ヒト肺上皮由来A549細胞におけるナノシリカによる細胞傷害に関する研究

大久保 智子^a, 前野 智和^b, 小西 浩之^a, 守安 貴子^c

6種のナノシリカを用いて、ヒト肺上皮由来A549細胞へ液相ばく露および気相ばく露し、A549細胞への影響を調べ、 さらに、ナノシリカのA549細胞への取り込みを観察した.シリカ液相ばく露では、A549細胞の細胞増殖能力は、6種 いずれのシリカも30µg/mLを超える濃度では、濃度依存的に抑制作用がみられた.6種全てのシリカは、乳酸脱水素 酵素(LDH)活性を増加させた.6種中5種のシリカは、A549細胞の炎症因子インターロイキン-8(IL-8)産生を増強 した.ヘムオキシゲナーゼ-1(HO-1)については、6種中1種のシリカが10µg/mLで産生を増強したが、300µg/mL以 上の濃度の全シリカは、産生を減弱させた.次に、シリカ気相ばく露では、A549細胞の細胞増殖能力は、対照群と 比べ、差はなかった.6種中2種のシリカは、LDH活性を増加させた.6種中1種のシリカがIL-8産生を増強、別の1種の シリカがIL-8産生を減弱した.6種中3種のシリカは、HO-1産生を増強した.液相ばく露と気相ばく露とでは、A549細 胞への作用の違いは見られたが、これは、ばく露量の違いに関連していると考えられた.シリカを液相および気相ば く露したA549細胞の透過型電子顕微鏡像を観察すると、細胞内へナノシリカが取り込まれたことが推察された.

キーワード:ナノシリカ,ナノ物質,A549細胞,細胞増殖能力,インターロイキン-8,透過型電子顕微鏡

はじめに

ナノ物質は、一般的に大きさが 100 nm 以下の素材であ る. そのサイズがごく小さくなることにより、重量当たり の表面積の増加等のナノ物質特有の物性を示し¹)、優れた 性能を有する材料が得られる可能性もあることから、様々 な製品が研究開発されている. その用途も医薬品、化粧品、 食品添加物、家庭用品、電気電子部品等様々である. 例え ば、酸化チタンは、紫外線の防御力に優れており、ナノ粒 子化することにより、目に見える光の散乱が減って白く見 えなくなり、塗布した際、透明に見えることから、日焼け 止め製品に広く使われている².

ナノ物質の一つであるナノシリカは、二酸化ケイ素 (SiO₂)の微粒子であり、吸湿性に優れていることから、 化粧品や食品添加物等に用いられている. 2016年の製造 量は、約20,000トンである³⁾. ナノシリカは、日常生活 の中で様々な用途で利用される一方、ヒトの健康への影響 は明確ではない. ナノ物質はその大きさゆえに、ヒトが吸 入した場合,肺の奥深くまで到達し,そこに留まり,生体 に悪影響を及ぼす可能性がある. ナノシリカによる生体へ の影響に関する報告はいくつかある. ナノシリカを培養細 胞へ液相ばく露した実験の報告^{1,4)}によると、シリカが培 養細胞内へ取り込まれていることが明らかとなった.また, 肺上皮由来細胞やヒト気管由来細胞への液相ばく露により, 炎症因子インターロイキン-8(以下 IL-8と略す)の産生 が増強された報告がある 5,6. 動物実験では、28 日間連続 でマウスに経口投与,あるいは経皮塗布した結果,腸管, 並びに皮膚経由で体内へ移行することが明らかとなった ⁷⁾. 化学物質等による影響を調べる試験管内試験では,培養 細胞への液相ばく露に加え,気相ばく露を行う方法がある. しかし,安定したばく露条件を確保できる気相ばく露装置 が必要なため,実験例が少なく,ナノシリカでは,気相ば く露による培養細胞への影響を調査した報告は見当たらな い.そこで,本研究は,ナノシリカの呼吸器系への影響を 調べるため,6種のナノシリカを用いて,ヒト肺上皮由来 A549 細胞への液相ばく露および気相ばく露実験装置を用 いた気相ばく露実験を行った.併せてナノシリカの培養細 胞への取り込みを確認するため,ナノシリカをばく露した 培養細胞の透過型電子顕微鏡(以下 TEM と略す)観察を 行ったので報告する.

