

氏 名 (本 国 籍)	福井 浩子 (大阪府)
学 位 の 種 類	博士 (農学)
学 位 記 番 号	農博甲第 6 4 4 号
学 位 授 与 年 月 日	平成 2 7 年 3 月 1 3 日
学 位 授 与 の 要 件	学位規則第 3 条第 1 項該当
研 究 科 及 び 専 攻	連合農学研究科 生物資源科学専攻
研究指導を受けた大学	岐阜大学
学 位 論 文 題 目	ナノ粒子の生体影響に対する抗酸化物質の効果
審 査 委 員 会	主査 岐阜大学 教 授 鈴 木 徹 副査 岐阜大学 教 授 岩 橋 均 副査 静岡大学 教 授 釜 谷 保 志

## 論 文 の 内 容 の 要 旨

酸化亜鉛 (ZnO) ナノ粒子は重要な工業材料であり、白色顔料や電子部品、日焼け止めの材料として使用されている。そこで本研究では、ラットに ZnO ナノ粒子を気管内注入し、ZnO ナノ粒子が急性期の肺に及ぼす影響、特に酸化ストレスについて評価を行った。更にヒト肺腺癌上皮細胞 (A549) を用いたインビトロ試験も実施しインビボ試験の結果と比較した。

ZnO ナノ粒子はインビボ、インビトロ両方の分散液中で  $\text{Zn}^{2+}$  を放出した。インビボ試験では、ZnO ナノ粒子はラットの肺に対し急性の強い酸化ストレスを誘導した。更に ZnO ナノ粒子の気管内注入によって、肺では脂質過酸化生成物、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) および  $\alpha$ -トコフェロールが増加した。細胞では、ZnO ナノ粒子は強い酸化ストレスだけではなく細胞死も誘導した。細胞内の  $\text{Zn}^{2+}$  レベルと ROS レベルは明らかな相関性を示した。この試験によって ZnO ナノ粒子がインビボにおいてインビトロ試験と同様に ZnO ナノ粒子から溶出した  $\text{Zn}^{2+}$  に起因する酸化ストレスを誘導することが分かった。

ZnO ナノ粒子の毒性影響に対する防御は必須であるが、毒性影響に対する防御の研究は報告されていない。そこで、ラジカル捕捉剤として知られる抗酸化物質のアスコルビン酸 (AA) による ZnO ナノ粒子の毒性抑制効果を検討した。ZnO ナノ粒子を気管内注入したラットに注入直後から 1 % の AA 水溶液を給水した。その結果、AA の給水が ZnO ナノ粒子の気管内注入が誘導する肺の酸化ストレス、炎症および傷害を抑える効果を持つことが分かった。

さらに、ZnO ナノ粒子が誘導する細胞毒性に対する AA の効果とそのメカニズムについて検討した。A549 細胞に ZnO ナノ粒子の曝露と同時に AA を処理し ZnO ナノ粒子由来の細胞毒性に対する効果を確認した。その結果、AA の処理によって ZnO ナノ粒子が誘導する細

胞内 ROS レベルの亢進や細胞毒性が抑えられた。またこの試験において、AA が A549 細胞内に取り込まれることを確認した。更に AA は主要なラジカル捕捉型抗酸化物質の一つであり、亜鉛のキレート剤としての役割も持つ。これらの AA の役割は、AA による細胞内での ROS の除去や  $\text{Zn}^{2+}$  のキレート効果によって、ZnO ナノ粒子曝露によって誘導される酸化ストレスが抑えられる可能性を示唆している。

本試験において ZnO ナノ粒子の曝露によって A549 細胞で誘導される酸化ストレスや炎症関連応答が、AA の同時処理によって抑えられた。これらの結果はインビボ試験の結果と一致した。AA による ZnO ナノ粒子から放出された  $\text{Zn}^{2+}$  のキレートは、ZnO ナノ粒子による細胞毒性の抑制に関与している。これらの発見は、今後のナノ粒子の毒性に対する防御の研究に寄与するであろう。

なお、これらの成果は、「Journal of Occupational Health」「Toxicology and Industrial Health」「Chemico-Biological Interactions」に公表した。

