

球状サイズ標準ポリスチレン粒子によるCHL細胞での倍数体誘発

松岡厚子[#], Agneta Önfelt^{*1}, 松田良枝^{*2}, 伊佐間和郎, 迫田秀行, 加藤玲子, 酒井恵子^{*2}, 新見伸吾

Polyploidy induction by spherical size standard polystyrene particles in a Chinese hamster cell line CHL

Atsuko Matsuoka[#], Agneta Önfelt^{*1}, Yoshie Matsuda^{*2},
Kazuo Isama, Hideyuki Sakoda, Reiko Kato, Keiko Sakai^{*2}, Shingo Niimi

To investigate relationships between particle (as a model of aggregates) size in a nanomaterial test suspension and its cytotoxicity, a series of eleven sizes of polystyrene (PS) particles were tested in the cytotoxicity test and the chromosome aberration test by using a Chinese hamster cell line CHL. The PS particles were spheres with defined diameters ranging from 0.1 to 9.2 μm . A series of eight sizes of particles with diameters ranging from 0.92 to 4.45 μm showed stronger cytotoxicity than the others. There was a marked difference in cytotoxicity between the 4.45- and 5.26- μm particles. The 0.92- to 4.45- μm particles did not induce structural chromosome aberrations but induced a high frequency of polyploidy in the chromosome aberration test. The 5.26- μm particles showed very weak induction of polyploidy. The incorporation of the 4.45- μm particles into CHL cells was observed by scanning electron microscopy (SEM). Some cells incorporated more than 10 particles. The semi-quantitative measurement of incorporation of particles into cells was performed by flow cytometry with a parameter of side scattered light (SSC) intensity. It showed that CHL cells preferably incorporated the 4.45- μm particles to the 5.26- μm particles. These findings suggest that CHL cells may have a kind of size-recognition ability and incorporate a particular size of particles. The particles may prevent a normal cytokinesis resulting in polyploidy induction. Nanomaterials also may show size-dependent toxicity. Data on particle (or aggregate) size distribution in the test suspension should be provided to evaluate properly the results of toxicity tests of nanomaterials.

Keywords: polystyrene particle, phagocytosis, polyploidy induction, CHL cell, size-dependent toxicity

1. 緒言

ナノマテリアルは近年、その開発が活発になり様々な分野での応用が考案されてきている。医療分野ではドラッグデリバリーシステム、遺伝子導入ベクター、細胞

培養用スキャフォールド等である。製品への応用がすすみ、我々の身の回りでも使用される機会が増え、結果としてそれらに暴露されることも多くなる。ナノマテリアルのヒトの健康への影響は未知の部分が多く、その安全性を確認しておくことは、アスベスト被害を経験している日本社会では特に、慎重に対応しなければならない問題だと考えられる。これまでに多くの研究がなされてきているにもかかわらず、毒性に関しては、いまだ議論があるところではあるが、国際機関 (OECD, ISO/TC 229など) 及び各国行政当局では、ナノマテリアルの計測、安全性評価などについて対応がすすめられてきた。国内では、厚生労働省が平成20年2月7日に通知「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」を発出し、平成20年11月に

[#] To whom correspondence should be addressed:

Atsuko Matsuoka: Division of Medical Devices, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan; (Present E-mail: matsuoka-atsuko@pmda.go.jp)

^{*1} Formerly, Department of Environmental Chemistry, Stockholm University, Stockholm, Sweden

^{*2} Formerly, Division of Medical Devices

「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会」が報告書を取りまとめたのをはじめとして、環境省が「ナノ材料環境影響基礎調査検討会」で、厚生労働省が「ナノマテリアルの安全対策に関する検討会」で報告書を取りまとめた。

ナノマテリアルの安全性評価は、これまでも、材料を開発したグループによって実施されてきている場合もあるが、試験法が一定ではなく、さらに、試験に供した分散液中の粒子サイズに関する情報を提供しているものが少なく、結果を材料間で直接比較することが困難な場合が多い。そこで、我々は比較的簡便な方法でナノマテリアルの生物活性を測定できる手法を開発し、ナノマテリアル全般の毒性をスクリーニングできる手法を提案したいと考えている。

これまでに著者らは、10種類のナノマテリアルを用いて、主にメノウ乳鉢による粉碎及び卓上型超音波洗浄機による分散後、レーザ回折/散乱式粒子径分布測定装置 (Horiba LA-950) による分散液中の粒子径分布測定及び細胞毒性試験を実施した。その結果、これらの手法では分散が不十分であるが、そのような分散液でも細胞毒性の違いは検出でき、分散液中の凝集体径と毒性の間に相関が認められることが示唆された。そこで、本研究では、その基礎研究として、粒子径が細胞に及ぼす毒性を詳細に検討した。

一般的に不溶性粒子の毒性について、その粒子径との関連はこれまでも報告されてきた^{1,2)}が、サイズ数は限られていた。そこで今回、粒子径が高度に調整された、連続する11種の粒子径のポリスチレン (PS) 粒子を入手し、より明確な粒子径とそれらによる生物反応との関連について調べた。ナノマテリアルの試験液には様々な大きさの凝集体も存在することが予想されることから、入手できたPS粒子は主に μm サイズではあるが、使用細胞での粒子 (凝集体) 径と細胞毒性の関係を明らかにするために、細胞毒性試験及び染色体異常試験を実施した。