実験方法

1. 試薬

ナノシリカ6種類(シリカ①~⑥)は、シリカ①,②,
③,④,⑤をシグマアルドリッチから、シリカ⑥を
TECNAN 社から入手した(表 1).なお、シリカ①,②,
③は粉体、シリカ④,⑤,⑥はコロイド液であった.
RPMI1640液体培地、0.25%トリプシン-EDTA、牛胎児血
清(FBS)はGIBCO[®] 製を用い、細胞増殖アッセイキッ
ト Cell counting kit-8 (WST-8/1-Methoxy PMS 溶液)は
DOJINDO 製を使用した.LDH-細胞毒性テストは富士フィ
ルム和光純薬株式会社製を使用した.DuoSet[®] ELISA
Development kit human CXCL8/IL-8, DuoSet[®] IC Human
Total HO-1/HMOX1 ELISA は、R&D Systems 製を使用した.
蛋白質分解酵素阻害剤(セリンおよびシステインプロテア

^{*} 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

^b 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

[。] 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

検体名	メーカー	製品番号	製品名	粒径	表面積	金属成分
シリカ	Aldrich	637238	Silicon dioxide,	10 - 20 nm		3584.5ppm
1			nanopowder	particle size		(Al, As, Ba, Ca,
				(BET)		Cr, Fe, Mg, Na,
						Ti)
シリカ	Aldrich	718483	Silica, nanopowder	12 nm	201 m ² /g	46.8 ppm
2				primary	(BET)	(Al, As, B, Ca,
				particle size		Mg, Na)
				(TEM)		
シリカ	Aldrich	637246	Silicon dioxide,	5 - 15 nm	590 - 690	1175.5 pm
3			nanopowder (spherical,	particle size	m^2/g	(Al, Ba, Ca, Cr,
			porous)	(TEM)	(TEM)	Fe, Mg, Na, Pd,
						Sr, Ti, Zr)
シリカ	Aldrich	420816	LUDOX [®] HS-40	-	217 m ² /g	-
4			colloidal silica, 40 wt. %			
			suspension in H ₂ O			
シリカ	Aldrich	420778	LUDOX [®] TM-50	-	132 m ² /g	-
5			colloidal silica, 50 wt. %			
			suspension in H ₂ O			
シリカ	TECNAN	SI-105	TECNADIS SI-105:	10 - 15 nm	150 - 228	-
6)			silicon (IV) oxide (SiO ₂),	(BET)	m²/g	
			nanopowder, 5% w/w			

表1. 実験に用いたシリカ

-; データなし, 粒径, 表面積, 金属成分データは, メーカー情報より.

ーゼ阻害剤;コンプリート,ミニ,EDTAフリー)は,ロシュ・ダイアグノスティックス株式会社製を使用した.

2. 培養細胞気相ばく露実験装置

Cultex[®] RFSシステム (Cultex[®] Laboratories GmbH, Hannover, Germany) を用いた.

3. 測定項目

細胞傷害作用[細胞増殖能力,乳酸脱水素酵素(以下 LDHと略す)活性],炎症因子 IL-8,酸化ストレスマー カー ヘムオキシゲナーゼ-1(以下HO-1と略す)の4項目 を調べた.

4. ヒト肺上皮由来培養細胞への液相ばく露実験1) ヒト肺上皮由来培養細胞の処理

ヒト肺上皮由来 A549 細胞(American Type Culture Collection)は、10% FBS 含有 RPMI1640 培地を用いて、 37℃、5% CO2・95% air の条件下で継代培養した. A549 細胞は、必要時にトリプシン-EDTA を用いて回収し、細 胞数を数えて、細胞増殖能力および LDH 活性測定用には 96 ウエルプレートに 2×10⁴ cells/well で播種し、IL-8 およ び HO-1 測定用には 24 ウエルプレートに 20×10⁴ cells/well で播種し、2日間培養した後、純水で所定の濃度(10~ 10,000 µg/mL) に希釈したナノシリカ(ばく露群)および 対照群として純水を1/10 量加えた1% FBS 含有 RPMI1640 培地(以下実験用培地と略す)で3または24時間ばく露 した.ナノシリカの濃度は1.0,10,20,30,50,100, 150,200,300,400,500,1000 µg/mL とした.なお,ば く露した A549 細胞は、シリカ①をばく露した群をシリカ ①群として、以下同様に、シリカ②群、シリカ③群、シリ カ④群、シリカ⑤群、シリカ⑥群とした.実験は、1回の ばく露実験を8 検体同時に行い(n=8),同じ条件の実 験を3回繰り返し行った.

