

## 磁性ナノ粒子マグネタイトによるヒト肺上皮細胞への影響

大久保 智子<sup>a</sup>, 斎藤 育江<sup>a</sup>, 前野 智和<sup>b</sup>, 保坂 三継<sup>a</sup>, 中江 大<sup>c</sup>

磁性ナノ粒子マグネタイト（以下マグネタイトと略す）は、プリンターやコピー機のトナーなど様々な用途に使われており、大気中に放出される可能性が高い。またマグネタイトをヒトが吸入した場合は肺胞まで届きやすく、健康への悪影響が懸念される。本研究は、培養細胞気相ばく露装置Cultex<sup>®</sup> RFSを用いて、マグネタイトを空気中に分散してヒト肺上皮A549細胞にばく露し、その影響を調べた。実験は、A549細胞に気相化したマグネタイトを流量1.0, 2.0及び5.0 mL/minにてばく露し、細胞増殖、炎症因子であるインターロイキン-8（以下IL-8と略す）の産生量、酸化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ-1（以下HO-1と略す）の細胞内レベルを測定した。その結果、マグネタイトのばく露は細胞増殖とIL-8産生に対して抑制的に作用する傾向を示したが、これらの作用は限定的で明確でなかった。一方、マグネタイトのばく露は、気流によるA549細胞内におけるHO-1レベルの経時的な減少に対して、抑制的な影響を及ぼした。以上の結果より、マグネタイトは、A549細胞に気相ばく露すると、空気の吹付による直接的刺激による細胞内HO-1の減少を抑制するものと示唆された。

**キーワード：**磁性ナノ粒子マグネタイト、ヒト肺上皮A549細胞、気相ばく露、IL-8、HO-1

### はじめに

粒径100 nm以下の超微粒子はナノ粒子と総称され、その微小性ゆえにヒトの健康への悪影響が懸念されているが、安全性評価が十分になされていない。磁性ナノ粒子マグネタイト（Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>）（以下マグネタイトと略す）は、化学的に安定で比較的大きな磁性を有することから、磁気記録媒体、磁性流体及び磁性トナーなど様々な用途に広く利用されている。また、医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が注目されている<sup>1</sup>ことから、今後、使用量の増加が見込まれる。マグネタイトは、微小なナノ粒子であるため、大気中に拡散しやすく、ヒトがそれを吸入した場合に肺胞まで届きやすいことから、健康への悪影響が懸念されている。ラットを用いたマグネタイトの気管内反復投与による慢性毒性試験においては、肺における慢性炎症及び肺上皮過形成が観察され、肺に対する発がん性が疑われる所見が得られた<sup>2</sup>。また、ヒト肺上皮A549細胞を用いた実験において、マグネタイトは遺伝毒性や活性酸素産生などを惹起した<sup>3</sup>。本研究は、ヒトが吸入する状態に近い条件下の実験が可能で培養細胞気相ばく露装置Cultex<sup>®</sup> RFS<sup>4</sup>を用いて、空気中に分散させたマグネタイトをA549細胞に気相ばく露し、その細胞増殖、炎症因子であるインターロイキン-8（以下IL-8と略す）の産生量及び酸化ストレス応答因子であるヘムオキシゲナーゼ-1（以下HO-1と略す）の細胞内レベルに及ぼす影響を検討した。また、予備実験としては、マグネタイトを培地に添加してA549細胞に液相ばく露し、同様にその影響を調べた。

### 実験方法

#### 1. 試薬

マグネタイトスラリー（マグネタイト超微粒子分散液）（6%, BMS-10, 1次粒径5-15 nm, 比表面積115 m<sup>2</sup>/g）は、戸田工業株式会社より購入した。RPMI1640培地、0.25% トリプシン-EDTA溶液及び牛胎児血清（FBS）はGIBCO<sup>®</sup> から、WST-8試薬は株式会社同仁化学研究所から購入した。IL-8とHO-1の測定用ELISA試薬キットであるDuoSet<sup>®</sup> IC human CXCL8/IL-8と human total HO-1/HMOX1 ELISA Development kit は、R&D Systems, Inc.より購入した。

