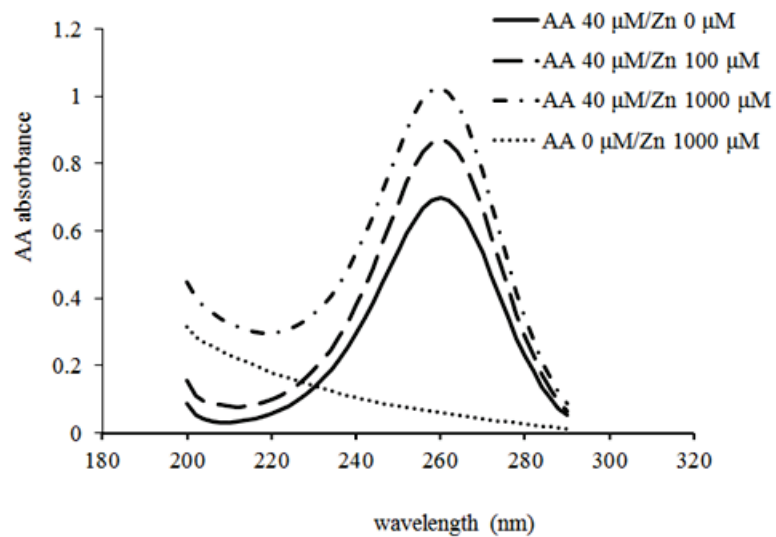
分光蛍光光度計により 244 nm の波長における AA の吸光度を測定した。

図 4-6. Zn^{2+} に対する AA の反応性

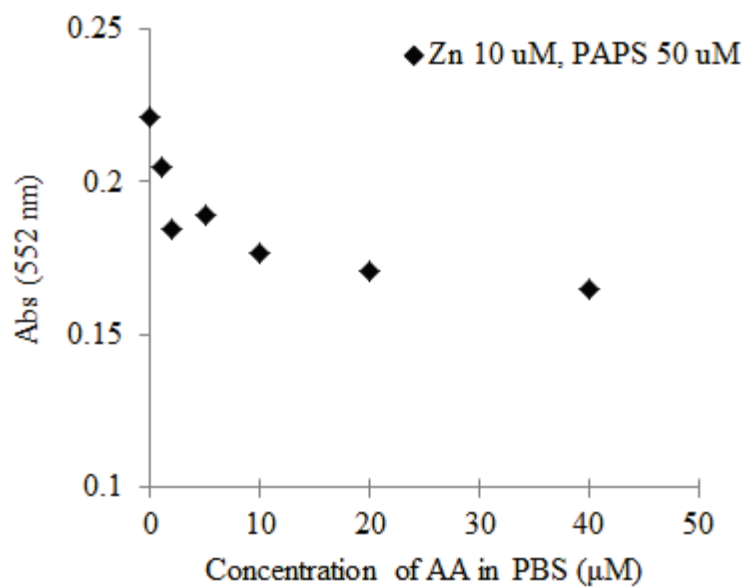
(A)



(B)



(C)



40 μM の AA 濃度の PBS (pH7.0) 中に、0 から 1000 μM の ZnCl_2 を添加した。(A) 244 nm の波長における AA の吸光度を分光蛍光光度計により測定した。(B) PBS 中の Zn^{2+} 濃度に対する AA の吸光曲線の変化を測定した。(C) Zn 濃度 10 μM 、5-Br-PAPS 濃度 50 μM の PBS 中に 0 から 40 μM の AA を添加した際の、555 nm の波長における 5-Bt-PAPS の吸光度変化を分光蛍光光度計により測定した。

第五章 総合考察

近年ナノテクノロジーの利用は増加しており、それに伴って工業ナノ粒子の製造量も増加している。ナノ粒子は表面活性の強さや溶解性の増大などに関して、同じ化学物質であっても、よりサイズの大きいサブミクロン微粒子とは異なる性質を持つ可能性がある。この性質を効果的に利用することによって新たなテクノロジーが生み出されることが期待される一方で、サイズの大きな粒子では認められなかった毒性が、ナノ粒子では認められることが懸念される。特に一部のナノ粒子で認められる溶解性の増大は、細胞内の ROS レベルの上昇と細胞生存率の低下に関与している (Horie et al., 2012a)。溶解性が認められるナノ粒子の中で、ZnO、CuO、NiO ナノ粒子は、インビボ試験およびインビトロ試験のどちらでも酸化ストレスを誘導する (Karlsson et al., 2008, Horie et al., 2011, Fukui et al., 2012, Toduka et al., 2012, Alarifi et al., 2013)。

一方で、ナノ粒子によって引き起こされる生体影響の評価に関する研究報告が多くあるのとは対照的に、その有害な影響を予防・抑制するための研究は報告されていない。しかしながらナノ粒子は、今後生産量がより拡大していくことが予測されるため有害な影響が判明しているナノ粒子については、早急に生体影響に対する対策を検討することが必須となる。本研究で研究対象として選択した ZnO ナノ粒子は、溶解性が認められるナノ粒子の中では、国内でも需要が多く生産量が年間 480 t の規模

