

2. ナノマテリアル等の安全性等に関する情報、試験法等に関する文献調査

2.1. 検索方法

(1) データベースの選定

検索に使用するデータベースは、本事業において過去に使用してきたデータベースで、かつ毒性情報に関する情報が豊富な「PubMed」を使用した。

(2) 検索キーワード

検索キーワードは、「nanomaterials」と「toxicity」又は「safety」の組み合わせを使用した。

(3) 検索の頻度・期間

検索頻度は毎月1回として、期間は、2017年1月1日～2017年12月31日(文献発行年月日)までの期間とした。

2.2. 論文選択手順・方法

上記した検索方法により検索し、タイトルを出力した。タイトル数は、毎月約70件前後であった。次に、タイトルから内容を判断し、さらにそれらの要旨を確認して絞り込みを行った。

絞り込みは、ドラッグデリバリーシステムや医療診断のためにナノマテリアルを利用する文献、センサーへの応用などに関する文献、レビュー文献を除外することにより行った。有害性に関する文献は、カーボンナノチューブ、酸化チタン、酸化亜鉛、銀、シリカに関するものが多かった。絞り込みは、これらの物質については類似性がある文献の中での選択と、*in vivo*実験を優先させた。*In vitro*実験でもメカニズムに触れた文献とヒトの細胞を対象とした文献を取り上げた。金、セルロース、ナノクレイ、グラフェン、ニッケル、酸化鉄、に関する文献は数が少なかったことから、優先的に取り上げた。プラチナ、 dendリマー、カーボンブラック、酸化アルミニウム、フラーレンについての文献は見当たらなかった。最終的に57件の文献を読み込んでサマリーを作成した。

2.3. 文献分類表

サマリーを作成した文献を試験法別に分類した結果を、表2.3-1に示す。3種類までのナノ粒子を使用している論文はそれぞれのナノ粒子に数えた。また、一つの文献でいくつかの試験法で実験している場合があるが、それぞれ取り上げた。従ってこの表の総数は読み込んだ文献数の57件以上の60件となった。

表 2.3-1 サマリーを作成した文献の試験法別分類表

ナノマテリアル	<i>in vivo</i>					生態 毒性	<i>in vitro</i>	小計
	吸入	気管内注入 咽頭吸引	静脈 注入	腹腔	経口			
SWCNT	-	1	1	-	-	-	3	5
MWCNT	-	2	1	-	-	-	1	4
グラフェン	-	-	-	-	-	1	4	5
TiO ₂	2	1	-	-	3	-	7	13
ZnO	1	-	-	-	-	1	6	8
SiO ₂	-	1	-	-	1	1	6	9
Fe ₂ O ₃	-	-	-	1	-	-	2	3
Ag	-	2	-	-	-	-	4	6
Au	-	-	-	-	-	-	1	1
Ni	-	-	-	-	-	-	1	1
ナノクレイ	-	-	1	-	-	-	1	2
ナノセルロース	-	-	-	-	-	-	1	1
量子ドット	-	-	-	-	-	-	2	2

ナノマテリアル	<i>in vivo</i>					生態	<i>in</i>	小計
合計	3	7	3	1	4	3	39	60

2.4. サマリーを作成した文献のまとめ

ナノマテリアルと生体との相互作用に関する文献は、2.2 で述べたドラッグデリバリーシステムや医療診断のためのナノマテリアルを利用する文献、センサーへの応用などに関する文献が多い。しかし人の健康に害を及ぼさないようにナノマテリアルを利用していくための研究は、欧米ではプロジェクトとして地道に継続されており、研究の範囲は拡がり、内容も深くなっている。特に 2.3 の結果が示すように、*in vitro* の研究が 2/3 を占め、単に細胞毒性のみを調査するにとどまらず、各種生物学的マーカーの動きや遺伝子の変化を通して、有害性のメカニズムの解明を目指す研究が増加している傾向が窺える。

長い間注目を浴びてきたカーボンナノチューブは、最近応用の幅と量を急激に広げており、EHS の分野でもその有害性についての深耕が望まれている。本年度取り上げた文献では、SWCNT については、長さとう有害性の関係(長い方がより重篤な結果を招く)、尾静注であっても肺繊維症を誘発すること、修飾(機能化)は細胞毒性に影響しないことなどが明らかになった。MWCNT については、がん原性があるとされた MWCNT-7 についてのがん化機構についての研究も行われたが、がん原性を完全に把握するまでには至らなかった。また遺伝子に注目した研究もなされた。カーボンナノチューブでは、肺吸入、気管支注入、咽頭吸引という実ばく露に近いばく露での研究も続けられ、ばく露の閾値を決めるため/人健康への影響への確実な予測が続けられている。

応用が広がりつつあるグラフェンの毒性は重篤とはみなされていないが、形態や化学組成にバリエーションが多く、そのことに対応した *in vitro* の研究がなされている。酸化グラフェンは、*in vitro* 毒性、環境毒性を示すので、利用には慎重を期すよう注意が喚起されている。ここでも、毒性研究においては、エンドキシンの作用に充分注意を払う必要性が喚起されている。

酸化チタンナノ粒子についての文献はここでは一番多く取り上げたことになったが、遺伝毒性を取り上げた文献をはじめ、有害性のメカニズムの一部の詳細な解明を目指した *in vitro* の研究が多い。しかし、食品関連に使用されることから、経口、胃内投与の文献もある。酸化チタンナノ粒子の食事摂取は、低用量でとはいえ、頻繁に連続的に起こるため、腸粘膜に及ぼす反復影響は腫瘍発症の増加したリスクもしくは既存腫瘍プロセスの進行に結び付くかもしれないと指摘した研究や、日焼け止めや化粧品、食品や練り歯磨きに酸化チタンナノ粒子を使用すると、ヒトの潜在的なリスクがあり、より注意を払う必要があることを、マウス胸腺への誘発免疫毒性の可能性のある機構を示すことで警告した文献があった。また、ナノ酸化チタンの経口投与はマウスにおける肝代謝機能を攪乱するとの報告もあり、行政当局によるナノサイズ材料のリスク分析と規制のための有用な情報を提供したとしている。さらに酸化チタンでは、結晶形が異なる方がサイズより毒性への影響が大きいことを報告した文献が 2 件あった。

ナノシリカについては、気管内注入の 2 件を除けば、*in vitro* で、毒性メカニズムの機構解明を目指した文献である。シリカナノ粒子の *in vitro* ばく露によって誘発されたカルシウムシグナル伝達機構へ影響、オートファジーとアポトーシスに及ぼすシリカナノ粒子の影響、表皮成長因子受容体(EGFR)シグナリングカスケードの調節と細胞毒性、ギャップ結合細胞間伝達(GJIC)の変調細胞毒性を増大させることなどが取り上げられている。さらに、ナノ粒子上に形成されたコロナや腎臓シスタチンのナノ粒子による構造転換が細胞毒性に影響があることを指摘する文献があった。

酸化亜鉛については、ラットへの吸入実験がなされ、気管支肺胞洗浄液の比較プロテオーム分析により、特発性肺繊維症の生物マーカーの有意な増大を見出したことから、肺がんを誘起する

可能性があるとした。他は *in vitro* であり、小胞体ストレス誘発因子タプシガルジン¹は酸化亜鉛ナノ粒子の細胞毒性(ミトコンドリアとリソソームに対する損傷)を高める、PINK1/parkin-介在マイトファジーは BV-2 細胞における酸化亜鉛ナノ粒子の誘導毒性で役割を果たす、オートファジー経路の機能障害が酸化亜鉛ナノ粒子へのばく露に続く異なる臓器から供給された2つの細胞タイプにおけるアポトーシス死に寄与する、等の結果が示された。また、酸化亜鉛ナノ粒子の細胞毒性におけるサイズ効果、サイズと形状の効果、亜鉛イオンとの比較もなされている。

銀ナノ粒子では、10 及び 25nm の銀ナノロッドの単回気管内注入が行われ、ばく露期間後 1 日及び 1 週間後用量依存的酸化ストレスを引き起こしたことが報告された。また、咽頭吸引後 24 h に殺処分されたマウスにより、銀ナノ粒子誘発急性肺炎症に対する感受性の遺伝的決定因子について調査された。*In vitro* 研究では、銀ナノ粒子は、A549 細胞上皮におけるホルミシス(hormesis、閾下増進効果)を誘発すること、ナノ銀の細胞毒性は細胞培養培地中の塩化物濃度および有機物の存在に大きく依存すること、銀ナノ粒子と銀イオンの特異的遺伝毒性メカニズム、銀ナノ粒子とそれらの様々な塩前駆体の毒性学的影響等が調査されたが、銀ナノ粒子の毒性作用の機構は、まだ研究中であるとされた。

金ナノ粒子については、球状、ロッド、スター状の粒子の細胞毒性が比較され、金ナノスターが、PEG のような適切なリガンドによって被覆された場合顕著な毒性を引き起こすこと無しに、健康な及び病気の細胞の両方によって効果的に取り込まれることができ、同等の用量および表面化学で他のナノ粒子形状と比較してより有害性が少ないと考えられることができることを示した。

酸化鉄ナノ粒子についての文献では、単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブと比較し、これらのナノ粒子が、癌細胞におけるミトコンドリアを直接および選択的に標的化することによって抗癌剤候補として有望であり得ることを示唆し、それゆえに、ROS 媒介ミトコンドリア経路を介して細胞死を誘発し、最終的にシトクロム c 放出、カスパーゼ 3 活性化および癌性メラノサイトにおけるアポトーシスを導く可能性があることを示した。もう一つの文献では、反復酸化鉄ナノ粒子投与は、過剰の ROS を生成し、抗酸化剤レベルを枯渇させることによって心臓組織に酸化ストレスをもたらす、持続的な酸化ストレスは、アポトーシスおよび壊死を招き、心筋細胞の変性および心臓機能不全をもたらすと述べている。

ニッケルでは、金属ニッケルナノ粒子と酸化ニッケルナノ粒子、イオンとなる塩化ニッケルの細胞毒性が比較され、Ni および NiO ナノ粒子は、Ni イオン/複合体に比較して顕著な(遺伝)毒性効果を示し、より重篤な健康状態の懸念を示すと結論された。遺伝毒性の一次メカニズムとしての酸化ストレスの同定は、発癌性ハザードおよび、DNA と直接相互作用する薬剤に比べて閾値用量応答が低いことを示唆している。

ナノクレイおよび熱的に分解された副産物の毒性評価を行った論文では、そのような試料は製造環境または廃棄環境の両方で使用されると毒性効果を生じる可能性があることを報告しているが、改質していないモンモリロナイトおよびその熱的に分解された対応物は、ほとんど有意な毒性作用を示さなかったとしている。もう一つの文献では、ナノクレイ粒子が肝臓の損傷を引き起こすことがあり、この影響は、肝毒性化学物質や医薬品との相互作用の結果として相乗的に悪化することがあることが実証された、と報告している。

ナノセルロースについては、未修飾、カルボキシメチル化、およびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム修飾ナノファイブリル化セルロースへのばく露に関連する細胞毒性効果がないことが示されている。

量子ドットに関する文献では、細胞毒性を電気化学的酵素アッセイ方法論を使用する調査法についてのもとの、細胞外生成及び研究室合成 CdTe 量子ドットの毒性に関する比較研究があり、後者では、生合成された量子ドットは、化学的方法で合成されたそれらと比較した場合、大幅に低い毒性を示したとした。

2.5. 文献サマリー

(1) SWCNT

No	SWCNT-1
論文題目 (和訳)	Length effects of single-walled carbon nanotubes on pulmonary toxicity after intratracheal instillation in rats (ラットの気管内注入後の肺毒性に及ぼす単層カーボンナノチューブの長さの影響)
著者 所属機関	Makoto Ema ^{a,b} , Hiroshi Takehara ^c , Masato Naya ^a , Hiromichi Kataura ^d , Katsuhide Fujita ^{a,b} , Kazumasa Honda ^{a,b} . a) Research Institute of Science for Safety and Sustainability, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Tsukuba, Japan, b) Technology Research Association for Single Wall Carbon Nanotubes (TASC), c) Public Interest Incorporated Foundation, BioSefety Research Center (BSRC) d) Nanomaterials Research Institute, AIST
書誌事項	The Journal of Toxicological Sciences, Vol.43,No.3,367-378,2017, DOI 10.2131/jts.42.367
試験物質	バルク N-SWCNT (CVD 法により合成, Nikkiso Co. Ltd.より購入): 幾何学的平均直径 1.8nm、表面積 878m ² /g、Fe が 43,650ppm。 S-SWCNT: 金属不純物 Fe、Co、Ni、V がそれぞれ 45、12、1.06、0.55µg/g。溶液中でバンドル形成。平均長 0.40µm。 L-SWCNT: 金属不純物 Fe、Co、Ni、V がそれぞれ 62、24、0.28、0.011µg/g。溶液中でバンドル形成。平均長 2.77µm。
試料調整法	L-SWCNT 溶液は N-SWCNT を 1% のサケ精子製 DNA を含む 10 倍希釈 PBS 中で、ホモジナイザーにて 10 時間均質化し調整。 S-SWCNT 溶液は L-SWCNT 溶液を 5 時間以上超音波ホモジナイズし調整。 ベヒクルコントロール; 1% のサケ精子製 DNA を含む 10 倍希釈 PBS、。ネガティブコントロール; PBS、ポジティブコントロール; U.S.Silica
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オス CrI:CD (SD) ラット、7 週齢。 【投与方法・期間・用量】S-、L-SWCNT (1mg/ml/kg) を気管内注入、6 ヶ月間観察。 【分析】全身状態を観察。体重、肺重量を測定。 【病理組織学的検査】左肺、肝臓、左腎、脾臓、脳をホルマリンで固定、パラフィンに設置、切片化、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色し、観察。 【BALF 分析】右肺から得た BALF を遠心分離。上清の総タンパク質、LDH 量を測定。GM-CSF、インターフェロン-γ、TNF-α、MCP-1、GRO/KC、インターロイキンを測定。細胞画分を PBS に懸濁、血液検査システムで総細胞数を決定。MG 染色で好中球、マクロファージ、リンパ球、好酸球数を決定。
試験結果	・全身状態、体重、肺重量: SWCNT 投与後に臨床症状、体重変化は観察されなかった。肺は重量が増加し、褐~黒色斑が観察された。 ・病理組織学的検査: S-SWCNT 処置群で 7~182 日目にマクロファージが肺胞で観察された。7~91 日目には好酸球の血管周囲浸潤も、91、182 日目には肉芽腫、肺胞タンパク症、好中球の肺胞浸潤、気管支嚢胞の増殖も観察された。L-SWCNT 処置群は 7~182 日目に出血、肺胞中のマクロファージの蓄積、肉芽腫が観察されたが、S-SWCNT 処置群より変化が小さかった。両処理群とも脳、脾臓、肝臓、腎臓の病理組織学的変化は観察されなかった。 ・BALF 分析: S-SWCNT 処置群では 6 ヶ月の観察期間を通じて LDH 量、総タンパク質が高く、L-SWCNT 処置群は 6 ヶ月の観察期間の後期に高かった。MCP-1、IL-18、GRO-KC は連続的に上昇し、S-SWCNT 処置群のパラメータのレベルは、L-SWCNT 処置群より高かった。両処理群とも、その他のサイトカインの変化は観察されなかった。
結論	SWCNT の気管内注入後の肺毒性は SWCNT の長さに依存し、S-SWCNT は L-SWCNT よりも重篤な肺毒性を誘発する。S-SWCNT は持続性の肺炎症を誘発した。一方 L-SWCNT が誘発した炎症は小さく、BALF 中総タンパク質は 6 ヶ月の観察期間の後期に上昇した。

No	SWCNT-2
論文題目 (和訳)	Long-term intravenous administration of carboxylated single-walled carbon nanotubes induces persistent accumulation in the lungs and pulmonary fibrosis via the nuclear factor-kappa B pathway (カルボキシル化された単層カーボンナノチューブの長期静脈内投与による核内因子 κ B 経路を介した肺への持続的な蓄積と肺線維症の誘発)
著者 所属機関	Yue Qin ^a , Suning Li ^b , Gan Zhao ^b , Xuanhao Fu ^a , Xueping Xie ^a , Yiyi Huang ^a , Xiaojing Cheng ^c , Jinbin Wei ^a , Huagang Liu ^a , Zefeng Lai ^a a) Pharmaceutical College, Guangxi Medical University, (Guangxi, People's Republic of China) b) The Maternal and Child Health Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, c) Life Sciences Institute, Guangxi Medical University
書誌事項	International Journal of Nanomedicine, 2017:12,263-277, DOI 10.2147/IJN.S123839
試験物質	カルボキシル化された単層カーボンナノチューブ (c-SWCNT): 長さ 1~3 μ m。カルボキシル含有量 2.73wt%。(Chengdu Organic Chemicals (Chengdu, People's Republic of China)より購入; Co 触媒による CVD 法で作製)。
試料調整法	c-SWCNT を混酸と混合し、65°C で磁気攪拌機で 3hr 攪拌。NaOH 溶液で中和し、1hr 超音波分解。不純物のイオンを除去し得られた短い c-SWCNT の高濃度水溶液を 5.00wt% のグルコース溶液で希釈し、5分以上超音波処理。4,900 \times g で 10 分間遠心分離して凝集体を除去。最終的に、長さはほとんど 1 μ m 以下、6~15nm ϕ 、GD 比 5.5、 ζ ポテンシャル -44.1mV、金属ほとんど含まず。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オスおよびメス SD ラット、8 週齢、200~250g。 【投与方法・期間・用量】c-SWCNT グルコース溶液 (2.0mgc-SWCNT/kg 体重/日) を尾静脈注射で 1、7、30、60、90 日間反復投与 30 日後後、肺、肝臓、腎臓を摘出。(投与後 30 日経過したラットをそれぞれ t1、30、60、90、120 日検体と称する。) 【光学顕微鏡観察・TEM 観察】肺をホルマリンで固定、パラフィンに設置、切片化、HE で染色し、光学顕微鏡で観察。肺を切片化、グルタルアルデヒドで固定、四酸化オスミウムで後固定、脱水、樹脂に埋込み、TEM で観察。 【IHC(病理組織学的及び免疫組織学的)分析】切片を脱パラフィンし、ブロッキング(過酸化水素水、ヤギ血清)。次に Col I (I 型コラーゲン)、Col III、MMP-2、TIMP-2、TGF- β 1、 α -SMA、ZSGB-BIO でインキュベートさらにペルオキシダーゼ標識ストレプトアビジンでインキュベート。最後にジアミノベンジデン基質クロモゲン溶液でインキュベート後、ヘマトキシリンで対比染色し、マイクロスコープで分析。 【ウエスタンブロッティング】肺組織を液体窒素を加えて摩砕、再懸濁し、細胞質を抽出。電気泳動により分離。対 Col III 抗体、NF- κ B/p65、I κ B α 、チューブリン、グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼでインキュベート。TBST で 3 回洗浄後ヤギ(ポリクロナール)対ラビット抗体でインキュベート 【ELISA 法】肺組織中の TNF α 、IL-1 β を定量。
試験結果	・剖検: SWCNT 凝集体 (黒色斑) はすべての肺葉で観察された。60、90 日目に塞栓を形成した。90 日間で肺毛細血管周囲にコラーゲン線維が沈着した。投与 60 日間で SWCNT 凝集体の周囲に肉芽腫が観察された。 ・TEM 観察: c-SWCNT で処置した肺において、層状体が観察された。コラーゲン繊維が形成され、肺間質内を透過した。多くの c-SWCNT が肺間質に取り込まれた。 ・IHC 分析、ウエスタンブロッティング: 肺における c-SWCNT への 30 日以上のお曝露により Col I、Col III が沈着し、肉芽腫周辺で c-SWCNT 凝集体が確認された。c-SWCNT で処置した肺切片において、MMP-2、TIMP-2 陽性細胞が観察された。c-SWCNT への曝露により、7、30 日で細胞質中の I κ B α 、p65 が減少した。 ・ELISA 法: c-SWCNT の静脈内投与により、試験期間に形質転換増殖因子ベータ 1 (TGF- β 1) 陽性細胞、 α -SMA (α -平滑筋アクチン) 陽性細胞の数が増加した。陽性細胞は主に SWCNT 凝集体の周囲に分布していた。前炎症性、前線維性サイトカインの発現は、注射を止めてから 30 日後には減少しなかった。
結論	c-SWCNT の尾静脈注射による長期の反復投与は、肺毛細血管における持続的な塞栓形成を誘発し、核内転写因子 (NF- κ B) シグナル伝達経路によって制御される慢性炎症に起因する肺線維症を誘発した。c-SWCNT による肺胞上皮細胞 (AEC) の永続的損傷は、炎症性サイトカイン、前線維性増殖因子の発現を促進した。TGF- β 1 は、NF- κ B シグナル伝達、線維形成の調節において重要な役割を有していた。

No	SWCNT-3
論文題目 (和訳)	Rheological alteration of erythrocytes exposed to carbon nanotubes. (カーボンナノチューブにばく露された赤血球の粘弾性の変化)
著者 所属機関	Heo Y ¹ , Li CA ² , Kim D ² , Shin S ¹ . 1) School of Mechanical Engineering, Korea University, Seoul, Korea. 2) Department of Nano Mechanics, Korea Institute of Machinery and Materials, Daejeon, Korea.
書誌事項	Clin Hemorheol Microcirc. 2017;65(1):49-56. doi: 10.3233/CH-15081.
試験物質	SWCNT:10mg, raw HiPco SWCNTs, Lot No. R0513 (Unidym)。径 0.8-1.2nm、長さ 100-1,000nm。 SWCNTs を、キトサンヒドロキシルフェニルアセアミド (CHPA、50mi、1mg/mL) 溶液に分散。
試料調整法	異なる分散状態の 2 サンプルを調整;1つ目は、個別化したもので、もう1つは、束ねられた SWCNTs。個別化サンプルの直径は 0.77±0.25nm、束ねられた SWCNTs の直径は 1.71±0.58nm。長さは平均 0.61-0.68µm (違いほとんどなし)。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】健康なドナー (23~25 歳) の肘静脈から採取した全血。 【血液サンプル調整】実験日に、ドナー肘静脈から全血を自動凝固剤 (K2-EDTA) 含有バキュエターにセット。遠心分離し、血漿、軟膜、細胞最上層の上澄みを別容器に静かに移す。残りのバックされた赤血球 (RBC) を PBS で 2 度洗浄後、バックされた赤血球 500µL を 25%ヘマトクリットで 0.9%塩化ナトリウム溶液で 1.5mL に希釈。希釈赤血球懸濁液 (0.3mL) を 0.9%塩化ナトリウム溶液 (1.2mL) に SWNT 分散液とともに混合 (赤血球に 2 つの異なる分散状態の SWNTs 試料をばく露)。 【培養方法】0.9%塩化ナトリウム溶液 (1.2mL) 中の赤血球懸濁液をコントロールとして使用。室温で 4 時間培養。1 時間ごとに測定。 【試験用量】SWNTs 濃度 (溶血試験): 0, 0.05, 0.1, 0.5, 1, 5, 10 µg/mL。 (赤血球凝集): 0, 0.05, 0.1, 0.5µg/mL。 (SEM イメージ): 0.5µg/mL。 【実験種類】溶血試験、赤血球の凝集
試験結果	【溶血試験】赤血球の溶血割合は、同じ SWNTs 濃度にはばく露した場合、個別 SWNT サンプル < 束ねられた SWNTs。SWNTs 濃度の増加により、溶血割合も増加。1µg/mL SWNTs では溶血割合は、それぞれ 39.5、60.4%。溶血は、赤血球の粘弾性特性の変化をもたらした。 【赤血球凝集】SWNTs 濃度 0.1µg/mL では EI (伸長指数) は個別 SWNT サンプルとコントロールサンプル間で見かけの違いなし。SWNTs 濃度 0.5µg/mL では、束ねられた SWNTs の EI は個別 SWNTs よりも明らかに減少。赤血球の変形能は培養時間の違いによる変化なし。凝集指数 (AI) は、個別 SWNT サンプルでは濃度とともに増加。ただし、0 と 0.5µg/mL の有意差なし。束ねられた SWNT サンプルの AIs は濃度の増加に対して徐々に減少。SWNTs 濃度 0.1µg/mL へのばく露による赤血球の AIs は、個別 SWNTs よりも束ねられた SWNTs へのばく露で、全ばく露時間 (0,1,2,3,4 時間) でずっと低い。統計的有意差はみられないが、束ねられた SWNTs サンプルは、個別 SWNTs よりも赤血球の凝集の大きな変化を引き起こした。 赤血球の形状変化の SEM 画像で、0.5µg/mL SWNTs ばく露で、ユニ状赤血球と一般的な形状の赤血球を確認。ユニ状赤血球は SWNT との接触に伴う溶血の結果で、その頻度は、束ねられた SWNT のほうが個別サンプルよりも高い。束ねられた SWNTs では、ユニ状赤血球の形状は平らで、細胞-細胞融合を観察。電子顕微鏡による形態観察では、赤血球のダメージは束ねられた SWNTs よりも個別分散サンプルのほうが小さい。SWNT の分散状態に応じて観察される血液学的変化の相違とよく一致。
結論	束ねられた SWNT は、溶血及び赤血球の凝集の点で、個別 SWNT よりもむしろ赤血球に対してより有毒であることがわかった。溶血がない場合に、赤血球の変形能は SWNTs へのばく露後でさえ、明らかな変化を示さなかった。束ねられた SWNTs は、個別 SWNTs よりも厚く、硬く、これらの物理的特性は、異なる程度の細胞膜相互作用を生じさせ、続いて、細胞膜の近くの空乏層を擾動させた。本研究を通じて、生物学的細胞中のナノ材料の毒性評価のための新しいツールとして、血液学的測定を使用することができることを確認した。このツールは、ナノ材料の毒性評価に便利に使用することができる。

No	SWCNT-4
論文題目 (和訳)	Single-walled carbon nanotubes (SWCNTs) inhibit heat shock protein 90 (HSP90) signaling in human lung fibroblasts and keratinocytes (単層カーボンナノチューブ (SWCNT) は、ヒト肺線維芽細胞およびケラチノサイトにおける熱ショックタンパク質90 (HSP90) シグナル伝達を阻害する)
著者 所属機関	Li-Chu Ong ^{a,b} , Yuen-Fen Tan ^{a,b} , Boon Shing Tan ^c , Felicia Fei-Lei Chung ^a , Soon-Keng Cheong ^d , Chee-Onn Leong ^{a,e} a) Center for Cancer and Stem Cell Research, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia b) School of Postgraduate Studies, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia c) Institute of Biological Chemistry, Academia Sinica, Taipei, Taiwan d) Faculty of Medicine and Health Sciences, University Tunku Abdul Rahman, Bandar Sungai Long, Selangor, Malaysia e) School of Pharmacy, International Medical University, Bukit Jalil, 57000 Kuala Lumpur, Malaysia
書誌事項	Toxicology and Applied Pharmacology 329 (2017) 347–357
試験物質	SWCNT (Research Nanomaterials, Inc., Texas, USA, 補足表 1); 標準的長さ(5~30µm)と短い(1~3µm)もの。未修飾(製造したままのもの)のもの。カルボキシル基、水酸基で修飾したもの。
試料調整法	次欄参照。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ヒト胚性腎臓細胞 (HEK-293T)、非形質転換乳房上皮細胞 (MCF 10A)、ヒト胎児肺線維芽細胞 (MRC-5)、肝細胞癌細胞 (HepG2)、不死化ヒトケラチノサイト細胞 (HaCaT)、鼻咽頭上皮細胞株 (NP69)、初代ヒト間葉系幹細胞 (CYT-0086)。 CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay: 計 5,000 個の細胞をプレートに播種、24 時間培養。精製未修飾及び修飾(機能化)SWCNT を細胞培養培地に分散、最終濃度 0.1~100µg/mL で細胞に投与。細胞生存率を CellTiter-Glo Luminescent Cell Viability Assay キットにより測定。少なくとも 3 回実施。 細胞周期分析: MRC-5 及び HaCaT をプレートに 8×10 ⁴ 細胞/mL 細胞密度で播種、細胞接着 24 時間後に細胞を一定長さの SWCNT 25,50,100µg/mL とともに 37°C、5%CO ₂ で 72 時間培養。細胞をトリプシン処理、回収、FBS-PBS で 2 回洗浄。次いで、ペレットをエタノールに再懸濁、-20°C で一晩保存。固定した細胞を氷冷した PBS で洗浄、RNアーゼ A (200µg/mL) と共に 37°C で 1 時間培養後、ヨウ化プロピジウム (PI; 10µg/mL) を用いて DNA 染色。蛍光(励起/発光極大: 488/530nm) が記録された FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest を用いて細胞周期を分析。WinMDI 2.8 ソフトウェアを用いて解析。 細胞死検出 ELISA Plus アッセイ: MRC-5 及び HaCaT を未修飾 SWCNTs 100µg/mL で処理前にプレートに 24 時間播種、処理 72 時間後に、細胞死検出 ELISA Plus アッセイを用いて、ヒストン錯化 DNA 断片の定量測定により、アポトーシス及び壊死細胞死に関連する DNA 断片化を評価。TECAN 無限プレートリーダー F200 により吸光度 (405nm) 測定。陰性対照に対して処置群を標準化することにより、アポトーシス及びネクローシス指数を算出。少なくとも 3 回実施。 カスパーゼ活性の測定: カスパーゼ 3/7、8、9 活性を Caspase-Glo Assay キットで定量。 マイクロアレイとコネクティブティマップ解析: ・マイクロアレイ実験: 2 連実施。MRC-5 細胞を、一定長さ(5~30µm)の未修飾 SWCNT 100µg/mL 又は賦形剤で 72 時間処理。細胞からの全 RNA を、Qiagen RNA 単離キットにより抽出。 ・マイクロアレイハイブリダイゼーション: Affymetrix Human Gene 1.0 ST アレイを用いて実施。 定量的リアルタイム PCR (qPCR) 分析: RNeasy Mini Kit を用い全 RNA 抽出。第 1 鎖 cDNA 合成及び qPCR を実施。特異的なフォワード及びリバースプライマー配列 (補足表 2)。全ての qPCR 反応は、94°C で 3 分→94°C で 40 秒→60°C で 40 秒及び 25 秒 72°C、40 サイクル。発現データは、ハウスキーピング遺伝子 GAPDH を用いて標準化。 タンパク質単離およびウェスタンブロット分析: 細胞からのタンパク質溶解物を氷冷溶解緩衝液 (1% NP-40, 1mM DTT, ホスファターゼ阻害剤カクテル及び PBS 中のプロテアーゼ阻害剤カクテル) 中で抽出。全タンパク質 (25µg) を SDS-PAGE に供し後イムブロッティング。

	<p>細胞ベース HSP90 依存性ルシフェラーゼリポソームフォールディングアッセイ: pGreenFire1-CMVdscGFP/T2A/Fluc 遺伝子を担持するレンチウイルス粒子を形質導入した MRC-5 及び HaCaT で実施。形質導入された細胞をプレート中で 72 時間、未修飾 SWCNT で処理。細胞を予熱した培地 (50°C) で約 6 分間培養、内因性ルシフェラーゼを十分に発現。その後、細胞を 37°C、5%CO₂ で 1 時間培養。ルシフェラーゼリポソームフォールディングの程度は、ルシフェリン基質溶液の添加によって測定、得られたルミネセンスは、ルミノメーターを用いて評価。 HSP90、HSP70 及び HSP40 のトランスフェクション: MRC-5 及び HaCaT を、X-tremeGENE HP DNA トランスフェクション試薬を用いて HSP90、HSP70 又は HSP40 で逆トランスフェクション。</p>
<p>試験結果</p>	<p>・製造したままの (未修飾) SWCNT は、ヒト細胞株において細胞型特異的細胞傷害性を誘導した。未修飾 SWCNT は、濃度及び時間依存的に試験した全ての細胞系において有意な細胞傷害性を誘導した (図 1A、B)。HEK-293T、MCF-10A、MRC-5、HepG2、HaCaT 及び CYT-0086 の短い SWCNT と比較して、一定長さの SWCNT は比較的より細胞毒性があったが、NP69 は短い SWCNT の毒性影響に対してより感受性であった (図 1A)。本結果は、未修飾 SWCNT の細胞毒性効果は、未修飾 SWCNT の長さによる影響を受け、高度に細胞型に依存することを示唆している。</p> <p>・SWCNT のヒドロキシル及びカルボキシル機能化 (修飾) は、ヒト細胞株における細胞毒性に影響した。SWCNT のカルボキシル化及びヒドロキシル化は、MRC-5、HaCaT 及び HEK-293T 細胞における一定長さの SWCNT の細胞毒性を有意に低下させた (図 2)。HepG2 肝細胞及び CYT-0086 ヒト間充織幹細胞は、未修飾 SWCNT と比較して、ヒドロキシル化及びカルボキシル化された一定長さの SWCNT に対して感受性が低いことが判明した。NP69 の鼻咽頭上皮細胞は、一定長さのカルボキシル化 SWCNT に対して感受性が高かった。対照的に、ヒドロキシル又はカルボキシル基を有する短い SWCNT の機能化は、細胞傷害性の有意な減少が観察された NP69 を除いて、試験した全細胞系において、未修飾 SWCNT と比較して細胞毒性に有意な影響を及ぼさなかった。全体として、SWCNT の機能化が SWCNT の細胞毒性効果に影響を与え得ることを示した。細胞生存率に対する機能化の効果は、細胞型に依存していた。</p> <p>・SWCNT は、細胞型依存的にアポトーシスおよびネクローシスを誘導した。MRC-5 胚性肺線維芽細胞におけるカスパーゼ 3 及び 9 活性、ミトコンドリア膜脱分極、と有意なアポトーシス及び壊死を誘導した (図 3A~D)。パンカスパーゼ又はカスパーゼ 3 又は 9 特異的阻害剤との SWCNT の共処理は、SWCNT のアポトーシス効果を完全に排除し、SWCNT が MRC-5 におけるミトコンドリア依存性アポトーシス細胞死を誘導することを示唆した。SWCNT は MRC-5 細胞においてわずかな S 及び G2/M 細胞周期停止を誘導した (補足図 1A)。対照的に、SWCNT は、HaCaT ヒトケラチン細胞の増殖を細胞死を誘導することなく阻害した。</p> <p>・SWCNT は、熱ショックタンパク質 90 (HSP90) 阻害に関連する示差的遺伝子発現シグネチャーを誘導した。遺伝子発現プロファイリング及びコネクティブティマップ分析により、SWCNT が、MRC-5 細胞における熱ショックタンパク質 90 (HSP90) 阻害の特徴的な遺伝子発現シグネチャーを誘導し、SWCNT が HSP90 シグナル伝達経路を阻害し得ることを示唆した (図 4A、4B、表 1)。マイクロアレイ及びコネクティブティマップ分析データは、SWCNT が HSP90 シグナル伝達及びコレステロール生合成の調節を介してその毒性作用を発揮する可能性があるという仮説を導いた。</p> <p>・SWCNTs が HSP90 クライアントを阻害した。HSP70 タンパク質発現の増加に裏付けられた SWCNT $\geq 50\mu\text{g}/\text{mL}$ にばく露された細胞における AKT、CDK4 及び BCL2 タンパク質発現の有意な減少を観察した (図 5A)。対照的に、HSP90、HSP60 及び HSP40 の発現レベルは、細胞の SWCNT へのばく露によって影響を受けなかった。既知の HSP90 阻害剤であるゲルタナマイシン (GA) 及びタネスピマイシン (17AAG) で処理した細胞でも同様の生物学的効果が観察され、SWCNT が HSP90 の発現に影響を与えずに HSP90 クライアントタンパク質の分解を促進することが示唆された。</p> <p>・SWCNT は HSP90 依存性タンパク質リポソームフォールディング活性を有意に阻害した。HSP90 依存性ルシフェラーゼリポソームフォールディング活性は、濃度に依存して一定長さ及び短いものの初期 SWCNT の両方にばく露された MRC-5 細胞において有意に減少した (図 5B)。一定長さの初期 SWCNT にばく露された HaCaT 細胞でも同様の効果が観察されたが、短い SWCNT で処理された細胞では観察されなかった。</p> <p>・HSP90 の異所性発現は、SWCNT 誘導細胞傷害を抑制した (図 6A)。HSP90 の異所性発現は、HSP40 又は HSP70 ではなく、SWCNT の細胞傷害効果を完全に排除し、SWCNT 誘導細胞毒性が HSP90 依存性であることを示した。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究結果は、標準的長さの未修飾 SWCNT が、HSP90 活性を阻害することによってヒト肺線維芽細胞およびケラチノサイトにおいて細胞傷害性を誘導することを示唆した。</p>

(2) MWCNT

No	MWCNT-1
論文題目 (和訳)	Multi-walled carbon nanotube-induced genotoxic, inflammatory and profibrotic responses in mice: Investigating the mechanisms of pulmonary carcinogenesis マウスにおける多層カーボンナノチューブ誘発遺伝毒性、炎症性及び繊維症進行の応答： 肺発癌のメカニズムを解明
著者 所属機関	Luna Rahman ^a , Nicklas Raun Jacobsen ^b , Syed Abdul Aziz ^c , Dongmei Wu ^a , Andrew Williams ^a , Carole L. Yauk ^a , Paul White ^a , Hakan Wallin ^{b,d} , Ulla Vogel ^{b,e} , Sabina Halappanavar ^a , a Environmental Health Science and Research Bureau, Health Canada, Ottawa, Canada b The National Research Centre for the Working Environment, Copenhagen, Denmark c Food Directorate, Health Products and Food Branch, Health Canada Ottawa, ON, Canada d STAMI, National Institute of Occupational Health, Gydas vei 8, Oslo, Norway e Department of Micro- and Nanotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby, Denmark
書誌事項	Mutat Res Gen Tox En 823 (2017) 28-44
試験物質	2 つの異なる MWCNTs ・ Mitsui XNRI-MWNT-7 (Mitsui-7; Lot# 05072001K28) : Mitsui Company (Tokyo, Japan) (now Hadoga Chemical Industry)から入手。 直径 49-100 nm、長さ 3-5.7 μ m。BET; 22 m ² /g。 ・ NM-401: the European Union Joint Research Centre (JRC), Ispra, Italy から寄付。 直径 30-90 nm、長さ 3.6-4.4 μ m。BET; 18 m ² /g。 共に、不純物<5%。誘導結合プラズマ質量分析法 (ICP-MS) 分析では、共に、Fe、Na、Al などの不純物を含む。エネルギー分散型 X 線分光法 (EDS) 分析では、NM-401 は Si、Cu と Zn も含む。
試料調整法	ストック懸濁液は、Muta TM マウスから収集された 2% 血清を含む NanoPure 水中 3.2 mg/mL の濃度で、ばく露の日に新たに調製。超音波処理、希釈して使用。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物： 大人 12 週齢雌 Muta TM マウス; Health Canada, Ottawa, Canada で繁殖、維持。 誘発突然変異頻度の決定のために標的遺伝子 (すなわち、lacZ) を含む非転写 λ gt10lacZ シヤトルベクター [49, 50] の 29 \pm 4 の安定的に統合され、連結されたコピーを持つトランスジェニックマウス (strain 40.6)。 投与方法・ 期間・試験用量(Mitsui-7 と NM-401、それぞれ)： 4 週連続週 1 回気管内注入 (1 回注入量 50 μ l)。0 (溶媒(vehicle)のみにばく露されたコントロールマウス 2 粒子タイプ間で共有)、36 \pm 6 又は 26 \pm 2 μ g/マウス(低用量)と 109 \pm 18 又は 78 \pm 5 μ g/マウス(高用量)。最初のばく露の後に続く 90 日に殺処分。
試験結果	・肺切片中の MWCNTs のハイパー スペクトルマッピング： MWCNTs のハイパースペクトルマッピングは、顕著な量の Mitsui-7 と NM-401 が両方の用量群で肺組織中に最初のばく露後 90 日でさえ保持された、ことを明らかにした。バイモータルピークが組織マトリックス中の MWCNTs に対して観察された(不均一性を示唆)。 ・BALF および肺組織の遺伝毒性および変異原性評価(コメットアッセイを用いた DNA 損傷の定量化)： 尾長さ (TL) 及び尾%DNA として表示されるデータは、溶媒(vehicle)ばく露マウスを基準にして MWCNT ばく露マウスの BALF 中の DNA 損傷の大幅な増加を示さなかった(図 3、上部パネル)。同様に、一致するコントロールに比べて Mitsui-7 ばく露肺において大きな変化は観察されなかった。ただし、DNA 鎖切断の大幅な増加は、両コメットパラメーター-TL と尾%DNA による測定のように、NM-401 の高用量で処理されたマウスの肺で観察された(図 3、下パネル b、補助表 I) (高用量 NM-401 とコントロールに対して、それぞれ 18 \pm 1.05 と 6.1 \pm 1.63 対 24 \pm 2.42 と 12.7 \pm 1.86)。 導入遺伝子(LacZ)突然変異頻度 (MF) 解析は、MWCNTs の突然変異能を決定するために使用された。コントロールマウスの平均 MF 頻度は 6.8 \pm 0.7 \times 10 ⁻⁵ だった。Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスは、コントロール(図 4)と比較して、最初のばく露後 90 日での用量でも、導入遺伝子 MF のレベルの統計的に有意な増加を示さなかった(6.1 \pm 0.3 \times 10 ⁻⁵ または 6.4 \pm 0.5 \times 10 ⁻⁵ 、それぞれ)。 ・細胞増殖： 肺切片は、細胞増殖に及ぼす MWCNT ばく露の影響を調べるために、Ki-67 発現のために分析された。一致したコントロールと比較された細胞増殖の増加が、低用量(図 5A-b, g)

と高用量 (図 5A-c, h) Mitsui-7 処理肺切片で観察された。NM-401 によって誘発された細胞増殖は、低用量群では一致したコントロールに匹敵した (図 5A-d, i) が、高用量群では一致したコントロールと比較して、より高かった (図 A-e, j)。Ki-67 に対する増加染色が主にこれらの用量群動物の細気管支ダクト近くで観察された。

・p53 発現:

p53 の発現は高用量群でのみ調べられた。増加した p53 の発現が、コントロール肺組織切片 (図 5B-a, d) と比較して、Mitsui-7 (図 5B-b, e) と NM-401 (図 5B-c, f) の高用量へばく露された肺切片で観察された。P53 染色は、線維化病変領域で主に発見され、NM-401 ばく露群で比較的より高かった。

・肺の炎症と線維化:

BALF 細胞数;

コントロール群に対して 8 匹のマウスとそれぞれのばく露群に対して 6 匹のマウスからの BALF は、差別的炎症細胞数が評価された (図 6 および補足表 II a-b)。90 日間ばく露後、細胞合計数は、溶媒ばく露マウスと比較されて、Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスからの BALF 中で、それぞれ、~7- と~4.6-倍高かった (図 6a)。同様の傾向がマクロファージに対して見付かった (図 6b)。

図 6 c に示される細胞プロファイルは、MWCNT ばく露に続く好中球数の増加を明らかにした。特に、一致するコントロールと比較して、Mitsui-7 の低、高用量へのばく露に続く好中球で、それぞれ 134、160 倍の増加があり、NM-401 の低、高用量へのばく露、それぞれ、に続く 76 と 100 倍の増加があった (補足表 IIb)。

リンパ球の数も Mitsui-7 へのばく露に続いて 67 倍と 60 倍まで、NM-401 へのばく露に続いて 12 倍と 20 倍まで、低および高用量でそれぞれ増加した (図 6d; 補足表 IIb)。コントロール及び MWCNT ばく露サンプルに対し、好酸球数の有意な差は観察されなかった (図 6 e)。

上皮細胞の総数は、一致するコントロールと比較して、それぞれ、低および高用量ばく露 Mitsui-7 群で 10 倍、14 倍高く、低および高用量 NM-401 ばく露群で 3 倍と 5 倍高かった (図 6f; 補足表 IIb)。Mitsui-7 または NM-401 へばく露されたマウスの BALF 細胞プロファイル間のトレンドは、総好中球及び上皮細胞を除いて、同等だった。

病理組織学;

ハイパースペクトルマッピングの結果と一致して、H-E 染色 MWCNT ばく露肺組織の病理組織学的解析は、肺のばく露 90 日後で大量の MWCNT がまだ存在していたことを示した (図 7A a-e)。

MWCNTs は、主に線維化巢中でバンドルで頻繁に発見された。MWCNT ばく露群における肉芽腫性の病変は、マクロファージによって支配されていた。病変は、主に、しかし独占的ではなく、小葉中心性領域 (CA) 中で、または終末細気管支と肺胞管の交差点に発生した (図 7A a-e, 補足表 III)。病気にかけた領域の定量化は、一致するコントロールから溶媒処理肺に比べて、MWCNT ばく露肺中の疾患領域で大幅な増加を示した (図 7A-a)。

肺切片は、線維化病変の指標であるコラーゲン沈着を評価するために、Masson Trichrome 染色 (青い領域) で染色された。少量から軽度なコラーゲン沈着 (総面積の 1.2 %, 7B-b) が溶媒処理肺 (図 7A-f); より具体的には、細気管支及び血管の間質および肺胞管の壁、で見付かった。

MWCNT ばく露マウスにおいて、コラーゲン量は、肺胞管、肺胞、気道の壁と間質中での沈着を伴い、2-2.6% へと控えめに増加した (図 7A g-j, 7B-b)。また、軽度なコラーゲン沈着が、炎症性細胞の近く、肉芽腫内の肺胞領域中で観察された。線維芽細胞のマーカであるビメンチンに対する抗体を用いた免疫組織化学は、MWCNT ばく露肺切片中で (図 7A l-o); より具体的には、最大のビメンチン染色を持っていた高用量 NM-401 群における線維症の領域 (図 7 a-o) 中で、増加したビメンチン染色 (総面積の 1-1.2% (茶色染色)、図 7B-c) を示した。

対照的に、溶媒処理コントロール (図 7A-k) は、最小のビメンチン染色を示した (総面積の 0.6 %, 7B-c)。ムチン生産のためのマーカである PAS を用いた肺切片の染色は、溶媒ばく露肺と比べて、すべてのテスト用量で MWCNTs の両タイプへばく露された肺中の気道上皮 (補足図 1a-e) 領域中で高められたムチン合成 (黒矢印) を示した。

プルシアン ブルーを使用した鉄含有量のための追加的染色は、MWCNTs へばく露された肺中のマクロファージの最小限の染色を示した。1 匹のマウスは、溶媒処理コントロールに比べて、鉄ポジティブマクロファージの有意な増加を示した (補足図 1f-j)。

遺伝子発現解析;

Mitsui-7 または NM-401 へのばく露後 90 日に採取されたサンプルからの DEGs (発現変動遺伝子、すなわち、上方と下方調節された遺伝子) のリストが、溶媒コントロールと比較して表示されて、補足表 IV 中に提示している。図 8A は、すべての用量粒子タイプの組み合わせに対して、上向きと下向き調節された遺伝子の数をまとめている。

Mitsui-7 は、低および高用量群のマウス肺において、それぞれ、1372 DEGs (902 の上

向き調節と 470 の下向き調節) と 1411 DEGs (958 の上向き調節と 453 の下向き調節)を誘発した。

最大の発現変更は、chloride channel calcium activated 3 (Clca3, 172- and 153-fold increases for the low and high dose, respectively), chemokine (C-X-C motif) ligand 5 (Cxcl5, 8- and 4-fold), serum amyloid A 3 (Saa3, 25- and 19-fold), chemokine (C-C motif) ligand 7 (Ccl7, 13- and 10-fold), triggering receptor expressed on myeloid cells 2 (Trem2, 13- and 13-fold), glycoprotein (transmembrane) nmb (Gpnmb, 12- and 16-fold), Spp1 (16- and 20-fold), lymphocyte antigen 6 complex, locus I, interferon (Ly6i, 8- and 6-fold), alpha-inducible protein 27 like 2A (Ifi27l2a, 6- and 4-fold), mucin 5, subtype B, tracheobronchial (Muc5b, 11- and 12-fold), fibrinogen gamma chain (Fgg, 6- and 9-fold)のメンバーに対して観察された。

Mitsui 7 と NM-401 の両方に対して、それぞれ、低および高用量群 (図 8B-a)の間で共通だった 1073 DEGs (すなわち、731 の上向きと 342 の下向き調節された)があった。低用量 NM-401 群における DEGs の数(1205)が低用量 Mitsui-7 群 (1372 DEGs)に匹敵し、2 つの MWCNT 群間の 874 共通 DEGs を伴った(図 8B-b)。

しかし、高用量 Mitsui-7 群 (1411 DEGs)と比較して、高用量で、NM-401 ばく露肺サンプル中の DEGs の数の大幅な増加があった (214 %、2585 DEGs、1459 の上方と 1126 の下方調節)。

溶媒コントロールと比較して最大の発現変更は、NM-401 の低と高用量で、それぞれ、Clca3 (62-, 177-fold), Cxcl5, (17- and 12-fold), Saa3 (17- and, 53-fold), Ccl7 (11-, 25-fold), Trem2 (11-, 25-fold), Gpnmb (10- and, 32-fold), Spp1 (7- and 30-fold), Ly6i (9- and 8-fold), Ifi27l2a (9- and, 13-fold), Muc5b (9-, 13-fold), Fgg (9- and 14-fold) 遺伝子に対して観察された。

NM-401 の用量群に共通な 978 DEGs (すなわち、679 の上向きと 299 の下向き調節された)があった(図 8B-c)。合計 1199 DEGS (すなわち、781 の上向きと 418 の下向き調節された)は、高用量群での両方の MWCNTs によって影響を受けた(図 8B-d)。

NM-401 に対して最大の発現変更を示す遺伝子が Mitsui-7 群で観察されるものと同じであったにもかかわらず、公開 NM-401 ばく露マウスでの発現変更は、明確な用量依存応答を示し、Mitsui-7 群よりもより大きい倍率変更を示した。ただし、応答はすべての遺伝子に対して用量依存性ではなく、より高い発現が高用量と比較して低用量群でしばしば観察された。

GO 用語の Enrichment 分析は、Mitsui-7 と NM-401 への肺ばく露が、両方の用量で、多くの生物学的プロセス (図 9) (免疫応答 (GO: 0006955)、炎症反応 (GO: 0006954)、恒常的プロセス (GO:0042592)、リンパ球活性化 (GO: 0019882)、抗原プロセッシングおよび提示 (GO: 0046649)、細胞接着 (GO: 0007155)、骨髄白血球活性化 (GO: 0002274)、および細胞増殖 (GO: 0008283) を含む)において摂動を誘発した(図 9A)。

