

った。

F. 健康危険情報

該当事項無し

G. 研究発表

①論文発表

無し

②学会発表

1. 亀井数正、向 洋平、小島拓記、吉川舞、角田慎一、堤 康央、吉岡靖雄、岡田直貴、中川晋作；化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討；日本薬学会 第 128 年会；横浜；2008 年 3 月

2. 吉岡靖雄；ナノマテリアルの細胞死誘導メカニズムの検討；日本薬学会 第 128 年会(シンポジウム講演)；横浜；2008 年 3 月

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当事項無し

②実用新案登録

該当事項無し

③その他

該当事項無し

I. 研究協力者

衛藤祐介；大阪大学大学院薬学研究科 博士後期課程 3 年

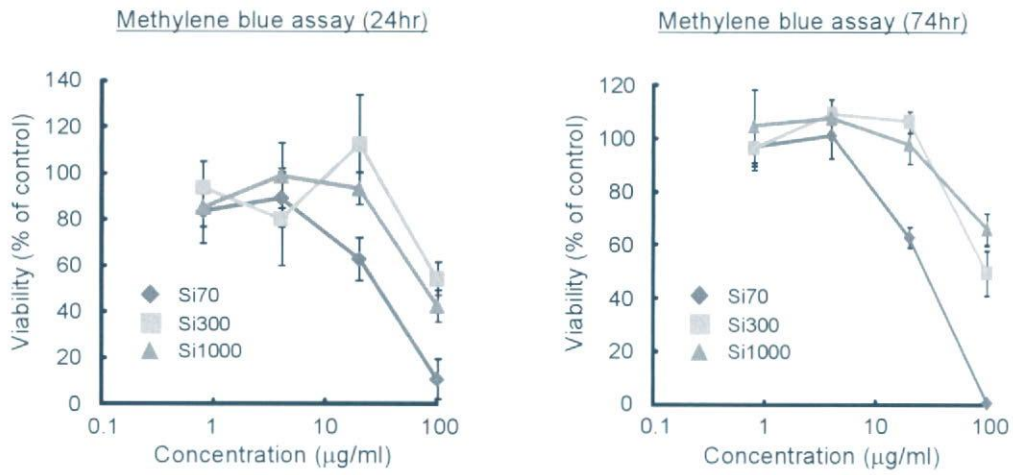


Fig. 1. Cytotoxicity of nanoparticles on macrophage cells (RAW264.7). Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 or 74 hr. At the end of the incubation period, cellular viability were determined by the Methylene blue assay, respectively. The subtracted OD value of control cells (nanoparticle-free medium) was taken as 100% and then calculated as the percentage of reduction of OD in nanoparticle-exposed cells. (n = 6)

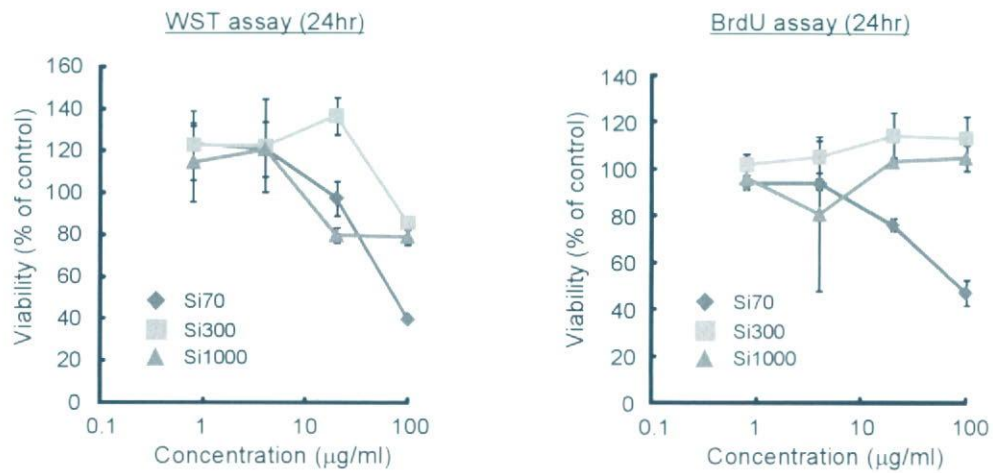


Fig. 2. Cytotoxicity of nanoparticles on RAW264.7 cells. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cellular viability were determined by WST-1 assay or BrdU assay, respectively. The subtracted OD value of control cells (nanoparticle-free medium) was taken as 100% and then calculated as the percentage of reduction of OD in nanoparticle-exposed cells. (n = 3-4)

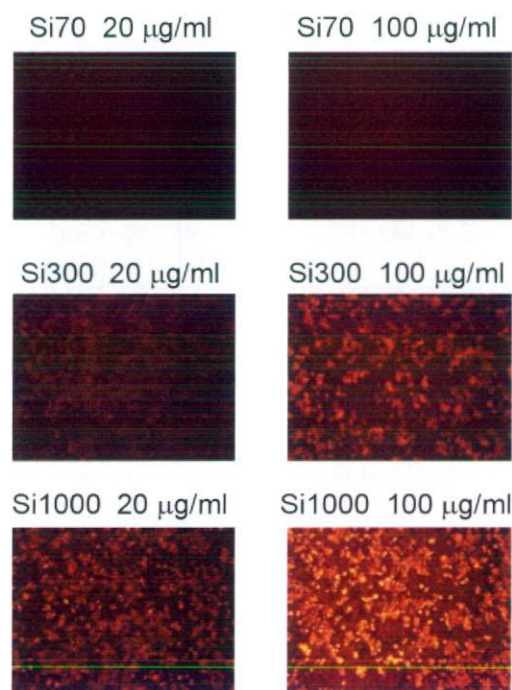


Fig. 3. Fluorescence microscope observation of RAW264.7 cells treated with various nanoparticles. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cells were observed under fluorescence microscope.

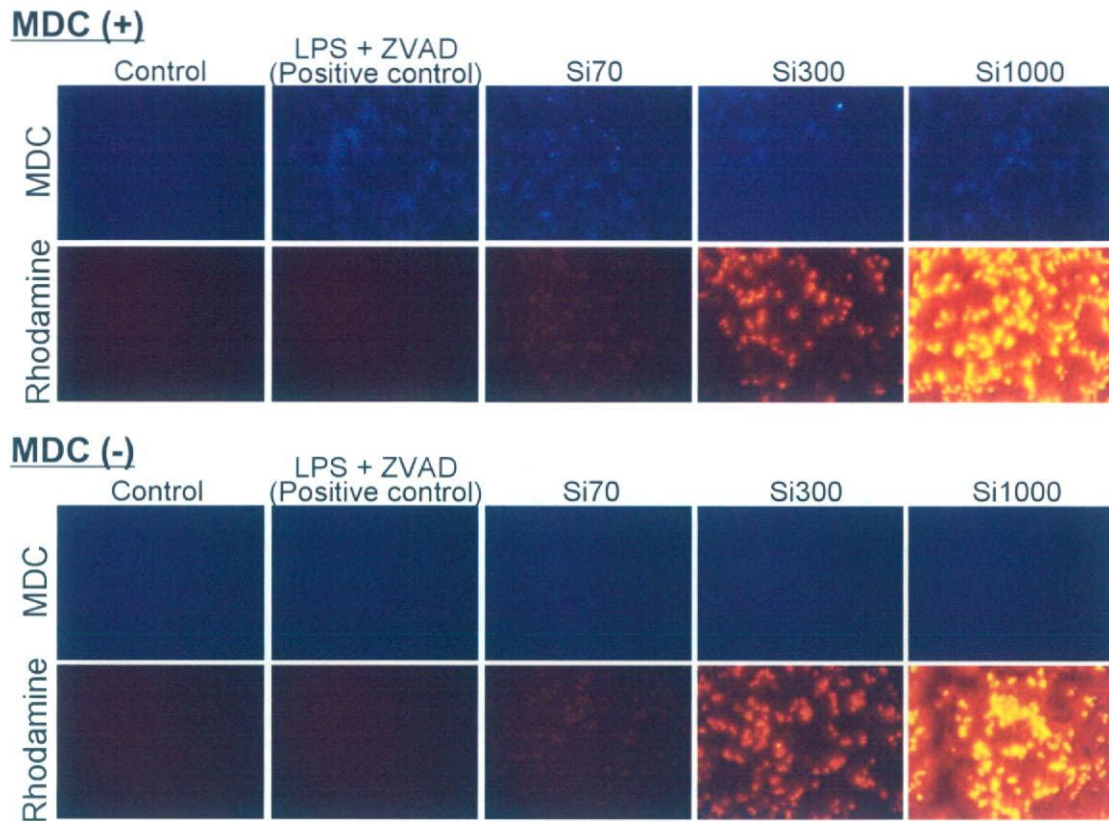


Fig. 4. MDC staining of RAW264.7 cells treated with various nanoparticles. Cells were treated with 100 $\mu\text{g/ml}$ of nanoparticles or LPS (100 ng/ml) + ZVAD (50 μM) for 8 hr. At the end of the incubation period, representative control cells and nanoparticles treated cells labeled with MDC are shown.