であり工業的利用価値が高い材料である。一方で、ZnO ナノ粒子は細胞培地中に Zn^{2+} を放出し、細胞内で溶け出した Zn^{2+} は酸化ストレスを始めとした強い細胞毒性の要因となる (Osman et al., 2010, Roy et al., 2011, Yang et al., 2009)。

本研究では第二章において、まず「実験動物を用いた ZnO ナノ粒子が引き起す生体影響の評価と、細胞試験による毒性メカニズム」を検証した。ZnO ナノ粒子の生体影響には、粒子からの Zn^{2+} の溶出が関与していることが指摘されていることから、本研究では可溶性の亜鉛化合物である ZnCl_2 についても同様に検討した。細胞試験では、ZnO ナノ粒子の曝露によって時間依存的な細胞死の誘導と細胞内 Zn^{2+} レベルの増加が認められ、同様の結果は ZnCl_2 を曝露した細胞でも確認された。ZnO ナノ粒子による細胞毒性の要因が溶解性の増大であり、細胞内で溶出した Zn^{2+} が細胞毒性影響に関与することが、細胞内 Zn^{2+} レベルと細胞内 ROS レベルおよび細胞生存率との相関性から示唆された。また抗酸化物質の NAC を処理した細胞では ZnO ナノ粒子の曝露による細胞死が抑制されたことから、細胞内での Zn^{2+} の溶出によって ROS の生成レベルが上昇し、酸化ストレスが誘導されることによって結果として細胞死が起こることが分かった。ラットへの ZnO ナノ粒子の気管内注入による急性期の肺影響では、酸化ストレスによって発現が誘導される HO-1 の BALF 中の濃度が上昇した。また肺組織の *ho-1* 遺伝子発現レベルも上昇した。BALF 中の HO-1 濃度と肺組織の *ho-1* 遺伝子発現レベルの挙動は、HO-1 濃度の上昇は注入 24 時間から 72 時間後のみの一過

性であった一方で、遺伝子発現レベルの上昇は注入直後である 1 時間後から 1 週間後まで持続的に認められた。このことから BALF 中の HO-1 濃度が上昇した 24 時間から 72 時間後までは、肺組織中の細胞損傷が最もひどく細胞膜が損傷されたことによって、細胞内タンパク質である HO-1 が BALF 中に放出された。このことは BALF 中の LDH 活性が ZnO 気管内注入から 72 時間後に最も増加し、1 週間後にはコントロールレベルまで減少していた結果からも確認できる。一方で金属結合タンパク質であり抗酸化能も有する *mt-1* の肺組織での遺伝子発現レベルは注入直後から 1 週間後まで顕著に高い状態であった。肺組織の *ho-1* 遺伝子発現レベルの結果と併せて考察すると、ZnO ナノ粒子を注入した肺組織内では注入直後から 1 週間後まで ZnO および溶け出した Zn^{2+} が存在し、継続的に酸化ストレスにさらされていたことが考えられた。一方で ZnCl_2 を気管内注入した動物でも上記と同様の影響が認められたが、いずれの生体応答も ZnO ナノ粒子と比較すると応答レベルは低かった。更に *ho-1* や *mt-1* の肺組織における遺伝子発現上昇の持続期間は、ZnO ナノ粒子と比較すると短い期間で収束したことから、水溶性である ZnCl_2 の肺組織からのクリアランスは速く、そのため組織が酸化ストレス等による影響から早く回復すると考えられる。一方でナノ粒子は肺組織中に留まり、その間に Zn^{2+} を放出すると考えられる。その結果、肺組織で持続的な Zn^{2+} の溶出が生じ、それによって誘導された持続的な酸化ストレス状態にあるだろう。以上のことから第二章において、ZnO ナノ粒子はインビゴ(肺組織)およびインビトロ

(細胞)のどちらにおいても Zn^{2+} を放出し、それに伴って酸化ストレスを誘導すること、更に細胞試験においては酸化ストレスを介して細胞死が誘導されることが分かった。これらの結果から ZnO ナノ粒子による生体影響を抑制するためには、その最も重要な要因であると考えられる酸化ストレスを抑制することが有効である。

第三章では ZnO ナノ粒子を気管内注入したラットに対し、注入直後から抗酸化物質である AA の 1%水溶液を給水することによって ZnO ナノ粒子が急性期の肺に及ぼす影響を抑えることが出来るかを検討した。その結果 AA の給水は、ZnO ナノ粒子による酸化ストレスのみならず、炎症応答や組織傷害も抑えることが分かった。一般的に酸化ストレスは炎症応答に関与しており、ROS は炎症調節剤としての役割も持つ (Lee et al., 2012)。このことから ZnO ナノ粒子を気管内注入した肺において、AA による抗酸化効果は酸化ストレスの抑制を介した炎症抑制効果を示したと考えられる。その一方で ZnO ナノ粒子を気管内注入した肺組織内の *mt-1* 遺伝子発現レベルは、AA の給水に関わらず高レベルを維持していたことから、AA の給水による酸化ストレス等の影響を抑制する効果は、 Zn^{2+} の溶出自体を抑えた結果ではないことが分かった。AA は経口で体内に取り込まれた後、小腸で再吸収されて血中から組織へと運ばれる。肺組織の細胞膜には AA の受容体 SVCT が存在する (Savini et al., 2008) ことから、本研究で確認された AA の効果は血中で肺組織まで運ばれてきた AA が膜受容体を介して細胞内へ取り込まれた結果と考えられる。しかし AA はラジカル捕捉効果と共に、重