これらの生物学的プロセスは、炎症と線維化に関連付けられる。高用量での Mitsui-7 や NM-401 ばく露肺で強化される生物プロセスは:急性炎症反応 (GO: 0002526)、サイトカイン産生の調節 (GO: 0001817)、イオン恒常性 (GO: 0050801)、骨格系発育 (GO:0001501)、上皮発育 (GO: 0060429)、細胞外構造組織化 (GO: 0043062)、骨化 (GO: 0001503)、細胞骨格組織化の調節 (GO: 0051493)、補体活性化古典経路 (GO: 0006958)、および細胞死 (GO: 0008219) :のみを含んでいた(図 9B)。

さらに、DNA 損傷に関連する生物学的プロセス (細胞内シグナル伝達カスケード (GO: 0007242)、アポトーシス (GO: 0006915)、血管新生 (GO: 0001525)、MAPKKK カスケードの調節 (GO: 0043408)、ATP 代謝プロセス (GO: 0046034)酸化ストレスへの応答 (GO: 0006979)、抗アポトーシス (GO: 0006916) と DNA 結合の調節 (GO: 0051101)) も高用量での処理肺で混乱させられた。

全体的遺伝子発現・創意工夫生体機能解析は、両粒子タイプへの応答で膨大な数の生体機能の摂動を明らかにした。炎症反応と関連する機能がそれらの機能の中で主に影響を受ける一方、線維化に関連する他のプロセス (例えば、結合組織障害)、癌 (例えば、細胞毒性、細胞生存率、進行性悪性腫瘍、転移、および腫瘍の侵入)、関節症と心血管疾患も有意に (p -値 $< 5 \times 10^{-8}$) 影響を受けた。

両方の用量で Mitsui-7 または NM-401 へばく露された肺サンプル中の DEGs に関連付けられたトップインパクトな病気と機能を示す経路分析の結果が、補足図 2A 中に表示されている。これらの経路や機能に関連付けられている DEGs の数は、Mitsui-7 よりも NM-401 へばく露された肺において、より高かった。

疾患のメカニズムを理解するために、標準経路が IPA を使用して分析された(補足図 2B)。最も重要な摂動経路は、炎症、肝線維化と酸化的損傷に関連付けられ、これらの経路中の遺伝子は両方 MWCNT 群で強化された。線維化および DNA 損傷経路に関連付けられている遺伝子の数と DEGs の倍率変更は、Mitsui-7 ばく露マウス肺よりも NM-401 でより高かった。

いくつかの上方調節遺伝子は1.3より上の倍率変更値を持ち、調節遺伝子のアクティブ化状態と有意性は IPA 中で計算された Z-スコアから予測された。正の Z-スコアを持つ上方調節遺伝子は活性化される可能性があると考えられた一方、負の Z-スコアを持つ上方調節遺伝子は、抑制される可能性があると考えられた。Z-スコア ≥ 2 を持つ上方調節遺伝子は、有意性があると考えられた。

上方調節遺伝子 Tnf、インターロイキン 6 (Il6)、Myd88、コラーゲン刺激因子 (Csf1、Csf2)、インターフェロン制御因子 7 (Irf7)、Jun oncogene (Jun)、インスリン様成長因子 I (Igf1)、一酸化窒素合成酵素 2 (Nos2)、Cd44、ケモカイン (C-C motif) 配位子 2 (Ccl2)、BCL2 関連 Xタンパク質 (Bax)、分泌リンタンパク質 1 (Spp1) は、両用量群で Mitsui-7 と M-401 へばく露された肺サンプル中で有意に活性化された(補足図 2C)。

interleukin 10 receptor-alpha (Il10ra), atypical chemokine receptor 2, (Acr2), suppressor of cytokine signaling 1 (Socs1), apolipoprotein E precursor (ApoE) は、抑制はこれらの群で抑制されているようだった (Z-スコア ≤ 2)。さらに、低、高用量群での Mitsui-7 と高用量群での NM-401 は、prostaglandin E receptor 4 (Ptger4) の調節を抑制した。しかし、NM-401 は、interleukin 1 receptor antagonist (Il1rn) の調節を抑制した。

炎症と線維症に関連付けられた遺伝子のリストは、Qiagen マウス RT2 プロファイラー経路特定の PCR アレイを使用してコンパイルされ、MWCNT 誘発遺伝子リストは、Poulsen et al., 2015 [6] で公表された。

同様に、我々は、Qiagen マウス RT2 プロファイラーアレイ上に存在する遺伝子と[67]で報告されている MWCNT 誘発 35 がん遺伝子サインを使用して肺がん遺伝子リストをコンパイルした。これらのリストは、炎症、線維症、癌に関連付けられている Mitsui-7 または NM-401 へばく露された肺中の DEGs の数を評価するために使用された(図 10A-D)。

Mitsui-7 へばく露の後に続き、合計 61 と 58 の DEGs が、それぞれ、低および高用量群での炎症と関連付けられ(図 10A と B)、45 と 42 の DEGs が、それぞれ、低および高用量群での線維症と関連付けられた(図 10A と B)。

線維症進行遺伝子の中で、低用量群での 37 遺伝子(図 10 A) および高用量群での 35 遺伝子(図 10B) は炎症と関連付けられる DEGs に共通だった。

癌に関連付けられていた低用量群での 27 DEGs (図 10 a) と高用量群での 29 DEGs (図 10 b) があり、そのうちの 8 つは各用量群での炎症と線維化に共通だった(図 10A-B)。

NM-401 へばく露に対し、合計 61 と 75 の DEGs が炎症に関連付けられ(図 10C と D)、42 と 55 の DEGs が低および高用量での線維化にそれぞれ関連付けられた(図 10C と D)。線維症進行遺伝子の中で、低用量群での 37 DEGs (図 10C)、高用量群での 42 DEGs (10D) は炎症とも関連付けられた。

癌に関連付けられた低用量群での 29 DEGs(図 10C)と高用量群での 39 DEGs (図 10D) があり、低用量群でのこれらの DEGs の 7 つ(図 10C)と高用量群での 9 つ(図 10D) は 炎症と線維化に共通だった。

Mitsui-7 または NM-401 によって誘発された線維化 DEGs の約 20% (例えば、matrix metalloproteinase 12 (Mmp12), matrix metalloproteinase 14 (Mmp14), chemokine (C-X-C motif) ligand 10 (Cxcl10), insulin-like growth factor 1 (Igf1), interleukin 6 (Il6) and Ptk2) も癌と関連付けられた。

結論

本研究は、まっすぐ硬い炭素ナノファイバーを代表する Mitsui-7 と NM-401 の高用量の反復注入が 90 日間ばく露後で遺伝子導入 MutaMouse の DNA 変異を誘発しない、ことを示した。DNA 鎖切断は、NM-401 へばく露された動物の肺でのみ観察され、Mitsui-7 ではされなかった。NM-401 で観測された DNA 鎖切断は、明確に線維化病変に局在化した、増加された p53 発現を伴い、DNA 損傷への線維組織の潜在的な脆弱性を示唆した。DNA の損傷も p53 の活性化も、NM-401 群において見られたのと同程度が Mitsui-7 へばく露マウス肺において観察されなかった。ただし、両 MWCNT は、肺において強く(robust)慢性的な炎症や線維化病変を誘発させた。もっと重要なことに、両 MWCNT が、発癌性形質転換の活性化だけでなく、癌の特徴と関連付けられる何百もの遺伝子の発現 - 細胞の恒常性の維持に関与する細胞プロセスにおける変化を誘発した。結果は、炎症と線維症に連付けられた DEGs のサブセットも癌にリンクしていることを示した。の誘導における DNA 修復に関連する細胞活動、細胞死カスケードの活性化および他の腫瘍性形質転換プロセスの研究を伴う、MWCNT の低用量への慢性ばく露を含むより多くの研究が、MWCNT のような有毒繊維の発癌可能性を完全に認識するために必要である。

No	MWCNT-2
論文題目 (和訳)	Systemic and immunotoxicity of pristine and PEGylated multi-walled carbon nanotubes in an intravenous 28 days repeated dose toxicity study (静脈内 28 日反復投与毒性研究における製造状態の及び PEG 化多層カーボンナノチューブの全身および免疫毒性)
著者 所属機関	Ting Zhang ¹⁻³ , Meng Tang ¹⁻³ , Shanshan Zhang ¹⁻³ , Yuanyuan Hu ¹⁻³ , Han Li ⁴ , Tao Zhang ⁴ , Yuying Xue ¹⁻³ , Yuepu Pu ¹⁻³ 1 Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, China; 2 Jiangsu key Laboratory for Biomaterials and Devices, Southeast University, Nanjing, China; 3 Collaborative Innovation Center of Suzhou Nano Science and Technology, Suzhou, China; 4 Department of Material Science and Engineering, National Key Laboratory of Solid State Microstructures, Nanjing University, Nanjing, China
書誌事項	International Journal of Nanomedicine 2017;12: 1539–1554
試験物質	・p-MWCNTs(製造されたままの状態の);Shenzhen Nano harbor Co.から入手(平均直径 10-20nm、長さ範囲 5-15µm、純度>95%)。 ・MWCNTs-PEG ;PEG 修飾は、ポリエチレン・グリコールを用いて、アシル化された COOH-MWCNTs のエステル化により導入。長さが合成中に 300-600nm まで短縮。 ・両タイプとも、内毒素汚染なし。
試料調整法	0.5% Tween-80 を含むリン酸塩緩衝液 (PBST) を用いて適切な濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 7 週齢雌 BALB/c マウス(Yangzhou University Comparative Medicine Center(揚州大学比較医学センター)により提供)。 ・投与方法・ 期間・試験用量: 28 日の間 1 週あたり 1 回静脈注射(尾部静脈)。一回の注射において、溶媒コントロール (PBST)、0.02mg/kg·bw、0.1mg/kg·bw、0.5mg/kg·bw の p-MWCNTs 、0.1mg/kg·bw の MWCNTs-PEG を投与。
試験結果	①肉眼評価と体重に対する影響(最後の注射後 7 日に殺処分): p-MWCNTs または MWCNTs-PEG のどちらかを用いた処理のための 28 日ばく露期間の間に毒性のための臨床兆候は無かった。体重分析は、処理群が用量関連変化において統計的に有意に異なっていなかった。 ②特定器官総括的観察 (gross observation) と器官係数に対する影響: マウスの総括的観察は、肥大した茶色っぽく着色された肺、脾臓および肝臓、および肥大した浮腫性および鬱血したリンパ節を明らかにした。MWCNTs は、主に、肺、肝臓、および脾臓中に沈着されている。p-MWCNTs 処理の最高用量群において、鼠蹊部リンパ節の肥大や鬱血肺の鬱血箇所、肝臓の鬱血性および浮腫性変化、または脾臓萎縮のようないくつかの所見が観察された。特定器官の総括的所見についての顕著な変化は、コントロール群のそれに比べて、p-MWCNT 群の高用量において観察された。肺、肝臓、脾臓および胸腺の器官重量/体重係数の増加が観察された一方、心臓、腎臓、脳、精巣、および精巣上体の器官重量/体重係数は、コントロール群に比べて、種々の用量群において、違いを全く示さなかった。p-MWCNTs の相対的な脾臓重量の有意な (P<0.05) 用量関連増加、及び 0.1mg/kg·bw MWCNTs-PEG によって処理された後の脾臓重量の有意な増加 (P、0.05) があった。 ③組織病理学: 静脈内注入 MWCNTs は、外因的な粒子とみなされるべきであり、それは免疫系によって認識された。マクロファージは食細胞のタイプであり、特に注入部位で、免疫系に微粒子の抗原の存在の警報を出す役割を果たす。従って、注入 MWCNTs が尾部静脈まわりのマクロファージによって飲み込まれたかどうかを組織化学の観察を通じて調査した。大量の p-MWCNTs 沈着が注入部位の尾部静脈において観察されて、多い細胞が注入 p-MWCNTs の飲み込みの 28 日後に黒くなった H&E 切片を示す。マクロファージが相対的に大きい細胞であり、微粒子を受入れてきたので、観察された黒い細胞は、主にマクロファージとして組織学的に区別できた。結果は、静脈内注入 p-MWCNTs がその場マクロファージによって迅速に飲み込まれることを示した。また、これは、マクロファージ細胞がそれらの食食機能を表すように活性化されたことを暗示した。組織病理学的な観察は、p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の高及び中間の用量の静脈内投与が病理学的変化を用量依存で引き起こすかもしれないことを示した。肺組織においていくつかの好中球浸潤および肺胞中隔肥厚が観察された。肝臓の組織病理学的写真は、肝小葉の構造破壊および類洞スペースのいくつかの損失を示した。p-MWCNT

群のマウスの肝臓は、主に最高 p-MWCNT 濃度の時に、肝細胞の穏やかな空胞変性、明らかな壊死細胞無し、および穏やかな類洞鬱血を示した。個々の肝細胞が見られ、それは少量の CNTs が間質細胞中で沈着することを示した。

要約すると、結果は、p-MWCNT 処理が、肺、肝臓、および注入部位の尾部静脈において異なる程度の病理学的損傷を起こすかもしれないことを示す。しかし、明らかな病理学変化は、MWCNTs-PEG-処理マウスの脾臓とリンパ節において発見されなかった。

④脾細胞の TEM 超微細構造画像:

コントロール群のマウス脾細胞は均等に分布された真正染色体を持つ丸い核を含んでいた。MWCNTs-PEG を用いて処理された脾臓マクロファージは目立って変化しなかった一方、0.5mg/kg-bw p-MWCNT 群からの脾臓マクロファージの超微構造は、脾細胞におけるミトコンドリア膨潤、不規則な形の核、クロマチン凝縮、および空胞化を示す、ことを観察した。さらに、TEM は高い電子密度として視覚化された脾臓マクロファージ中の p-MWCNTs 内在化を確認した。結果は、より高い用量 p-MWCNTs がマウスの脾細胞マクロファージ壊死を起こすかもしれないことを示唆した。

⑤血液学および臨床化学:

血液学パラメータの顕著な変化が MWCNTs の静脈内投与後に観察された。p-MWCNTs および MWCNTs-PEG はすべての処理群において WBC 数を大幅に減少させ、0.5mg/kg-bw p-MWCNT 群において最も大幅だった。コントロール群と比較される時、0.5mg/kg-bw 群における NEUT%と EOS%が大幅に減少された一方、LYM%と BASO%は、p-MWCNT 群において増加された(注:白血球数(WBC)、好中球パーセンテージ(NEUT%)、リンパ球パーセンテージ(LYM%)、好酸球パーセンテージ(EOS%)、好塩基球パーセンテージ(BASO%)。)

一般に、少ない変更が臨床化学パラメータにおいて観察された。ALP、ALT、および AST を含むいくつかの臨床化学パラメータは、用量関連影響を示した。増加された ALP、ALT、および AST は、肝損傷を暗示している。腎機能パラメータ(CREとBUN)は、如何なる用量群とコントロールの間でも大幅には違わなかった(注:アルカリホスファターゼ(ALP)、アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)、アスパラギン酸塩アミノトランスフェラーゼ(AST)、尿素窒素(BUN)、クレアチニン(CRE))。

⑥マウス末梢血中のリンパ球および Tリンパ球サブセット活性に対する MWCNTs の影響:

28 日間、MWCNTs の種々の用量での静脈内投与によって引き起こされたマウスにおけるリンパ球部分集団の変化は、表 5 中に示される。結果によると、0.5mg/kg-bw p-MWCNTs によって引き起こされた全 T(CD3+)および全 B(CD19+)と 0.1 及び 0.5mg/kg-bw によって起こされた CD4+T リンパ球は、コントロールのそれらに比べてかなり減少された。さらに、0.5mg/kg-bw 群の CD8+(CD4+/CD8+)に対する CD4+の比率は、コントロール群のそれよりかなり低かった。投与後の CD8+および NK(CD49+)細胞サブセットのための絶対細胞数に対して群間の統計的有意差はなかった。細胞数のこの増加は、脾臓の重量増加の原因であると考えられる。

⑦血清中の免疫グロブリン(Ig)生産:

全身免疫反応を評価するために、p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の投与後に IgM 及び IgG 抗体レベルが観察された。IgM 及び IgG は血液中に存在し、様々な病原菌と結合でき、凝集および固定化、補体活性化(古典経路)、及びそれらの毒素の中和を通じて、それらから身体を保護できる。コントロール群に比べて、IgM 及び IgG のかなり増加されたレベルが、0.1 及び 0.5mg/kg-bw の用量で、p-MWCNTs-処理マウスにおいて検出された。しかし、IgM 及び IgG 抗体レベルの同等の濃度は MWCNTs-PEG-処理マウスにおいて変化を示した。

⑧マウスの免疫機能に対する MWCNTs の影響:

プラーク形成細胞(PFC)分析と溶血テストは体液性免疫を評価するために一般的に用いられ、マイトゲン刺激脾細胞増殖は細胞免疫を検出するために一般的に用いられ、NK 細胞活性は非特異的な免疫反応を検出するために通常用いられた。28 日投与後、p-MWCNTs の高用量(0.5mg/kg-bw)は、ネガティブコントロール群と比較される時、PFC/106 脾細胞、HC50、ConA-誘発脾細胞増殖、およびリポ多糖体(LPS)-誘発脾細胞増殖のかなりの減少を引き起こした。MWCNTs-PEG 群において、HC50 および ConA-誘発脾細胞増殖は、ネガティブコントロール群に比べてわずかに減少したけれども、それは大幅ではなかった。4 群間で NK 細胞活性に明らかな違いがなかった。結果は、p-MWCNTs の高濃度が、マウスの体液性および細胞免疫機能に対して潜在的な影響があるかもしれないことを示唆する。

結論	MWCNTs の修飾の影響を調査するために、マウスにおける p-MWCNTs と MWCNTs-PEG の全身と免疫毒性を比較した。p-MWCNTs を用いて処理されたマウスは、脾臓、胸腺、および肺重量の増加と、変更された末梢血中のリンパ球数(CD3、CD4、CD8、CD19)と血清 IgM 及び IgG レベルを引き起こした。形態学的な結果は、肺及び肝臓の組織学的変化、注射部位での局所的な炎症反応、および脾臓マクロファージの超微構造変化を示す。特別な免疫機能結果は、p-MWCNTs が体液性および細胞の免疫機能を抑制し、羊赤血球と血清溶
----	--

血レベルに対する減少した免疫反応と関連することを示した。結果は、p-MWCNTs への *in vivo* ばく露が MWCNTs-PEG に比べて脾臓の異常調節を通じて全身性免疫へより多くの損害を起こしたことを示唆する。免疫毒性影響を理解することは生体適合性 CNTs の合理的なデザインをガイドするだけでなく、どのように全身性免疫毒性が引き起こされるのかに洞察を提供する。将来の研究は、CNTs のより良い生物学的適応性を開発するために、全身性免疫毒性だけでなく特別な免疫機能変化にも焦点を当てることにこの研究の結果を使用すべきである。

No	MWCNT-3
論文題目 (和訳)	Stromelysin-2 (MMP-10) facilitates clearance and moderates inflammation and cell death following lung exposure to long multiwalled carbon nanotubes (ストロメライシン-2 (MMP-10) は、長い多層カーボンナノチューブへの肺ばく露の後に続く、クリアランスを容易にし、炎症と細胞死を調節する)
著者 所属機関	Tyler C Vandivort ^{1,2} , Timothy P Birkland ¹ , Talita P Domiciano ³ , Somenath Mitra ⁴ , Terrance J Kavanagh ² , William C Parks ¹ 1 Cedars-Sinai Medical Center, Women's Guild Lung Institute, Los Angeles, CA 2 Department of Environmental and Occupational Health Sciences, University of Washington, Seattle, WA 3 Department of Pediatrics, Cedars-Sinai Medical Center, Los Angeles, CA 4 Department of Chemistry and Environmental Science, New Jersey Institute of Technology, Newark, NJ, USA
書誌事項	International Journal of Nanomedicine 2017;12 1019–1031
試験物質	MWCNT: Cheap Tubes, Inc. (Cambridgeport, VT, 米国) から購入され、NIEHS Centers for Nanotechnology Health Implications Research (NCNHIR) Consortium での参加を通じてワシントン大学の Nanotoxicology Center に提供された。 元素組成; 炭素 95.8%±0.6% (SD)、酸素 3.4%±0.2%、微量の Ni (0.5%±0.5%) と Fe (0.3%±0.3%)。
試料調整法	<i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> 研究用のチューブ調製は、0.6mg/mL マウス血清アルブミン、PBS の 10µg/mL 1, 2-dipalmitoylsn-グリセロ-3-ホスホコリンおよび 0.1%エタノール(v/v) から成る分散媒体(DM)中の懸濁物から成った。MWCNTs のストックアリコト(1.6µg/µL)は、使用前に超音波処理、攪拌。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: Mmp10 ^{-/-} マウス(MMP10 なし; C57BL/6J 遺伝的背景の)、および野生型の同腹子(雌雄、8-12 週齢) ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果中に記述。
試験結果	①MMP-10 の MWCNT-誘発発現: MWCNTs に対する肺の反応に対する MMP-10 のインパクトをはっきりさせるために、野生型 (Mmp10 ^{+/+}) および Mmp10 ^{-/-} マウスは 80µg の MWCNTs を用いて口腔咽頭吸引によって、または分散媒体(DM)の同等体積によって、処理された。MWCNT のこの用量は、他の研究において使われたばく露に基づいた。24 時間後、肺は収集され、mRNA 分離のために処理された。挑戦されない野生型マウス(すなわち、無 MWCNTs、無 DM)からの肺において、Mmp10 mRNA に対して、発現の無または非常に低いレベルを本質的に示している 36 から 37 までの Ct 範囲を検出した。Mmp10 の発現は DM だけの投与によって控え目に引き起こされ、処理手順が穏やかな肺損傷を起こしたことを示し、それは肺中への直接注入に関係する処理方法の間で共通である。しかし、MWCNTs へばく露される時、Mmp10 mRNA の発現は、DM-コントロールレベルより 3 倍以上上に刺激された。予期されるように、Mmp10 mRNA は Mmp10 ^{-/-} サンプルにおいて検出されなかった。 ②炎症細胞に対するインパクト: BAL 中の全細胞は、挑戦されない野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で異ならず、これらのほぼ全てはマクロファージだった。DM に対する応答で、BAL 中の全細胞は控え目に増加したが、遺伝子型の間でまだ大幅には異ならなかった。しかし、MWCNTs によって処理された時、全細胞数はコントロールと比較して減少され、Mmp10 ^{-/-} サンプルにおいてかなりより低かった。百分率細胞数は、遺伝子型及び処理の間のリンパ球のパーセンテージ又は全数における有意な差を明らかにしなかった。対照的に、野生型 BAL に比べて MWCNT-処理 Mmp10 ^{-/-} BAL 中の好中球のより高いパーセンテージだけでなく、マクロファージの減少されたパーセンテージおよび数を見付けた。しかし、MWCNTs によって上昇されたけれども、好中球の全数は、野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で大幅には異ならなかった。同様に、CXCL1/KC、ヒト CXCL8/IL-8 のマウスのオルソログをエンコードする Cxcl1 および重要な急性フェーズ好中球ケモカインの発現レベルを試験した。好中球の推定値と一致して、MWCNT 処理が増加された Cxcl1 発現を刺激したこと、及びこの増加が Mmp10 ^{-/-} マウスにおいてより大きいことへの穏やかな傾向だけを示した。減らされたケモカイン発現が Mmp10 ^{-/-} マウスにおける低下されたマクロファージ数に寄与したかどうか、評価した。Cxcl1 と同様に、Ccl2 レベルは、MWCNT 処理によってかなり増加したけれども、野生型と Mmp10 ^{-/-} マウスの間で違わなかった。これらの調査結果は、MWCNT-処理 Mmp10 ^{-/-} マウスにおける減少されたマクロファージ数が、正常に機能しない動員よりもむしろ、細胞の損失に起因していたことを示唆する。 全体的に、これらの調査結果は、MWCNT が、好中球数の増加およびマクロファージの減少の両方によって現わされた炎症促進反応を仲介したことを示す。Mmp10 ^{-/-} マウスにおいてこれ

らの観察の両方が誇張された一方、マクロファージの減少だけが統計的に有意であった。

③MWCNTs は炎症促進因子の生産を引き起こす:

多くのグループは、MWCNT が、肺中への注入の後に続く頑強な炎症促進反応 (Il1b、Il6、Tnfa、および Nos2 mRNA を含む) を引き起こすことを証明した。それ故、野生型及び Mmp10^{-/-}マウスの肺においてこれらの mRNA のそれぞれを評価した。MWCNT-処理マウスにおいて Il6 と Nos2 のための mRNA レベルが増大し、それらのレベルが野生型と Mmp10^{-/-}マウスの間で異なることを見付けた。Il1b の発現が全肺 RNA において増加傾向であったけれども、増加は有意に達しなかった。Tnfa と mRNA レベルは影響されなかった。これらの観察と一致して、肺出血または全 BAL たんぱく質、急性肺損傷の両マーカー、遺伝子型の間で違いを観察しなかった。細胞数での最も突出した応答は、マクロファージ数の減少であるとすれば、全肺転写産物がマクロファージにおいて潜在的な炎症促進表現型をマスキングしているかもしれないと仮定した。従って、観察された MWCNTs に対する *in vivo* 応答がマクロファージに帰され得るかどうかを評価するために、野生型および Mmp10^{-/-}マウスからの脊髄由来マクロファージ (BMDM) を使用した。全 *in vitro* 実験において、可能な内毒素汚染のためにコントロールに 10 μ g/mL の PmB を加えた。*in vivo* で観察したものを反映させて、MWCNTs の 10-100 μ g/mL を用いた 2 時間の BMDM の処理は、DM コントロールに比べて Mmp10 mRNA の統計的に有意な増加を結果として生じさせた。さらに、MWCNT が、野生型細胞中での Il1b、Il6、Il12a、および Tnfa のための mRNA の発現を刺激し、これらの値が Mmp10^{-/-} BMDMs においてさらに高められたことを見付けた。野生型マクロファージからの IL-18 たんぱく質の放出は、また、MWCNTs によって—しかし DM によってではなく—引き起こされ、Mmp10^{-/-}マクロファージからかなり増加された。

④MMP-10 は MWCNTs のクリアランスを容易にする:

マクロファージは吸入された粒子のクリアにとって重要なので、私達は、Mmp10^{-/-}マウスにおけるマクロファージの減少された数が MWCNTs の保持に影響を与えるかどうかを評価した。実験に、肺ホモジネートにおいて、野生型サンプルに比べて Mmp10^{-/-}溶解産物ペレットにおいてより多くの MWCNT 粒子を観察し、遺伝子型の間でのこの違いはポストばく露 28 日で (at 28 d postexposure) 明らかであり続けた。

他のグループは、吸入された MWCNTs がポストばく露 1 年 (1 year postexposure) までの間、肺中に残留することを見付けた。さらに、Mmp10^{-/-}肺切片において、肺胞マクロファージ中での粒子の蓄積を観察した。

内部カウント (internal counts) と盲目形態計測分析の両方によって、有意により多い (約 2.5 倍) 残存粒子および野生型組織に比べて Mmp10^{-/-}肺中の MWCNT によって占められた全組織のより大きいパーセンテージを測定した。DM-コントロール肺において粒子シグナルは見えなかったか、検出されなかった。肺中の残存粒子の全体的増加にもかかわらず、野生型と Mmp10^{-/-}サンプルの間での MWCNT-含有マクロファージのパーセンテージ、またはエンドサイトーシス空胞中の平均 MWCNT-占領領域のどちらかにおける差も見付けなかった。しかし、両方の遺伝子型において、マクロファージ数と MWCNT-ポジティブマクロファージのパーセンテージの間の逆関係を見付けたが、このネガティブな相関関係は Mmp10^{-/-}サンプルにおいてより頑強だった。これらのデータは、MMP-10 が、マクロファージ細胞死からの保護と MWCNT ばく露後肺から粒子クリアランスを仲介することに関与していることを示唆する。

⑤MMP-10 はマクロファージにおける MWCNT 仲介アポトーシスに対して保護する:

居住マクロファージ数が挑戦されない野生型と Mmp10^{-/-}マウスの間で異ならなかった。Mmp10^{-/-}マウスにおいて観察されたマクロファージの減少がこれらの細胞の MWCNT-誘発アポトーシスに起因していたかどうかを評価した。肺溶解産物における、MWCNT-誘発セル死の設立されたエンドポイントであるカスパーゼ-3 活性は、MWCNT ばく露によって影響されず、野生型および Mmp10^{-/-}マウスの間で異ならなかった。しかし、野生型サンプルにおいて測定されたレベルに比べて、MWCNT-処理 Mmp10^{-/-}マウスからの BAL におけるカスパーゼ-3 活性の約 2 倍の増大を見た。マクロファージが Mmp10^{-/-} BAL の細胞フラクションにおけるカスパーゼ-3 活性の頑強な増加の原因であるかどうかを評価した。*in vivo* 調査結果と一致して、MWCNT-ポジティブマクロファージ数が野生型および Mmp10^{-/-}の間で異なる一方、MWCNTs が Mmp10^{-/-} BMDM におけるカスパーゼ-3 活性のかなりより大きい増加を仲介したことを見付けた。これらのデータは、MMP-10 が、MWCNT-誘発アポトーシスからマクロファージを保護することを示唆する。肺—または任意の組織—中へ流入するマクロファージが現住集団とは別のものである、野生型及び Mmp10^{-/-}肺胞マクロファージが、動員された細胞集団をモデルする BMDM がするように、MWCNT ばく露に対して同様に反応するかどうか評価した。BMDM を用いて見たように、Mmp10 の発現は、MWCNT へばく露された野生型肺胞マクロファージにおいてかなり上向き調節された。さらに、野生型および Mmp10^{-/-}肺胞マクロファージからの IL-18 の著しい放出を見た。それは、BMDM を用いて見た応答と同様に、Mmp10^{-/-}セルからより大きい傾向であった。さらに、MWCNTs が野生型肺胞マクロファージにおけるカスパーゼ-3 活性に影響しなかった一方、それらが Mmp10^{-/-}細胞においてほぼ 3 倍の増加を仲介することを見付けた。これらのデータは、居住肺胞マクロファージと浸入マクロファ

	<p>ジの両方が MWCNT に対して同様に応答し、Mmp-10 が、MWCNT-誘発マクロファージアポトーシスを仲介することによって、両集団において保護的役割を持っているという結論を支持する。</p>
<p>結論</p>	<p>マクロファージは、MWCNT ばく露に対する重要な応答者であり、他の <i>in vivo</i> 及び <i>in vitro</i> 研究と一致している発見物である。その上、私達のグループおよび他は、Mmp10 がマクロファージ反応の重要な決定因子であり、緑膿菌を持つ急性大腸傷害、皮膚創傷、および肺感染のモデルにおける区別ステータス(differentiation status)であることを示した。とりわけ、皮膚創傷および肺感染のモデルの両方において、Mmp10-/-マウス中への野生型マクロファージの養子免疫伝達は、Mmp10-/-動物において観察された主要な表現型(皮膚創傷における余分な傷跡;肺感染における罹患率)を救うのに十分であった。この反応の根底にある正確なメカニズムが未知である(すなわち、基質 MMP-10 は、マクロファージ機能をコントロールするために作用する)一方、これらの研究すべては、Mmp-10 が傷つけられた組織中でのマクロファージ活性化の重要な変更者であると結論付けた。本研究において、私達は、MWCNT ばく露への急性反応におけるマクロファージ Mmp-10 が果たす役割を報告することによってこれらの観察を拡張する。さらに、私達の調査結果は、MWCNT ばく露への影響反応における MMP-10 の長期のインパクトに疑問を投げ掛ける。</p>

No	MWCNT-4
論文題目 (和訳)	Thrombospondin-1 and microRNA-1 expression in response to multiwalled carbon nanotubes in alveolar epithelial cells (肺胞上皮細胞における多層カーボンナノチューブへの応答としてのトロンボスポンジン-1 と microRNA-1 の発現)
著者 所属機関	M. Pacurari ^{1,2} , R. Kafoury ^{1,2} , T. Turner ¹ , S. Taylor ¹ , P. B. Tchounwou ^{1,2} 1 Department of Biology, College of Science, Engineering, and Technology, Jackson State University 2 NIH/NIMHD RCM! Center for Environmental Health, College of Science, Engineering, and Technology, Jackson State University
書誌事項	Environmental Toxicology. 2017; 32: 1596–1606
試験物質	MWCNT: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO) から購入。
試料調整法	Ca ²⁺ /Mg ²⁺ フリーリン酸緩衝生理食塩水(PBS)、pH7.4 中で MWCNT ストック(2mg/mL) は調製。分散液は超音波処理(定期的)、4°C 保持、2-3 週以内に使用。使用直前に再超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 肺胞上皮 A549 細胞 (American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA) から入手)。 ・投与方法・期間・試験用量: 50 μ L 分散媒体 (DM) の口腔咽頭吸引または 80 μ g の MWCNTs を含む等体積によって処理。詳細は、試験結果中に記載。
試験結果	①Mir-1 標的遺伝子の識別: 潜在的 miR-1 標的遺伝子を識別するために、肺線維症および改造 (remodeling) 関連遺伝子が、miR-1 のための予測された標的であるかどうかを決定するために TargetScan 及び microRNA.org エンジンを使用した。TargetScan は 2456 個の潜在的標的遺伝子を識別し、microRNA.org は miR-1 のための 7204 個の潜在的標的遺伝子を識別し、Co13A1, Co113A1, Co119A1, TGIF1, Adams 9, 及び TSP-1 のような線維症及び細胞外マトリックス (ECM) 改造遺伝子を含んでいた。microRNA.org データベース中で検索質問として Thrombospondin-1 (TSP-1) を使い、TSP-1 が -1.1233 の全標的 miR-1 サイトのための結合された mirSVR スコアを持つ 3 つの miR-1 結合サイトを含むことが見付かった。mirSVR スコアは、6-mer またはより良好な種サイト (seed site)、または、mirSVR スコア ≤ -0.1 を持つ mRNA 中の miRNA のための標的サイトに関する回帰分析に基づく、miRNA による mRNA の下向き調節の可能性を表している。 ②TSP-1 に対する MWCNT の影響: TSP-1 mRNA は、処理 6 時間後に MWCNT の 20 μ g/mL によって大幅な増加はなく、対コントロールで 1.13 倍の変化だった一方、50 μ g/mL は、対コントロールで 2.25 倍まで TSP-1 mRNA を大幅に増大させた。24 時間後に 20 及び 50 μ g/mL の両方の用量で、MWCNT は対コントロールでそれぞれ 2.59 及び 2.28 倍 TSP-1 mRNA を大幅に増加させた。MWCNT 処理の後に続く TSP-1 の免疫組織化学分析は、コントロールサンプルに比べて、MWCNT-処理サンプルにおける TSP-1 の強い免疫検出 (緑色) を明らかにした。免疫組織化学分析は、特に 50 μ g/mL MWCNT を用いた処理の 6 時間後に、細胞周囲で強い TSP-1 検出を示した。Western blot 分析は、コントロールに比べて、50 μ g/mL MWCNT を用いた後に続く 6 時間及び両用量を用いた処理の 24 時間後に TSP-1 タンパク質レベルの増加を示した。 ③MiR-1 に対する MWCNT の影響: MWCNT 処理の後に続く肺胞上皮 A549 細胞における miR-1 の分析は、コントロールと比較して、miR-1 発現の大幅な抑制を明らかにした。MWCNT は用量依存的に miR-1 発現を抑制した。20 μ g/mL での MWCNT は、処理の 24 時間後、miR-1 レベル発現を 75% まで抑制した一方、コントロールと比較して、20 μ g/mL での処理の 24 時間後 miR-1 発現は 60% まで抑制されただけだった。50 μ g/mL での MWCNT は、処理 6 時間後 miR-1 を 80% まで抑制した一方、処理の 24 時間後、miR-1 はほとんど検知できなかった。TSP-1 が、miR-1 の予測された標的であると分かったので、TSP-1 の発現レベルと miR-1 の間の相関関係分析を実行した。ピアソン相関関係分析は、 $r = -0.58$ を持つ miR-1 と TSP-1 mRNA の間の強い逆関係を見つけた。 ④細胞移動に対する MWCNT の影響: さらに、処理 24 時間後、創傷治癒への細胞移動に対する MWCNT の用量依存影響を分析した。20 または 50 μ g/mL での MWCNT は、創傷治癒への弱い細胞移動を刺激した。20 及び 50 μ g/mL での MWCNT は、対コントロールで 1.67 及び 1.49 倍まで細胞移動を刺激した。既に、48 時間後に 20 μ g/mL MWCNT に応答したより高い細胞移動を示してお

	<p>り、これらの結果は、MWCNT-誘発細胞移動が、時間的に、空間的に調節されたプロセスである複雑なプロセスであることを示唆する。</p> <p>⑤細胞形態学に対する異所性 miR-1 の影響： 細胞形態学に対する miR-1 の一時的な発現または抑制の影響は、miR-1 模倣体または miR-1 抑制剤を用いて細胞にトランスフェクト(導入)することによって分析された。異所性 miR-1 模倣体は、引き起こされたセル形態学が、細胞が互いに接触することを伴う細胞クラスタリングのような細胞形態学変化を引き起こした。対照的に、異所性 miR-1 抑制剤は、細胞が互いに別れているより少ない細胞と細胞の接触を引き起こし、細胞周囲突起を持つ引き延ばされた形態学を示した。</p> <p>⑥分子ネットワーク解析： TSP-1 とその相互作用たんぱく質に関連する分子ネットワーク相互作用は、IntAct を使って検索された。分子ネットワークマップは、TSP-1 が、他の 16 遺伝子、4 多糖類、および 2 分子 (ssRNA_AG 及び Q9WMX2-pro_0000037551 (その機能が未知である)) と相互作用したことを示す。TSP-1 と相互作用している 16 遺伝子の間で、TGFβ、コラーゲンタイプ (Col 1A1 およびそのパラログ Col3A1、Col 11A1、Col VI)、FN1、BGN、TGM2、及び TUBB5 を識別した。識別された 16 遺伝子の大多数は ECM のコンポーネントであり、小道結合 ECM 組織、コラーゲン合成、細胞粘着、および細胞間通信、および TGFβ シグナリング経路と関連するシグナリング経路に関与している。識別された多糖類は、ヘパラン硫酸塩、コンドロイチン硫酸塩、及び既知のコンポーネント 細胞表面上と ECM 中で見付けられるプロテオグリカンの既知コンポーネントであるデルマタン硫酸塩を含んでいる。さらに、また、TSP-1 は既知の抗凝血因子であるヘパリンと相互作用したが、ヘパリンの正確な生理学的役割は完全には知られているわけではなく、いくつかの研究は、ヘパリンが ECM 内の FN の触媒活性化において役割を果たしているかもしれないことを示唆している。</p>
結論	<p>この研究の結果は、MWCNT-誘発 ECMリモデリングにおける TSP-1 の役割を示す。また、それらは MWCNT が肺胞上皮細胞中の miR-1 の発現を変更することを示す。研究は、TSP-1 が TGFβ を活性化させ、それゆえ線維症において役割を果たすことを示した。本結果は、miR-1 と TGFβ シグナリングの間の関係も示し、従って、肺 ECM リモデリングと線維症の MWCNT 変調への応答における miR-1 と TSP-1 の役割を示唆する。以前に出版された研究からの調査結果とともに、得られたこれらの結果は、miR-1、TSP-1、および TGFβ を通じての MWCNT-誘発肺リモデリングと線維症のための可能なメカニズムを示唆する。我々は、MWCNT が ROS の形成を引き起こし、NF-KB を活性化し、MMP-9 と MMP-12 の発現を増加させることを既に報告している。本研究を用いて我々の以前に公表した研究を裏付けて、MWCNT-誘発の肺 ECMリモデリングおよび線維症は、TSP-1 の増加された発現、および細胞膜へのその局在化を含む多くのステップに関与する。平行して、また、MWCNT は TGFβ の発現を引き起こし、それは TSP-1 と TGFβ のそれに続く活性化によって活性化される。活性化された TGFβ は、下流に信号で伝えて、Col3A1 の合成、および ECMリモデリングと肺線維症と関連した遺伝子の発現を引き起こす。</p>

(3) グラフェン

No	Graphen-1
論文題目 (和訳)	Toxicity studies of six types of carbon nanoparticles in a chicken-embryo model. (6種類のカーボンナノ粒子の鶏胎児による毒性研究)
著者 所属機関	Kurantowicz N, Sawosz E, Halik G, Strojny B, Hotowy A, Grodzik M, Piast R, Pasanphan W, Chwalibog A. Department of Animal Nutrition and Biotechnology, Warsaw University of Life Sciences
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Apr 7;12:2887-2898. doi: 10.2147/IJN.S131960. eCollection 2017.
試験物質	<ol style="list-style-type: none"> ダイヤモンドナノ粒子 (DNPs); 球状、3-4nm、デトネーション法で製造、純度>95%、比表面積 282m²/g; ζ;-21.4mV、表面化学結合; -O-H, -C=O, -C-N, -C-O-C, -COOH 黒鉛ナノ粒子 (GNPs); 球状、3-4nm、爆発法で製造、純度>93%、比表面積 540-650m²/g; ζ;35.57mV、表面化学結合; -O-H, -C-O, -C-O-C, -C=C グラフェンナノ粒子 (pG); 不規則形状、厚さ 1-5nm、平均フレーク径 4μm、天然黒鉛の液相剥離法で製造、純度>99.5%、比表面積; 120-150m²/g、ζ; 4.15mV、表面化学結合; -O-H, -C=C, -C=O, 酸化グラフェン(小) (sGO); 不規則形状、8-25nm、天然黒鉛片から修正 Hummers 法で作成、ζ;-4.49mV、表面化学結合; -O-H, -C=C, -C=O, -C-O 酸化グラフェン(大) (lGO); 膜状、1.27μm、天然黒鉛片から修正 Hummers 法で作成、ζ; -16.73mV、表面化学結合; -O-H, C=C, -C-O-C, C-O 還元酸化グラフェン (rGO); 不規則形状、2.53μm、50mg の lGO の水分散液から作成、ζ; -20.93mV、表面化学結合; -O-H, C=C, -C-O-C, C-O <p>1-3 は SkySpring Nanomaterials (Houston, TX, USA) から購入 4-5 は Institute of Electronic Materials Technology, Warsaw, Poland で作成</p>
試料調整法	水中に WFI; Aqua Pro injection; Polpharma, Starogard Gdański, Poland) で射出し、500μg/ml とし、超音波浴中で1時間保持 (550W/m ²)
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> 透過電顕、ζ ポテンシャル測定、FTIR 測定 (表面化学結合) で各粒子をキャラクタライズした。 鶏胎毒性試験; 鶏卵のアルブミン中に 500μg/ml の CNPs を 0.3ml 注入する。37°C、湿度 70% でインキュベート。5、10、15、20 日後胎仔の成長度合いを調査。 血液検査; 5μL 採取し、赤血球のモルフォロジー調査及び血清の生化学分析を実施。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> キャラクタリゼーションの結果は、上記「試験物質」の項に掲載した。 鶏胎毒性; 生存率; DNPs は何も CNPs を混入しない場合と変わらず。それとの相対的な生存率は、rGO が 95%、pG が 92.5%、GNPs が 89%、sGO は 87.5%、lGO は 80% であり、毒性は moderate と言える。 胎仔重量に統計的にグループ差はなかった。肝臓、脳、心臓、腎臓、脾臓の重量も同様。 全グループにおいて赤血球に炎症はなく、形状等に変化は見られなかった。 血清の生化学試験; AST、ALT、ALP、グルコース、クレアチニン、尿素窒素、全蛋白、アルブミン、LDH、トリグリセリドに各物質間に有意な変化はなかった。 肝臓溶解物中マロンアルデヒド (MDA) 濃度 (脂質酸化による損傷の指標) も同様であった。
結論	カーボンナノ粒子は、大きな副作用なしに血液循環に留まり、薬物送達のための媒体または活性化化合物それ自体としての潜在的な適用性を示唆している。しかしながら、それらの特性についてさらに検討する必要がある、これらの特性は製造方法および表面機能化によって異なる。

No	Graphen-2
論文題目 (和訳)	Graphene and carbon nanotubes activate different cell surface receptors on macrophages before and after deactivation of endotoxins エンドトキシン(内毒素)の不活性化の前後で、グラフェンとカーボンナノチューブはマクロファージ上の異なる細胞表面レセプターを活性化させる。
著者 所属機関	Mohamed H. Lahiani ^{a,†} , Kuppan Gokulan ^{a*} , Katherine Williams ^a , Mariya V. Khodakovskaya ^{b,c} and Sangeeta Khare ^{a*} *Correspondence to: Kuppan Gokulan and Sangeeta Khare, Division of Microbiology, National Center for Toxicological Research, US-FDA, 3900 NCTR Rd, Jefferson, AR, 72079, USA. E-mail: kuppan.gokulan@fda.hhs.gov; sangeeta.khare@fda.hhs.gov † Authors contributed equally to the study. a Division of Microbiology National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, Jefferson, AR, 72079, USA b Department of Biology, University of Arkansas at Little Rock, Little Rock, AR, 72204, USA c Institute of Biology and Soil Sciences, Vladivostok, Russian Federation, 690024
書誌事項	J. Appl. Toxicol. 2017; 37: 1305-1316
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・元状態グラフェン: the NanoCore facility at the National Center for Toxicological Research (NCTR) in Jefferson, AR, USA から供給。 ・グラフェン平板 (< 3 層; 横方向の寸法 1-2 μm): Cheap Tubes (Brattleboro, VT, USA) から購入。 ・長 MWCNT [MWCNT-COOH-ロング(外径 13-18nm; 長さ 1-12μm)]、短 MWCNT [MWCNT-COOH-ショート (外径 < 7nm; 長さ 0.5-2 μm)]: US Research Nanomaterials Inc (Houston, TX, USA) から購入。 ・ヘリカル炭素ナノチューブ [ヘリカル MWent (外径 100-200 nm; 長さ 1-10 μm)]: ・単層炭素ナノホーン (SWCNHs): Dr Puretzky from Oak Ridge National Laboratory から提供。 ・活性炭: Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA) から購入。 <p>*キャラクターゼーション結果は、別途論文または既存公開と説明されているのみ。 このうち、ばく露試験には、元状態グラフェン、長 MWCNT の 2 つを使用。共に、オートクレーブ処理(AU-)で、汚染エンドトキシン濃度レベルを下げている(不活性化)ものと、オートクレーブ未処理品の 2 種類を使用。</p>
試料調整法	すべて 炭素系ナノマテリアル(CBNs) は水中に懸濁され、15 分間超音波処理。超音波処理後、ウシ血清アルブミン (BSA) は 0.05% の最終的濃度を達成するためにこれらの懸濁液に添加。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物: J774 マウスのマクロファージ細胞 (TIB-67; ATCC, Manassas, VA, USA)</p> <p>投与方法・期間・試験用量: <i>in vitro</i>. 1, 20μg/ml. 48 時間培養(1, 3, 48 時間ポストインキュベーションで、培養上澄液除去)。 コントロールは、未処理(0μg/ml)及び精製エンドトキシン(1, 2 EU/ml)と培養。</p>
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・食食: マクロファージは、オートクレーブ処理材料よりも非処理材料と培養された時、より多くの NM sを取り込んだ(撮像)。CBNs は液胞に局在し、これは非処理(NA)グラフェンに比べて NA-MWCNT で最も明白。 ・細胞毒性(LDH 活性を評価): pyrogenated と depyrogenated (外因性発熱物質(パイロジェン)除去) CBNs の両方は 1, 3h 時点で細胞毒性を引き起こすことができないことを示した。対照的に、24, 48 h 培養されたマクロファージは 1, 3 h 培養やコントロールの細胞と比較して有意に高い細胞毒性があり、24 h と比較して 48 h がはるかに高いことを示した。Pyrogenated CBNs (グラフェンと異なる MWCNTs) はより多くの LDH を生成し一般的に大きい細胞毒性を示した。この同様なパターンは、1 と 20μg/ml の濃度の両方で観察され、グラフェンと MWCNTs の両方で観察された。主な違いは、1μg/ml 濃度の pyrogenated または非オートクレーブ処理 MWCNT が 20μg/ml と比較して有意に高い LDH を生成するようマクロファージを誘導したことである。 ・遺伝子発現解析(免疫毒性評価)(細胞から、RNA 分離、cDNA 生成、遺伝子発現評価は Antibacterial Response PCR Arrays (SA Biosciences/ Qiagen, Valencia, CA, USA) in an Applied Biosystems 7500 DNA Sequence Detection System を使用。):

	<p>遺伝子発現データ（図 5）から生成したヒートマップは、グラフェン又は MWCNTs 介在活性化の間の遺伝子発現の分離があっただけでなく、CBNs を介した遺伝子発現のパターンはオートクレーブ処理と非処理のグループに分離したことを示した。</p> <p>全体的に見て、遺伝子発現パターンは、バクテリアエンドトキシン（ポジコン）、グラフェン、MWCNTs を用いて処理されたマクロファージにおいて、遺伝子発現の異なるパターンがあったことを明示した。また、下流のシグナル分子/エフェクター分子だけでなく、病原体認識レセプターの発現差異があった。</p>
<p>結論</p>	<p>研究者は、depyrogenated NMs が免疫学的アプローチを含む研究のために使用されることを確保するように注意すべきである。また、科学者は、エンドトキシンや製造条件のための材料試験を記述する対応するデータなしでの、健康への CBNs の悪化影響に関する結果やレポートを解釈することに慎重であるべきである。</p>