2. 材料及び方法

2. 1 サイズ標準PS粒子

Spherotec Inc. (Lake Forest, IL, USA) より購入した、以下の11種のサイズのPS粒子を用いた。これらの粒子は、0.02%アジ化ナトリウムを含む脱イオン水に分散されていた。

平均直径 \pm SD: 0.10 \pm 0.0024 μm
0.20 \pm 0.005 μm
0.51 \pm 0.012 μm
0.92 \pm 0.023 μm
1.09 \pm 0.027 μm

2.07 \pm 0.05 μm

3.17 μm

4.45 μm

5.26 μm

6.8 μm

9.2 μm

2. 2 細胞

当研究室で維持している、チャイニーズ・ハムスター肺由来線維芽細胞株 (CHL) を用いた^{3,4)}。医薬品及び医療機器 (材料) をはじめとする各種化学物質の非臨床安全性試験に国内で標準的に使用されている細胞株である。細胞は10%牛胎児血清 (Intergen Company, N.Y. USA) 添加MEM培地 (GIBCO 11095-080) で、5%炭酸ガス、飽湿37°C条件下で培養した。CHL細胞の倍加時間は約13時間、染色体モード数は25本である。

2. 3 細胞毒性試験 (コロニー法)

24-well プレートに50細胞/wellのCHL細胞を播種し、翌日PS粒子を添加し、そのままさらに6日間培養を続け、形成されたコロニーをメタノールで固定、ギムザ染色を行なった後カウントした。コントロール群のコロニー数を100%とした時の、処理群の相対コロニー数 (Survival %, 平均値 \pm SD, n=4) で細胞毒性を表示した。

2. 4 染色体異常試験

直径60 mmのプラスチックシャーレに1 x 10⁵/plateの細胞を播種し、翌日PS粒子を添加、24時間又は48時間処理後に染色体標本を作製した⁵⁾。ギムザ染色後、広がりの良い分裂中期細胞100個を観察し、染色体構造異常と数的異常 (倍数体及び核内倍加) を記録した。背景データに基づき、構造異常を有する細胞又は数的異常を有する細胞の頻度が5%未満を陰性、5%以上10%未満を疑陽性、10%以上を陽性と判定した⁵⁾。陰性対照として溶媒処理群を設定した。実験は少なくとも2回実施し、代表的なデータを示した。

2. 5 フーリエ変換全反射赤外吸収 (FT-IR/ATR) スペクトル測定及びキャピラリー電気泳動分析

PS粒子のFT-IR/ATRスペクトルは、SPX-200 (日本電子株式会社) にDuraScope (Smiths Detection) を装着して測定した。全反射結晶/フォーカシングレンズには、1回反射型のダイヤモンド/セレン化亜鉛を用いた。

分散媒のキャピラリー電気泳動分析は、CAPI-3300システム (大塚電子株式会社) を用いた。泳動条件は、キャピラリー: フューズドシリカ (内径 75 μm \times 有効長 48 cm, 大塚電子株式会社), 緩衝液: 10 mM イミダゾール,

5 mM 2-ヒドロキシイソ酪酸, 2 mM 18-クラウン-6-エーテル及び0.2w% 酢酸, 電圧: 10.0 kV, 温度: 25.0℃, 検出波長: 210 nm並びにサンプル注入: 落差法 (25 mm, 30 sec) とした.

2. 6 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

直径35 mmのプラスチックシャーレに 1×10^4 の細胞を播種し, 翌日PS粒子を200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で添加し, 24時間処理後, 観察用試料とした. 具体的には, 処理液を除き, PBSでリンス後, 2%パラホルムアルデヒド-2.5%グルタルアルデヒド液で前固定後, 1%酸化オスミウムで後固定を行った. その後液体窒素で凍結した試料を凍結乾燥させ, 金で蒸着後SEM (日本電子 JSM-5800LV) 観察を行った.

2. 7 フローサイトメトリー

PS粒子の細胞内取り込みを半定量的に測定するために, PS処理後の細胞の前方及び側方散乱光を測定した. 前方散乱光 (FSC) は, レーザービームの光軸に対して前方で検出される光で, 細胞の表面積又は大きさにほぼ比例する. 一方, 側方散乱光 (SSC) はレーザービームの光軸に対して90°の角度で検出される光で, 細胞の顆粒性状, 内部構造にほぼ比例する. 細胞を48時間PS粒子で処理し, 1回リンス後, 解析用に細胞を回収した. 測定は, FACSCalibur (Becton Dickinson) を用いて行い, 20,000細胞について解析した.