## 審 査 結 果 の 要 旨

酸化亜鉛 (ZnO) ナノ粒子は重要な工業材料であり、白色顔料や電子部品、日焼け止めの材料として使用されている。一方で、ZnO ナノ粒子は細胞に対し強い毒性を持ち、酸化ストレスおよび亜鉛イオン ( $\text{Zn}^{2+}$ ) の放出が毒性に関与している。そこで本論文では、①ラットに ZnO ナノ粒子を気管内注入し、ZnO ナノ粒子が急性期の肺に及ぼす影響、特に酸化ストレスについて評価を行っている。また、ヒト肺腺癌上皮細胞 (A549) を用いたインビトロ試験も実施しインビボ試験の結果と比較している。一方、酸化亜鉛 (ZnO) ナノ粒子の毒性影響に対する防御の研究は報告されていない。そこで、②ラジカル捕捉剤として知られる抗酸化物質のアスコルビン酸 (AA) による ZnO ナノ粒子の毒性抑制効果を検討している。

- ① ラットに ZnO ナノ粒子を気管内注入毒性評価と、ヒト肺腺癌上皮細胞 (A549) を用いた毒性評価比較。

ZnO ナノ粒子はインビボ、インビトロ両方の分散液中で  $\text{Zn}^{2+}$  を放出した。インビボ試験では、ZnO ナノ粒子はラットの肺に対し急性の強い酸化ストレスを誘導した。更に ZnO ナノ粒子の気管内注入によって、肺では脂質過酸化生成物、ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1) および  $\alpha$ -トコフェロールが増加した。細胞では、ZnO ナノ粒子は強い酸化ストレスだけではなく細胞死も誘導した。細胞内の  $\text{Zn}^{2+}$  レベルと ROS レベルは明らかな相関性を示した。この試験によって ZnO ナノ粒子がインビボにおいてインビトロ試験と同様に ZnO ナノ粒子から溶出した  $\text{Zn}^{2+}$  に起因する酸化ストレスを誘導することが分かった。

- ② ラジカル捕捉剤、アスコルビン酸 (AA) による ZnO ナノ粒子の毒性抑制効果 ZnO ナノ粒子を気管内注入したラットに注入直後から 1 % の AA 水溶液を給水した。その結果、AA の給

水が ZnO ナノ粒子の気管内注入が誘導する肺の酸化ストレス、炎症および傷害を抑える効果を持つことが分かった。さらに、A549 細胞で誘導される酸化ストレスや炎症関連応答が、AA の同時処理によって抑えられた。これらの結果はインビボ試験の結果と一致した。AA による ZnO ナノ粒子から放出された  $\text{Zn}^{2+}$  のキレートは、ZnO ナノ粒子による細胞毒性の抑制に関与している。

これらの結果から、申請者は、ラットに ZnO ナノ粒子の気管内注入毒性試験とヒト肺腺癌上皮細胞 (A549) 毒性試験を実施による毒性メカニズムの解析、急性毒性低減を目的とした、ラジカルアスコルビン酸による ZnO ナノ粒子の毒性抑制効果を明らかにした。研究内容と関連する項目に関する知識等も十分であると判断できたことから、本学研究科の学位論文として相応しい内容と判断した。

尚、この研究に関しては、以下の 3 つの学術論文が公表されている。

#### 基礎となる学術論文

1. Fukui, H., Horie, M., Endoh, S., Kato, H., Fujita, K., Nishio, K., Komaba, L. K., Maru, J., Miyauchi, A., Nakamura, A., Kinugasa, S., Yoshida, Y., Hagihara, Y., Iwahashi, H. Association of zinc ion release and oxidative stress induced by intratracheal instillation of ZnO nanoparticles to rat lung. *Chemico-Biological Interactions* 198: 29-37, 2012
2. Fukui, H., Endoh, S., Shichiri, M., Ishida N., Hagihara, Y., Yoshida, Y., Iwahashi, H., Horie, M. The induction of lipid peroxidation during the acute oxidative stress response induced by intratracheal instillation of fine crystalline silica particles in the rat lung *Toxicology and Industrial Health* (In press).
3. Fukui H., Iwahashi H., Endoh S., Nishio K., Yoshida Y., Hagihara Y. and Horie M. Ascorbic acid attenuates acute pulmonary oxidative stress and inflammation caused by zinc oxide nanoparticles” *Journal of Occupational Health* (In press).