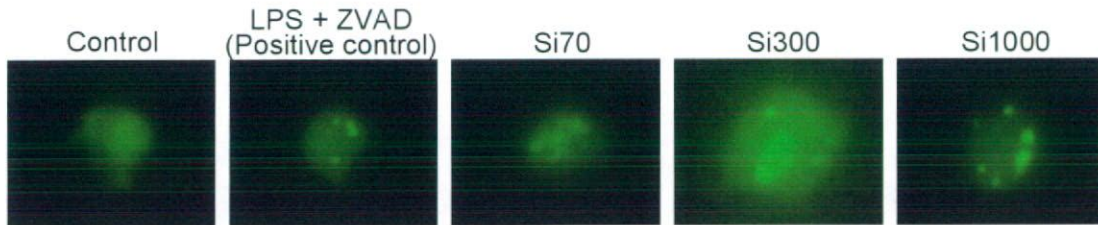


Fig. 5. Nanoparticles induces autophagy on RAW264.7 cells. Cells that had been transfected with the expression plasmid of GFP-LC3 were treated with LPS + ZVAD or 100 $\mu\text{g/ml}$ of nanoparticles for 12 hr. The cells were analyzed under fluorescence microscope.

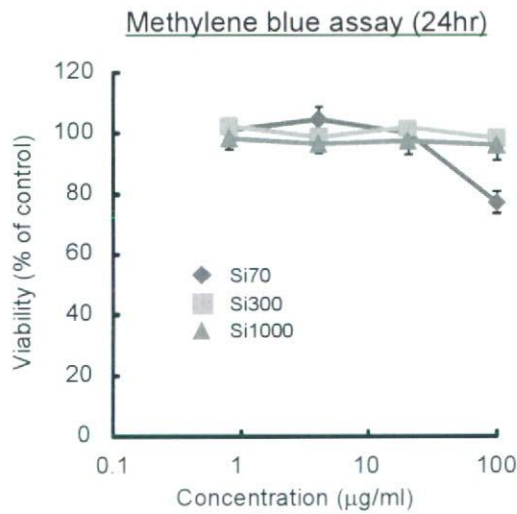


Fig. 6. Cytotoxicity of nanoparticles on dendritic cells (DC2.4). Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cellular viability were determined by the Methylene blue assay. The subtracted OD value of control cells (nanoparticle-free medium) was taken as 100% and then calculated as the percentage of reduction of OD in nanoparticle-exposed cells. (n = 6)

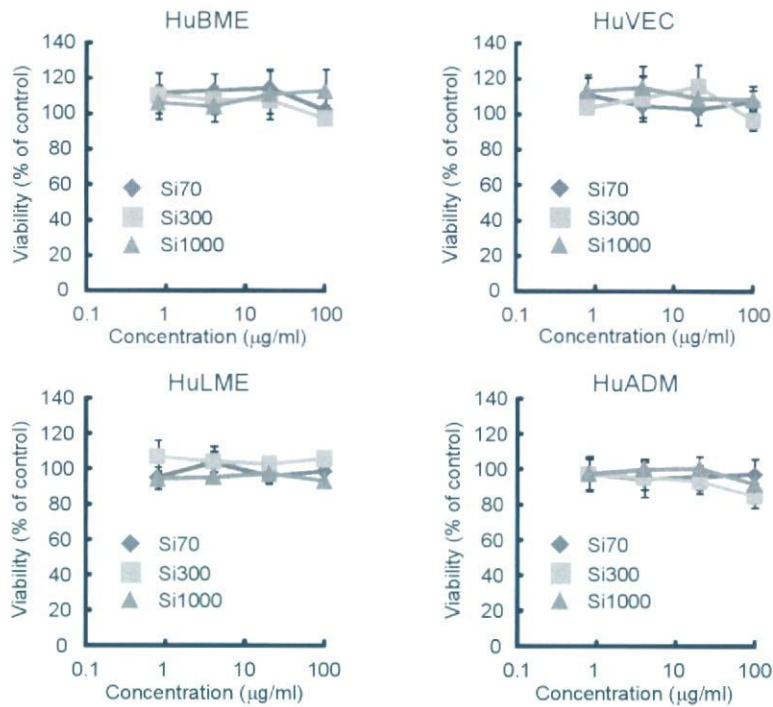


Fig. 7. Cytotoxicity of nanoparticles on vascular endothelial cells (HuBME, HuVEC, HuLME, or HuADM). Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cellular viability were determined by the Methylene blue assay, respectively. The subtracted OD value of control cells (nanoparticle-free medium) was taken as 100% and then calculated as the percentage of reduction of OD in nanoparticle-exposed cells. (n = 6)

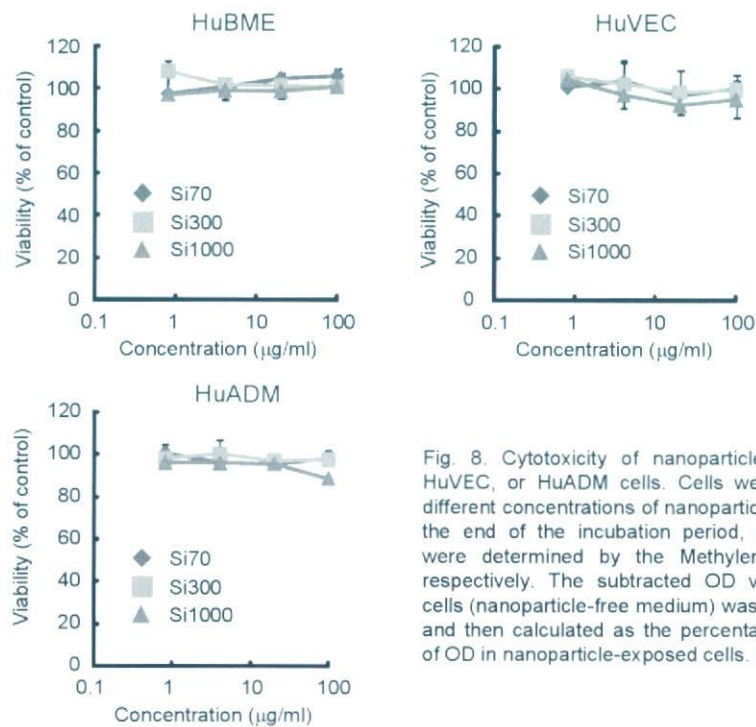


Fig. 8. Cytotoxicity of nanoparticles on HuBME, HuVEC, or HuADM cells. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 72 hr. At the end of the incubation period, cellular viability were determined by the Methylene blue assay, respectively. The subtracted OD value of control cells (nanoparticle-free medium) was taken as 100% and then calculated as the percentage of reduction of OD in nanoparticle-exposed cells. (n = 6)

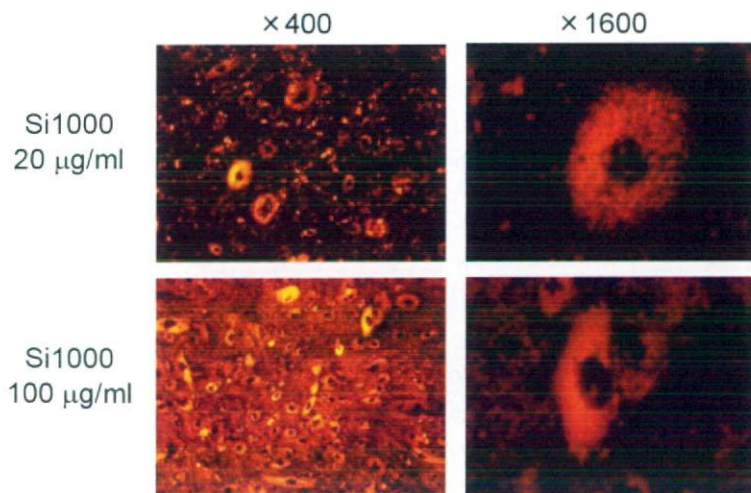


Fig. 9. Uptake of nanoparticles by HuBME cells. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cells were observed under fluorescence microscope. Magnification, × 400, × 1600.