3. 研究結果

3. 1 PS粒子の細胞毒性

平均直径0.1-9.2 μm までの11種のPS粒子の細胞毒性を31.25-500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度で検討した. その結果, 既に報告したように⁶⁾, 0.1-0.51 μm の小さい3種のPS粒子はほとんど細胞毒性を示さなかった. より大きな8種のPS粒子は, 濃度依存性のある毒性を示し, いずれも最高濃度500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で最も強い細胞毒性を示したが, 4.45 μm のPS粒子が8種のうち最も強い細胞毒性を示した (Fig. 1). 8種のPS粒子間の細胞毒性を比較するために100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の単一処理濃度での細胞毒性試験を実施した. その結果, 0.92 μm から4.45 μm までの5種のサイズの粒子が明らかな細胞毒性を示し, そのうち最も強い細胞毒性を示したのは4.45 μm の粒子 (Survival=0%) で, 次に2.07 μm ($1.78 \pm 3.55\%$) と3.17 μm ($0.59 \pm 1.18\%$), その次に0.92 μm ($26.6 \pm 5.59\%$) と1.09 μm ($23.7 \pm 6.97\%$) の粒子であった. 5.26 μm ($85.7 \pm 14.9\%$), 6.8 μm ($102.6 \pm 8.73\%$) 及び9.2 μm ($62.4 \pm 16.8\%$) の粒子はほとんど細胞毒性を示さず, 単純に一方方向性に粒子径と細胞毒性の関係があるのではないことが明らかとなった.

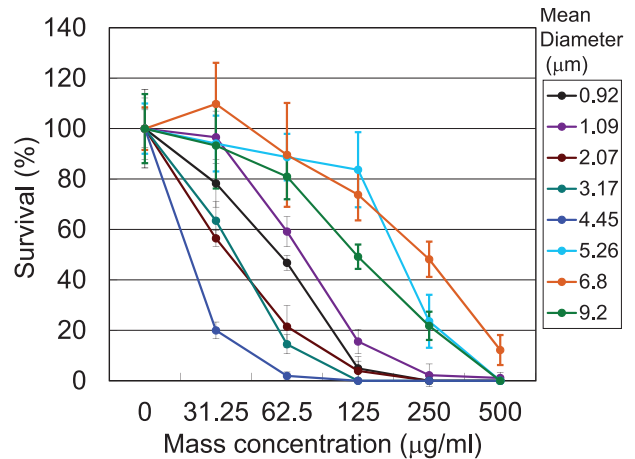


Fig. 1. Cytotoxicity of eight size-different PS particles in CHL cells

The colony formation assay was performed. Cells were seeded at 50 cells per well in 24-well plates. After 24-h incubation, a suspension of PS particles was added to the culture and incubated for further six days. The colonies formed were fixed with methanol and stained with Giemsa solution. The number of colonies on each well was counted, and the survival (%) was calculated as the ratio of the number of colonies in the test group to that in control.

3. 2 PS粒子の表面解析及び分散媒の性状

細胞毒性試験の結果, 4.45 μm と5.26 μm のPS粒子間で細胞毒性に大きなギャップが認められた. いずれの粒子も, 毒性試験終了時には白い沈殿が細胞を覆うように存在し, また, 粒子径の違いも僅かであることから, PS粒子製造時の表面組成の違い, あるいは分散媒の成分の違いがあるのではないかと疑われた. この疑問を解決するために, 高分子材料等の表面組成を測定できるFT-IR/ATR法によるPS粒子の表面解析 (Fig. 2a) 及び微粒子等が混在しても測定が可能なキャピラリー電気泳動法による分散媒成分の分析 (Fig. 2b) を行った. その結果, C=O及びCO-Oのピーク強度に僅かな相違がみられたものの, 4.45 μm と5.26 μm のPS粒子のATRスペクトルは一致し, 粒子表面の構成成分はどちらの粒子もPSであった. また, 本泳動条件において, 保存剤として添加されているアジ化ナトリウムに由来するNaイオンを除くピークは検出されなかった. これらのことから, 細胞毒性の大きな違いは粒子径の違いに起因すると考えられる.

3. 3 PS粒子の染色体異常試験結果

ナノマテリアルの安全性評価で実施する予定の染色体異常試験を, PS粒子についても実施した.

まず, 僅かな粒子径の違いで細胞毒性に大きな違いが認められた4.45 μm と5.26 μm のPS粒子について, 染色体異常試験を実施した. その結果, Table1及びTable2

