

図8-1

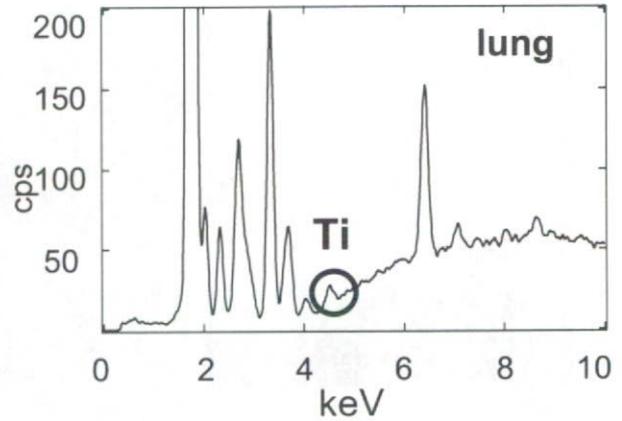


図8-2

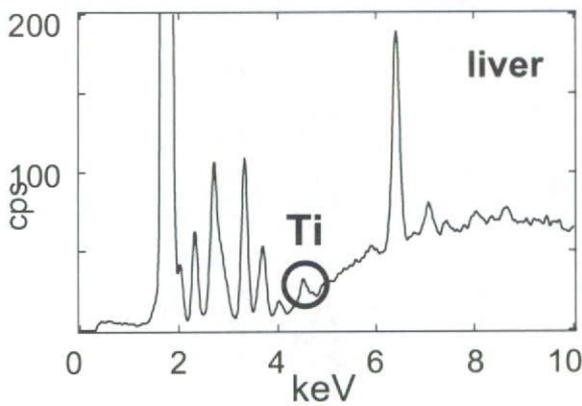


図8-3

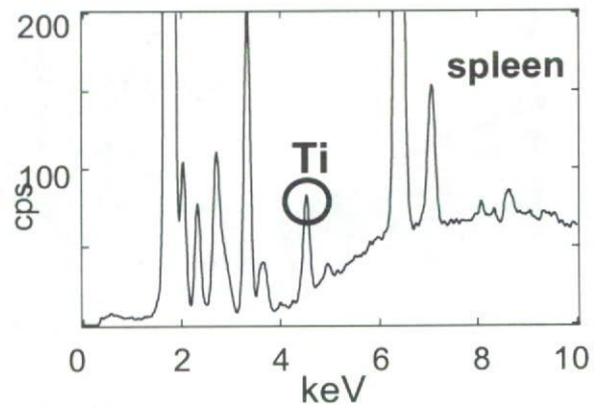


図8-4

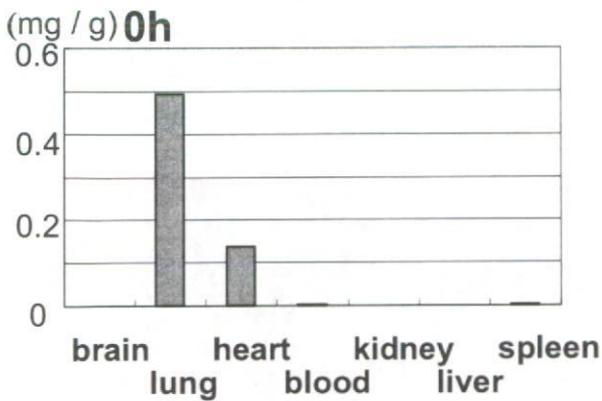


図8-5

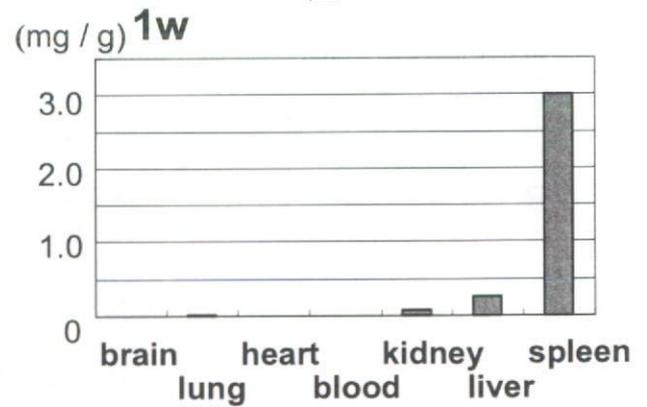
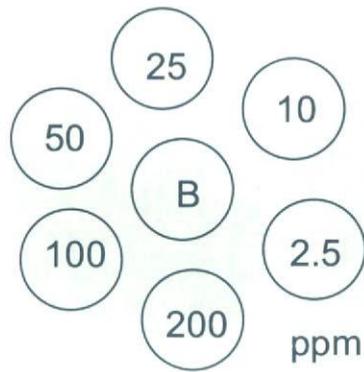
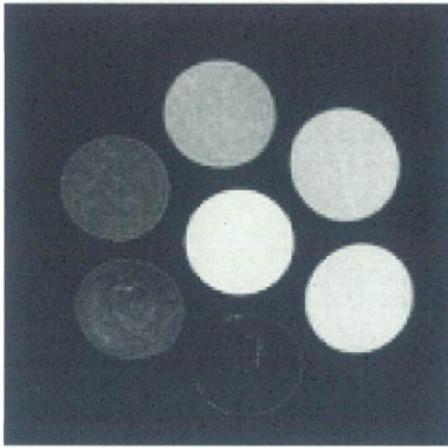
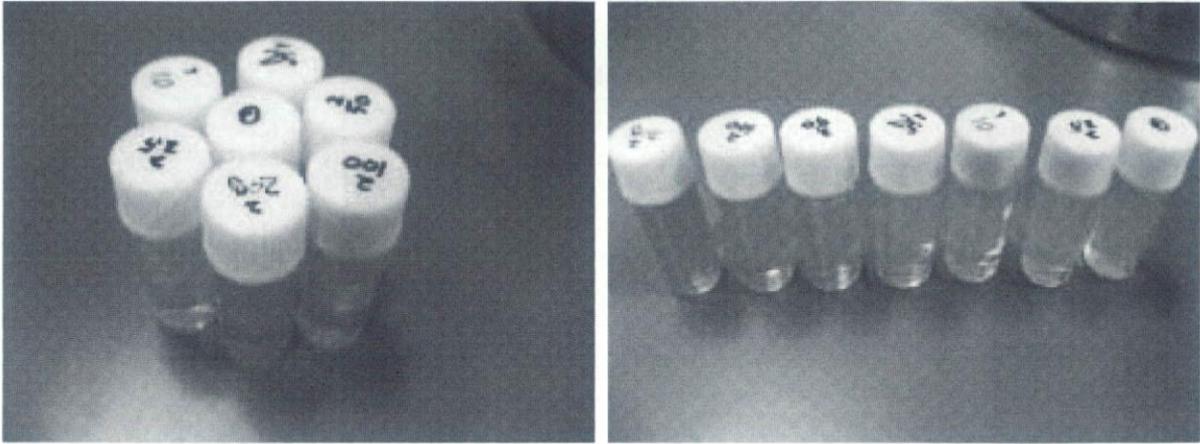


図8-6

図8 投与方法による体内分布への影響の観察結果

(図8-1: 経口投与用無機粒子分散飼料(寒天)、8-2: 経口投与後(TiO_2 : 50 mg / d x 10 d)の蛍光X線分析結果(肺)、8-3: (肝臓)、8-4: (脾臓)、8-5: 肺への単回強制暴露(Pt: 1-2 mg)後の各臓器のICP分析結果(投与直後)、8-6: (投与後1週間))



TE=20 msでの画像

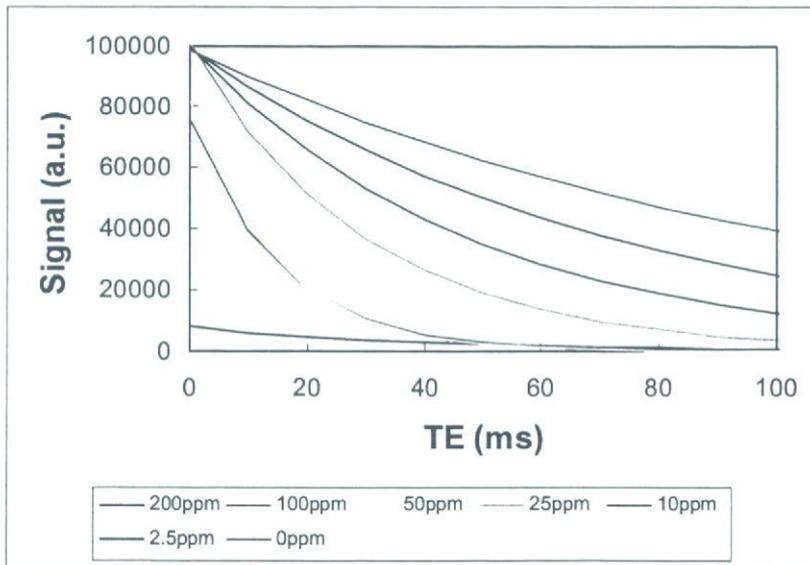


図9 ナノマグネタイトのMRI造影効果の評価

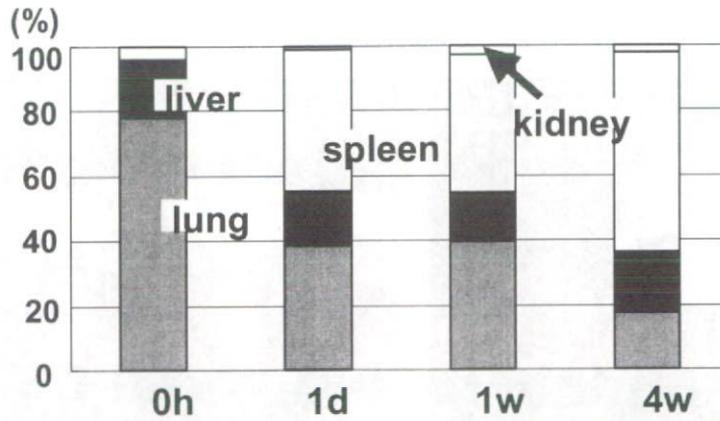
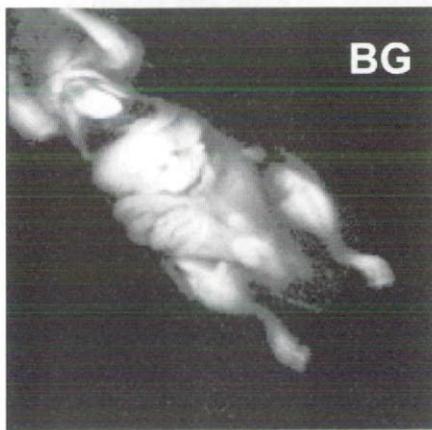
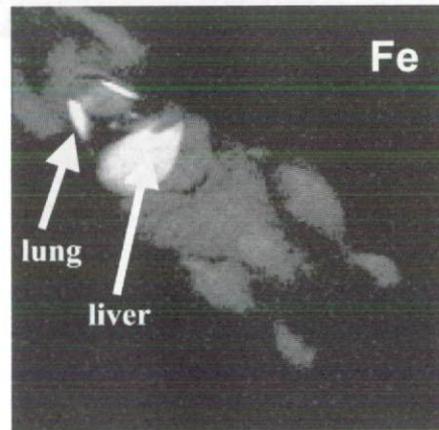