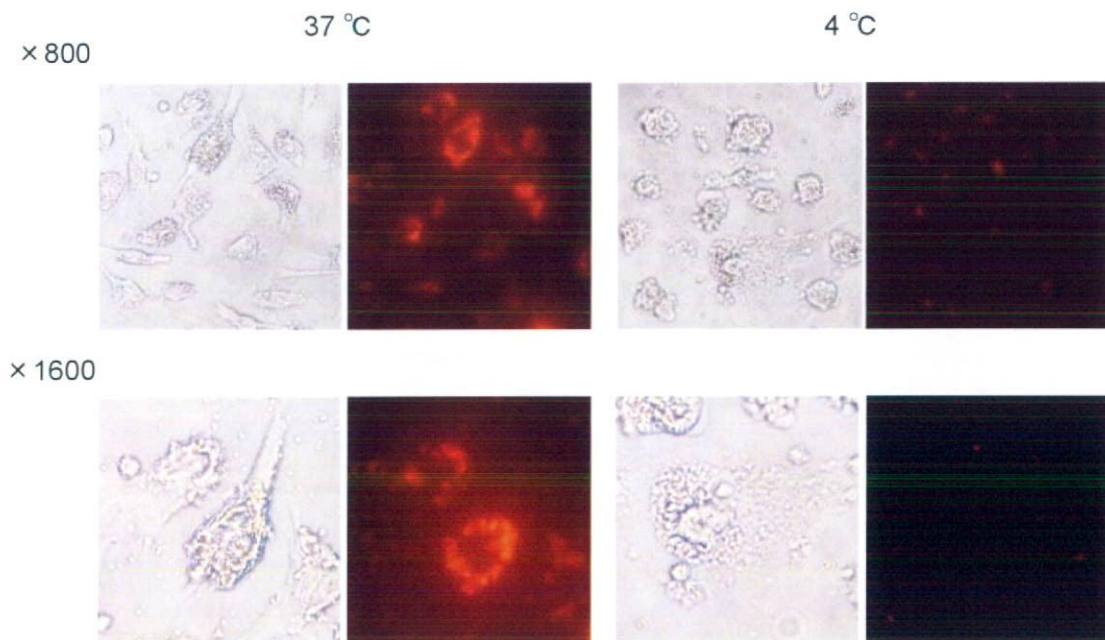


Fig. 10. Uptake of nanoparticles by HuBME cells at 37 °C or 4 °C. HuBME cells were preincubated at 37 °C or 4 °C for 1 hr and added 100 μg/ml of Si1000. After 8 hr incubation at 37 °C or 4 °C, cells were observed under fluorescence microscope. Magnification, × 800, × 1600.

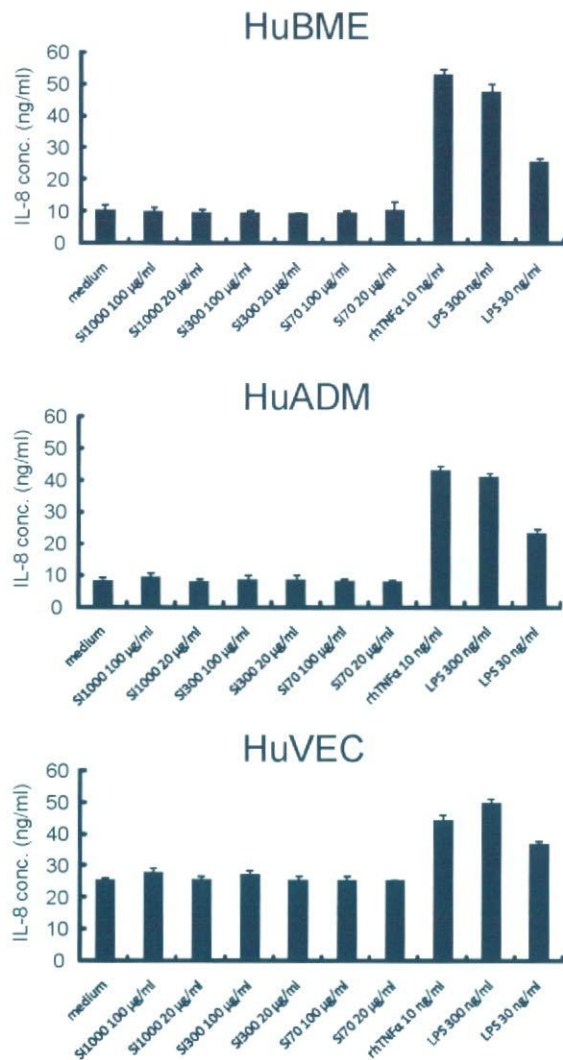


Fig. 11. IL-8 concentration in culture supernatant on nanoparticles-treated endothelial cells. HuBME, HuADM, or HuVEC cells (5×10^3 cells) were treated with different concentrations of nanoparticles, rhTNF α (10 ng/ml), or LPS (300, 30 ng/ml) for 24 hr. IL-8 concentration in culture supernatant was determined by ELISA, respectively. (n = 6)

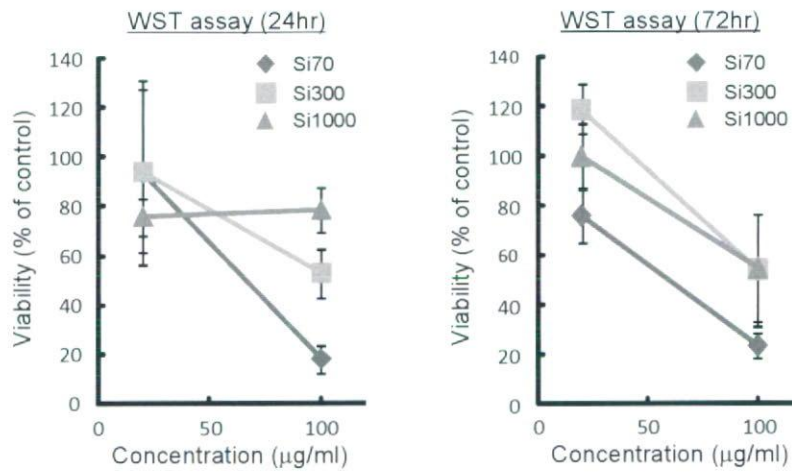


Fig. 12. Cytotoxicity of nanoparticles on neuron stem cells. Cells were treated with different concentrations of nanoparticles for 24 or 72 hr. Cellular viability were determined by the WST-1 assay, respectively. (n = 3)