金属をキレートする効果も持つため、その防御効果のメカニズムは不明な点が多い (Tajmir-Riahi et al., 1991)。本研究では細胞を使用した試験によって、より詳細な防御メカニズムを検証した。

第四章では ZnO ナノ粒子の曝露によって誘導される細胞毒性に対する AA 処理の効果とそのメカニズムについて検討した。ZnO ナノ粒子によって誘導される細胞毒性の主な要因は、細胞内での Zn^{2+} の溶出とそれによって起こる酸化ストレスである。このどちらかを抑えることが、ZnO ナノ粒子が誘導する細胞毒性自体の抑制につながる可能性がある。生体動物による試験で AA は Zn^{2+} の溶出自体を抑える効果は持たないことが分かった。一方で、ZnO ナノ粒子が誘導する肺組織の酸化ストレスや炎症、傷害に対して防御的效果を示した。ZnO ナノ粒子によって誘導される細胞内 ROS レベルの上昇は、AA の同時処理によって抑えられた。また *ho-1* や *il-8* などの酸化ストレスおよび炎症関連応答についても、AA の処理によって発現の上昇が抑えられた。一方で細胞内の Zn^{2+} レベルについては *mt-2* の遺伝子発現レベルと相反する結果が認められた。ZnO ナノ粒子の曝露は金属結合タンパク質である *mt-2* の遺伝子発現レベルを上昇させたが、AA 処理を加えることによって発現の上昇は軽減された。一方で細胞内の Zn^{2+} レベルは ZnO ナノ粒子の曝露と同時に AA 処理を加えた際に、ZnO ナノ粒子の曝露のみを行った細胞と比較して顕著に増加した。AA による *mt-2* の遺伝子発現上昇の軽減効果は、細胞内で溶出した Zn^{2+} を AA がキレートした結果であり、 Zn^{2+} がキレ

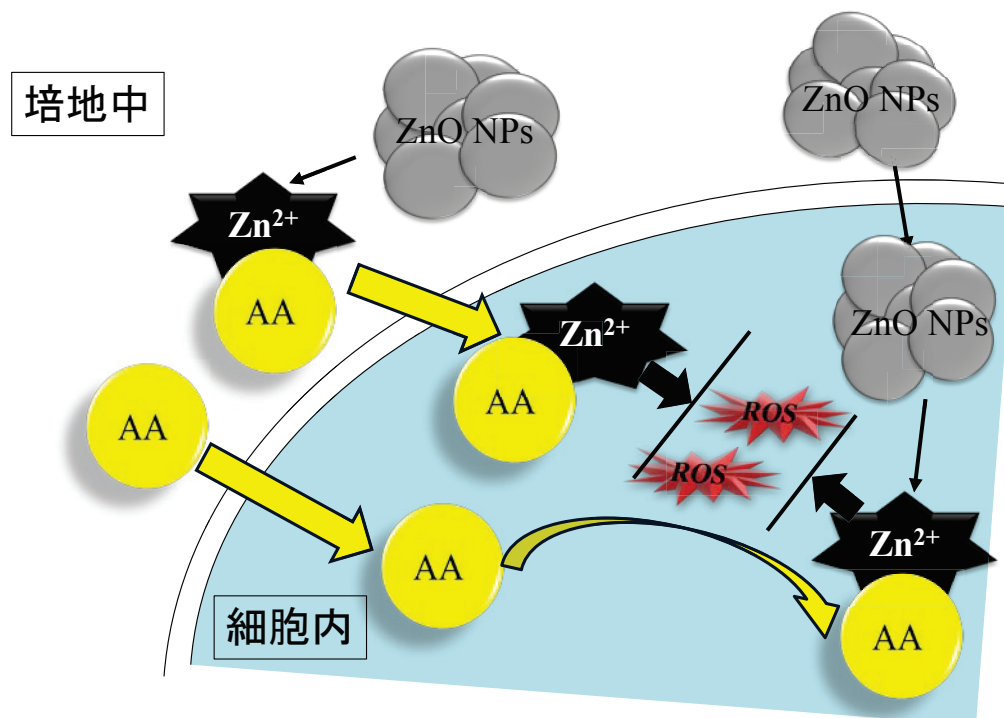
ートされることによって Zn^{2+} が誘導する ROS 生成レベルの上昇およびそれに続く酸化ストレス、あるいは炎症関連応答が抑制されたという考えられたが、AA の処理によって細胞内の Zn^{2+} レベルが更に上昇した事実はこの仮説に相反する結果となった。この矛盾の原因として、AA が細胞外で培地中に溶け出した Zn^{2+} をキレートして細胞内に取り込んだ可能性が考えられたため、AA と Zn^{2+} との反応性を調べた。この際に、ZnO-DMEM-FBS 分散液中への AA の添加操作が培地中へ放出される Zn^{2+} 濃度に影響しないことを調べるために、AA を加えた ZnO-DMEM-FBS 分散液中の Zn^{2+} 濃度と AA と ZnO ナノ粒子の反応性を確認した。この結果、AA の添加操作は分散液中の Zn^{2+} 濃度に影響を与えず、ZnO に対して AA は反応性を持たないことが分かった。AA と Zn^{2+} の反応性の検討によって、AA は試験で使用した濃度 (5 mM) よりはるかに低い濃度 (40 μM) で 0 から 1000 μM の Zn^{2+} に対しては反応性 (キレート作用) を示した。細胞に曝露した 0.1 mg/ml の ZnO ナノ粒子分散液中の Zn^{2+} 濃度は約 20 から 30 $\mu\text{g/ml}$ (300 μM から 460 μM) であることから、細胞試験の条件において分散液中の AA は溶出した Zn^{2+} をキレートすることが可能であった。これらの結果から、ZnO ナノ粒子の細胞毒性に対する AA の防御的効果を以下のように考察した。ZnO-DMEM-FBS 培地中に添加した AA は細胞外で培地中に溶出した Zn^{2+} をキレートし、AA-Zn の複合体が細胞内に取り込まれた。更に ZnO ナノ粒子として細胞内に取り込まれた後、細胞内で溶出した Zn^{2+} は細胞内で AA にキレートされた。AA-Zn の複合体は安定している