No	Graphen-3
論文題目 (和訳)	Graphene oxide nanosheets induce DNA damage and activate the base excision repair (BER) signaling pathway both <i>in vitro</i> and <i>in vivo</i> (酸化グラフェンナノシートは、DNA損傷を誘発し、 <i>in vitro</i> および <i>in vivo</i> の両方で塩基除去修復(BER)シグナル伝達経路を活性化する)
著者 所属機関	Chun-Jiao Lu ^a , Xue-Feng Jiang ^a , Muhammad Junaid ^{a, b} , Yan-Bo Ma ^a , Pan-Pan Jia ^{a, b} , Hua-Bin Wang ^a , De-Sheng Pei ^a a) Chongqing Institute of Green and Intelligent Technology, Chinese Academy of Sciences, Chongqing, 400714, China b) University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China
書誌事項	Chemosphere 184 (2017) 795e805
試験物質	酸化グラフェンナノシート(GO):GO シートは、雲母表面上に、約 1.5nm の高さで良好に分散、単一の GO 層の高さと一致。横方向サイズは約 1.5 μ m。
試料調整法	GO の調整:GO 粉末(Sigma-Aldrich)を超純水に懸濁、50 分間超音波処理、1g/L ストック溶液を調整。その後、実験ごとの濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物:生後 3 か月の野生型ゼブラフィッシュ(Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences)</p> <p>GO の AFM 特徴づけ:Dimension Edge Instrument を用いて室温で実施。トッピングされたシリコンカンチレバーを用いて、公称スプリング定数 40N/m および公称プローブ曲率半径 10nm を用いて空气中で GO を特徴づけるために、最適化された操作パラメータを用いたタッピングモード AFM を使用。</p> <p>細胞培養、GO ばく露および細胞生存率測定:10%ウシ胎仔血清(FBS)と 1%ペニシリンストレプトマイシン溶液を補充した RPMI 培地 1640 中で HEK293T 細胞を、空气中 5%CO₂ の雰囲気に加湿インキュベーター内で 37°C で培養。GO ばく露のために、細胞をウェルプレート(約 2.4x10⁵ 細胞/ウェル、3mL/ウェル)に播種、37°C で 12 時間培養。次いで、異なる濃度の GO (0,5,25,50mg/mL)含有培地に細胞をばく露。各処理を 3 回繰返し、全細胞を 37°C で 24 時間培養。GO へのばく露後の HEK293T 細胞の生存率を調べるために、CCK-8 アッセイを使用。細胞をウェルプレートに播種(約 1x10⁵ 細胞/ウェル、100mL /ウェル)、37°C で 12 時間培養。上清を除去、細胞を PBS で 2 回洗浄。その後、ブランク培地(対照群)および異なる濃度の GO(試験群)含有培地を添加。各処理を 6 回繰返し、5%CO₂ 雰囲気に加湿インキュベーター内で 37°C で 24 時間培養。CCK-8 溶液を添加、波長 450nm のマイクロプレートリーダーで 4 時間後に吸光度測定。</p> <p>コメットアッセイ:DNA 損傷をアルカリコメットアッセイにより測定。</p> <p>AFM を用いた細胞への機械的作用の影響:力の曲線は、PBS 緩衝液中の接触モードを有する寸法辺縁器具を使用。校正後、力曲線を 1mm/s の速度で記録。少なくとも 10 個の力曲線を各細胞について集め、3 回の独立した実験から 30 個以上の細胞を測定。力曲線の生データは、Igor Pro に基づく自己書き込み手順を用いて、力-距離曲線に変換。得られた力-距離曲線に基づいて細胞の変形を評価し、P =粘性変形/(粘性変形+弾性変形)に従って計算した粘性係数(P)を用いて定量。全ての計算は、Matlab に基づく自己記述手順を使用して実施。</p> <p>ゼブラフィッシュの繁殖と GO ナノシートへのばく露:ゼブラフィッシュを明暗 14 時間:10 時間で自動水循環システムに入れ、1 日 3 回、フラインシュリップを摂餌。正常な成体ゼブラフィッシュ雄 2 匹、雌 1 匹を選定し、1 晩タンク内で産卵させた。産卵後、胞胚期の 150 個の胚を同定、ペトリ皿に移し、異なる濃度の GO (0,5,25,50mg/mL)含有培地にばく露。各処理は 28±5°C の照明光インキュベーター内で独立して 3 回繰返し実施。72 hpf(受精後数時間)における生存率および孵化率は、以下の式を用いて計算;</p> <p>・生存率/孵化率 = (生存数/孵化胚) / 全胚 × 100 ··· (1)</p> <p>HEK293T 細胞とゼブラフィッシュ胚における遺伝子発現プロファイリング:GO に 24 時間ばく露後、RNAiso Plus 試薬を用いて、ウェルプレート(約 2.4x10⁵ 細胞/ウェル、3mL/ウェル)から HEK293T 細胞の全 RNA を抽出。cDNA の合成は、Primer Script RT 試薬キットを用いて実施。qRT-PCR は、ABI 7300 システム上の SYBR Green RCR Kit を用いて実施。選択された遺伝子プライマー及び配列を表 1 に列挙。ハウスキープ遺伝子 β-アクチンを内部対照として選択。全サンプルを 3 回繰返し実施。遺伝子発現レベルは、2^{-$\Delta\Delta$CT}法を用いて β-アクチンに対して標準化。ゼブラフィッシュの胚をペトリ皿で培養、GO に 24 時間ばく露。各処理を 3 回繰返し実</p>

	<p>施。全 RNA を 30 個の均質化ゼブラフィッシュ胚から抽出。HEK293T 細胞と同じプロトコールに従って、qRT-PCR のために cDNA を合成。</p>
<p>試験結果</p>	<p>HEK293T 細胞において GO により誘導される細胞毒性と DNA 損傷: CCK-8 アッセイを用いて細胞生存率を測定。GO (5,25,50mg/mL) で 24 時間処理した HEK293T 細胞の細胞生存率は 87.7% から 75% に低下 ($p < 0.01$)。GO ばく露後、HEK293T 細胞の形態変化は、対照群と比較して、GO ばく露群では細胞が変形し、GO ばく露濃度の増加に伴って細胞の異常形態が増加した (図 3A)。細胞生存率は、GO 濃度の増加とともに減少 (図 3B)、GO の細胞毒性が用量依存的であることが実証された。コメットアッセイの結果 (図 4A、4B) から、GO ばく露が HEK293T 細胞における DNA 損傷を誘導したことを示した。対照群と比較して、GO (5,25,50mg/mL) に 24 時間ばく露後の尾部 DNA 百分率、尾の長さ、尾のモーメント、オリブの尾のモーメントに有意差が観察された。</p> <p>GO ばく露後の HEK293T 細胞の生物物理的特性: 異なる GO ばく露濃度での HEK293T 細胞の変形を特徴付けるために、AFM 機械的技術を用いた。計算された粘性係数をヒストグラムにプロットし、ガウス関数に適合させた (図 5)。対照 (0.73) と比較して、GO ばく露後の細胞の粘度因子は用量依存的に減少 (5mg/mL については 0.53、25mg/mL は 0.52、0.5mg/mL は 0.52)、GO ばく露が細胞構造における変形を誘導することを示した。</p> <p>GO にばく露されたゼブラフィッシュ胚の生存率と孵化率: 12,24,48,72 時間の異なる濃度の GO (0,5,25,50mg / mL) へのばく露後のゼブラフィッシュ胚の生存率 (表 3) は、すべての GO ばく露濃度で 12-24 時間のばく露時間の増加とともに有意に減少。しかし、生存率は、ばく露時間 48 時間、72 時間で一定であった。異なる GO 濃度に 72 時間ばく露後、対照群と比較して孵化率は 5mg/mL からわずかに減少、その後はより高濃度 (25,50mg/mL) でわずかに増加したが、その差は有意ではなかった ($p > 0.05$) (表 3)。</p> <p>GO ばく露は BER 経路の遺伝子発現レベルを妨げた: HEK293T 細胞では、より低い GO 濃度 (5mg/mL) では、標的遺伝子の発現レベルに有意な変化を誘導することができなかった。対照群 (図 6A) と比較して、CREB1 (サイクリック AMP 応答要素結合タンパク質) は、それぞれ GO 25、50mg/mL で 1.73 倍、1.8 倍に有意に上方調節された。APEX、OGG1、UNG もまた、それぞれ 50mg/mL で 1.38 倍、1.2 倍、1.57 倍にわずかに上方調節された (図 6A)。POLB 発現は、異なるばく露濃度で対照と比較して、有意ではなかった ($p > 0.05$) (図 6A)。DNA 損傷パラメータと BER 経路遺伝子発現との間に有意な正の相関があることを確認した (表 4)。DNA 損傷パラメータと他の 2 つの BER 経路調査遺伝子 (APEX1、POLB) 間に相関が存在したが、相関係数は有意ではなかった ($p > 0.05$)。DNA 損傷を遺伝子発現の予測因子として使用すると、$OGG1 (0.965) > UNG (0.962) > CREB1 (0.883) > APEX1 (0.578) > POLB (0.549)$ の順で有意に高い線形回帰係数 (r^2) が明らかになった。BER 経路の遺伝子発現が、GO ばく露によって引き起こされる HEK293T 細胞における DNA 損傷の帰属であることを示唆した。ゼブラフィッシュ胚では、apex1 遺伝子の転写レベルは、それぞれ GO 25、50mg/mL へのばく露後に、1.57 倍、1.31 倍に有意に上方調節された (図 6B)。GO 50mg/mL にばく露した場合、ogg1、polb、creb1 の発現レベルもそれぞれ 1.36 倍、1.47 倍、1.77 倍に有意に増大した (図 6B)。他の GO 濃度については、これら遺伝子の発現に関して明らかな差異は観察されなかった。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究の発見は、酸化グラフェン (GO) が HEK293T 細胞における DNA 損傷を引き起こし、HEK293T 細胞およびゼブラフィッシュ胚の両方で塩基除去修復経路を誘導することを実証した。GO ナノシートはまた、細胞の物理的特性を乱す可能性を有し、GO の細胞毒性の別の指標である。さらに、本研究は、生物医学装置および他の用途における GO の使用を規制することを思い出させる、過剰な GO ばく露の結果としての BER 経路の活性化を強調した。</p>

(4) TiO₂

No	TiO2-1
論文題目 (和訳)	Nanoparticles-induced apoptosis of human airway epithelium is mediated by proNGF/p75(NTR) signaling. (ヒト気道上皮のナノ粒子誘発アポトーシスは、proNGF/p75(NTR)シグナル伝達により媒介される)
著者 所属機関	Sreeparna Chakraborty ^a , Vincent Castranova ^b , Miriam K. Perez ^c , and Giovanni Piedimonte ^c a Department of Pediatrics , West Virginia University School of Medicine , Morgantown , West Virginia , USA. b Department of Pharmaceutical Science , West Virginia University School of Pharmacy , Morgantown , West Virginia , USA. c Pediatric Institute and Children's Hospital, Cleveland Clinic Foundation , Cleveland , Ohio , USA.
書誌事項	Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A. 2017, Vol.80, No. 1, p.53-68. doi: 10.1080/15287394.2016.1238329.
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子 (TiO ₂ -NP) : 商用グレード二酸化チタン TiO ₂ 微粒子 (TiO ₂ -FP) : 酸化チタン(IV)微粒子
試料調整法	ストック溶液(10mg/ml) : TiO ₂ -NP 又は TiO ₂ -FP を、無菌リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中に 30 秒間超音波処理、15 秒間氷で冷却、合計 3 分間、で調整。 粒子 : 使用前に、無菌条件で PBS 中に 0-100µg/ml に希釈後、1 分間超音波処理。 サイズ分布測定用 : PBS 中に 100µg/ml で粒子懸濁、2 分間 (TiO ₂ -FP) 又は 1 分間 (TiO ₂ -NP) 超音波処理 (TiO ₂ -NP は 1 分以上の超音波処理で弱凝集体が増加)。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞株】ヒト鼻上皮細胞、ヒト気管上皮細胞、ヒト気管支上皮細胞、タイプ I 肺胞細胞。全ヒト上皮細胞は、5%CO ₂ 雰囲気、37°C で各培地で成長。細胞が 70-80%コンフルエント(細胞密度)で、かつ 5-6 代継代内に到達してから実験実施。肺胞細胞のみ、3-4 代継代内で実施。 【試験種類】細胞毒性試験、RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応)、蛍光活性化細胞選別(FACS)、免疫染色、免疫沈降/イムノブロット、JNK 細胞死経路の p75 ^{NTR} 媒介活性化の役割・IL-1α の役割・p75 ^{NTR} の役割の確認試験。アポトーシス/壊死試験、NGF 抑制試験。統計解析。 【投与期間】24 時間 【試験用量】TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP(0-100µg/ml) 【試験・投与方法】 ・細胞毒性試験 : 上皮細胞をウェルプレートに設置。細胞密度が約 70%到達後、培地を TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP 含有 200µl 新鮮培地に再設置し 24 時間培養。ばく露後、細胞生存率を 10µl MTT 試薬添加により測定、3 時間 37°C で培養。結晶化 MTT を溶解し、光学密度(OD)を 575nm で測定。生存率を計算。 ・RT-PCR(逆転写ポリメラーゼ連鎖反応) : 神経栄養因子と受容体の遺伝子発現を RT-PCR で解析。神経栄養発現の倍の変化を B2M でノーマライズ、ΔΔCt 手法で計算。 ・蛍光活性化細胞選別(FACS) : TiO ₂ 粒子への 24 時間ばく露後の神経栄養タンパク質発現を FACS で測定。NGF、BDNF、TrkA、TrkB、p75 ^{NTR} 受容体を 1 次抗体で染色。気道上皮細胞をトリプシン処理で単離、4%パラホルムアルデヒドに固定、PBS 中 0.5%トライト X-100 で透過処理。非特異的結合をヒト免疫グロブリン(Ig)G 添加により除去。細胞を NGF、BDNF、TrkA、TrkB、又は p75 ^{NTR} 用 1 次抗体を用いて培養、各蛍光共役 2 次抗体を培養、FACSCalibur を用いて CellPro ソフトウェアにより解析。 ・免疫染色 : ポリ-L-リシン被覆ガラスカバースリップ上で成長、24 時間 TiO ₂ -FP 又は TiO ₂ -NP 10µg/ml にばく露させたヒト気道上皮細胞で画像試験。その後、細胞を PBS でリンス、4%パラホルムアルデヒドで固定、抗 NGF 抗体で、その後 AlexaFluor488 ラベル 2 次抗体で免疫染色。カバースリップに DAPI 含有 Prolong Gold 消泡剤を装着。EC Plan-Neofluar 40x1.30 oil DIC M27 オブジェクトを用いて細胞可視化、共焦点顕微鏡により撮影。 ・免疫沈降/イムノブロット : タンパク質を、コントロールと TiO ₂ 処理細胞ペレットからプロテアーゼ阻害剤カゲル含有 RIPA 溶解緩衝液を用いて抽出。同量(50µg)タンパク質を 10%SDS-PAGE ジェルにより分離、ニトロセルロース膜に 4°C で移行。タンパク質サンプル含有膜を TBS-T 緩衝液中に 5%ミルクでブロック後、抗 NGF 抗体あるいはリン酸 - JNK で培養。タンパク質鎖を化学発光検出で可視化。イムノブロットを、β-アクチン、GAPDH、又は前 JNK 用特異的抗体で剥ぎ取り、ブロック、再プローブし、定量。 ・JNK 細胞死経路の p75 ^{NTR} 媒介活性化の役割 : TiO ₂ 粒子ばく露又は未処理コントロール細胞由来タンパク質 200µg を抗 p75 ^{NTR} マウスモノクローナル抗体(sc-56448)を用いて 4°C で 1 晩培養。抗原抗体複合体を A/G プラスアガラスビーズ(sc-2003)に 4°C で 2 時間結合させ沈降、ピ

	<p>ーズから一度溶出したものはイムブロッティングを実施。その後、膜をウサギポリクローナル抗 NGF 抗体(sc-33602)を用いて、ブロッッキング緩衝液中で 4℃で1晩培養、化学発光シグナルを開発。</p> <p>・IL-1α の役割:TiO₂-NP ばく露気管支上皮細胞中の NGF 発現を調節時の IL-1α の役割。気管支上皮細胞の密度(80%)プレートを経換え IL-1α(0.5mg/ml)にばく露又は、IL1-ra(2-100μM)で3時間、前処理後、TiO₂-NP(10μg/ml)でさらに24時間ばく露。培養後、細胞を RNA 抽出、-80℃で保存又は、ウェスタンブロット及び免疫発光アッセイ用に処理。 p75^{NTR} の役割:神経栄養誘発死媒介時。特異的ブロック抗体(抗ヒト NGFR p75^{NTR}, SPM299)を使用。気管支及び肺胞上皮細胞を 1μg/ml 抗体で 24 時間、前培養後、TiO₂-NP に 24 時間ばく露。ブロック抗体の特異性評価用に、アイソタイプ IgG 抗体をコントロールとして使用。細胞死を FACS で測定。</p> <p>・アポトーシス/壊死アッセイ:TiO₂ 誘発細胞死モード理解のために、アネキシン V/ヨウカプロピシウム(PI)アッセイを利用。気道上皮細胞をプレート上で成長、TiO₂-NP 又は TiO₂-FP に 24 時間ばく露。全浮遊細胞を遠心分離で捕集、接着細胞をトリプシン処理により分離。細胞を FITC 共役アネキシン V と PI を用いて、室温、暗条件下で 15 分間培養し、FACSCalibur フローサイトメーターと CellQuest Pro ソフトウェアで解析。</p> <p>・NGF 抑制:トランスフェクション試薬として Lipofectamine 2000 を有する特異的 siRNA を使用。抑制効率を RT-PCR で測定。NGF 欠損気管支上皮細胞をその後 TiO₂ 粒子(10μg/ml)に 24 時間ばく露。細胞をトリプシン処理で捕集。アポトーシスと壊死を FACS により測定。proNGF 誘発アポトーシスにおける p75^{NTR} の役割を、コンフルエント気管支上皮細胞を抗ヒト p75^{NTR} 抗体 1μg/ml に 24 時間前処理後、TiO₂-NP にさらに 24 時間ばく露により確認。抗ヒト IgG 抗体をアイソタイプコントロールとして使用。細胞を培養後回収し、アポトーシスを FACS により測定。</p> <p>・統計解析:平均±平均の標準偏差(SD)。複数比較用に ANOVA 解析、グループ内比較用に t-テスト。グループ間事後比較を Holm-Sidak 法又は Tukey-Kramer テスト。P 値 < 0.05 は有意。</p>
試験結果	<p>・TiO₂ 誘発細胞毒性:肺胞・気管支細胞は、気管・鼻細胞よりも TiO₂ 毒性の毒性を受けやすい傾向をしめした。同質量濃度の MTT アッセイで、TiO₂-FP よりも TiO₂-NP へのばく露後の細胞生存率が数値的に大きく低下した。</p> <p>・TiO₂ 誘発神経栄養発現:TiO₂-NP へのばく露で、気道上皮細胞の神経栄養合成と表面受容体発現が上昇し、気道タイプに依存した重要な違いを示した。TiO₂-NP ばく露で、鼻、気管支、肺胞上皮細胞の NGF と p75^{NTR} 受容体遺伝子の発現が有意に高まったが、TrkA 受容体発現は肺胞上皮細胞でのみ増加。BDNF と TrkB 遺伝子発現は、鼻上皮細胞の TrkB 以外は、全細胞種で基底レベル近くに留まった。気管上皮細胞は少なくとも TiO₂-NP に反応し、神経栄養遺伝子発現の有意な変化なし。同質量濃度の TiO₂-FP は、気管、気管支、肺胞上皮細胞の NGF 遺伝子発現を増加、気管上皮細胞の p75^{NTR} の上昇、気管支上皮細胞の TrkA 上昇。</p> <p>肺胞上皮細胞は、コントロールと比較して、10μg/ml TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露後に NGF タンパク質合成が明らかに上方に調節。鼻上皮細胞も、TiO₂-NP へのばく露で明らかに高い NGF タンパク質濃度であったが、気管上皮細胞ではコントロールと比較して NGF の明確な変化なし。TiO₂-NP 処理した鼻と肺胞細胞は、NGF の細胞内染色が有意に増加したが、TiO₂-FP ではベースラインレベルに近かった。気管支上皮細胞は TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露で内因性 NGF が有意に上方に調節。IL-1α タンパク質濃度は TiO₂-NP 又は TiO₂-FP へのばく露後に細胞上澄みで有意に上昇した。外因性 IL-1α は TiO₂-NP と同レベルまで NGF 遺伝子発現を増加、特異的受容体抑制因子(IL1-ra)による前処理は、NGF 遺伝子発現に対する TiO₂-NP ばく露の効果を無効化した。IL1-ra は、気管支上皮細胞のウェスタンブロット又は FACS 解析により測定された TiO₂-NP 誘発 NGF タンパク質合成に対して同様の阻害効果。</p> <p>・ProNGF/p75^{NTR} 媒介細胞死: TiO₂-NP ばく露後の気管支上皮細胞で最高濃度で NGF 二量体形態を明らかにした。免疫沈降は、proNGF が高親和性で p75^{NTR} 受容体に結合することを示した。ウェスタンブロットは、気管支上皮細胞の JNK リン酸化後、TiO₂-NP へのばく露で、有意な増加を示し、本経路が proNGF-p75^{NTR} 軸からのシグナル伝達により開始される細胞の遊走において重要な役割を果たすことを示唆。TiO₂ は、アポトーシスによる著しい気道上皮細胞死を、特に気管支上皮細胞間で誘発。初期アポトーシス細胞の増加割合は、TiO₂-NP 処理後は、肺胞 > 気管支 > 鼻上皮細胞、TiO₂-FP ばく露では、主に壊死による細胞死を誘発し、鼻 > 肺胞 > 気管 > 気管支上皮細胞。p75^{NTR} は TiO₂-NP 誘発細胞死を防ぐ阻害剤で、気管支及び肺胞上皮細胞の両方の生存を有意に高め、proNGF-p75^{NTR} 軸を介したシグナル伝達が NP 誘発アポトーシスに重要であることを示した。24 時間の TiO₂-NP ばく露前に NGF 特異的 siRNA(NGFsiRNA)で核酸導入した気管支細胞は、アポトーシスはばく露していない細胞よりも有意に高かったが、スクランブル siRNA を用いて核酸誘導したコントロールと比較して、初期アポトーシスの有意な減少とともに、壊死の増加を示した。ばく露していないスクランブル siRNA 核酸誘導の生存率は、未処理細胞と類似。</p>

結論	<p>データから、TiO₂-NP へのばく露は、重要な神経栄養タンパク質と、呼吸器上皮におけるそれらの同族受容体の発現パターンの複雑な変化を、呼吸器における気道深度に依存した違いとともに、生成することを示した。特に、NGF 前駆体は、TiO₂-NP にばく露した気管支上皮細胞で過剰発現されたが、成熟したニューロトロフィン(神経栄養因子)に変換することができず、したがって、主に p75NTR 死受容体に結合した。同じ細胞で、p75NTR はそのタンパク質リガンドと並行して、それに対応した抗アポトーシス TrkA 受容体の変化していない発現と比較して有意に過剰発現する。結果として生じた proNGF/p75NTR シグナル伝達の増加は、SAPK-JNK 経路の下流で活性化し、その結果、アポトーシス死及び気管支上皮の早期老化をもたらした。したがって、未成熟 NGF 前駆体とその成熟形態との不均衡は、細胞死を促進する受容体の優先的発現と対になって、気道 NP に対する空气中 NP の有害作用に寄与する。</p>
----	--

No	TiO ₂ -2
論文題目 (和訳)	Toxicokinetics of titanium dioxide (TiO ₂) nanoparticles after inhalation in rats (二酸化チタンナノ粒子のラットの吸入後の体内動態)
著者 所属機関	Pujalté ^a , D. Dieme ^a , S. Haddad ^a , A.M. Serventi ^b , M. Bouchard ^a a Department of Environmental and Occupational Health, University of Montreal b Institute of Research of Hydro-Quebec
書誌事項	Toxicology Letters 265 (2017) 77–85; .doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.11.014
試験物質	TiO ₂ ; Nanostructured & Amorphous Materials Inc. (Houston, Texas, USA) より購入。アナターゼ(正方晶)99%。平均一次粒径 10~30nm、比表面積 200–220m ² /g。数百 nm から数 μm のカリフラワー状の凝集体。
試料調整法	二酸化チタンを濃度 6.5mg/mL で超純水(脱イオン水)中で攪拌し、Collision 6-jet aerosolizer (BGI Inc., Waltham, USA)により液体エアロゾルを生成。(空気流量 7.25L/min,最大圧力 2.76 bar)分散、空気希釈後の吸入エアロゾル中の二酸化チタンは、幾何平均 76.9nm(幾何標準偏差 1.87)の凝集粒子で、DustTrak Aerosol Monitor (Model 8520, TSI Inc., USA)による平均個数濃度は、6時間平均で 665,000±26,000 個/m ³ (変動係数 3.9%)。これらの値は労働衛生上のばく露を代表しているとみなせる。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	雄 Sprague-Dawley ラット(5-6 週齢、150-170g、順化、二次吸入防止等に注意)への鼻部吸入 6 時間。0,3,6,12,24,48,72,168,336 時間後調査。用量 15mg/m ³ 。(実績 15.57 mg/m ³ ;min9-max21)吸入後の異常は見られなかった。適時尿、便、採取。吸入後のラット(6 匹)は CO ₂ 窒息後、血液、組織、内臓採取、前処理して、ICP-MS により Ti を分析して、二酸化チタン含量を決定。TEM 観察用切片採取。酸化損傷の指標であるマロンジアルデヒド(MDA)測定。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> 二酸化チタン粒子の肺への堆積、滞留、排出;肺中の TiO₂ 量は、ばく露開始から 48h で最高値 3623±663ng に達した。それは実験中の平均ばく露濃度と吸入体積から推定した肺中に滞留した TiO₂ 投与量の 0.53±0.36%である。14 日後には定常値 1794±1279ng となる。吸入された粒子の大部分は上気道に堆積し粘液に捉えられ便となる。肺中に移行した粒子は長時間留まったのち他の臓器に移行する。肺切片の TEM 観察によれば、TiO₂ 粒子は肺尾部にのみ見出された。 血液中には、6h で見られ 12h で最高値 331±52ng となり、その後緩やかに低下し、7 日後ベースラインになる。リンパ節中の値はずっと小さい。これらの値は肺中に移行した量に比べて少ない。マクロファージによる貪食や粘液による捕集の方が大きい。 72h を最高値として臭球や脳への移行も見られた。 肺以降の臓器では、12-48h をピークとして、肝臓がもっとも高く、次いで腎臓、脾臓、に見られた。胸腺、唾液腺、膵臓、心臓、脳ではそれらより低い値でほぼ一定。 排泄物;14 日後の総計は、尿中 1027ng、便中 46414ng に達し、それらの値は便で 72h、尿で 48h で大部分が排泄された。 脂質過酸化の指標である MDA レベルは、吸入開始後 24 時間で、血液と肺で有意に高い値を示した。
結論	この研究は、20nm の初期直径を有する、殆ど凝集していない NP の 6 時間吸入後の典型的な TiO ₂ 作業員へのばく露の新しいデータを与えた。吸入中及び吸入後の肺における滞留後は、便中に排泄される量や、最も多い粘液線毛クリアランスに比べて、血液およびリンパ系への転移は少ない。それにもかかわらず、吸入量の一定割合が全身循環系に移行して到達したとみられる肝臓、腎臓、脾臓などの二次臓器で、検出可能なレベルの TiO ₂ を含有していた。吸入後 14 日までの肺で観察されたナノ粒子のレベルは、反復ばく露後の酸化的損傷の割合の増加を起こす可能性がある。嗅球および脳への一定の転移も観察された。そのような現象が起きるメカニズムをさらに調査すべきである。

No	TiO ₂ -3
論文題目 (和訳)	Biopersistence and translocation to extrapulmonary organs of titanium dioxide nanoparticles after subacute inhalation exposure to aerosol in adult and elderly rats (成年及び高齢ラットの二酸化チタンナノ粒子の亜急性吸入ばく露後の肺外器官への転移と生体内持続性)
著者 所属機関	L. Gatéa, ^a C. Disdier ^b , F. Cosniera, ^a F. Gagnaire, ^a J. Devoy, ^a W. Saba, E. Brun, M. Chalansonnet ^{a,*} , A. Mabondzo a Institut National de Recherche et de Sécurité, Département Toxicologie et Biométrie
書誌事項	Toxicology Letters 265 (2017) 61–69
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子;P25 (Aeroxide1 P25, 75% anatase 25% rutile, Evonik) 21.5±7.2nm 比表面積;51m ² /g
試料調整法	購入した TiO ₂ ナノ粒子をそのまま、回転ブラシ型エアロゾル発生器(詳細は Disdier et al, Part. Fibre Toxicol. 12, 27(2015)).に供給。 器官中の Ti 分析(ICP-MS)用の試料前処理;濃硝酸 - フッ化水素酸、マイクロ波処理後、硝酸・塩酸で加熱分解したのち、硝酸溶液で3回リンスする。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・雄フィッシャーラット(12–13 週齢、300–320g→若成年ラット、19 月齢、400–425g→高齢ラット) ・鼻部吸入;エアロゾル発生器と鼻部吸入ばく露タワーで構成する 100 匹にばく露可能なシステムを使用;Cosnier et al.; Aerosol Air Qual. Res. doi: http://dx.doi.org/10.4209/aaqr.2016.01.0034 . ・1日に3時間ずつ2回吸入、5日/週、4週間ばく露;吸入直後、3、28、90、180日後麻酔、全採血、肺、肺関連リンパ節、肝臓、脳、腎臓、脾臓を採取 ・吸入濃度約 10mg/m ³ ;実績;若成年ラット 10.17±3.29mg/m ³ 、エアロゾル粒子個数濃度 24000±6400 個/cm ³ ;高齢ラット 10.42±1.80 mg/m ³
試験結果	・若成年及び高齢群のラットの肺にばく露した Ti の負荷は、分析された各時点での対応する対照群の負荷よりも有意に高く、ばく露の停止後は時間とともに減少した。 ・ばく露した若成年群では、肺 Ti のクリアランスは、吸入期間終了後観察された。90日の回復後、肺負荷ばく露された若年成人群では、0日目の肺負荷の54%の減少で(肺における平均 Ti 含量は0日目は2.08mg/肺、90日目は0.95mg/肺)、これは遅いクリアランス率である。高齢群で観察された Ti クリアランスは、少し遅くなる。実際、90日の回復後の高齢者群では、ばく露された動物における平均肺負荷は、0日目の2.19mg/肺と比較して1.2mg/肺であり、したがって、約45%の減少である。しかしこれらに有意差はない。若年成人および高齢ラットにおけるチタンの肺クリアランス速度は、96.5日(R ² = 0.9339)および103.1日(R ² = 0.9575)の排出半減期を有する一次モデルに適合した。 ・ばく露された若成年および高齢ラットの他の臓器における Ti 分析において、大きなチタンの量が見出される肺の後の組織は、肺関連リンパ節であった。チタンの蓄積は、ばく露終了後180日まで観察された。ばく露された若成年における Ti の有意な増加もまた、脾臓で28日目から180日目で見られた。 ・両方の年齢群において、TiO ₂ NPs ばく露が肝臓の Ti 濃度に及ぼす影響も観察された。たとえ群内で変動性がより大きくても、ばく露された老齢ラットの肺外器官で検出される Ti の量は、若成年ラットよりもはるかに高かった(それぞれ中央値 315.5ng/g 対 90.0ng/g)ことは注目に値する。 ・さらに、ばく露された動物の結果が採取されたとき個別に、脾臓および肝臓における Ti のレベル間の関連性が観察された。実際、所与の動物において、より多量の Ti が脾臓が観察された多くの場合、同じ傾向が肝臓で見られた。組織 Ti 含量に関するこのような有意な相関は、腎臓および脾臓、腎臓および肝臓のいずれにも見られなかった。これは、肺から二次臓器への NP の転移に関する動物間のある異質性を示唆している可能性がある。 ・対照と比較して、若成年または高齢の TiO ₂ ばく露群の腎臓では測定された Ti の有意な増加はなかった。同様に、若成年および高齢の TiO ₂ ばく露ラットの脳への有意な Ti 転移は、対照と比較して有意ではなかった。
結論	粒径 21.5nm の TiO ₂ ナノエアロゾル亜急性吸入ばく露後の、若成年および高齢ラットにおける Ti の肺摂取、クリアランス、および再分布を調査した。 4 週間の吸入期間の後、肺の Ti は徐々にクリアされた。ICP-MS の感度によるが、ばく露された用量のうちの少量が、ばく露後 28–180 日の間に脾臓および肝臓に転移した。以前に同じ TiO ₂ ナノ粒子(NPs)で行った静脈注射後の観察では、これらの NPs はそのような肺外器官において少なくとも1年間の持続性を示唆した(Disdier et al., 2015)。この Ti の再分布は、全身の副作用のみならず、関与する輸送メカニズムを説明する将来の転移のメカニズム研究の必要性を強調する。

No	TiO ₂ -4
論文題目 (和訳)	Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO ₂ nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in mice (二酸化チタンナノ粒子のマウスへの気管内投与による肺ばく露後の遺伝毒性及び炎症誘発に粒子表面修飾は影響しない)
著者 所属機関	Hakan Wallin ^{1,2} Zdenka O. Kyjovska ¹ , Sarah S. Poulsen ¹ , Nicklas R. Jacobsen ¹ , Anne T. Saber ¹ , Stefan Bengtson ¹ , Petra Jackson ¹ and Ulla Vogel ¹ ¹ National Research Centre for the Working Environment (NRCWE,Denmark)
書誌事項	Mutagenesis, 2017, 32, 47–57 doi:10.1093/mutage/gew046
試験物質	NRCWE-001 (未修飾); NanoAmor (Houston, TX, USA) から購入、比表面積 99m ² /g、DLS 測定粒径; 3 投与濃度とも水力学径ピーク値 50.8,58.5,68.1nm でほぼ同じで大きな凝集なし。ζポテンシャル; -26 mV at pH 7.0 NRCWE-002 (NRCWE-001 を NRCWE に於いて 3-aminopropyltriethoxysilane で修飾して作製); 比表面積 84m ² /g、DLS 測定粒径; 投与 3 濃度により、水力学径ピーク値 1281,1484,1718nm。ζポテンシャル; 25 mV at pH 7.0
試料調整法	0.2 μm フィルター濾過、γ線照射した Nanopure Diamond UV water (発熱物質 <0.001 EU/ml, 全有機炭素<3.0 ppb) 中で氷上超音波懸濁
試験生物 投与方法・期間 試験用量	雌 C57BL/6J BomTac マウス(8 週齢)、体重 18.5±1.3mg 気管内投与一回、18, 54 or 162 μg/マウス(デンマークの TiO ₂ の労働衛生ばく露濃度 10mg/m ³ での 1.5,5,15 労働日に相当)、1, 3, 28 日後定法に従い屠殺、気管支肺胞液 (BALF) を採取、肺、肝臓を取り出す。BALF 分析とアルカリコメットアッセイ(遺伝毒性)による DNA 鎖切断調査を実施。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・体重; NRCWE-001 ではベヒクルのみの投与と変わらず、NRCWE-001 では 28 日後のみ体重が減少した。 ・肺中への TiO₂ ナノ粒子転移は確認されたが、炎症応答(好中球、マクロファージ、好酸球、リンパ球等 BAL 細胞数)は、投与量依存性は示したが、未修飾、修飾で有意な差はなかった。BALF 中の全蛋白も投与量、日数による変化はあるが、二つのナノ粒子で有意差がなかった。 ・NRCWE-001 および NRCWE-002 の気管内投与後、1 日目の肝臓における遺伝的応答および BAL における全体的な遺伝毒性の応答に統計的に有意な差があった。しかし、肺組織における NRCWE-001 および NRCWE-002 に対する遺伝毒性応答に統計的な有意差はなかった。 ・好中球の流入として決定される炎症は、二つのナノ粒子について時間および用量依存性であり、ばく露から 28 日後に最高値で持続したが、BAL 細胞数には統計的有意差がなかった。同様に、BALF 中の増加したタンパク質濃度でけっさいされる肺細胞の損傷は、NRCWE-001 および NRCWE-002 については統計的に異ならなかった。
結論	研究されたルチル TiO ₂ NP の表面修飾は、肺ばく露後の毒物学的反応に影響を及ぼさなかった。

No	TiO2-5
論文題目 (和訳)	Short-term oral exposure to low doses of nano-sized TiO ₂ and potential modulatory effects on intestinal cells. (ナノサイズ TiO ₂ の低用量への短期経口ばく露と腸細胞に及ぼす潜在的な調節影響)
著者 所属機関	Ammendolia MG1, Iosi F2, Maranghi F2, Tassinari R2, Cubadda F2, Aureli F2, Raggi A2, Superti F2, Mantovani A2, De Berardis B2. 1 Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy. Electronic address: maria.ammendolia@iss.it. 2 Istituto Superiore di Sanità, Viale Regina Elena, 299, Rome, Italy.
書誌事項	Food Chem Toxicol. 2017 Apr;102:63-75. doi: 10.1016/j.fct.2017.01.031. Epub 2017 Jan 31.
試験物質	TiO ₂ NP (アナターゼ、一次サイズ < 25nm、BET 表面積 45-55m ² /g、純度 99% -Sigma-Aldrich, Gillingham, Dorset, 英国)
試料調整法	超純水、DMEM 培地中に分散(それぞれ、 <i>in vivo</i> 、 <i>in vitro</i> 研究用)。凝集を減らすため、温度管理下超音波処理。 Z-平均 (nm) と PdI は、Milli-Q 水中で 604±24、0.221±0.035、DMEM 中で 831±106、0.126±0.049。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	< <i>in vivo</i> 試験 > ・試験生物: 成体雌雄 Sprague-Dawley ラット ・投与方法・期間・試験用量: 経口・強制飼養、5 連続日、2 又は 1mg/kg bw/日。最後の処理後 24 時間に屠殺。小腸摘出、空腸は組織病理学、残りは粒子蓄積、有害影響を調べるため使用。 < <i>in vitro</i> 試験 > ・試験生物: ヒト結腸直腸腺癌細胞株 HT-29; American Type Culture Collection (Rockville, MD, 米国) から入手。 ・投与方法・期間・試験用量 (LDH 及び MTT 細胞毒性試験): 6、24、48 時間、1.8、4.5、9、36µg/mL に対応する 1、2.5、5、20µg/cm ²
試験結果	< <i>in vivo</i> 試験 > ・健康、体重増加、餌消費に両性とも影響無。空腸の病理組織学解析は量的変化無。雄で、組織形態計測的データは、2 mg/kg bw でのみ絨毛高さの顕著で用量関連増加を示した。杯細胞の密度は、両用量で、顕著で用量関連増加の結果になった。雌の空腸で、モルフォロジーは量的変化がなく、アポトーシスに影響を与えなかった (TUNEL アッセイ)。小腸中の Ti レベルは、コントロール、1mg/kg bw/日、2 mg/kg bw/日、それぞれ、0.08±0.02、0.09±0.02、0.13±0.03µg/g だった。 < <i>in vitro</i> 試験 > LDH、MTT アッセイにおいて、全ての用量、時間で統計的に有意な細胞毒性影響は無かった。 6 時間後全ての用量で、細胞内酸化ストレスの指標である DCHF 蛍光が、増加傾向。ROS レベルは、2.5 から 20µg/cm ² で、大幅に上昇。24 時間では、6 時間に比較して、DCHF 蛍光強度は低下。 ミトコンドリア膜電位 (MMP) は変更なし。 SEM 観察結果; 6 時間では観察できる細胞内組織学的差異はなく、24 時間でも劇的なモルフォロジー変化は見られず、細胞膜損傷はなかった。ほんの僅かのミトコンドリアが膨れまたは損傷し、NPs 凝集体を含む多胞体を現した。 テストステロン (200nM) 及び IGF-1 (50nM) の影響; TiO ₂ NP とテストステロン (200nM) の複合溶液で処理した細胞の成長レベルは、48 時間まで (6、24 時間) では全ての TiO ₂ NP 用量でコントロール細胞の成長レベルと匹敵。48 時間では、複合溶液がより成長が速く、用量増加とともに速度低下。 IGF-1 (50nM) との複合液の場合も、同様の結果を示した。
結論	TiO ₂ NP の食事摂取は、低用量でとはいえ、頻繁に連続的に起こるため、腸粘膜に及ぼす反復影響は腫瘍発症の増加したリスクもしくは既存腫瘍プロセスの進行に結び付くかもしれない。本結果は、更なる研究が必要とされるが、腸での発ガンに結び付く増殖プロセスに関与するかもしれない因子としての TiO ₂ NP へのより大きな注目を引き起こす。

No	TiO2-6
論文題目 (和訳)	Interaction of New-Developed TiO2-Based Photocatalytic Nanoparticles with Pathogenic Microorganisms and Human Dermal and Pulmonary Fibroblasts. (新開発の TiO2 系光触媒ナノ粒子の病原性微生物と人間の皮膚と肺線維芽細胞との相互作用)
著者 所属機関	Nica IC ¹ , Stan MS ¹ , Popa M ^{2,3} , Chifiriuc MC ^{2,3} , Lazar V ^{2,3} , Pircalabioru GG ³ , Dumitrescu I ⁴ , Ignat M ⁵ , Feder M ⁶ , Tanase LC ⁶ , Mercioniu I ⁶ , Diamandescu L ⁶ , Dinischiotu A ¹ . 1 Department of Biochemistry and Molecular Biology, Faculty of Biology, University of Buchares. 2 Department of Botanic-Microbiology, Faculty of Biology, University of Bucharest 3 Research Institute of the University of Bucharest-ICUB, University of Bucharest 4 National R&D Institute for Textiles and Leather Bucharest (INCDTP) 5 National Research and Development Institute for Textiles and Leather (INCDTP) Leather and Footwear Research Institute (ICPI) 6 National Institute of Materials Physics (NIMP)
書誌事項	Int J Mol Sci. 2017 Jan 25;18(2). pii: E249. doi: 10.3390/ijms18020249.
試験物質	P25 粉(Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA,米国) に 1% Fe と N 原子を含浸: 適量の TiO ₂ 、FeCl ₃ ・6 H ₂ O、尿素を蒸留水中で機械及び超音波攪拌を介して分散/解散し、混合物を 200°C/2 時間で加熱。結果として出来た粉を塩を除去するために超純水で洗浄(pH 6.5 ~)、乾燥、および最終的に 400°C で 2 時間焼成。 PH 5.5 と 8.5 で TiO ₂ -1% Fe-N 合成: 適量の TiCl ₃ と FeCl ₃ ・6H ₂ O 純水中で攪拌混合、pH 値を 25% NH ₄ OH 溶液で調整。その後、得られた Ti(III) の沈殿物を空気中で色が紫から白に変化するまで酸化。塩を除去するため、Ti(IV)と Fe(III)の水酸化物の共沈殿を超純水で洗浄し、空気乾燥。尿素存在下、水熱処理による窒素ドーピング (200°C/2 時間)。乾燥結果粉末を空气中 400°C で 2 時間焼成。 ・キャラクタリゼーション: P25、P25-1% Fe-N、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5 の相構成;アナターゼ((83%)・ルチル(~17%)、同左、アナターゼ(~80%)・ブルッカイト(~20%)、アナターゼ(~85%)・ブルッカイト(~15%)。 注)TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;HT1、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5;HT2 で略記。 同上の粒子平均サイズ;29±15nm、30±10nm、15±2.8nm、10±4nm。 同上是大きい凝集体を形成(SEM 観察)(77.7-105.5nm、-、300.4-511.3nm、79.9-112.3nm)。 ・流体力学サイズ: 純水中新規分散;P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;765、1168、1692 d.nm。 PBS 中加熱分散時;ほぼ同上。 細胞培養培地中加熱分散;TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;3309、3787 d.nm。培地イオンが電位を変化。 モルフォロジー:P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;角の丸い多面体形状、優勢な二次形態(prevaling quadratic morphology)、複合形態(三角形、球形、等)。 紫外可視拡散反射スペクトル:P25、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~5.5、TiO ₂ -1% Fe-N pH ~8.5;347、352、350nm。 ・光触媒活性(紫外線、可視光によるメチレンブルー (MB)の分解で評価): The TiO ₂ -1% Fe-N, pH ~8.5 > TiO ₂ -1% Fe-N, pH ~5.5 > P25 系。 <抗菌活性アッセイ> 得られた粉末の原核生物と真核微生物系統に及ぼす影響評価):グラム陰性菌株(大腸菌 <i>E. coli</i> ATCC 8739、緑膿菌 <i>P. aeruginosa</i> ATCC 27853)、グラム陽性細菌株(黄色ブドウ球菌 <i>S. aureus</i> ATCC 6538、フェカリス菌 <i>E. faecalis</i> ATCC 29212)、真菌株(カンジダ・アルビカンス <i>C. albicans</i> ATCC 10231)使用。液体媒体微量希釈法により抗菌活性の定量。 紫外線より可視光で抗菌性改良。 最小発育阻止濃度 (MIC) 値(TiO ₂ -1% Fe-N, pH 8.5 及び TiO ₂ -1% Fe-N, pH 5.5); <i>S. aureus</i> , <i>E. faecalis</i> , <i>E. coli</i> ;0.0625 mg・mL ⁻¹ 。 <i>P. aeruginosa</i> ;0.002 mg・mL ⁻¹ (最高の抗菌活性); <i>C. albicans</i> ;0.015 及び 0.004 mg・mL ⁻¹ 。

試料調整法	テストされる粉末は、10 mg・mL ⁻¹ の濃度で貯蔵液を得るためにジメチルスルホキシド (DMSO) 中に懸濁された。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・試験生物: 皮膚、肺からの正常ヒト繊維芽細胞 (CCD-1070Sk 細胞株, ATCC Cat. No. CRL-2091)、(MRC-5 細胞株, ATCC Cat. No. CCL-171) ・投与方法・期間・試験用量: 31.25、62.5、125µg/mL の TiO₂-1% Fe-N ナノ粒子、24、72 時間。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・細胞生存率 (Trypan Blue 染色使用): ばく露時間又は光触媒濃度にかかわらず肺と皮膚細胞は細胞生存率の面で顕著な変化を示さなかった。 ・細胞膜完全性 (培地への LDH 放出量; 商業キット (TOX7, Sigma-Aldrich) 使用): 乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出レベルから、皮膚線維芽細胞の場合、TiO₂-1% Fe-N NPs は細胞膜完全性に影響しなかったが、肺細胞では 72 時間でわずかな減少、それまでは顕著な変化無し。 ・炎症性ポテンシャル (培地への NO 放出レベル; Griess 試薬使用): 一酸化窒素 (NO) 放出量は、2 つの細胞、2 つの TiO₂ NPs 試料の間で大差無し。試験された NPs へのばく露後に誘発される炎症は低すぎ、厳しいとは考えられない。 ・細胞拡散およびアクチン細胞骨格モルフォロジー (蛍光顕微鏡観察): 蛋白質濃度アッセイ (細胞抽出液のタンパク質濃度; Bradford による方法) ・抗酸化酵素アッセイ: <ul style="list-style-type: none"> ・抗酸化酵素活性 (吸光度法) / カタラーゼ (CAT) (EC 1.11.1.6) 活性 (Aebi's 法) / グルタチオンペルオキシダーゼ (GPX) (EC 1.11.1.9) 活性 (Beutler 法) / グルタチオン s-トランスフェラーゼ (GST) (EC 2.5.1.18) 活性 (Habig らの方法) / 細胞溶解物からの蛋白質中のグルタチオン (GSH) 含有量 (商業グルタチオンアッセイキット (Sigma-Aldrich) 使用) <p>カタラーゼ活性は 2 細胞間で有意差あり。皮膚線維芽細胞の CAT 活性のレベルは、125µg/mL HT1 による両方の時間間隔 (24、72 時間) のばく露後、コントロールのほぼ 35% まで増加した一方、HT2 試料は、72 時間ばく露後 20% だけまでしか増加せず、長時間ばく露後の抗酸化防御機構の活性化が示唆された。対照的に、TiO₂-1% Fe-N NPs は、MRC 5 肺細胞に対してより深刻な影響を持っていた。最初の 24 時間後でさえも CAT 活性が低下、低下は 72 時間後ほぼ 20% に到達した。</p> <p>皮膚線維芽細胞において、TiO₂ NPs の両タイプの高用量でだけ、GPx 活性の有意な増加が観察されたが、肺細胞において、コントロールと比較してテストされた濃度のすべてに対して強い上昇された活性が測定された。皮膚線維芽細胞において、GST 活性プロファイルがグルタチオン (GSH) 含有量の増加によって伴われる GPx 活性 (高用量に対する増加されたレベル) と似ていることを考慮して、酵素的及び非酵素的抗酸化機構両方の活性化が、酸化傷害に対する適切な細胞の防御のために協力することを示唆した。対照的に、TiO₂-1% Fe-N NPs への肺細胞の 24、72 時間のばく露後、GST 活性のレベルは大きく変化しない (コントロールに比べ約 20%)。これらの結果は、2 つの時間間隔の間の GSH 含有量減少と相関し、72 時間での高 GPx 活性が、解毒プロセスがこのタイプ細胞に対して、特に抗酸化防系のこの酵素を通じてより強い実現されたことを明確に示した。</p> <ul style="list-style-type: none"> ・脂質過酸化 (マロンジアルデヒド (MDA) レベルによって表現される; Dinischiotu による吸光度法): ヒト皮膚および肺線維芽細胞における脂質過酸化反応に対する TiO₂-1% Fe-N NPs の影響は、HT1 と HT2 の試料間で大きな違いは見られなかった。両細胞株中のマロンジアルデヒド (MDA) 含有量は、24 時間ばく露後、コントロールと比較して大幅に変更されず、TiO₂ NPs は、用量依存のわずかな増加をさせた。CCD-1070Sk 細胞において、ナノ光触媒との 72 時間の培養は、125µg/mL の濃度に対して、90% まで増加された MDA レベルにつながった。72 時間後の MRC 5 細胞における脂質過酸化レベルは少し低くなった。しかし、皮膚細胞と比較して、肺線維芽細胞は、62.5 と 125µg/mL の用量に対して、70% MDA 含有量の同じ増加を記録した。 ・アクチン細胞骨格の動的変化: TiO₂-1% Fe-N NPs へのばく露後の MRC-5 と CCD-1070Sk 細胞モルフォロジーの変化を位相差顕微鏡で調べた。表示されるアクチン細胞骨格形成の動的変化は、細胞生存率分析に関する所見と一致していた。したがって、人間の皮膚や肺線維芽細胞は、24、72 時間ばく露後、線維芽細胞固有の細長い形態を維持し、コントロールと比較して、サンプル間で有意差が無かった。多数のストレスファイバーは、ヒト細胞が多数の接着斑を作り、それらの挙動は、ナノ光触媒への応答で特に変更されなかった。
結論	増大した光触媒作用効率を持つ共ドーブされた TiO ₂ ナノ粒子を得ることに成功した。合成の間に pH 値を修正することによって、粉の光触媒作用挙動だけでなく、相対相含有量 (アナターゼ/ブルッカイト)、結晶子及び粒度は、明らかに変わった。結果は、肺および皮膚の

細胞に対する低用量での TiO_2 -1% Fe-N の生体適合性を示し、それは酸化ストレスを用量依存方法で開始するかもしれず、将来の光化学触媒作用アプリケーションのために有益な情報を提供する、ことを示した。さらに、これらの粒子は、顕著な殺菌および抗バイオフィルム活性を表し、産業、食品、調剤、医療分野からの種々の環境の微生物の浄化のためのそれらの潜在的なアプリケーションを示唆している。