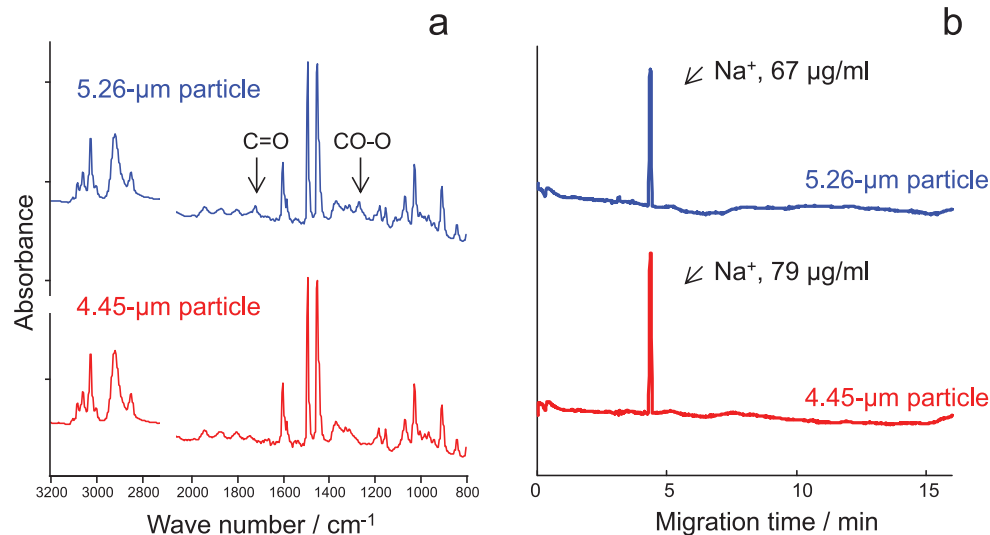


Fig. 2. FT-IR/ATR spectra of the 4.45- and 5.26- μm PS particles (a) and the capillary electropherograms of the dispersion vehicles of them (b)

Both particles showed the same FT-IR/ATR spectra pattern including the peaks for carbonyl and ether bond. The dispersion vehicle contained sodium ion at the similar concentration of around 70 $\mu\text{g}/\text{ml}$ to each other.

に示すように、構造異常は誘発されず倍数体の誘発で陽性という結果になった。処理濃度及び倍数体誘発頻度から、4.45 μm PS粒子の方が明らかに濃度依存性もあり、強い陽性結果を示した。そこで、他のサイズのPS粒子についても倍数体誘発性を確認するために、48時間処理のみの染色体異常試験を実施した。11種すべてのサイズのPS粒子の48時間処理後の倍数体出現頻度をFig. 3に示す。グラフ横軸は、各サイズのPS粒子の試験濃度を最低濃度-最高濃度で、縦軸は倍数体頻度を示している。詳細な試験濃度は、脚注に示す。細胞毒性がほとんど観

察されなかった0.1 μm と0.2 μm のPS粒子は、2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ まで試験を実施した。その他のサイズの粒子は、細胞毒性が認められる濃度まで試験を実施した。使用しているCHL細胞の陰性対照での倍数体出現頻度は、平均値約1%、最大値4%であることから、10%以上を陽性と判定している。0.92-4.45 μm のPS粒子は、実施した複数の濃度すべてで倍数体の誘発において陽性結果を示した。その他のサイズの粒子は、5.26 μm の粒子を除いて、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 又はそれ以上の濃度でも倍数体を誘発しなかった。

Table 1. Chromosome aberrations induced by the 4.45- μm PS particles in CHL cells

Treat- ment Time (h)	Mass conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Poly- ploidy (%)	Frequency of cells with structural ab. (%) [*]					total
			ctg	ctb	cte	csb	cse	
24	0	5	1	2	2	0	0	4
	50	7	1	0	0	0	0	1
	100	12 ^{**}	0	0	0	0	0	0
	200	14 ^{**}	1	0	0	0	0	1
	300	16 ^{**}	0	0	0	0	0	0
	400	14 ^{**}	0	0	0	0	0	0
48	0	1	0	0	0	0	0	0
	50	12 ^{**}	0	0	0	0	0	0
	100	15 ^{**}	1	0	0	1	0	2
	200	36 ^{**}	1	0	0	0	0	1
	300	37 ^{**}	2	4	0	0	2	6
	400	23 ^{**}	2	2	0	0	0	4

^{*} The structural aberrations were classified as follows; ctg, chromatid and chromosome gaps; ctb, chromatid breaks; cte, chromatid exchanges; csb, chromosome breaks; cse, chromosome exchanges. ^{**}The frequency indicates a positive response.

3. 4 PS粒子の細胞内への取り込み

これまでに、蛍光標識PS粒子（直径2 μm ）の細胞内

Table 2. Chromosome aberrations induced by the 5.26- μm PS particles in CHL cells

Treat- ment Time (h)	Mass conc. ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	Poly- ploidy (%)	Frequency of cells with structural ab. (%) [*]					total
			ctg	ctb	cte	csb	cse	
24	0	5	1	2	2	0	0	4
	200	3	0	0	0	0	0	0
	400	0	0	0	0	0	0	0
	600	6	0	0	0	0	0	0
	800	6	0	0	0	0	0	0
	1000	6	1	1	0	0	0	1
48	0	1	0	0	0	0	0	0
	200	3	0	0	0	0	0	0
	400	5	0	1	0	0	1	1
	600	9	1	0	0	0	1	2
	800	9	1	0	0	0	0	1
	1000	13 ^{**}	0	1	0	2	0	4

^{*} and ^{**}: See legends to Table1.