ため、 Zn^{2+} が要因となって誘導される ROS の生成やその結果として起こる酸化ストレスおよび炎症関連応答が抑えられた(図 5-1)。第三章におけるインビボ試験で、AA の給水にも関わらず *mt-1* 遺伝子発現レベルの上昇が抑えられなかった一方で、細胞試験において *mt-2* の遺伝子発現レベルの上昇が AA 処理によって抑えられたことについては、インビボ試験において AA は小腸からの再吸収を経るため ZnO ナノ粒子が気管内注入によって肺組織に取り込まれた後、時間が空いてから肺組織に取り込まれたと考えられる。その間に既に ZnO ナノ粒子から Zn^{2+} が放出されており *mt-1* 遺伝子の発現レベルが上昇し、ROS が生成されていた可能性がある。そのため AA は肺組織内の Zn^{2+} をキレートすると共に、ROS の除去にも効果を発揮していたと考えられる。一方で細胞試験においては、AA は ZnO と同時に細胞に処理されたため、ZnO とほぼ同時に細胞内に取り込まれキレート効果を発揮した。その結果、細胞内の *mt-2* 遺伝子発現レベルの上昇が抑えられたと考えられる。生体内における ZnO ナノ粒子が誘導する有害影響に対する AA の防御的効果のメカニズムを調べるためには、AA を予め給水する条件等、更なる検討が必要である。

本研究をまとめると、ZnO ナノ粒子によって肺(インビボ)および細胞(インビトロ)で ZnO ナノ粒子から溶出した Zn^{2+} に起因する酸化ストレスが誘導されることが分かった。ZnO ナノ粒子による細胞毒性には細胞内の Zn^{2+} レベルと ROS レベルの増加が関与しており、結果として酸化ストレスを介した細胞死を誘導した。更にインビボでは

継続的な酸化ストレスと共に一過性の組織傷害が確認された。この ZnO ナノ粒子による酸化ストレスの誘導を抑えるために、抗酸化物質である AA 添加の効果を検討したところ、インビボにおいて AA は酸化ストレスのみならず炎症や傷害を抑え、インビトロにおいても酸化ストレスや炎症関連応答を抑制した。この AA の効果のメカニズムは、インビトロでは AA による Zn^{2+} のキレートが主となると考えられる一方で、インビボではキレート効果と共に ROS の除去による効果も大きいと考えられる。本研究によって、ZnO ナノ粒子が引き起こす呼吸器毒性の防御に対して、AA の処理が有効であることが示された。CuO ナノ粒子など、AA がキレート出来る金属種では同様の効果が期待される。金属酸化物ナノ粒子の呼吸器毒性は、最も大きな有害性の要因である金属溶出とそれに続く酸化ストレスによる負荷をブロックすることで抑制できることが示された。この結果は、労働衛生の観点からも重要である。

