

201236025A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

毒性評価を目的としたナノマテリアル分類システムの構築

平成24年度 総括研究報告書

研究代表者 小泉 直也

平成25(2013)年 5月

目 次

I. 総括研究報告

毒性評価を目的としたナノマテリアル分類システムの構築

研究代表者 小泉直也

研究要旨-----	1
研究目的-----	2
研究方法-----	2
研究結果-----	3
考察-----	5
結論-----	5
研究発表-----	5
健康危険情報-----	5
知的財産権の出願・登録状況-----	5

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
（総括）研究報告書

毒性評価を目的としたナノマテリアル分類システムの構築

研究代表者

小泉直也（昭和薬科大学 薬学部 助教）

研究要旨

本研究は、ナノマテリアルの開発と製造および利用が安心して進められるため、ナノマテリアル安全性における分類システムを構築することを目的としており、3カ年の計画でその分類評価項目の選定と妥当性の検討および既存のナノマテリアルを用いた分類システムの評価を行う。初年度においては、粘膜上皮細胞への慢性毒性を反映する評価系を開発し、これまで毒性の有無について報告のあったナノマテリアルを用いて、評価系の妥当性について検討することを目的とした。

まず、粘膜組織への慢性毒性能を反映する簡便な評価系を確立するため、*in vivo*での組織障害性、およびナノマテリアル毒性評価の基礎研究に汎用されている蛍光ナノシリカを用いた細胞毒性評価系の検討を行った。本検討では、おおくのナノマテリアルを用いた毒性評価を行うことを想定し、より簡便な*in vitro*での慢性毒性評価系について基礎的な検討を行った。その結果、細胞膜に存在するタンパク質をトリプシン処理にて一部除去することで急性細胞毒性を回避することが可能であり、さらに70 nmの蛍光シリカ作用により経時的な細胞増殖能の低下が観察され、この細胞増殖抑制効果は300 nmの蛍光ナノシリカに比べ顕著であった。また、この評価系におけるナノマテリアルの細胞内分布を調べたところ、細胞核周辺への集積が観察され、この分布は急性細胞障害を誘導する際とは異なる分布であった。よって、トリプシン処理細胞を用いた本評価法は、経時的な慢性毒性の評価が可能な実験系ではないかと考えた。

初年度においては、上記に示した検討を行い*in vivo*慢性毒性評価に対応する培養細胞を用いた慢性毒性評価系を構築した。これまでの*in vitro*ナノマテリアル毒性評価系においては、急性毒性を指標としたものが主流であったが、実際に問題となる慢性毒性に近い評価系が確立可能と考え、ナノシリカ以外のナノマテリアルについても順次検討を行う。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの有用性は周知の事実であるが、有用な物質特性が発揮できる半面、その高い活性による生体への影響が懸念されている。事実、生体への影響に関する研究により、一部のナノマテリアルは実験動物への経肺適用による毒性が報告されている。ナノマテリアルの健康影響に関して実験動物を用いる評価法は必須であると考えられるが、その煩雑性からスクリーニング的に検討することは難しく、前段階として、ナノマテリアルの安全性を簡便な手法により分類するシステムの構築が必要である。そこで、本研究ではナノマテリアルの物質特性（表面特性と粒子径）を測定することで、およそその生体への影響（蓄積性と直接毒性）を予測可能な、安全性評価分類システムの確立を目的とする。本分類システムは、これまでに毒性の有無に関して報告のあるナノマテリアルを最大4項目の指標について評価し、それぞれの評価別に分類することで、生体適用に際しての安全性と懸念事項の概要についてナノマテリアルの物質特性より把握が可能とする分類システムであり、安全なナノマテリアルの利用促進と安全性に疑いのあるナノマテリアルの使用抑制を同時に示すことが可能となる。今後増加の一途をたどるナノマテリアルのヒト健康影響を評価し、利用者の安全を確保するためには必須の安全性分類システムになると考えられ、新たなナノマテリアル安全性評価手法の開発とその発展に貢献できると考えている。初年度においては、粘膜上皮細胞への慢性毒性を反映する評価系を開発し、これまで毒性の有無について報告のあったナノマテリアルを用いて、評価系の妥当性について検討することを目的とした。

B. 研究方法

in vitro急性毒性評価系の構築

粘膜組織への慢性毒性能を反映する簡便な評価系を確立するため、in vivoでの組織障害性、およびナノマテリアル毒性評価の基礎研究に汎用されている蛍光ナノシリカを用いた細胞毒性評価系の検討を行った。本検討では、