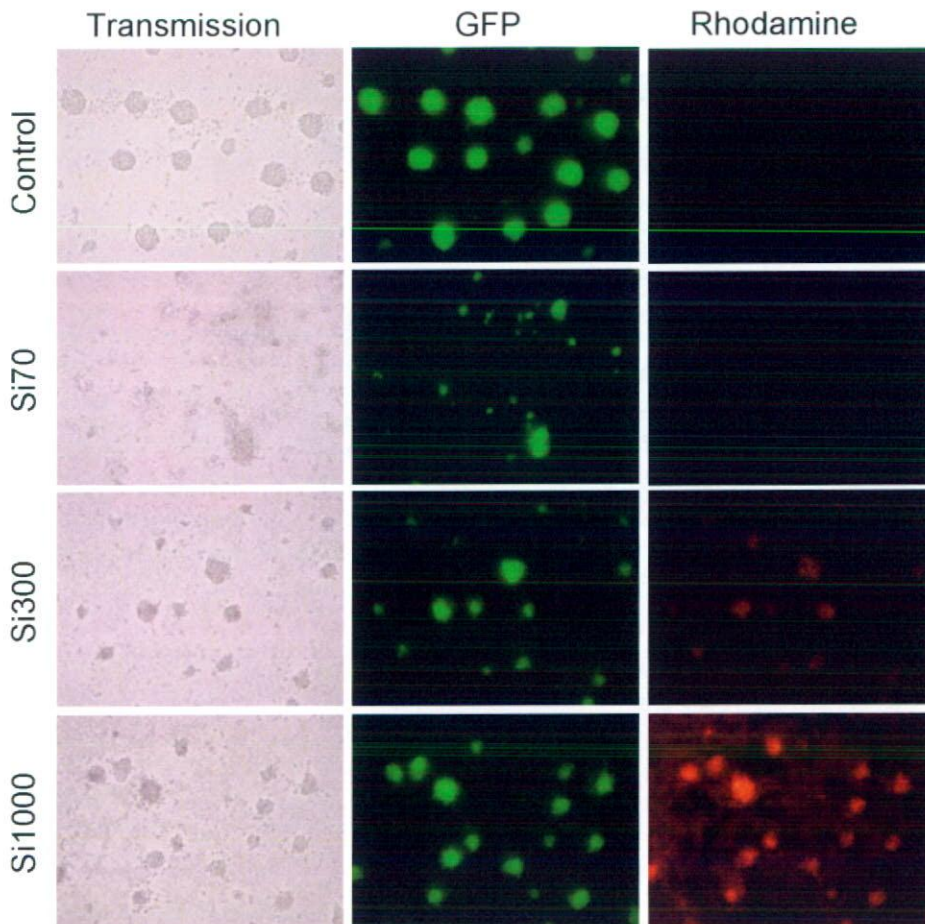


Fig. 13. Effect of nanoparticles on neural stem cells. Cells were treated with 100 µg/ml of nanoparticles for 24 hr. At the end of the incubation period, cells were observed under fluorescence microscope.

電子顕微鏡によるナノマテリアルの細胞内局在性および細胞毒性に 関する研究

分担研究者 今澤 孝喜 (独)医薬基盤研究所基盤的研究部 トキシコゲノミクスインフォマティクスプロジェクト
主任研究員

研究要旨

ナノマテリアルは医薬品、化粧品、食品領域で広く使用されているが、ナノマテリアルの安全性評価において、組織や細胞内での動態あるいは影響を透過型電子顕微鏡により超微形態学的に検索することが極めて重要であると考えられる。今回、粒子径 70 nm、300 nm および 1000 nm の 3 種類のナノシリカを用い、予備的検討として培養正常表皮細胞を用いた *in vitro* の実験および *in vivo* としてマウスを用いた急性毒性試験を実施し、細胞内取り込み、局在性および細胞毒性について電顕で観察した。

培養細胞では 70 nm シリカは細胞質内に取り込まれ、核内および核小体に侵入した像が観察された。300 nm および 1000 nm シリカは細胞質内に取り込まれるが、核内では観察されなかった。動物実験でのマウス肝組織ではナノシリカの全ての投与群でクッパー細胞にナノシリカが多数貪食されていた。しかし、70 nm シリカは肝細胞質内に侵入し、核内にも侵入した像が観察された。また、70 nm シリカは本実験の最高用量 100 mg/kg を投与したマウス肝細胞に小管状物質の顕著な増生やミトコンドリア内に沈着物が観察された。一方、300 nm および 1000 nm シリカは肝細胞内に侵入した像は観察されなかった。肺組織では 70 nm シリカ投与群のみが肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入した像が観察された。

サイズの小さい 70 nm シリカのみが *in vitro* のみならず *in vivo* でも肝細胞質や核内に侵入し、細胞毒性も誘発された。また、肺においても 70 nm シリカのみが肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入することが判明した。一方、300 nm および 1000 nm シリカは貪食細胞に捕捉されており、肝細胞質内には観察されなかったことから異物として認識される大きさであったと言える。70 nm という粒子径は異物として認識され難い大きさで、貪食されずに細胞質に容易に取り込まれ、さらに核内へも侵入し、細胞毒性を誘発するものと考えられた。このように、粒子径の差異による明らかな粒子の局在性の違いが見られ、それに連関して細胞毒性として現れるものと考えられた。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルは医薬品、化粧品、食品領域で広く使用されている。例えば、ドラッグデリバリー、日焼け止め、栄養強化などの目的であるが、それらは生体に対して毒性を示す可能性があることが知られている。しかし、ナノマテリアルが経皮、経口、経気道、血管内などの経路で生体内に入った

場合、組織や細胞内でどのような動態あるいは影響を示すのか、これに関する情報は少ないのが現状である。そこで、ナノマテリアルの生体影響・健康影響評価の一環として透過型電子顕微鏡(電顕)により超微形態学的に検索することが極めて重要であると考えられる。今回、ナノマテリアルが細胞内でどのような局在性や細胞毒性を示すのか、生体影響の予

備的検討として培養細胞を用いた *in vitro* の実験、さらに *in vivo* として動物を用いた急性毒性試験を実施し、超微形態学的に検索した。

B. 研究方法

ナノマテリアルの毒性試験の開始に当たり、本年度は各種サイズのナノ酸化チタンとナノシリカの形状と凝集性について電顕で観察した。酸化チタンは粒子径 5 nm、30~40 nm、10x40 nm、5 μm、50 μm のサイズの 5 種類について、それぞれ 0.1 % の割合で蒸留水、コーン油あるいは 0.1 M リン酸緩衝液にて懸濁し、超音波発生装置で 20 分間処置した。その後 10 分間静置し、親水化処理したグリッドメッシュに検体液を載せ電顕で観察した。

ナノシリカは表面未修飾の粒子で直径 70 nm、300 nm、1000 nm の 3 種類を用いた。それぞれ 0.1 % の割合で蒸留水にて懸濁し、超音波処理をせずに親水化処理したグリッドメッシュに検体液を載せ電顕で観察した。

5 nm および 30~40 nm の酸化チタンは粒子状、10x40 nm の酸化チタンは針状を呈し、いずれも凝集が観察された (写真 1, 2)。5 μm および 50 μm の酸化チタンはサイズにバラツキが見られ、形状も一定ではなく多面体を呈していた (写真 3)。ナノシリカはいずれもほぼ表示通りの大きさで、球面体を呈し、凝集はほとんど観察されなかった (写真 4, 5)。

今回、凝集の見られなかったナノシリカを *in vitro* および *in vivo* の実験に用いた。*in vitro* の実験として粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm の 3 種類のナノシリカを培養液中にそれぞれ 30 μl/ml および 100 μl/ml の割合でスライドガラス上に培養した正常表皮細胞 (HaCaT 細胞) に処置した。対照は無処置とした。培養細胞は処置 24 時間後、冷 2.5 % グルタルアルデヒド液で 1 時間固定後、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄し、1 % 四酸化オスミウムで 30 分間後固定し、上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従い、エポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。

in vivo の実験として雄 BALB/c マウスにナノシリカを投与し、細胞内取り込み、局在性および細胞毒

性について電顕で観察した。ナノシリカは蛍光標識した粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm の 3 種類を用いた。ナノシリカは注射用水に懸濁し、投与量 10、30、100 mg/kg、対照として注射用水のみをそれぞれマウス各 2 匹に尾静脈内から投与した。投与 24 時間後、フェノバルビタールで麻酔・屠殺し、肝および肺を摘出し、直ちに冷 2.5 % グルタルアルデヒド液で 2 時間固定し、0.1 M リン酸緩衝液で洗浄後、1 % 四酸化オスミウムで 1 時間後固定した。常法に従いエポキシ樹脂で包埋した。熱重合で硬化した標本をダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、電顕で観察した。