図 5-1. ZnO ナノ粒子による細胞毒性に対する AA の防御的効果のメカニズム



謝辞

本研究を行うに当たり、岐阜大学応用生物科学部教授・岩橋均先生には研究全般に亘って多大なご指導と援助を賜りました。深く感謝いたし、御礼申し上げます。主査を担当して頂きました岐阜大学応用生物科学部教授・鈴木徹先生、副査を担当して頂きました静岡大学農学部教授・釜谷保志先生には多くの御助言を賜りましたことに感謝致します。産業技術総合研究所健康工学研究部門主任研究員・堀江祐範博士には、研究の基礎から学位論文の執筆に至るまで、日頃から多くの時間を費やして頂き、多大な指導賜りました。深く感謝申し上げます。また、産業技術総合研究所健康工学研究部門ストレスシグナル研究グループの方々、特に萩原義久博士、七里元督博士、西尾敬子氏、石田規子氏、駒場リリアン楓氏には実験の援助ほか多くのご支援を頂きました。更に、博士論文の執筆に当たっては、産業技術総合研究所健康工学研究部門部門長・吉田康一博士に貴重なご意見を頂きました。そのほか、多くの方々のご助力を頂き、本研究を完成させることができましたことに感謝しております。この場を借りて御礼申し上げます。

文献

Abbassi R, Chamkhia N, Sakly M (2010) Chloroform-induced oxidative stress in rat liver: Implication of metallothionein. *Toxicol Ind Health*. 26: 487–496

Abe S, Nagasawa J (2013) Asbestos and nanofiber: similarities and differences. *Japanese Journal of Risk Analysis* 23: 231–240

Agte VV, Nagmote RV, Chiplonkar SA (2004) Role of vitamin-zinc interactions on in vitro zinc uptake by human erythrocytes. *Biol Trace Elem Res*. 99: 99–112

Ahmad J, Ahamed M, Akhtar MJ, Alrokayan SA, Siddiqui MA, Musarrat J, Al-Khedhairy AA (2012) Apoptosis induction by silica nanoparticles mediated through reactive oxygen species in human liver cell line HepG2. *Toxicol Appl Pharmacol*. 259: 160–168

Akhtar MJ, Kumar S, Murthy RC, Ashquin M, Khan MI, Patil G, Ahmad I (2010) The primary role of iron-mediated lipid peroxidation in the differential cytotoxicity caused

by two varieties of talc nanoparticles on A549 cells and lipid peroxidation inhibitory effect exerted by ascorbic acid. *Toxicol In Vitro*. 24: 1139–1147

Asada K (1992) Ascorbate peroxidase - a hydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants. *Physiol Plant* 85: 235–241

Banni M, Messaoudi I, Said L, El Heni J, Kerkeni A, Said K (2010) Metallothionein gene expression in liver of rats exposed to cadmium and supplemented with zinc and selenium. *Arch. Environ. Contam. Toxicol*. 59: 513–519

Bendich A, Machlin LJ, Scandurra O (1986) The antioxidant role of vitamin C. *Adv Free Radic Biol Med* 2: 419–444

Braithwaite EK, Mattie MD, Freedman JH (2010) Activation of metallothionein transcription by 4-hydroxynonenal. *J Biochem Mol Toxicol*. 24: 330–4

Brehm M, Schiller E, Zeller WJ (1996) Quantification of reactive oxygen species generated by alveolar macrophages using lucigenin-enhanced chemiluminescence--methodical aspects. *Toxicol Lett.* 87: 131-138

Cabelli DE, Bielski BHJ (1983) Kinetics and mechanism for the oxidation of ascorbic acid/ascorbate by HO_2/O_2^- (hydroperoxyl/superoxide) radicals. A pulse radiolysis and stopped-flow photolysis study. *J. Phys. Chem* 87: 1809-1812

Chimienti F, Devergnas S, Favier A, Seve M (2004) Identification and cloning of a beta-cell-specific zinc transporter, ZnT-8, localized into insulin secretory granules. *Diabetes.* 53: 2330-2337

Choi AM, Alam J (1996) Heme oxygenase-1: function, regulation, and implication of a novel stress-inducible protein in oxidant-induced lung injury. *Am J Respir Cell Mol Biol* 15: 9-19

Chuang HC, Juan HT, Chang CN, Yan YH, Yuan TH, Wang JS, Chen HC, Hwang YH, Lee CH, Cheng TJ (2014) Cardiopulmonary toxicity of pulmonary exposure to occupationally relevant zinc oxide nanoparticles. *Nanotoxicology*. 8: 593–604

Cooper RG (2008) Zinc toxicology following particulate inhalation. *Indian. J. Occup. Environ.* 12: 10–13

Cuzzocrea S, McDonald MC, Filipe HM, Costantino G, Mazzon E, Santagati S, Caputi AP, Thiernemann C (2000) Effects of tempol, a membrane-permeable radical scavenger, in a rodent model of carrageenan-induced pleurisy. *Eur J Pharmacol.* 390: 209–222

De Berardis B, Civitelli G, Condello M, Lista P, Pozzi R, Arancia G, Meschini S (2010) Exposure to ZnO nanoparticles induces oxidative stress and cytotoxicity in human colon carcinoma cells. *Toxicol Appl Pharmacol.* 246: 116–127