No	TiO2-7
論文題目 (和訳)	Oral administration of nano-titanium dioxide particle disrupts hepatic metabolic functions in a mouse model. (ナノ酸化チタンの経口投与はマウスにおける肝代謝機能を攪乱する。)
著者 所属機関	Yang J ¹ , Luo M ² , Tan Z ² , Dai M ² , Xie M ² , Lin J ² , Hua H ² , Ma Q ² , Zhao J ² , Liu A ³ . 1 Ningbo College of Health Sciences, Ningbo 315100, China. 2 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China. 3 Medical School of Ningbo University, Ningbo 315211, China. Electronic address: liuaiming@nbu.edu.cn.
書誌事項	Environ Toxicol Pharmacol. 2017 Jan;49:112-118. doi: 10.1016/j.etap.2016.12.006. Epub 2016 Dec 11.
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子 (21nm, TiO ₂ NP); Sigma-Aldrich (Product Number 718476, Lot MKBR0084V, MO, 米国) から購入。仕様書情報; 表面積 35-65m ² /g、微量金属基準(根拠) 99.5%以上、一次粒子サイズ 21nm。
試料調整法	0.5% CMC-Na (w/v) 溶液中に分散、30 分超音波処理、10 分攪拌。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 雄 5-7 週齢 C57/BL6 マウス; The Experimental Animal Center of Ningbo University. ・投与方法・期間・試験用量: 経口投与、1日 1 回、14 日。処理終了後、後眼窩静脈叢からの採血。屠殺後、肝臓採取。
試験結果	・生化学分析; 血清中の IBIL、TBIL、TBA、ALP、AST、ALT 分析 (Spectra Max M5 (CA, 米国) 使用): IBIL、TBIL は、TiO ₂ NP 500mg/kg/日投与で、大幅に上昇、統計的差異、用量反応相関を示した。TBA は、わずかに上昇したが、コントロール群との差は無し。ALP と一致。AST、ALT は変更されず、肝損傷示されず。 ・組織病理学及び超微細構造解析: 組織病理学解析; 変更なし。 超微細構造解析; 250mg/kg/日 で処理されたマウスにおいて、小胞体で増加されたミトコンドリア数と浮腫が観察された。TiO ₂ NP は、細胞質中で見付けられた (500mg/kg/日投与で)。500mg/kg/日投与群では、浮腫は激しくなり、TiO ₂ NP 粒子は肝細胞中でクラスターになっていた。 ・定量的ポリメラーゼ連鎖反応 (Q-PCR) 解析及び Western blot 解析 (CYP3a、CYP2b、CYP2c の発現を評価 (肝臓蛋白質)): <i>Cyp7a1</i> 、 <i>Cyp8b1</i> 、 <i>Cyp27a1</i> の発現は 2 つの投与群 (250、500mg/kg/日) で変更無し。 <i>Oapt1</i> は、高用量群で、7 倍以上まで上昇。 遺伝子 <i>Bsep</i> 、 <i>Mrp2</i> の発現は変更無し。 <i>Ostb</i> 、 <i>Mrp4</i> は変更無し。 <i>Mrp3</i> は、高用量群で、5 倍まで上昇。 CYP サブファミリー <i>Cyp2b10</i> 、 <i>2c37</i> はそれぞれ、4、2 倍まで上昇。誘発もしくは抑制は <i>Cyp3a11</i> 、 <i>2c39</i> に対して観察されず。 <i>Ugt1a1</i> 、 <i>1a2</i> は変更されなかった。 <i>Tnfa</i> 、 <i>Il-6</i> 、 <i>Il-10</i> は、変更無し。炎症結果と一致して、4 つの典型的アポトーシス遺伝子 <i>Bax</i> 、 <i>Bcl-xl</i> 、 <i>Bcl-2</i> 、 <i>Bim</i> は変化しないままだった。 これらのデータは、生化学指標 ALP、AST、ALT と合致していなかった。炎症もアポトーシスも、TiO ₂ NP チャレンジとその後の代謝の変更によって、始動されなかった。
結論	2 週間の TiO ₂ NP (21nm) の経口投与は、肝細胞の細胞質中のナノ粒子の沈着とミトコンドリア浮腫につながった。TiO ₂ NP による肝代謝の部分的変更は、代謝性疾患のリスクをもたらすかもしれない、他の毒性学的エンドポイントよりも敏感だった。これらのデータは、行政当局によるナノサイズ材料のリスク分析と規制のための有用な情報を提供した。

No	TiO2-8																													
論文題目 (和訳)	<i>In vitro</i> genotoxicity testing of four reference metal nanomaterials, titanium dioxide, zinc oxide, cerium oxide and silver: towards reliable hazard assessment. (4つの参照金属ナノマテリアル、二酸化チタン、酸化亜鉛、酸化セリウム、銀の <i>in vitro</i> 遺伝毒性試験:信用できるハザード評価に向けて)																													
著者 所属機関	El Yamani N ^{1,2} , Collins AR ^{2,3} , Rundén-Pran E ¹ , Fjellsbø LM ¹ , Shaposhnikov S ² , Zienolddiny S ⁴ , Dusinska M ⁵ . 1 Health Effects Group, Department of Environmental Chemistry, NILU-Norwegian Institute for Air Research, Kjeller 2007, Norway. 2 Comet Biotech AS, Oslo 0372, Norway. 3 Department of Nutrition, University of Oslo, Oslo 0372, Norway and. 4 STAMI-The National Institute of Occupational Health, Oslo 0363, Norway. 5 Health Effects Group, Department of Environmental Chemistry, NILU-Norwegian Institute for Air Research, Kjeller 2007, Norway, maria.dusinska@nilu.no.																													
書誌事項	Mutagenesis. 2017 Jan;32(1):117-126. doi: 10.1093/mutage/gew060. Epub 2016 Nov 12. Erratum in: Mutagenesis. 2017 May 1;32(3):409.																													
試験物質	Ag NM300K : Fraunhofer-Gesellschaft (Institute for Molecular Biology and Applied Ecology, Aachen, ドイツ)から入手。 TiO2 NM100, ZnO NM110, CeO2 MN212: the Joint Research Centre (Ispra, イタリア)から入手。 キャラクタリゼーション(NM100, NM110, NM212, NM300Kの順に下記): 多形;アナターゼ、ジシカイト、セライト、金属 粉体タイプ;粉、粉、粉、分散液 モルフロジー;-、-、-、球 XRD サイズ(nm);56.7->100、>100、NA、14±2 TEM 直径(nm);110±57、147±149、33、16.7±4.0																													
試料調整法	The Nanogenotox dispersion protocol に従って、分散し、ストック液に。																													
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト肺胞基底上皮細胞株 A549; European Collection of Cell Culture (ECACC)より入手。 ヒトリンパ芽球様細胞 TK6; ECACC から購入。 ・投与方法・期間・試験用量: 付着 A549 細胞に対して、0.01-75 µg/cm ² 分散液培地中 TK6 細胞に対して、0.14-140µg/mL(上記濃度と等しい) alarmarBlue 及びコメットアッセイ;3 又は 24 時間 慢性ばく露(コロニー形成効率;は CFE);9-12 日間																													
試験結果	細胞毒性(alarmarBlue®使用;生細胞の細胞内減少代謝への比色応答を通して測定): NM100 は、3µg/cm ² での A549 の生存率をわずかに低下させた(24 時間後では戻される)が、NM100 と NM212 への 3 又は 24 時間の A549 細胞のばく露は、細胞生存率をさほど低下させなかった。しかし、NM110 と NM300K は高濃度で非常に細胞毒性であり、中程度の濃度で生存率の大幅な低下を引き起こした。 細胞毒性(クローン原性アッセイで測定;コロニー形成効率(ばく露/非ばく露)、80%より低いと細胞毒性): NM100 と NM212 は、CFE に影響及ぼさず、NM110 と NM300K は濃度依存的に細胞毒性だった。NM110 と NM300K を用いた処理後、コロニーは非常に小さかった。 DNA(SBs と Fpg サイト)損傷(コメットアッセイ(ハイスルーブット)で測定): SBs+Fpg サイト(% tail DNA) <table border="1" style="margin-left: auto; margin-right: auto;"> <thead> <tr> <th rowspan="2"></th> <th colspan="2">3h ばく露</th> <th colspan="2">24h ばく露</th> </tr> <tr> <th>TK6</th> <th>A549</th> <th>TK6</th> <th>A549</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>TiO2 NM100</td> <td>23</td> <td>40</td> <td>9.0</td> <td>17</td> </tr> <tr> <td>ZnO MN110</td> <td>37</td> <td>58</td> <td>8.0</td> <td>25</td> </tr> <tr> <td>CeO2 NM120</td> <td>21</td> <td>15</td> <td>9.1</td> <td>27</td> </tr> <tr> <td>Ag NM300K</td> <td>29</td> <td>37</td> <td>25</td> <td>46</td> </tr> </tbody> </table>		3h ばく露		24h ばく露		TK6	A549	TK6	A549	TiO2 NM100	23	40	9.0	17	ZnO MN110	37	58	8.0	25	CeO2 NM120	21	15	9.1	27	Ag NM300K	29	37	25	46
	3h ばく露		24h ばく露																											
	TK6	A549	TK6	A549																										
TiO2 NM100	23	40	9.0	17																										
ZnO MN110	37	58	8.0	25																										
CeO2 NM120	21	15	9.1	27																										
Ag NM300K	29	37	25	46																										
結論	NMs の遺伝毒性影響の調査を計画する際の考慮のために、いくつかの一般的なステートメントが為されることができる。 ・24 時間培養だけでは、DNA に対する或る NMs の損傷影響を検知するためには、不十分である。																													

- NMsへの応答は、試験のために選ばれた細胞タイプによって変化する。
- 遺伝毒性は細胞毒性(alarBluet®のような試験による多分 80%生存率の閾値を設定する)でない濃度で評価されるべきである。
- Fpgの使用はDNAへの酸化損傷の検出を可能にし、それはさもない物がされるだろう。
- 濃度のわずかな増加は、遺伝毒性の面で、計り知れない影響を持つことがある。
- DNA損傷を測定するコメットアッセイのハイスループット版の使用は、堅牢さを増し、実験変動を減らす。

No	TiO2-9
論文題目 (和訳)	Effects of titanium dioxide nanoparticles on human keratinocytes. (ヒトケラチノサイトに及ぼす二酸化チタンナノ粒子の影響)
著者 所属機関	Wright C ¹ , Iyer AK ¹ , Wang L ² , Wu N ³ , Yakisich JS ¹ , Rojanasakul Y ⁴ , Azad N ¹ . 1 Department of Pharmaceutical Sciences , Hampton University , Hampton , VA , USA. 2 Allergy and Clinical Immunology Branch, National Institute for Occupational Safety and Health , Morgantown , WV , USA. 3 Department of Mechanical & Aerospace Engineering. 4 Department of Pharmaceutical and Pharmacological Sciences , West Virginia University , Morgantown , WV , USA.
書誌事項	Drug Chem Toxicol. 2017 Jan;40(1):90-100. doi: 10.1080/01480545.2016.1185111. Epub 2016 Jun 16.
試験物質	粒子: West Virginia University 寄贈 F-TiO ₂ ; 粒子サイズは 1µm、100%ルチルから成る。 UF-TiO ₂ ; 粒子サイズは 21nm、80% アナターゼと 20%ルチルから成る。H ₂ TiO ₇ ; 粒子サイズは 12nm、100%アナターゼから成る。
試料調整法	H ₂ TiO ₇ ナノ粒子 (NP)、微粒子 (F) と超微粒子 (UF) 粒子の保存液 (2 mg/mL) は、10 mg の粉体を 5 mL 滅菌 PBS に溶解することによって調製。この溶液は、超音波処理分散。溶液は 4 °C で保管、1-2 週間以内に実験に使用。各実験前に原液は超音波処理、すぐに培地で作業濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 全ての細胞の入手先; American Type Culture Collection (Manassas, VA) 不死化ヒト表皮細胞株 (HaCaT) ヒト気管支上皮 Beas-2B 細胞 ヒト肺線維芽細胞 CRL-1490 ・投与方法・期間・試験用量 粒子ばく露濃度; 0.1、1、10、25、100 µg/cm ²
試験結果	<試験方法> 活性酸素種/活性窒素種 (ROS/RNS) 検出: 細胞 ROS/RNS 生産は、活性酸素、過酸化物質、窒素酸化物、それぞれの蛍光プローブとして DHE、DCF DA と DAF-DA を使用し測定。 ・カスパーゼ 8/9 アッセイ: CaspGLOW™ Fluorescein Active Caspase-8 and -9 Staining Kit (BioVision, Milpitas, CA) それぞれ使用 ・Western blotting: 蛋白質含有量; bicinchoninic acid assay kit (Thermo Scientific) アポトーシスアッセイ: Hoechst 33342 DNA fragmentation assay 使用 ・MTT アッセイ: 細胞生存率 ・酵素結合免疫吸着検査法 (ELISA): VEGF 蛋白質レベル測定に Human VEGFA ELISA kit (Thermo Scientific) 使用 コラーゲンアッセイ: 細胞コラーゲン含有量はメーカーのプロトコルに従って Sircol® assay (Bicolor Ltd., Belfast, 英国) によって測定 <結果> ・細胞の酸化及びニトロ化ストレスに及ぼす微細 (F)、超微粒子 (UF) と H ₂ TiO ₇ の影響: 15 分時点で、TiO ₂ の 3 形態全てが、コントロールを上回り、過酸化水素やスーパーオキシド レベルを用量依存的に増加する。しかし、TiO ₂ のいずれかの形態も NO レベルを大幅な増加させない。さらに、皮膚細胞に対する F、UF、H ₂ TiO ₇ によって誘発される効果に有意差は認められなかった。 過酸化水素で NO レベルが徐々に減少に対し、TiO ₂ の 3 形態すべてによって 30 分と 1 時間の両時点で活性酸素レベルの用量依存増加を示す。F-TiO ₂ と UF-TiO ₂ 対 H ₂ TiO ₇ の影響に有意差は認められなかった。 ・アポトーシス調節蛋白質に及ぼす影響: カスパーゼ活性アッセイ結果は、6 時間後に全ての TiO ₂ 形態がコントロールと比べてカスパーゼ 8 活性の大幅な増加を示す (Z-VAD-FMK (汎カスパーゼ阻害剤) を用いた前処

	<p>理で検証)。 TiO₂ 処理後活性化カスパーゼ 9 の増加があったが、カスパーゼ 8 活性レベルの違いと比較するとはるかに小さい。 24 時間時点でカスパーゼ 8 または 9 の分割、活性化胸の変化はコントロールと比べて TiO₂ のいずれかの形態でもなかった。 1、10 μg/cm² の処理用量で特に 3 つの TiO₂ 粒子すべてによって抗アポトーシス蛋白 Bcl-2 のダウンレギュレーションが観察された。また、TiO₂ 粒子を用いた処理はアポトーシス誘導タンパク質 Bid のダウンレギュレーションにつながったし、抗アポトーシス蛋白 FLIP の発現に対する最小の影響を持っていた。 ・アポトーシスに及ぼす影響: TiO₂ 処理は、12 と 24 時間時点でコントロールと比べアポトーシスの大幅な増加を引き起こした。 TiO₂ の 3 つの形態すべてと全ての用量に対してコントロール比較で細胞死の増加があった。ただし、一酸化窒素合成酵素 (NOS) 阻害剤、アミノグアニジン (AG) 又はスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) 模倣剤とペルオキシ亜硝酸スカベンジャー、MnTBAP のいずれかで前処理は TiO₂ によるアポトーシスの誘導に大きな影響がなかった。 UV-C への曝けを伴う TiO₂ 処理後様々な時点 (0.5、1、5 時間) での観察された細胞死の割合は、TiO₂ 単独処理 (図 3 (A と B)) 後に観察された細胞死と比較して、違いがなかった。 ・細胞増殖と血管新生に及ぼす影響: F-TiO₂ および UF-TiO₂ は 24 時間での細胞生存率に対してポジティブな影響を持つ一方、H₂TiO₇ 処理は反対の影響を観察した。さらに、細胞増殖は 48 時間時点で F-TiO₂、UF-TiO₂ および H₂TiO₇ のすべての処理用量にตอบสนองしてネガティブに影響された。 VEGF 細胞レベルは、24 時間時点で 3 つの TiO₂ 粒子すべてで様々な用量で処理された細胞中で、顕著な変化はなかった。 ・細胞の生存と分化の経路に及ぼす影響 6 時間時点で TiO₂ 粒子はリン酸化 EGFR レベルに対して最小の影響を持った一方、Akt リン酸化、それ故活性化は 10μg/cm² UF-TiO₂ と 1 mg/cm² H₂TiO₇ 用量を用いて特異的に増加した。 UF-TiO₂ および H₂TiO₇ 処理の E-カドヘリンと β-カテニンを含む分化マーカー蛋白質の発現に対する影響は最小限であった。 ヒト肺上皮と線維芽細胞の細胞増殖に及ぼす影響: 全ての TiO₂ 粒子は、24 時間と 48 時間の両時点で、Beas-2B 細胞増殖に対する抑制影響を示した。 CRL 1490 細胞における細胞増殖の中等度の増加を示した。 TiO₂ のさまざまな形態と様々な用量で、両方の細胞は、コントロールと比較してコラーゲンレベルの変動する変化を示した。</p>
結論	<p>F-TiO₂、UF-TiO₂、H₂TiO₇ 粒子は、カスパーゼ 8 と Fas/FADD 経路を通じて、ケラチノサイトにおいてアポトーシスを誘発する。過酸化物の蓄積とカスパーゼ 8 及び 9 の活性の用量依存性の増加がある;これはアポトーシスにおける同様の傾向が後に続く。しかし、F-TiO₂ および UF-TiO₂ と比べて H₂TiO₇ ナノ粒子の影響に有意差はなかった。また、様々な TiO₂ 粒子は、HaCaT ケラチノサイトと 2 つの異なる肺細胞タイプ (Beas-2B と CRL-1490) における細胞の増殖、生存、血管新生/移行/侵入可能性に対する一貫性のある影響を持たなかったことを報告する。増大された表面積とより小さい粒子サイズによる、H₂TiO₇ の増加された発がん可能性は、TiO₂ の他の形態と比較して、皮膚及び肺の細胞におけるより有害な影響に変換されない。本研究が TiO₂ へのばく露が皮膚細胞に対してもつかかもしれない長期的な影響に焦点を当てていない中、矛盾し、決定的でない結果は、ここで、皮膚細胞に及ぼす TiO₂ の影響に関する以前に公表されたデータを裏付ける。このデータは、TiO₂ の影響が表皮皮膚層の完全性 (傷つけられた組織に対するより効果的な) とナノ粒子にばく露されている皮膚層の遺伝的特徴に依存しているという受け入れられた結論を再確認する。長期ばく露調査を使用する詳細な分析が、ヒト皮膚細胞に対する TiO₂ ナノ粒子の細胞毒性または悪性の可能性を判断するために間違いなく必要である。この分析は、もしあれば、どのような影響を TiO₂ への慢性ばく露が多くの人間に対して持っているか、の決定的な決定を行うことができるようにしていく。</p>

No	TiO2-10
論文題目 (和訳)	Different toxicity of anatase and rutile TiO2 nanoparticles on macrophages: Involvement of difference in affinity to proteins and phospholipids (マクロファージに対するアナターゼおよびルチル型TiO ₂ ナノ粒子の異なる毒性:タンパク質およびリン脂質に対する親和性の差異の関与)
著者 所属機関	Qilin Yu ^a , Honggang Wang ^a , Qi Penga, Ye Li ^a , Zhe Liu ^{a,b} , Mingchun Li ^a a) Ministry of Education Key Laboratory of Molecular Microbiology and Technology, Department of Microbiology, College of Life Science, Nankai University, Tianjin 300071, China b) Water Environment Monitoring Center of Yellow River Basin, Zhengzhou, Henan 450002, China
書誌事項	Journal of Hazardous Materials 335 (2017) 125–134
試験物質	TiO ₂ ナノ粒子;類似の粒径(20-40nm)、表面積(51-52m ² /g)、ゼータ電位(-13.4~-13.7mV)のアナターゼ型(TiO ₂ -A)とルチル型(TiO ₂ -R)。 合成後 TiO ₂ NPs: 粒子サイズ 20-40nm、平均サイズ 27-28nm。
試料調整法	TiO₂ の合成: Sun の方法。蒸留水を用いて四塩化チタン水溶液(0.3M)を調製→激しく攪拌しながら、70℃で 4M NH ₄ OHを用いて pH を 4.0 に調整→ろ過した沈殿物を 50℃で 24 時間乾燥させた後、450℃で 2 時間焼成して TiO ₂ -A を、または 700℃で 2 時間焼成して TiO ₂ -R を合成。 TiO₂ NP ストック溶液(10mg/mL): TiO ₂ -A/TiO ₂ -R NP を 10%FBS を含む DMEM 培地に懸濁。ストック溶液を 30 分間超音波処理、続いて同じ培地で希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	細胞株: マウスマクロファージ系 RAW264.7(中国科学院細胞資源センター) 培養条件: プレートに、10%FBS を補充した DMEM 培地中で 37℃の加湿インキュベーターで 5%CO ₂ 、24 時間培養。 MTT assay: プレートで 24 時間前培養後、培養上清を除去。10%FBS 及び TiO ₂ NPs を (0mg/L、12.5mg/L、25mg/L、50mg/L、100mg/L、200mg/L) の濃度範囲で含有する DMEM 培地(500μL)をウェルに添加。プレートを 24 時間培養、PBS 洗浄、3-(4,5-ジメチル-2-チアゾリル)-2,5-ジフェニル-2H-テトラゾリウムプロト ⁵ 500μL を添加。37℃で 4 時間培養後、生成したホルマザンを DMSO500μL で抽出。抽出溶液の光学密度(495nm)をマイクロプレートリーダーにより決定。 細胞生存率アッセイ: ヨウ化プロピジウム (PI) 染色により決定。マクロファージをアナターゼ又はルチル TiO ₂ NP で 24 時間処理後、2μL の PI(1mg/mL)を各ウェルに添加。5 分間染色後、蛍光顕微鏡により細胞を観察。PI 陽性細胞と各領域の総細胞数を数え、PI 陽性細胞の割合 (PI 陽性細胞の数×100 /全細胞数)を算出。TiO ₂ NP 処理下での細胞生存率に対する ROS スカベンジャー N-アセチル-L-システインの効果の評価用に、前培養した細胞をアナターゼまたはルチルで処理(2mM NAC を dH ₂ O に 24 時間溶解)、又は NAC の非存在下で培養。その後、全細胞生存率を試験。 アポトーシスとネクローシス(壊死)アッセイ: FITC-AnnexinV/PI アポトーシスキットを用いて評価。アナターゼ又はルチル TiO ₂ NP を 24 時間処理後、細胞をアポトーシスアッセイに使用。フローサイトメリーにより染色細胞の蛍光密度を評価。 ROS 検出: 1mL の細胞懸濁液を 5μL のジクロロフルオレセインジブクテート(DCFH-DA、10mg/mL、エタノールに溶解)で染色。37℃で 30 分間培養後、細胞を採取、洗浄、PBS 緩衝液に再懸濁。蛍光マイクロプレートリーダーを用いて、染色細胞の蛍光密度 (FLU、励起波長 488nm、発光波長 520nm)を検出。 ウェスタンブロッティング: TiO ₂ NP 処理細胞におけるオートファジーマーカー LC3 を検出するために、RIPA 緩衝液(プロテアーゼ阻害剤カクテルを含む)を用いて細胞から総タンパク質を抽出、SDS-PAGE により分離。タンパク質をポリビニリデンフルオリド膜に移し、LC3-I 及び LC3-II の両方に対応する抗体(Abcam、USA)を用いて検出。 NPs の細胞内取込み: 最終濃度 25mg/L を用いて、24 時間、アナターゼ又はルチル TiO ₂ NP で細胞を処理。細胞を PBS で洗浄、細胞に侵入することなく NP を除去、血球計算盤で計数、H/HNO ₃ (V:V=2:8) で 180℃、30 分間消化。消化液のチタン含量を誘導結合プラズマ質量分析法(ICP-MSe)で測定。 LMP 検出: LysoTracker Red 染色を用いて LMP を検出。ウェル底部の TiO ₂ NP 処理マクロファージを 500μL の PBS で保護、5μL の LysoTrackerRed で 37℃で 60 分間染色。細胞

	<p>を PBS で洗浄、蛍光顕微鏡で観察。全細胞分布不全蛍光 (LMP 陽性) 及び各視野の全細胞数を計数、LMP 陽性細胞のパーセント (LMP 陽性細胞の数×100/全細胞の数) を計算。少なくとも 20 の異なるフィールドを観察・分析。</p> <p>マクロファージの TEM 観察: 細胞超微細構造を観察。TiO₂NP 処理細胞をグルタルアルデヒド溶液で 4℃で 12 時間固定、四酸化オスmium溶液で 1 時間後固定。試料を脱水、包埋、超薄切片に切断、酢酸ウラニル及びケエン酸鉛で染色、TEM により観察。</p> <p>ミトコンドリア膜電位 (MMP) 測定: TiO₂NP を 24 時間処理後、マクロファージをアポトーシス及び壊死アッセイに記載の通り採取。PBS 緩衝液中の細胞 1mL を 37℃で 30 分間、2μL JC-1 (0.5mg/mL DMSO に溶解) で染色。フローサイトメトリーを用いて、染色された細胞の蛍光密度を調べた。J - 凝集体の蛍光発光は、蛍光チャネル 2 (FL2) におけるフローサイトメトリー及び蛍光チャネル 1 (FL1) におけるモノマー蛍光によって記録。減少した MMP (FL2 における低い蛍光強度) を有する細胞の割合を記録。</p> <p>逆電子伝達 (RET) アッセイ: ミトコンドリアの RET 活性を Knobeloch の方法で試験。マクロファージをミトコンドリア緩衝液中に懸濁、ホモジナイズ。溶解物 1000g で 10 分間遠心分離、核及び未処理細胞を除去。次いで上清 10,000g で 15 分間遠心分離、ミトコンドリアペレットを得た。ミトコンドリアを異なる濃度の TiO₂ NP 含有ミトコンドリア緩衝液中に懸濁、ATP と共に 5 分間培養。各試料 OD₃₄₀ 変化を記録、RET 阻害率計算。</p> <p>吸着実験: 以前の方法[40]に従って、牛血清アルブミン (BSA) の TiO₂-A 及び TiO₂-R への吸着等温線が得られた。それぞれ 100μg/mL の TiO₂ NP 及び異なる量の BSA を含む dH₂O を含有する一連のバイアルを、180rpm、37℃で 24 時間振盪。上清を使用してクマシーブルーリアントブルーアッセイを用いて BSA の濃度を検出。各平衡濃度での吸着質量は、物質収支法に基づいて計算。両方の NP に対する重要な原形質膜リン脂質、ホスファチジルエタノールアミン (PE) の吸着等温線をバイアル中で得た。バイアルには 100μL の 10mg/mL TiO₂NP ストック懸濁液と異なる量の PE ストック溶液 (1:1 クロロホルム/メタノール) が含まれ、最終液量は 1:1 クロロホルム/メタノールで 10mL に調整。バイアルを 180rpm、37℃で 24 時間振盪、各バイアルの上清を LC-MS システムにより PE 含量決定。各平衡濃度での吸着質量も計算。</p> <p>統計解析: Statistical Packages for the Social Sciences (SPSS) Version 20.0.3 を用いて統計解析を実施。各実験は 3 回反復して各試験条件で実施、値は 5 回の実験平均±標準偏差。一元配置 ANOVA を用いて、処置間の有意差 (P < 0.05) を決定。</p>
<p>試験結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・アナターゼ及びルチル TiO₂ NP は、マクロファージに対して明確な毒性を示した。MTT アッセイで 12.5mg/L 以上の TiO₂-R は、代謝活性の明らかな低下を引き起こしたが、TiO₂-A は、50mg/L 以上の濃度でのみ減少した (図 2A)。PI 染色による細胞生存率の評価でも、TiO₂-R は 12.5mg/L までの生存細胞で有意な減少をもたらした、TiO₂-R によって誘導された PI 陽性細胞のパーセントは 25mg/L 以上の濃度で TiO₂-A よりも高く (図 2B)、アナターゼ型 TiO₂ NP がルチル型 TiO₂ NP よりも毒性が低いことを示した。TiO₂-R による代謝活性の低下は 12.5mg/L で開始したが、両タイプの NP による細胞生存率の低下は 25mg/L で開始し、細胞死の増強以外の他のメカニズムが、ルチル TiO₂ に関連した毒性で機能していた。 ・ROS の蓄積とオートファジーの両方は、アナターゼとルチル型 TiO₂NP との間の毒性の違いに関与していなかった。細胞 ROS レベルの測定で、DCFH-DA 染色は、TiO₂-NP の両タイプがマクロファージにおける ROS 蓄積の増加をもたらしたが、両タイプで処理した細胞間 ROS レベルに有意差はなかった (図 3A)。ROS スカベンジャー NAC は、両タイプ処理細胞間で細胞生存率の差を減少させなかった (図 3B)。試験濃度 TiO₂ NP で、NAC は TiO₂-R の細胞損傷への影響を与えなかったが、TiO₂-A の毒性を効果的に弱めた (図 3B)。ウェスタンブロッティングでは、両タイプが LC3-II 含量を僅かに増加させたが、の LC-I・LC-II 含有量に明確な差はなかった (図 S2)。 ・マクロファージは、マクロファージにおいてアナターゼ及びルチル型 TiO₂NP と同様の取込み能力を示した (図 3)。 ・アナターゼ TiO₂ NP は、ルチル TiO₂ NP よりも重度の壊死を引き起こさなかった。アポトーシスの検出により、12.5mg/L 及び 50mg/L 濃度の TiO₂-A は、TiO₂-R よりもより深刻なアポトーシスを引き起こしたが、100mg/L に達すると、TiO₂-R と同様のアポトーシス誘導活性を有した (図 4A)。アポトーシスは、TiO₂-R よりも TiO₂-A の毒性が低いことと関連していなかった。FITC-アネキシン V/PI 染色による壊死の検出は、MTT アッセイおよび細胞生存率アッセイの結果と一致し、TiO₂-A は、示された濃度で TiO₂-R よりも低いレベルの壊死細胞を誘導した (図 4B)。アポトーシスではなく、壊死がアナターゼ TiO₂NP のより低い毒性に関与していることを示唆した。 ・アナターゼ TiO₂NP は、ルチル TiO₂NP よりも重度の LMP を引き起こした。TiO₂-A で処理された細胞のほとんどは、対照細胞と同様に、リソソーム蛍光の点で分布した (図 5A) のに対し

	<p>て、TiO₂-R で処理された豊富な細胞は、全細胞蛍光の分布を有しており(図 5A)、細胞が TiO₂-R の処理下で LMP の網状化を起こした。LMP 陽性細胞の計数から、TiO₂-R は、濃度が 12.5mg/L でも、TiO₂-A よりも LMP 陽性細胞の方がはるかに高かった(図 5B)。TEM 観察により、TiO₂-R に起因する重度のリソソーム損傷が確認されたが、ほとんどの TiO₂-A 含有リソソームは無傷のままであった(図 5C)。対照的に、TiO₂-R NP はリソソームの内面に付着する傾向があり(図 4S)、リソソーム膜が明らかに破壊された(図 5C)。損傷したリソソームは、TiO₂-A によって引き起こされるものよりもはるかに豊富であった(図 5D)。さらに、PM に付着した TiO₂-R NPs は PM 損傷を引き起こし、細胞内の細胞質の放出が続いた(図 5C)。これらの観察は、TiO₂-A 及び TiO₂-R がリソソームに損傷を与える別個の能力を有し、LMP の増加が壊死の増強及び TiO₂-R の高い毒性に関連することを示唆した。</p> <p>・アナターゼ TiO₂ NP は、ミトコンドリアのルチル TiO₂ NP に対してより高い毒性を示した。マクロファージにおけるミトコンドリア機能の評価のための MMP アッセイで、12.5~50mg/L 濃度の TiO₂-A が TiO₂-R よりも MMP のより深刻な低下を引き起こすことを示した。TiO₂-A と TiO₂-R の処理(図 6A)の間で、MMP を低下させた細胞の割合に差はなかった。RET アッセイにより、マクロファージのミトコンドリアとの相互作用の間に、両タイプで RET に対して顕著な阻害効果を示した。TiO₂-A は、全濃度で TiO₂-R よりも強い RET 阻害活性を示した(図 6B)。観察結果から、TiO₂-A がミトコンドリアに強い影響を与え、TiO₂-A 処理マクロファージにおけるアポトーシスの増強に寄与する可能性のある TiO₂-R よりも重度のミトコンドリア機能障害をもたらすことを示した。</p> <p>・アナターゼ及びルチル TiO₂NP は、タンパク質及びリン脂質に明確な吸着活性を有した。タンパク質及びリン脂質との吸着実験による相互作用の検出から、BSA/TiO₂ NP の吸着等温線は、TiO₂-A が TiO₂-R よりもこのモデルタンパク質に対して高い吸着親和性を示すことを示した(図 7A)が、モデルリン脂質 PE の吸着等温線は、リン脂質に対する TiO₂-A よりも TiO₂-R の吸着活性が大きいことを明らかにした(図 7B)。</p>
結論	<p>本研究は、類似のサイズ及びゼータ電位を有するアナターゼ及びルチル型 TiO₂ NP が、タンパク質およびリン脂質に対するそれらの異なる親和性のために、マクロファージ中のオルガネラに対して異なる毒性及び異なる損傷効果を有することを実証した。以前の所見とは対照的に、TiO₂-A は、TiO₂-R(10%対 50mg/L で 20%)と比較して低い細胞死割合を示し、TiO₂-R と比較してより低い毒性を示した。TiO₂-A 及び TiO₂-R で処理されたマクロファージは、類似の活性酸素種(ROS)およびオートファジーマーカー LC3 を有し、我々の観察された毒性の差異は酸化損傷およびオートファジーに起因しないことを示唆している。興味深いことに、TiO₂-A は、重度の壊死およびリソソーム膜透過性(LMP)を引き起こすが、より重篤なミトコンドリア機能不全を引き起こす。吸着アッセイはさらに、TiO₂-A 及び TiO₂-R がそれぞれタンパク質およびリン脂質に対してより高い親和性を有することを明らかにする。本研究は、ナノ毒性における異なる生体分子に対する結晶相関連表面親和力の重要な役割を明らかにした。したがって、NP と生物系との間の相互作用を減弱または増強するために、NP の結晶相を合成手順中に制御することができる。</p>

No	TiO2-11
論文題目 (和訳)	Exposure to nano-size titanium dioxide causes oxidative damages in human mesothelial cells: The crystal form rather than size of particle contributes to cytotoxicity (ナノサイズの二酸化チタンへのばく露が、ヒト中皮細胞における酸化損傷を引き起こす: 粒子サイズよりも結晶形が細胞傷害性に寄与する)
著者 所属機関	Kenji Hattori ^a , Kazuhiko Nakadate ^b , Akane Morii ^a , Takumi Noguchi ^a , Yuki Ogasawara ^c , *, Kazuyuki Ishii ^a a) Department of Hygienic Chemistry, Meiji Pharmaceutical University, Japan b) Department of Basic Science, Educational and Research Center for Pharmacy, Meiji Pharmaceutical University, Japan c) Department of Analytical Biochemistry, Meiji Pharmaceutical University, Japan
書誌事項	Biochemical and Biophysical Research Communications 492 (2017) 218e223
試験物質	nTiO ₂ 、微細 TiO ₂ 粒子 (アナターゼ型)
試料調整法	TiO ₂ 粒子を分散媒中に懸濁し、超音波ホモジナイザーで 5 分間超音波処理。全ての対照実験で、細胞を等量分散培地で処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ヒト胸膜中皮細胞 (American Type Culture Collection) 細胞培養・処理: ヒト胸膜中皮細胞 (MeT-5A) 株を、10% FBS、ペニシリン (100mg/mL)、ストレプトマイシン (100mg/mL) を補充した M199 中で、37°C の加湿インキュベーター中で 5% CO ₂ 、95% 空気の雰囲気下で培養。細胞を、図に示されている時間間隔で、6cm ディッシュまたはウェルプレートに TiO ₂ 粒子の有無で培養。 LDH アッセイ: 透過性アッセイを用いて細胞膜の完全性をモニターし、乳酸デヒドロゲナーゼ (LDH) の培地への放出を測定。LDH 漏出は、細胞毒性 LDH アッセイキット-WST により測定。試料の吸光度は、マイクロプレートリーダーにより測定 (450nm)。 細胞内 ROS の測定: MeT-5A 細胞をウェルプレート (2.5×10 ⁴ 細胞/ウェル) で培養。細胞を異なる時間および異なる濃度で nTiO ₂ で処理。nTiO ₂ を含む、または含まない処理後、細胞を PBS で洗浄、37°C で FBS を含まない M199 培地中の 10mM DCF-DA で処理。30 分間培養後、細胞をウェルプレートに移動。485nm、535nm の励起波長及び発光波長で蛍光強度を測定、蛍光単位として表現。 DNA 中の 8-OHdG の定量: サンプル調製中の人工 8-OHdG 生成を最小にするために、カトリック NaI 法を用いて DNA を抽出、鉄キレート剤であるデフェロキサミンを添加し鉄触媒フェントン反応を抑制。DNA Extractor キットを用いて MeT-5A (5~10 ⁶ 細胞) から核 DNA を抽出。沈殿した DNA を、ヒドロキシル化ブチルヒドロキシル含有エタノール中に一晩保存。蒸留水に溶解した DNA 等量を 95°C で 2 分間変性、氷上で急速冷却。熱変性 DNA を、酢酸ナトリウム緩衝液 (pH4.5) 中で 37°C で 30 分間、ヌクレアーゼ P1 (20 単位/ mL) とともに消化、アルカリホスファターゼをトリス緩衝液 (pH8.5) 中で 37°C で 30 分間培養。この溶液を遠心分離。上清をフィルターユニットを備えたチューブに移し、遠心分離、電気化学的検出器および UV 検出器を備えた HPLC カラムに注入。標準試料として 2-デオキシグアニン (0.5mg/mL) および 8-OH-dG (5ng/mL) 溶液を使用。8-OHdG の値は、106dG あたりの残基数として計算。 TEM 観察: TiO ₂ の細胞内への摂取について超構造的に調べた。異なるタイプの TiO ₂ にばく露し培養した MeT-5A 細胞を、15 分/24 時間/48 時間の処理後、リン酸緩衝液 (pH7.4) 中のパラホルムアルデヒドおよびグルタルアルデヒド中に固定。細胞をリン酸緩衝液中の 1% OsO ₄ で後固定。1% ウラニルアセテートで一括染色、段階的濃度のエタノールで脱水、プロピレンオキシドに浸漬。細胞を Epon-812 樹脂に包埋、60°C で 48 時間重合。Epon-812 樹脂に包埋した細胞を、光学顕微鏡下でトリミング。超薄切片 (厚さ 70nm) を切断、超薄切片を透過型電子顕微鏡で検査、画像を CCD カメラで捕捉。
試験結果	nTiO₂ の細胞毒性: LDH アッセイから、コントロール細胞と比較して 48 時間の処理後に nTiO ₂ のアナターゼ型で細胞毒性が有意に観察された (図 1)。対照的に、媒体中に 200mg/mL の TiO ₂ 粒子で処理した場合、ルチル型の nTiO ₂ またはアナターゼ型微粒子 TiO ₂ で著しい LDH の漏出は観察されなかった (図 1A)。放出された LDH 活性は全 LDH 活性の約 5% であったが、nTiO ₂ アナターゼ型で細胞傷害性の用量および時間依存性が観察された (図 1B)。 TiO₂ ばく露により誘導される MeT-5A の細胞内 ROS 生成: nTiO ₂ アナターゼ型が、処理 2

	<p>時間後に 100mg/mL 濃度のルチル型 nTiO₂ 処理と比較して、ROS レベルが 2.5 倍増加することを示唆した (図 2A)。8 時間または 24 時間の処理後に、アナターゼ型 nTiO₂ から用量依存的に RPS が生成されたことが明らかに示された (図 2B)。</p> <p>DNA 中の 8-OHdG 形成は、MeT-5A 細胞において nTiO₂ によって増加: 3 種類の TiO₂ 粒子にばく露後の MeT-5A 細胞は、8-OHdG 形成の傾向が異なった。細胞を各形態の TiO₂ で 24 時間処理すると、アナターゼ型 nTiO₂ のみが、未処理細胞の値 (コントロール) と比較して 8-OHdG のレベルを有意に増加させた (図 3)。12~48 時間までの全測定点で、未処理対照と比較して 8-OHdG の有意な減少が観察されたが (p < 0.05)、nTiO₂ のアナターゼ型処理の 24 時間後に最大の蓄積が見られた。これらの結果は、8-OHdG 形成が、単に nTiO₂ へのばく露によって引き起こされる ROS 形成と単に相関するものではないことを示した。</p> <p>MeT-5A 細胞における nTiO₂ の取込み: nTiO₂ のアナターゼ型にばく露されたすべての細胞はかなりの量の nTiO₂ を摂取し、蓄積した nTiO₂ が細胞質で観察された (図 4A, a)。アナターゼ TiO₂ (アナターゼ) の微粒子にばく露で、少数の細胞が TiO₂ 粒子を蓄積したが (図 4A, b-1)、大部分の細胞では TiO₂ 粒子は吸収されなかった (図 4A, b-2)。ルチル型 nTiO₂ (ルチル) にばく露した場合、TiO₂ 粒子の細胞取込みは観察されなかった (図 4A, C)。アナターゼ型 nTiO₂ の長期間ばく露による細胞形態の変化の観察 (図 4B) で、TiO₂ 処理なし細胞及び TiO₂ に 15 分間ばく露した細胞は、健康な形態を示した (図 4B, a)。TiO₂ への 24 時間ばく露細胞は、大量の TiO₂ を取込んだが、ほとんどの細胞は健康な形態を有していた (図 4B, b)。TiO₂ への 48 時間ばく露後、細胞質中の TiO₂ の蓄積が、24 時間ばく露後細胞のと同様であることを観察した (図 4B, c)。大部分の細胞は、特に核膜において、健康な形態を示さなかった (図 4B, d)。ほとんどの細胞において、多くのオートファゴソーム様構造または液胞が観察された。</p>
<p>結論</p>	<p>この研究では、二酸化チタン粒子の形態および形態に焦点を当てた。ヒト由来胸膜中皮細胞に対するナノサイズのアナターゼとルチル型二酸化チタンとの効果を比較すると、アナターゼ型は細胞に活発に吸収され、活性酸素種を生成し、DNA に酸化的損傷を引き起こすことが示された。対照的に、ルチル型が細胞に容易に吸収されず、したがって、酸化的 DNA 損傷を引き起こさず、細胞に著しく損傷を与えないことを初めて示した。これらの結果は、ヒト由来の中皮細胞に対する二酸化チタン粒子の毒性に関して、粒径よりも結晶形が細胞吸収に対してより大きな効果を有することを示唆している。また、吸収の差は、中皮細胞に対する毒性の差の主な原因であることが示された。</p>

No	TiO2-12
論文題目 (和訳)	Immunotoxic effects of thymus in mice following exposure to nanoparticulate TiO2 (ナノ粒子TiO2にばく露したマウスにおける胸腺の免疫毒性効果)
著者 所属機関	Fashui Hong ^{1,2,3,4} Yaoming Zhou ⁵ Yingjun Zhou ^{1,2,3,4} Ling Wang ⁶ 1) Department of Food, Jiangsu Collaborative Innovation Center of Regional Modern Agriculture and Environmental Protection, Huaiyin Normal University, China 2) Department of Food, Laboratory for Food Safety and Nutritional Function, Huaiyin Normal University, China 3) Department of Food, Jiangsu Key Laboratory for Eco-Agricultural Biotechnology Around Hongze Lake, Huaiyin Normal University, China 4) Department of Food, School of Life Sciences, Huaiyin Normal University, China 5) Department of Food, Jiangsu Food and Pharmaceutical Science College, China 6) Department of Food, Library of Soochow University, China
書誌事項	Environmental Toxicology. 2017;32:2234–2243.
試験物質	TiO2 NP: アナターゼ型。粒子サイズ 約 5~6nm、表面積 174.8m ² g ⁻¹ 、流体力学的直径 294nm、ゼータ電位 9.28mV (特性は参考文献 22・23 を参照。)
試料調整法	TiO2 NP の調整: 参考文献 22・23 を参照。TiO2 NP 粉末を 0.5%w/v ヒドロキシプロピルメチルセルロース (HPMC) K4M 溶液中に分散、懸濁溶液を 30 分間超音波処理、機械的に 5 分間振動。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 5 週齢の雌性 ICR マウス (18-22g) (蘇州大学動物センター) ばく露条件: TiO2 NP 懸濁液 (0/1.25/2.5/5mg/kg-体重) を毎日 9 か月間、胃内栄養により投与。温度制御下 (24±2°C)、明暗 12 時間サイクル、相対湿度 (60±10%) の動物室でオートクレーブ処理水とげっ歯類の食餌を自由に与えた。投与前にマウスを 5 日間馴化。 胸腺指標の評価: TiO2 NPs 処理後に体重を測定し、麻酔後屠殺。血液サンプルを眼静脈から回収。胸腺を迅速単離、胸腺重量を測定、胸腺の固有指標を胸腺 (湿重量、mg) 対体重 (g) の比として算出。各群の 5 匹のマウスから新鮮な胸腺を、組織病理学的検査用にパラホルムアルデヒド溶液にすばやく浸漬。残った新鮮な胸腺を液体窒素中に迅速貯蔵、タンパク質発現について試験。 タンパク質含量分析: 約 0.1g の胸腺を秤量、解凍、消化、タンパク質含量を分析。 血液学的パラメータ決定: 抗凝固剤としてエチレンジアミン四酢酸 (EDTA) 含有チューブに血液試料 (各 n=5) を採取。赤血球 (RBC)、網状赤血球 (Ret)、白血球 (WBC)、ヘモグロビン (HGB)、血小板 (PLT)、平均赤血球ヘモグロビン濃度 (MCHC)、平均赤血球ヘモグロビン (MCH)、平均赤血球体積、及び平均血小板容積 (MPV) を、血液自動分析装置で測定。 細胞調製およびフローサイトメリー分析: 胸腺をマウスから切開、単細胞浮遊液を無菌条件下で調製。懸濁液をステンレススチールメッシュに通し、4°C、200×g で 10 分間遠心分離、完全細胞培養培地に再懸濁、細胞密度を 1.5×10 ⁶ 細胞 cell mL ⁻¹ に調整。胸腺の収穫後、胸腺組織切片を捨棄してシリンジのプランジャーで粉砕し、RPMI 1640 培地に懸濁させることで、単一細胞懸濁液を調製。赤血球を除去するために溶血緩衝液で胸腺細胞を処理。5×10 ⁵ 個の胸腺細胞を、フルオレセイン活性化細胞選別機 (FACS) 緩衝液で 1 回洗浄。細胞を、CD3、CD4、CD8、CD19 および NK1.1 に対する抗マウスモノクローナル抗体で染色。FACSCaliber で 4 色フローサイトメリーにより細胞分析。B 細胞、CD3T 細胞、CD4T 細胞、CD8T 細胞、二重陽性胸腺細胞、二重陰性胸腺細胞、および NK 細胞含有リンパ球サブセットを分析。各細胞集団サイズは、Hemavet または血球計によって記録された全リンパ球数とフローサイトメーターにより記録された陽性リンパ球の百分率との積として計算。全データを BD Biosciences Cellquest 分析ソフトウェアで解析。 組織病理学的評価: 各群 5 匹のマウスからの胸腺を、組織学的評価のために中性緩衝ホルマリン中に固定。光学顕微鏡法を用いて形態学的評価のために、パラフィン包埋組織切片を切開、ヘマトキシリンおよびエオシンで染色。 ELISA を用いたタンパク質発現アッセイ: 胸腺組織由来タンパク質を抽出。組織の 1.00g 等量を抽出緩衝液 (RIPA 緩衝液) と混合、25 分間連続振とう、遠心分離。上清を回収、220°C で保存。全試料を 2 回抽出。胸腺組織中の、正常な T 細胞発現および分泌 (RANTES)、ヘルペスウイルス増殖因子活性化受容体 γ 共活性化因子-1 アルファの活性化に調節される IκB、IκB キナーゼ (IKK) 1、IKK2、インターロイキン-16 (IL-16)、IL-好中球セラーチナーゼ関連リポカン