#### 2. 培養細胞

ヒト肺上皮A549細胞は、American Type Culture Collectionより購入した。A549細胞は、10% FBS含有RPMI1640培地（増殖用培地）を用いて、37°C、5% CO<sub>2</sub>/95%空気条件下で維持した。

#### 3. 気相ばく露装置

培養細胞気相ばく露装置は、Cultex<sup>®</sup> RFS（Cultex<sup>®</sup> Laboratories GmbH, Germany）を用いた。この装置は、インサートの底面のメンブランフィルター上で細胞を培養するもので、培養細胞の上面が空気と接触し、フィルターに面した下部から培地が供給される構造になっている<sup>4</sup>。気相ばく露の条件としては、Fig. 1に示すように、2.0 L/minの速度で流した空気に、水で希釈した1%マグネタイト分散液を0.1 mL/minの速度で分散させて細胞ばく露装置へ導入し、培養細胞に気相ばく露した。

<sup>a</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部環境衛生研究科  
169-0073 東京都新宿区百人町3-24-1

<sup>b</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科

<sup>c</sup> 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

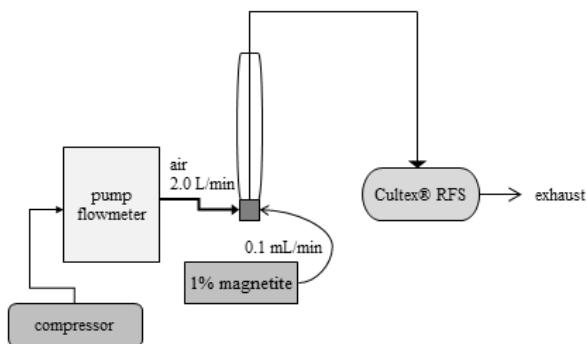


Fig. 1. The total configuration diagram of a Cultex® RFS system

#### 4. 液相ばく露実験

##### 1) 細胞増殖試験

A549細胞は、96ウェルプレートに $2 \times 10^4$ 個/ウェルで播種し、 $37^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2/95\%$ 空気条件下で2日間培養した後に培地を捨て、1% FBS含有RPMI1640培地（実験用培地）で段階的に希釈したマグネタイトを加え、24時間ばく露させた。ばく露終了後は、WST-8試薬を10  $\mu\text{L}$ /ウェルで加えて1時間培養した後、波長450 nmにおける吸光度を測定した。細胞増殖は、対照群の吸光度を100%とした時の、マグネタイトをばく露した実験群の吸光度のパーセンテージで評価した。

##### 2) IL-8及びHO-1測定

IL-8とHO-1は、ELISA法を用い、上記の各キットに添付された説明書に従って測定した。A549細胞は、24ウェルマイクロプレートに $25 \times 10^4$ 個/ウェルで播種し、2日間培養した後に培地を捨て、実験用培地で希釈したマグネタイトを加えた。IL-8測定用試料は、24時間ばく露した後に培地を回収し、 $-30^\circ\text{C}$ で保存した。HO-1測定用試料は、3時間ばく露した後に培地を捨て、細胞をトリプシン-EDTAで回収してPBS洗浄した後にHO-1測定用細胞溶解液（1% Triton-X, 1 mM EDTA, 蛋白質阻害剤含有PBS）で溶解し、この細胞溶解液を $-30^\circ\text{C}$ で保存した。ELISA測定時に、IL-8用試料は $830 \times g$ で1分間、HO-1用試料は $2,000 \times g$ で5分間、それぞれ遠心して得られた上清を測定に供した。また、IL-8については、培地を回収した後に、残った細胞をトリプシン-EDTAで回収して、HO-1測定用細胞溶解液を用いて細胞溶解液を作成し、その蛋白質濃度をLowry法<sup>5)</sup>で測定して補正に用いた。HO-1については、細胞溶解液の蛋白質濃度を測定し、補正に用いた。

##### 5. 気相ばく露実験

A549細胞は、プレートの培養用培地を入れたウェルに設置した底面積 $0.9 \text{ cm}^2$ のインサートに $17 \times 10^4$ 個/インサートで播種し、 $37^\circ\text{C}$ において、5%  $\text{CO}_2/95\%$ 空気条件下で3日間培養した後に培地を捨て、Cultex® RFS内に設置した。マグネタイトは、空気2.0 L/minに分散させ、流量1.0, 2.0及び5.0 mL/minで15, 30, 60, 90及び120分間ばく露した。