EC. Scientific Committee on Emerging and Newly Identified Health Risks (SCENIHR). 2007. Risk Assessment of Products of Nanotechnologies

Forman HJ, Torres M (2001) Redox signaling in macrophages. *Mol Aspects Med.* 22: 189–216

Franken NA, Rodermond HM, Stap J, Haveman J, van Bree C (2006) Clonogenic assay of cells in vitro. *Nat. Protoc.* 1: 2315–2319

Frei B, England L, Ames BN (1989) Ascorbate is an outstanding antioxidant in human blood plasma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86: 6377–6381

Friedlander MA, Hilbert CM, Wu YC, Finegan CK, Rich EA (1994) Disparate cytochemical characteristics and production of cytokines and prostaglandin E2 by human mononuclear phagocytes from the blood, lung, and peritoneal cavity. *J. Lab. Clin. Med.* 123: 574–584

Fukui H, Endoh S, Shichiri M, Ishida N, Hagihara Y, Yoshida Y, Iwahashi H, Horie M (2014) The induction of lipid peroxidation during the acute oxidative stress response induced by intratracheal instillation of fine crystalline silica particles in the rat lung. *Toxicol Ind Health.* In Printing

Fukui H, Horie M, Endoh S, Kato H, Fujita K, Nishio K, Komaba LK, Maru J, Miyauhi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yoshida Y, Hagihara Y, Iwahashi H (2012) Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chem Biol Interact.* 198: 29–37

Fukui H, Iwahashi H, Endoh S, Nishio K, Yoshida Y, Hagihara Y, Horie M (2014) Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles. *J Occup Health.* In printing

Gojova A, Guo B, Kota RS, Rutledge JC, Kennedy IM, Barakat AI (2007) Induction of inflammation in vascular endothelial cells by metal oxide nanoparticles: effect of particle composition. *Environ Health Perspect.* 115: 403–409

Gordon T, Fine JM (1993) Metal fume fever. *Occup. Med.* 8: 504–517

Heng BC, Zhao X, Tan EC, Khamis N, Assodani A, Xiong S, Ruedl C, Ng KW, Loo JS (2011) Evaluation of the cytotoxic and inflammatory potential of differentially shaped zinc oxide nanoparticles. *Arch Toxicol.* 85: 1517-1528

Herzog E1, Casey A, Lyng FM, Chambers G, Byrne HJ, Davoren M (2007) A new approach to the toxicity testing of carbon-based nanomaterials—the clonogenic assay. *Toxicol. Lett.* 174: 49-60

Ho M, Wu KY, Chein HM, Chen LC, Cheng TJ (2011) Pulmonary toxicity of inhaled nanoscale and fine zinc oxide particles: mass and surface area as an exposure metric. *Toxicol. Lett.* 23: 947-956

Horie M, Fujita K, Kato H, Endoh S, Nishio K, Komaba LK, Nakamura A, Miyauchi A, Kinugasa S, Hagihara Y, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H (2012) Association of the physical and chemical properties and the cytotoxicity of metal oxide nanoparticles: metal ion release, adsorption ability and specific surface area. *Metallomics* 4: 350-360

Horie M, Kato H, Fujita K, Endoh S, Iwahashi H (2012) In vitro evaluation of cellular response induced by manufactured nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 25: 605–619

Horie M, Nishio K, Endoh S, Kato H, Fujita K, Miyauchi A, Nakamura A, Kinugasa S, Yamamoto K, Niki E, Yoshida Y, Iwahashi H (2013) Chromium(III) oxide nanoparticles induced remarkable oxidative stress and apoptosis on culture cells. *Environ Toxicol.* 28: 61–75

Horie M, Nishio K, Fujita K, Kato H, Nakamura A, Kinugasa S, Endoh S, Miyauchi A, Yamamoto K, Murayama H, Niki E, Iwahashi H, Yoshida Y, Nakanishi J (2009) Ultrafine NiO particles induce cytotoxicity in vitro by cellular uptake and subsequent Ni(II) release. *Chem Res Toxicol.* 22: 1415–1426

Hsiao IL, Huang YJ (2011) Titanium oxide shell coatings decrease the cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Chem Res Toxicol.* 24: 303–313

Huang CC, Aronstam RS, Chen DR, Huang YW (2010) Oxidative stress, calcium homeostasis, and altered gene expression in human lung epithelial cells exposed to ZnO nanoparticles. *Toxicol. In Vitro.* 24: 45-55

IARC (1997) Silica dust, crystalline, in the form of quartz or cristobalite

Iler RK (1979) *The Chemistry of Silica: Solubility, Polymerization, Colloid and Surface Properties and Biochemistry of Silica.* John Wiley and Sons Ltd, Hoboken, New Jersey

ISO/TS 27687 (2008) Nanotechnologies -- Terminology and definitions for nano-objects -- Nanoparticle, nanofibre and nanoplate