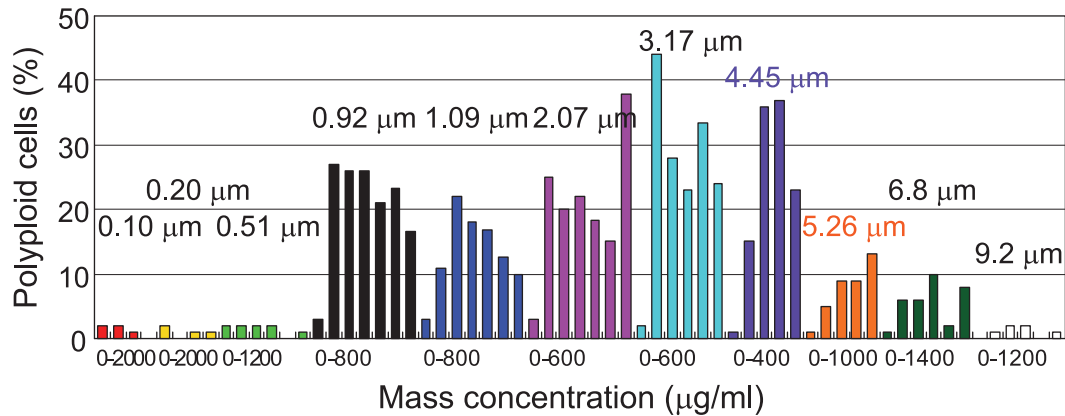


Fig. 3. Polyploidy induction by PS particles after 48-h treatment in CHL cells

Frequency of polyploidy cells in % is indicated to the mass concentrations of the 0.10- to 9.2- μm PS particles. Mass concentrations indicate their range tested. Details are as follows:

- 0, 1500, 1750, and 2000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 0.10- and 0.20 μm particles
- 0, 400, 600, 800, 1000, and 1200 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 0.51- and 9.2 μm particles
- 0, 300, 400, 500, 600, 700, and 800 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 0.92- and 1.09 μm particles
- 0, 100, 200, 300, 400, 500, and 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 2.07 μm particles
- 0, 200, 300, 400, 500, and 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 3.17 μm particles
- 0, 100, 200, 300, and 400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 4.45 μm particles
- 0, 400, 600, 800, and 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 5.26 μm particles
- 0, 600, 800, 1000, 1200, and 1400 $\mu\text{g}/\text{ml}$ for the 6.8 μm particles

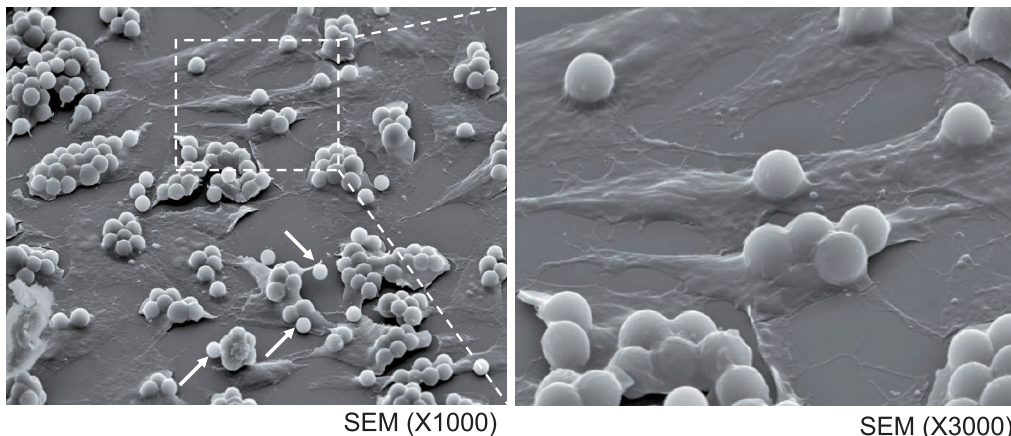


Fig. 4. SEM images of CHL cells with the 4.45- μm particles incorporated

In the right photo with a higher magnification, it is clear that PS particles are covered by the cell membrane like balls covered by a cloth. In the left photo, particles remained not incorporated in a cell (white arrows) can be distinguished from those incorporated.

取り込みを共焦点顕微鏡で観察し、細胞内へ粒子が取り込まれている事を、三次元構築した細胞画像の切断面で確認した⁶⁾。共焦点顕微鏡観察では多数の細胞の観察には時間を要するため、本研究ではSEMを使ってPS粒子の細胞内への取り込みを観察することにした。Fig. 4にその画像を示す。これは、最も強い細胞毒性を示し倍数体誘発性も高かった4.45 μm PS粒子で24時間処理後、2回リンスし観察したCHL細胞の写真である。1000倍で撮影した左図の一箇所(点線で囲まれている部分)を3000倍で観察したものが右の写真である。中央にある2つの

細胞(上の細胞は1個の粒子を、下の細胞は4個の粒子を貪食している)をよく見ると、あたかも布がボールを覆うように、粒子が細胞膜で覆われていることがわかる。左の写真に戻ってみると、裸の粒子(白矢印)と細胞膜で覆われている粒子の識別が可能で、細胞によっては驚くことに10個以上もの粒子を貪食していることが確認できる。この結果は、これまでに位相差顕微鏡で観察した画像とよく一致しており、位相差顕微鏡観察において、細胞輪郭の内部に存在する球状の粒子は貪食された粒子であることが示唆された(Fig. 5)。