	<p>(NGAL)、ペロキシソーム増殖因子活性化受容体 γ (PPAR-γ)、プリン作動性 (P2X) 受容体-7 (P2X7)、プロスタグランジン E2 (PGC1-α)、シクロオキシゲナーゼ 2 (COX-胸腺組織における低酸素誘導因子 1-α (HIF-1α)、インターフェロン誘導性タンパク質 10 (IP-10)、および葉柄因子 1 (TFF1) タンパク質の発現のレベルをそれぞれのタンパク質に選択的な市販キットを用い、酵素結合免疫吸着アッセイ (ELISA) 法により測定。吸光度は、450nm のマイクロプレートリーダーで測定、IκB、IKK1、IKK2、IL-1β、IL-4、RANTES、PGC1-α、COX-2、NGAL、PPAR-γ、P2X7、PGE2、HIF-1α、IP-10、TFF1 を、各サンプル (各 n=5) についての標準曲線から計算。</p> <p>ウェスタンブロットを用いたタンパク質発現アッセイ: 胸腺組織を氷冷 RIPA 溶解緩衝液中でホモジナイズ、プロテアーゼ阻害剤を 1% RIPA 溶解緩衝液の用量で添加。全タンパク質 (30-50μg) を 8% または 12% SDS-PAGE に供し、ニトロセルロースメンブレンに移し、1 次抗体 (抗 NF-κB (1:1,000)、抗 t/p-ERK1/抗 t/ p-JNK (1:500)、抗 t/p-p38 (1:500)、および抗 β-アクチン (1:2,000)) で培養。TBST で洗浄後、室温で 2 時間、膜を HRP コンジュゲート二次抗体 (1:10,000) と共に培養後、増強化学発光を用いて検出。免疫反応性バンドを X 線フィルムを用いて視覚化。定量分析のために、バンドを ImageJ ソフトウェアで評価、β-アクチン密度について標準化。</p> <p>統計解析: SPSS 19.0 ソフトウェアを用いて統計解析、一元配置 ANOVA、続いて Tukey's HSD post hoc test を用いて統計的比較分析。</p>
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> • 体重、胸腺重量、胸腺指標およびチタン蓄積: 体重は明らかに減少したが (P <0.05)、胸腺の胸腺重量、胸腺指標およびチタン含量は有意に増加した (図 1、P <0.05)。コントロールのチタン含量は検出できなかった。 • 血液学的パラメーター: 血液学的パラメーターから、TiO₂ NPs ばく露は、WBC、RBC、Ret、HGB 及び MCHC を大幅に減少させる一方で、血液中で用量依存的に MCV、MCH、PLT、及び MPV を有意に上昇させることを示唆した (表 1、P <0.05)。 • 胸腺由来のリンパ球サブセット: CD31 については 19.03%、33.6%、51.1% の減少を伴ってリンパ球サブセットが顕著に減少したことが観察された (図 2)。CD41 は 26.78%、35.84%、50.46%、CD81 は 24.81%、31.23%、36.18%、B 細胞では 12.11%、26.21%、35.75%、NK 細胞では 18.57%、37.98%、48.99% であった (p <0.05)。種々の TiO₂ NP ばく露マウスにおける CD41 対 CD81 比は、各々 2.84%、6.7% および 22.38% 減少した (P <0.05)。 • 組織病理学的評価: 非ばく露胸腺サンプルは、皮質、小葉で見える無傷の包皮で囲まれた髄質を伴う正常な構造を示したが、TiO₂ NP ばく露群は、マクロファージの身体によって出現する皮質の典型的な外観、出血、重度の溶血または鬱血、脂肪変性、及び細胞アポトーシスまたは壊死を含む、顕著な病理学的変化を示した (図 3)。この結果は TiO₂ NP への慢性ばく露はマウスの胸腺損傷をもたらし、これは胸腺免疫および/または炎症関連マーカー発現の変化に関連する可能性があることを示唆している。 • 免疫/炎症因子を含むタンパク質発現: TiO₂ NP がそれぞれ IKK1/2、IL-1β、IL-4、RANTES、COX-2、NGAL、P2X7、IP-10、及び HIF-1α タンパク質の発現を大きく誘導すること、胸腺における IκB、PPAR-γ、PGC-1α、PGE2、及び TFF1 タンパク質の発現をそれぞれ用量依存的に有意に抑制すること、を示唆した (表 2)。 • NF-κB 媒介性 MAPK 経路の活性化: 胸腺における NF-κB、p-JNK、p-p38、および p-ERK1/2 の発現は、TiO₂ NP の用量が増加するにつれて用量依存的に有意に上昇し、0.14、0.95、1.03 倍; 0.69、0.81、1.21 倍; 0.38、0.63、0.86 倍; 0.04、0.48、0.85 倍または 0.02-0.24 および 0.77 倍であった (図 4、P <0.05)。
結論	<p>本研究では、TiO₂ NP に長期間ばく露することで、マウスの胸腺損傷、血液中の WBC、RBC、Ret、HGB、MCHC および CD31、CD41、CD81、B 細胞の減少による免疫刺激効果、及び胸腺における NK 細胞、血中の MCV、MCH、PLT 及び MPV の増加が生じる可能性があることが示唆された。さらに、TiO₂ NP によって引き起こされるこれら免疫感作効果は、マウス胸腺における、NF-κB、IKK1/2、IL-1β、IL-4、RANTES、COX-2、NGAL、P2X7、IP-10、HIF-1α、p-JNK、p-p38、と p-ERK1/2 タンパク質の発現増加と、IκB、PPAR-γ、TFF1、PGC-1α、と PGE2 の発現低下による NF-κB 媒介性 MAPK 経路の活性化と免疫/炎症因子の発現の変化と関連していた。これらの結果は、動物またはヒトにおける免疫器官の潜在的な毒性としての TiO₂ NP の免疫毒性作用についての洞察を提供する。そのため、日焼け止めや化粧品、食品や練り歯磨きなどに TiO₂ NP を使用すると、ヒトの潜在的なリスクがあり、より注意を払う必要がある。マウス胸腺の TiO₂ NPs 誘発免疫毒性の可能性のある機構を示す概略図を図 5 に示した。</p>

(5) SiO₂

No	SiO ₂ - 1
著者 所属機関	Inhibition of gap junction intercellular communication is involved in silica nanoparticles-induced H9c2 cardiomyocytes apoptosis via the mitochondrial pathway. (ギャップ結合細胞間伝達の阻害はミトコンドリア経路を経由したシリカナノ粒子誘発 H9c2 心筋細胞アポトーシスに關与する)
論文題目 (和訳)	Du ZJ ¹ , Cui GQ ² , Zhang J ¹ , Liu XM ³ , Zhang ZH ¹ , Jia Q ¹ , Ng JC ⁴ , Peng C ⁵ , Bo CX ¹ , Shao H ¹ . 1Department of Toxicology, Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences. 2Department of Respiratory Medicine, Qilu Children's Hospital of Shandong University, Jinan. 3Department of Radiation Chemistry and Toxicology, School of Public Health, Jilin University, Changchun, People's Republic of China. 4National Research Centre for Environmental Toxicology-Entox, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia. 5Department of Toxicology, Shandong Academy of Occupational Health and Occupational Medicine, Shandong Academy of Medical Sciences; National Research Centre for Environmental Toxicology-Entox, The University of Queensland, Brisbane, QLD, Australia.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Mar 20;12:2179-2188. doi: 10.2147/IJN.S127904. eCollection 2017.
試験物質	シリカナノ粒子 (SNP) : 直径 = 60 nm、質量濃度 = 12.4 g/L。 提供先: School of Chemistry, Jilin University
試料調整法	保存媒体: 無血清 DMEM
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ラット心筋細胞株 H9c2 (2-1) (カタログ番号: GNR 5) 購入先: Cell Resource Center, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences. 投与方法・期間及び試験用量 ①細胞生存性 (CC K-8 アッセイ) (WST-8 cell counting kit (CCK-8 Kit; Dojindo, Kumamoto, Japan) 使用) H9c2 細胞は SNPs にばく露 (12.5、25、50、100、200 µg/mL ; 1、6、12、24、48 時間)。それから、10 µL の CCK-8 溶液を各 well に添加し、追加の 1 時間、37°C で培養。 ②ギャップ結合活性分析 (ギャップ結合細胞間伝達 (GJIC) の評価のためにスクレイプ - ローディング/色素移動法を使用) 処理後、実施。 ③ギャップ結合細胞間伝達 (GJIC) の変調 GJIC 変調のための薬理的薬品は保存溶液としての DMSO に溶解。相乗作用プロセスのために、細胞は、SNPs ばく露に先立って及び処理を通じて、24 時間、ギャップ結合活性化剤レチノイン酸と共に培養 (RA, 10 µM in DMSO)。また、遮断薬カルベノキソロン二ナトリウム (CBX, 50 mM in DMSO) と共に培養。コントロール細胞は、DMSO だけで培養。 ④ Annexin V-FITC/PI アポトーシスアッセイ (アポトーシスの定量化: Annexin V-FITC/PI 二重染色アッセイ付きフローサイトメーター (Becton Dickinson, Franklin Lakes, NJ, USA)) 100 µg/mL の SNPs への 24 時間ばく露後、細胞採取。 ⑤Western blot アッセイ (GJIC/アポトーシス-関連蛋白質の発現を測定) 処理後、すぐに細胞採取。
試験結果	①細胞生存率テスト SNPs へのばく露後、細胞生存率は濃度・および時間依存的に、コントロールセルに比べて減少した。SNPs の明らかな細胞毒性は、100µg/mL、24 時間で観察 (対コントロールの生存率 = 約 75%)。SNPs によって引き起こされたアポトーシスにおける GJIC の役割の検討条件を 100µg/mL 以下、24 時間を選定。 ②GJIC 阻害 GJIC 阻害は用量依存的。24 時間 SNPs 処理後、Cx43 蛋白質発現は有意にダウンレギュレート、P-Cx43 のレベルは有意に上昇。 ③SNPs 誘発アポトーシスに及ぼす GJIC の影響 ギャップ結合機能は 2 つの方法で操作される (RA による結合チャンネルの強化、CBX による阻害)。特に、100µg/mL SNPs と組み合わせられた RA は、SNPs 処理だけと比較し大幅に細胞生存率を増大させた、大幅に減少した細胞毒性を産出した。

	<p>④Annexin V-FITC/PI 二重染色 アポトーシス比は、③同様の結果(100μg/mL、24 時間処理)。 ⑤SNPs 処理の後に続くアポトーシス関連蛋白質の発現に及ぼす GJIC の影響 RA-前処置群で Bcl-2/Bax 比率有意に増大、一方 CBX-前処置群で有意に減少。SNPs- 処理群に比べて、カスパーゼ-3 とカスパーゼ-9 の発現は、SNPs および RA による処理群 で有意にアップレギュレート、一方、SNPs と CBX による処理による処理群で有意にダウンレ ギュレートされた。これらの結果は、GJIC が、SNPs 誘発アポトーシスにおいてミトコンドリア 経路を調整することを示唆する。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究は、SNPs がアポトーシスに加えて GJIC 阻害を引き起こすことを示した。重要な意味 は、強化された GJIC がオフターゲットの損傷または防御を発揮するのに対して、抑制された GJIC が H9c2 セルの細胞毒性を増大させることである。それは、また、GJIC ダウンレギュレ ーションが H9c2 細胞における細胞毒性影響のための潜在的なメカニズムと考えられること を示唆する。</p>

No	SiO ₂ - 2
論文題目 (和訳)	Silica nanoparticles induce cardiotoxicity interfering with energetic status and Ca (2+) handling in adult rat cardiomyocytes. (シリカナノ粒子は、成体ラット心筋細胞におけるエネルギー状態及びCa(2+) handlingに害を与える心毒性を誘発する)
著者 所属機関	Guerrero-Beltrán CE ^{1,2} , Bernal-Ramírez J ¹ , Lozano O ^{1,3} , Oropeza-Almazán Y ¹ , Castillo EC ¹ , Garza JR ¹ , García N ^{1,2} , Vela J ¹ , García-García A ⁴ , Ortega E ⁵ , Torre-Amione G ^{1,2,6} , Ornelas-Soto N ⁷ , García-Rivas G ^{8,2} . 1Cátedra de Cardiología y Medicina Vascul ar, Escuela Nacional de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México. 2Centro de Investigación Biomédica, Hospital Zambrano-Hellion, Tecnológico de Monterrey, San Pedro Garza-García, México. 3Namur Nanosafety Centre, Namur Research Institute for Life Sciences, Research Centre for the Physics of Matter and Radiation, University of Namur, Namur, Belgium. 4Centro de Investigación en Materiales Avanzados S.C. Unidad Monterrey, Apodaca Nuevo León, México. 5Department of Physics and Astronomy, The University of Texas at San Antonio, San Antonio, Texas. 6Methodist DeBakey Heart and Vascular Center, The Methodist Hospital, Houston, Texas; and. 7Laboratorio de Nanotecnología Ambiental, Centro del Agua, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México. 8Cátedra de Cardiología y Medicina Vascul ar, Escuela Nacional de Medicina, Tecnológico de Monterrey, Monterrey, México
書誌事項	Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2017 Apr 1;312(4):H645-H661. doi:10.1152/ajpheart.00564.2016. Epub 2017 Jan 27.
試験物質	・nano-SiO ₂ (Degussa, Parsippany, NJ): 平均直径=7nm(メーカー情報)、水力直径(超純水中)=91±22nm。ζ電位=-27.1±4.4mV。非晶質。純度95%以上。 ・micro-SiO ₂ (St Ober 法で合成): 670±32nm (FEG-SEM)、水力直径=712±212nm。ζ電位=-14.4±5.48mV。非晶質。純度95%以上。 ・F- micro-SiO ₂ (蛍光 micro-SiO ₂) 蛍光は、(3-アミノプロピル)トリエトキシシランの仮焼後のシリカネットワーク中の炭素及び酸素の欠損の導入に寄与する。
試料調整法	粒子の DLS 測定は、超純水、Tyrode 液、M-199、M-199+ウシ血清アルブミン(BSA) (5%) 溶液中に懸濁させて実施。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ラット心室筋細胞(灌流心臓のコラゲナーゼ II ダイジェッションのよって分離) 投与方法・ 期間及び試験用量: 様々な濃度、24 時間培養
試験結果	①細胞毒性(Alamar blue 生存率試験(Life Technologies, Carlsbad, CA)で測定)。ネクロシス・アポトーシス(BD FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, Heidelberg, Germany)で測定): nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は、両方とも、用量依存の顕著な細胞毒性影響を示し、それぞれ、IC ₅₀ =99.5±12.4µg/mL、>1,500µg/mL。細胞毒性はネクロシス経路で起こり、nano-SiO ₂ の方が早く起こる(LDH 放出によって示される)。 ②心筋細胞中の粒子(nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂)のキャラクタリゼーション(FEG-SEM、粒子誘起 X 線放射(Pixe) (細胞内粒子の定量)で分析。): nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は、両方とも、時間依存で内在化し、nano-SiO ₂ の方が内在化により好ましい。細胞膜とは単独及び凝集/凝結体で結合。 ③共焦点顕微鏡による F- micro-SiO ₂ の細胞内配置: 3次元像から、単独及び凝集/凝結体の内在化、細胞核域付近での配置を確認。 ④無傷の心筋細胞における Ca ²⁺ handling と細胞短縮(Ca ²⁺ 過渡電流、Ca ²⁺ スパーク、細胞短縮を測定): SiO ₂ 処理は、細胞収縮の減少、SERCA(注: 遺伝子名)活性の低下、β-アドレナリン刺激の損傷を引き起した。心筋細胞サルコメラ(筋節)短縮は、コントロール群比較で、nano-SiO ₂ 、micro-SiO ₂ は 34、36%減少。減少は、0.5 と 2.0Hz で残り、nano-、micro-SiO で差がなかった。 ⑤生体エネルギー状態測定(ミトコンドリア膜電位を共焦点顕微鏡によって評価):

	<p>SiO₂ 処理は、ミトコンドリア膜電位と ATP 含有量の低下を引き起した。 ⑥酸化ストレスマーカー(培地中の H₂O₂ 濃度の変化を検知): SiO₂ 処理は、ROS 産生とグルタチオン枯渇を引き起した。</p>
結論	<p>本研究の所見は、SiO₂ 誘発心筋細胞毒性が強いサイズ依存性であるという意見を支持する。①differential な時間依存的なネクロシスによる細胞死を伴い、アポトーシスの活性化がない、培養 24 時間後の differential な用量依存毒性を示した。②共焦点顕微鏡を用いて、非分裂・非食食性初代培養細胞における内在化現象を可視化した。③結果は、細胞機能に対する酸化ストレスの役割と SiO₂ 粒子に直接的影響: 害された Ca⁺ handling と細胞短縮の減少、を示した。これらの影響は、すべて、ミトコンドリア機能不全により、膜電位と ATP 含有量の低下として示された。</p>

No	SiO ₂ - 3
論文題目 (和訳)	Specifically Formed Corona on Silica Nanoparticles Enhances Transforming Growth Factor β 1 Activity in Triggering Lung Fibrosis. (シリカナノ粒子上の特別に形成されコロナは、肺線維症を起こすトランスフォーミング増殖因子 β 1 活性を高める)
著者 所属機関	Wang Z ¹ , Wang C ² , Liu S ¹ , He W ¹ , Wang L ¹ , Gan J ¹ , Huang Z ¹ , Wang Z ¹ , Wei H ¹ , Zhang J ^{1,3} , Dong L ¹ . 1State Key Laboratory of Pharmaceutical Biotechnology, NJU Advanced Institute for Life Sciences (NAILS), School of Life Sciences, Nanjing University, 163 Xianlin Avenue, Nanjing 210093, China. 2State Key Laboratory of Quality Research in Chinese Medicine, Institute of Chinese Medical Sciences, University of Macau, Taipa, Macau SAR, China. 3Jiangsu Provincial Laboratory for Nano-Technology, Nanjing University, Nanjing 210093, China.
書誌事項	ACS Nano. 2017 Feb 28;11(2):1659-1672. doi: 10.1021/acsnano.6b07461. Epub 2017 Jan 19.
試験物質	・フルオレセインイソチオシアネート(FITC)ラベルシリカナノ粒子(F-SiNPs)、シリカナノ粒子(SiNPs)(SiNPs-10、-30、-100、-200、-1000を含む):入手先;Kisker Biotech (Steinfurt, Germany) ・炭素ナノ粒子(CNP-100)、その他材料(CaCO ₃ 、Au、鉄-コバルト-ニッケル合金(FeCoNi)、Fe ₃ O ₄)から造ったナノ粒子:購入先;DK Nano (Beijing, China)
試料調整法	SiNPs-100 はさらに修飾;水和(H- SiNPs)、アミノ化(N- SiNPs)、ポリマー修飾(PEI(P-SiNPs)、デキストラン(D- SiNPs)、ゼラチン(G- SiNPs))
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ・ヒト肺癌上皮細胞 A549。提供先;Stem Cell Bank, Chinese Academy of Science (Shanghai, China) ・雄 ICR マウス(20±2g)。購入先;Model Animal Research Center of Nanjing University (Nanjing, China) ・投与方法・期間及び試験用量: 試験結果の項に記載。
試験結果	①エンドトキシン(内毒素)アッセイ ②・マウスにおける珪肺モデル(シリカ誘発肺繊維化発生のため) 異なるサイズ、修飾シリカ(0.02、0.1、1、2、4mg)、TGF- β 1(1 μ g)、TGF- β 1/SiNP-100 が懸濁している無菌生理食塩水(合計 50 μ L)をマウス気管に経口的に投与(首切開し、針で)。ばく露後 20 日(4mg 群)、56 日に殺処分。シリカは、1N HCl 中で煮沸、洗浄・乾燥後、生理食塩水に懸濁、超音波処理。 ・肺ホモゲネート調製 ・TGF- β 1 の酵素結合免疫吸着検査法(ELISA)(肺ホモゲネート中の TGF- β 1 濃度測定) ⇒SiNP-100 が肺線維化誘発の能力が他より高い。CNP は非誘発。健康な及び線維化の肺ホモゲネート中の TGF- β 1 濃度は、348.8±41.23 及び 1145±130.8pg/mL。 ③・SiNPs のコロナの形成と分離 SiNP は LH 又は TGF- β 1(10 μ g/mL)と、4°C、2 時間培養。遠心分離でナノ粒子-コロナ複合体を分離(ショ糖クッションを通して)。コロナから蛋白質を抽出。 ・蛋白質濃度アッセイ(コロナから抽出された蛋白質の全濃度検知;BCA アッセイ) ・SDS(Sodium dodecyl sulfate)-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE) コロナ中の蛋白質は、PAGE 試料緩衝液で抽出、熱変性、遠心分離後、12%SDS-PAGE ゲルにかけて、分離。 ・未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動(Native PAGE)(TGF- β 1 と SiNP の結合を分析) ・LC-MS 分析のための試料調製、トリプシン消化物の LC-MS 分析(抽出された蛋白質の分析) ・データベース検索、階層的クラスター分析、ヒートマップ解析、経路解析 LC-MS データからのペプチド及び蛋白質の識別は、ProteinPilot 4.5 software (AB SCIEX)を用いて実行。潜在的繊維化関連蛋白質の分析。 ・Western Blotting、定量的 Western Blotting(コロナ蛋白質の定量化) ・粒子当たりの蛋白質吸収数(PANPP)の絶対定量 定量的 Western Blotting の結果をもとに、mg SiNP-100 当たりの TGF- β 1 の相当量を計算。 ・フローサイトメトリーベースの粒子分析(FABA)(SiNP-コロナの表面上に TGF- β 1 がばく露されているか測定)

	<p>⇒SiNP 上のコロナ成分は CNP のそれとは異なり、より多くの線維化関連蛋白質を含んでいた。SiNP フラクシオン中では TGF-β1 が多く検知された。SiNP-100、-200 は他のサイズよりもより多く TGF-β1 を動員した(LH との培養)。2 時間培養の間、1 時間後にコロナ中の TGF-β1 含有量がピーク。Native PAGE で、SiNP は TGF-β1 の移動を遅らせることができた(TGF-β1 の SiNP 上への動員、安定化を示唆)。N-及び P-SiNP は TGF-β1 を動員しなかった(SiNP の負電位表面が動員促進)。</p> <p>④・上皮間葉転換(ETM)進行 A549 細胞は、PBS、TGF-β1 (5µg/mL)、SiNP-100 (50µg/mL)、TGF-β1/ SiNP-100、LH、又は LH/ SiNP-100 を用いて 48 時間刺激された。ETM は倒立位相差顕微鏡で評価。 ・創傷スクラッチアッセイ(ETM が細胞の増殖、移動を増加させる。その定量的評価に用いる。) ⇒SiNP-100 コロナ結合 TGF-β1 は肺上皮細胞中の ETM(肺線維化のキーステップ)を悪化させることを示唆。他のサイズの SiNP、N-及び P- SiNP は ETM 又は細胞移動を促進しなかった。</p> <p>⑤・RNA 分離と定量的リアルタイム PCR(A549 細胞及び肺組織の RNA は Trizol reagent を使用して抽出。PCR を用いて、mRNA 検知。)</p> <p>⑥・トランスフォーミング増殖因子-β1(Transforming Growth Factor-β1:TGF-β1)インターナリゼーションアッセイ(TGF-β1 結合媒体で A549 洗浄後、A549 は媒体中で 30 分、4℃で培養) ・膜蛋白質抽出(Western Blotting によって膜上の TGF-β1 の量を分析するため) 共沈アッセイ(SiNP 表面の TGF-β1 の生物反応性(細胞上のレセプターと結合できる)の確認。沈殿物中の蛋白質を Western Blotting によって測定) ⇒SiNP が分解のため細胞質ゾル中へ内在化されることから TGF-β1 を防ぐことができた、と示唆された。</p> <p>⑦・免疫蛍光抗体染色法(マウス中への F-SiNPs の気管内注入後 6 時間に肺組織採取) ・組織学的調査(肺組織の繊維化の激しさ;ヘマトキシリンエオジン染色、マッソントリクローム染色) ・肺のヒドロキシプロリン含有量の定量(ヒドロキシプロリンアッセイキット使用、コラーゲン含有量測定)</p>
結論	<p>本研究は、100nm サイズで SiNPs が肺中の蛋白質コロナ中に TGF-β1 を特に動員し豊富にすることができることを示す。SiNP コロナ結合 TGF-β1 は細胞レセプターと結合し肺線維化を引き起こす生物学的活性を保存しないだけでなく、細胞線維化を直接促進する TGF-β/Smad2 経路の緩慢な劣化と長期の活性化を示さない。所見は、近年広く感づかれている、ナノ粒子上のコロナが生物学的系における病理学的変化のような有害応答を引き起こす直接的な証拠を提供する。コロナ形成の制御を目的とした更なる研究は、珪肺症及びその他の関連疾患に対する有望な治療的アプローチを活気づけるかもしれない。</p>

No	SiO ₂ - 4
論文題目 (和訳)	Calcium signalling induced by <i>in vitro</i> exposure to silicium dioxide nanoparticles in rat pulmonary artery smooth muscle cells. (ラット肺動脈平滑筋細胞における二酸化珪素への <i>in vitro</i> ばく露によって誘発されたカルシウムシグナル伝達)
著者 所属機関	Dubes V ¹ , Parpaite T ¹ , Ducret T ¹ , Quignard JF ¹ , Mornet S ² , Reinhardt N ² , Baudrimont I ² , Dubois M ² , Freund-Michel V ² , Marthan R ³ , Muller B ² , Savineau JP ² , Courtois A ⁴ . 1 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France. 2 Université de Bordeaux, France; CNRS, ICMCB, France. 3 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France; Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Hôpital du Haut-Lévêque, Service d'Exploration Fonctionnelle Respiratoire, France. 4 Université de Bordeaux, France; Inserm U1045, Centre de Recherche Cardio-Thoracique de Bordeaux, France; Centre Hospitalier Universitaire de Bordeaux, Centre AntiPoison et de Toxicovigilance d'Aquitaine et de Poitou Charente, France.
書誌事項	Toxicology. 2017 Jan 15;375:37-47. doi: 10.1016/j.tox.2016.12.002. Epub 2016 Dec 7.
試験物質	・15nm-SiO ₂ NPs (テトラエトキシシランを EtOH、水、アンモニアの溶液に投入し、室温で一晩反応させて合成後、精製ろ過して作製)。TEM 測定直径 = 15±2.5nm。DLS 測定粒度分布、多分散指数 = 24nm、0.235。ζ 電位 = 約 -55mV (pH7.4)。 ・炭素 NP (一次直径 = 13-14nm)、入手先; Degussa (Germany) ・(TiO ₂) NP (一次直径 = 15nm)、入手先; Sigma Chemical Co. (St Quentin-Fallavier, France)
試料調整法	NP は、脱イオン水に 10 mg/mL 濃度で懸濁、使用前に超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 雄 Wisper ラット (200-300 g; Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France) 第一群 (正常酸素ラット、n=6); 大気ばく露。 第二群 (低酸素ラット、n=10); 3 週間連続 (慢性) 低酸素ばく露。低酸素肺高血圧症 (Fulton 比 0.51 以上)。 新鮮な分離した肺動脈平滑筋細胞 (PASM) は酵素解離法を使用して、得た。 試験前に、細胞質カルシウム [Ca ²⁺] _i を蛍光イメージングで測定。 ・投与方法・期間及び試験用量: 増殖試験 (Ducret ら、2008 のように); 1-500 µg/mL、48 時間 (DNA 合成は、Cell Proliferation ELISA, BrdU colorimetric method を使用して評価)
試験結果	① NP への急性ばく露による細胞内カルシウムシグナルの活性化 (FURA-PE3 (カルシウム蛍光高感度プローブ) 負荷 PASM 細胞に 50µg/mL の各 NP を急性添加): 蛍光比 (F340/F380) ([Ca ²⁺] _i を意味する) を約 10 分間測定。NP 添加が [Ca ²⁺] _i を数秒以内に増加させた (ピーク応答し、その後減少)。Δ 比 (F340/F380) はどの NP でも増加したが、SiO ₂ NP で最も大幅増加。また、用量依存で増加。 ② 細胞外カルシウム源とカルシウム侵入経路 細胞外カルシウム源不在は SiO ₂ NP 誘発カルシウム応答の増幅を減少、カルシウム侵入チャンネルのうち電圧操作チャンネル関与に注目する。 ③ 細胞内カルシウム源 (筋小胞体成分の関与) タプシナルギン (小胞体膜状の Ca ²⁺ -ATPase (SERCA) 阻害剤) で前処理した PASM 細胞は、SiO ₂ NP 誘発 [Ca ²⁺] _i 上昇を阻害。 ④ 酸化ストレスの関与 SiO ₂ NP は酸化ストレスを誘発できるが、わずか。抗酸化剤 N-アセチルシスチンが SiO ₂ NP 誘発 [Ca ²⁺] _i 上昇を阻害した。
結論	NP が、細胞膜でカルシウムチャンネルの活性化を介したラット PASM 細胞におけるカルシウム応答及び CICR メカニズムを介したさらなるカルシウム増加を引き起す証拠を提供する。このカルシウム増加は、増殖応答と関係づけられた (図 8)。本研究はいくつかの課題を生じさせる。一つの疑問は、カルシウムシグナル伝達が、NP によるカルシウムチャンネルの直接的刺激を通して、または、膜電位の変更のような他のメカニズムを通して電圧開閉カルシウムチャンネルの間接的刺激の結果として、起こるのかどうか、である。加えて、カルシウム応答での TRPV チャンネルの影響のための証拠を提供してさえも、この課題は更なる研究に値する。

NP にとっての細胞標的として TRP チャンネルと識別することを許すので、特に関心がある。この文脈で、TRPV4 チャンネルを過剰に発現することが知られている肺高血圧症に苦しむ動物における SiO₂ NP のより大きな影響の観察は、NP 及び一般的な粒子状物質の有害影響でのこれらのチャンネルの役割を、さらに問う。

No	SiO ₂ - 5
論文題目 (和訳)	Structural transition of kidney cystatin induced by silicon dioxide nanoparticles: An implication for renal diseases. (二酸化珪素ナノ粒子によって誘発された腎臓シスタチンの構造転移:腎疾患に対する影響)
著者 所属機関	Shamsi A ¹ , Ahmed A ¹ , Bano B ² . 1 Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India. 2 Department of Biochemistry, Faculty of Life Sciences, Aligarh Muslim University, Aligarh 202002, India. Electronic address: bbbano17@gmail.com.
書誌事項	Int J Biol Macromol. 2017 Jan;94 (Pt B) :754-761. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2016.10.019. Epub 2016 Oct 19.
試験物質	SiO ₂ ナノ粒子 (Cat.No.69294) (APS 15nm) 購入先: SRL (Mumbai, India)
試料調整法	リン酸ナトリウム緩衝液
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験試料: バッフアロー腎臓シスタチン (BKC; バッフアロー腎臓から分離; 血清たんぱく質の一つ、ポリペプチド) ・投与方法・期間及び試験用量: 4, 8, 12, 16 μ M SiO ₂ NP を伴う 0.4 mg/mL (6 μ M) の BKC 標本を調製。アジ化ナトリウム (.20%) 添加後、37 $^{\circ}$ C、24 時間培養後、分光試験。 なお、下記⑧~⑩の試験生物等は、試験法で定まった生物を使用、下記。
試験結果	①固有蛍光測定 (標本: BKC+ SiO ₂ NP) : SiO ₂ NP が本来の BKC の蛍光強度より、減少。蛋白質の構造を歪めた。 ②UV 吸収分光分析 (本来の BKC、SiO ₂ NP と培養した BKC) : ① に一致。 ③ATR-FTIR 分光分析 (本来の BKC、SiO ₂ NP と培養した BKC) : 本来の BKC の構造変化を確認。 ④CD 測定: BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M) は本来の BKC は α -ヘリカル成分が減少し、本来の BKC が構造を変化。 ⑤SEM 分析 (SiO ₂ NP と BKC との相互作用の可視化) : SiO ₂ NP が本来の BKC の構造を留め金 (clumped) 構造に変形。 ⑥TEM 分析 (SiO ₂ NP と BKC との相互作用パターンの洞察) : 穴部に SiO ₂ NP クラスター化。 ⑦等温滴定量測定 (ITC) : SiO ₂ NP と BKC との相互作用は発熱反応。 ⑧チオールプロテアーゼ阻害活性試験 (BKC と BKC と培養した SiO ₂ NP) : 抗パピイン (システインプロテアーゼ) 活性分析で、本来の BKC が最大の抗パピイン阻害を示し、16 μ M SiO ₂ NP で最大に減少。 ⑨MTT アッセイ (処理リンパ球における細胞生存率用: リンパ球サンプルは本来の BKC、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) と 37 $^{\circ}$ C、5% CO ₂ で 24 時間培養) : コントロール群比較で、SiO ₂ NP のみ (12 μ M 及び 16 μ M)、本来の BKC では細胞生存率に影響を与えなかったが、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) では生存率を下げた。本来の BKC が毒性構造に変化。 ⑩コメットアッセイ (健康非喫煙ボランティアから静脈せん刺によって得たヘパリン添加血液サンプルから分離したリンパ球は BKC+ SiO ₂ NP へばく露) 本来の BKC はリンパ球に及ぼす毒性影響は無いが、BKC+ SiO ₂ NP (12 μ M 及び 16 μ M SiO ₂ NP) は核 DNA 損傷を引き起こした。本来の BKC が毒性構造に変化。
結論	これらの試験は、SiO ₂ NP 培養 BKC の有毒な性質を明確に示した。SiO ₂ NP の存在で、BKC は有毒な非本来の BKC に構造転換され、細胞生存率の低下を引き起こした。有毒な非本来の BKC に構造は、前フィブリル集合体で、この構造の蛋白質は性質が毒性であるとして知られている。

No	SiO ₂ - 6
論文題目 (和訳)	Silica dioxide nanoparticles combined with cold exposure induce stronger systemic inflammatory response. (寒冷ばく露と複合された二酸化珪素ナノ粒子はより強い全身炎症反応を誘発する)
著者 所属機関	Zhang Y ¹ , Lin Y ¹ , Li X ¹ , Zhang L ¹ , Pan W ² , Zhu H ¹ , Xi Z ³ , Yang D ⁴ . 1 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. 2 Tianjin No. 254 Hospital, Tianjin, 300142, China. 3 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. 4 Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine, No.1 DaLi Road, Tianjin, 300050, China. fengdyd@126.com.
書誌事項	Environ Sci Pollut Res Int. 2017 Jan;24 (1) :291-298. doi: 10.1007/s11356-016-7649-2. Epub 2016 Oct 6.
試験物質	SiO ₂ NPs (直径 > 40 nm)
試料調整法	リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に分散、50°C 以下で 6 時間超音波処理。その間、90 分に 1 回渦乱流装置で混合。SiO ₂ 濃度 = 3 mg/mL。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 特定病原体フリー雄 Sprague-Dawley ラット (8-10 週齢、230-250 g 体重)。入手先; Tianjin Institute of Health and Environmental Medicine (Tianjin, China) 及び認定済み自施設。 ・投与方法・期間及び試験用量: 1 回の気管内注入 (5mg/kg 体重)、投与後 28 日後に殺処分。寒気ばく露は 4°C、4 時間/日 (8:30-12:30)。複合ばく露は両方の組合せ。関心の臓器取り出し (副睾丸白色脂肪組織 (eWAT)、肩甲骨間褐色脂肪組織 (iBAT)、肺、全血)。
試験結果	①肺の組織病理学 (E&H 染色): 全肺域に位置する肺構造の組織病理学的変化の発症。複合ばく露後は、肺胞が変形し、つぶれてさえた。加えて、SiO ₂ NPs 又は寒気へばく露後、炎症細胞浸潤が主に観察された。 ②定量リアルタイムポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR) (標的組織中の関心の遺伝子の相対 mRNA レベルを定量)、③血清分析 (腹部大動脈から血液採取。血清の生化学パラメーター; IL-6、IL-8、IL-10、TNF-α レベルを含む): <WAT 中> IL-6 の mRNA レベルは SiO ₂ NPs ばく露でアップレギュレート、複合ばく露でさらに増した。炎症性促進サイトカイン遺伝子 IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β の発現が SiO ₂ NPs ばく露、複合ばく露群で有意に増加 (コントロール群比較)。寒気ばく露群で、IL-6、TNF-α、IL-1β の発現がアップレギュレートの傾向、IL-8 の発現がダウンレギュレート、IL-10 の発現は有意にアップレギュレート。IL-10 の発現は、SiO ₂ NPs ばく露と複合ばく露で有意にダウンレギュレート (コントロール群比較)。 <BAT 中> IL-6、IL-8、TNF-α、IL-1β の mRNA レベルが SiO ₂ NPs ばく露でアップレギュレート、特に複合ばく露で。寒気群でもアップレギュレート傾向。IL-10 の mRNA 発現は SiO ₂ NPs ばく露で増加、寒気ばく露で減少した。 <血清> IL-8、TNF-α の蛋白質存在量は他群に比べ、複合ばく露群で有意に増加した。IL-8 に及ぼす SiO ₂ NPs、寒気の影響は有意で、相乗効果あり。TNF-α に及ぼす SiO ₂ NPs の主影響は有意、寒気は有意でなかった。両者の相互作用はなかった。IL-6 のレベルは SiO ₂ NPs、複合で増加傾向、複合でより明確。抗炎症性サイトカイン IL-10 の発現は、他群に比べ、寒気群で増加傾向だった。
結論	本研究の結果は、SiO ₂ NP が、肺を通して吸入された場合、炎症応答を引き起こすことを明確に示した。SiO ₂ NP と寒気は一緒に、炎症促進サイトカインのアップレギュレートによる白/褐色脂肪組織における肺可塑性及び代謝に影響を与えた。それ故、人間も同様の応答を示すと推測する。所見は、煙霧と冬条件の組み合わせの潜在的健康リスクをさらに理解することに貢献していく。

No	SiO ₂ -7
論文題目 (和訳)	Altered microRNA expression profiles in lung damage induced by nanosized SiO ₂ . (ナノシリカによって誘発された肺損傷における変化したマイクロ RNA 発現プロファイル)
著者 所属機関	Yang H ¹ , Zhang Y ¹ , Li W ¹ , Lao C ¹ , Li M ¹ , Zheng Y ¹ . 1 Key Laboratory of Environmental Medicine Engineering, Ministry of Education, School of Public Health, Southeast University, Nanjing, China.
書誌事項	Bioengineered. 2017 Jan 2;8(1):45-54. Epub 2016 Sep 30.
試験物質	・ナノ SiO ₂ : 表面積 = 640 ± 50 m ² /g. 純度 = 99.5%、水酸基含有量 = 45%. 提供先; Zhejiang Hongsheng Material Technology Co., Ltd. (Zhejiang, China). ・マイクロ SiO ₂ : 80% が直径 1–5 μm. 入手先; Sigma-Aldrich (cat. no. 5631, USA)
試料調整法	生理活性食塩水中に懸濁。気管内注入前に 15 分間超音波で懸濁液を分散。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 特定病原体フリー雄健康 Sprague Dawley ラット。重量 180–220 g、7 週齢。 購入先; Shanghai Laboratory Animal Research Center (Shanghai, China) ・投与方法・ 期間及び試験用量: 生理活性食塩水の 1mL 懸濁液 (6.25, 12.5, 25 mg/mL ナノ SiO ₂ 及び 25 mg/mL のマ イクロ SiO ₂ 粒子濃度) を気管内注入。ばく露後 7、15、30、60、90 日に殺処分。肺組織除 去。肺組織の総 RNA 抽出 (TRIzol® Regent (Invitrogen, USA) を用いて)。 総 RNA の量と質は、Nanodrop2000 Micro-spectrophotometer (Thermo Scientific, USA) で検出。各サンプル中の RNA integrity はアガロースゲル電気泳動によって測定。
試験結果	①miRNA 配列解析: コントロール群と比較して、6.25、12.5、25 mg/mL ナノ SiO ₂ 及び 25 mg/ml マイクロ SiO ₂ 群、それぞれで、miRNA のアップレギュレートされた発現の数は 395、314、278、 241、及びダウンレギュレートされた発現の数は 127、167、135、412 だった。ナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされた初期の段階 (7、15、30 日目) での肺損傷の共通に変動されて 発現された miRNAs は、それぞれ、アップレギュレートされた rno-miR-208 と rno-miR-212 で、後期段階 (60、90 日目) での肺損傷の共通に変動されて発現された miRNAs は、アップレギュレートされた rno-miR-18a だった。 rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a は異なる表現であったことを示した。 rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a がナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされるラ ットの肺損傷過程に関与するかどうかを探索するためにさらなる研究が必要である。 ②リアルタイム定量 PCR 解析: 結果は、テスト群における rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a の発現レベルが (表 4) のコントロール群のそれらより有意に高いことを確認した。 ③標的遺伝子予測と変動して発現された miRNA の解析: 予測結果は、rno-miR-208、rno-miR-212、rno-miR-18a の標的遺伝子の量が、それぞ れ、146、310、184 であることを示した。 ④蛋白質解離と western blotting: 標的遺伝子の分析と文献レポートは、rno-miR-208 及び rno-miR-212 が、それぞれ、炎 症シグナル伝達経路の調節に関与するそれらの標的遺伝子 PDCD4、LIN28B に作用 することを示した。rno-miR-18a は、組織線維化の形成に関与するそのターゲット遺伝子 CTGF に作用した。リアルタイム定量 PCR および Western blotting テストは、正常な生理 食塩水群と比較された、ラット肺組織における、SiO ₂ へのばく露後 7 日での PDCD4、 LIN28B mRNA 及び蛋白質、とナノサイズ SiO ₂ へのばく露後 60 日での CTGF mRNA 及び蛋白質のレベルを検出した。
結論	この研究は、ナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされたラットの肺損傷の miRNA 発現プロフ ァイルを初めて記述した。ナノサイズ SiO ₂ によって起こされた初期段階の肺損傷の共通に変 動して発現された microRNAs は、それぞれ miR-208 と miR-212 であり、後期段階では miR-18a だった。行われた標的遺伝子予測と KEGG 経路は、変動して発現された miRNAs が肺の形成不全、MAPK と TGF-β のシグナル経路を調節することを示唆した。 PDCD4、LIN28B、および CTGF のそれらの標的遺伝子は、ナノサイズ SiO ₂ によって引き 起こされたラットの肺損傷の調節の標的遺伝子の翻訳レベルにおいて機能した。miRNA プ ロファイル、標的遺伝子とナノサイズ SiO ₂ によって引き起こされたラットの肺損傷の病因論の 間の関係の全体の理解を得るために、追加的 <i>in vitro</i> 調査が行われることが必要である。

No	SiO ₂ - 8
論文題目 (和訳)	The Effects of Silica Nanoparticles on Apoptosis and Autophagy of Glioblastoma Cell Lines 神経膠芽腫細胞株のオートファジーとアポトーシスに及ぼすシリカナノ粒子の影響
著者 所属機関	Rafał Kretowski ^{1,*} , ID, Magdalena Kusaczuk ¹ , Monika Naumowicz ² , Joanna Kotyńska ² , Beata Szynaka ³ and Marzanna Cechowska-Pasko ¹ 1 Department of Pharmaceutical Biochemistry, Medical University of Białystok, Mickiewicza 2A, 15-222 Białystok, Poland; mkusaczuk@wp.pl (M.K.); mapasko@gmail.com (M.C.-P.) 2 Institute of Chemistry, University of Białystok, K. Ciołkowskiego 1K, 15-245 Białystok, Poland; monikan@uwb.edu.pl (M.N.); joannak@uwb.edu.pl (J.K.) 3 Department of Histology and Embryology, Medical University of Białystok, Waszyngtona 13, 15-269 Białystok, Poland; beataszynaka@gmail.com * Correspondence: r.kretowski@umb.edu.pl; Tel.: +48-85-748-56-39; Fax: +48-85-748-56-91
書誌事項	Nanomaterials 2017, 7, 230; doi: 10.3390/nano7080230
試験物質	ヒュームド二酸化珪素アモルファスパウダー(7nm)、二酸化珪素球状多孔質ナノパウダー(5-15nm)、二酸化珪素ナノパウダー(10-20nm):Sigma (St. Louis, MO, USA)のよって提供。
試料調整法	超音波処理で脱イオン水中に分散
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: ・LBC3 細胞株(外科的腫瘍切除を受けた56歳女性患者から採取した神経膠芽腫多形性組織から育成):Prof. Cezary Marcinkiewicz (Department of Neuroscience, Temple University, Philadelphia, PA, USA)が贈呈。 ・LN-18 とヒト皮膚線維芽細胞 (CRL1474) 細胞株:American Type Culture Collection (ATCC)が提供。 投与方法・期間・試験用量: 12.5~1000g/mLの範囲濃度でSiNPsを含むDMEM中で24、48h培養。
試験結果	・細胞生存率(MTTアッセイで測定): すべてのサイズのSiNPsがLBC3、LN-18細胞株の両方において細胞生存率の時間依存、用量依存低下を誘発したことが示された。細胞生存率の低下は、SiNPsのサイズに依存していた。LBC3とLN-18細胞における細胞生存率の低下は、使用されたSiNPsサイズ全部で24時間後に観察された。SiNPsの高濃度で処理された細胞において、細胞生存率に及ぼす影響は、LBC3細胞の場合著しくより顕著であった一方、LN-18細胞の生存率ははるかに大きかった。SiNPsと培養された細胞において、培養時間の48hまでの延長は、生LN-18細胞と比較して生LBC3細胞の数の強い減少を結果としてつながった。最も高い細胞毒性は、LBC3とLN-18の両細胞において、中サイズSiNPs(5-15nm)で処理された細胞の場合に観察された。強力な細胞毒性影響は、LBC3細胞において5-15nm SiNPsと培養された両時点後に観察された。LN-18及びLBC3細胞と対照的に、12.5から1000g/mL濃度で5-15nm SiNPsを使用して、正常な皮膚線維芽細胞の生存率の弱い、用量依存性の低減だけを観察した(図1G)。 ・ゼータ電位に及ぼす分散媒体の影響: すべての粒子にとって、大きいサイズ領域中のピークは、粒子の凝集を表している。DLS法で測定されたSiNPsのサイズは、脱イオン水および10%FBSのDMEMの両方で、元のサイズよりも大きく、ファンデルワールス力と媒体との疎水性相互作用の両方に拠るかもしれない。 ・アポトーシスと壊死(ネクローシス)(flow cytometry on FACSCanto II (BD, San Diego, CA, USA)で評価): 50と100g/mLの5-15nm SiNPsで処理された細胞において24時間培養後に、アポトーシス細胞の割合はコントロール細胞と比較して有意に高かった。 LBC3細胞の壊死の用量依存性だが時間依存でない増加が観察された。 LBC3細胞と対照的に、LN-18細胞のアポトーシスに対するSiNPsの影響は見られなかった。LN-18細胞のアポトーシスの割合は、培養時間と、SiNPsの用量と独立して変化しなかった。アポトーシスとは対照的に、LN-18細胞の壊死に及ぼすSiNPsの強い時間と用量依存的影響を観察した(図4D、F)。 50g/mLの5-15nm SiNPsと24h、DMEM中で培養された培地の場合、壊死細胞の割合の変化は観察されなかった。100g/mLのSiNPsと培養された細胞において、コントロール細胞と比較して壊死の顕著な増加が観察された。両方の濃度の5-15nm SiNPsとのLN

	<p>-18 細胞の培養 48h 後、コントロールと比較して、壊死の上昇に気づいた。</p> <p>・細胞内 ROS 産生: 20,70-ジクロロフルオレッセン (DCF) の蛍光性は細胞内の ROS 産生の増加によって強化され、培養時間と SiNPs の濃度に依存していた。50 又は 100g/mL の 5-15 nm SiNPs との LBC3 細胞の 24h 培養後、細胞内の ROS 産生は未処理の細胞と比較して約 2 倍高かった。未処理のコントロールと比較して、48 h 後、50g/mL の 5-15 nm SiNPs と培養された LBC3 細胞における約 2 倍高い ROS 産生、100g/mL で処理された細胞の場合 3 倍高い結果に結び付いた (図 4A)。</p> <p>・ミトコンドリア膜電位の変化: LBC3 細胞におけるミトコンドリア膜電位 (DYm) の用量依存低下を観察した。48h 培養だけでなく 24 h 後、DYm の大きな損失が観察された。コントロール細胞と比較して、50 g/mL の SiNPs で処理された細胞は、DYm の約 10 倍低下を示し、100g/mL の SiNPs で培養された細胞は、DYm のほぼ 11 倍低下を示した。</p> <p>・カスパーゼ-9 活性: LBC3 細胞において、未処理細胞と比較して、SiNPs の両方の濃度に対して、48h 後、カスパーゼ-9 活性の 2 倍の上昇を観察した。</p> <p>・アポトーシス促進遺伝子発現: LBC3 細胞において、Bax、Bim、Noxa、Puma 遺伝子の mRNA レベルが 5-15 nm SiNPs と培養された細胞において用量及び時間依存的に上向き調節された。</p> <p>・LBC3 細胞の形態変化: 24h、5-15 nm SiNPs へばく露された LBC3 細胞において、マトリックス中の巣状増白、ミトコンドリア膜変形、ミトコンドリア膨潤、クリステ (鶏冠《ミトコンドリアの内側の薄膜などにある隆起部分》) 破裂のようなミトコンドリアの構造の破壊に気づいた (図 5C、赤矢印)。 それを除いて、図 5 B に示されたように、細胞の部分が、フリーなまたは細胞質中で膜結合凝集体として小さな電子密度の高い物質 (SiNPs) で構成されている (図 5B、黄色矢印)。 48 h、5-15 nm SiNPs へばく露された LBC3 細胞の変化は、24h、SiNPs と培養された細胞で観察されたそれと類似していた。いくつかの変更が、48 h 後により判定された。ミトコンドリアにおける変化は、変更されたサイズ、形状およびミトコンドリア膜への損傷を持つ巣状浮腫、ミトコンドリアの膨潤とクリステ破裂から成っている (図 5B、赤矢印)。また、細胞質に分散させた多くの SiNPs を観察した (図 5E、黄色矢印)。</p> <p>・オートファジーマーカーの発現 (LBC3 細胞におけるオートファジーのマーカー Light Chain 3 (LC3-I and LC3-II) の発現の Western blot 分析): 50 と 100g/mL の SiNPs と 24 および 48 h 培養された細胞は、LC3-II 型の発現を示したが、LC3-I 型は弱い発現しか発現を示さなかった。また、コントロール (レーン: 1, 4) と比較して、24、48 h 後、膜結合 LC3-II 型、(ホスファチジルエタノールアミン共役型) の発現は、50g/mL (レーン: 2, 5) 及び 100g/mL (レーン: 3, 6) の SiNPs と培養された細胞において増加されたことが観察された。 SiNPs の両方の濃度で培養された細胞において LC3-II/LC3-I 比の時間と用量依存の増加に気づいた。 Atg5 の転写は、LBC3 細胞において大幅に時間と用量依存的で上向き調節された (図 6C)。したがって、LC3-II/LC3-I 比増加と Atg5 遺伝子発現の上向き調節との共存に気づき、SiNPs 処理を施された細胞におけるオートファジーの発生を確認した。</p> <p>・酸性小胞細胞内小器官 (オルガネラ) の形成 (オートファジーは、AVOs (酸性小胞細胞器) の形成によってキャラクタライズ): LBC3 細胞の細胞質中の AVOs 形成の時間と用量依存 (48h 培養後にのみ) の増加を観察した。 培養 24 時間後、コントロール細胞と比較して、AVOs-陽性細胞の割合が 50 g/mL と 100 g/mL SiNPs で処理された LBC3 細胞において、約 4 倍高かった。48 h までの培養時間の長は、コントロール細胞と比較して、50 g/mL の SiNPs で処理された時 6 倍高い割合の AVOs-陽性 LBC3 細胞、100 g/mL の SiNPs で処理された時 7 倍高い割合の AVOs-陽性 LBC3 細胞に結果としてつながった。</p>
結論	<p>結論としては、我々の結果は、SiNPs が神経膠芽腫 LBC3 において細胞毒性を引き起こすことができるが、ヒト皮膚線維芽細胞ではできないことを示唆する。興味深いことに、LBC3 細胞においてオートファジーの共存を観察した一方、LN-18 において壊死だけに気づいた。SiNPs 処理は、LBC3 細胞における酸化ストレスと MMP の損失に結果としてつながった。さらに、アポトーシス促進性遺伝子: Bim, Bax, Puma, Noxa の上向き調節とカスパーゼ-9 の活性の増加が LBC3 神経膠腫細胞において観察された。これらの結果は、アポトーシスのミトコンドリア依存経路が SiNPs 介在の LBC3 細胞死に関与していることを示しているかもしれない (図 7)。</p> <p>SiNPs についての大量の情報が既に利用できるが、まだ集中的な調査の主題ではない。我々の調査結果は、SiNPs が細胞タイプ固有の方法で作用でき、それらのばく露への応</p>