C. 研究結果

培養細胞を用いてナノシリカの取り込みについて超微形態学的に観察した。培養細胞では 70 nm シリカは細胞質内に取り込まれ、核内および核小体に侵入した像が観察された (写真 6, 7)。300 nm および 1000 nm シリカは細胞質内に取り込まれたが、核内では全く観察されなかった (写真 8, 9)。

動物実験におけるマウス肝組織ではナノシリカの投与用量に拘わらず全ての投与群でクッパー細胞に多数のナノシリカが貪食されていた。しかし、70 nm シリカは肝細胞質内に侵入し、僅かであるが核内にも侵入した像が観察された (写真 10)。また、70 nm シリカを 100 mg/kg 投与したマウスでは肝細胞に小管状物質の顕著な増生やミトコンドリア内に沈着物が観察された (写真 11)。一方、300 nm および 1000 nm シリカはクッパー細胞に貪食されており、肝細胞質内に侵入した像は観察されなかった (写真 12, 13)。肺組織では 70 nm シリカのみが肺胞上皮 II 型細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入した像が観察された (写真 14, 15)。

D. 考察

今回、各種の酸化チタンを電顕で形状観察した結果、凝集性が強いことが明らかになった。このような凝集したナノマテリアルはナノマテリアルというよりマイクロマテリアルとなり、動物実験に用いた場

合、本来の毒性作用が異なった結果として評価されることが考えられた。そのようなことから鑑みて実験に用いる場合と同じ条件でナノマテリアルをその都度、電顕での直接確認が必要かと思われた。

一方、ナノシリカは凝集がほとんど見られなかったことから毒性試験に用いた。

ナノシリカはサイズの異なる 70 nm, 300 nm, 1000 nm の3種類について *in vitro* および *in vivo* の実験で細胞内への侵入、局在性および細胞毒性について検討した。サイズの小さい 70 nm シリカのみが *in vitro* のみならず *in vivo* でも肝細胞質や核内に侵入し、細胞毒性も誘発された。また、肺においても 70 nm シリカのみが肺胞上皮細胞や毛細血管の内皮細胞に侵入することが判明した。一方、300 nm および 1000 nm シリカは培養細胞に取り込まれるが、動物実験では貪食細胞にほとんど捕捉されており、異物として認識されるものと思われた。一方、70 nm という粒子径は肝細胞質に容易に侵入し、さらに核内へも侵入することから、異物として認識され難い大きさであると考えられた。また、粒子径の差異による明らかなナノシリカの局在性の違いが見られたことから、ナノシリカの侵入あるいは局在・蓄積する部位に依存して細胞毒性が誘発されるものと思われた。

E. 結論

動物実験において 70 nm シリカ投与群のみが肝細胞内や核内、さらに肺胞上皮細胞内および毛細血管内皮細胞内に観察された。生体内では 70 nm という粒子は異物として認識され難い大きさで、細胞質内に容易に侵入し、さらに核内へも侵入するものと思われた。またそれに伴い、特に肝細胞では小管状物質の増生、ミトコンドリアの変性というような細胞毒性も誘発された。しかし、300 nm および 1000 nm シリカは貪食細胞に捕捉されており、肝細胞質内には観察されなかったことから異物として認識される大きさであると考えられた。このように 70 nm シリカは 300 nm および 1000 nm シリカと比較して粒子径の差異による明らかな粒子の局在性の違いによる細胞毒性が顕著に現れるものと考えられた。

以上のことから、70 nm より小さいナノシリカは生体に有害影響を引き起こす可能性が示唆された。

今後、ナノシリカについて肝、肺以外の他の臓器・組織における細胞内への取り込みについて検討する。さらにナノシリカの頻回投与、あるいは異なる投与経路による細胞内での局在性や細胞毒性について超微形態学的に比較検討する。また他のナノマテリアルについても細胞内局在解析や細胞毒性を中心に超微形態学的に検討する予定である。

F. 健康危険情報

G. 研究発表

①論文発表

②学会発表

ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関
西森光、磯田勝広、近藤昌夫、今澤孝喜、角田慎一、堤康央、八木清仁
第128年会日本薬学会 2008.3.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