図10-1



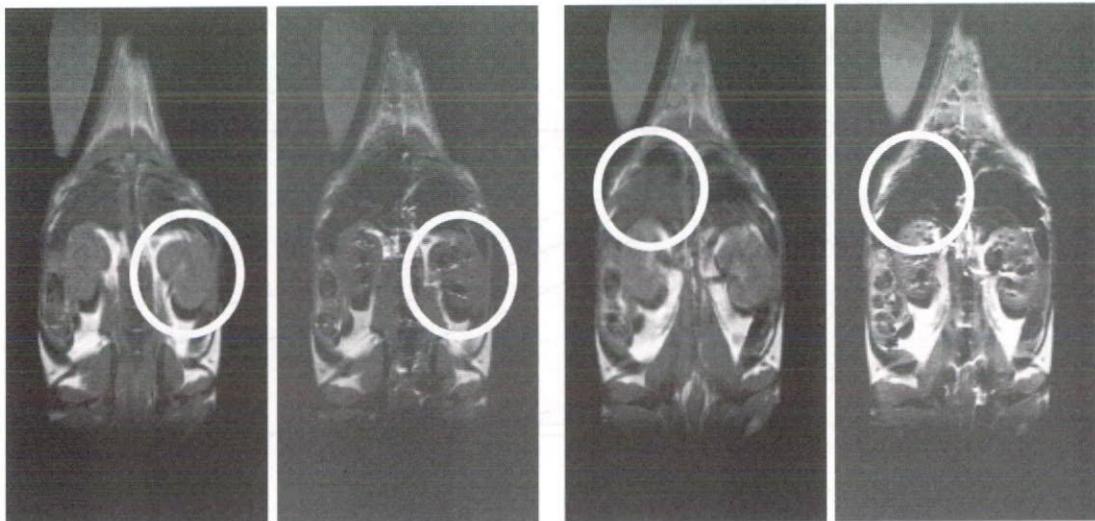
25 mm

図10-2



25 mm

図10-3

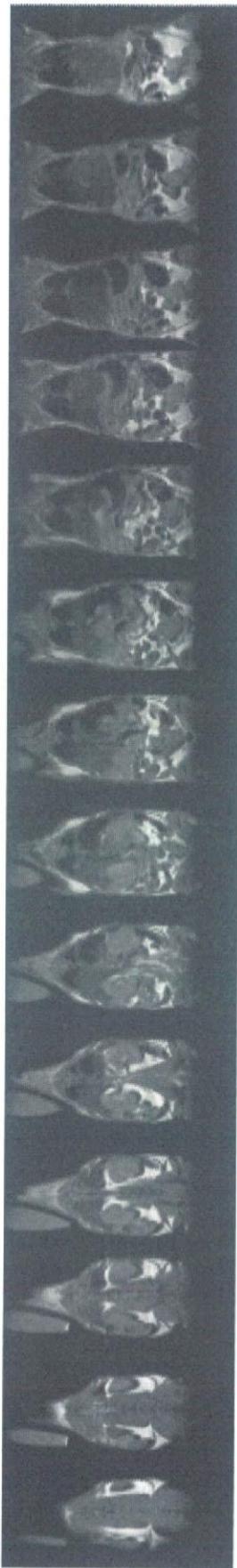


pre-injection after 1 hour pre-injection after 1 hour

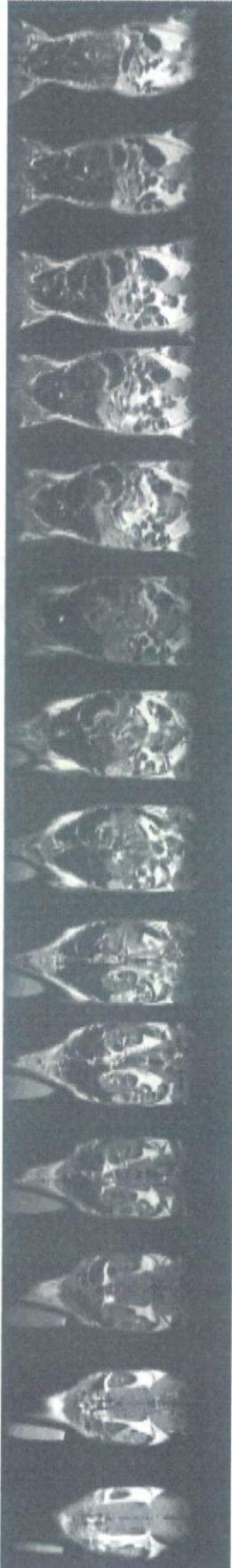
図10-4

図10 ナノマグネタイト投与後の体内分布の観察結果
 (図10-1:各臓器内の経時変化(蛍光X線分析)、10-2:XSAMによる全身の
 マッピング像(background)、10-3:マッピング像(Fe元素)、10-4:MRI観察結果)

pre-injection



0.5 hrs. after injection



1.5 hrs. after injection

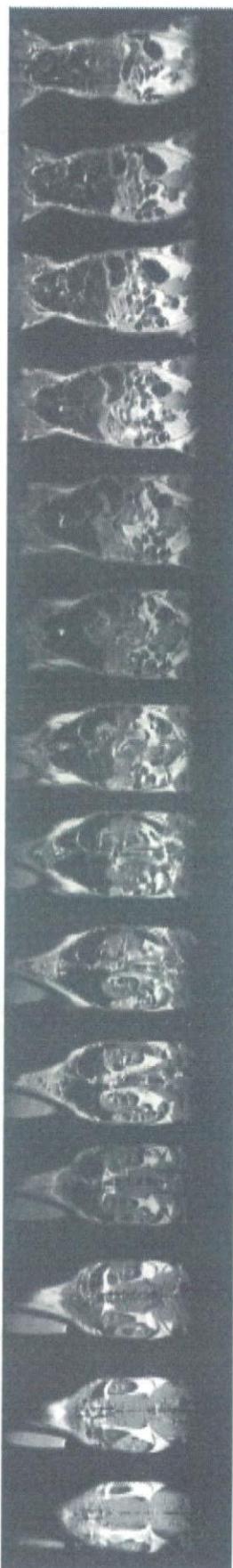


図11 ナノマグネタイト投与後のMRIの経時的変化

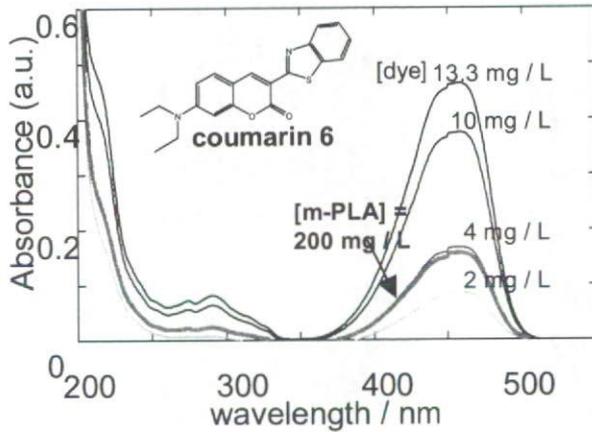


図12-1

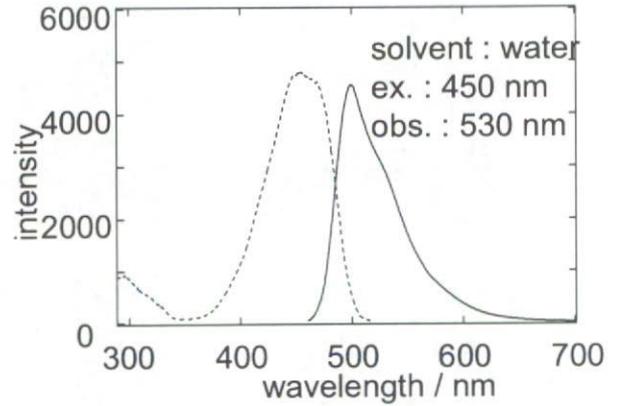


図12-2

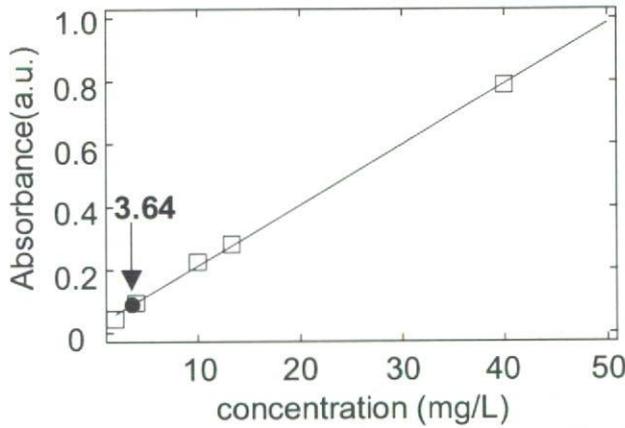


図12-3

□ : coumarin 6
 ● : m-PLA (200 mg/L)
 solvent : ethanol
 obs. : 423 nm

色素含有率

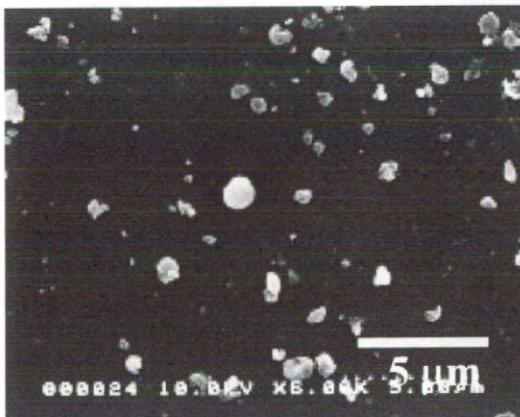
$$\frac{[\text{dye}]}{[\text{polymer}]} \times 100 = 1.8 \%(w/w)$$