答において変化し易く複雑な機構を開始することができることを示す。したがって、総合的に神経膠芽腫多形性療法のための潜在的な治療剤として成功理にそれを使用するに、SiNPs 処理によって活性化された分子機構を包括的に明らかにすることは価値がある。

No	SiO ₂ - 9
論文題目 (和訳)	Cytotoxic Effect of Nano-SiO ₂ in Human Breast Cancer Cells <i>via</i> Modulation of EGFR Signaling Cascades (ヒト乳癌細胞におけるEGFRシグナリングカスケードの調節によるNano-SiO ₂ の細胞毒性)
著者 所属機関	DONGHWAN JEON ¹ , HYUNGJOO KIM ¹ , KEESOO NAM ¹ , SUNHWA OH ¹ , SEOG-HO SON ¹ and INCHEOL SHIN ^{1,2} 1) Department of Life Science, 2) Natural Science Institute, Hanyang University, Seoul, Republic of Korea
書誌事項	ANTICANCER RESEARCH 37: 6189-6197 (2017)
試験物質	シリカナノ粒子 (Nano-SiO ₂) (Kisker-biotech) : 直径 30nm
試料調整法	ナノ粒子の調整: ストック溶液を、60kHzで20分間超音波処理した後、リン酸緩衝生理食塩水 (PBS) 中の粒子を 5mg/ml に希釈することで作製。使用直前に、原液を同じ条件下で超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物: ヒト乳癌細胞株 MDA-MB-231、Hs578T (American Type Culture Collection)</p> <p>抗体: リン-表皮成長因子受容体 (p-EGFR) に特異的な抗体、カスパーゼ-3、ポリ ADP リボースポリメラーゼ (PARP)、リン酸シグナルトランスデュサーおよび転写 3 の活性化因子 (p-STAT3) (Y705)、p-STAT3 (S727)、リン-焦点接着キナーゼ (p-FAK)、FAK、燐光体-細胞肉腫キナーゼ (p-SRC)、SRC (Cell Signaling Technology); β-チューブリン (H-235)、サイクリン D1 (A-12)、サイクリン B1 (D-11)、p27 (C-19)、フィブロネクチン (A-11)、スルビビリン (D-8)、STAT3 (H-190) に対する抗体 (Santa Cruz Biotechnology); EGFR 検出用抗体 (Abcam)。</p> <p>細胞培養: 10%ウシ胎仔血清 (FBS)、100U/ml ペニシリン、100mg/ml スレプトマイシンを補充したダルベッコ改変イーグル培地 (DMEM) に、37°Cの加湿空気中で 5%CO₂ を補充したインキュベーター中で細胞を維持。</p> <p>ナノ-SiO₂ へのばく露: 原液と通常培地混合物を用いてナノ-SiO₂ に個々にばく露し、混合物を処理直前に調製。等量の PBS 溶液と混合した培地を陰性対照として使用。</p> <p>細胞増殖アッセイ: 細胞をウェル細胞培養プレート中に 2×10⁴ 細胞/ウェルで播種。24 時間後、最終濃度 100µg/ml でナノ-SiO₂ を添加。24 時間毎に 4 日間、細胞数を血球計数器で 3 回計数。</p> <p>二次元コロニー形成アッセイ: 細胞をウェル細胞培養プレート中に 100 細胞/ウェルで播種。最終濃度 100µg/ml で細胞播種の 3 日後にナノ-SiO₂ を添加。5 日後、細胞をクリスタルバイオレットで 30 分間染色。PBS で洗浄後、光学顕微鏡下でコロニー数を計測。実験は 3 回実施。</p> <p>MTT アッセイ: 細胞生存率を、3-(4,5-ジメチルチアゾール-2-イル)-2,5-ジフェニルテトラゾリウムプロモイト (MTT) チアゾリウムブルーアッセイを用いて測定。</p> <p>トキシロピシン処理: 細胞処理前に、トキシロピシンを DMSO 中に 10mM 濃度で最初に溶解、トキシロピシンのストック溶液を希釈、最終濃度 10,50,100,500,1000nM でナノ-SiO₂ 100 又は 200µg/ml で細胞に添加。24 時間後、細胞生存率を MTT アッセイで測定。</p> <p>フローサイトメリーによる細胞周期分析: 最終濃度 100µg/ml ナノ SiO₂ に 24 時間ばく露後、細胞を氷冷マナール中で -20°C で 3 時間固定。固定細胞を、1mg/ml RNase 含有 PBS 中の 50µg/ml ヨウ化プロピジウム (PI) 中で 30 分間培養。細胞周期分析は、FACScan フローサイトメーターを用いて実施。データは Cell Quest ソフトウェアを用いて分析。少なくとも 3 回実施。</p> <p>細胞接着アッセイ: 細胞を、ナノ-SiO₂ 100µg/ml 含有ウェル細胞培養プレートに 5×10⁵ 細胞/ウェルで播種。3 時間後、未接着細胞を洗い流し、付着細胞数を血球計数器で推定。少なくとも 3 回繰返し実施。</p> <p>創傷治癒アッセイ: 播種前に、細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露。SiO₂ 処理細胞を採取、ウェル細胞培養プレートに 4×10⁵ 細胞/ウェルで再播種、24 時間培養。無血清培地中でさらに 24 時間培養後、培養プレートをピペットチップで擦って創傷領域を生成、顕微鏡下で創傷閉鎖を観察。創傷治癒率 (%) は、以下の式を用いて算出; [(0 時間の創傷領域の幅 - x 時間の創傷領域の幅) / 0 時間の創傷領域の幅] × 100、x = 24, 48, 72。</p> <p>トランスウェルの走査・浸潤アッセイ: 細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、細胞を無血清培地に懸濁、8µm 孔サイズのトランスウェルチャンバーに播種。無血清培地中細胞を、1×10⁴ 個細胞/チャンバーで上部チャンバーに移し、下部チャンバーを血清含有培地で満たした。18 時間後、ポリカーボネート膜底面の細胞をクリスタルバイオレットで染色、光学顕微鏡を用いて細胞数を計</p>

	<p>算。マトリゲル充填上部チャンバーを用いて同じ方法で細胞浸潤アッセイを実施。</p> <p>ウェスタンブロット分析: ナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露した細胞を溶解緩衝液に溶解。溶解物を SDS サンプル緩衝液で煮沸、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動ゲル上で分離、ニトロセルロース膜上にブロット。スキムミルクで 1 時間ブロッキング後、膜を適切な一次抗体とともに培養。18 時間後、それらを西洋ワサビペロオキシダーゼ結合二次抗体とともにさらに培養。タンパク質バンドを、Dyne ECL STAR ウェスタンブロット検出キットで視覚化。</p> <p>ゲフィチニブ処理: 細胞処理前に、ゲフィチニブのストック溶液を、最初に DMSO に 10µM で溶解することで作製。ストック溶液を最終濃度 10nM で細胞培養培地でさらに希釈、乳癌細胞に添加。等量の DMSO と混合した培地を陰性対照として用いた。</p> <p>定量的リアルタイムポリマーゼ連鎖反応 (qPCR): ナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、Trizol 試薬を用いて RNA を細胞から単離。Thermal Cycler Dice で SYBR FAST qPCR キット (KAPA) を用いて、定量的リアルタイム PCR を実施。グリセルアルデヒド 3-リン酸デヒドロゲナーゼ (GAPDH) を用いて C(t) 値を標準化。プライマー: GAPDH: forward: 5'-TCA GTG GTG GAC CTG ACC TGA CC-3', reverse: 5'-TGC TGT AGC CAA ATT CGT TGT CAT ACC-3'; fibronectin: forward: 5'-GTT GTT ACC GTG GGC AAC TCT GTC-3', reverse: 5'-AAA GCC TAA GCA CTG GCA CAA CAG-3'; survivin: forward: 5'-CTT GGA GGG CTG CGC CTG CAC CC-3', reverse: 5'-CTG GCT CCC AGC CTT CCA GCT CCT TG-3'; FAK: forward: 5'-ATG GCA GCT GCT TAC CTT GAC CCC A-3', reverse: 5'-TGC ATT GCC CCG CAT CTC CCA-3'。</p> <p>共有結合架橋: 細胞をナノ-SiO₂ 100µg/ml に 24 時間ばく露後、1mM ビス(スルホスクシンイミド) スペレート (BS3) 架橋試薬を 4°C で 30 分間添加。架橋反応は、10mM トリス (pH 7.5) 処理によって 5 分間で終了。二量体化 EGFR の検出を、EGFR に対する抗体を用いたウェスタンブロットによってモニター。</p>
<p>試験結果</p>	<ul style="list-style-type: none"> ・ナノ-SiO₂ は、乳癌細胞に対して細胞毒性作用を有する。人乳癌細胞株の増殖測定 (図 1A) により、細胞増殖はナノ-SiO₂ へのばく露で有意に減少した。形成されたコロニー数は、対照細胞と比較して SiO₂ 処理後に有意に減少した (図 1B)。MTT アッセイでは、ナノ-SiO₂ 50µg/ml 以上の濃度に 24 時間ばく露で、両細胞株で細胞生存率がわずかに低下した (図 1C)。処理後 48 時間に、ナノ-SiO₂ の全濃度の MDA-MB-231 と、100µg/ml を超える濃度の Hs578T 細胞で、細胞生存率が有意に低下した。乳癌細胞に対する抗癌剤ドキソルビシンとナノ粒子の併用効果のモニターでは、ナノ-SiO₂ の共処理により、ドキソルビシン毒性が付加的に増加した (図 1D)。しかし、1000nM のドキソルビシン処理 Hs578T 細胞を除くと、SiO₂ 濃度を 100µg/ml から 200µg/ml の 2 倍に増加させても、細胞生存率の有意なさらなる低下はなかった。 ・ナノ-SiO₂ は、細胞周期分布を変化させ、乳癌細胞のアポトーシスを誘導する。細胞周期プロファイルの分析から、ナノ-SiO₂ ばく露癌細胞におけるサブ G1 画分の有意な増加があり、ナノ-SiO₂ 活性化アポトーシスシグナルが示された (図 2A)。乳癌細胞をナノ-SiO₂ ばく露後の関連タンパク質量の測定では、PARP およびカスパーゼ-3 の切断型が増加し、サイクリン D1、サイクリン B1 およびサバヒンの量がナノ-SiO₂ 処理で有意に減少したが、p27 レベルは変化しないことを見出し、ナノ-SiO₂ が乳癌細胞のアポトーシスの誘導を介して癌細胞の生存率を低下させることを示した (図 2B)。 ・ナノ-SiO₂ は、癌細胞の接着・移動を妨げる。細胞接着アッセイから、ナノ-SiO₂ 処理が乳癌細胞の細胞培養プレート表面への接着を妨害することを見出した (図 3A)。創傷治癒率の観察から、癌細胞はナノ-SiO₂ へのばく露により、細胞運動性が著しく損なわれた (図 3B)。癌細胞の移動・湿潤能はナノ-SiO₂ により妨害された (図 3C・D)。 ・ナノ-SiO₂ は、EGFR シグナル伝達カスケードの調節を介して癌細胞の細胞毒性を発揮する。EGFR シグナル伝達影響を調べたところ、全 EGFR の変化を伴わずに、ナノ-SiO₂ ばく露後に EGFR のリン酸化が減少すること、c-SRC のリン酸化が減少し、続いて STAT3 リン酸化が減少することを見出した (図 4A)。サイクリン B1、サイクリン D およびサバヒンを含む STAT3 標的の抑制も確認した。フィブロネクチンおよび FAK、ならびにリン酸化された FAK の総量が有意に減少した。SiO₂ 処理癌細胞の転写レベルの調査から、FAK、フィブロネクチンおよびサバヒン発現の下方調節がナノ粒子へのばく露により誘導されることを見出した (図 4B)。ゲフィチニブ処理後の分子パターンでも同様の変化を見出した (図 4A)。ナノ-SiO₂ ばく露による EGFR 二量体の形成破壊を調べたところ、両癌細胞株において、二量体 EGFR 量がナノ-SiO₂ へのばく露で有意に減少し、ナノ-SiO₂ が EGFR 二量体化を妨げることを示した (図 4C)。
<p>結論</p>	<p>MDA-MB-231 と Hs578T の 2 つの乳がん細胞株を用いて毒性と可能性のある分子機構を調べるために、いくつかの試験を行った。ナノ SiO₂ 処理は、乳癌細胞株の増殖を抑制し</p>

た。アポトーシスも増加し、細胞運動性も低下した。さらに、ナノ SiO₂ へのばく露は、表皮成長因子受容体(EGFR)の二量体化、続いて下流の細胞肉腫キナーゼ(c-SRC)およびシグナルトランスデュサーおよび転写 3 の活性化因子(STAT3)シグナル伝達カスケードの下方調節を著しく妨げた。ナノ-SiO₂ は、EGFR シグナル伝達カスケードの調節を介して、MDA-MB-231 および Hs578T 乳癌細胞に細胞毒性効果を有する。

(6) ZnO

No	ZnO-1
論文題目 (和訳)	Comparative Proteomic Analysis of Rat Bronchoalveolar Lavage Fluid after Exposure to Zinc Oxide Nanoparticles. (酸化亜鉛ナノ粒子ばく露後の、ラット気管支肺胞洗浄液の比較プロテオーム分析)
著者 所属機関	Yu-Min Juang ¹ , Han-Ju Chien ¹ , Cheng-Yu Yang ¹ , Hsiao-Chien Yeh ¹ , Tsun-Jen Cheng ² , and Chien-Chen Lai ^{1,3,4} 1) Institute of Molecular Biology, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan, 2) Institute of Occupational Medicine and Industrial Hygiene, National Taiwan University, Taipei, Taiwan, 3) Graduate Institute of Chinese Medical Science, China Medical University, Taichung, Taiwan, 4) Rong Hsing Research Center for Translational Medicine, National Chung Hsing University, Taichung, Taiwan
書誌事項	Mass Spectrom (Tokyo). 2017; doi: 10.5702/massspectrometry.S0066.
試験物質	酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs) (以下、粒子サイズと濃度は、GRIMM SMPS+C (逐次の移動性粒子寸法測定器とカウンター、モデル5.403で測定。) 粒度 (高用量35nmの場合) ~ 35nm、直径: 35.6nm (中央値)、表面積: $1 \times 10^5 \text{ mm}^2/\text{m}^3$ (幾何標準偏差 2.0)。
試料調整法	亜鉛粉末をろつぽに入れて、蒸発した亜鉛を窒素+酸素気流中で酸化して製造 (蒸発凝縮法)。ばく露室に入る手前でろ過空気と混合して所定の粒子数濃度に調整。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】オスSDラット、7週齢、体重285-302g。これらは、ばく露群 (N=6) と対照群 (N=6) に分割。ばく露群: 高用量35nmのZnO NPsに吸入ばく露、対照群: 空気にはばく露、ばく露濃度: 質量濃度12.1mg/m ³ ; 数濃度 7.9×10^6 粒子/cm ³ 。ばく露: 午前8時~午後2時。 【採取試料】BALF、【測定項目】たんぱく質濃度、【測定法】ブラッドフォード法 【タンパク質スポット分析】採取したBALFは次の要領でタンパク質スポット分析を行った。 ・分析対象: 4匹のコントロールと6匹のばく露ラットからの2つのプールされたBALF。 ・サンプルの処理: 180μlの固定pH勾配 (immobilized pH gradient IPG) 緩衝液で希釈後、室温で1時間放置 (200μg)。 ・対象サンプル: スポット強度に有意な増加あるいは、減少が認められたタンパク質。 【ゲルの消化】本研究で用いられたゲルは、1.5倍以上または0.66倍以下の変化を示したタンパク質スポットを対象に、25mM重炭酸アンモニウム緩衝液 (pH 8.0) で消化後、ペプチドをゲル溶出溶液 (5.0% TFA中の50% CAN) の上澄みから抽出。その後、真空乾燥して、ナノ噴霧液体クロマトグラフィタンデム型質量分析 (ナノLC/MS/MS) に供試。
試験結果	・タンパク質スポット1-22は、1.61~24.82倍に増加していたタンパク質であった。一方、タンパク質スポット23-31は0.56~0.32倍に減少していたタンパク質であった。(図2) ・これらの特定されたタンパク質の間で、11だけはゲル・ベースのアプローチとLCベースの双方の方法によって検出された。この結果は、異常制御されたタンパク質同定のための、双方の方法を取り込んだ統合したアプローチの必要性を示す。 ・細胞成分領域のタンパク質のほとんどは細胞外領域 (72%) に分泌された (図3A)。生物学のプロセス領域のタンパク質のほとんどは刺激 (43%)、炎症反応 (17%)、酸化ストレス (15%) に対する応答または免疫応答 (10%) 関係していた (図3B)。 ・分子機能領域のタンパク質のほとんどが結合 (35%)、触媒活性 (23%)、酵素阻害剤活性 (16%)、酸化還元酵素活性 (9%)、抗酸化剤活性 (7%) で役割を果たしていた (図3C)。 ・これらの結果は、最も差別的に表現されたタンパク質は細胞外領域にあって、刺激へ応答に関係していたとする我々の先行研究の結果と整合している。 ・興味深いことに、ZnO NPsばく露の後ラットBALF中で増加したタンパク質の多くは、炎症関連のタンパク質と免疫応答関連のタンパク質であった。前者には、α-1-抗-蛋白質分解酵素 (スポット1)、ムリノグロブリン-1 (スポット5)、complement C3 (spot 6)、血清トランスフェリン (スポット9)、タンパク質deglycase DJ-1 (スポット15)、α-2-HS-糖蛋白 (スポット18と20) とC反応性蛋白 (スポット19) が含まれる。後者には、肺表面活性物質関連のタンパク質D (SPD、スポット3)、BPIフォールドを含む族Aメンバー1 (スポット8、11、13と22)、好中性ゼラチナーゼ関連のlipocalin (スポット14) が含まれる。(表1)。 ・SPDは、生来の免疫応答で重要である、そして、肺の免疫応答の多くの調節性側面に関与する。本研究では、SPDは2.42倍 (表1、図4) であった。 ・福井らによって報告された (脂質過酸化物質、ヘム・オキシゲナーゼ-1とα-トコフェロールを含む) 抗酸化剤に関連したタンパク質が本研究では特定されなかったものの、他の同様の抗酸化剤タンパク質 (過酸化redoxin-6と-1) がZnO NPsばく露ラットのBALF中で増大していた事が観察された (表1)。 ・タンパク質ゲルソリン (スポット2) がZnO NPsばく露の後のラットのBALFで有意に増大していた (2.84倍、表1、図4) ことも発見された。 ・ZnO NPsへのばく露によって、6.1 (DJ-1/6.1、スポット15) のπ状態pI stateをもつDJ-1タ

	<p>ンパク質の発現は1.66倍に増加し、6.4(DJ-1/6.4、スポット25)のπ状態をもつDJ-1は0.33倍に減少したことも確認された(表1、図4、図S1C・D)。</p>
結論	<ul style="list-style-type: none"> ・nanoLCMS/MSと結合された二次元電気泳動法(2-DE)を用いて、高用量ZnO NPsにばく露したラットのBALFにおける差別的タンパク質を分離・定量・特定した。 ・その結果、S100A8とS100A9(特発性肺線維症と肺癌の候補マーカー)は特定されなかったものの、肺表面活性物質関連のタンパク質Dとゲルソリン(特発性肺線維症の生物マーカー)は、有意に増大した(それぞれ2.42と2.84倍)。 ・これらの炎症反応は、特発性肺線維症即ち肺癌を誘起する可能性がある。 ・以上の結果は、ZnO NPsへのばく露が主にラットの肺炎症と免疫応答を誘起することを示した我々の先行研究の結果と一致している。

No	ZnO-2
論文題目 (和訳)	The endoplasmic reticulum stress inducer thapsigargin enhances the toxicity of ZnO nanoparticles to macrophages and macrophage-endothelial co-culture. (小胞体ストレス誘発因子タプシガルジンは、マクロファージとマクロファージ内皮との共培養に対する ZnO ナノ粒子の毒性を高める。)
著者 所属機関	Gui Chen ^{a,1} , Yuexin Shen ^{a,1} , Xiyue Li ^a , Qin Jiang ^a , Shanshan Cheng ^a , Yuxiu Gu ^a , Liangliang Liu ^b , Yi Cao ^a , a Key Laboratory of Environment-Friendly Chemistry and Application of Ministry of Education, Lab of Biochemistry, College of Chemistry, Xiangtan University, Xiangtan 411105, PR China b Institute of Bast Fiber Crops, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Changsha 410205, PR China
書誌事項	Environ Toxicol Pharmacol. 2017, doi: 10.1016/j.etap.2017.01.020.Mar;50:103-110.
試験物質	酸化亜鉛ナノ粒子 (ZnO NPs;コード:NM110)、メーカー: BASF、被覆無し、Prof. Peter Moller より提供。 透過電子顕微鏡 (TEM)、X線回折 (XRD)、BET、動的光散乱 (DLS)、ナノ粒子追跡分析 (NTA) などによって特徴づけ。 XRD サイズ: 70~>100nm。TEM サイズ: 20-250/50~350nm。BET 表面面積: 14m ² /g。媒体中の DLS サイズ: 306nm。水中の NTA サイズ: 約 155nm。 流体力学サイズ分布とゼータ電位も測定 (測定対象: MilliQ 水中の 16µg/mL NM110)。 ・粒子特性 NM110 のサイズ: 195.4±20.1nm (図 1A)、ゼータ電位: -17.7±6.6nm (図 1B)、形状: 楕円形、あるいは、不規則な形状 (SEM、TEM) (図 1C,D)
試料調整法	NM110 懸濁液の調整: 懸濁媒体: 2%FBS を含む MilliQ 水、粒子濃度: 2.56µg/mL、ばく露時に THP-1 媒体で希釈。(2.2)
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【試験生物】phorbol 12-myristate 13-acetate 処理によって THP-1 単球 (ATCC) から分化した THP-1 マクロファージと HUVECs (継代 1) (2.1) 【投与方法・期間・用量】 THP-1 マクロファージの培養 (2.2): 250nM タプシガルジン (TG; 他は endoplasmic reticulum stress inducer; ER ストレス誘発因子) のありと無しで培養、培養媒体: 補充された THP-1 媒体、NM110 粒子濃度: 0µg/mL, 2µg/mL, 4µg/mL, 8µg/mL, 16µg/mL, 32µg/mL、ばく露時間: 24h 共培養 (2.2): 250nMTG のありと無しで培養、NM110 粒子濃度: 0µg/mL, 2µg/mL, 8µg/mL, 32µg/mL、培養媒体: 補充された THP-1 媒体。HUVECs は、750 µL の補充された内皮媒体で培養、ばく露時間: 24h 【測定項目・方法】 ・WST-1 分析: 測定項目: THP-1 マクロファージのミトコンドリア生存度、測定方法: 水溶性テトラゾリウム-1 (WST-1) 分析。THP-1 マクロファージは、TG のありなしで各種濃度の NM110 にばく露。共培養のミトコンドリア生存度を決定するために、上澄みは、エリサ分析のために除去されて、上室で 200µL10% WST-1 試薬を、下室では 300µL10% WST-1 試薬を用いて共培養 (2h)。TG の影響を見るために、HUVECs は 24 時間各種濃度の TG にばく露後 WST-1 アッセイを実行。 ・LDH 分析: 測定項目: 膜健全性 ・中性赤取り込み分析: 測定項目: リソソーム不安定化、 ・細胞内 ROS: 測定項目: 細胞内 ROS、測定: 2',7'-ジクロロフルオレセイン・ジアセテート (DCFHDA) を用いることにより推定。 ・細胞内 Zn イオン蓄積: 測定項目: 細胞内の Zn イオン蓄積、測定: 細胞透過性 Zn イオン蛍光プローブ Zinquin エチル・エステルを用いることにより、TG の有となしで、各種濃度の NM110 に 24h ばく露後、THP-1 マクロファージで測定 ・エリサ: 測定項目: 腫瘍壊死因子 α (TNFα) の放出、測定: エリサ・キットによって測定。
試験結果	・THP-1 マクロファージに対する細胞毒性 3.2: WST-1 分析では、NM110 または TG 単独で各種濃度へのばく露では、THP-1 マクロファージの生存度は減少しなかった。(図 2A) TG+16µg/mL と 32µg/mL NM110 へのばく露は、ミトコンドリア生存度を有意に減少させた。対照的に、LDH の放出は、TG の存在の有無にかかわらず NM110 による影響は受けなかった (図 2B)。中性赤の取り込み分析では、NM110 と TG の単一要因の影響ならびに NM110 と TG の間の相互作用を示した (図 3)。EC50 値は、NM110 単独の場合は 11.2µg/mL であったが、NM110+TG の場合は、6.4µg/mL に減少した (図 3A)。中性赤染色は TG の有無にかかわらず NM110 へのばく露によって減少した (光顕微鏡観察、図 3B) ・細胞内 ROS 3.3: 細胞内 ROS は、TG の有無とも NM110 へのばく露によっては影響を受

	<p>けなかった(図 4A)。ポジティブコントロールとして、0.5%と1% H2O2 にばく露した場合は、細胞内 ROS はそれぞれ 189.2%と 289.5%に増加した(図 4B)。</p> <ul style="list-style-type: none"> •細胞内 Zn イオンの蓄積 3.4.:細胞内 Zn イオンは、NM110 へのばく露によって用量依存的に増加した(図 5)。TG なし、8μg/mL, 16μg/mL 32μg/mL NM110 へのばく露は、細胞内 Zn イオンの蓄積を有意に増進した。TG は細胞内 Zn イオンに有意に影響を及ぼさなかった。NM110 と TG の間の相互作用は認められなかった。 •マクロファージ-HUVEC 共培養に対する細胞毒性 3.5: 上室における THP-1 マクロファージの生存度は、TG の有無とも NM110 へのばく露によっては影響を受けなかった(図 6A)。下室で間接的にばく露された HUVECs は、TG の存在で、0μg/mL, 2μg/mL, 8μg/mL, 32μg/mL NM110 へのばく露によって、生存度は減少した(図 6B)。HUVECs の生存度は、TG へのばく露によって減少した。図 6C •TNFα の放出 3.6.: 上室または下室への TNFα の放出は、TG の有無とも、NM110 ばく露の影響は受けなかった(図、7)。
<p>結論</p>	<ul style="list-style-type: none"> •ER ストレス誘発因子 TG を使って THP-1 マクロファージにストレスを加えることによって、NM110 の細胞毒性(ミトコンドリアとリソソームに対する損傷)を高めることができる。 •この毒性は、マクロファージ内皮共培養によって HUVECs に移すことができる。 •NM110 ばく露による細胞内 ROS、細胞内 Zn イオンの蓄積、TNFα の放出は、TG の有りなしの影響を受けなかった。 •以上の結果は、ZnO NP 誘起細胞毒性における ER ストレスの役割を示す。

No	ZnO-3
論文題目 (和訳)	Comparative <i>in vitro</i> genotoxicity study of ZnO nanoparticles, ZnO macroparticles and ZnCl ₂ to MDCK kidney cells: Size matters. (MDCK 腎臓細胞に対する ZnO ナノ粒子、ZnO マクロ粒子、ZnCl ₂ の <i>in vitro</i> 比較遺伝毒性研究: サイズは重要である。)
著者 所属機関	Veno Kononenko ^a , Neza Repar ^a , Nika Marusic ^a , Barbara Drasler ^a , Tea Romih ^a , Samo Hocevar ^b , Damjana Drobne ^a a Department of Biology, Biotechnical Faculty, University of Ljubljana, Vefna pot 111, 51-1000 Ljubljana, Slovenia b Department of Analytical Chemistry, National Institute of Chemistry, Hajdrihova 19, 51-1000 Ljubljana, Slovenia
書誌事項	Toxicol <i>In Vitro</i> . 2017 Apr;40:256-263. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.015.
試験物質	<p>・酸化亜鉛ナノ粒子 ZnO NPs、酸化亜鉛マクロ粒子 (ZnO MPs)。ラベル表示サイズ: それぞれ、<100nm、<1 μm。Sigma-Aldrich (Steinheim, Germany) から入手。</p> <p>・粒子懸濁液の調製と特徴づけ</p> <p><測定項目、分析法、分析対象></p> <p>①粒子直径: 透過電子顕微鏡分析 (TEM) で測定。試料調製: ZnO NPs、MPs の水性懸濁液は銅のグリッド上におかれた透明炭素箔の上で室温で乾燥することによって調整、</p> <p>②流体力学サイズ: 動的光散乱分析 (DLS) で測定。懸濁液調整後 20 分放置し後上澄みを分析、対象: 脱イオン水中の 737 μM 粒子懸濁液、細胞培養液中の 737 μM と 123μM 粒子懸濁液。</p> <p>③ゼータ (ζ) 電位: ZetaPALS 電位アナライザで測定、対象: DPB 中の 737 μM ZnO NPs、MPs</p> <p>・粒子特性</p> <p><平均直径> ZnO NPs: 72±46nm、ZnO MPs: 237±119nm (TEM 測定、図 1)</p> <p>サイズ分布は広いものの、ZnO NPs の大多数 (84%) は 100nm 以下であった。MPs の大部分 (96%) は 100nm 以上であった。</p> <p><ゼータ電位></p> <p>ZnO NPs: -13.3±2.3mV (脱イオン水)、-33.7±1.6mV (pH 7.4DPB)</p> <p>ZnO MPs: -16.6±1.5mV (脱イオン水)、-36.5±2.7mV (pH 7.4DPB)</p> <p>DPBS Dulbecco's Phosphate Buffer Saline</p> <p><平均流体力学直径> (DLS 測定)</p> <p>・737 μM 水性懸濁液中 ZnO NPs: 85.5nm (PdI = 0.809)、ZnO MPs: 112.8nm (PdI = 0.738)</p> <p>・123μM 細胞培養液中 ZnO NPs: 253nm (PdI = 0.363)、ZnO MPs: 456nm (PdI = 0.214)</p>
試料調整法	ZnO NPs と ZnO MPs の 123mM ストック懸濁液は、脱イオン水中で調製され、各実験の前に、超音波で 15 分間破壊後、細胞培養液中で最終濃度に希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>・細胞培養</p> <p>【試験生物】マディン・ダービー犬の腎臓細胞 (MDCK 細胞)</p> <p>培養媒体: 4mM L-グルタミンと 5% (v/v) ウシ胎児血清 (FB) で補充されたダルベッコの修正イーグル培地 (DMEM) と F-12K の 1:1 の混合物 (v/v)</p> <p>・細胞培養液における ZnO NP の溶解分析</p> <p>ZnO NPs 濃度: 2 水準 (0.61、123μM)。</p> <p>細胞実験と同じ条件下で 24h 保持。この後、超遠心分離 (10 万 rcf×30 分) にかけた後、上澄みの一部を HNO₃ で酸性とし。火炎原子吸光分析 flame atomic absorption spectroscopy で全 Zn 濃度を測定。残りの一部は酸性化せず、矩形波陽極のストリッピング・ボルタンメリーによって分析。</p> <p>・細胞毒性分析</p> <p>測定項目: Zn 化合物の細胞毒性。分析方法: 3 種。陽性対照: 0.5mM H₂O₂ 以下、①②③とも MDCK 細胞濃度: 2.2×10⁴ 細胞/cm²、培養時間: 24h、培養液: ZnO NPs、ZnO MPs と ZnCl₂ の等モル濃度の媒体。</p> <p>培養液濃度: 12、61、123、184、369、737 μM (それぞれ、1、5、10、15、30、60μg/mL ZnO に、1.67、8.37、16.7、25.1、50.2、100μg/mL ZnCl₂ に対応)</p> <p>①MTT 分析 測定項目: ミトコンドリア酵素活性の評価。測定: 570nm の吸光度を spectrophotometry で測定。</p> <p>②NRU 分析 測定項目: リソソーム (ATP-依存的プロセス) 中の酸性 pH を維持する細胞の能力。培養の後、中性赤染料 (最終濃度 0.04mg/mL) を加えて再度 2 時間培養後、中性赤染料の蛍光を測定 (励起波長: 530nm、測定波長: 645nm)。</p>

	<p>③トリパンブルー除外分析 測定項目:細胞膜安定性の評価。培養後、細胞は収穫されて(トリプシン/EDTA)、0.2%(w/v)トリパンブルー溶液で染色し、細胞生存度を顕微鏡的観察によって評価。</p> <p>・アルカリ性コメット分析 測定項目:一本鎖と二本鎖のDNA破壊、アルカリ不安定な部位、不完全な除去修復部位。MDCK細胞濃度:2.2×10⁴細胞/cm²。培養時間:24h。細胞培養液(12、61、123 μM)の中に調製されるZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂溶液。陽性対照:メタンサルホン酸メチル(MMS)溶液(0.45μM)。ばく露の後、細胞懸濁液は1.6%低融点アガロースを混合され、冷電気泳動緩衝液(0.3M NaOH、1mM EDTA、pH>13)に30分間浸漬。この後、電気泳動を実施(1V/cm、40分)。電気泳動の後、エピ蛍光顕微鏡を用いて検査。コメットの尾部に存在するDNAの割合を、DNA損傷のパラメータとして使用。</p> <p>・細胞分裂-遮断小核分析 測定項目:一度分けられた二有核細胞 once-divided bi-nucleated cells における染色体損傷の評価。MDCK細胞濃度:1.2×10⁴細胞/cm²。培養時間:24h。細胞培養液(12、61、123 μM)の中に調製されるZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂溶液。陽性対照:Methyl methanesulfonate (MMS) 溶液(0.45μM)。ばく露後、細胞は1.5μg/mLヘキスト33258と1μg/mLプロピジウム・ヨウ化物で染色されエピ蛍光顕微鏡二有核細胞の小核の存在を調査。アポトーシス or 壊死性細胞、単核、二有核、トリ有核および四有核細胞の頻度も評価。</p> <p>・カタラーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性分析 測定項目:2つのストレス関連酵素の活性度の測定(CATとGST)(細胞ストレス-防衛力の評価)。MDCK細胞密度:2.2×10⁴細胞/cm²。培養液:ZnO NPs、ZnO MPsまたはZnCl₂の溶液(12、61、123μM)。陽性対照:H₂O₂溶液(0.5mM)。培養時間:24h。培養後、細胞ホモジネートの総蛋白濃度を、ピアスニシンコニン酸(BCA)タンパク質分析キットで測定。CAT活性:全細胞タンパク質量当たりのCAT活性は、H₂O₂に対する消滅係数より計算。GST活性:全細胞タンパク質の質量当たりのCDNBGSH複合物(GSTによって引き起こされる反応の生成物)に対する吸光係数を用いて計算。</p> <p>・無細胞ROS測定 測定項目:全てのZn化合物の酸化性ポテンシャルの評価。培養時間:24h。陽性対照:0.025mM H₂O₂。培養後、酸化されたDCFH(DCF)の蛍光は、495nmの励起波長と520nmの放出波長で測定。</p>
試験結果	<p>・ZnO NPsの24時間培養の細胞培養液中のZn含有量 細胞がない以外は細胞毒性実験と同じ条件で測定した結果、ZnO NPsの細胞培養液中への溶解は高かった(表1)。超遠心分離前の測定では、Znのおよそ50%は非粒子の形状(表1)で存在した。それはZnイオンならびに有機分子とそれらの錯体から成る。</p> <p>・細胞毒性分析(2.5に対応) 全てのZn化合物が同様の濃度依存的細胞毒性を示した。これは、184μM以上の濃度で対コントロールで有意であった(MTTとNRU分析)。トリパンブルー除外分析では、369μM以上で対コントロールで有意であった(図2)。</p> <p>・アルカリ性コメット分析 ZnO NPsばく露の場合、61μMと123μM以上の濃度で二本鎖および一本鎖DNA破壊の増加が観察された。ZnO MPsとZnCl₂の場合、123μM以下の濃度ではDNA損傷の増加は認められなかった。(図3A)。</p> <p>・細胞分裂-遮断小核分析 cytokinesis-block micronucleus assay (CBMN) assay ZnO NPsの場合のみ、61μMの濃度で遺伝毒性は増加した。ZnO MPsとZnCl₂は、全ての濃度で(<123μM)染色体異常の増加は認められなかった(CBMN分析、図3B)。</p> <p>・カタラーゼとグルタチオン-S-トランスフェラーゼ活性分析 123μM ZnO NPsで処理された場合だけGST活性は減少した。ZnO MPsとZnCl₂は、培養後、12μMから123μMの濃度範囲でGST活性を変化させなかった(図4A)。 ZnO NPs(61μMと123μM)で培養の場合、CAT活性は減少した。ZnO MPsは、最高の試験濃度(123μM)でさえ、CAT活性に影響しなかった。ZnCl₂はばく露濃度123μMでCAT活性にわずかに影響した(図4B)。</p> <p>・無細胞ROS 細胞培養媒体中のROS含有量は、ZnO NPs、ZnO MPs、ZnCl₂の場合とも、有意な増加を示さなかった(図5)。</p>
結論	<p>ZnO NPsのサブ細胞毒性濃度は、遺伝毒性影響を誘起する。この影響は粒子サイズ依存的である。ZnO NPsの遺伝毒性は、GSTとCAT活性の減少を伴う。細胞培養液中のZnO NPsから溶出したZnイオンが細胞影響の唯一の原因とはいえない。試験遺伝毒性の陽性結果、細胞防御システムの損傷と細胞毒性の欠如は、NPsの有り得る副作用の早期警戒と考えられる。</p>

No	ZnO-4
論文題目 (和訳)	Involvement of <i>PINK1</i> /parkin-mediated mitophagy in ZnO nanoparticle-induced toxicity in BV-2 cells. (BV-2 細胞における ZnO ナノ粒子誘発毒性での <i>PINK1</i> /parkin 介在マイトファジーの関与)
著者 所属機関	Wei L ¹ , Wang J ¹ , Chen A ² , Liu J ² , Feng X ² , Shao L ² . 1 Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, People's Republic of China; Department of Pediatric Dentistry, School and Hospital of Stomatology, Wenzhou Medical University, Wenzhou, People's Republic of China. 2 Department of Stomatology, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou, People's Republic of China.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Mar 8;12:1891-1903. doi: 10.2147/IJN.S129375. eCollection 2017.
試験物質	ZnO NPs:購入先;Sigma Chemical (St Louis, MO, 米) 直径約 50 nm、六角形プリズム形状(TEM)。 水溶液中に分散時に小凝集体を形成(ZnO NPs の流体力学的サイズが示唆)。
試料調整法	ZnO NPs は、最終ストック濃度 10 mg/mL で脱イオン水中に懸濁。懸濁液は、使用前に毎回 30 分間超音波処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 不死化マウスミクログリア細胞株、BV-2:購入先;CBCAS (Cell Bank of the Chinese Academy of Sciences, Shanghai, 中国) 播種後 2 日目、細胞は Lipofectamine 3000 (Invitrogen) を使って <i>PINK1</i> siRNA または GFP LC3 を遺伝子導入(トランスフェクト)された。実験では <i>PINK1</i> siRNA の 3 つのペアを BV-2 細胞中の <i>PINK1</i> 遺伝子をノックダウンするために使用。 ・投与方法・期間・試験用量: MTT アッセイ; 細胞成長曲線、ZnO NPs 処理後の細胞生存率の両方を MTT アッセイを用いて評価。野生型 BV-2 細、empty ベクター導入 BV-2 細胞クローン、 <i>PINK1</i> siRNA 導入 BV-2 細胞クローンは、ZnO NPs の異なる濃度に 24 時間ばく露。 ミトコンドリアの分離および Western blot 分析(タンパク質発現評価); 異なる期間 (4, 8, 12, 24 h) ZnO NPs にばく露。放射性免疫沈降法により細胞内総蛋白を抽出。細胞ミトコンドリア分離キットを使ってミトコンドリア蛋白質を抽出。 免疫細胞化学; ZnO NP 処理後。 細胞内活性酸素種 (ROS) レベル(ジクロロジヒドロフルオレセインジアセテートアッセイ (DCFH-DA, Sigma-Aldrich, St Louis, MO, 米国); 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理後。 MDC 染色; ダンシルカダベリン(MDC) <蛍光色素および自食作用胞の特定マーカー>を、ZnO NPs が BV-2 細胞でオートファジーを誘発させたかどうかを確認するため使用。 JC-1 アッセイ(Sigma JC-1 Assay Kit;ミトコンドリア膜電位の変化(ΔΨm)測定); 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理後。
試験結果	・ZnO NPs の BV-2 細胞生存率に及ぼす影響: 野生型 BV 2 セルで ZnO NP 治療後の細胞生存率; ZnO NPs は、用量依存的に BV-2 細胞生存率に影響。10µg/mL よりも低濃度で、ZnO NPs は細胞の生存率に大きな影響を示さなかった。 3 タイプの細胞の細胞成長曲線; 成長曲線に基づき、細胞生存率に有意差無し。細胞の形態に明らかな差無し。 3 タイプの細胞間の NPs を用いた処理に続く細胞生存率の比較; <i>PINK1</i> の機能の損失が ZnO NPs に対する BV-2 細胞の脆弱性を増加した。 ・ZnO NPs は BV-2 細胞における酸化的ストレスを時間依存で誘発した。 ・ZnO NPs はミトコンドリアの膨潤を誘発し、BV-2 細胞においてオートファジープロセスの誘因となった。 LC3 GFP プラスミド導入野生型 BV-2 細胞は ZnO NP 処理後、オートファジー空胞の形成が観察された(蛍光顕微鏡、MDC 染色、TEM)。ZnO NPs が NPs ZnO を用いた処理後すぐにオートファジープロセスを誘発した(Western blot 分析を用いたオートファジー指標 LC3 の発現の評価結果)。 ・BV-2 細胞における ZnO ナノ粒子誘発毒性での <i>PINK1</i> /parkin 介在マイトファジーの関

	<p>与： LC3、総 parkin、細胞質中の parkin、ミトコンドリア中の parkin、PINK1、カスパーゼ-9 の蛋白質発現評価 (Western blot 分析)、ZnO NP 処理後、PINK1 発現上昇していることを示した。総 parkin は処置前後有意差無し、cyto-parkin レベル低下、mito-parkin レベル上昇し、細胞質からミトコンドリアへの parkin の移行を示した (マイトファジーの関与を意味する)。</p> <p>・PINK1^{-/-}BV-2 細胞を 10µg/mL ZnO NPs、4、8、12、24 時間で処理： JC-1 アッセイおよび Western blot の結果は、総 parkin レベルが維持されたことを明らかにした。しかし、ミトコンドリア中の parkin の発現は野生型細胞のミトコンドリア中でより低く、ZnO NPs 処理後 parkin はほとんどミトコンドリア中に移行しなかった。野生型細胞と比べて、PINK1^{-/-}細胞は、ZnO NPs 処理後、より高いカスパーゼ-9 発現を示し、ZnO NP によって誘発された PINK1 の損失が細胞アポトーシスを増加させた。</p>
結論	<p>PINK1/parkin-介在マイトファジーは、BV-2 細胞における ZnO NP 誘導毒性で役割を果たすと示唆された。ただし、<i>in vitro</i> 細胞モデルは正確に身体中に存在する様々な細胞間相互作用を模倣できない。これらのデータだけを使用して、生物中での ZnO NPs の毒性学的挙動を正確に予測することは困難で、これは本研究の避けられない制限だった。最終的な結論に達するために、さらに動物実験が必要である。ZnO NPs のユニークな物理化学的特性が傷害の新しいメカニズムを起こすかどうか、これらの傷害が新しい病理学に結果としてつながるかどうかは未定である。</p>

No	ZnO-5
論文題目 (和訳)	Zinc oxide nanoparticles exhibit cytotoxicity and genotoxicity through oxidative stress responses in human lung fibroblasts and <i>Drosophila melanogaster</i> . (酸化亜鉛ナノ粒子はヒト肺線維芽細胞及びキイロショウジョウバエにおいて酸化ストレス反応を通じた細胞毒性および遺伝毒性を示す。)
著者 所属機関	Ng CT ¹ , Yong LQ ² , Hande MP ³ , Ong CN ⁴ , Yu LE ⁵ , Bay BH ² , Baeg GH ² . 1 Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore; Environmental Research Institute, National University of Singapore, Singapore. 2 Department of Anatomy, Yong Loo Lin School of Medicine, National University of Singapore, Singapore. 3 Department of Physiology, Yong Loo Lin School of Medicine. 4 Environmental Research Institute, National University of Singapore, Singapore. 5 Department of Civil and Environmental Engineering, National University of Singapore, Singapore, Singapore.
書誌事項	Int J Nanomedicine. 2017 Feb 28;12:1621-1637. doi: 10.2147/IJN.S124403. eCollection 2017.
試験物質	・ZnO NPs (Sigma-Aldrich から、製品番号 721077) ; <100 nm 粒子サイズ (動的 光散乱法 [DL]; Milli-Q water 中) (TEM 観察) 球状、直径~70 nm の平均流体力学サイズ、表面電荷 = +5.8 mV。ZnO NPs の凝集体が観察された。 ・比較用 (異なるサイズ) ZnO NPs (US Research Nanomaterials, Inc.); 水溶液中粒子 サイズ = ~50-80 nm
試料調整法	実験で使用する前に、在庫濃度 1 mg/mL の溶液は、新たに調製され、超音波処理、滅菌 フィルター処理。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: 継代 20-30 であるヒト MRC5 胎児肺線維芽細胞 (ATCC® CCL 171™); Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) で培養された。 ・投与方法・期間・試験用量: ZnO NPs の <i>in vitro</i> 処理; 濃度範囲 (0, 1, 10, 25, 50, 75, 100 µg/mL)、24, 48, 72 時 間。 リポ酸 (LA) とグルタチオン (GSH) は、300µM と 3mM で、ZnO NP 誘発細胞毒性に及 ぼす抗酸化影響を調べるため、ZnO NP 処理前 24 時間に添加。 *ハエ系は、下欄に記載。
試験結果	<ヒトMRC5 胎児肺線維芽細胞におけるばく露影響> ・LDHアッセイ: 上澄液中のLDH 活性を490 nm でSpectraMax M5 MicroPlateリーダ ーを用いて定量化。 ・AlamarBlue® アッセイ: 細胞毒性をモニター。 FACS (fluorescence activated cell sorter) 解析: 染色; Annexin V and fluorescein isothiocyanate (FITC) Apoptosis Detection Kit I (BD Biosciences)、細胞周期解 析; Dako Cyan フローサイトメトリー (DakoCytomation) で解析・点数化。 ・細胞ROS検出アッセイ: DCFDAで染色、蛍光強度を測定。 ・RNA抽出、逆転写 (RT) と定量的リアルタイム RT-ポリメラーゼ連鎖反応 (qRT-PCR): 総RNA分離; Purelink RNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) 使 用。RNA品質評価; NanoDrop ND-1000 Spectrophotometer使用。cDNA変換; Agilent AffinityScript qPCR cDNA synthesis kit (Genomax Technologies) 使用。 mixture consisting of 希釈cDNA, SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)、各遺伝子のためのプライマーの混合物解析; 7900HT Fast Real-Time PCR machine (Thermo Fisher Scientific) 使用。 ・8-ohdG DNA 損傷の定量化: 酸化的 DNA 損傷をモニター; EpiQuik™ 8-ohdG DNA 損傷定量キット (Epigentek) 使用。DNA抽出; PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Thermo Fisher Scientific) 使用。 ・コメットアッセイ: 【試験結果】 ・ZnO NPs の内面化、顕著な形態変化、核変化とアポトーシスの形成体、細胞の収縮を確 認。 ・ZnO NP 処理MRC5 細胞の膜完全性を失っていることは、用量依存的LDH 放出に関 連付けら、細胞生存率は早ければ処理後24時間で減少、ZnO NPs濃度 50µg/mL で総 細胞死を引き起こした。FACS 解析は、アポトーシス細胞死を見付けた。

	<p>・RC5 線維芽細胞において、ZnO NPs へのばく露は、ROS誘発と小胞体ストレスに関連する遺伝子の発現の増加を起こした。DNA damage inducible transcript 3 (DDIT3) と ER to nucleus signaling 1 (ERN1)の発現が大幅にアップレギュレーションされることが分かった。</p> <p>遺伝毒性試験;ZnO NP は結果としてROS産生に結び付き、コメットアッセイ (図 5 b) によって示されるように、酸化的 DNA 損傷に続いて、8-OHdGの蓄積につながった。</p> <p><ハエ系統におけるばく露影響></p> <p>キイロショウジョウバエの次の系統はこの研究で使用された: 野生型 <i>Canton-S; Sod2N308/CyO</i> (NIG-FLYから入手); と <i>cncCK6/TM3, Sb</i> (Dr Kerppola T からの贈り物)。 <i>in vivo</i>生存率分析で、野生型成虫は0, 0.1, 0.25, 0.5, 1 mg/mL の ZnO NPs を添加した食品メディアを含んだバイアルの中に置かれた。親のハエはその後 5 日後に取り出され、大人の段階への産まれた卵の生存率をモニターしていた。出現したF1 (雑種第一世代) ハエは収集され、カウントされ、コントロール(未処理; 0 mg ZnO NPs)に比べての生存率が計算された。</p> <p>CncC (転写因子Nrf2 のショウジョウバエの相同物) またはスーパーオキシドジスムターゼ 2 (SOD2) 活性の抑制が、ZnO NP 誘発ROSを減少させ、ZnO NP 誘発生存率を上昇させるかどうか評価するために、処女雌and <i>cncCK6/TM3, Sb</i> または <i>Sod2N308/CyO</i>ハエは、雄 <i>Canton-S</i>ハエと交配された。ハエは0, 0.25 や 0.5 mg/mL ZnO NPs を含む食品メディアへ移され、出現した成体が収集され、カウントされ、コントロールに対する生存率の割合を算出した。</p> <p>ジヒドロエチジウム(DHE)染色を用いた ROS検出は、幼虫の内臓で実施。</p> <p>【試験結果: <i>in vivo</i>】</p> <ul style="list-style-type: none"> ・処理ハエの F1 子孫の 3 齢幼虫の腸中へ摂取され内面化された ZnO NPs が見つかった。いくつかの ZnO NPs は腸管内の微絨毛に付着して、いくつかは、腸の細胞の細胞質内小胞内に囲まれているのが観察された(電子顕微鏡)。 ・ <i>Canton-S</i>ハエの F1 子孫の卵の成人での生存率は、試験された ZnO NPs の 0から 10 mg/mL の範囲で用量依存的に低下し、0.5 mg/mL で 49.8%。 ・ROS の中間レベルは 0.25 mg/ml ZnO NPs で観察された一方、0.5 mg/mL ZnO NP では過剰量の ROS を誘発させた。 ・低下された生存率は、Sod2 または CncC (Nrf2 のショウジョウバエの相同物)に対してヘテロ接合しているハエにおいて、コントロール ファイルと比較して、強化された。
結論	<p>この研究は、ZnO NPs が、ER ストレス、細胞毒性、および遺伝毒性によって毒性を起こすことができ、それはROS生成と密接に関連し、必然的に、<i>in vitro</i>で細胞死を引き起こす、ことを示した。また、<i>in vivo</i>研究は、摂取経路による ZnO NPs ばく露が、酸化ストレスを引き起こすことによって生体に毒性を起こすことができ、ショウジョウバエの減らされた生存能力に結果としてつながった、ことを示した。<i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 調査両方からの結果は、それらの毒性に寄与している重要なメカニズムであるかもしれない ZnO NPs の有害影響をより良く評価するのに役立つかもしれない。</p>