おおくのナノマテリアルを用いた毒性評価を行うことを想定し、より簡便なin vitroでの慢性毒性評価系について検討した。

細胞

A549細胞：ヒト肺腺癌細胞

HepG2細胞：ヒト肝癌細胞

蛍光シリカ

70nm Fluorescent silica particles (micromod)

300nm Fluorescent silica particles (micromod)

操作

各細胞を12 well plateに 3×10^5 cells/wellにて播種し、24時間培養。その後、70 nmおよび300 nmの蛍光シリカを各濃度(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/ml)にて作用させ、作用後24時間において細胞から放出される逸脱酵素量(LDH: lactate dehydrogenase)を指標に細胞障害性について検討した。LDHの測定は、CytoTox 96 Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit (プロメガ)を用いておこなった。

in vitro急性毒性評価系における蛍光シリカの細胞内分布

これまでin vivoおよびin vitro実験系において多数の細胞障害性の報告がされている蛍光ナノシリカにおいて、培養細胞を用いた急性毒性を再現可能な評価系が構築された。よって、この急性毒性を誘導する蛍光ナノシリカの細胞内分布を明らかとするため、ナノシリカに標識したFITCの蛍光を指標にオリンパス蛍光顕微鏡システムにて観察を行った。

細胞

A549細胞：ヒト肺腺癌細胞

蛍光シリカ

70nm Fluorescent silica particles

300nm Fluorescent silica particles

操作

ガラスプレートを敷いた12 well plateにA549細胞を 3×10^5 cells/wellにて播種し、24時間培養。その後、70 nmおよび300 nmの蛍光シリカを1.0 mg/mlの濃度にて作用させ、作用後24時間においてPBSにて3回洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒドにて固定化し、さらにPBSにて洗浄後、50%グリセロール溶液にて封入し、オリンパス蛍光顕微鏡システムを用いて細胞を観察した。

in vitro慢性毒性評価系の構築

粘膜組織への慢性毒性能を反映する簡便な評価系を確立するため、in vivoでの組織障害性、およびナノマテリアル毒性評価の基礎研究に汎用されている蛍光ナノシリカを用いた細胞毒性評価系の検討を行った。本検討ではナノマテリアルにおける慢性毒性を評価可能な実験系について検討した。

細胞

A549細胞：ヒト肺腺癌細胞

HepG2細胞：ヒト肝癌細胞

蛍光シリカ

70nm Fluorescent silica particles

300nm Fluorescent silica particles

操作

各細胞を2.5 $\mu\text{g/ml}$ のトリプシンによりdishより剥離し、12 well plateに 3×10^5 cells/wellにて播種し、同時に70 nmおよび300 nmの蛍光シリカを各濃度(0.5、1.0、2.0、4.0 mg/ml)にて作用させ24時間培養した。24時間共培養後、PBSにて洗浄し、その後2.5 $\mu\text{g/ml}$ のトリプシンにより細胞を再剥離および細胞表面の蛍光シリカを除去して再播種した。播種後、経時的に細胞から放出されるLDHを指標に細胞障害性について検討した。また、経時的な細胞増殖能を測定するためAlamar Blue assayをおこなった。

in vitro慢性毒性評価系における蛍光シリカの細胞内分布

ナノマテリアルの慢性毒性を評価可能な実験系が得られたことから、この慢性毒性を誘導する蛍光ナノシリカの細胞内分布を明らかにするため、ナノシリカに標識したFITCの蛍光を指標に共焦点レーザー顕微鏡にて観察を行った。

細胞

A549細胞：ヒト肺腺癌細胞

蛍光シリカ

70nm Fluorescent silica particles

300nm Fluorescent silica particles

操作

A549細胞を2.5 $\mu\text{g/ml}$ のトリプシンによりdishより剥離し、12 well plateに 3×10^5 cells/wellにて播種し、同時に70 nmおよび300 nmの蛍光シリカを1.0 mg/mlにて作用させ24時間培養した。24時間共培養後、PBSにて洗浄し、その後2.5 $\mu\text{g/ml}$ のトリプシンにより細胞を再剥離および細胞表面の蛍光シリカを除去し、ガラスプレートを敷いた12 well plateに 1×10^5 cells/wellにて再播種した。作用後24時間においてPBSにて3回洗浄した。その後、4%パラホルムアルデヒドにて固定化し、さらにPBSにて洗浄後、50%グリセロール溶液にて封入し、ニコン共焦点顕微鏡システムA1+を用いて細胞を観察した。