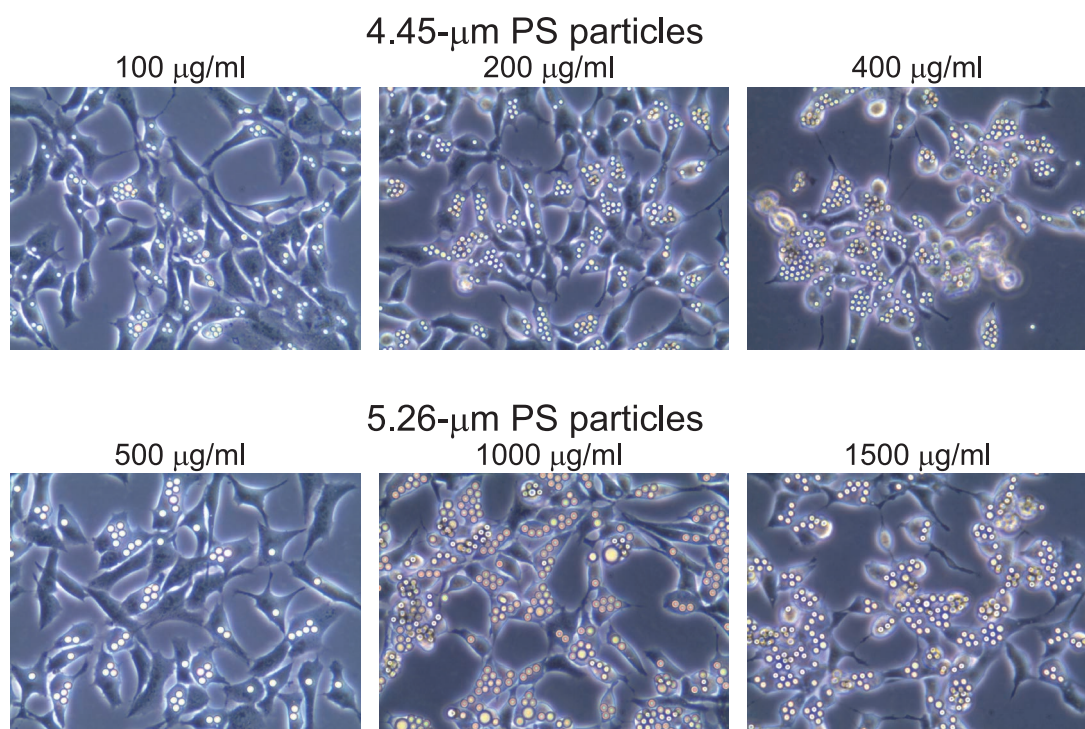


Fig. 5. Phase contrast microscopic images of CHL cells treated with the 4.45- or 5.26- μm PS particles

Cells were treated with PS particles for 48 h and then rinsed twice with the culture medium. They were observed through a phase contrast microscope (Leica DM IL LED) and then collected for the FACS analysis (Fig. 6). The number of particles incorporated in a cell increases with the mass concentration for the both sizes of particles.

3. 5 フローサイトメトリーによるPS粒子取り込み細胞の半定量的測定

SEM観察の結果を受けて、次に位相差顕微鏡で観察される細胞内取り込み粒子量とフローサイトメトリーで測定できるFSC及びSSCとの相関の有無を調べた。

4.45 μm と5.26 μm PS粒子の取り込み量は、同じ処理濃度では明らかに5.26 μm の方が少ないことを予備検討で確認しており、本検討ではいずれも倍数体が誘発される濃度付近での48時間処理を行った。Fig. 5に処理終了時の細胞と粒子量の様子を、位相差顕微鏡像で示す。どちらのサイズのPS粒子でも、低濃度では、一部の細胞内に1個から数個の粒子が観察され、中濃度ではほとんどの細胞内に数個以上の粒子が観察され、高濃度では細胞の形態も丸くなり傷害を受けている様子が観察される。これらの細胞を回収し、20,000個の細胞をフローサイトメトリーで解析した結果 (Fig. 6)、FSCは処理濃度による変化はほとんどなく、粒子を取り込んでも細胞の大きさには変化がないことが判明した。一方、SSCは位相差顕微鏡で観察される粒子取り込み量と相関して、濃度依存的に増大していた。そこで、SSC値に対してその細胞数をプロットしたのがFig. 7である。細胞のみ (Control) では、低いSSC値のところに鋭いピークが認められる分布を示した。また、いずれのサイズの処理群でも粒子を取り込んでいない細胞がControlのSSC値を

示すピークのところに存在し、処理濃度依存的に細胞数が減少している。一方、濃度依存的に、SSC値の分布はブロードになり、より大きなSSC値を示す細胞が増えていることがわかる。5.26 μm PS粒子では、中濃度と高濃度でのグラフの変化が小さく、取り込みが飽和状態に達してきていることが示唆される。4.45 μm PS粒子の方がより低濃度でより大きなSSC値を示す細胞が検出されており、CHL細胞は4.45 μm 粒子を選択的に貪食する傾向が示唆された。

フローサイトメトリーは20,000個もの細胞のデータを用いて細胞内取り込み粒子量に関するデータを示すことができ、共焦点顕微鏡やSEMに比べて、より客観的かつより定量的であるといえる。