No	ZnO-6
論文題目 (和訳)	Nanomaterial-induced cell death in pulmonary and hepatic cells following exposure to three different metallic materials: The role of autophagy and apoptosis. (3つの異なる金属材料へのばく露の後に続く肺と肝臓の細胞におけるナノマテリアル誘発細胞死:オートファジーとアポトーシスの役割)
著者 所属機関	Kermanizadeh A ¹ , Jantzen K ¹ , Ward MB ² , Durhuus JA ³ , Juel Rasmussen L ³ , Loft S ¹ , Møller P ¹ . 1 Department of Public Health, Section of Environmental Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. 2 Leeds Electron Microscopy and Spectroscopy (LEMAS) Centre, University of Leeds, Leeds, UK. 3 Department of Cellular and Molecular Medicine, University of Copenhagen, Center for Healthy Aging, Copenhagen, Denmark.
書誌事項	Nanotoxicology. 2017 Mar;11(2):184-200. doi: 10.1080/17435390.2017.1279359. Epub 2017 Jan 24.
試験物質	ZnO-BASF Z-Cote; 非被覆、100nm。乾燥粉。 Ag-RAS GmbH; Capped; <20nm。Ag NPs は安定剤を含む脱イオン水中で供給。 TiO2 試料は、The National Research Center for the Working Environment (Copenhagen, デンマーク)によって入手され、中性電荷ルチル材料(10nm)から製造された。乾燥粉。 キャラクタリゼーション(文献値); NM 型、XRD サイズ(nm)、TEM サイズ、表面積(BET;m ² /g)、完全 MEM 中サイズ(平均、nm)、完全 F-12 中サイズ(平均、nm)の順で記述。 ZnO、70- > 100、20-250/50-350、14、100.6、81.8。Ag、(7、14、< 18)、8-47(平均 17.5)、NA、59.2、47.6。TiO2、10、80-400、84、160.6、149. 3。 MEM: minimum essential Eagle cell culture medium F-12: Ham's F-12 cell culture medium 添加 ZnO の約 50%は、24 時間後、細胞培養培地中で溶解したが、Ag は 1%より少なかった。
試料調整法	分散液は超音波処理、培地希釈前に氷上で保存、30 分以内に使用。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	ヒト肝癌細胞株 HepG2; Sigma-Aldrich (Paisley, 英国) ヒト肺上皮細胞株 A549; ACTT (American Type Culture Collection) から。 全実験は、passage 3 と 20 の間の細胞使用。 ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果欄で記述。
試験結果	・WST-1 細胞毒性試験 (WST-1 細胞増殖試薬使用; NMs 濃度 0.31-156.25µg/cm ² (1-500µg/mL に相当)、24 時間ばく露後): 細胞生存率は濃度依存的に低下した。 HepG2-LC20 (µg/cm ²)、-LC50、A549-LC20、-LC50 ZnO 1.25 2.5 0.62 2.5 Ag 2.5 5 0.62 2.5 TiO2 39 未到達 78 未到達 LC20: 20% 致死濃度 ・遺伝子発現レベル評価 (NMs へ 6 時間ばく露後。追加的に 100nM のラピマイイン (オートファジー誘発剤) 及びバフィロマイシン (オートファジー阻害剤) へ 2 時間ばく露。3 処理に対して、RNA 抽出・分離、RNA 濃度・純度測定、cDNA へ転写、RT-PCR。遺伝子発現の 6 時間解析後、NMs へのばく露後の HepG2 細胞において LC3B、p62、atg12 レベルの広い時間コース (1、2、4、6、12 時間) 調査実施。): アポトーシス; 幅広い細胞周期プロセスで重要な遺伝子 (LC3B、atg12、atg3、atg4b、atg5、p62) の発現調査。Ag、ZnO ばく露後の両細胞で、LC3B、atg4b、p62 がアップレギュレーション、atg12、atg5 がダウンレギュレーションされた。 LC3B、atg4b、p62 のうち LC3B、p62 は、Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、時間依存的にポジティブだった。TiO2 NMs は顕著な変化無。 ・Western blotting 解析 (標的蛋白質 (LC3、p62) の発現検知; NMs への HepG2 の 4、6、24 時間ばく露後): オートファジー; Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、LC3- II レベルが時間依存的に上昇した。p62 蓄積も見られ、後半時点で最も見付けられやすかった。 ・TEM (NMs への 6 時間ばく露後):

	<p>Ag、ZnO ばく露後の HepG2 細胞において、ばく露後の細胞内コンポーネントの隔離のために形成された二重膜オートファゴソーム様構造を示した。TiO₂ NMs では、単一膜小胞を容易に検知したが、検知できるオートファゴソームの数はより少なかった。肝細胞による Ag、ZnO NMs の取込みは EDX で確認されたが、ZnO はその高い溶解性のためより困難だった。</p> <p>・蛍光顕微鏡 (NMs (LC20) への 6 時間ばく露後) 共焦免疫蛍光顕微鏡からは、LC3- I と II の区別ができなかった (抗体が蛋白質の両蛋白質を認識するため)。Ag、ZnO ばく露後、細胞はオートファジーを形成した。TiO₂ は起こさないか極めて少なかった。</p> <p>蛍光顕微鏡 (細胞骨格の構造変更; NMs (LC20) への 6 時間ばく露後の HepG2 細胞中のアクチンフィラメントを染色して測定): NM 処理とコントロール (ラピマイイン) との間で F-アクチンネットワークでほとんど変動なく、これらのフィラメントはオートファジーに可視的に関与していないことが示唆された。しかし、Ag、ZnO ばく露後、G-アクチンネットワークが多数変動しているのが観察された。</p> <p>アポトーシス細胞検知 (NMs への 24 時間ばく露後): オートファジー経路の疑わしい機能不全はアポトーシス/ネクローシスの細胞死にリンクする。サイトフローメトリーで確認の結果、アポトーシスが主要メカニズムであった。</p> <p>カテプシン B の酵素活性 (NMs への 24 時間ばく露後の HepG2 細胞): ネガティブコントロールを超えるカテプシン B の酵素活性の変化はどの NMs に対しても観察されず、オートファジーとアポトーシスの間の相互作用はなかった。</p> <p>カスパーゼ 3 の酵素活性 (NMs (又は 6μM のカンプトテシン (アポトーシス誘発剤)) への 6 時間ばく露後): カスパーゼ 3 発現はアポトーシスとよく一致し、これらの NMs へのばく露後のカスパーゼ 3 依存アポトーシス細胞死が確認された。</p>
<p>結論</p>	<p>オートファジーの生理学的な機能の新しい理解を基に、オートファジーにおける基底レベルとストレス誘発増加の両方が哺乳類健康を促進することで重要であることは明確である。本研究で、このオートファジー経路の機能障害が ZnO 及び An NMs、しかし TiO₂ NMs でない、へのばく露に続く異なる臓器から供給された 2 つの細胞タイプにおけるアポトーシス死に寄与することが示された。従って、全オートファジー過程の包括的な解析を実行することは重要であり、それは、ナノテクノロジーリスクの理解、安全なナノ材料、ナノ医療の設計に役立つ巨大な可能性を持っている。</p>

No	ZnO-7
論文題目 (和訳)	Effect of size and shape on toxicity of zinc oxide (ZnO) nanomaterials in human peripheral blood lymphocytes (ヒト末梢血リンパ球における酸化亜鉛 (ZnO) ナノ材料の毒性に及ぼすサイズおよび形状の影響)
著者 所属機関	D. Shalini, S. Senthilkumar & P. Rajaguru Department of Biotechnology, Anna University-BIT Campus, Tiruchirappalli, India
書誌事項	TOXICOLOGY MECHANISMS AND METHODS, 2018, VOL. 28, NO. 2, 87-94
試験物質	ZnO ナノ粒子 (NPs)、ナノロッド (NRs)
試料調整法	ZnO NPs の合成; 50mg 酢酸亜鉛二水和物を室温で超音波処理により 25ml メタノールに溶解、濾過、キシレン 25ml で希釈、30 分間超音波処理により完全混合。反応を 60°C、10 時間継続。合成 ZnO NP を濾過により回収、過剰のメタノールで洗浄。ZnONP を種として ZnONP を用いて水熱成長。シード層被覆サンプルを、60°C で 90 分間の二重蒸留水中の硝酸亜鉛及びヘキサメチレンテトラミンのそれぞれ等モル溶液 (0.01M) と混合。ZnO NR は、メタノールで穏やかに超音波処理後、収集、乾燥。 ZnO 微粒子 (MP)、マイクロロッド (MR) の合成; ZnO 粉末 (Sigma-Aldrich (St.Louis, MO)) を使用。MR は、ZnO MPs を種として水熱合成法で合成。ZnO MP を二重蒸留水中の硝酸亜鉛とヘキサメチレンテトラミンの等モル溶液 (0.02M) に入れ、90°C で 90 分間保持。ろ過により集めた ZnO MR を二重蒸留水で 2 回洗浄、乾燥。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 健康な男性供与者 (22~25 歳) から得られた HPBL 細胞 試験用量: [細胞毒性] ZnO NM (NP、NR、MP および MR) 50-1000mg/ml、[遺伝毒性] PBS (25,50,100mg/ml)、ZnO NM (細胞毒性と同じ)、[遺伝毒性に対する抗酸化作用] ZnO PBS 中の NMs (NP 及び NR: 25mg/ml; MP 及び MR: 50mg/ml) 酸化電位; DTT アッセイ。 ZnO NMs の細胞毒性・遺伝毒性; フィコール-ヒストパーク (Ficoll-Histopaque) 密度勾配法使用。ヒト HPBL により評価。細胞懸濁液を血清を含まない RPMI-1640 培地で希釈 (100µl 懸濁液中に約 1×10 ⁶ 個の細胞)。無血清で分散した ZnO NM (NP、NR、MP 及び MR) の異なる濃度を有する 96 ウェルプレート中の HPBL 細胞 (1~104 細胞/ウェル) を処理することにより、ZnO NMs の細胞毒性を評価。RPMI-1640 培地中で 37°C、24 時間培養後、MTT アッセイ。各濃度について、少なくとも 6 回の反復維持。細胞添加前に、ZnO NM ストック懸濁液 (2000mg/ml) を 30 秒間 3 回超音波処理。遺伝毒性測定用に、24 ウェルプレート上の細胞を PBS 中の異なる濃度の ZnO NM で 37°C、3 時間処理し、アルカリコメットアッセイ。 ZnO NMs の遺伝毒性に対する抗酸化物質の役割; 37°C、2 時間、ビタミン C、ケルセチン又はアポシニン (各 50mM) で細胞処理後、ZnO PBS 中の NMs を 37°C、4 時間培養。3 つの培養物及びコントロールを全サンプルについて維持。コメットアッセイ用の陽性対照 H ₂ O ₂ (100mM、5 分、37°C)。コメットアッセイは、Ramkumar et al. (2012)。臭化エチジウム (10mg/ml) で染色したスライドを 20°C で試験。蛍光顕微鏡で測定。3 つの複製スライド (50 細胞/1 スライド) から無作為選択された 150 の細胞の合計を 1 試料につき検査。尾部 DNA パーセントを Comet Score TM バージョン 1.5 ソフトウェアで測定。 エンドキシン検出; 全 NM を Limulus Amebocyte Assay で試験。エンドキシンの存在を、100mg/ml 濃度で三連アッセイ。NM は検出可能な量のエンドキシンを含まなかった。 脂質過酸化の推定; ZnO NMs 誘導脂質過酸化を測定するために、試験物質 (24 ウェルプレートで 5~10 ⁴ 細胞/ウェル、37°C で 1 時間) にばく露後、細胞を遠心分離、上清除去。細胞ペレットを PBS に再懸濁、超音波処理。透明な溶解物をチオバルビツル酸反応性物質 (TBARS) (Nichens Niehaus and Samuelsson 1968) と脂質ヒドロペルオキシド (Jiang ら、1992) の推定に使用。 乳酸脱水素酵素 (LDH) 放出; 細胞から放出された LDH のレベルを測定して、処理した細胞の膜完全性に対する ZnO NMs の効果を評価。新たに単離された HPBL 細胞 (37°C) を 25,50 及び 100mg/ml ZnO NM で 4 時間処理。LDH 放出は、ピルビン酸ナトリウム存在下で NAD ⁺ からの NADH の酵素的形成をモニターにより決定 (Qiu ら、2007)。4 時間後、試料採取、遠心分離、PBS (pH7.4) で 5 倍希釈。100ml 希釈サンプル等量を 100ml 試薬と混合、96 ウェルプレート中の PBS、pH7.4 中の 1.5mM NADH 及び 25mM ピルビン酸ナトリウム最終濃度を得、吸光度を 340nm で測定。

	<p>細胞内活性酸素種(ROS)測定; ROSの細胞内レベルを、DCFH-DAの蛍光化合物ジクロロフルオレセイン(DCFH)への酸化変換の測定により決定。24ウェルプレートに採取したHPBL細胞(5~104細胞/ウェル)を25,50及び100mg/ml ZnO NMsで4時間、37°Cで処理、DCFジASETと培養培地中で15日間培養した冷PBSで3回洗浄。緑色蛍光強度(酸化DCFH)をマルチモード検出器で測定。</p>
<p>試験結果</p>	<p>SEM画像;なめらか、六角形。球形(NP、MP)。平均φは、NP187nm、MP683.5nm。水中表面電荷は、-20.0~-29.9mV。 酸化電位レベル;NP・NR>MP・MR(図2)。 ZnO NMs誘発細胞内ROS生成レベル; ZnO NM4種類全てで、細胞内ROS生成の用量依存的増加の誘導を示す。全用量レベル(25,50 および 100mg/ml)で、ROS産生は、NP・NR>MP・MR(図3、DTTアッセイと一致)。 細胞生存率;生存率における用量依存的な減少を示した(図4)。ZnO NPは、本研究で使用した他の3形態のZnO NMと比較して、より少ない細胞傷害性を有した。これにもかかわらず、全てのNMsは、最高試験濃度(1000mg/ml)でさえ50%未満の毒性を誘導することが判明。 LDH放出;より低用量レベル(25及び50mg/ml)でのZnO NM全4種類が、未処理対照細胞と比較してLDH放出において有意な変化を誘導しなかったことを示した。100mg/mlでは、MR単独ではLDH放出レベルが有意に高かった。 HPBL細胞の遺伝毒性; ZnO NPのみが用量依存的にDNA損傷を誘導、試験レベル(25,50及び100mg/ml)の他の形態のZnO NMは検出可能なDNA鎖を誘導しなかった(図6)。ZnO NP処理細胞では、%tail DNAの中央値は線量とともに線量増加し、100mg/mlでは%tail DNAは陽性対照(H₂O₂処理細胞)のそれと同等であった。箱の大きさとボックスの中央線は、より高レベルのDNA損傷を有する多数の細胞を示すより大きな値に向かって%tail DNA値が歪められることを示唆した。他の処理群では、有意なレベルのDNA損傷は観察されなかった。さらに、全処理群において、多数の外れ値の存在は、各処理群における小グループの細胞が、より高レベルのDNA損傷を被ったことを示した。 抗酸化物質の効果;抗酸化剤の中で、ビタミンC又はケルセチンによる前処置は全処理群でDNA損傷を減少させたが、アポニン前処置はZnO NPの遺伝毒性を増加させた(図7)。3つの化合物は全て、H₂O₂処理細胞のDNA損傷を減少させ、50mM濃度でHPBL細胞に検出可能なDNA損傷を誘導しなかった。しかし、全ての実験において、全処理群における多数の細胞が、DNA損傷からの細胞の不完全な回収を示す異常値のままであった。 脂質過酸化;全てのZnO NMsは、TBARS及びLOOH値により示されるように、用量依存的に有意な脂質過酸化を誘導した(図8(a,b))。微小粒子及びMRは、より高レベルの脂質過酸化を引き起こすことが見出されている。 相関分析;細胞傷害性がLDH放出、TBARSおよびLOOHと有意な正の相関を、値および遺伝毒性がDTT及びDCF値と正の相関を有することを示した(表2)。DTT値とDCF値の間には有意な相関が見られた。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究の結果は、ナノ物質のサイズと形状がその毒性に大きな影響を与えることを示唆した。NPおよびナノロッド(NR)は、微小粒子(MP)およびマイクロローズ(MR)より高いレベルの酸化電位およびROS生成能力を有していた。対照的に、MPおよびMRは、より高いレベルの脂質過酸化能力を有していた。より小さなNPはより遺伝毒性であり、より大きなMPおよびMRは本質的により細胞傷害性であった。ビタミンC又はケルセチンによる処理は、ZnO NMに伴う遺伝毒性を有意に減少させる。より小さなNP及びNRが<i>in vitro</i>でHPBLにおいてより遺伝毒性であることを示唆した。毒性の差は主として粒子の大きさによるものであり、細胞膜に浸透し核に達し、DNA損傷を誘発する能力に影響する。粒子の物理的特性によるこの異なる毒性は、特に生物医学的用途のためのナノ材料の調製のために考慮すべき重要な概念であり得る。抗酸化剤の補充が毒性を緩和する可能性がある。<i>in vitro</i>でHPBL細胞から得られた現在の結果が<i>in vivo</i>環境にも適用可能であるかどうかを確認することが重要である。</p>

(7) Ag

No	Ag-1
論文題目 (和訳)	Silver nanoparticles induce hormesis in A549 human epithelial cells. (銀ナノ粒子は、A549 細胞上皮におけるホルミシス(hormesis、閾下増進効果)を誘発する。)
著者 所属機関	Sthijns MM ¹ , Thongkam W ² , Albrecht C ² , Hellack B ³ , Bast A ⁴ , Haenen GR ⁴ , Schins RP ² . 1 Department of Pharmacology and Toxicology, Maastricht University, The Netherlands. 2 IUF - Leibniz Research Institute for Environmental Medicine, Auf'm Hennekamp, Germany. 3 Institute of Energy and Environmental Technology e.V. (IUTA), Germany. 4 Department of Pharmacology and Toxicology, Maastricht University, The Netherlands.
書誌事項	Toxicol <i>In Vitro</i> . 2017 Apr;40:223-233. doi: 10.1016/j.tiv.2017.01.010. Epub 2017 Jan 18.
試験物質	AgNP1: Skyspring Nanomaterials, Inc. (米国)から購入。粉体。一次粒子径 = 37.0 nm ± 13.0 nm。 AgNP2: European Commission Joint Research Centre (Ispra, イタリア)から受け取る。NM-300 リファレンスナノマテリアルのサンプルを代表。分散体。一次粒子径 = 16.6 nm ± 4.4 nm。 脱イオン水 (常温) への溶解度は、72 時間で、AgNP1 = 約 0.2%、AgNP2 = 5%。
試料調整法	<i>in vitro</i> 実験で使用されたすべての粒子懸濁液は、EU 第 7 フレームワークプロジェクト ENPRA と SIINN ERANET プロジェクト NanOxiMet 内で開発されたナノ粒子分散プロトコルに基づいて調製された。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト肺腺癌細胞 (A549) 投与方法・期間・試験用量: 細胞用量応答関係評価; 0, 1.25, 2.5, 5, 10, 20, 40, 80 µg/cm ² の AgNPs, 24 時間ばく露 細胞毒性、GSH レベル; AgNP1; (前処理) 2.5 µg/cm ² , 24 時間、(2 回目投与) 60µg/cm ² , 24 時間。AgNP2; 5µg/cm ² , 24 時間、(2 回目投与) 80µg/cm ² , 24 時間。 RNA 発現解析; 2.5µg/cm ² (AgNP1), 5µg/cm ² (AgNP2), 8 時間 免疫組織化学的評価; 2.5µg/cm ² (AgNP1), 5µg/cm ² (AgNP2), 4 時間 細胞処理条件 (すなわち 10 %FCS 含有培地) 下で、Z-平均(流体力学的直径) は、AgNP1 と AgNP2 に対して、642 nm と 408 nm。細胞は、比較的広いサイズ範囲を持つ凝集体へばく露していたことを示唆。
試験結果	細胞毒性 (WST-1 assay (Roche, Mannheim, ドイツ) 使用): 計算されたアクロレイン (参照; 30 分ばく露)、AgNP1、AgNP2 (24 時間ばく露) の TC50 値は、0.15±1.62µg/cm ² , 55±12µg/cm ² , N 80µg/cm ² 。 細胞内 GSH レベル (蛋白質含有量; bicinchoninic acid assay (BCA; Pierce, Thermo Fisher Scientific, Etten-Leur, 蘭; オランダ) 使用): 両タイプの AgNPs は、細胞内 GSH レベルを用量依存的に減少させた。ただし、A549 細胞のグルタチオンの減少の程度は調査した 3 つの化合物の細胞毒性の同じレベルに結び付かなかった。 また、前処理の影響が判明した。 ヘム酸素添加酵素 1、γ-グルタミルシステイン合成酵素の発現 (RNA 量測定 (NanoDrop (Thermo scientific nanodrop 1000 spectrophotometer, isogen life science, De Meern, 蘭) 使用)。cDNA 作製 (iScript cDNA synthesis kit (Biorad, Veenendaal, 蘭) 使用)。定量的リアルタイム PCR で測定。) 及び免疫組織化学 (一次 Nrf2 抗体 (C-20, Santa Cruz Biotechnology, Inc.), AlexaFluor 594 二次ヤギ抗ウサギ IgG 抗体 (Life Technologies, Darmstadt, ドイツ) 使用): 10µM アクロレイン、2.5 µg/cm ² AgNP1 と 5µg/cm ² AgNP2 を用いた 8 時間の細胞ばく露は、HO-1 発現における顕著な増加に結び付いた (図 6)。 gNP1 (2.5 µg/cm ²) 及び AgNP1 (5 µg/cm ²) を用いた 4 時間ばく露後、高められた免疫反応性が観察された。
結論	AgNPs は、ホルミシス (hormesis、閾下増進効果) 適応を引き起こすことができる。GSH は毒性と関連するけれども、ホルミシスとはせず、それは GSH が毒性とホルミシスと結び付けられるアクロレインについての調査結果と対照的である。これらの調査結果は、消費者が AgNPs の相対的に高い濃度に繰り返しばく露されるので、リスクアセスメントだけでなく医学における AgNPs の使用についての意味を持っている。AgNPs によるホルミシスの精密な分

子メカニズムはまだ不可解であるけれども、Nrf2 介在シグナリングは関係するようである。多くのナノマテリアルの毒性における酸化ストレス及び酸化還元シグナリングの確立された重要性を考慮して、ナノ粒子の他のタイプが AgNPs と同様なメカニズムによってホルミシス適応を引き起こすことができるかどうか、調査することは、興味深い。

No	Ag-2
論文題目 (和訳)	Cytotoxic effects of nanosilver are highly dependent on the chloride concentration and the presence of organic compounds in the cell culture media. (ナノ銀の細胞毒性は細胞培養培地中の塩化物濃度および有機物の存在に大きく依存する)
著者 所属機関	Kaiser JP ¹ , Roesslein M ¹ , Diener L ¹ , Wichser A ¹ , Nowack B ² , Wick P ¹ . 1 Particles-Biology Interactions Laboratory, Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology, Switzerland. 2 Technology and Society Laboratory, Empa, Swiss Federal Laboratories for Materials Science and Technology, Lerchenfeldstrasse 5, 9014, St. Gallen, Switzerland.
書誌事項	J Nanobiotechnology. 2017 Jan 6;15(1):5. doi: 10.1186/s12951-016-0244-3.
試験物質	ナノ銀:PPG Industries Europe BV (蘭)より入手。
試料調整法	ナノシルバー粒子 (100 µg/mL) は、10 % FCSを持つ培地で、37°C、0、24、48、72 時間培養。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物:CaCo-2 cells Health Protection Agency Culture Collections (Salisbury, 英国)から入手。 細胞は、異なる濃度の熱不活化 FCS (1、5、10%)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-ネオマイシン溶液、1% グルタミン溶液、1% 非必須アミノ酸溶液、1 mM ピルビン酸ナトリウムおよび 1% ビタミン溶液と一緒に、均一細胞培養条件 (5 %CO ₂ 、湿度 95%、37°C) 下、MEM 中で培養。培地は、実験で使用する前に週 1 回交換。 細胞毒性試験用培地 15 の異なる培地でナノ銀の細胞毒性を調べた: 5 つの異なる塩化物濃度と 3 つの異なる FCS 濃度 (1、5、10%)。A 培地:124.5 mM の塩化物濃度、B-E 培地:塩化物濃度が段階的に 25% 減および硫酸置換。E 培地:0.05 mM。 ・投与方法・期間・試験用量: 20 µg/mL のナノ銀添加した試験用培地で、浮遊細胞培養。 細胞生存率(アポトーシス/ネクローシス):フローサイトメリーにより分析 細胞モルフォロジー:48 時間ばく露後 ナノ粒子の取込み:TEM 活性酸素種の放出、サイトカインの放出
試験結果	・ナノ粒子の凝集:全ての培地ですぐに同様のサイズ範囲で形成 (65–235 nm)。 ・フリーの銀および無機銀錯体量の計算: 1.5 µg/mL の総銀に対して、培地 A 中の固体 AgCl の予測沈殿量は 28%、銀錯体の残りの種分化は、0.08% Ag ⁺ 、7.6% AgCl _{aq} 、80.7% AgCl ₂ ⁻ 、11.6% AgCl ₃ ²⁻ 。培地 E 中で、AgCl は沈殿が予想されず、Ag ⁻ 種分化は、65.7% Ag ⁺ 、3.4% AgCl _{aq} 、10.0% Ag-glutamate and 20.8% Ag ₂ SO ₄ 。 ・細胞毒性試験: 培養培地中の塩化物および FCS 濃度は、浮遊培養細胞の生存率に対して著しく影響しなかった。対照的に、培養皿の底で成長する培養細胞は大きく沈殿する銀錯体および沈降銀凝集物にばく露された。培養細胞は、20µg/mL のナノ銀存在下で培地 A で培養したとき、死んだ細胞数の増加が観察された。したがって培地中の塩化物濃度は適用ナノ銀の細胞毒性の影響を増加した。 培養皿底上の培地 A 中で成長する細胞は、ナノ銀へ 48 時間ばく露後、銀ナノ粒子を取り込んでおり(TEM)、膜結合構造、おそらくエンドソーム-リソソーム区画中に銀凝集体として見付かった。いずれの培養培地でもばく露の最初の 4 時間以内 caco-2 細胞によって ROS の顕著な量の生産はなかった。Caco-2 細胞はナノ銀存在下で FCS 濃度の高い培地で育っていたときに細胞生存性と IL-8 の間の相関が見られた。
結論	本研究で使用される培地中での銀の凝集と銀錯体の形成は、塩化物濃度と有機炭素(この場合は大抵 FCS)の存在の影響を受け、この相互作用はさらに細胞培養の生存率を決定した。細胞は懸濁液中の銀粒子にばく露されるだけで、溶存銀錯体は、すべての条件下で任如何なる影響も示さなかった。培養皿底部上で成長する細胞は、銀凝集体の沈殿を通して銀にばく露された。これらの銀化合物の溶解は、培地の組成によって決定される LEEC に結果としてなる可能性が高く、最終的なばく露条件は十分分散された粒子の系のそれらとは完全に異なっていた。したがって、要求され報告された材料キャラクタリゼーションに加えて、細胞培養条件は、細胞がばく露される銀錯体の種類と用量を推定するために、慎重に検討されなければならない。これらの因子は、真核対原核生物のような異なる生物学的系が比較される場合より関連性が高くなり、それは、例えば、細菌コロニー形成およびバイオフィルム形

成を防ぐためにインプラント用抗菌コーティングとして銀の使用を評価するとき、重要であるかもしれない。ヘルスケア製品上の銀コーティングは、静菌性または殺菌だけでなく、細胞毒性であるかもしれない。よく管理され理解された培養条件のみが、銀のような反応性ナノ材料を使用するさまざまな研究の比較を向上させることができている。

No	Ag-3
論文題目 (和訳)	Evaluation of oxidative stress induction in rats following exposure to silver nanorods. (銀ナノロッドへのばく露の後に続くラットにおける酸化ストレス誘発の評価)
著者 所属機関	Lingabathula H ¹ , Yellu N ¹ . 1 Department of Pharmacology and Toxicology , University College of Pharmaceutical Sciences, Kakatiya University , Warangal , Telangana , India.
書誌事項	Toxicol Mech Methods. 2017 May;27 (4) :272-278. doi: 10.1080/15376516.2016.1274351. Epub 2017 Jan 25.
試験物質	10、25nm SNRs;Sigma-Aldrich, St. Louis, MO から購入。 QTZ 粒子 (58-68 μ m;99.95%純度);Berkely Springs, Morgan County, WV から入手。
試料調整法	—
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物:6 週齢の雄 Wistar ラット;Sainath agencies, Hyderabad,インドから購入。 ・投与方法・期間・試験用量: 10nm SNRs、25nm SNRs、QTZ 粒子の 1mg/kg 及び 5mg/kg b.w.の気管内注入による 単回投与。注入期間後、1 日、1 週、1 月、3 月に眼窩叢で血液採取。血清を得る。
試験結果	酸化ストレス評価;MDA、GSH、SOD、カタラーゼ、TAC; MDA レベルは、SNRs、QTZ 注入期間後、1 日、1 週で上昇され、脂質過酸化を示した。 10nm SNRs は 1mg/kg (p<.01) 及び 5mg/kg (p<.001) で、注入期間後、1 日、1 週で有意に脂質過酸化を上昇した。25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 週 (p<.01) で有意に脂質過酸化を上昇した。 10nm SNRs は 1mg/kg 及び 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.05) で、有意に低下された GSH レベルを示した。 25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.01) で、有意に低下された GSH レベルを示した。 10nm 及び 25nm SNRs は、5mg/kg で、注入期間後、1 日、1 週で、SOD レベルを有意に (p<.001) 低下させた。 10nm SNRs は両用量で、25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日、1 週で、有意に (p<.001) カタラーゼレベルを低下させた。10nm SNRs、5mg/kg (p<.01) では、1 月でも低下させた。25nm SNRs は 1mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.01) で、カタラーゼレベルを低下させた。 10nm SNRs は両用量で、注入期間後、1 日、1 週で、有意に (p<.001) TAC を低下させ、5mg/kg で、1 月でも低下させた。25nm SNRs は 5mg/kg で、注入期間後、1 日 (p<.001)、1 週 (p<.001)、1 月 (p<.05) で、TAC を低下させた。
結論	ラットにおける 10 及び 25nm の SNRs の気管内注入は、脂質過酸化の上昇したレベルと GSH、SOD、カタラーゼ及び TAC の低下したレベルに結果として結び付き、試験 SNRs による酸化ストレス誘発を示した。最終的に、SNRs は、ばく露期間後 1 日及び 1 週間後、気管内注入の後に続く用量依存的酸化ストレスを引き起こした。

No	Ag-4
論文題目 (和訳)	Toxicological effects of three types of silver nanoparticles and their salt precursors acting on human U-937 and HL-60 cells. (ヒト U-937 及び HL-60 細胞に作用する 3 タイプの銀ナノ粒子とそれらの塩前駆体の毒性学的影響)
著者 所属機関	Barbasz A ¹ , Oćwieja M ² , Walas S ³ . 1 Institute of Biology, Pedagogical University of Cracow, Cracow, Poland. 2 Jerzy Haber Institute of Catalysis and Surface Chemistry, Polish Academy of Sciences, Cracow, Poland. 3 Faculty of Chemistry, Jagiellonian University, Cracow, Poland.
書誌事項	Toxicol Mech Methods. 2017 Jan;27 (1) :58-71. doi: 10.1080/15376516.2016.1251520. Epub 2016 Nov 15.
試験物質	銀分散液;硝酸銀、酢酸銀、過塩素酸銀の溶解起源の銀イオンの化学的還元(タンニン酸を還元剤として使用)。それぞれ、TAN、TAA、TAC と表示。 3 つの分散粒子は、同様の物理化学的特性だった。球状、低多分散性。 TAN の場合は、ストック溶液濃度 452mg/L(密度から)、流体力学直径 13.7±1.1nm (DLS 測定)、平均粒子サイズ 13.6±6.1nm (TEM 観察)、 ζ 電位 ($T=298K$ 、 $I=0.001M$) -64±3mV(電気泳動移動度測定)。
試料調整法	ストック溶液は、要求される濃度に RPMI 1640 培地で希釈。 30mg/L 分散液への粒子の溶解は、約 7 日まで速く、擬似直線だったが、長期間後、約 8-10%が溶解。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト組織球性肉腫細胞株 U-937(ATCC から); 活性化マクロファージは、フル培地中 PMA と一緒に 24 時間 U-937 を誘導して得た。 ヒト前骨髄球細胞株 HL-60(ATCC から); ⇒マクロファージ様細胞への分化、顆粒球への分化。 ・投与方法・期間・試験用量: 試験結果欄で記述。
試験結果	MTT アッセイ(細胞毒性): 銀塩は、AgNPs に比べ、大幅に低い用量で試験細胞の死を誘発した。U-937 細胞生存は用量依存。25mg/L 濃度の AgNPs は、非処理細胞比較で、約 30%までの生存率の低下に結び付いた。U-937 の活性化は生存率に影響しなかった。HL-60 は U-937 に比べ、より生存能力が高かった。顆粒球への分化の細胞生存率に及ぼす影響は無視できるほどだった。マクロファージへ分化された細胞では、生存率に変化が観察された。マクロファージは TAC に関して最も敏感。 炎症誘発(一酸化窒素レベル): U-937 では、コントロール比較で、TAC 処理は 1.5 倍(25mg/L)まで、TAN、TAA 処理は 1.3 倍(25mg/L)まで NO 生成増加させた。活性化で微増。 HL-60 では、非分化、分化細胞とも、コントロール比較で、どの粒子処理も 1.5 倍まで増加。 牛血清アルブミン(BSA;モデル蛋白質)と粒子の相互作用(銀塩の違いの影響): 結合し易い順:TAC>TAN>TAA。アルブミン添加での粒子処理は、アルブミン濃度の上昇とともに、細胞生存率が上昇し、銀粒子の毒性影響をほとんど消せる。
結論	Ag NPs の毒性作用の機構は、まだ研究中である。非常に似た物理化学的特性の、また異なる前駆体塩から得た粒子の影響の比較は、これらの研究の新しいコースを明らかにした。ゾル精製の最良の方法でさえ、粒子表面に残ることがある、反応混合物中に存在する全ての化学種を除去しなかった。これらの存在は、ナノ粒子のバイオ-特性に大きく影響する。試験されたナノ粒子の細胞毒性は、それらの用量と細胞タイプに依存する。LD50 の測定は、試験された物質の最も細胞毒性なものとして、銀塩がヒト細胞に関係する Ag NPs よりもより毒性である、TAC と塩前駆体(AgClO ₄)を示した。Ag NPs は、免疫細胞による NO 産生を大幅に強化し、TAC 粒子は、分析された Ag NP 中で最も免疫原性である。TAC は、BSA との最高の親和性を示し、蛋白質過剰はナノ粒子の毒性影響を除去することができる。合成前駆体についての情報は、商業的に入手可能なナノ粒子に取り付けられるべきである。

No	Ag-5
論文題目 (和訳)	Differential genotoxicity mechanisms of silver nanoparticles and silver ions. (銀ナノ粒子と銀イオンの特異的遺伝毒性メカニズム)
著者 所属機関	Li Y ^{1,2} , Qin T ^{1,3} , Ingle T ⁴ , Yan J ¹ , He W ^{5,6} , Yin JJ ⁵ , Chen T ⁷ . 1 Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, USA. 2 Covance Laboratories Inc., USA. 3 Bio-Medical Pharmaceutical Manufacturing Corporation, USA. 4 Division of Biochemical Toxicology, National Center for Toxicological Research, U.S. Food and Drug Administration, Jefferson, AR, USA. 5 Division of Analytical Chemistry, Office of Regulatory Science, Center for Food Safety and Applied Nutrition, US Food and Drug Administration, USA. 6 Key Laboratory of Micro-Nano Materials for Energy Storage and Conversion of Henan Province, Institute of Surface Micro and Nano Materials, Kuching University, People's Republic of China. 7 Division of Genetic and Molecular Toxicology, National Center for Toxicological Research, US Food and Drug Administration, USA.
書誌事項	Arch Toxicol. 2017 Jan;91(1):509-519. doi: 10.1007/s00204-016-1730-y. Epub 2016 May 14.
試験物質	5nm PVP-被覆 AgNPs (Liら、2014 に記述されるものと同じ) AgNO ₃
試料調整法	水中(1mg/mL) AgNPs は、攪拌、超音波処理で分散。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: KT6 細胞; American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, 米国) から入手。 ・投与方法・期間・試験用量: AgNPs; 濃度 (0, 1, 1.25, 1.5 µg/mL)、28 時間。 AgNO ₃ ; 濃度 (0, 1.25, 1.5, 1.75 µg/mL)、28 時間。
試験結果	・ <i>in vitro</i> 小核試験 (FACSCanto II flow cytometer (BD Biosciences, San Jose, CA, 米国) 使用。細胞毒性は、RPD によって推定 (OECD TG487 (OECD 2014) 推奨): 28 時間後、AgNPs 1.5 µg/mL, AgNO ₃ 1.75 µg/mL で、50% 細胞毒性 (小核試験) で、両者は同様な用量で細胞毒性を起こすことを示唆。 遺伝毒性 (<i>in vitro</i> 小核試験); 用量依存で、小核誘発。両者最高用量で 2 倍。 ・遺伝子発現 (カスタマイズ PCR 発現アレイ (酸化ストレス、金属イオン結合、DNA 損傷・修復、細胞周期、小胞体ストレス応答、アポトーシス、増殖に關係する 89 遺伝子の応答を測定; 著者設計、Qiagen (Valencia, CA, 米国) 製作) 使用。Applied Biosystems 7500 Fast Real-Time PCR System (Life Technologies) 上で実施): AgNPs ばく露は、酸化ストレス (GPX7、TPO、HMOX1、MT1B、MT1H、MT1X、MT2A)、金属イオン結合 (MT1B、MT1H、MT1X、MT2A) に關与する遺伝子を主に調節不全した。AgNO ₃ 処理も同様で、メタロチオネイン遺伝子をより高く誘発。 ・ROS 産生 (DCFH-DA 使用; AgNPs は 0-1.5 µg/mL、24 時間処理、AgNO ₃ は 0-1.75 µg/mL、28 時間処理。処理開始後、30 分、2、4、6、24 時間で蛍光強度測定): AgNO ₃ 処理は 30 分から 24 時間まで、コントロールを超えて、ROS レベルを大幅に上昇した一方、AgNPs 処理は 24 時間時点で大幅に上昇しただけ。 ・AgNPs 又は AgNO ₃ によって誘発された細胞毒性、小核、ROS に及ぼす NAC 又は Trolox の影響 (NAC (銀イオンキレート剤; 61.5 µM)、Trolox (ROS 捕捉剤; 23 µM)、AgNPs (1.5 µg/mL)、AgNO ₃ (1.75 µg/mL)、28 時間で処理して誘発): NAC 又は Trolox は、小核、ROS レベルの低下、相対的細胞集団倍加 (RPD) の上昇の結果につながった。 ・AgNPs から放出される Ag ⁺ イオンは、TK6 細胞において、細胞毒性、遺伝毒性を引き起こさなかった。AgNPs 1.5 µg/mL、28 時間で培養培地の溶解した Ag は、7.4 ng/mL で培地中の AgNPs のわずか 0.5% だった。 AgNPs と AgNO ₃ は両方、ROS を誘発させるので、それらはフリーラジカル生産者または酸化還元剤として活性である。AgNPs は用量依存的にヒドロキシルラジカルを増加させるが、AgNO ₃ は増加させない。
結論	TK6 細胞における遺伝毒性と酸化ストレスを誘発させるための Ag NPs と AgNO ₃ の潜在能力は同様である。しかし、フリーラジカルスカベンジャー Trolox は、両作用剤の細胞毒性を無効にする一方、銀イオンキレート剤 NAC の添加は AgNO ₃ の遺伝毒性を大幅に減少さ

せるが、Ag NPs はさせない。さらに、非常に小さい量の Ag⁺だけが Ag NPs から細胞媒体中へ放出され、放出された Ag⁺はこの濃度で遺伝毒性でなかった。ESR を使用した詳細分析は、Ag NPs はヒドロキシラジカルを直接生成した一方、AgNO₃ はしなかったことを示した。これらの結果は、Ag NPs と Ag⁺の両方が酸化ストレスを産すことによって遺伝毒性を誘発できるにもかかわらず、メカニズムは異なり、ナノ粒子、しかし放出されたイオンでない、は、Ag NPs の遺伝毒性を主に担っている。

No	Ag-6
論文題目 (和訳)	Genetic determinants of susceptibility to silver nanoparticle-induced acute lung inflammation in mice マウスにおける銀ナノ粒子誘発急性肺炎症に対する感受性の遺伝的決定因子
著者 所属機関	David K. Scoville,* Dianne Botta,* Karen Galdanes,† Stefanie C. Schmuck,* Collin C. White,* Patricia L. Stapleton,* Theo K. Bammler,* James W. MacDonald,* William A. Altemeier,‡ Michelle Hernandez,† Steven R. Kleeberger,§ Lung-Chi Chen,† Terry Gordon,† and Terrance J. Kavanagh* * Department of Environmental and Occupational Health Sciences and ‡ Department of Medicine, University of Washington, Seattle, Washington, USA; † Department of Environmental Medicine, New York University, Tuxedo, New York, USA; and § Immunity, Inflammation, and Disease Laboratory, National Institute of Environmental Health Sciences, Research Triangle Park, North Carolina, USA
書誌事項	The FASEB Journal Vol. 31, No. 10, pp. 4600-4611
試験物質	AgNPs(名目上 20 nm で、安定化のためにクエン酸中でコーティング): the National Institute of Environmental Health Sciences Centers for Nanotechnology Health Implications Research Consortium が入手可能ないくつかのナノマテリアルの 1 つ。
試料調整法	1 mM クエン酸緩衝液中に懸濁
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験生物: 雄マウス; The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) から購入。 ・T.J.K. laboratory 表現型の 11 の近交系 (CBA/J, C57L/J, MRL/MpJ, NOD/ShiLtJ, NZB/BINJ, NZO/HILtJ, NZW/LacJ, PL/J, PWD/PhJ, PWK/PhJ, TALLYHO/JngJ, and WSB/EiJ) ・T.G./L.-C.C. laboratory 表現型の 10 の異なる系統 (BALB/cJ, BTBRT+tf/J, C3H/HeJ, C57BL/10J, DBA/2J, FVB/NJ, SJL/J, SM/J, and SWR/J) ・追加 4 系統 (129S1/ SvImJ, A/J, AKR/J, and C57BL/6J mice) 投与方法・期間・試験用量: 口腔咽頭吸引後 24 h に殺処分。0.25 mg/kg 体重又は 1 mM クエン酸緩衝液のみ。
試験結果	・肺炎症: コントロール比較で、AgNPs 処理マウスにおける BALF 中の好中球のパーセンテージが顕著な系統依存的上昇。SWR/J, DBA/2J, SM/J, BTBRT+tf/J, C57BL/10J 系統を除いて、ほとんどの系統で、統計的に有意な AgNP 誘発肺炎症が見られた。 ・AgNP 誘発肺炎症の遺伝可能性: AgNP が含まれ、混合モデルにおける処理のために調整される場合、BALF 好中球の割合に対する遺伝可能性は 0.37 であることが分かった。個別に評価される場合、遺伝可能性推定値は、クエン酸処理動物で 0.43、AgNP 処理動物で 0.73 だった。また、これらの結果は、遺伝的背景が AgNP 誘発肺炎症における系統間変異の重要な決定要因であることを示す。 ・ゲノムワイド関連 (GWA) マッピング (AgNPs への感受性における系統間差異に貢献するかもしれない特定のゲノム領域と候補遺伝子を識別するために、行った): 一塩基多型 (SNPs) の不足している遺伝子型 calls をフィルタリング後、65,493 個の SNPs が BALF 好中球の割合とのそれらの関連付けを評価するために EMMA (The efficient mixed-model association) で使用された (図 2)。我々は、染色体 4、15、および 18 上の量的形質遺伝子座 (QTL) ピーク中の 6 つの重要な SNPs を見付けた (図 3、表 1)。最強の QTL は染色体 18 の qE1 領域中で 3 Mb に及んだ。 この領域は、#1[rs29865915、St8sia3 ((ST8 a-N-acetyl-neuraminide a-2,8-sialyltransferase3) に近い]、#2 (rs29959933、Nedd4l に近い)、#4 (rs29778747、Nedd4l に近い; 図 3A および表 1) の $-\log_{10}(P)$ 順位を持つ 6 つの重要な SNPs の 3 つを保持していた。 また、この領域は 17 個の他の既知遺伝子と 2 つのマイクロ RNAs を含んでいた (Fig. 3A)。染色体 15 上の QTL は、遠位 qE3 と近位 qF1 領域を横切って 10 Mb に及び、#3 (rs31581766、Ano6 の遺伝子内) の順位を持つ 1 つの重要な SNP と #6 の順位を持つ SNP (rs3688273、遺伝子に近くない) を含んでいた。 また、この QTL 領域は、100 個以上のその他の既知遺伝子を含んでいた (図 3B および表 1)。染色体 4 上の QTL ピーク領域は 62.5 Mb 幅であり、qD3 の近位部分の一部を通して qC3 領域をカバーし、#5 (rs27482013、Rnf220 の遺伝子内) の順位を持つ 1 つの重要な SNP を含み、また、100 以上の既知遺伝子を含んでいた (図 3C、表 1)。SNP 対立遺伝子と AgNP が BALF 好中球に対して持つ影響を視覚化するため、処理群と

6 つの重要な NPs の SNP 対立遺伝子による BALF 好中球の割合の分布を評価した。遺伝子の中又は近くにいた 6 つの SNPs の内の 5 つのためのプロットを図 4 に示した。これらの同じ 5 つの SNPs の Cohen 効果サイズ d 統計は 0.9 で、それは AgNP 誘発好中球流入に対する大きな影響を抑えることを示す(表 1) (40)。系統による対立遺伝子の分布も調べられ、これら 5 SNPs に対してすべて異なっていた(補足図 3)。

・マウスフェノーム情報データベースを用いた候補遺伝子探索:

潜在的な候補遺伝子のための最初のスクリーニングとして、染色体 18 QTL 中で識別された潜在的候補遺伝子及び、Ano6、Rnf220 に対する mRNA 発現値が、Berndt and Stearns (48) によってマウスフェノーム情報データベース (MPD) に提出された、非処理雌マウスに対する 9 系統マイクロアレイベース遺伝子発現の調査(系統当たり $n = 3$) から得られた。

遺伝子内染色体 15 および 4 上の QTL 領域が 100 遺伝子以上を含んでいたため、これらの地域中の最も重要な SNPs が遺伝子内だったと仮定し、Ano6、Rnf220 の発現に焦点を絞った。MPD からの発現値は、本研究で使用された 8 つの重複する系統からの AgNP 処理マウスからの BALF 好中球の割合によって、系統と比較された。

いくつかの潜候補遺伝子の報告されているベースライン発現レベルと我々の研究からの BALF 好中球の割合との間の正・逆両方の相関を見付けた。最も逆相関の遺伝子は、染色体 18 上の Nedd4l と、染色体 15 上の Ano6 だった(図 5A, B)。

重要な遺伝子内の SNP を含むにもかかわらず、染色体 4 上の Rnf220 の発現は BALF 好中球の割合と相関しなかった(図 5C)。最も正に相関した遺伝子は Ccbe1、Cplx4 で、両方とも染色体 18 上にあった(図 5D, E)。また染色体 18 にある St8sia3 は、中程度に相関したが、統計的に有意ではなかった(図 5F)。

・候補遺伝子に関する定量的 RT-PCR:

候補遺伝子が AgNP へばく露された肺で差別的に発現したかどうかを確認するために、低い(C57BL/6J, 129S1/SvImJ)及び中程度から高い(MRL/MpJ, A/J)好中球を代表した我々の系統のサブセットからの右肺組織に対して定量的 RT-PCR (qRT-PCR) を実行した(図 6A)。

重要な遺伝子内 SNPs を持つ遺伝子および/または Berndt and Stearns (48) からのデータを使用して BALF 好中球の割合と有意に相関または逆相関するそれらのリストに加え、最も重要な SNP (rs26865915) に隣接しているため、St8sia3 についても qRT-PCR を行った。

我々は、AgNP 処理とコントロールマウス間の Nedd4l、Ano6、Rnf220 の mRNA 発現の倍変化が、AgNP 処理マウスにおける BALF 好中球の割合とすべて大幅に逆相関したことを見付けた(図 6B-D)。

興味深いことに、MPD (Ccbe1 と Cplx4) (48)からの mRNA 発現データを用いた BALF 好中球の割合と有意に相関していたか、又は非常に重要な SNP (St8sia3)に隣接させていたかいずれかである、染色体 18 の QTL からの遺伝子の 3 つは、AgNP-またはクエン酸-処理マウスのいずれかから採取された肺組織で表現されなかった。

結論

mRNA レベルが AgNP 誘発肺炎と逆に関連する、複雑なポリジーン形質である可能性が高い、3 つの有望な候補遺伝子、Nedd4l、Rnf220、Ano6 を識別した。ヒト GWA 研究で、さまざまな程度で、Nedd4l と Rnf220 も肺機能におけるヒト変化に関連付けられてきている; Ano6 は、C-反応性蛋白と、したがって、全体的な炎症と適度に関連付けられてきている。医薬品ばく露に対するヒトの感受性の違いがマウス GWA マッピングを使用することによって特定される遺伝子多型に関連付けられてきているため、AgNP 誘発肺炎に対する感受性を調節することにおけるこれらの遺伝子の役割はさらに探究されなければならない。遺伝的背景が 25 の近交系マウス系統にわたって観測された炎症性応答の変化に寄与することを示すこと及び識別追加的研究のために候補遺伝子を識別することによって、将来の AgNP のメカニスティック研究の指針となる情報が生み出してきた;ただし、そのような実験は、現在の研究の範囲を超えている。また、AgNP 誘発肺炎に対する感受性の異なるマウスの系統間変異に関する情報は、AgNP リスク評価における種内の不確か因子を判断するために役に立つかもしれず、それ故、AgNP 誘発肺炎の遺伝的傾向があるかもしれない脆弱性個人に対する十分な保護を確保していく。