2) 細胞増殖能力試験

細胞増殖能力は、24時間ばく露したA549細胞の培地に WST-8/1-Methoxy PMS溶液を培地の1/10量加えて、更に1 時間培養後、マイクロプレートリーダ Multiskan FC

(Thermo Fisher Scientific, Inc.)を用いて,波長450 nmに おける培地の吸光度を測定した^{8,9}. なお,細胞増殖能力 は,対照群の培地の吸光度を100%として,各検体の吸光 度から増殖能力を算出した.

3) LDH活性

LDH活性は、24時間ばく露したA549細胞の培地を回収 し、当該培地にLDH-細胞毒性テストを使用し、波長550 nmにおける吸光度を測定した.シリカをばく露しない細胞(対照群)を培養した培地をネガティブコントロール

(0%),ばく露しない細胞に0.1% Tween20を含んだ実験 用培地を加え、24時間培養後、回収した培地をポジティブ コントロール(100%)として、各検体の細胞障害率を算 出した.なお、ばく露に用いた実験用培地は、フェノール レッド不含RPMI1640培地を使用した.

4) IL-8濃度

IL-8濃度は、24時間ばく露したA549細胞の培地を回収し て試料とした. DuoSet[®] ELISA Development kit human CXCL8/IL-8を使用し、添付された方法に従って、波長450 nmにおける吸光度を測定して定量した. IL-8濃度は、蛋 白質量当たりの値として算出するため、残った細胞をトリ プシンで回収し、PBSで2回洗浄した後、細胞溶解用液(1 mM EDTA、0.5% Triton X-100,蛋白質分解酵素阻害剤含 有PBS)を用いて作製した細胞溶解液の蛋白質濃度 (Lowry法¹⁰)を定量した.

5) HO-1濃度

HO-1濃度は、3時間ばく露したA549細胞を回収し、細 胞溶解用液を用いて、HO-1測定用の細胞溶解液を作製し た. DuoSet[®] IC Human Total HO-1/HMOX1 ELISAを使用し、 添付された方法に従って、波長450 nmにおける吸光度を 測定して定量した. HO-1濃度は、細胞溶解液の蛋白質量 当たりの値として算出した。

5. ヒト肺上皮由来培養細胞への気相ばく露実験

1) シリカ粒子のTEM観察

シリカ①を, 直径3 mmのグリッドに少量乗せ, 粒子の 状態をTEM観察した. TEMは, 日本エフイー・アイ株式 会社Tecnai F20を用い, 試料のTEM観察は, 加速電圧80-200 keVの条件で行った.

2) シリカ粒子の気相化

シリカ①~⑤について,精製水で10 mg/mL(1%)溶液 を作製し,0.1 mL/minの流速で2 L/minの乾燥空気中に分 散,気相化した.この分散したシリカの粒径分布をWide-Range Particle Spectrometer 1000XP(MSP)を用いて測定し た.

3) ヒト肺上皮由来培養細胞の処理

A549細胞は、トリプシン-EDTAを用いて回収し、10% FBS含有RPMI1640培地を入れた12ウエルプレートのウエ ル内に置いたインサート(面積0.9 cm²)に17×10⁴個で播 種し、インサートのメンブラン膜上で、37°C、5% CO₂・ 95% airの条件下で3日間培養した.実験時は、当該インサ ートを実験用培地が入ったCultex[®] RFSに設置した.

分散気相化したシリカ(ばく露群)および対照群として 活性炭を通過させて清浄にした空気を,1.0 mL/minの流速 で,30,60,90または120分間細胞にばく露した.ばく露 後,インサートを新しい実験用培地0.6 mLの入ったプレー ト上のウエルに入れ,LDH,IL-8測定試料にはインサート 内に実験用培地を0.5 mL加え,37°C,5% CO2・95% airの 条件下にて培養した.実験は、1回のばく露実験を3検体同時に行い(n = 3)、同じ条件の実験を3回繰り返し行った. なお、インサートで培養した気相ばく露していない細胞を 0分ばく露群とし、同様に新しい実験用培地0.6 mLの入っ たプレート上のウエルに入れて培養し、ばく露群、対照群 とともに各測定項目を測定した.