4. 考察

細胞毒性試験において、0.1及び0.2 μm のPS粒子は、1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ という高濃度まで処理してもほとんど毒性を示さなかった。これらの分散液は理想的な分散状態を示し、処理終了時にも沈殿はほとんど認められなかった。すなわち、接着細胞にほとんど接していないことが原因である可能性が高い。ナノマテリアルの安全性評価では、どうすれば材料凝集体の分散をよくして細胞に処理できるかを検討しているところであるが、理想的なナノレベルの分散液を調製できた時、*in vitro* 実験ではナノマテ

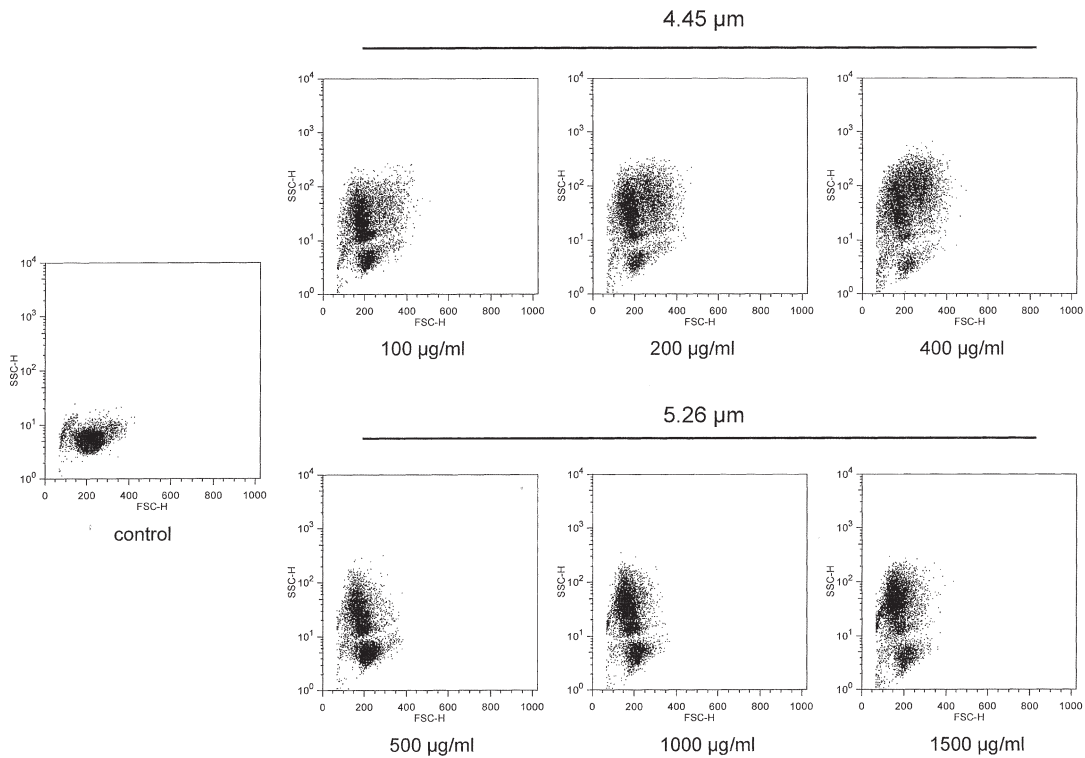


Fig. 6. FSC-SSC dot plot of cells treated with the 4.45- or 5.26- μm PS particles

20,000 cells were analyzed for each mass concentration by flow cytometry and the data are plotted in two-dimensional, the side scattered light (SSC) intensity to the forward scattered light (FSC) intensity, dot plots for the 4.45- (upper) and 5.26- μm (lower) PS particles. The control data are identical. As the change in the FSC intensity is less clear than that in the SSC intensity, the latter is used for the further analysis (Fig. 7) .

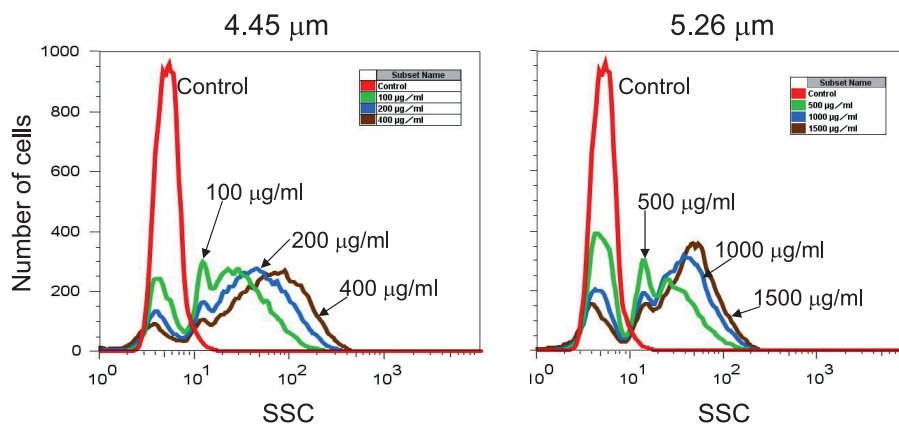


Fig. 7. Semi-quantitative measurement of cells with particles incorporated by flow cytometry

The number of cells is plotted to their SSC intensity. The control data are identical. The SSC intensity of cells increases with the mass concentration for the 4.45- μm particles. On the other hand, that seems to reach the plateau at 1000 $\mu\text{g/ml}$ for the 5.26- μm particles, although the SSC intensity is lower than that for the 4.45- μm particles.