図12-4

図12 coumarin 6 をドーブしたポリ乳酸粒子(m-PLA)のキャラクタリゼーション
 (図12-1:m-PLAおよびcoumarin 6のUV-vis. 吸収スペクトル、
 12-2:m-PLAの蛍光・蛍光励起スペクトル、12-3: coumarin 6の吸光度より
 m-PLA中の色素濃度の評価、12-4: m-PLAのSEM像)

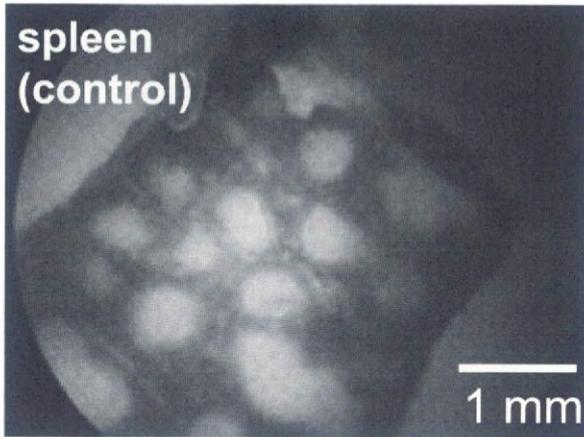


図13-1

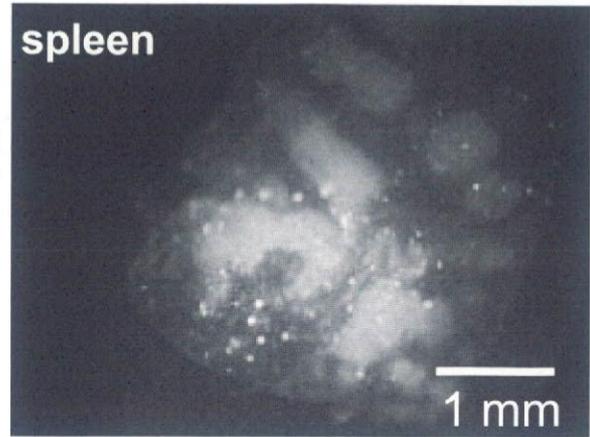


図13-2

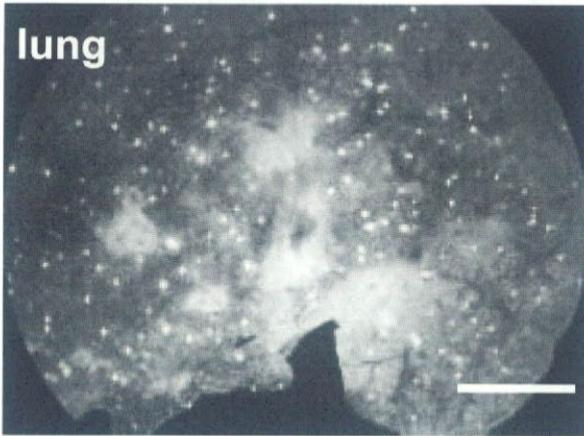


図13-3

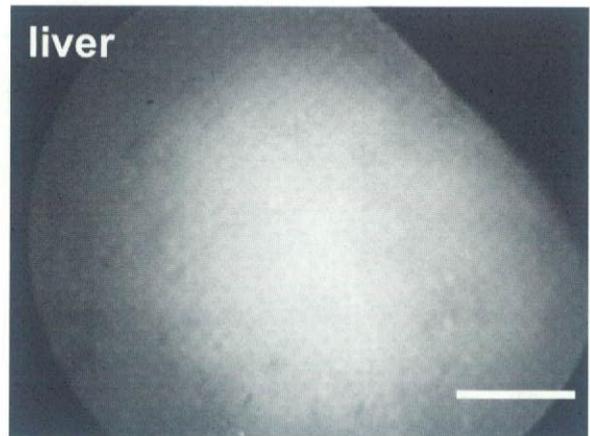


図13-4

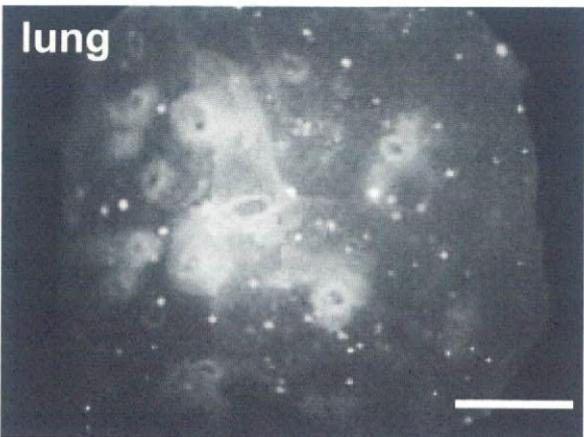


図13-5

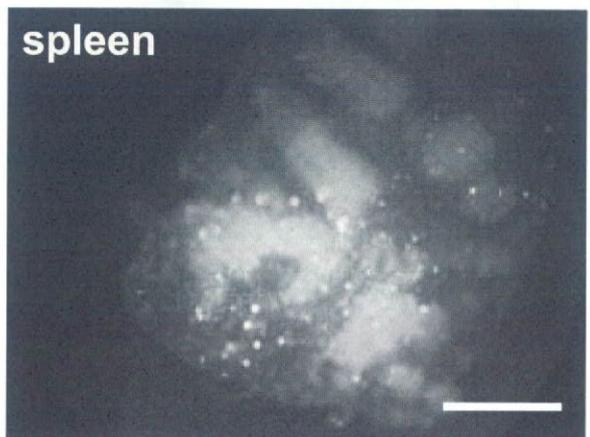


図13-6

図13 m-PLA投与後の各臓器への分布状況(蛍光顕微鏡により観察)
(図13-1:コントロール(脾臓)、13-2:m-PLA投与後一週間(脾臓)、13-3:(肺)、
13-4:(肝臓)、13-5:低濃度m-PLA投与後1日(肺)、13-6:(脾臓))

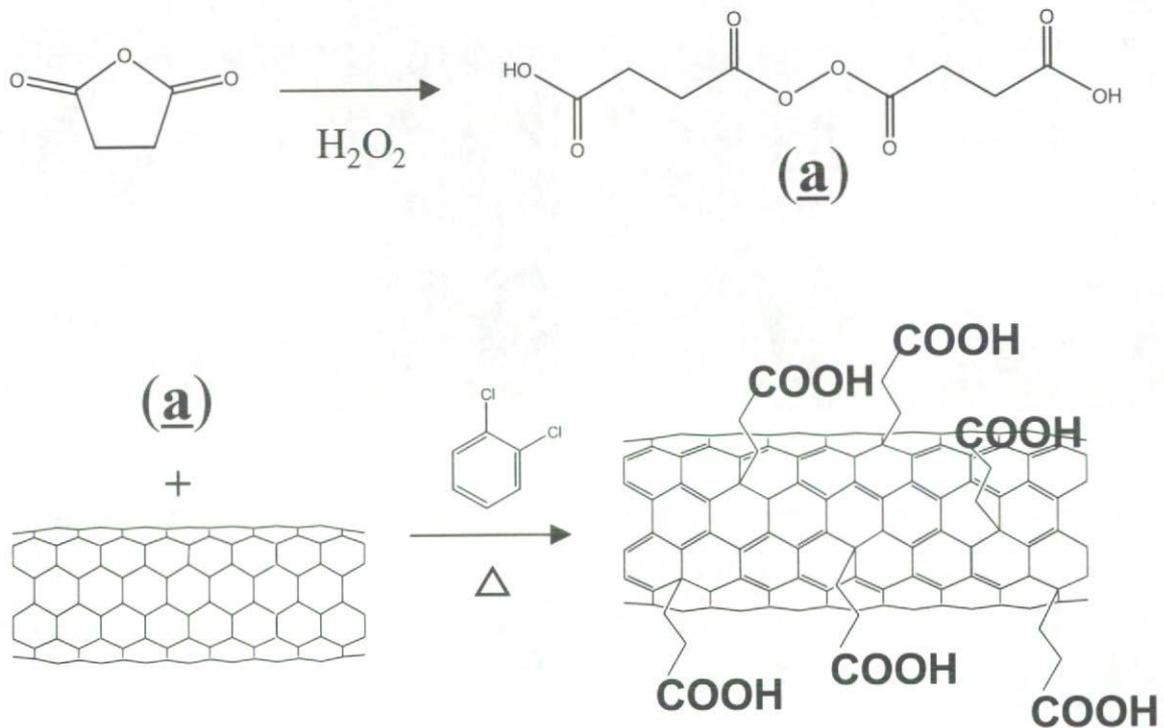
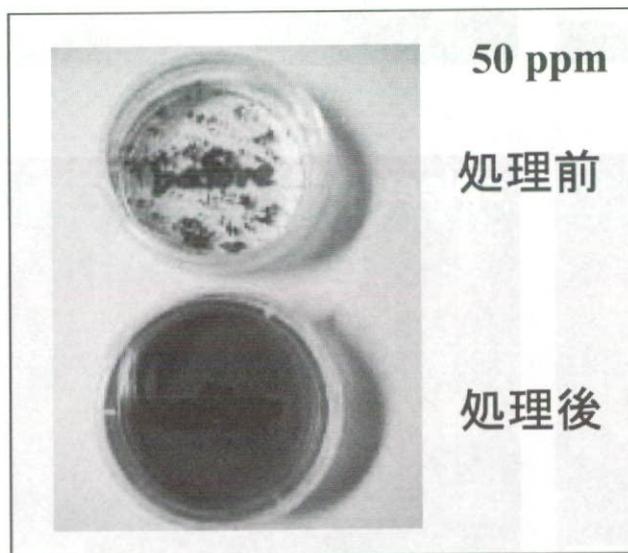


図14-1



親水化処理により
 水中に安定して
 分散された
 (2w、沈殿を生じず)

図14-2

図14 親水性カーボンナノチューブ(CNT-COOH)
 (図14-1:反応スキーム、14-2:水中での分散状態)