4) 細胞増殖能力試験

細胞増殖能力は,ばく露後24時間培養したA549細胞に, WST-8/1-Methoxy PMS溶液を1/10量加えた実験用培地を入 れ,更に1時間培養してから,波長450 nmにおける培地の 吸光度を測定した.0分ばく露群の培地の吸光度を100%と して,各検体の吸光度から増殖能力を算出した.

5) LDH活性

LDH活性は、ばく露後24時間培養したA549細胞の培地 を回収し、液相ばく露と同様に測定した.0分ばく露群の 培地をネガティブコントロール(0%)、0分ばく露群の細 胞に0.1% Tween20を含んだ実験用培地を加え、24時間培 養後、回収した培地をポジティブコントロール(100%) として、各検体の細胞障害率を算出した.

6) IL-8濃度

IL-8濃度は、ばく露後24時間培養したA549細胞の培地を 回収し、液相ばく露と同様に測定した.

7) HO-1濃度

HO-1 濃度は,ばく露後3時間培養したA549細胞を細 胞溶解用液で調整した細胞溶解液を用い,液相ばく露と同 様に測定した.

6. 統計学的解析

統計学的検定は、Dunnett法を用いて、有意差の検定を 行い、有意確率(p値)を示した.液相ばく露実験では、 ばく露濃度0µg/mLのデータを対照群として、各ばく露群 のデータを比較し、解析した.また、気相ばく露実験では、 各ばく露時間の対照群とばく露群とのデータを比較し、解 析した.

7. シリカばく露した細胞のTEM観察

1) ヒト肺上皮由来培養細胞の樹脂包埋および薄切

インサートのメンブラン上に培養されたA549細胞は, シリカ②を24時間液相ばく露,または180分間気相ばく露 後24時間培養し,TEM観察実験に供した.前処理,樹脂 包埋等の詳細な方法は,別報の通りである¹¹⁾.なお,試験 片には染色は行わなかった.

2) TEM観察および元素分析

TEMは、Tecnai F20を用いた. 試料のTEM観察は、加速 電圧80-200 keVの条件で行った. 元素分析は、EDAX社製 エネルギー分散型X線分光分析(EDS)装置を用いた.

果

1. 液相ばく露によるヒト肺上皮由来培養細胞へのシリカの影響

結

1) 細胞増殖能力

図1にシリカを液相ばく露した A549 細胞の細胞増殖能 力を示す. A549 細胞へ1~1000 µg/mL のシリカを液相ば く露した時の細胞増殖能力は,シリカ①群は 300 µg/mL 以 上,シリカ②群は 30 µg/mL 以上で抑制された.シリカ③ 群は1µg/mL で増加が見られたが,300 µg/mL 以上で抑制 された.シリカ④群は1~30 µg/mL の範囲で増加したが, 50 µg/mL 以上では抑制された.シリカ⑤群,⑥群は100 µg/mL 以上で抑制された.シリカ⑤群,④群は,低濃度で 増殖作用が見られたが,30 µg/mL を超える濃度では,① ~⑥群の全てのシリカで濃度依存的に細胞増殖能力を抑制 した.また,シリカ①群,②群,④群,⑤群および⑥群は, 1000 µg/mL で細胞をほぼ死滅させた.



- 図1. 液相ばく露されたA549細胞の細胞増殖能力
 - ◆;シリカ①群,■;シリカ②群,▲;シリカ③群,
 ×;シリカ④群,◇;シリカ⑤群,□;シリカ⑥群,
 ***;p<0.001, **;p<0.05

2) LDH活性

細胞が傷害されると細胞外へ放出される LDH 活性は, シリカ①群,③群は 200 μg/mL 以上で増加した.シリカ② 群は 30 μg/mL 以上,シリカ④群は 10 μg/mL 以上,シリカ ⑤群は 10 および 70 μg/mL 以上,シリカ⑥群は 10 および 200 μg/mL 以上で増加した.