C. 研究結果

in vitro急性毒性評価系の構築

これまでの多数の研究報告と同様、70 nmの蛍光シリカでは濃度依存的な細胞障害性が観察され、300 nmの蛍光シリカでは細胞障害性は見られなかった。また、HepG2細胞およびA549細胞の両細胞において、ほぼ同様の結果が得られたことから、100 nm以下のナノシリカにおいては、細胞への急性毒性能を持つことが確認された。本評価法は、播種した培養細胞にナノマテリアルを24時間作用させるだけであり、簡便な方法と考えられる。本結果

より、70 nmおよび300 nmの蛍光シリカ粒子を用いて、ナノマテリアルの細胞障害性評価系

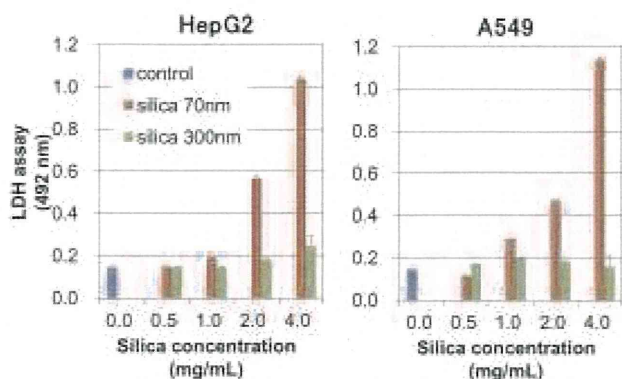


図 *in vitro*急性毒性評価系を用いたナノシリカによる細胞障害性を構築可能と考え、研究課題遂行に必要な慢性毒性能を反映する評価系の構築が可能であると考えた。

*in vitro*急性毒性評価系における蛍光シリカの細胞内分布

前述したナノシリカにおいて急性毒性が観察された実験系における蛍光シリカの細胞内分布について検討を行った。蛍光シリカ作用後24時間にて、蛍光顕微鏡を用いてA549細胞を観察したところ、著しい蛍光像が観察され、詳細な細胞分布については不明であった。これは細胞表面に蛍光シリカが多量に分布していることが原因と推察される。これらの顕微

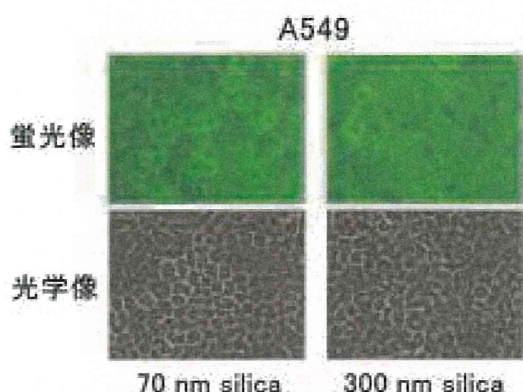


図 *in vitro*急性毒性評価系を用いた蛍光シリカの顕微鏡鏡画像より、急性毒性評価系においては、蛍光シリカは細胞膜に極めて高く分布していることが明らかとなった。

*in vitro*慢性毒性評価系の構築

急性毒性評価系においては、ナノシリカが細胞表面に著しい集積を示すことから、細胞膜に存在するナノシリカが強い毒性を示していると考え、細胞膜表面からナノシリカを減量する操作をおこなった。具体的には、細胞膜に存在するタンパク質をトリプシン処理にて一部除去した。この方法を用い、70 nmの蛍光ナノシリカによるA549細胞およびHepG2細胞への急性毒性が低下することを明らかとした。また、70 nmの蛍光シリカ作用後24時間での毒性が観察されなかった細胞において、経時的な細胞培養をおこなったところ、細胞増殖能の低下が観察され、この細胞増殖抑制効