②実用新案登録

③その他

I. 研究協力者

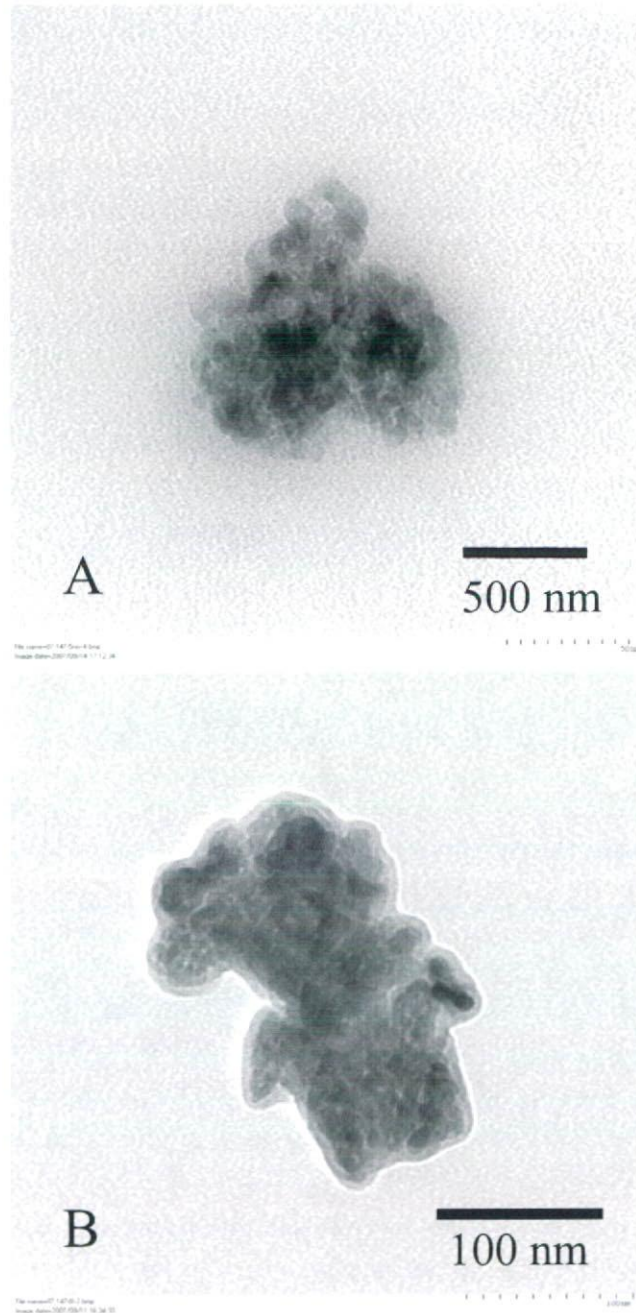


写真 1. A: 5 nm 酸化チタン、コーン油で懸濁
B: 5 nm 酸化チタン、0.1 M リン酸緩衝液で懸濁
A, B とも強い凝集が見られる

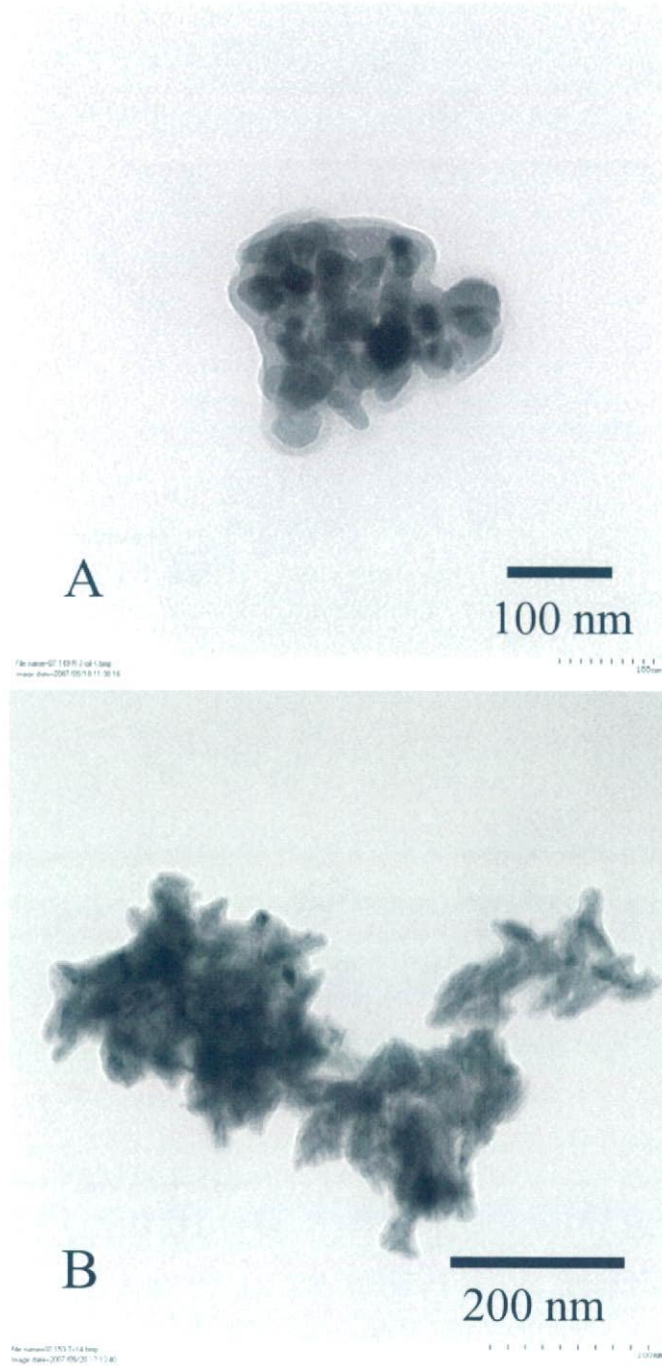


写真 2. A: 30~40 nm 酸化チタン、コーン油で懸濁
B: 10x40 nm 酸化チタン、コーン油で懸濁
A, B とも強い凝集が見られる

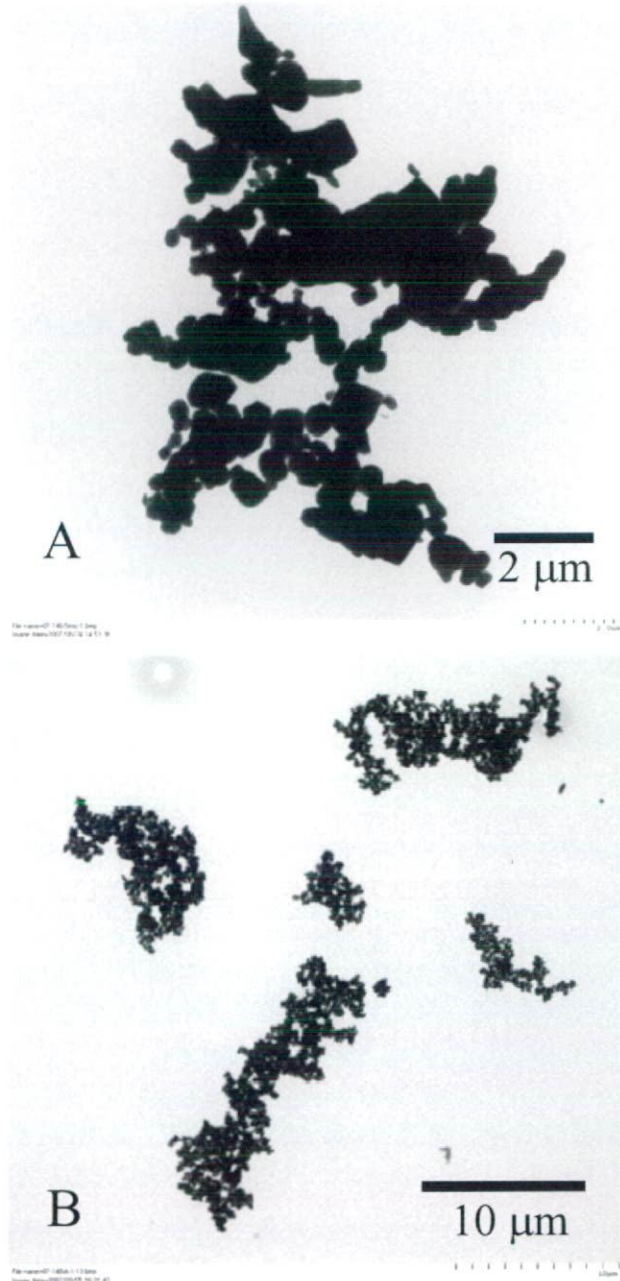


写真 3. A: 5 μm 酸化チタン、蒸留水で懸濁
B: 50 μm 酸化チタン、0.1 M リン酸緩衝液で懸濁
A, B ともサイズのバラツキが大きく、不定形で多面体を呈している