3) IL-8

炎症症状を引き起こす原因因子の1つである IL-8 産生 は、シリカ①群は 300 μg/mL 以上、シリカ②群は 30 μg/mL 以上、シリカ④群は 50 μg/mL 以上、シリカ⑤群は 100 μg/mL 以上、シリカ⑥群は 500 μg/mL で濃度依存的に 増強された(図 2).増強の程度は、シリカ④群、⑤群が 強かった.なお、シリカ③群は 10 μg/mL 以上で IL-8 産 生を減弱した.

4) HO-1

酸化ストレスマーカーであるHO-1の産生は、シリカ① 群、③群は100 μg/mL以上、シリカ②群は30 μg/mL以上、 シリカ④群は10 μg/mL以上、シリカ⑥群は300 μg/mLで減 弱した.シリカ⑤群は10 μg/mLで増強したが、100 μg/mL 以上で減弱した.



図2. 液相ばく露されたA549細胞から産生されたIL-8量
◆;シリカ①群,■;シリカ②群,▲;シリカ③群,
×;シリカ④群,◇;シリカ⑤群,□;シリカ⑥群,
****;p<0.001,*;p<0.05

2. 気相ばく露によるヒト肺上皮由来培養細胞へのシリカ の影響

1) シリカのTEM像

シリカ①の TEM 観察像を写真 1 に示した.シリカ粒子 の粒径は 10-20 nm 程度であったが,ほとんどの粒子が 凝集して,二次粒子を形成し存在していた.



写真1. シリカ①のTEM像

2) 気相化したシリカの粒径分布

気相化したシリカ①, ②, ③, ④および⑤の粒径分布を 図3に示す.シリカ①の最頻粒径分布は24.01-29.44 nm シリカ②は326.3-402.03 nm,シリカ③は27.5-31.87 nm, シリカ④, ⑤は67.77-79.30 nm であり,シリカ④と⑤の 粒径分布は類似していた.気相ばく露条件下において,い ずれのシリカも,表1に示した粒径(一次粒子)で存在す る割合は低く,一次粒子が凝集した二次粒子として存在し ていることがわかった.なお,シリカ⑥の粒径分布は,装 置の故障により,測定できなかった.

3) 細胞増殖能力

A549 細胞ヘシリカを 30~120 分間気相ばく露すると、 細胞増殖能力は、いずれのばく露時間においても、全ての シリカばく露群と対照群との間に有意差は見られなかった (図 4).



図3.気相ばく露実験に用いたシリカの粒径分布
 ◆;シリカ①群,■;シリカ②群,▲;シリカ③群,×;シリカ④群,◇;シリカ⑤群



図4. 気相ばく露されたA549細胞の細胞増殖能力

◆;シリカ①群,■;シリカ②群,▲;シリカ③群,
 ×;シリカ④群,◇;シリカ⑤群,□;シリカ⑥群,
 ○;対照群

4) LDH活性

LDH 活性は、対照群と比較してシリカ①群は 30 分間ば く露、シリカ③群は 60、90、120 分間ばく露で増加した. シリカ②群、④群、⑤群および⑥群は、対照群と差はなか った.

5) IL-8

IL-8 産生は、対照群と比較して、シリカばく露群は 30, 60 分間ばく露では差はなかった.シリカ③群は 120 分間 ばく露で IL-8 産生を増強させ、シリカ④群は 90, 120 分 間ばく露で産生を減弱した(図 5).シリカ①群、②群、 ⑤群および⑥群は、対照群と差はなかった.

6) HO-1

HO-1 産生は、対照群と比較して、シリカ②群、④群は 90 分間ばく露で、シリカ⑤群は60,90,120 分間ばく露 で増強された.シリカ①群、③群および⑥群は、対照群と 差はなかった.