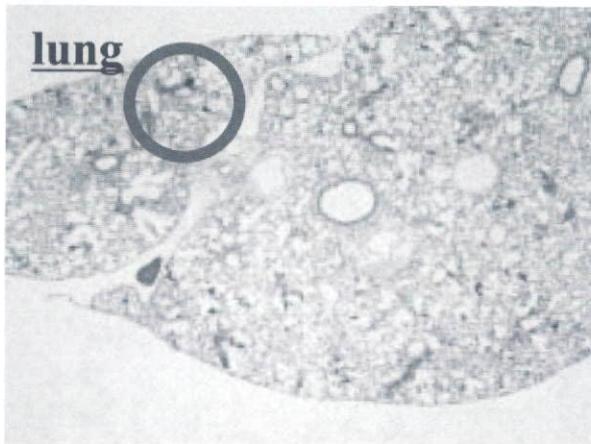


図15-1

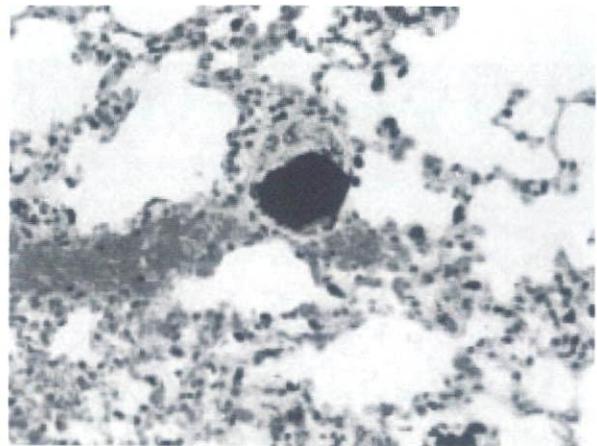


図15-2

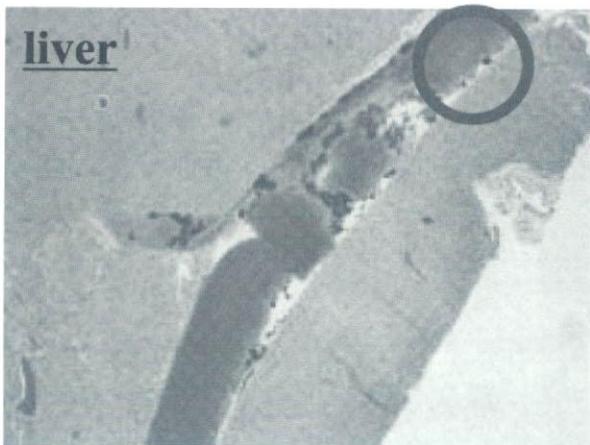


図15-3

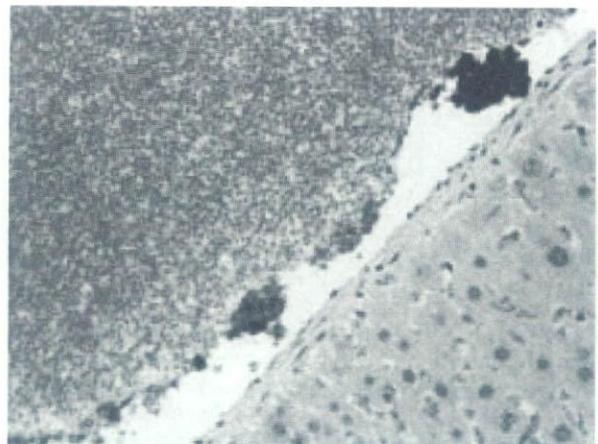


図15-4



図15-5

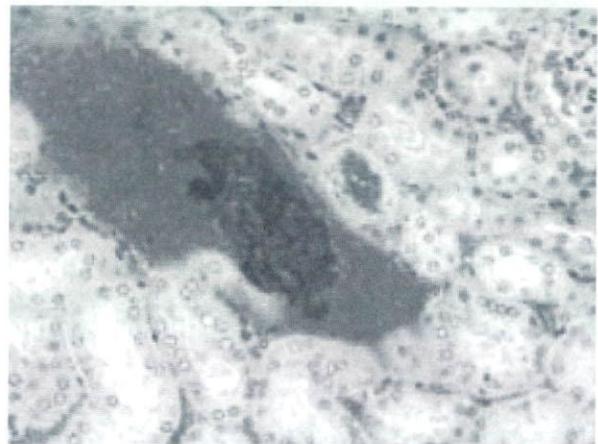


図15-6

図15 CNT-COOH投与後の各臓器への分布状況(投与直後)
 (図15-1:肺・弱拡大(4倍)、15-2:肺・強拡大(40倍)、15-3:肝臓・弱拡大(4倍)、
 15-4:肝臓・強拡大(40倍)、15-5:腎臓・弱拡大(4倍)、15-6:腎臓・強拡大(40倍))

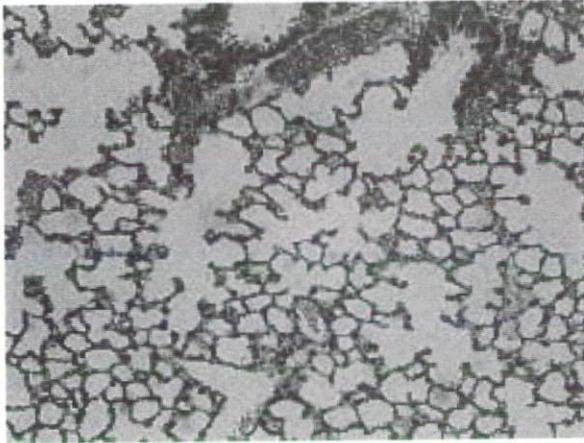


図16-1

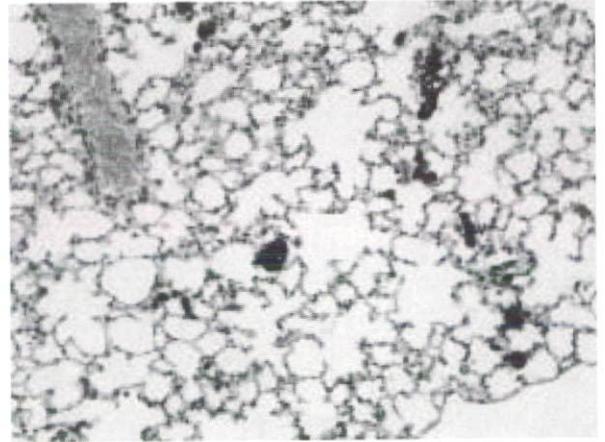


図16-2

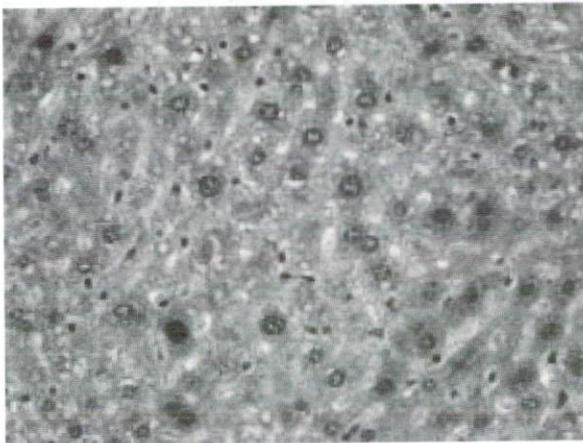


図16-3

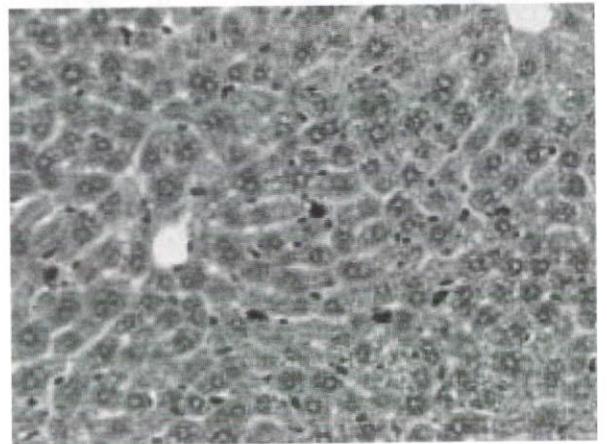


図16-4

図16 CNT-COOH投与後の各臓器への分布状況(一週間後、倍率20倍)
(図16-1:コントロール(肺)、16-2:投与(肺)、16-3:コントロール(肝臓)、
15-4:投与(肝臓))