Jacob RA (1996) Three eras of vitamin C discovery. *Subcell Biochem.* 25: 1-16

Kambe T (2011) An Overview of a Wide Range of Functions of ZnT and Zip Zinc Transporters in the Secretory Pathway. *Biosci Biotechnol Biochem.* 75: 1036-1043

Karlsson HL, Gustafsson J, Cronholm P, Möller L (2009) Size-dependent toxicity of metal oxide particles—a comparison between nano- and micrometer size. *Toxicol. Lett.* 188: 112–118

Kato H, Fujita K, Horie M, Suzuki M, Nakamura A, Endoh S, Yoshida Y, Iwahashi H, Takahashi K, Kinugasa S (2010) Dispersion characteristics of various metal oxide secondary nanoparticles in culture medium for in vitro toxicology assessment. *Toxicol. In. Vitro.* 24: 1009–1018

Kermanizadeh A, Vranic S, Boland S, Moreau K, Baeza-Squiban A, Gaiser BK, Andrzejczuk LA, Stone V (2013) An in vitro assessment of panel of engineered nanomaterials using a human renal cell line: cytotoxicity, pro-inflammatory response, oxidative stress and genotoxicity. *BMC Nephrol.* doi:10.1186/1471-2369-14-96

Kim IS, Baek M, Choi SJ (2010) Comparative cytotoxicity of Al₂O₃, CeO₂, TiO₂ and ZnO nanoparticles to human lung cells, *J. Nanosci. Nanotechnol.* 10: 3453–3458

Kim YH, Fazlollahi F, Kennedy IM, Yacobi NR, Hamm-Alvarez SF, Borok Z, Kim KJ, Crandall ED (2010) Alveolar epithelial cell injury due to zinc oxide nanoparticle exposure. *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 182: 1398-1409

Kuschner WG, D'Alessandro A, Wintermeyer SF, Wong H, Boushey HA, Blanc PD (1995) Pulmonary responses to purified zinc oxide fume. 43: 371-378

Landsiedel R, Ma-Hock L, Kroll A, Hahn D, Schnekenburger J, Wiench K, Wohlleben W (2010) Testing metal-oxide nanomaterials for human safety. *Adv Mater.* 22: 2601-2627

Lapp NL, Castranova V (1993) How silicosis and coal workers' pneumoconiosis develop--a cellular assessment. *Occup Med* 8: 35-56

Lee IT, Yang CM (2012) Role of NADPH oxidase/ROS in pro-inflammatory mediators-induced airway and pulmonary diseases. *Biochem Pharmacol.* 84: 581-590

Leiro J, Alvarez E, Arranz JA, Laguna R, Uriarte E, Orallo F (2004) Effects of cis-resveratrol on inflammatory murine macrophages: antioxidant activity and down-regulation of inflammatory genes. *J Leukoc Biol.* 75: 1156–1165

Leonard SS, Harris GK, Shi X (2004) Metal-induced oxidative stress and signal transduction. *Free Radic Biol Med.* 37: 1921–1942

Makino T, Saito M, Horiguchi D, Kina K (1982) A highly sensitive colorimetric determination of serum zinc using water-soluble pyridylazo dye. *Clin Chim Acta.* 120: 127–135

Nishikimi M (1975) Oxidation of ascorbic acid with superoxide anion generated by the xanthine-xanthine oxidase system. *Biochem Biophys Res Commun* 17: 463–468

Osman IF, Baumgartner A, Cemeli E, Fletcher JN, Anderson D (2010) Genotoxicity and cytotoxicity of zinc oxide and titanium dioxide in HEP-2 cells. *Nanomedicine (Lond).* 5: 1193–1203

Pawliczak R (2003) The role of radical oxygen species in airway inflammation. *Pol*

Merkur Lekarski. 14: 493–496

Peake J, Suzuki K (2004) Neutrophil activation, antioxidant supplements and exercise-induced oxidative stress. *Exerc Immunol Rev*. 10: 129–141

Poland CA, Duffin R, Kinloch I, Maynard A, Wallace WA, Seaton A, Stone V, Brown S, Macnee W, Donaldson K (2008) Carbon nanotubes introduced into the abdominal cavity of mice show asbestos-like pathogenicity in a pilot study. *Nat Nanotechnol*. 3: 423–428

Roy R, Tripathi A, Das M, Dwivedi PD (2011) Cytotoxicity and uptake of zinc oxide nanoparticles leading to enhanced inflammatory cytokines levels in murine macrophages: comparison with bulk zinc oxide. *J Biomed Nanotechnol*. 7: 110–111

Sauberlich HE (1994) Pharmacology of vitamin C. *Annu Rev Nutr* 14: 371–39

Savini I, Rossi A, Pierro C, Avigliano L, Catani MV (2008) SVCT1 and SVCT2: key proteins for vitamin C uptake. *Amino Acids*. 34: 347–355

Sharma V, Anderson D, Dhawan A (2011) Zinc oxide nanoparticles induce oxidative stress and genotoxicity in human liver cells (HepG2). *J. Biomed. Nanotechnol.* 7: 98–99