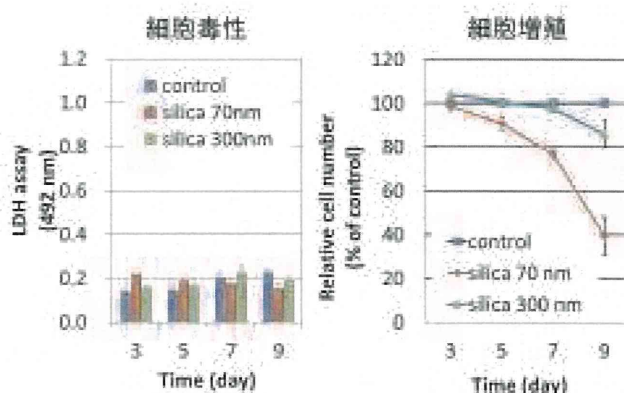


図 *in vitro*慢性毒性評価系を用いたナノシリカによる細胞増殖抑制効果は300 nmの蛍光ナノシリカに比べ顕著であった。よって、トリプシン処理細胞を用いた検討により、ナノシリカの急性毒性を回避し、慢性毒性の評価が可能ではないかと考えた。

*in vitro*慢性毒性評価系における蛍光シリカの細胞内分布

トリプシン処理による膜タンパク質を除去した培養細胞に70 nmおよび300 nmの蛍光シリカを作用させた際の細胞内分布を検討したところ、70 nmのナノシリカは核膜の内側に観察された。一方、300 nmの蛍光シリカは細胞膜近傍には存在するものの、核内には分布しないことが明らかとなった。100 nm以下の蛍光シリカが細胞核内に移行し、細胞障害性を引き起こすことは過去の報告にもあることから、*in vitro*細胞毒性評価系においても、これまでの報告と類似した細胞内分布が得られてい

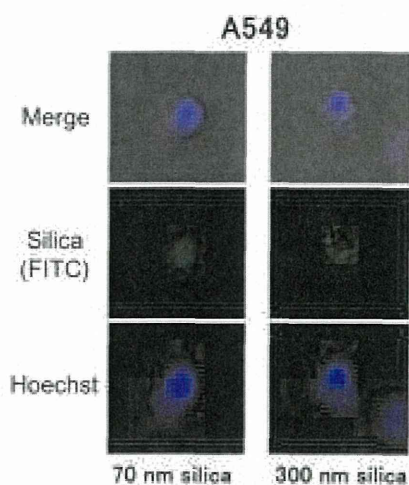


図 *In vitro*慢性毒性評価系を用いた蛍光シリカの細胞内分布と判断した。

D. 考察

トリプシン処理による膜タンパク質を除去した培養細胞に70 nmの蛍光シリカを作用させた際の細胞内分布を検討したところ、蛍光は核膜の内側に観察された。一方、トリプシン未処理の培養細胞を用いた検討においては、細胞膜への付着が非常に強く観察され、細胞核内への分布も一部観察された。100 nm以下の蛍光シリカが細胞核内に移行し、細胞障害性を引き起こすことは過去の報告にもあることから、研究代表者が行った*in vitro*細胞毒性評価系においても、これまでの報告と類似した細胞内分布が得られていると判断した。一方で、トリプシン処理により70 nmの蛍光シリカによる急性毒性は低下していることから、蛍光ナノシリカによる急性毒性には、核内への移行ではなく細胞膜へのシリカ粒子の分布が強く関与している可能性が考えられる。よって、さらなる詳細な検討が必要ではあるが、慢性毒性評価系としては細胞膜へのナノマテリアル吸着を減少させ、培養細胞への急性毒性を回避可能なトリプシン処理細胞を用いた評価系が有用ではないかと考えた。*In vivo*では、粘膜上皮細胞の表面は絨毛運動や粘液による異物除去システムが常に働いており、ナノマテリアルの細胞表面への吸着量は低いことが考えられることから、本評価系は*in vivo*での現象を模していると考え、今後*in*

*vivo*慢性毒性評価系との相関についても検討を行い評価系の確立を行う。

E. 結論

初年度においては、上記に示した検討を行い*in vivo*慢性毒性評価に対応する培養細胞を用いた毒性評価系を構築した。引き続き、ナノマテリアル分類システムの構築に利用可能な細胞毒性評価系の確立を行うと共に、次年度においてはナノシリカ以外のナノマテリアルとして、酸化亜鉛、酸化セリウム、酸化アルミニウムを用いた検討を行い、評価系としての有用性と妥当性を検証する。

F. 研究発表

1. 学会発表

佐々木浩子、小泉直也、三上真智子、藤井まき子、渡辺善照：細胞内導入技術を用いたナノマテリアル毒性評価系の基礎研究
第28回日本DDS学会学術集会、2012年7月4日
(開催地：札幌)

G. 健康危険情報

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