3. ヒト肺上皮由来培養細胞のTEM観察およびEDS分析

シリカを液相ばく露したA549細胞のTEM像を観察すると、細胞内にナノ物質が観察され、その粒子1つの大きさ



図5. 気相ばく露されたA549細胞から産生された IL-8量

◆;シリカ①群,■;シリカ②群,▲;シリカ③群,
 ×;シリカ④群,◇;シリカ⑤群,□;シリカ⑥群,
 ○;対照群,**;p<0.01,*;p<0.05

は10から50 nm程度であった(写真2). TEM観察用試験 片を-40°から+50°の範囲で傾斜させ,立体的に観察し,ナ ノ物質のA549細胞内部へ取り込みを確認できた(写真2). 次に,気相ばく露したA549細胞のTEM像を観察すると, ナノ物質が核の近くに取り込まれていた(写真3).さら に,写真4上部の写真の視野を用いてEDS分析を行い,下 部に示した分析結果では,ナノシリカの構成元素であるケ イ素のピークが強く検出された.次に,ナノ物質が確認で きない視野へ移動し,EDS分析すると,ケイ素のピークは ほとんど検出されず(データは示さず),このナノ物質が ナノシリカであることが推察された.



写真2. シリカ②を液相ばく露したA549細胞のTEM像 撮影角度を-40度(右上)および+50度(左下)で 傾斜

考 察

本研究では、6種のナノシリカを用いてヒト肺上皮由来 A549細胞へ液相および気相ばく露し、その影響を調べた. シリカ液相ばく露では、A549細胞に影響を及ぼし始め るばく露濃度を調べると、各測定項目(細胞増殖能力, LDH活性, IL-8, HO-1)とも、シリカ②,④は10から50



写真3. シリカ②を気相ばく露したA549細胞のTEM像



写真4. シリカ②を液相ばく露したA549細胞のTEM像(上部)およびEDS分析結果(下部)

μg/mLの範囲,シリカ①,③,⑤および⑥は100から500 μg/mLの範囲であり,シリカの種類により,培養細胞への 影響の程度が異なることがわかった.また,今回の実験で は,シリカ④,⑥は,IL-8産生を強く増強した.これは, Farcalら⁵, Skulandら⁶⁰の報告に類似する結果であり,シリ カが炎症を引き起こす作用を有することが示唆された.

液相ばく露と気相ばく露の結果を比較すると、シリカ② は、HO-1を液相ばく露では減弱させたが、気相ばく露で は少し増強させた.シリカ④は、IL-8を液相ばく露では増 強、気相ばく露では減弱させ、HO-1を液相ばく露では減 弱、気相ばく露では増強させた.シリカ⑤は、液相ばく露 では細胞増殖能力、LDH活性、IL-8に影響が見られたが、 気相ばく露ではこれらの項目に影響は見られなかった.し かし、シリカ⑤は、液相ばく露では、HO-1を10 µg/mLば く露で増強、100 µg/mLばく露で減弱、そして、気相ばく 露では、HO-1を、60および90分間ばく露では増強、120分 間ばく露では減弱し、両ばく露法とも、ばく露量、ばく露 時間に依存して、HO-1への影響が増強から減弱へ変化し た.このように、シリカの種類によって液相ばく露と気相 ばく露とで、A549細胞への影響に相違が見られた. シリカの種類によって結果の相違を示す理由として、シ リカの表面積や金属成分含有率(表1)の差が考えられる. 表面積については、シリカ③のみが590-690 m²/gで、それ 以外のシリカの表面積は、シリカ③に比べ小さい.また、 シリカに含有される金属の中で、活性酸素等を発生させる 鉄が、シリカ①、③にそれぞれ151.1 ppm、42.6 ppm含有 (メーカー情報による)している.しかし、今回の実験で は、シリカごとの表面積や金属成分と、培養細胞への影響 に関連性は見られなかった.

また,ばく露方法による結果の違いが生じた理由として, シリカのばく露量がある.シリカ液相ばく露では,最大ば く露量は250 µg/cm²,また,シリカ気相ばく露では,最大 ばく露量は66.7 µg/cm²と算出され,液相ばく露量の方が, 4倍程度多い.そして,気相ばく露は,シリカが分散した 気相がばく露中にばく露装置から順次排気されるため,培 養細胞への絶対的な気相ばく露量は,培養細胞表面にシリ カが留まり続ける液相ばく露に比べ,計算上,はるかに少 ないと考えられる.したがって,このことが作用の違いに 関連する要因の一つと考えられた.

本研究では、これまでの報告^{1,46}ので実施されてきた培養 細胞を用いた液相ばく露実験だけでなく、気相ばく露実験 を行い、ばく露方法によりいくつか異なる結果を得た.液 相ばく露は、特殊な装置が不要で、長時間ばく露が可能で あり、気相ばく露は、呼吸器系を介した吸入ばく露を想定 した条件下で実験が可能という利点がある.今回の実験で は、液相ばく露および気相ばく露では異なる結果が得られ た.各ばく露法の利点、特性を考慮しながら結果を考察す ることにより、培養細胞への影響について明らかにするこ とが必要と考えられた.