対照群では、活性炭を通過した清浄空気を同様にばく露した。ばく露後のA549細胞は、新しいプレートの実験用培地を入れたウェルにインサートを戻し、IL-8測定のための細胞にのみ培地を0.5 mL/インサート加えて培養した。細胞増殖については、24時間培養した後に10% WST-8試薬添加実験用培地を0.5 mL/インサート加え、さらに1時間培養した後、波長450 nmにおける吸光度を測定した。IL-8については、24時間培養した後にインサート内の培地を回収して上記の液相ばく露実験と同様にELISAで測定すると共に、細胞を回収して細胞溶解液を作製し、補正用の蛋白質濃度を測定した。HO-1については、3時間培養した後に細胞を回収してPBSで洗浄後に細胞溶解液を作製して上記の液相ばく露実験と同様にELISAで測定し、細胞溶解液の蛋白質濃度で補正した。

##### 6. 透過型電子顕微鏡（TEM）観察

マグネタイトスラリーを水で任意に希釈したのち、フォルムバー付マイクログリッド（150メッシュ、銅製、イーエムジャパン株式会社）に1  $\mu\text{L}$ 滴下し、乾燥させて観察に供した。TEM（Tecnai F20、日本エフイー・アイ株式会社）は、加速電圧200 kV、観察倍率10万倍に設定して観察した。

##### 7. 粒径分布測定

細胞気相ばく露実験と同様に、空気2.0 L/minに1%マグネタイトを0.1 mL/minの速度で分散し、これをMSP Wide-range particle Spectrometer 1000XP（日本カノマックス株式会社）を用いて粒径分布を測定した。粒径は10 - 10,000 nmまでを36段階に分けて測定を行った。

## 結 果

##### 1. マグネタイトの性状

マグネタイトスラリーのTEM像をPhoto 1に示す。マグネタイトの粒径は20 nm以下であり、大きな凝集塊は見られなかった。空気中に分散したマグネタイトの粒径分布を

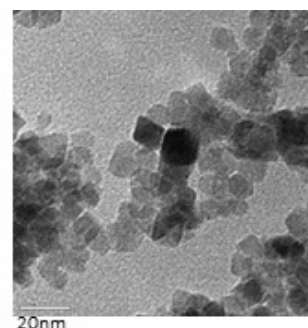


Photo 1. Transmission electron micrograph of magnetite nanoparticles

The magnetite nanoparticles were observed with a Tecnai F20 transmission electron microscope (FEI Company) at an accelerating voltage of 200 keV.

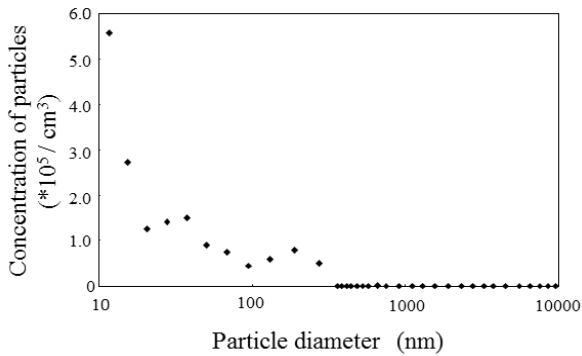


Fig. 2. Size frequency curve of magnetite nanoparticles

測定したところ、粒径は10 - 13.32 nmが一番多く、次に13.32 - 17.78 nmで、ほとんどが350 nm以下であった (Fig. 2)。また粒径の範囲は10 - 5,000 nm, 粒子数は約 $165 \times 10^6$  個/cm<sup>3</sup>で、100 nm以下の粒子は全体の88.4%を占めていた。

## 2. 液相ばく露実験

細胞増殖の結果をFig. 3に示す。0, 100, 300, 500及び1,000 µg/mLのマグネタイトを24時間ばく露させた結果、A549細胞の増殖は300 µg/mL以上の群で対照値 (0 µg/mL 群値) に比べて抑制され、1,000 µg/mLで対照値の70%に達した。