Shinohara N, Nakazato T, Tamura M, Endoh S, Fukui H, Morimoto Y, Myojo T, Shimada M, Yamamoto K, Tao H, Yoshida Y, Nakanishi J (2010) Clearance kinetics of fullerene C₆₀ nanoparticles from rat lungs after intratracheal C₆₀ instillation and inhalation C₆₀ exposure. *Toxicol Sci* 118: 564–573

Song W, Zhang J, Guo J, Zhang J, Ding F, Li L, Sun Z (2010) Role of the dissolved zinc ion and reactive oxygen species in cytotoxicity of ZnO nanoparticles. *Toxicol. Lett.* 199: 389–397

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci.* 33: 105–106

Tajmir-Riahi HA (1991) Coordination chemistry of vitamin C. Part II. Interaction of L-ascorbic acid with Zn(II), Cd(II), Hg(II), and Mn(II) ions in the solid state and in aqueous solution. *J Inorg Biochem.* 42: 47–55

Tebbe B, Wu S, Geilen CC, Eberle J, Kodelja V, Orfanos CE (1997) L-ascorbic acid inhibits UVA-induced lipid peroxidation and secretion of IL-1alpha and IL-6 in cultured human keratinocytes in vitro. *J Invest Dermatol.* 8: 302–306

Toduka Y, Toyooka T, Ibuki Y (2012) Flow cytometric evaluation of nanoparticles using side-scattered light and reactive oxygen species-mediated fluorescence-correlation with genotoxicity. *Environ Sci Technol.* 46: 7629–7636

Tsou TC, Yeh SC, Tsai FY, Lin HJ, Cheng TJ, Chao HR, Tai LA (2010) Zinc oxide particles induce inflammatory responses in vascular endothelial cells via NF κ B signaling. J. Hazard. Mater. 183: 182-188

Tsukaguchi H, Tokui T, Mackenzie B, Berger UV, Chen XZ, Wang Y, Brubaker RF, Hediger MA (1999) A family of mammalian Na⁺-dependent L-ascorbic acid transporters. Nature. 399: 70-75

U.S. Environmental Protection Agency (EPA). 2007. Senior Policy Council. Nanotechnology White Paper.

U.S. National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH). 2006. Approaches to Safe Nanotechnology: An Information Exchange with NIOSH

Warheit DB, Sayes CM, Reed KL (2009) Nanoscale and fine zinc oxide particles: can in vitro assays accurately forecast lung hazards following inhalation exposures? Environ. Sci. Technol. 43: 7939-7945

Wu W, Samet JM, Peden DB, Bromberg PA (2010) Phosphorylation of p65 is required for zinc oxide nanoparticle-induced interleukin 8 expression in human bronchial epithelial cells. *Environ Health Perspect.* 118: 982–987

Xia T, Kovochich M, Liong M, Mädler L, Gilbert B, Shi H, Yeh JI, Zink JI, Nel AI (2008) Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano* 2: 2121–2134

Yang H, Liu C, Yang D, Zhang H, Xi Z (2009) Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J Appl Toxicol.* 29: 69–78

Yin H, Casey PS, McCall MJ (2010) Surface modifications of ZnO nanoparticles and their cytotoxicity. *J Nanosci Nanotechnol.* 10: 7565–7570

Yoshida Y, Kodai S, Takemura S, Minamiyama Y, Niki E (2008) Simultaneous measurement of F2-isoprostane, hydroxyoctadecadienoic acid,

hydroxyeicosatetraenoic acid, and hydroxycholesterols from physiological samples.

Anal Biochem. 379: 105-115

Yu LP, Fang T, Xiong DW, Zhu WT, Sima XF (2011) Comparative toxicity of nano-ZnO and bulk ZnO suspensions to zebrafish and the effects of sedimentation,

$\cdot$ OH production and particle dissolution in distilled water. J Environ Monit. 13:

1975-198

倉田忠男(1998). ビタミン C の抗酸化性. (二木鋭雄, 島崎弘幸, 美濃真) 抗酸化物質 ラジカルと生体防御, pp. 79-86. 学会出版センター, 東京.

重岡成 (1996) なぜ植物にアスコルビン酸は多く存在するのか? 食品・食品添加物

研究誌 170, 66 - 74

外山尚紀 (2011) 日本における石綿の定義と建材など製品中の石綿含有分析の課

題. 労働科学 87, 136 - 156

高橋希之，二木鋭雄(1998)．生体の酸化傷害と防御システム．（吉川敏一）抗酸化物質の全て，pp. 26-34．先端医学社，東京．

真野純一，浅田浩一(1998)．ビタミン C．（吉川敏一）抗酸化物質の全て，pp. 82-92．先端医学社，東京．

森本泰夫，堀江祐範，北島信一，福島昭治，武林亨（2013）工業用ナノ材料の有害性評価に向けた気管内投与試験とばく露試験の所見の比較．日衛誌 68，161 -

167