リアルが接着細胞に接触できず、適切な安全性評価を妨げる可能性もあり、注意を要する。

サイズの異なる粒子の生物反応を比較するとき、同じ重量濃度で比較すべきか、同じ粒子数で比較すべきか、あるいは同じ表面積量で比較すべきか、迷うところである。本研究では、一貫して重量濃度で実験データを記載

しているが、例えば、Fig. 7で示した4.45 μm と5.26 μm の比較を同じ粒子数で行うとすれば、4.45 μm 粒子の200 $\mu\text{g/ml}$ での粒子数は、5.26 μm 粒子では328 $\mu\text{g/ml}$ での粒子数と同じである。Fig. 5には、5.26 μm PS粒子の328 $\mu\text{g/ml}$ での処理細胞の写真は示されていないが、500 $\mu\text{g/ml}$ よりも明らかに少ないことを確認しており、同じ

重量濃度で比較しても、同じ粒子数で比較しても5.26 μm PS粒子の取り込み量は4.45 μm 粒子に比べて明らかに少ない。

CHL細胞はこれまで主に化学物質の安全性スクリーニングに使用され、ほとんどの場合溶解する物質が対象であったため、貪食という概念はなかったが、本研究において特定のサイズのPS粒子を積極的に貪食することが判明した。ナノマテリアルは不溶性のものが多く、CHL細胞は貪食機能を有していることからナノマテリアルの評価にも十分使えることが判明したと考えている。

一方、粒子の形状に着目してみると、従来針状の物質については、アスベストをはじめとして*in vitro*で染色体異常を誘発することが既に報告されている。例えば、栄養成分であるビタミンB₂であっても針状で作用させると倍数体が誘発されること⁷⁾、また、針状であるカーボンナノチューブが細胞質に取り込まれている状態で倍数体が誘発されること⁸⁾も報告されている。しかし、SEM画像からも確認できるように、今回の粒子はそれらとは対照的に球状の物質であった。このことから、高頻度の倍数体誘発は、粒子の形状に依存しないと考えられる。

現在ISO/TC 229 Nanotechnology専門委員会WG 3(健康・安全・環境作業部会)では、ナノ粒子の毒性評価のために調製した分散液中のナノ粒子の特性を測定する方法、*in vitro*毒性試験法及びナノ粒子により産生された細胞内活性酸素量測定法を標準化しつつある。本研究で判明したように、粒子径(凝集体径)と毒性の間には相関性があることから、ナノ材料の安全性評価においては、分散液内の粒子性状も明確にすることが必要と考えられ、今後とも当該標準化作業を注視したい。

細胞によって、また、粒子の材質によっても、選択的に取り込まれる粒子径等も変化する事が予想され、更なる研究が必要と考えられる。

5. 結論

CHL細胞は0.1 μm から9.2 μm までの11種のサイズのPS粒子のうち、0.92から4.45 μm までの5種のサイズの粒子を選択的に貪食し、これは細胞毒性及び染色体数異常(倍数体)誘発性を示す粒子のサイズと一致していた。このことから、CHL細胞は何らかのサイズ認識機構をもち、貪食したPS粒子によって物理的に細胞質分裂が阻害され倍数体を誘発し、それが最終的に細胞死につながっている可能性が示唆された。

本研究では、試験分散液中の粒子(凝集体)径分布が毒性に影響する重要な特性であることが示唆された。ナノマテリアルの安全性評価において、分散が不十分で μm サイズの凝集体で処理する場合もあると考えられるが、何らかの分散状態を示すデータとともに各種毒性試

験結果を慎重に評価する必要があると考えられる。

引用文献

- 1) Koshi K, Hayashi H, Hamada A, Sakabe H: *Bull Nat Inst Indust Health*. 1961;6:10-27.
- 2) Yin H, Too HP, Chow GM: *Biomaterials*. 2005;26:5818-26.
- 3) Koyama H, Utakoji T, Ono T: *Gann*. 1970;61:161-7.
- 4) Ishidate M Jr, Odashima S: *Mutat Res*. 1977;48:337-54.
- 5) Matsuoka A, Sofuni T, Miyata N, Ishidate M Jr: *Mutat Res*. 1991;259:103-10.
- 6) Matsuoka A, Önfelt A, Matsuda Y, Nakaoka R, Haishima Y, Yudasaka M, Iijima S, Tsuchiya T: *Bio-Med Mater Engineering*. 2009;19:19-27.
- 7) Kawaguchi Y, Hayashi H, Sato M, Shindo Y: *Mutat Res*. 1997;373:1-7.
- 8) Asakura M, Sasaki T, Sugiyama T, Takaya M, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S: *J Occup Health*. 2010;52:155-66.