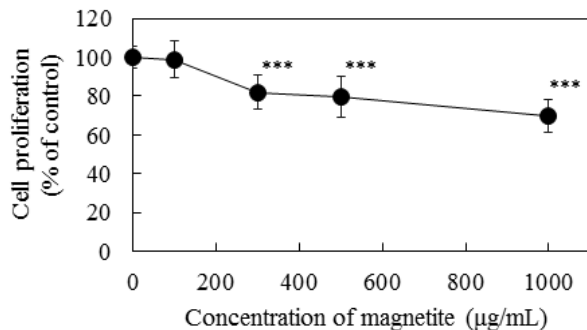


Fig. 3. The cell proliferation of A549 cells exposed by suspended magnetite nanoparticles for 24 h  
n=8, \*\*\*, p<0.001

0, 1.0, 10及び100 µg/mLのマグネタイトを24時間ばく露させた結果、A549細胞から産生されたIL-8の量は、対照値に比べ、濃度依存的に増加した (Fig. 4)。

0, 1.0, 10及び100 µg/mLのマグネタイトを3時間ばく露させた結果、A549細胞のHO-1レベルは、対照値に比べ、濃度依存的に減少した (Fig. 5)。

## 3. 気相ばく露実験

マグネタイトを気相ばく露して24時間培養した後の細胞増殖を調べたところ、流量が1.0 mL/minの場合、対照群では120分間ばく露しても影響がみられなかった。マグネタイトをばく露した、ばく露群では30及び90分間ばく露で有

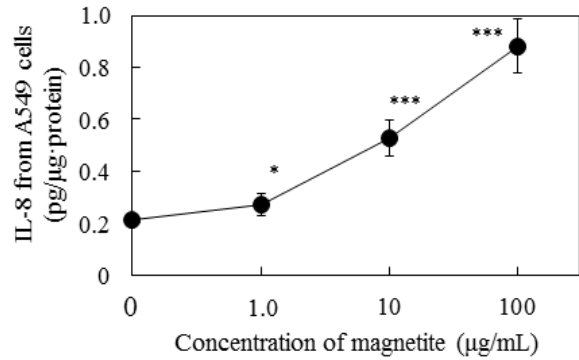


Fig. 4. The concentration of IL-8 induced from A549 cells exposed by suspended magnetite nanoparticles for 24 h  
n=6, \*, p<0.05, \*\*\*, p<0.001

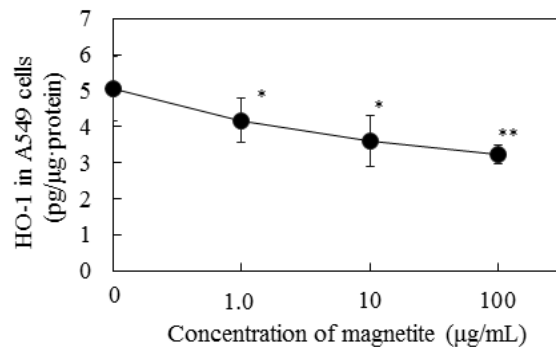


Fig. 5. The concentration of HO-1 in A549 cells exposed by suspended magnetite nanoparticles for 3 h  
n=6, \*, p<0.05, \*\*, p<0.01

意に増殖が抑制されたが、120分間ばく露で有意な影響がなかった (Fig. 6)。また、流量が2.0及び5.0 mL/minの場合、対照群及びばく露群共に気流により増殖が抑制される傾向が出現し、マグネタイトばく露による影響は明確でなかった。

マグネタイトを気相ばく露して24時間培養した後のIL-8産生量を調べたところ、対照群及びばく露群共に気流によりIL-8産生量が経時的に増加する傾向が見られた (Fig. 7)。ばく露群のIL-8産生量は、対照群のそれに比べ、流量1.0及び2.0 mL/minで15分間ばく露した時と、流量5.0 mL/minで60及び90分間ばく露した時に有意に抑制されたが、そのほかの条件では有意な影響は認められなかった。