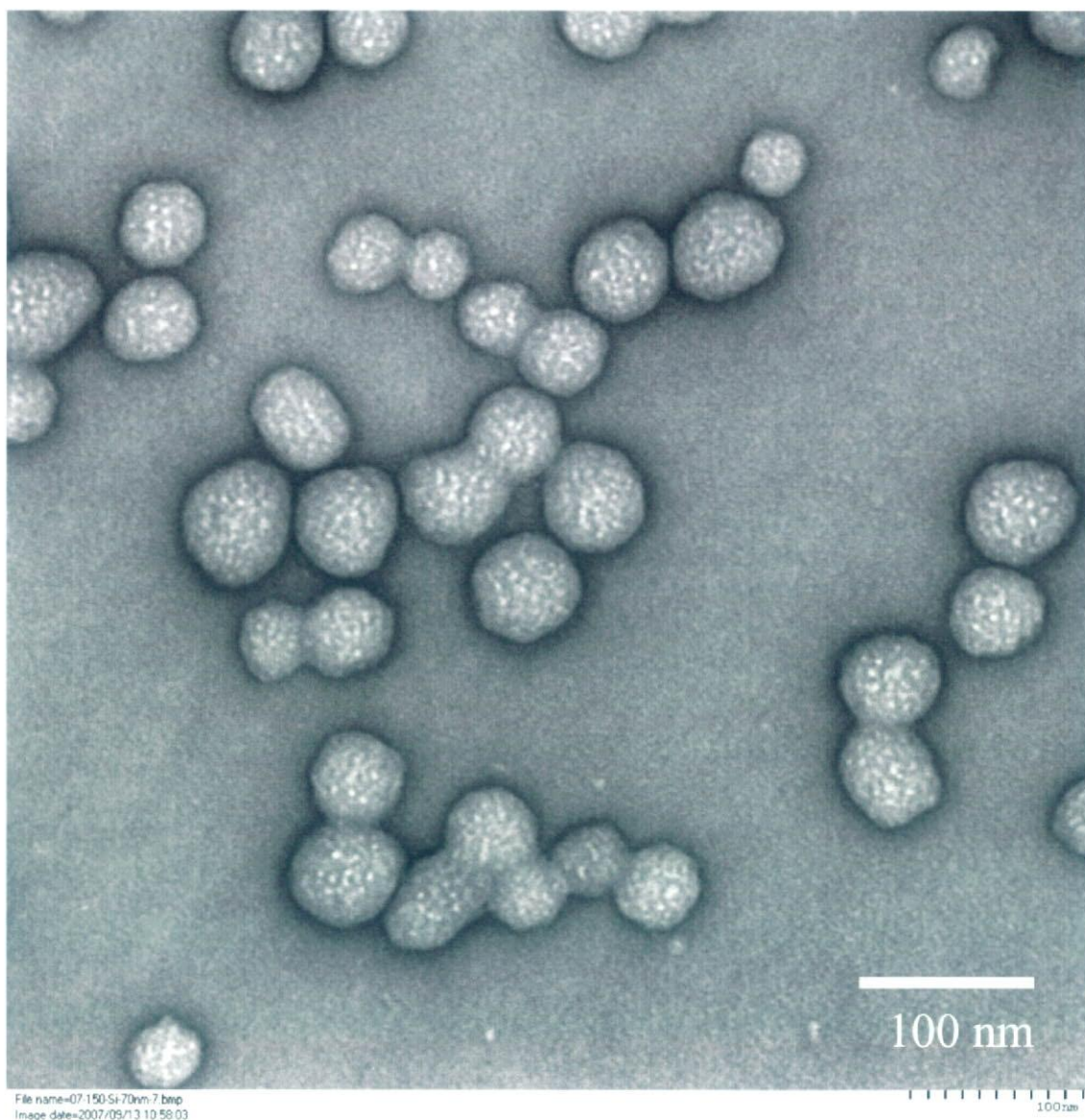


写真 4. 70 nm シリカ、蒸留水で懸濁
ほぼ70 nm 前後の粒子径で球面体を呈し、凝集が少ない

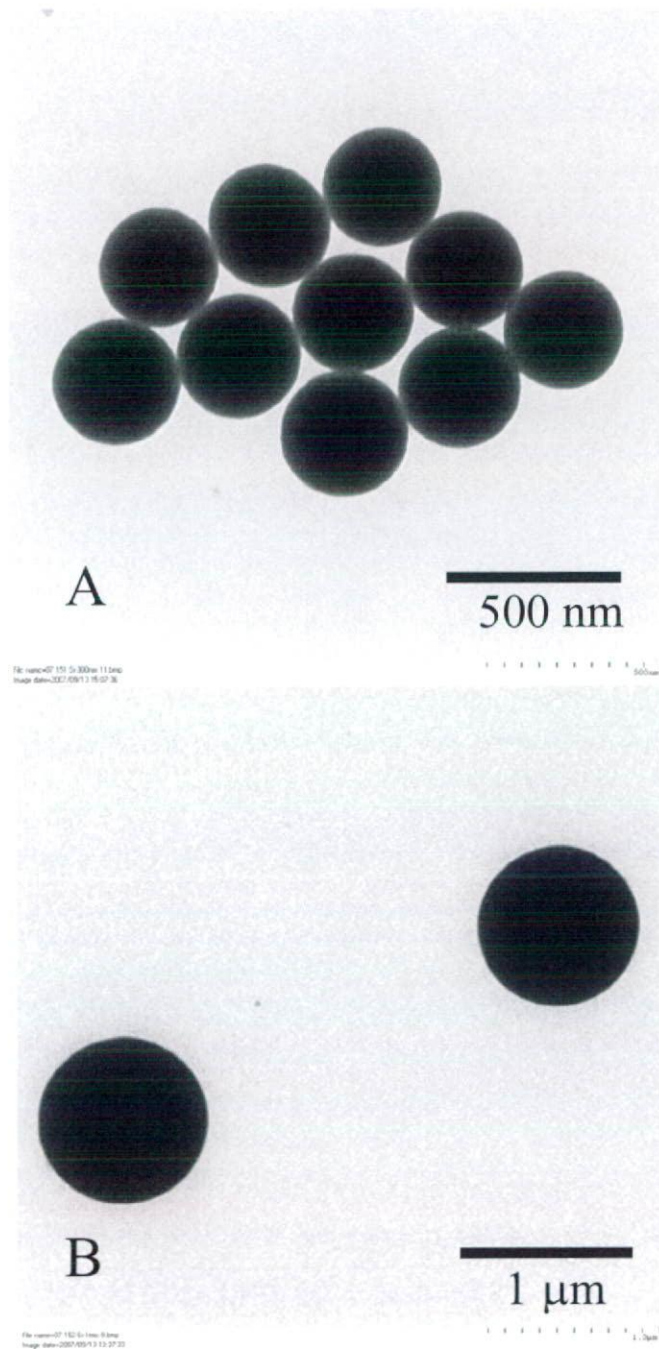


写真 5. A: 300 nm シリカ、蒸留水で懸濁
B: 1000 nm シリカ、蒸留水で懸濁
A, B ともほぼ表示通りの粒子径で球面体を呈し、凝集は少ない

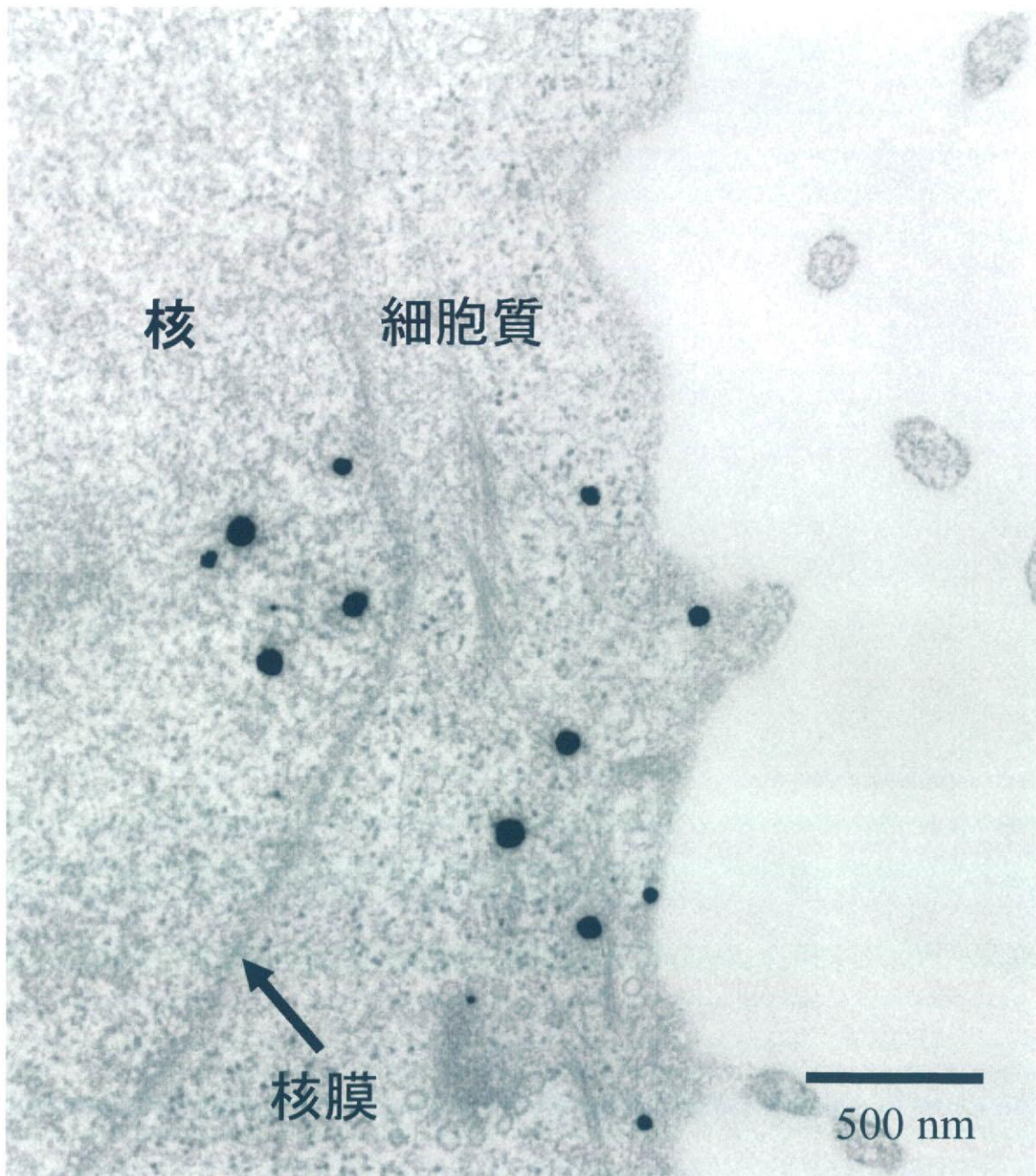


写真 6. 培養細胞に 70 nm シリカを 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処置
細胞質および核内にシリカ(黒いドット)が侵入している