(8) Au

No	Au-1
論文題目 (和訳)	Multiparametric Assessment of Gold Nanoparticle Cytotoxicity in Cancerous and Healthy Cells: The Role of Size, Shape, and Surface Chemistry. (癌の及び健康な細胞における金ナノ粒子細胞毒性の多パラメーター評価)
著者 所属機関	Bhamidipati M ¹ , Fabris L. 1Department of Biomedical Engineering, Rutgers University, United States.
書誌事項	Bioconjug Chem. 2017 Feb 15;28 (2) :449-460. doi: 10.1021/acs.bioconjchem.6b00605. Epub 2017 Jan 6.
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・クエン酸被覆金ナノ球(citrate NSp):修正 Turkevich 法によって合成(TEM;平均直径=18.4±1.9nm) ・金ナノロッド:Nikoobakht & EL Sayed によって開発された種介在成長法によって合成(TEM;平均長さ=52.7±5.9nm、幅=23.0±3.6nm) ・金ナノスター:Yuan らによる界面活性剤フリーナノスター合成の修正版によって合成(TEM;平均先端-先端距離=62.5±11.2nm)
試料調整法	<p>AuNPs の表面官能基化:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・臭化セチルトリメチルアンモニウム(CTAB)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、ナノスターを被覆 ・ポリ(エチレングリコール)(PEG)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、CTAB 被覆ナノロッド、金ナノスターを被覆 ・ヒト血清アルブミン(HAS)被覆:クエン酸被覆金ナノ球、CTAB 被覆ナノロッド、CTAB 被覆金ナノスターを被覆 <p>注)CTAB:陽イオン性の界面活性剤(逆性石鹸) <DLS 測定の水力直径;被覆により増加> citrate NSp⇒CTAB 被覆;25.1±0.2nm⇒35.2±1.4nm citrate NSp⇒PEG 被覆;25.1±0.2nm⇒30.5±0.7nm citrate NSp⇒HPA 被覆;25.1±0.2nm⇒39.4±0.4nm CTAB ナノスター⇒PEG 被覆;80.0±0.5nm⇒83.9±3.0nm CTAB ナノスター⇒HPA 被覆;80.0±0.5nm⇒82.2±2.7nm 注)ナノロッドは、アルゴリズム上、DLS で測定不可。 <ζ 電位> 被覆粒子の電位は、文献値と同様だった。 <AuNPs 上のリガンド濃度> 100mL の合成 AuNPs 中の CTAB 濃度(1H NMR);2.168mg(ナノ球)、1.148mg(ナノロッド)、2.041mg(ナノスター) PEG 濃度(TGA);0.307mg(ナノ球)、0.136mg(ナノロッド)、0.274mg(ナノスター) HAS 濃度(Pierce BCA アッセイ);正確な濃度測定不可のため、合成されたままの AuNPs の 50mL 中で 20、100、151.5μg を細胞毒性試験で使用。</p>
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・試験生物: ヒト神経膠芽腫細胞(U87、継代(passage)5~11) 初代ヒト皮膚線維芽細胞(継代20~28)(略して、hfb) ・投与方法・期間及び試験用量: 100μg/mL の濃度で AuNPs を含む細胞培養媒体を培養(4 及び 24 時間)
試験結果	<p>① <i>In vitro</i> 細胞毒性試験:</p> <ul style="list-style-type: none"> ・MTT 細胞増殖アッセイ(V13154 Vybrant MTT 細胞増殖アッセイキット、Termo Fisher): —適正用量の探索のため、PEG ナノスター(0~200μg/mL)への4、24時間ばく露。細胞生存率は、両細胞において、異なる濃度で顕著な差異なく、U87 において、200μg/mL で78.3±9.3%(⇒適正用量として、100μg/mL 選択)。 —100μg/mL の AuNPs に相当するリガンドだけの細胞毒性は、U87 において、CTAB(ナノ球、4時間)は、ナノロッド、ナノスターでよりも顕著に低かった。PEG は、両細胞において、異なる濃度で顕著な差異なし。20 から 151.1μg への HAS の濃度増加は、24 時間ばく露で、U87 において細胞毒性が顕著な低下を示したが、hfb においては示さなかった。 —両細胞において、100μg/mL の異なる AuNPs、24 時間ばく露。細胞生存率(コントロール比較)は、CTAB ナノ球が最低(14%)。PEG ナノ球は、U87 のほうが良かった。(PEG、HAS)-(ロッド、スター)は、同様で、コントロールと差異無かった。 ⇒CTAB(リガンド)と NPs との相互作用の強さは、NP のモルフォロジーが影響。 ・細胞からの乳酸脱水素酵素(LDH)の放出(Pierce LDH 細胞毒性アッセイキット、Termo Fisher;細胞膜破壊(⇒ネクローシス)情報提供): 4、24 時間ばく露後、放出 LDH 量は、hfb においてより多い。しかし、CTAB-ナノ球は、細胞を問わず、大規模な細胞膜破壊を起こしたようだ。CTAB、PEG-ナノスターは、24 時間後

	<p>に、hfbにおいてより多くの量を放出したが、U87 では変化なしで、hfbが影響を受けた(ネクローシス)。</p> <p>・細胞活性酸素種産生 (DCFDA 細胞 ROS 検知アッセイキット (Abcam) ; ネクローシス、アポトーシスによる細胞死を起こす炎症情報) :</p> <p>ROS 産生は、hfbより U87 において、より低かった。経時的に増加。CTAB-ナノ球は、両細胞において、低かった(リン脂質二重層の効果)が、CTAB-ナノスターは高かった(サイズの効果)。(PEG、HAS)-(球、スター)の両細胞において増加、スターは穏やかだった。</p> <p>・アポトーシスの誘発 (EnzChek Caspase-3 アッセイキット、Termo Fisher; アポトーシス情報) :</p> <p>ばく露 24 時間後、U87 において、細胞内 Caspase 3/7 活性増加し、CTAB、HAS に比べ、PEG-粒子のほうがより多く活性。</p> <p>⇒U87 はアポトーシス、hfbはネクローシスを被ったようだ。</p> <p>②細胞摂取(取込み)試験(100µg/mL の PEG 及び HAS 被覆金ナノスターへばく露:細胞中の金属濃度を ICP-MS で測定) :</p> <p>(TEM 観察)</p> <p>PEG、HAS-ナノスターは、24 時間ばく露後、両細胞中に内在化。核中には粒子なし。HAS-は、hfbにおいて、核周囲域に多く位置し、PEG-は HAS-よりも多く、U87 内で見つめられた。両細胞において、粒子のほとんどは異なったサイズの小胞内にあるのが見つかかり、ほんのわずかがサイトゾル中で観察された。U87 は、激しい細胞質膜損傷、核周囲でのクロマチン濃縮、液胞形成(オートファジーを示す)、アポトーシス体を示した(⇒これらはアポトーシスを示す)。hfbは、広範囲なミトコンドリア損傷、細胞膜損傷を示し、ネクローシス経路の死に繋がった。</p> <p>(ICP-MS)</p> <p>hfbに比べ、U87 はより高い金摂取を示した(100ng/細胞、500 ng/細胞)。ナノスターが最高に摂取された(表面化学)。細胞毒性と摂取量の明確な相関は無かった(影響を及ぼすナノ粒子の用量ではなかったことを示唆)。</p>
<p>結論</p>	<p>本研究は、金ナノスターが、PEG のような適切なりガンドによって被覆された場合顕著な毒性を引き起こすこと無しに、健康な及び病気の細胞の両方によって効果的に取り込まれることができ、同等の用量および表面化学で他のナノ粒子形状と比較してより少なく有害であると考えられることができることを示した。特にナノ粒子の <i>in vivo</i> アプリケーションにとって、標的病気細胞の周辺の健康な細胞及び組織を含む完全な細胞毒性評価は、医療分野でのこれらのナノ構造の適用性に影響を与える健康関連懸念を減らすために、実行されるべきである。</p>

(9) Fe₂O₃

No	Fe2O3-1 (SWCNT、MWCNT についても記載)
論文題目 (和訳)	Single-walled carbon nanotube, multi-walled carbon nanotube and Fe ₂ O ₃ nanoparticles induced mitochondria mediated apoptosis in melanoma cells (単層カーボンナノチューブ、多層カーボンナノチューブ及びFe ₂ O ₃ ナノ粒子は、メラノーマ細胞におけるミトコンドリア媒介アポトーシスを誘導した)
著者 所属機関	Parvaneh Naserzadeh ^a , Fatemeh Ansari Esfeh ^a , Mahboubeh Kaviani ^a , Khadijeh Ashtari ^d , Raheleh Kheirbakhsh ^b , Ahmad Salimi ^c & Jalal Pourahmad ^a a) Department of Pharmacology and Toxicology, Faculty of Pharmacy, Shahid Beheshti University of Medical Sciences, Tehran, Iran; b) Cancer Biology Research Center, Cancer Institute of Iran, Tehran University of Medical Sciences, Tehran, Iran; c) Department of Pharmacology and Toxicology, School of Pharmacy, Ardabil University of Medical Science, Ardabil, Iran; d) Department of Medical Nanotechnology, Faculty of Advanced Technology in Medicine, Iran University of Medical Sciences, Tehran, Iran
書誌事項	CUTANEOUS AND OCULAR TOXICOLOGY, 2017
試験物質	単層カーボンナノチューブ [†] (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ [†] (MWCNT)、Fe ₂ O ₃ ナノ粒子 (IONPs)を含む高密度で現在生産されている3つのナノ粒子。
試料調整法	メラノーマ腫瘍の調製 ;腫瘍を、F10 メラノーマ細胞を有する別のマウスから皮膚内に接種。麻酔後、体外の後胸部の小さな切開を行い、腫瘍の一部を抜き取り、小さな部分(各約 2mm)に分けた。メスを使用して、それらを皮膚の下に置き、これらの部分すべてを縫合。腫瘍の大きさは、デジタルキャリパーを用いて3日毎に測定。体積は O'reilly et al. の、52v=(腫瘍重量) 2(腫瘍長)0.52により計算。本研究は、Shahid Beheshti 医科大学研究倫理委員会により承認。 ミトコンドリアの調整;動物を断頭し、がん性の正常な皮膚を切開後、ミトコンドリアを4℃で単離、分画遠心分離により新たに調製した試料を採取。全ての実験において「フラットフォード」試験(標準としてのBSA)からのミトコンドリアタンパク質濃度を0.5mg タンパク質/mlに調整、試料の実験条件の均一化及び標準化を達成。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	細胞毒性試験 ;細胞(1~10 ⁴ 細胞/ウェル)をプレート中で、50mLの最終容量で48時間、アセチン存在下/非存在下で培養。処理終了時に、20ml MTT(PBS中5mg/ml)を各ウェルに添加、37℃でさらに4時間培養。紫色のMTTホルマサン沈殿物を100ml DMSOに溶解、ELISAリーダーで吸光度(570nm)測定。 カスパーゼ3活性 ; 「シグマのカスパーゼ3アッセイキット(CASP-3-C)」 を用い異なる処理からの細胞溶解物中で測定。 コハク酸デヒドロゲナーゼ活性 ;ミトコンドリア複合体II(コハク酸デヒドロゲナーゼ又はSDH)の活性を、MTT減少の測定により試験。 ミトコンドリア膨潤アッセイ ;ミトコンドリア懸濁液(100mg タンパク質/ウェル)を、25℃で、膨潤緩衝液(140mmol/l KCl、10mmol/l NaCl、2mmol/l MgCl ₂ 、0.5mmol/l KH ₂ PO ₄ 、20mmol/l HEPES、0.5mmol/l EGTA; 1mg/ml ロテンン及び10mmol/l コハク酸塩を補充したKOHでpH7.2に調整)。ミトコンドリアの腫瘍長を、1時間の持続時間で分光光度的に測定。ミトコンドリアの腫瘍長は、540nmでモニターされる吸光度を減少。 ミトコンドリア ROS 形成アッセイ ;精製ミトコンドリアを単離、呼吸緩衝液(0.32mM スクロース、10mM Tris、20mM Mops、50μMEGTA、0.5mM MgCl ₂ 、0.1mM KH ₂ PO ₄ 及び5mM コハク酸ナトリウム)に入れた。この後、DCFH-DA 添加(最終濃度10μM)、37℃で1時間、種々の濃度のナノ粒子を添加。フローサイトメリー(BD)で蛍光強度変化を測定。 ミトコンドリア MMP 崩壊アッセイ ;MMP アッセイ緩衝液(220mM スクロース、68mM D-マンニトール、10mM KCl、5mM KH ₂ PO ₄ 、4.2mM MgCl ₂ 、50μMEGTA、5mM コハク酸ナトリウム、10mM リン酸緩衝液)中の10mM ローダミン123と共にミトコンドリア画分(1000mg タンパク質/ HEPES、2μM ロテンン)を添加、次に37℃で1時間、種々の濃度のナノ粒子を添加。フローサイトメリー(BD)を用いて蛍光強度変化を測定。 シクロム c 放出アッセイ ;シクロム c の濃度は、Quantikine Rat / Mouse Cytochrome c Immunoassay キット(Minneapolis, MN)を用いて測定。at / Mouse Cytochrome c Immunoassay キット(Minneapolis, MN)を用いて測定。
試験結果	細胞生存率 ;濃度に対して細胞生存率の有意な低下を示した。特に Fe ₂ O ₃ ナノ粒子は最大の細胞傷害活性を示した。活性は、この化合物のサイズおよび磁気効果に起因すると推定

	<p>される。本知見は、毒性に対する分子サイズ/親油性の増強効果に関する一般的な傾向に従うかもしれない。Fe₂O₃ > SWCNT > MWCNT の順に増加する試験化合物の細胞傷害活性を図 1 に示す。</p> <p>カスパーゼ 3 アッセイ; 全ナノ粒子は、正常細胞ではなくメラノーマ細胞でのみアポトーシス最終メディエーター、カスパーゼ-3 の活性を有意に増加させた(図 2)。Cs.A 及び BHT のみが Z-IETD によってナノ粒子がカスパーゼ 3 活性化を誘導するのを妨げ ($p < .001$)、これらナノ粒子がアポトーシスで終結するメラノーマ細胞における ROS 介在ミトコンドリア内因性経路を活性化することを示唆した。</p> <p>SDH 活性; SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子は、癌性で健康ではないミトコンドリアで用量依存的にコハク酸デヒドロゲナーゼ活性のみを阻害した。特に、Fe₂O₃ ナノ粒子は、癌性ミトコンドリアにおいて SDH に対して最大の阻害効果を示した(図 3)。</p> <p>ROS 形成; 全ナノ粒子は、使用濃度で癌性ミトコンドリアにおいて ROS 生成を有意に誘導した ($p < .05$、図 4)。これらの結果は、ROS 生成を誘導するこれらナノ粒子が CLL 細胞アポトーシス促進への影響の根底にある可能性を示唆したが、使用濃度が正常ミトコンドリアにおいて ROS 生成を上昇させないことを示した。</p> <p>MMP アッセイ; SWCNT、MWCNT 及び Fe₂O₃ ナノ粒子への添加で、1 時間は、これらのナノ粒子へのばく露後にメラノーマ細胞から得られたミトコンドリアにおいて $\Delta\Psi_m$ の減少を示した(図 5)。正常ミトコンドリア上へのナノ粒子の同濃度の添加は、全てのナノ粒子において $\Delta\Psi_m$ の有意な減少を示さなかった(図 5)。</p> <p>ミトコンドリアの腫瘍長; SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子の添加は、メラノーマ細胞から得られた癌性ミトコンドリアにおけるミトコンドリアの腫瘍長をもたらした(図 6)。同濃度で試験したナノ粒子を正常ミトコンドリアに添加しても、ミトコンドリアの腫瘍長は誘発されなかった(図 6)。</p> <p>シクロム c; SWCNT、MWCNT 及び Fe₂O₃ ナノ粒子が、ミトコンドリア膜電位のミトコンドリア膨潤および崩壊を有意に引き起こすことを示した。これらの事象は、ミトコンドリア透過性移行 (MPT) 及びミトコンドリアから培養緩衝液へのシクロム c 放出をもたらし得る。試験した全てのナノ粒子は、癌性ミトコンドリア上で有意な ($p < .05$) シクロム c 放出を誘導したが、正常な健康ドナーでは誘導しなかった(図 7)。重要なことに、MPT 阻害剤、Cs. A 及び ROS スカベンジャーである BHT によるナノ粒子処理ミトコンドリアの前処理は、酸化ストレス及び MPT の役割を示す唯一のナノ粒子で処理したグループと比較して、使用したナノ粒子の細孔開口はシクロム c 放出を誘導した。</p>
結論	<p>3 つのナノ粒子の毒性を、正常細胞および黒色腫細胞と比較した。</p> <p>すべての試験ナノ粒子は、メラノーマ細胞およびミトコンドリアにおけるミトコンドリア経路を介した選択的毒性およびカスパーゼ 3 活性化を引き起こし、活性酸素種 (ROS)、ミトコンドリア膜電位低下 (MMP 崩壊)、ミトコンドリア膨潤およびシクロム c 放出を引き起こした。ブチル化ヒドロキシルエン (BHT) の前処理、細胞透過性酸化防止剤とシクロスポリン A (Cs.A)、ミトコンドリア透過性転移 (MPT)、細胞毒性を低下させる細孔封鎖剤、カスパーゼ 3 活性化、ROS 生成、とミトコンドリア損傷は、MWCNT、および IONPs により誘発された。本研究結果は、SWCNT、MWCNT、及び Fe₂O₃ ナノ粒子が、癌細胞におけるミトコンドリアを直接的および選択的に標的化することによって抗癌剤候補として有望であり得ることを示唆し、それゆえに、これらは ROS 媒介ミトコンドリア経路を介して細胞死を誘発し、最終的にシクロム c 放出、カスパーゼ 3 活性化および癌性メラノサイトにおけるアポトーシスを導く可能性がある。</p>

No	Fe2O3-2
論文題目 (和訳)	Recurrent exposure to ferric oxide nanoparticles alters myocardial oxidative stress, apoptosis and necrotic markers in male mice (酸化鉄ナノ粒子への反復ばく露は、雄マウスにおける、心筋酸化ストレス、アポトーシスおよび壊死マーカーを変化させる)
著者 所属機関	V. Manickam, M. Periyasamy, V. Dhakshinamoorthy, L. Panneerselvam, E. Perumal Department of Biotechnology, Bharathiar University, India
書誌事項	Chemico-Biological Interactions; 278 (2017), 54–64 http://dx.doi.org/10.1016/j.cbi.2017.10.003
試験物質	Fe ₂ O ₃ ナノ粒子(酸化鉄 NPs)は Sigma-Aldrich より購入;詳細は著者らの以前の研究、Toxicol. Appl. Pharmacol. 317 (2017) 12–24 に。粒子はナノ粒子の微細な凝集体で、ゼータ値は正味の正の電荷を示し、水溶液中で安定。
試料調整法	ナノ粒子(< 50 nm)は 0.9%生理食塩水に溶解し、4℃で 5 分間、20Hz で超音波処理したものを所定の濃度で使用する。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> ・インド、トリスールのケララ農業大学実験動物センターから調達された、25～30g の体重範囲の雄性アルビノマウス(8 週齢)を使用。 ・対照および実験群の動物に、0.9%生理食塩水および Fe₂O₃ ナノ粒子をそれぞれ 25mg/kg(低用量)および 50mg/kg(高用量)で、30 日間、腹腔内投与した(それぞれ 7 日間隔で投与する)。(用量は著者らの過去の研究から決められた。) ・最後の処理の 24 時間後、動物は頸部を切断し、血液を採取し血清を分離。心臓は切除し、組織をホモジナイズする。 ・解析方法 心電図(ECG)解析、MRI による酸化鉄ナノ粒子の存在のイメージング、プルシアンブルーによる組織中の鉄の染色、心臓機能評価のマーカー(LDH、CK-MB)分析、心筋組織中の全たんぱく質・AChE 活性の推定、心筋組織中のオキシダント・抗酸化物質の生化学的分析、ミトコンドリア分析、ATP レベル決定、細胞死マーカーのウェスタンブロットング分析、細胞死マーカーのための心筋の免疫組織染色、心房直下の心臓の TTC 染色。
試験結果	<ul style="list-style-type: none"> ・食物消費と水分摂取において、対照群および実験群で大きな変化はなかったが、酸化鉄 NPs を与えられた動物において体重増加の有意な減少が観察され、さらに、有機体質指数の、用量に依存した減少が見られた。 ・心電図解析 高容量で HR, PR, QTc, QST, ST(心電図形の指標)の有意な上昇と RR 間隔の減少が見られ、低用量でも同様であった。 ・観測された MR 信号の差は、25mg/kg - 体重にばく露されたマウスについて、心臓および肝臓でそれぞれ、7.1 および 14.9%であった。投与量が 50mg/kg に増加したときも同様であった。 ・酸化鉄 NPs を与えられた動物では、鉄含有量の有意な用量依存性増加が、血清、肝臓および心臓組織で見出された。プルシアンブルー染色は、対照群と比較して、酸化鉄 NPs の蓄積による鉄の増加を示した。 ・酸化鉄 NPs は、全たんぱく質の増加、AChE 活性の減少、心臓機能マーカー酵素(LDH,CK-MB)のレベルの増加をもたらした。 ・酸化鉄 NPs は、心臓オキシダントマーカー、オキシダント(ROS,LPO,PC,NO)のレベルを増加させた。 ・損傷していないミトコンドリアの有意な減少が、ばく露した動物で観察された。ルシフェラーゼアッセイは、対照と比較してばく露群における ATP 濃度の用量依存的な減少を示した。 ・酸化鉄 NPsは、心臓の抗酸化物質(SOD, CAT, GSH-Px, GST, GSH, VitaminC)レベルを枯渇させ、心臓組織における酸化ストレス、アポトーシスおよび壊死マーカーに変化をもたらした。 ・心臓切片の免疫染色は、酸化鉄 NPsにばく露された動物において陽性に染色された細胞の数が増加した。一方、カスパーゼ-3p20 染色では、陽性染色された細胞の数は、25mg/kg 処置群で、50mg/kg 処置群およびコントロールと比較した場合、増加した。 ・TTC 染色は、白い壊死領域の輪郭の存在を示した。
結論	本研究は、酸化鉄 NPs へのばく露がマウスモデルにおける心臓毒性を誘起することを示した。反復酸化鉄 NPs 投与は、過剰の ROS を生成し、抗酸化剤レベルを枯渇させることによって心臓組織に酸化ストレスをもたらす。持続的な酸化ストレスは、アポトーシスおよび壊死をもたらす、心筋細胞の変性および心臓機能不全をもたらす。しかし、これらの研究結果のメカニズムの詳細を理解するためにはさらなる研究が必要である。

(10) Ni

No	Ni-1																																				
論文題目 (和訳)	Genotoxic and Mutagenic Properties of Ni and NiO Nanoparticles Investigated by Comet Assay, c-H2AX Staining, Hpvt Mutation Assay and ToxTracker Reporter Cell Lines (コメットアッセイ、c-H2AX 染色、Hpvt 突然変異アッセイおよびトックストラッカーレポーター細胞株によって調べられた Ni および NiO ナノ粒子の遺伝毒性および変異原性)																																				
著者 所属機関	E. Åkerlund, ¹ F. Cappellini, ¹ S. Di Bucchianico, ¹ S. Islam, ¹ S. Skoglund, ² R. Derr, ³ I. Odnevall Wallinder, ² G. Hendriks ³ and H. L. Karlsson ¹ ¹ Karolinska Institutet, Sweden ² KTH Royal Institute of Technology, Sweden ³ Toxys, Netherlands																																				
書誌事項	Environmental and Molecular Mutagenesis. 2017 Dec 15. doi: 10.1002/em.22163. [Epub ahead of print]																																				
試験物質	試験対象ナノ粒子 (Sigma-Aldrich より購入) の特性: <table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>BET 面積</th> <th>一次粒径</th> <th>純度</th> <th>DMEM (含血清) 中 Ni 放出量</th> <th>RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>Ni</td> <td>6.41 m²/g</td> <td><100 nm</td> <td>>99%</td> <td>~2%</td> <td>~2%</td> </tr> <tr> <td>NiO</td> <td>102 m²/g</td> <td><50 nm</td> <td>>99.8%</td> <td>~3%</td> <td>~6%</td> </tr> </tbody> </table> <ul style="list-style-type: none"> 参照 (比較) 物質; NiCl₂·6H₂O (溶解してイオン化) 細胞媒体中 Ni 放出量は ICP-MS で、粒径は動的光散乱法 (PCCS) により測定。 		BET 面積	一次粒径	純度	DMEM (含血清) 中 Ni 放出量	RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量	Ni	6.41 m ² /g	<100 nm	>99%	~2%	~2%	NiO	102 m ² /g	<50 nm	>99.8%	~3%	~6%																		
	BET 面積	一次粒径	純度	DMEM (含血清) 中 Ni 放出量	RPMI/LIC-9 中 Ni 放出量																																
Ni	6.41 m ² /g	<100 nm	>99%	~2%	~2%																																
NiO	102 m ² /g	<50 nm	>99.8%	~3%	~6%																																
試料調整法	<ul style="list-style-type: none"> 対応する細胞媒体中に濃度 1mg/mL の粒子懸濁液を作成。 次に室温中で、水浴中 15 分間、ボルテックス及び超音波攪拌し、100µg/mL に希釈した溶液を実験ごとに作成し、対応する用量を細胞に直接加える。細胞はそれぞれの物質の新鮮な質量濃度にばく露されることになる。 																																				
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<ul style="list-style-type: none"> アラマールブルーアッセイ (細胞増殖アッセイ); HBEC (ヒト気管支上皮細胞)、用量 5, 10, 25, and 50 mg Ni/mL、ばく露 24 時間、96-well plates、最終体積 100µL コメットアッセイ (DNA 鎖切断測定); HBEC 細胞、用量 5, 10, 25, and 50 mg Ni/mL、ばく露 24 時間、24-well plates、最終体積 600µL γ-H2AX アッセイ (DNA 損傷レベル検出); HBEC 細胞、用量 5, 10, and 25 mg Ni/mL、ばく露 3, 24 時間、最終体積 2mL 無細胞 DCFH-DA アッセイ; 25 mL の 10, 25, and 50 µg/mL of Ni と 15 µM DCFH in a black 96-well plate 細胞内 ROS 産生分析; 1×10⁴ HBEC 細胞を well 毎に接種/black and clear bottom 96-well plates、用量 5, 10, 25, and 50µg Ni/mL で 3 時間ばく露 トックストラッカーアッセイ・レポーター細胞ライン実験; 6 種類の緑色蛍光たんぱく質 (GFP) 導入細胞ライン、Srxn1-GFP, Blvrb-GFP, Bcl2-GFP, Rtkn-GFP, Btg2-GFP, and Ddit3-GFP をゼラチンコートした 96-well plates に接種し NP にばく露。 Hpvt 突然変異アッセイ; IB10mES (マウス胎児幹細胞、用量 0.5, 1, 5, and 10 µg Ni/mL) 及び V79-4 細胞 																																				
試験結果	<table border="1"> <thead> <tr> <th></th> <th>Ni ナノ粒子</th> <th>NiO ナノ粒子</th> <th>NiCl₂</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)</td> <td>無</td> <td>無</td> <td>小 50µg/mL で</td> </tr> <tr> <td>DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)</td> <td>有 10µg/mL から</td> <td>有 5µg/mL から</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)</td> <td>無</td> <td>無</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>無細胞 ROS</td> <td>僅少</td> <td>有</td> <td>僅少</td> </tr> <tr> <td>細胞内 ROS</td> <td>僅少</td> <td>有</td> <td>無</td> </tr> <tr> <td>細胞毒性 (レポーター細胞)</td> <td>有</td> <td>有</td> <td>有</td> </tr> <tr> <td>酸化ストレス (レポーター誘起)</td> <td>有</td> <td>有</td> <td>有</td> </tr> <tr> <td>DNA 損傷 (レポーター誘起)</td> <td>無*</td> <td>無*</td> <td>無*</td> </tr> </tbody> </table>		Ni ナノ粒子	NiO ナノ粒子	NiCl ₂	細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)	無	無	小 50µg/mL で	DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	有 10µg/mL から	有 5µg/mL から	無	DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	無	無	無	無細胞 ROS	僅少	有	僅少	細胞内 ROS	僅少	有	無	細胞毒性 (レポーター細胞)	有	有	有	酸化ストレス (レポーター誘起)	有	有	有	DNA 損傷 (レポーター誘起)	無*	無*	無*
	Ni ナノ粒子	NiO ナノ粒子	NiCl ₂																																		
細胞毒性 (HBEC ≤50µg/mL)	無	無	小 50µg/mL で																																		
DNA 鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	有 10µg/mL から	有 5µg/mL から	無																																		
DNA 二重鎖切断 (HBEC ≤25µg/mL)	無	無	無																																		
無細胞 ROS	僅少	有	僅少																																		
細胞内 ROS	僅少	有	無																																		
細胞毒性 (レポーター細胞)	有	有	有																																		
酸化ストレス (レポーター誘起)	有	有	有																																		
DNA 損傷 (レポーター誘起)	無*	無*	無*																																		

	たんぱく質ストレス(レポーター誘起)	有 (高細胞毒性時 で)	有 (高細胞毒性時 で)	有 (高細胞毒性時 で)
	Hprt 突然変異 (mES ≤ 5µg/mL)	無	1 用量のみ	無
	*Rtkn レポーターで緩やかな増加、閾値の 2 倍には達しない。			
結論	<p>•DNA 損傷が、肺上皮細胞(血清を含まない条件で培養)において、主に DNA 一本鎖切断の形で、Ni および NiO の NP にばく露することによって誘発され、一方、可溶性 NiCl₂ で導入された Ni イオン/錯体については効果が観察されなかった。</p> <p>•NiO について、1 回の用量でのみ、小さいが統計的に有意な Hprt 突然変異の増加が観察された。</p> <p>•6 つの異なるレポーター細胞株では、酸化ストレスが主な(遺伝)毒性機序であると結論づけられ、高用量でタンパク質の折り畳みのアンフォールディングが発生した。いずれの Ni 含有材料も、直接的な DNA 損傷レポーターに関連した DNA 損傷および DNA 複製フォークを誘起しなかった。</p> <p>•総じて、Ni および NiO ナノ粒子は、Ni イオン/複合体に比較して顕著な(遺伝)毒性効果を示し、より重篤な健康状態の懸念を示すと結論される。遺伝毒性の一次メカニズムとしての酸化ストレスの同定は、発癌性ハザードおよび、DNA と直接相互作用する薬剤に比べて閾値用量応答が低いことを示唆している。</p>			

(11) ナノクレイ

No	クレイ-1
論文題目 (和訳)	Toxicity evaluations of nanoclays and thermally degraded byproducts through spectroscopical and microscopical approaches. (分光学的および顕微鏡的アプローチによるナノクレイおよび熱的に分解された副産物の毒性評価)
著者 所属機関	Wagner A ¹ , Eldawud R ¹ , White A ¹ , Agarwal S ¹ , Stueckle TA ² , Sierros KA ³ , Rojanasakul Y ⁴ , Gupta RK ¹ , Dinu CZ ¹ . 1 Department of Chemical and Biomedical Engineering, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA. 2 National Institute for Occupational Safety and Health, Morgantown, WV 26505, USA. 3 Department of Mechanical and Aerospace Engineering, West Virginia University, Morgantown, WV 26506, USA. 4 Department of Pharmaceutical Sciences, West Virginia University, Morgantown, WV, 26506, USA.
書誌事項	Biochim Biophys Acta. 2017 Jan;1861 (1 Pt A) :3406-3415. doi: 10.1016/j.bbagen.2016.09.003. Epub 2016 Sep 7.
試験物質	・未処理 Cloisite Na ⁺ (UC):改質なしモンモリロナイト、 ・Cloisite 30B (CC):90meq/100g クレイ濃度で、メチル、獣脂、ビス-2-ヒドロキシエチル、第4級アンモニウムと:有機的にイオン交換反応により改質。 ・熱分解 Cloisite Na ⁺ (UC900) ・熱分解 Cloisite 30B (CC900)
試料調整法	・UC、CC:熱分解
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞株】不死化ヒト気管支上皮細胞 (BEAS-2B):1%L-glutaminin, 1%ペニシリン-ストレプトマイシン含有培地中で培養。全細胞は、0.25%トリプシン (Invitrogen) を用いて規則的に継代し、37°C、5%CO ₂ 、80%相対湿度で培養。各実験の前に、細胞を融合性単層に増殖。 【試験種類】 ・電気セル基板インピーダンス試験 ・生存細胞数計数:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml 用量の UC、CC、熱分解副生成物を 24 時間、48 時間、72 時間ばく露。 ・細胞生存率:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml UC、CC、UC900、CC900 を 24、48、72 時間ばく露。 ・細胞イメージング:BEAS-2B 細胞に、100µg/ml UC、CC、UC900、CC900 を 24 時間ばく露。
試験結果	・ナノクレイとその熱分解副生成物の特性:UC は CC に比べて層化が少なく、滑らかなエッジを有する (図 2)。UC900 と CC900 は凝集した形態で存在し、均一な表面。UC と熱分解副生成物 UC900 との元素組成の有意差なし。CC900 と CC の炭素量鎖は熱分解による有機変性剤の損失による。有機修飾物質の存在により、CC は他の 3 サンプルと比較して、培地と PBS の両方でより直径が小さくなったが、CC900 の熱分解サンプルは、CC と比較して、それぞれ 35、36%増加。 ・ナノクレイ又は熱分解副生成物へのばく露による細胞挙動評価:BEAS-2B 上皮細胞は、物質がヒト肺中に呼吸により導入された場合に、第 1 の防御システムとして機能することを示した。クレイ又は副生成物で処理した細胞の抵抗性がコントロールと比較して低下することを示した (図 4)。特に、CC の抵抗性が最大で、処置後 6 時間後にはほぼ完全な損失を示した。UC、UC900、CC900 で処置した細胞は、抵抗性 (領域 C) を回復/維持できた。耐性の傾向は、UC 及び UC900 で同様、CC900 でわずかに低い。 ・ナノクレイ又は熱分解副生成物の細胞変化に関与するメカニズム:CC は細胞-基質相互作用において完全な損失を示したのに対し、UC 処理細胞は α の減少を示したが、クレイ除去後に細胞-基質相互作用 (領域 C) を維持した。UC900 と CC900 は細胞-基質間相互作用が維持されていることを示したが、抵抗性が低く、細胞形態の変化が起こったことを示した。CC900 は細胞回復を確認。ナノクレイは有意な毒性効果を誘導し、時間依存性を示した Cloisite 30B は、それぞれコントロールと初期ナノクレイと関連した時間依存性を示す生存細胞数および細胞生存率の低下を示した。副産物はより少ない毒性効果をもたらした。全ての処置は、ばく露時に細胞形態の変化を引き起こした。
結論	ECIS (電気セル基板インピーダンス試験) は、非侵襲的で高スループットでリアルタイムの方法でクレイまたは副生成物の毒性プロファイルを同定する新しい手法を提供した。具体的には、クレイまたは熱分解された副生成物として処理した後の BEAS-2B 細胞で観察された形

態学的、行動的および生存率の変化は、そのような試料が製造環境または廃棄環境の両方で使用されると毒性効果を生じる可能性があることを示した。有機改質ナノクレイ CC は、細胞-基質および細胞-細胞相互作用における大きな損失および 72 時間までの最大細胞集団損失に最も近い、最も大きな毒性効果を有していた。対照的に、その熱的に分解された副生成物である CC900 は、既知の発癌性カーボンブラックと同様の毒性プロファイルを示唆する可能性がある細胞増殖を誘導した。UC およびその熱的に分解された対応物、UC900 は、ほとんど有意な毒性作用を示さなかった。

No	クレイ-2
論文題目 (和訳)	Hepatotoxicity and Drug/Chemical Interaction Toxicity of Nanoclay Particles in Mice マウスにおけるナノクレイ粒子の肝毒性と医薬品/化学物質相互作用毒性
著者 所属機関	Katsuhiko Isoda*, Ryutaro Nagata, Tomoya Hasegawa, Yuichiro Taira, Ikuko Taira, Yoshimi Shimizu, Kazuo Isama, Tetsuji Nishimura and Isao Ishida * Correspondence: k.isoda@thu.ac.jp Faculty of Pharmaceutical Sciences, Teikyo Heisei University, 4-21-2 Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan
書誌事項	Nanoscale Research Letters (2017) 12:199
試験物質	<ul style="list-style-type: none"> ・ナノクレイ粒子(モンモリロナイト):Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO)から購入。 1nm の1つの側を持つ層状粒子サイズの粉体。Zetasizer (Sysmex Co., Kobe, Japan) 測定の粒子サイズ分布は、57.8±12.3nm(ピーク1、体積43.6%)、1nmの1つの側を持つ層状粒子サイズの粉体。Zetasizer (Sysmex Co., Kobe, Japan) 測定の粒子サイズ分布は、57.8±12.3nm(一次粒子;ピーク1、体積43.6%)、648.3±232.2648nm(凝集粒子;ピーク2、体積56.4%)。 ・パラコート(除草剤)(生理食塩水に溶解) ・シスプラチン(生理食塩水に溶解) ・四塩化炭素(オリーブ油に溶解) ・医療用水(vehicle control)
試料調整法	医療用水(扶桑薬品工業、日本)中に20 mg/mlの濃度で分散。使用前に超音波処理して分散、水希釈。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	<p>試験生物:8週齢 BALB/c マウス;船橋ファーム株式会社(千葉県)から購入。 投与方法・期間・試験用量: 注射1回。投与24時間後、殺処分。</p> <p>① ナノクレイ粒子(単独での肝毒性用量依存性);0、1、5、10、20 mg/kg ② 化学物質(腹腔内投与)とナノクレイ(尾静脈内注入)</p> <ul style="list-style-type: none"> ・四塩化炭素;0.01ml/kg(肝障害を誘発しない用量)+NC;5 mg/kg ・パラコート;50mg/kg+NC;5 mg/kg ・シスプラチン;80µmol/kg+NC;5 mg/kg
試験結果	<p>生化学的解析(血清アラニンアミノトランスフェラーゼ(ALT)とアスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ(AST)は、酵素で肝障害で血液中に漏れ、肝障害の重要な指標。血液尿素窒素(BUN)は、腎臓が正常に働いている時に検査されるインデックスで、BUN値の上昇は腎機能の劣化の尺度。)および組織学的分析:</p> <p>① 20mg/kg(最大用量)のナノクレイ粒子で、急性肝障害観察。広範な損傷を示した。 ② 共投与</p> <ul style="list-style-type: none"> ・四塩化炭素とナノクレイ粒子5mg/kgの投与で、血清ALTとASTレベル上昇。 ・ALTレベル:NC単独;41.5、パラコート単独;48.3→共投与;126.6(相乗的上昇) ・ASTレベル:NC単独;257.6、パラコート単独;354.6→共投与;634.1(相加的上昇) ・シスプラチンとNCの共投与は、ALTとASTレベルを相乗的に上昇。血清BUNレベルも上昇。
結論	ナノクレイ粒子が肝臓の損傷を引き起こすことがあり、この影響は、肝毒性化学物質や医薬品との相互作用の結果として相乗的に悪化することがあることが実証された。これらのデータに基づくさらなる研究は、人間の医学での使用のために提案されたナノ粒子の毒性プロファイルを完全に明らかにするために必要とされている。

(12) ナノセルロース

No	セルロース-1
論文題目 (和訳)	<i>In vitro</i> biological responses to nanofibrillated cellulose by human dermal, lung and immune cells: surface chemistry aspect. (ヒト皮膚、肺、免疫細胞によるナノフィブリル化セルロースに対する <i>in vitro</i> の生物学的応答: 表面化学アспект)
著者 所属機関	Viviana R. Lopes ¹ , Carla Sanchez-Martinez ² , Maria Strømme ¹ and Natalia Ferraz ¹ 1 Nanotechnology and Functional Materials, Department of Engineering Sciences, Uppsala University, Box 53475121 Uppsala, Sweden. 2 Present affiliation: Ocular Biology and Therapeutics, UCL Institute of Ophthalmology, 11-43 Bath Street, EC1V 9EL London, UK.
書誌事項	Part Fibre Toxicol. 2017 Jan 10;14(1):1. doi: 10.1186/s12989-016-0182-0.
試験物質	NFC(ナノフィブリル化セルロース): 商用で、全く乾燥していない、漂白された軟質木材溶解パルプより生成。未修飾 NFC(U-NFC)、カルボキシメチル化 NFC、ヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム NFC、アニオン NFC(A-NFC)、カチオン NFC(CNFC)。参照物質: 食品グレード微結晶セルロース(MCC)。ポジティブコントロール: DMSO、ネガティブコントロール: 未処理細胞。 NFC ばく露懸濁液: U-NFC、A-NFC、C-NFC のストック溶液を PBS 中で 5mg/ml で調整し、超音波プローブで 12 分間分散
試料調整法	NFC の合成・表面修飾;【U-NFC】パルプの酵素前処理により調整。【A-NFC、CNFC】カルボキシメチル化及び、ボックスプロピルトリメチルアンモニウムクロライド(EPTMAC)四級化前処理により調整。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	【細胞培地】ヒト皮膚線維芽細胞(HDF)、ヒト MRC-5 肺線維芽細胞株、ヒト THP-1 単球細胞株。 【投与方法】最終ストック溶液を、それぞれ 45 分 2 サイクル中に UV 処理した C-NFC を除き、オートクレーブにより滅菌。ばく露前に、ストック溶液を細胞培養培地(濃度範囲 50-500µg/ml)で希釈、水浴超音波処理器で 30 分間超音波処理後、細胞に添加。 MRC-5 と HDF 細胞は DMEM/F12 培地、THP-1 細胞は 10%(v/v) 熱不活性化ウシ胎児血清 UFBS)、100IU/ml ペニシリン、100µg/ml ストレプトマイシンを補完した RPMI1640 培地で培養。細胞を 37°C、5%CO ₂ 加湿大気中で培養、70-80%細胞密度で継代培養。 【試験種類・試験用量・ばく露期間】 ・細胞毒性評価; NFC50-500µg/ml に 24 時間ばく露。 ・細胞代謝活性: アラマーブルアッセイ(AB アッセイ)、細胞膜完全性: 乳酸デヒドロゲナーゼアッセイ ・細胞形態 - 光学顕微鏡 ・炎症評価: サイトカイン腫瘍壊死因子 α(TNF-α) およびインターロイキン 1β(IL1-β) の分泌レベルを定量化することによって評価。 ・ROS 生成: シクロジヒドロフルオレセイン二酢酸(DCFH-DA)アッセイ。 ・NFC の細胞取込み - TEM: NFC500µg/ml に 24 時間ばく露。
試験結果	【NFC の特徴】表面荷電基の導入は、個々のナノフィブリルを生じたが、フィブリル凝集体は、透過型電子顕微鏡で観察される未修飾 NFC ゲル懸濁液中で優勢。タンパク質の存在下では、表面修飾された NFC はコンパクトな凝集体を形成したが、非修飾 NFC の凝集パターンはタンパク質の存在下および生理学的緩衝液中で類似。 【細胞毒性】非改変および修飾 NFC ゲルは、ヒト真皮線維芽細胞、肺、マクロファージ細胞において細胞毒性を誘導せず。 【ROS 産生】THP-1 マクロファージによる有意な ROS 産生は見られず、細胞取り込みは観察されなかった。 【炎症応答】TNF-α および IL1-β レベルの上昇によって評価される非修飾 NFC で THP-1 マクロファージを処置した場合、炎症応答が検出。これは、表面荷電基が NFC に導入された場合には存在しなかった。
結論	データは、未修飾、カルボキシメチル化、およびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム修飾 NFCs へのばく露に関連する細胞毒性効果がないことを示している。非修飾 NFC は、カルボキシメチルおよびヒドロキシプロピルトリメチルアンモニウム基などの表面修飾をナノフィブリルに導入することによって、さらに緩和される前炎症効果を示した。本知見は、NFC に対する炎症反応が物質表面化学によって引き起こされ、安全なナノセルロース材料を設計する可能性を開くことを示唆している。細胞が未修飾および表面修飾された NFC ゲルにばく露された場合、細胞毒性または有意な ROS 産生の徴候は見出されなかった。さらに、細胞の取り込みは観察されなかった。サイトカイン分泌の点で U-NFC による前炎症反応が見られ、この作用は、ナノフィブリル上に表面荷電基が存在する場合に抑制された。この知見は、NFC ゲルに対する炎症応答が、表面化学によって引き起こされ、安全なナノセルロース材料の設計の可能性を開くことを示唆している。

(13) 量子ドット

No	QD-1
論文題目 (和訳)	Quantum Dot Nanotoxicity Investigations Using Human Lung Cells and TOXOR Electrochemical Enzyme Assay Methodology. (ヒト肺細胞及び TOXOR 電気化学的酵素アッセイ方法論を使用する量子ドットナノ毒性調査)
著者 所属機関	O'Hara T, Seddon B, O'Connor A, McClean S, Singh B, Iwuoha E ¹ , Fuku X ¹ , Dempsey E. 1SensorLab, Department of Chemistry, University of the Western Cape, South Africa.
書誌事項	ACS Sens. 2017 Jan 27;2(1):165-171. doi: 10.1021/acssensors.6b00673. Epub 2017 Jan 5.
試験物質	メルカプトコハク酸(MHA)被覆 CdTe 量子ドット
試料調整法	MHA 被覆 CdTe 量子ドットは、Vaishnavi & Renganathan による方法の修正版に従って作製。原料は、CdCl ₂ 、MSA、NaHTe (Te 粉を NaBH ₄ で還元)。平均径 = 3.3±0.7 nm。量子ドットの内面空間 (d) = 0.39、0.32、0.24 nm。一部凝集(写真)。表面酸化あり。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	試験細胞:A549 ヒト肺上皮細胞 投与方法・期間: <i>in vitro</i> 、24 時間 試験用量:0~1,000 µg/mL
試験結果	・電気化学的細胞毒性アッセイ: ≥ 50 µg/mL までの 24 時間ばく露の後に続く、酸性ホスファターゼ活性の濃度(細胞中の免疫活性の指標となる)による依存低下を検知。IC ₅₀ 値 = 118±49 µg/mL。 ・MTT アッセイ: 代謝活性の類似した濃度依存低下を検知。IC ₅₀ 値 = 157±31 µg/mL。 ・細胞摂取(ばく露 30 分後): オプティカルセクションング、XZ 面イメージングが、細胞面内への量子ドットの入り込みを示し、内在化を示した。
結論	インハウス TOXOR 電気化学的細胞毒性アッセイを用い、MHA 被覆 CdTe 量子ドットの哺乳類細胞への細胞毒性を初めて測定した。両法の 24 時間 IC ₅₀ 値は良く合致した。ナノ粒子が電気化学的アッセイシグナルを干渉した証拠はなかった。更なる作業は、他のタイプのナノマテリアル(TiO ₂ 、CNT など)などのスクリーニングに対する電気化学的アッセイの使用に焦点を当てていく。

No	QD-2
論文題目 (和訳)	Comparative study on toxicity of extracellularly biosynthesized and laboratory synthesized CdTe quantum dots. (細胞外生合成及び研究室合成 CdTe 量子ドットの毒性に関する比較研究)
著者 所属機関	Kominkova M ¹ , Milosavljevic V ¹ , Vitek P ² , Polanska H ³ , Cihalova K ¹ , Dostalova S ¹ , Hynstova V ¹ , Guran R ¹ , Kopel P ¹ , Richtera L ¹ , Masarik M ³ , Brtnicky M ³ , Kynicky J ³ , Zitka O ¹ , Adam V ¹ . 1 Department of Chemistry and Biochemistry, Mendel University in Brno, Czech Republic; Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Czech Republic. 2 Global Change Research Institute, The Czech Academy of Sciences, Czech Republic. 3 Central European Institute of Technology, Brno University of Technology, Czech Republic; Department of Physiology and Department of Pathological Physiology, Faculty of Medicine, Masaryk University, Czech Republic.
書誌事項	J Biotechnol. 2017 Jan 10;241:193-200. doi: 10.1016/j.jbiotec.2016.10.024. Epub 2016 Oct 29.
試験物質	・生物合成 CdTe 量子ドット(BioS) (大腸菌(NCTC 13216)による) 大腸菌溶液を CdCl ₂ 、クエン酸ナトリウム水和物、Na ₂ TeO ₃ 、MSA、Na ₂ BH ₄ 液で希釈。24 時間 37°Cで培養後、精製。Milli-Q 水に溶解保存。 ・研究室合成 CdTe 量子ドット(MW) (マイクロ波加熱: Moulick ら 2015; Skalickova ら 2013 参考) 酢酸カドミウムに MSA 液添加、次にアンモニア溶液、NaTeO ₃ 溶液、次に NaBH ₄ 添加。2 時間攪拌、水希釈後、50°Cでマイクロ波照射(加熱)。4°C暗室保存。
試料調整法	試験試料の項に記載。
試験生物 投与方法・ 期間 試験用量	・試験生物: ヒト細胞株(HFF、PC-3、MCF-7) 購入先: Health protection Agency Culture Collection (Salisbury, UK) ・投与方法・ 期間及び試験用量 ①MTT 試験 培地量子ドット濃度: 0、2、3、5、10、15、30、50、100、150 nM 培養時間: 24 時間
試験結果	①MTT 試験 HFF 及び MCF-3 に対する細胞毒性(IC ₅₀)の差は、2つのタイプの量子ドットで 10%の範囲内であったが、PC-3 細胞株では、MW に対してより低い IC ₅₀ が測定された。
結論	量子ドットの細胞外合成は、いくつかの方法を使って、確かめられた。加えて、これらの粒子はキャラクタライズされ、マイクロ波合成を使って得られた粒子と比較された。ラマン分光法、質量分析、ゲル電気泳動を用いて得たデータを基に、量子ドットの表面が、それらの生物合成を仲介する有機化合物、多分 E.coli の分泌蛋白質、によって修飾されることが結論づけられる。加えて、Bios 量子ドットと MW 量子ドットの毒性が比較された。生物合成と研究室合成量子ドットの光学特性は、粒子の凝集が異なる条件で行われるため、大幅に違った。HFF 及び MCF-7 細胞株の MTT 試験によって立証された毒性の非常に小さい差違が、量子ドットの両タイプで観察された。しかし、PC-3 細胞株で、Bios 量子ドットは、化学的方法で合成されたそれらと比較した場合、大幅に低い毒性を示した。