マグネタイトを気相ばく露して3時間培養した後の細胞内HO-1レベルを調べたところ、流量1.0 mL/minの場合、対照群では120分間ばく露時点までHO-1レベルが維持されたのに対し、ばく露群では90分間ばく露時点まで同様に、120分間ばく露時点で有意なHO-1レベルの増加が認められた (Fig. 8)。流量2.0 mL/minの場合、対照群では、気流により90分間ばく露時点までHO-1レベルが低下し、120分間ばく露時点で回復した。ばく露群では、120分間ばく露時点までHO-1レベルが維持され、30及び60分間ばく露時点で対照群値より有意な高い値を示した。流量5.0 mL/minの

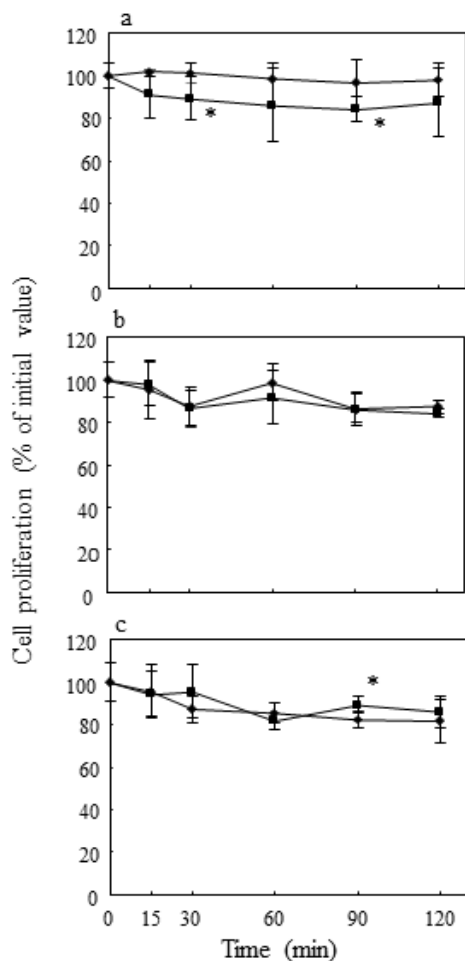


Fig. 6. The cell proliferation of A549 cells exposed magnetite nanoparticles by Cultex® RFS after 24 h post-exposure. The exposed flow rates are a; 1.0 mL/min, b; 2.0 mL/min and c; 5.0 mL/min.

◆; control, ■; magnetite, n=6

\*; p<0.05, magnetite vs control

場合、対照群ではばく露時間に依存してHO-1レベルが低下したが、ばく露群では120分間ばく露時点までHO-1レベルが維持され、120分間ばく露時点で対照群値より有意な高い値を示した。

### 考 察

本研究は、気相ばく露実験において、ばく露流量を1.0, 2.0及び5.0 mL/minに設定した。その結果、流量を1.0 mL/minとした場合は、対照群で、細胞増殖に影響がなく、細胞内HO-1レベルも維持されたが、IL-8産生量が増加した。また、この流量条件下では、データのばらつきも少なかった。しかし、流量を2.0及び5.0 mL/minとした場合は、対照群で、細胞増殖が抑制され、IL-8産生が増加し、細胞内HO-1レベルが減少した。また、これらの流量条件下では、データのばらつきが大きかった。以上の現象は、気流による直接的な影響を反映したものと推察される。したがって、マグネタイト気相ばく露が及ぼす影響については、

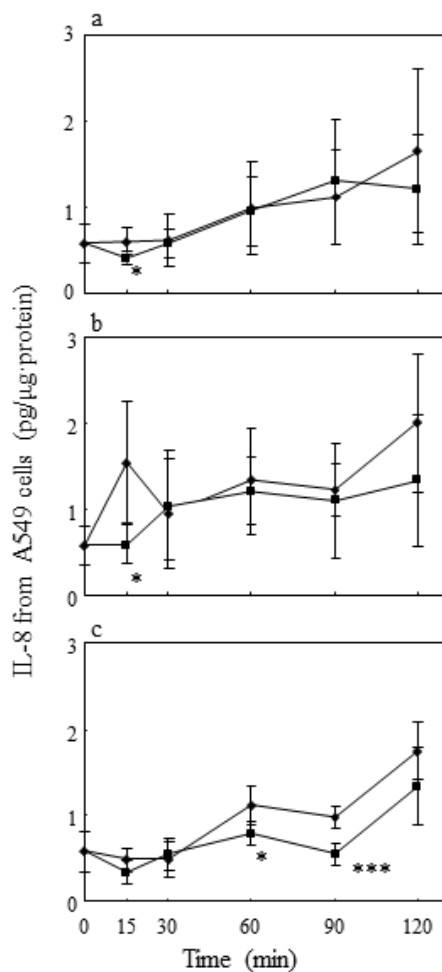


Fig. 7. The concentration of IL-8 induced from A549 cells exposed magnetite nanoparticles by Cultex® RFS after 24 h post-exposure.