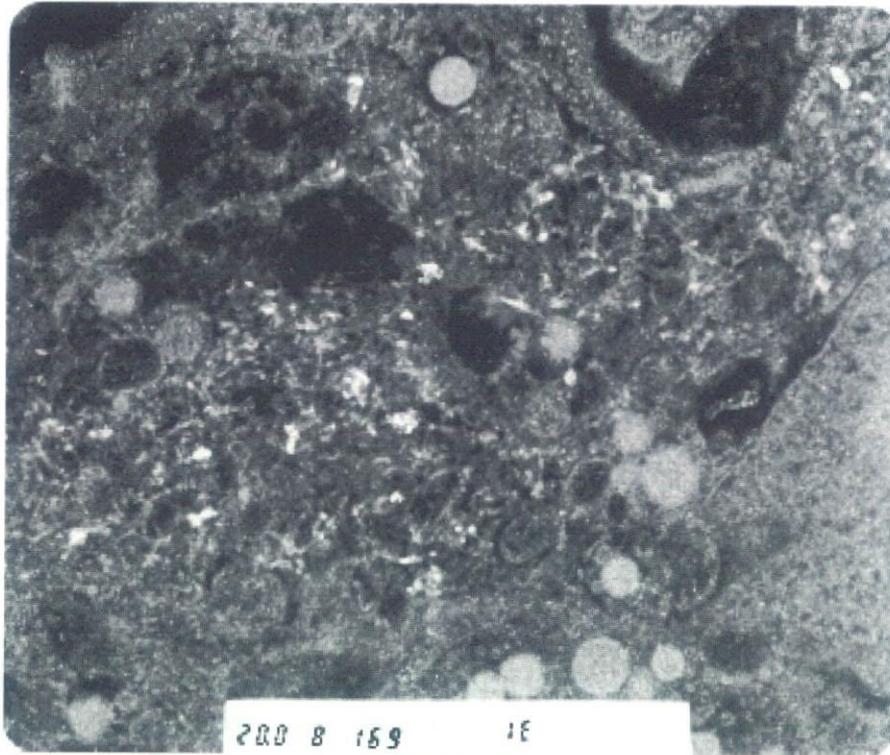


図17-1

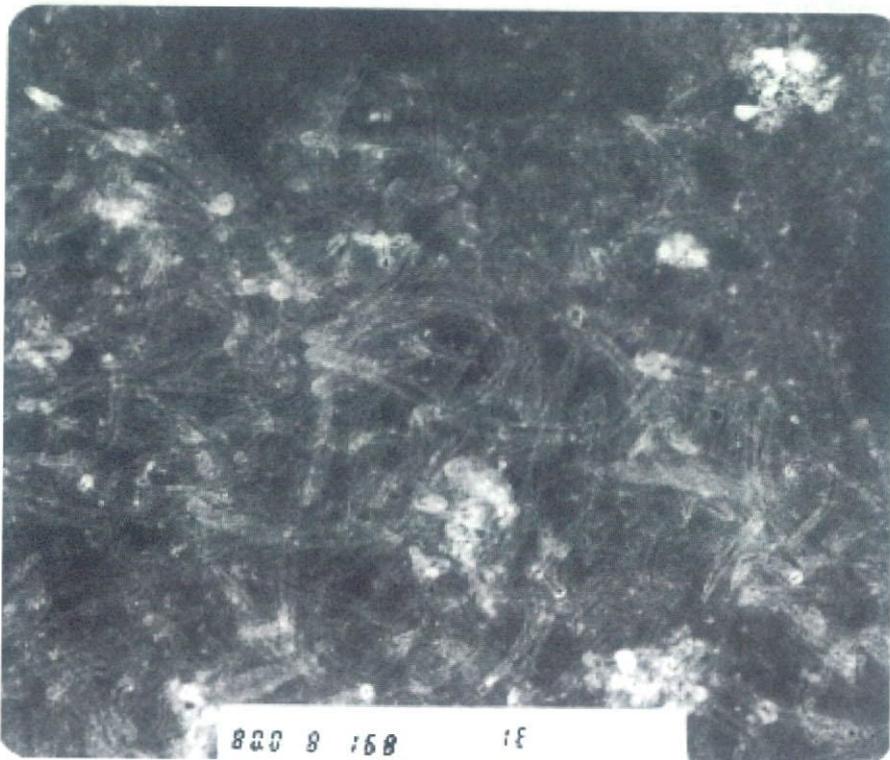


図17-2

図17 CNT-COOH投与直後の肺のTEM像
(図17-1:弱拡大(20,000倍)、17-2:強拡大(80,000倍))

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

生体内ナノ微粒子の高分解能電子顕微鏡観察に関する研究

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	市野瀬英喜	理化学研究所フロンティア研究システム 副ディレクター
研究協力者	坂口紀史	北海道大学エネルギー変換マテリアル 研究センター准教授

研究要旨 本研究においては、ドラッグデリバリーシステム等へのカーボンナノ微粒子のバイオ応用を見据え、ラット皮下にカーボンナノ微粒子を包埋し、一定期間経過後に取り出した生体組織片を観察対象とし、生体内におけるカーボンナノ微粒子の原子構造解析に向けた高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化と、画像処理による構造解析手法について検討した。超高压超高分解能電子顕微鏡を用いた高分解能 TEM 観察を用いることで、生体内に存在するカーボンナノ微粒子の原子構造を観察可能であることが本研究により明示された。同時に、フーリエ変換に基づく画像処理を併用することで、任意の空間周波数を有する周期構造を際立たせ、カーボンナノ微粒子の原子構造解析を推し進めた。

A. 研究目的

近年の急速なナノテクノロジーの進展は新たなリスクを生み出している。ナノマテリアルによって生じうる環境や健康への影響は既に現実的な問題になっているにもかかわらず、その潜在的なリスクについてさえ十分に議論されているとは言い難い。一方で、ナノテクノロジーを駆使したナノマテリアルやそれらを応用したナノエレクトロデバイスの開発は今後の日本国の浮沈を懸けて取り組むべき最重要課題であることは疑う余地も無く、世界をリードするための開発競争は熾烈を極めつつある。そのような理由から、ナノマテリアルが使用された製品が市販されるようになった現在においても、健康へのリスクについては十分に把握できていないのが現状である。

他方、ドラッグデリバリーシステム (DDS: Drug Delivery System) をはじめとするバイオテクノロジーとナノテクノロジーの融合は、すでにそれなりの

期間研究が継続されている。例えば、ナノパーティクルの中には、既に製品化され使用されているものがある一方、その応用にあたって安全性については手が回りかねているのが実状である。無論、バイオナノテクノロジーを駆使した研究開発を増進させることと、安全性や健康へのリスクマネジメントを両立させることが必要であることは言うまでも無い。ナノマテリアルテクノロジーの分野では、原子構造、電子構造、物性、を一体のものとして捉えることによって、二つの作業のいわば一体化に関する試みが既に行われつつあるが、バイオナノテクノロジーにおいても、対象を限定すればおそらくこのことは可能である。特に、生体とバイオマテリアルとが近接しないしは接触した状態を生体とバイオマテリアル間の異相界面問題としてとらえれば、界面における原子構造、電子構造、物性、の三者関連の問題に還元することが出来るはずである。原子構造・電子構造・物性関連については、生体のみの系では原子配置の

複雑さといったありようがマテリアル系とはかなりかけ離れている。純粋な生体系に比べれば、上述の界面問題に系を帰着させれば、前途はかなりの見通しがきくことになる。このような手法を生かせば、①ナノマテリアルの生体反応性に関する学術的・科学的データの整備、ナノテクノロジーのメリットとデメリットの両面からの総合的把握検討、②生体/ナノマテリアル界面に於ける物質移動と反応性の評価並びに安全性基準の提起、③これに立脚したナノバイオマテリアルの開発、などは十分に守備範囲となる。

そこで本研究では、カーボンナノチューブやナノファイバーなどの炭素系ナノ微粒子に興味の対象を絞り込み、生体とナノマテリアル反応の機構の共通項目と個別項目とに分けて原子・電子論的に解明し、ナノマテリアルのバイオ医用応用に求められる一定の指針得ることが最終的な目的である。その初期段階として、生体内におけるカーボンナノチューブ・ナノファイバーの高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化と画像処理に基づく原子構造解析手法の確立を試みた。

B. 研究方法

ラット皮下にナノ微粒子(カーボンナノチューブ、カーボンナノファイバー)を包埋し、一定期間経過後に生体組織片を取り出した(還流固定、オスミウム・酢酸鉛二重染色)。生体組織片を脱水、浸透後にエポキシ樹脂へ包埋・重合した後、ミクロトームにより厚さ80nm以下に薄片化することでTEM観察用試料を作製した。生体組織片の高分解能観察に先立ち、低加速電子顕微鏡(日立H-700、加速電圧75kV)を用いて細胞内におけるナノ微粒子の凝集形態をTEM観察した。その後、超高圧超高分解能電子顕微鏡(日本電子JEM-ARM-1300、加速電圧1250kV、点分解能0.12nm)を用いて、生体組織片内に包埋されたナノ微粒子の高分解能TEM観察を行った。尚、TEM観察は室温にて行い、記録には通常のTEM用フィルムを用いた。さらに、得られた高分解能像をコンピュータ上でフーリエ変換した後、種々の空間周波数を有する環状フィルターを用いて特定の波数領域のみをマスクした後、逆フーリエ変換してフィルター像を得た。

C. 研究結果

初めに、カーボンナノチューブをラット皮下に包埋し、1年間経過後に取り出した生体組織片の低加速TEMによる観察結果を図1にしめす。低加速TEMを用いることで、生体細胞組織が明瞭に観察されるときともに、包埋されたカーボンナノチューブが凝集体として存在していることも明らかである。図2には、超高圧TEMにより組織観察(図2-1)ならびに高分解能TEM観察(図2-2、図2-3)した結果をまとめて示した。微細組織観察からは、低加速TEMによる観察結果と同様にカーボンナノチューブの凝集が確認される。さらに、高分解能TEM観察結果を見れば、カーボンナノチューブの層状構造に対応した格子縞が明瞭に観察されている。これは、カーボンナノチューブは生体内においてもその層状構造が維持されることを示している。但し、層状構造に対応した格子縞がやや不明瞭になっている部分も見受けられる。これは、ナノチューブの原子構造に若干の乱れが生じていることに起因すると思われる。

D. 考察

ラット皮下に一定期間包埋後のカーボンナノチューブでは、その層状構造は維持されていたが、若干の原子構造の乱れが存在することが高分解能TEM観察より予想される。そこで、フーリエ変換に基づく画像処理により、カーボンナノチューブの結晶性について考察する。図3は、1年包埋後のカーボンナノチューブの格子像とフーリエ変換像(パワースペクトラム)である。格子像では、ナノチューブの層状構造が観察される領域が確認出来るとともに、パワースペクトラムにはナノチューブの層間隔に対応した位置にスポットが現れている。また、スポットは若干ディフューズになっていることから、ナノチューブは若干構造が乱れていることが分かる。図4には、パワースペクトラムを円形マスクによりフィルタリングし、逆フーリエ変換して得られたフィルター像をフィルタリング後のパワースペクトラムとともに示した。フィルタリングにより、短波長領域のノイズがカットされるため、若干の像質向上が見られるが、これからナノチューブの結晶性を判断することは難しい。また、図5は環状のマスクフィルターを用いた結果である。これより、バックグラ

ウンドとなる非晶質生体組織の影響が軽減されることによりナノチューブの層状構造が明瞭化され、さらに、ナノチューブが部分的に分断化した領域も観察可能となった。さらに、環状マスクフィルターを用いて、ナノチューブの層間隔に対応した波数空間のみをフィルタリングした結果を図6に示す。この場合、完全なナノチューブ層間隔を有する領域は明瞭なコントラストで与えられるが、一方、層間隔に乱れが生じた領域では著しくコントラストが低下する。比較的直線状のナノチューブは一様に白いコントラストで認識されるが、湾曲したナノチューブではコントラストが低下するとともに部分的に分断化されている様子が確認出来る。これは、湾曲したナノチューブでは原子構造が大きく乱れ、局所的には層状構造が破壊されていることを示唆している。この様に、フーリエ変換に基づくフィルター像から、ナノチューブの結晶性を視覚的に評価可能であることが明らかとなった。