液相ばく露したA549細胞のTEM像(写真2)から,粒径 50 nm程度のシリカの集合体を観察できた.また,シリカ を気相ばく露したA549細胞のTEM像を観察すると(写真 3),細胞核付近に存在するシリカ粒子は,小さいものは 10 nmから50 nm程度で,一次粒子もしくは一次粒子に近 い状態で細胞内に存在していることがわかった.これによ り,シリカによる培養細胞への作用は,培養細胞の外部か らだけでなく,内部からの影響も考えられた.

文 献

- 吉岡靖雄,吉川友章,堤 康央:日衛誌, 65,487-492,2010.
- 資生堂:美容成分辞典, https://www.shiseidogroup.jp/ingredients/beautyingredients/titanium_dioxide.html(2018年9月20日現 在.なお本URLは変更または抹消の可能性がある)
- 経済産業省:平成28年度ナノマテリアル情報提供 シート ナノマテリアルの製造量等の推移,2016 年,

http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/fil es/nanomaterial/2017suii.pdf(2018年9月20日現在.

- 4) 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業):「ナノマテリアルの経皮毒性に関するトキシ コキネティクスおよびトキシコプロテオミクス等の融合による有害性評価法・リスク予測法の開発」, 2007-2009年度実施。
- Farcal, L. R., Uboldi. C., Mehn, D., *et al.*: *Nanotoxicology*, 7, 1095-1110, 2013.
- 6) Skuland, T., Ovrevik, J., Låg. M., et al.: Toxicol. Appl. Pharmacol., 275, 76-86, 2014.

- 7) 吉岡靖雄, 吉川友章, 鍋師裕美, 他: YAKUGAKU ZASSHI, 133, 169-174, 2013.
- Ishiyama, M., Shiga, M., Sasamoto, K., et al.: Chem. Pharm. Bull., 41, 1118-1122, 1993.
- Tominaga, T., Ishiyama, M., Ohseto, F., *et al.*: *Anal. Commun.*, **36**, 47-50, 1999.
- 10) Lowry, E. C., Blumberg, J. M., Rhea, P. L., et al.: J. Biol. Chem., 193, 265-275, 1951.
- 前野智和,大久保智子:東京健安研セ年報, 69,263-267,2018.

In Vitro Effects Induced by Nanosized Silica Particles at an Air–Liquid Interface in Human Lung Alveolar Carcinoma Cell Line A549 Cells

Tomoko OKUBO^a, Tomokazu MAENO^a, Hiroyuki KONISHI^a, and Takako MORIYASU^a

This study examined the effects induced *in vitro* in human adenocarcinoma-derived alveolar basal epithelial A549 cells by introducing six types of nanosized silica particles either into the culture medium or at an air–liquid interface, observing the uptake of the particles by the cells. Exposing the A549 cells to nanosized silica particles in the culture medium inhibited cell proliferation at a dose of 50–1000 µg/mL. Lactate dehydrogenase (LDH) activity was increased by all six particle types, and the generation of interleukin-8 (IL-8) was increased by five out of the six. The concentration of heme oxygenase-1 (HO-1), an antioxidant enzyme, increased with one type of particle at a concentration of 10 µg/mL but was inhibited at concentrations of 30–1000 µg/mL for all six types. When the cells were exposed to nanosized silica particles at an air–liquid interface, cell proliferation was not inhibited. LDH activity increased with two of the six types of particle. The generation of IL-8 was increased by one type of particle but was inhibited by another, and HO-1 was increased by three of the six. Thus, nanosized silica particles had different effects on A549 cells when administered at an air–liquid interface and into the culture medium. Cell activities differed according to the type of nanosized silica particle; the reason for this was not clear, but may have related to the difference in exposure levels. Transmission electron microscopy of A549 cells administered with nanosized silica particles in the culture medium or at an air–liquid interface showed that the particles had been absorbed into the cells.

Keywords: nanosized silica; nano material; A549 cell; cell proliferation; interleukin-8, transmission electron microscope