The exposed flow rates are a; 1.0 mL/min, b; 2.0 mL/min and c; 5.0 mL/min.

◆; control, ■; magnetite, n=6

\*; p<0.05, \*\*\*; p<0.001, magnetite vs control

基本的に流量を1.0 mL/minとした場合のデータを用いて検討するべきものと考えられた。

液相ばく露実験において、マグネタイトは、300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度で細胞増殖を抑制し、1.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以上の濃度でIL-8産生を増強すると共にHO-1レベルを減少させた。マグネタイトのこれらの作用は、いずれも濃度依存性が得られた。しかし、気相ばく露実験において、マグネタイトは、細胞増殖とIL-8産生に対して抑制的に作用する傾向を示したが、これらの作用は限定的で明確でなかった。一方、細胞内HO-1レベルについて、マグネタイトのばく露は、流量が1.0 mL/minの場合に120分間ばく露でむしろ増加させ、流量が2.0及び5.0 mL/minの場合に気流による経時的な減少に対して抑制的な影響を及ぼした。両者の結果が異なる理由は明確でないが、ばく露方法の違いは大きな要因であるものと考えられる。液相ばく露実験では、底面積1.88  $\text{cm}^2$ のウェルに1 - 1,000  $\mu\text{g}/\text{mL}$ のマグネタイト溶液を0.5 mL加

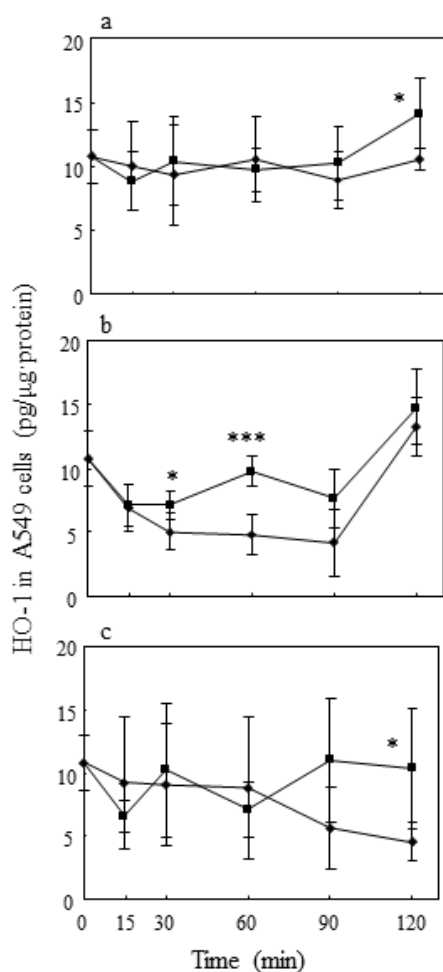


Fig. 8 The concentration of HO-1 in A549 cells exposed magnetite nanoparticles by Cultex® RFS after 3 h post-exposure

The exposed flow rates are a; 1.0 mL/min, b; 2.0 mL/min and c; 5.0 mL/min.

◆; control, ■; magnetite, n=6

\*, p<0.05, \*\*\*, p<0.001, magnetite vs control

えたので、0.5 - 500  $\mu\text{g}/\text{ウエル}$  (0.27 - 270  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ ) のマグネタイトが3または24時間ウエル内に留まる。一方、気相ばく露実験では、1% (10 mg/mL) マグネタイト分散液を0.1 mL/minの速度で空気2.0 L/minに分散していることから、マグネタイト0.5  $\mu\text{g}/\text{mL}\cdot\text{air}/\text{min}$ の濃度でばく露することになり、これを1.0 mL/minの流量で60分間ばく露する場合、底面積0.9  $\text{cm}^2$ のインサートに増殖しているA549細胞に対