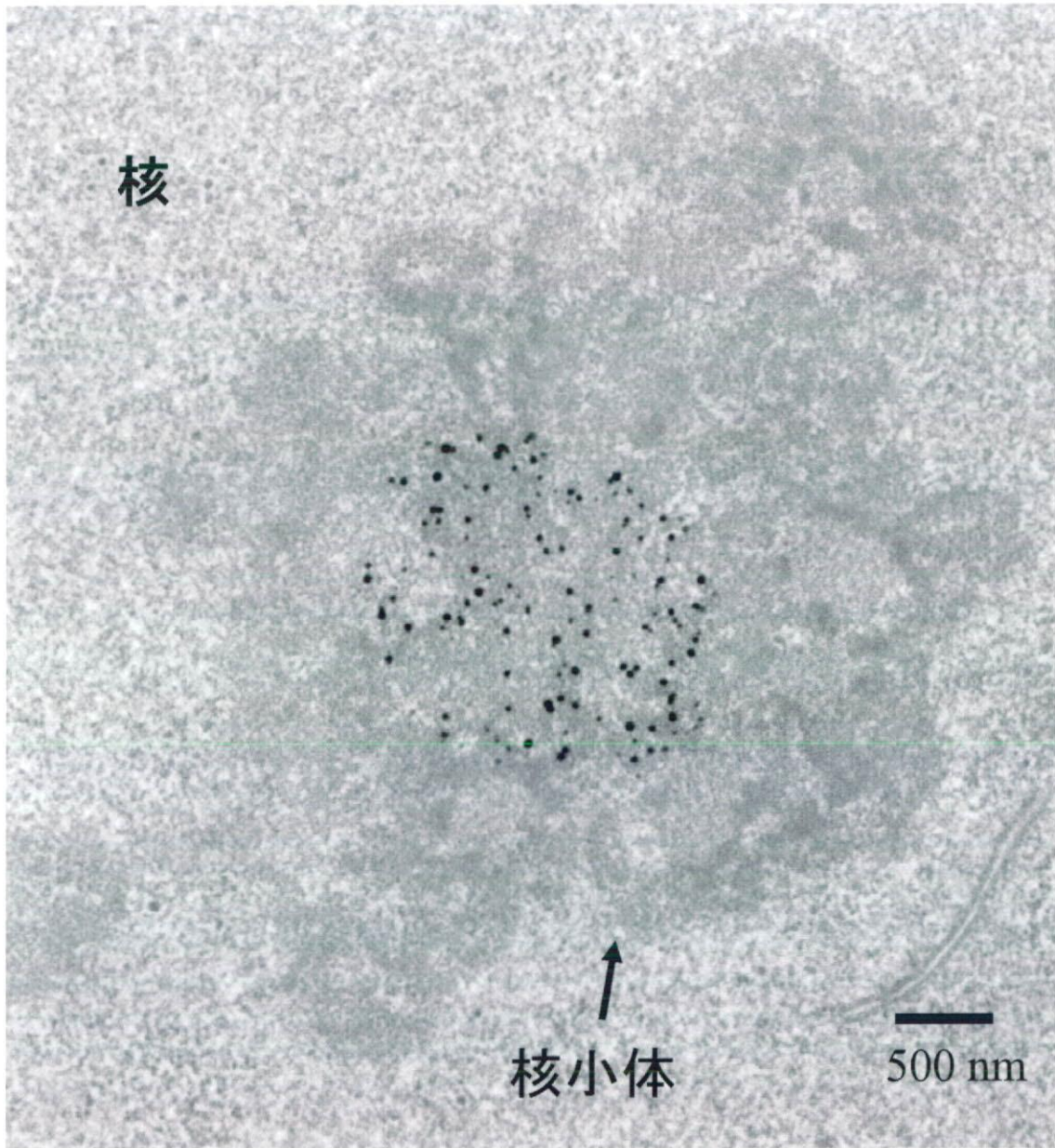


写真 7. 培養細胞に 70 nm シリカを 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 処置
核小体内にシリカが侵入している

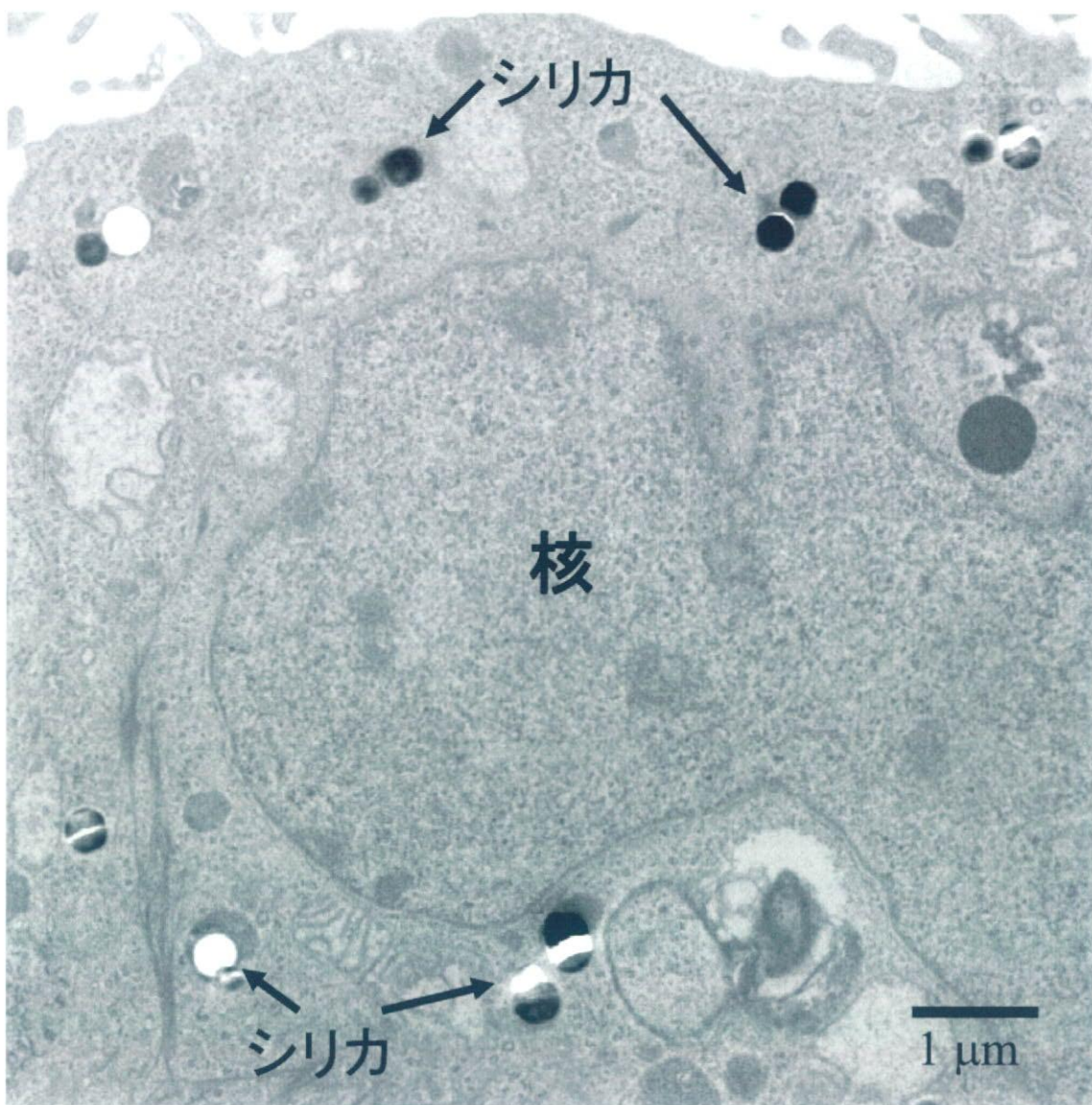


写真 8. 培養細胞に 300 nm シリカを 30 $\mu\text{g/ml}$ 処置
細胞質内にシリカが侵入している