E. 結論

本研究においては、カーボンナノチューブのバイオ応用を見据え、ラット皮下にカーボンナノチューブを包埋し、一定期間経過後に取り出した生体組織片を観察対象とし、生体内におけるカーボンナノチューブの構造解析に向けた高分解能電子顕微鏡観察技法の最適化と、画像処理による原子構造解析について検討した。超高压超高分解能電子顕微鏡を用いた高分解能 TEM 観察より、生体内に存在するナノチューブの原子構造が明瞭に観察可能であることが示された。さらに、フーリエ変換に基づく画像処理を行うことで、カーボンナノチューブの層状構造が明瞭に示されるのみならず、適当な波数空間領域のみを選定することでナノチューブの結晶性評価が視覚的に可能であることが見出された。

F. 研究発表

1. 論文発表

無し

2. 学会発表

無し

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し

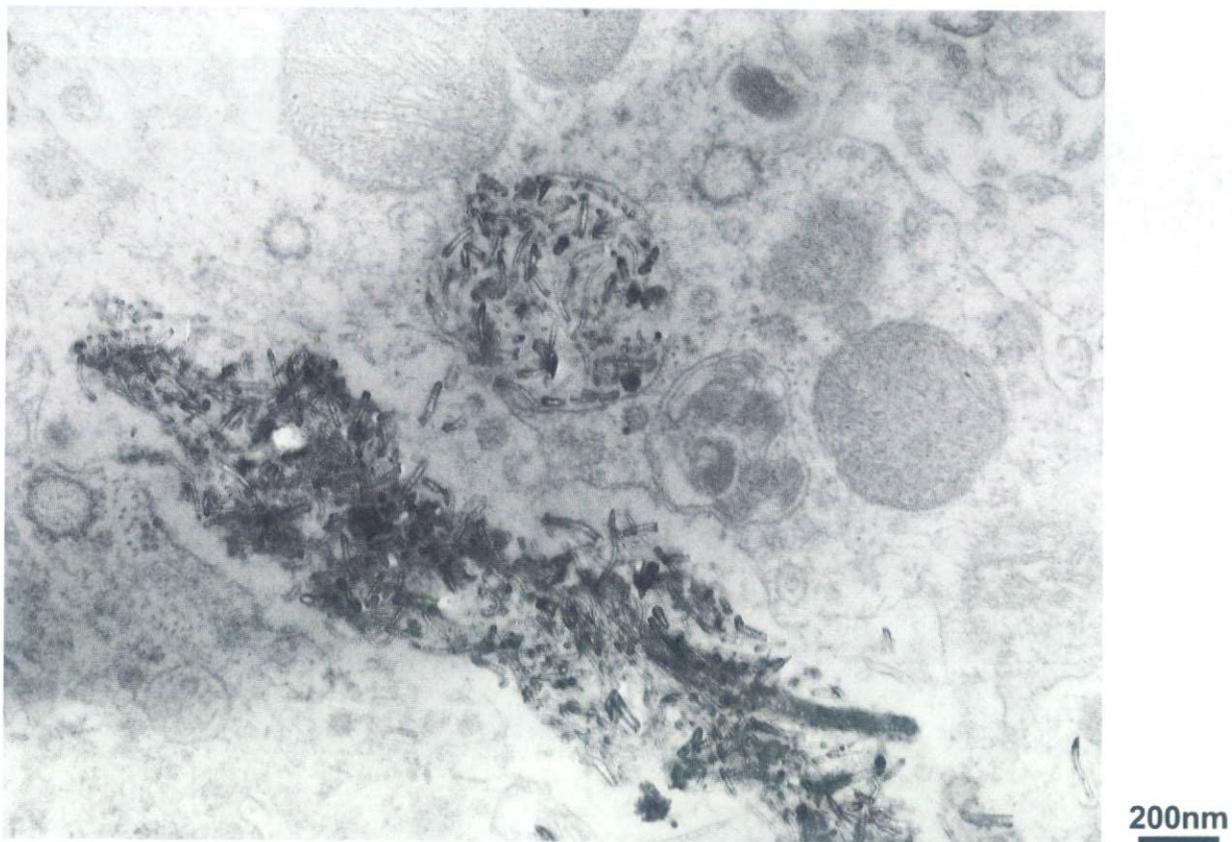


図1 ラット皮下に包埋一年間経過後のナノチューブ分散状況（低加速 TEM）。

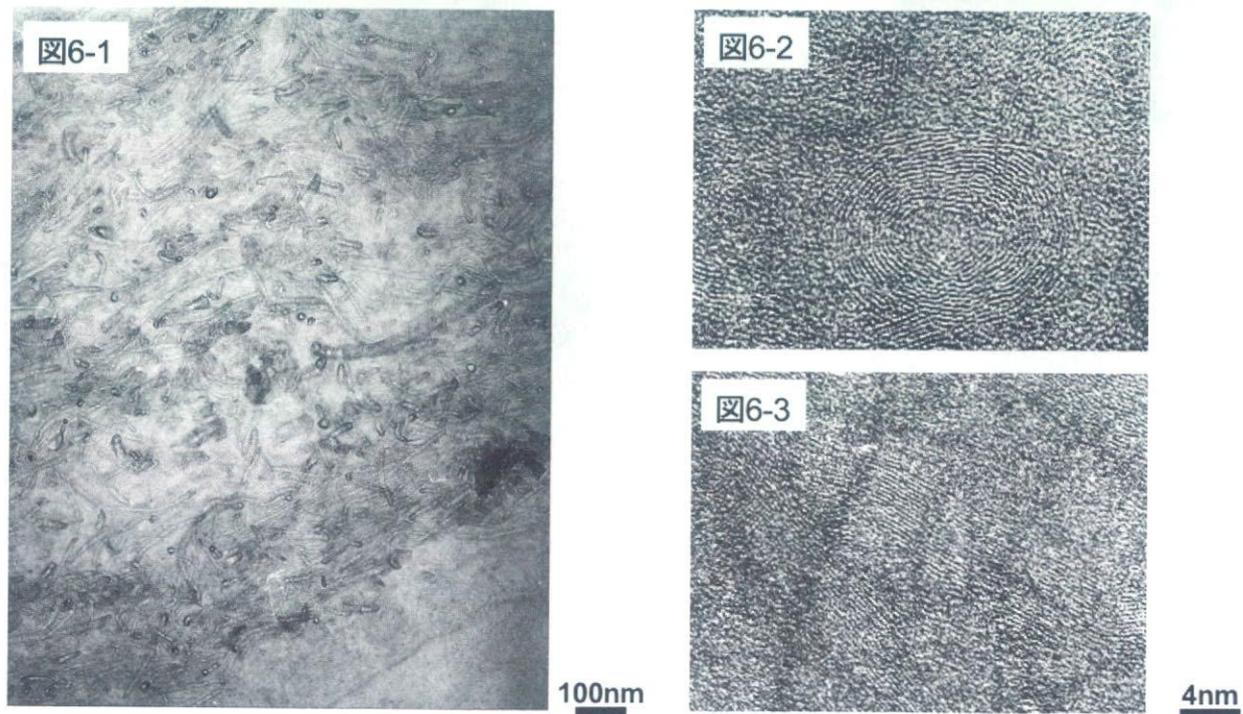


図2 ラット皮下に包埋一年間経過後のナノチューブの原子構造（超高压 TEM）。
 (6-1：明視野像、6-2、6-3：高分解能 TEM 像)

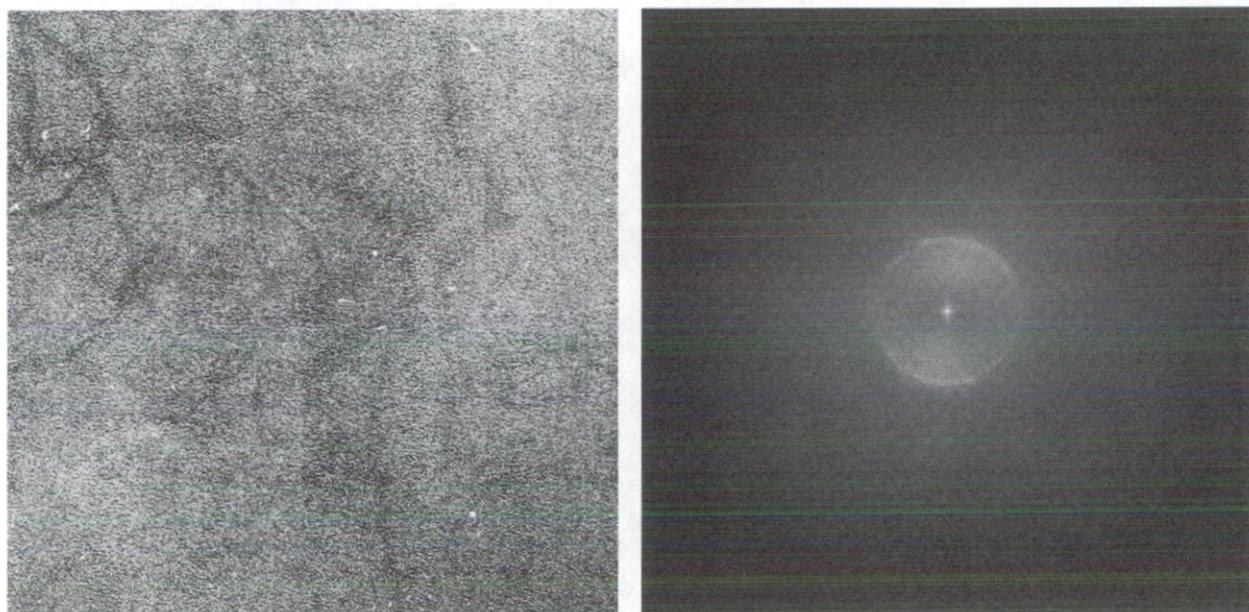


図3 包埋一年間経過後のナノチューブの格子像とパワースペクトラム。

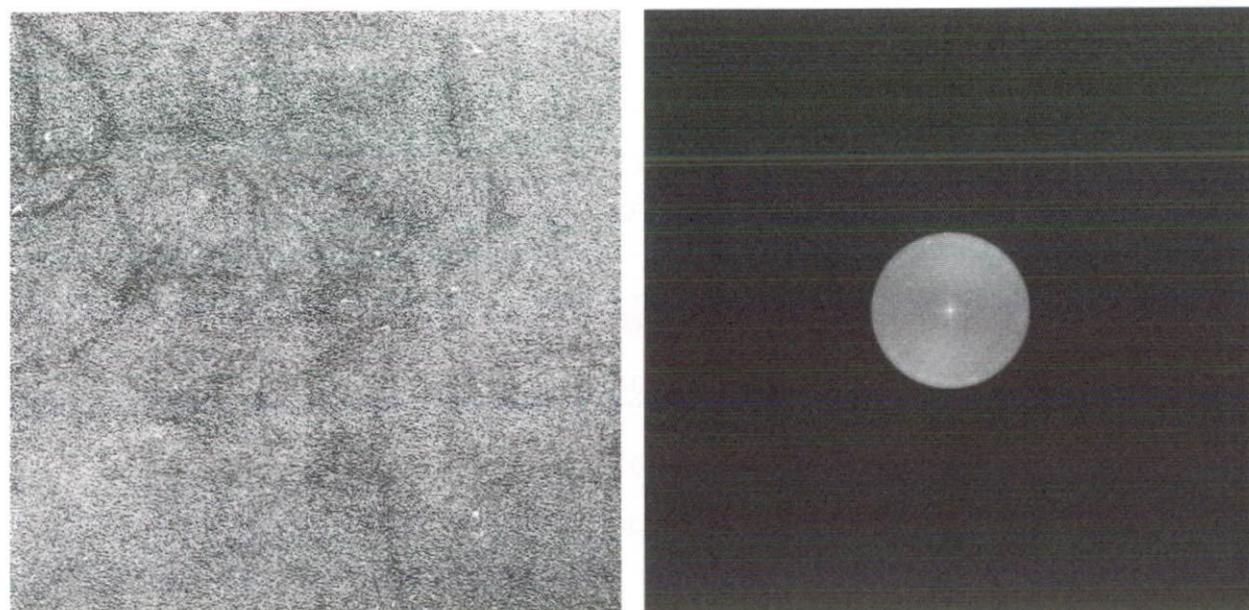


図4 包埋一年間経過後のナノチューブのFFT フィルター像とパワースペクトラム。

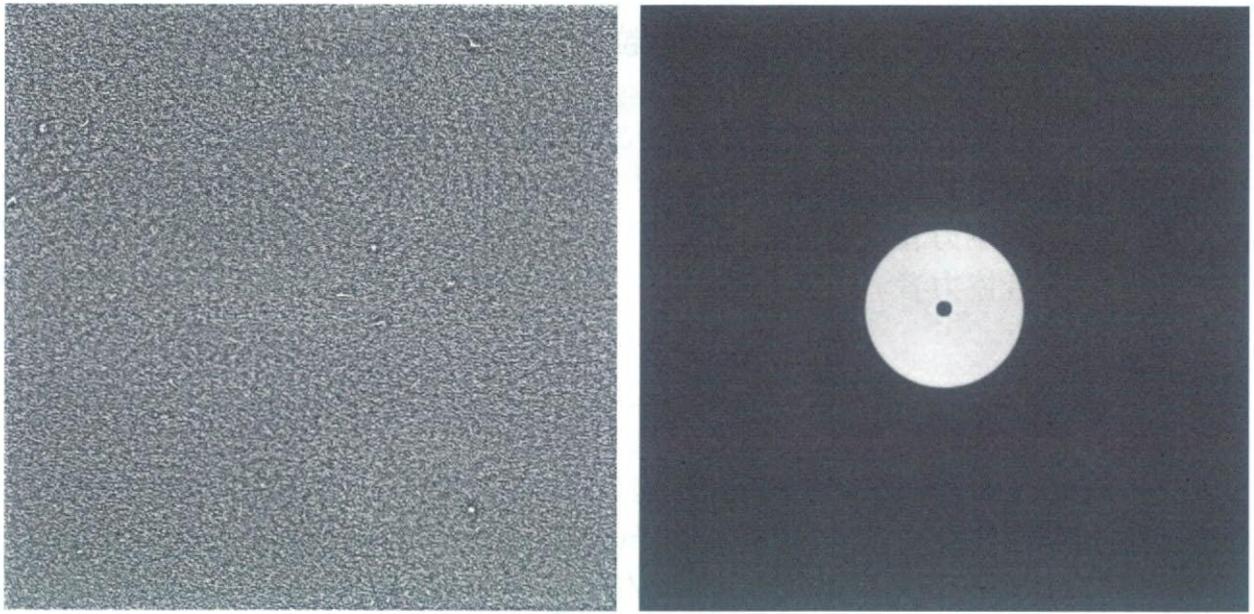


図5 包埋一年間経過後のナノチューブのFFTフィルター像とパワースペクトラム。

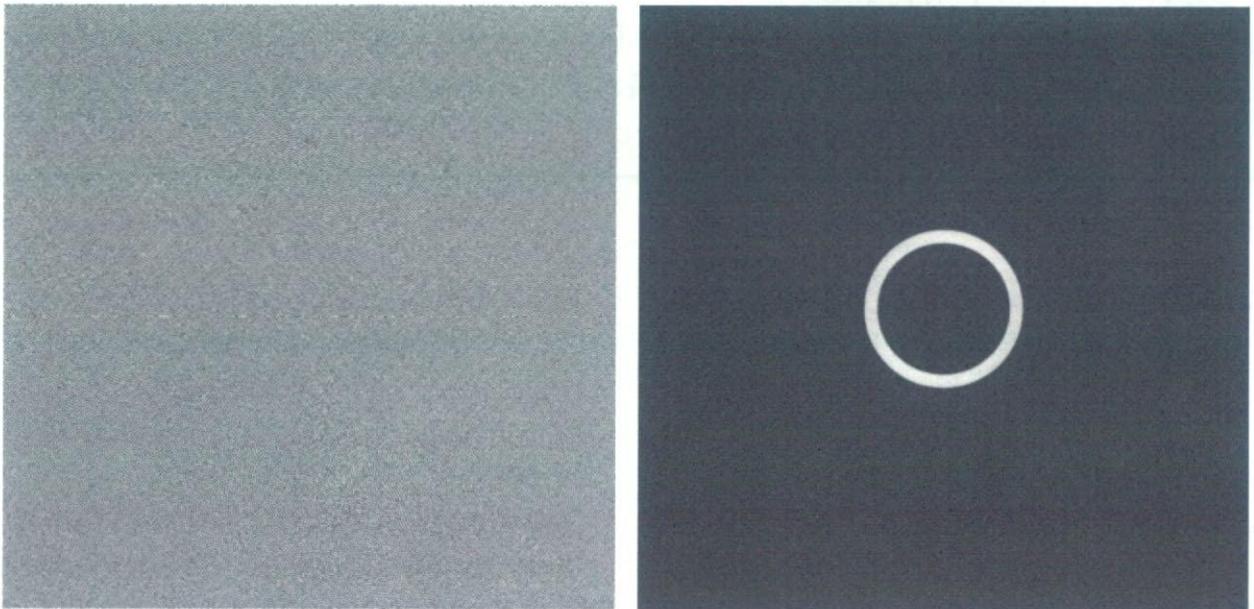


図6 包埋一年間経過後のナノチューブのFFTフィルター像とパワースペクトラム。

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

ゾウリムシによるナノ微粒子の細胞毒性試験に関する研究

主任研究者	亘理文夫	北海道大学歯学研究科教授
研究協力者	芳賀信幸	石巻専修大学工学部生物生産工学科教授
研究協力者	羽田紘一	石巻専修大学工学部情報電子工学科教授
研究協力者	阿部大基	石巻専修大学理学研究科生命科学専攻大学院生

研究要旨 本研究においては、単細胞真核生物であるゾウリムシを用いて、様々な細胞機能が時間的にも空間的にも同時に発現しているというこの生物の特徴を生かした細胞毒性試験を検討し、任意のナノ微粒子の細胞毒性と細胞親和性を短期間で迅速に評価する判定方法を開発した。用いたナノマテリアルは Ag 粒子、TiO₂ 粒子および CoFe₂O₄ 粒子の 3 種類である。Ag 粒子を用いた実験により、ゾウリムシの遊泳行動を指標とすることによって、Ag 粒子からは継続的に致死因子が生成しており、この因子は可溶性で平均孔径 5 nm の透析膜を通過する性質があることが明らかになった。致死因子の効果は速効性で、細胞表面から作用していることが示唆された。TiO₂ および CoFe₂O₄ 粒子を用いた実験では、分裂期および分裂停止期の細胞に対する毒性は全く認められなかったが、有性生殖過程にあるゾウリムシに対しては、新世代の核形成に対して両ナノ粒子に為害性が認められた。本研究によって、ゾウリムシは哺乳類培養細胞系では検定することが困難な神経細胞系および生殖細胞系の細胞機能に対する毒性を迅速に判定できることが明らかになった。

A. 研究目的

細胞毒性は偶発的な出来事によって認識されることが多いが、その実体と毒性発現のメカニズムはあらかじめ適切にデザインされた実験系によってのみ的確に把握されるものである。また、人体および生態系に対する安全基準値の設定は、毒性の種類や強度の判定において、複数の細胞種を用いた多面的な検証実験によってはじめて可能となる。

我々は単細胞真核生物であるゾウリムシ (*Paramecium caudatum*) が時間的および空間的に様々な細胞機能を同時に発現している点に注目し、哺乳類培養細胞系では検定することが困難な細胞機能に対するナノマテリアルの細胞毒性を評価するシステムの構築を目指してきた。

昨年度までは主としてカーボンナノチューブを用いて、分裂期と分裂停止期の細胞に対する毒性について検討し、それぞれの状態のゾウリムシに対する毒性発現の限界分散量を設定し、安全性を保障する条件を明らかにした（文献1）。

本年度は Ag 粒子、TiO₂ および CoFe₂O₄ 粒子を用いて、哺乳類の神経細胞に相当する興奮性細胞膜の機能と生殖細胞の減数分裂期に相当する接合過程に対する影響について検討し、安全基準値を設定することを目的とした。

少子高齢化時代をむかえた我が国にとって、ナノテクノロジーは極めて重要な産業であるとの認識のもとに、IT 産業はもとより、医療、食品、健康、ロボット産業など、ナノマテリアルの開発と製造は急

速に展開されている。

しかるに、既に製品化されているナノマテリアルから試行錯誤的に製造され、試験的に使われているナノマテリアルまでを含めて、人体および生態系に対する安全評価に関しては十分な認識がなされているとはいえず、さらに安全に関する社会通念の形成努力および製造、管理、使用等に関する法的な規制に関しても十分でないのが現状である。

ゾウリムシは約5億4千万年前の真核生物の大出現（真核生物のビッグバン仮説）の際に、哺乳類や被子植物などとともに出現したとされる。この生物は、人間の食品を用いて容易に培養することができ、細胞機能が非常に安定して発現し、人体に対する毒性が全く無いなどの特徴を持つため、遺伝学をはじめ、細胞生物学、電気生理学、生態学などの諸分野において長い研究の歴史を持ち、報告された知見の蓄積も豊かである。

我々はゾウリムシの細胞機能のうちで、遊泳行動と有性生殖機能を特に重要な評価項目と考え、細胞膜の興奮性と繊毛運動をナノマテリアルの毒性を検出するセンサーとして活用することを目的とした。また、有性生殖の一形態である接合過程にナノマテリアルを作用させることによって、減数分裂と新世代の核形成に対する影響を評価する方法についても検討した。

本研究では、抗菌作用が報告されているAg粒子とガン細胞などに対する温熱治療の可能性が注目されている磁性ナノ粒子 CoFe_2O_4 および対照実験として安全性が高いと評価されている TiO_2 を用いて細胞毒性試験を行った。また、基礎的な情報収集の一環として、接合過程におけるヒストンmRNAの細胞間輸送および新世代核でのヒストン分子の共同利用現象や低温耐性に関わる細胞質因子の存在を証明した研究例についても合わせて考察し、ゾウリムシの毒性試験における可能性について将来的な展望を概観した。

B. 研究方法

ゾウリムシはレタスジュース培養法によって培養した。1.25%になるようにレタスジュース（サラダ菜を用いて作製）をK-DS（0.6 mM KH_2PO_4 , 1 mM Na_2HPO_4 , 2 mM クエン酸ナトリウム, 1.5 mM CaCl_2 , pH 7.0）に溶かした溶液にバクテリア（*Klebsiella*

pneumoniae）を接種し、25°Cで一晩静置培養したものを使用した。ナノマテリアルの細胞毒性評価は10細胞を一組とする培養系で行った。

Ag粒子は真空蒸着装置に希ガスを導入するためのガス導入機構とその圧力制御および圧力モニター機構を装着することによって、不活性ガス雰囲気下でAg金属塊を加熱蒸発し、形成された気相から固化させる「希ガス中蒸発法」によって作製した。毒性試験に用いたAg粒子は平均粒径が17、21、28 nmのもので、粒径はX線回折のライン幅から算出した。

ナノマテリアルの透析処理は粒子分散液を平均孔径5オングストロームの透析チューブを用い、蒸留脱イオン水に対して13および24°Cで24時間行った。また、光触媒効果を検討する際には、遮光した容器を用いた。

Ag粒子分散液の透析によって生じた透析外液のスーパーオキシドアニオン（ O_2^- など）の検定は、Superoxide Anion Assay Kit (SIGMA)によってXanthine / Xanthine Oxidaseをpositive controlとして行った。

透析外液中のAgイオンの定量は東北緑化環境保全（株）に発注し、誘導結合プラズマ発光分光分析装置（ICP-AES）によって行った。

C. 研究結果

本研究で確立されたゾウリムシを用いた細胞毒性試験のスタンダード検定手順を図1に示した。

Ag粒子分散液中での遊泳行動と細胞形態の変化を図2-1に示した。ゾウリムシを分散液中に入れると、まず繊毛運動が逆転する逃避反応が見られた（回転・方向転換）。この反応はAg粒子の粒径が大きくなるにつれて長くなり、結果的に細胞死までの時間も延長した。一方逃避反応に続く形態的变化は全てのサイズの粒子において共通のパターンを示しながら同じような時間経過の後に細胞死を迎えた（変形・後退遊泳・死亡）。逃避反応は、Ag粒子由来の致死因子が細胞膜の外側から作用し、膜電位の脱分極を誘発し、その結果生じた膜電位依存性カルシウムチャネルの活性化を介して細胞内カルシウムイオンの上昇によるものであると考えられる。その後の長時間に及ぶ繊毛運動の逆転反応は細胞内カルシウムイオンの濃度が高いレベルで維持された状態を反

映しているものと考えられる。従って、カルシウムイオンのポンピングアウト機構においても異常が生じている可能性がある。

Ag粒子分散液中で死亡した細胞の形態変化を図2-2に示した。コントロール細胞に対して、Ag粒子分散液中で死亡した細胞は長軸が短縮し、細胞尾部には著しい縮小化が見られる。このような形態変化はどのサイズのAg粒子においても、また、透析外液中で死亡した細胞においても共通に見られた。

Ag粒子平均粒径17nmの生存曲線を図3-1に示した。各実験群のすべての細胞が死亡するまでの時間は分散度に依存して短くなった。次に、致死作用に対するサイズ効果を見るために分散度を10 μ g/mlに調製した3種類の粒子で比較した(図3-2)。60分間の暴露実験では致死作用は粒子サイズに依存することが明らかになった。しかし、24時間の長時間暴露実験では、どのサイズの分散液においても生存した細胞は無かった。

Ag粒子分散液(21nm, 50 μ g/ml)を蒸留脱イオン水に対して透析した時の透析外液中での生存曲線を図3-1に示した。透析処理は24時間ごとに透析外液を交換しながら13日間連続で行った。グラフには最初の24時間処理(1日目)、7日後(7日目)および13日後(13日目)とコントロールとしてAg粒子分散液(17nm, 50 μ g/ml)を示した。すべての実験群で5分以内に細胞死が確認された。従って、致死因子はAg粒子分散液から連続的に生成され、透析膜を通過でき、長時間にわたって水溶液中で安定に存在することが示唆された。

ゾウリムシを用いたバイオアッセイでは、Ag粒子分散液から生成される致死因子は13日間の連続透析処理によっても継続的に検出されたことから、次にAgイオンの関与について検討した。誘導結合プラズマ発光分光分析(ICP-AES)によって透析外液中のAgイオン量を測定した結果、数十 μ g/LのレベルでAgイオンが検出された(表1)。この測定結果は測定操作上のアーテファクトでは考えられないほどの高いレベルであるため、Ag粒子から生成されたイオンである可能性が極めて高いと考えられる。

透析外液中のスーパーオキシドアニオン(O_2^- など)を、Superoxide Anion Assay Kit(SIGMA)によって測定した結果、24時間の透析処理による透析外液中からはスーパーオキシドアニオンに由来するシグ

ナルは検出されなかった。

ガン細胞などに対する温熱治療の可能性が注目されている磁性ナノ粒子 $CoFe_2O_4$ と安全性が高いと評価されている TiO_2 を用いて有性生殖過程に対する細胞毒性試験を行った。表2に示したように、子孫の稔性が高い系においては、為害性はまったく認められなかった。しかし、稔性の低い系においては、両粒子ともに新世代の細胞の核形成において、阻害効果が認められた。阻害効果は $CoFe_2O_4$ の方が大きかった。

D. 考察

Ag粒子分散液はゾウリムシに対して速効性の強い毒性を示した。ICP-AESによる分析の結果、Agイオンが致死因子である可能性が強く示唆された。細胞行動学および電気生理学的知見をもとに致死因子の作用機構を推測すると、致死因子は細胞表面から作用し、膜電位依存性カルシウムチャネルの活性化とそれに続く細胞内カルシウムイオンの上昇によって、繊毛運動の逆転が起こり、やがて細胞変形の誘発を経て細胞死に至るというプロセスが考えられる。

磁性ナノ粒子 $CoFe_2O_4$ と TiO_2 の細胞毒性は、子孫の稔性が低い系での新世代の核形成に対して認められた。我々は先行実験の中で、新世代の核形成には、親世代のヒストン分子とそのmRNAが関与している直接的な証拠を明らかにしている(文献2)。従って、今後 $CoFe_2O_4$ の為害性については、ヒストン分子とそのmRNAの細胞間移動や核輸送との関連で調査することも重要な課題になるのではないかと考える。

本研究では、直接触れなかったが、ゾウリムシは低温(5-10 $^{\circ}C$)の環境下では、生存に必要な細胞質因子が働いている知見を得ている。さらに、低温環境は子孫の稔性に重大な影響を与えることに関する情報も得ているので、有性生殖における新世代の核形成過程もナノ粒子の為害性を評価するための重要なセンサーシステムになるのではないかと考えている。

E. 結論

Ag粒子は様々な細菌細胞に対して増殖を抑制する抗菌作用があることが知られている。しかし、この抗菌作用の化学反応を支える基盤分子や細胞の標

的分子に関しては、まだまったく理解されてはいない。本研究では、Ag粒子からのAgイオンの生成を初めて検出した。また、細胞の標的分子に関しても重要な候補が浮上してきた。我々が確立したゾウリムシのバイオアッセイ系は今後、Ag粒子の抗菌作用における分子メカニズムの解明に大きな貢献をするものと期待される。

また、磁性ナノ粒子の有性生殖における新世代の核形成に対する影響もゾウリムシの系でなければ検証することが困難な問題である。ナノ粒子が有性生殖によって生まれた次世代の細胞機能に与える影響を正当に評価することは人間社会にとっても、また、生態系にとっても極めて重要な課題であると云える。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Y. Takenaka, A. Yanagi, H. Masuda, Y. Mitsui, H. Mizuno and N. Haga. Direct observation of histone H2B-YFP fusion proteins and transport of their mRNA between conjugating *Paramecia*. *Gene*, 395, 108-115 (2007).
2. N. Haga and K. Haneda, *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effect of carbon nanofiberson proliferation and survival, *Jpn. J. Protozool.*, 40 (2) 139-146 (2007).

2. 学会発表

1. N. Haga, Y. Takenaka, A. Yanagi and H. Masuda, Transport of histone H2B-mRNA and sharing use of histone H2B among old and young nuclei in *Paramecium caudatum*. 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Abstracts.p53 (2007).
2. H. Sasaki and N. Haga, Characterization of cold Tolerance cytoplasmic factor in *Paramecium*. 78th Annual Meeting of the Zoological Society of Japan, Abstracts. P54 (2007).
3. N. Haga, A wild stock expressing two different types of syngametic mating types in *Paramecium*. 40th Annual Meeting of Japan Society of Protozoology, Abstracts. P20 (2007).
4. T. Abe and N. Haga, Cytotoxicity test of Ag Particles in *Paramecium*. 40th Annual Meeting of Japan Society of Protozoology, Abstracts. P20 (2007).
5. Y. Takenaka, Y. Mitsui and N. Haga, Genomic integration of DNA microinjected into *Paramecium caudatum*. 40th Annual Meeting of Japan Society of Protozoology, Abstracts. P21 (2007).

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

無し

2. 実用新案取得

無し