し33  $\mu\text{g}/\text{cm}^2$ のマグネタイトをばく露したことになる。さらにこの場合、マグネタイトは細胞に接触するものの、細胞に沈着して残留するものは少なく、大半は空気中に分散したまま空気と共に排出されると考えられる。加えて、気相ばく露実験では、空気の吹付による細胞への物理的な刺激がある。これらの違いは、マグネタイトの影響に関する液相ばく露実験と気相ばく露実験の結果が異なることに大きく影響したものと推察される。

Fukanoら<sup>6)</sup>は、A549細胞へのタバコ煙ばく露実験をCultex®モジュールを用いて行った結果、A549細胞のHO-1遺伝子発現が増加することを報告し、気相ばく露実験を行うことがタバコ煙に関連する肺疾患への基礎的な実験に役立つ可能性を持っていると報告した。ヒトがマグネタイトにばく露される上で想定される主なルートは、粉じんとして呼吸器を通じて肺に入り、さらに末梢の肺胞にまで到達し、そこで沈着することが考えられる。そのためタバコ煙と同様に、気相ばく露実験により、そのヒトへの健康影響を明らかにし得るものと考えられる。タバコ煙でHO-1遺伝子発現が増加したことから、本研究においてマグネタイトが気流による細胞内HO-1レベルの減少を抑制したことは、作用のベクトルが一致する。したがって、マグネタイトやタバコ煙などの微小粒子の培養細胞への気相ばく露は、培養細胞の酸化ストレス反応に関与する可能性がある。

## ま と め

磁性ナノ粒子マグネタイトは、ヒト肺上皮A549細胞へ気相ばく露すると、直接的刺激による細胞内の酸化ストレスマーカーHO-1の減少を抑制することが示唆された。

## 文 献

- 1) Duquest, E., Vasseur, S., Mornet, S., *et al.*: *Nanomedicine*, **1**, 157-168, 2006.
- 2) Tada, Y., Yano, N., Takahashi, H., *et al.*: *J. Toxicol. Pathol.*, **26**, 393-403, 2013.
- 3) Kőnczőol, M., Ebeling, S., Goldenberg, E., *et al.*: *Chem. Res. Toxicol.*, **24**, 1460-1475, 2011.
- 4) Aufderheide, M., Halter, B., Mőhle, N., *et al.*: *BioMed. Res. Int.*, **2013**, Article ID 734137 15pages, 2013.
- 5) Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., *et al.*: *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, 1951.
- 6) Fukano, Y., Yoshimura, H., Yoshida, T.: *Exp. Toxic. Pathol.*, **57**, 411-418, 2006.

**Effects of Magnetite Nanoparticles on Human Bronchial Epithelial A549 Cells**

Tomoko OKUBO<sup>a</sup>, Ikue SAITO<sup>a</sup>, Tomokazu MAENO<sup>a</sup>,  
Mitsugu HOSAKA<sup>a</sup> and Dai NAKAE<sup>a</sup>

Magnetite nanoparticles are mainly used in toners of printers and copying machines, and are easily released in the environment. There is thus a concern that these particles may have a harmful influence on human health. The present study examined the effects of magnetite nanoparticles on human bronchial epithelial A549 cells using a gaseous-phase exposure apparatus namely Cultex<sup>®</sup> RFS system. Magnetite nanoparticles were dispersed in the air and then A549 cells were exposed to the nanoparticles at flow rates of 1.0, 2.0, and 5.0 mL/min. The magnetite nanoparticles were found to have an inhibitory effect on cell proliferation and the production of inflammatory cytokine IL-8. However, these effects were somewhat unclear. On the other hand, the magnetite nanoparticles were shown to inhibit a decrease in intracellular levels of the oxidative stress-reacting factor, HO-1, as a result of physical irritation by the air flow. The present results suggest that magnetite nanoparticles inhibit stress-induced depression in intracellular HO-1 levels in A549 cells.

**Keywords:** magnetite nanoparticles, human lung epithelial A549 cell, culture cell gaseous phase exposure system, IL-8, HO-1

---

<sup>a</sup> Tokyo Metropolitan Institute of Public Health,  
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan