

201329023A

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25年度 総括研究報告書

研究代表者 小泉 直也

平成26(2014)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	5
考察	7
結論	7
研究発表	8
健康危険情報	8
知的財産権の出願・登録状況	8

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 講師）

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。これまでに生体毒性が報告されている70nmのナノシリカを用いて、培養細胞における中・長期毒性評価モデルを構築したことから、より広範のナノマテリアルを簡便に細胞内へ導入する実験系の確立をおこなった。また、ナノマテリアルは水溶液中での強固な凝集を起こすことが知られており、ナノ粒子に特化した評価が非常に困難であることから、医薬品添加物として使用されるヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノ分散系について検討をおこなった。

まず、構築した中・長期毒性評価モデルを用いて、これまで評価系の構築に用いていたナノシリカ以外のナノマテリアルを用いて本評価系における毒性評価を行った。その結果、100nm以下の1次粒子径を持つ酸化チタン（ルチル型）、酸化アルミニウムを用いた検討を行ったところ、いずれのナノマテリアルにおいてもナノシリカのような強い細胞増殖能の低下は観察されなかった。そこで、本評価系における各ナノマテリアルの細胞培養液中の平均粒子径を測定したところ、ナノシリカ以外のナノマテリアルはいずれも100nm以上のサイズであった。そこで、ナノサイズの特徴が十分に発揮されていないのではないかと考え、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノマテリアルのナノ分散系構築を試みた。その結果、分散時にヒドロキシプロピルメチルセルロースを添加し、超音波処理を組み合わせることで多様なマテリアル（シリカ、酸化チタン、酸化アルミニウム）を、水溶液中でナノサイズに分散可能であることを明らかとした。本分散系は、マテリアル粒子に表面修飾を施すことなく水溶液中でナノサイズに懸濁可能であることから、長期毒性評価モデルによる種々のナノマテリアルを用いた検討に有用と考えられる。

これら結果は、研究事業の最終年度において、確立した培養細胞における中・長期毒性評価モデルとナノサイズに分散させた種々の表面特性の異なるナノマテリアルを用いた評価に必要な成果であり、最終目標であるナノマテリアルの安全性指標となる分類表の作製が可能になると考えている。

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反面、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。これまでに生体毒性が報告されている70nmのナノシリカを用いて、培養細胞における中・長期毒性評価モデルを構築したことから、より広範のナノマテリアルを簡便に細胞内へ導入する実験系の確立をおこなった。また、ナノマテリアルは水溶液中での強固な凝集を起こすことが知られており、ナノ粒子に特化した評価が非常に困難であることから、医薬品添加物として使用されるヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノ分散系の確立をおこなった。

B. 研究方法

各種マテリアルの水中および細胞培養液中の粒子径測定

ナノマテリアルの多くは、水溶液中において強固な凝集体を形成することが知られていることから、本検討で用いた各種マテリアルの分散溶液の違いによる平均粒子径について測定した。

各マテリアル

シリカ

- silica(12) (12nm Silica nanopowder, sigma)
- silica(70) (Fluorescent 70nm Sicastar®plain, micromod)
- silica(300) (Fluorescent 300nm Sicastar®plain, micromod)

酸化チタン

- TiO₂(21) (21nm Titanium oxide nanopowder, sigma)
- TiO₂(300) (300nm Sicastar(TiO₂), micromod)

酸化アルミニウム

- Al₂O₃(13) (13nm Aluminum oxide nanopowder, sigma)
- Al₂O₃(300) (300nm Sicastar(Al₂O₃), micromod)

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D6429, SIGMA)

操作

各ナノマテリアルが50mg/mlになるように精製水にて懸濁させた。その後、超音波装置(TOMY SEIKO, Handy Sonic, UR-20P)により各ナノマテリアル溶液を超音波処理し、水または細胞培養液にて希釈して、ダイナミック光散乱光度計を用いて平均粒子径を測定した。

各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 急性毒性評価（細胞播種後作用）

生体組織への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ナノシリカを用い、細胞毒性評価系をすでに構築している。本検討では、平均粒子径の異なるシリカ、酸化チタン、酸化アルミニウムを用いることで、マテリアルの短期的な毒性について網羅的に検討した。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D6429, SIGMA)

使用マテリアル

シリカ

silica(12)

silica(70)

silica(300)

酸化チタン

TiO₂(21)

TiO₂(300)

酸化アルミニウム

Al₂O₃(13)

Al₂O₃(300)

操作

2x10⁴のHepG2細胞を48well plateに播種し、24時間培養した。その後、150μl/wellで各マテリアル(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml)を20時間作用した。20時間後にPBSにて2回洗浄後、Alamar Blue溶液 (Biosource) を200 μl/wellにて37度、3時間作用させた。3時間後に培養メディウムを回収し、メディウムの蛍光強度 (540/590) を測定し、生細胞数を評価した。

各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 急性毒性評価 (細胞播種時作用)

生体組織への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ナノシリカを用い、細胞毒性評価系をすでに構築している。本検討では、ナノマテリアルの毒性評価の検出感度の向上と測定時間の短縮を目的に、細胞播種時にナノマテリアルを作用させた。また、平均粒子径の異なるシリカ、酸化チタン、酸化アルミニウムを用いることで、マテリアルの短期的な毒性について網羅的に検討した。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D6429, SIGMA)

使用マテリアル

シリカ

silica(12)

silica(70)

silica(300)

酸化チタン

TiO₂(21)

TiO₂(300)

酸化アルミニウム

Al₂O₃(13)

Al₂O₃(300)

操作

2x10⁴のHepG2細胞を48well plateに播種し、播種時に全量150μl/wellになるように調整し、各マテリアルを20時間作用した。その際の、各マテリアル濃度は、(0, 0.25, 0.5, 1.0, 2.0, 4.0 mg/ml)とした。20時間後にPBSにて2回洗浄後、Alamar Blue溶液 (Biosource) を200 μl/wellにて37度、3時間作用した。3時間後に培養メディウムを回収し、メディウムの蛍光強度 (540/590) を測定し、生細胞数を評価した。

各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 中・長期毒性評価 (細胞播種時作用)

生体組織への中・長期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ナノシリカを用い、細胞増殖能への影響について検討している。本検討では、すでに構築したナノマテリアルの細胞増殖能への影響を、平均粒子径の異なるシリカ、酸化チタン、酸化アルミニウムを用いて検討した。これらの検討により、マテリアルの細胞増殖能への影響について網羅的に解析した。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D6429, SIGMA)

使用マテリアル

シリカ

silica(70)

silica(300)

酸化チタン

TiO₂(21)

TiO₂(300)

酸化アルミニウム

Al₂O₃(13)

Al₂O₃(300)

操作

2x10⁴のHepG2細胞を48well plateに播種し、播種時に全量150μl/wellになるように調整し、各マテリアルを20時間作用した。その際の、各マテリアル濃度は、0.5 mg/mlとした。20時間後にPBSにて2回洗浄後、2.5 μg/mlのトリプシンにより剥離し、12 well plateまたは6 well plateに3x10⁴ cells/wellにて播種した。培養1, 3, 5, 7日後にPBSにて2回洗浄後、Alamar Blue溶液 (Biosource) を加えたメディウムを作用させ37度にて3時間培養した。3時間後に培養メディウムを回収し、メディウムの蛍光強度 (540/590) を測定し、生細胞数を評価した。

ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いた各種マテリアルの細胞培養液中ナノ分散系の確立

ナノマテリアルの多くは、水溶液中において強固な凝集体を形成することが知られている。このことから、本検討ではヒドロキシプロピルメチルセルロース (HS) を用いた凝集抑制効果について、細胞培養液中でのナノマテリアルの平均粒子径を測定することで評価した。

分散試薬

ヒドロキシプロピルメチルセルロース (サンジェローズ60L, パウレック)

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (D6429, SIGMA)

使用マテリアル

シリカ

silica(12)

酸化チタン

TiO₂(21)

酸化アルミニウム

Al₂O₃(13)

操作

ヒドロキシプロピルメチルセルロースを3mg/mlになるように精製水にて調整した。各ナノマテリアルを50mg/mlになるようにヒドロキシプロピルメチルセルロース溶液にて懸濁させた。その後、超音波装置 (TOMY SEIKO, Handy Sonic, UR-20P) により各ナノマテリアル溶液を超音波処理し、細胞培養液にて希釈して、ダイナミック光散乱光度計を用いて平均粒子径を測定した。

ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノシリカ分散系による*in vitro*中・長期毒性評価 (細胞播種時作用)

培養細胞への中・長期毒性評価において、ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノ材料のナノ分散系による評価が可能であるかナノシリカを用いて検討した。

分散試薬

ヒドロキシプロピルメチルセルロース（サンジェローズ60L，パウレック）

使用マテリアル

シリカ

silica(12)

操作

2x10⁴のHepG2細胞を48well plateに播種し、播種時に全量150μl/wellになるように調整し、0.5 mg/mlのナノシリカを20時間作用した。20時間後にPBSにて2回洗浄後、2.5 μg/mlのトリプシンにより剥離し、12 well plateまたは6 well plateに3x10⁴ cells/wellにて播種した。培養1, 3, 5, 7日後にPBSにて2回洗浄後、Alamar Blue溶液（Biosource）を加えたメディウムを作用させ37度にて3時間培養した。3時間後に培養メディウムを回収し、メディウムの蛍光強度（540/590）を測定し、生細胞数を評価した。

C. 研究結果

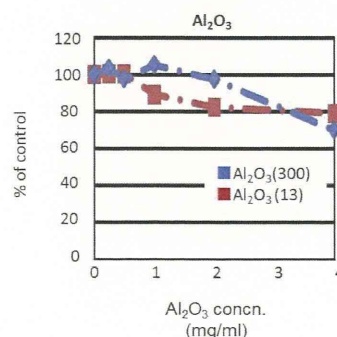
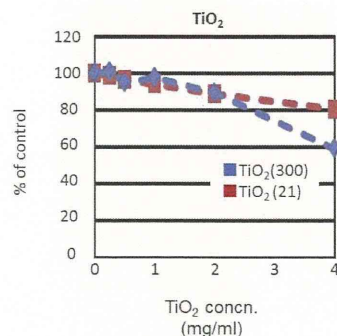
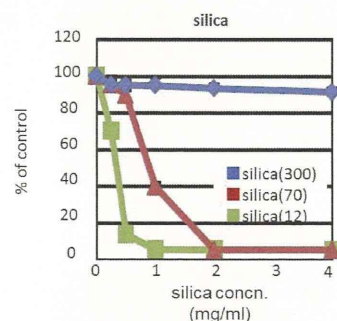
各種マテリアルの水中および細胞培養液中の粒子径測定

各マテリアルの水中および細胞培養液中での粒子径を測定した結果、1次粒子径の小さいマテリアルほど、凝集能が高く平均粒子径が増大していることが明らかとなった。また、精製水中よりも、細胞培養液中での粒子径が大きくなる傾向にあり、これは細胞培養液中に存在する各種イオンの影響によるものと考えられる。一般的には1次粒子径と粒子の表面積が比例することから、マテリアルの表面特性は保持されると考え、各種培養細胞への毒性評価について、検討することとした。

平均粒子径(nm)			
マテリアル	1次粒子径(データシート参考)	水中分散	細胞培養液中分散
silica(12)	12.0	419.7±53.3	1140.4±152.7
silica(70)	70.0	62.1± 0.8	114.5± 8.5
silica(300)	300.0	308.6± 5.4	265.2± 31.3
TiO ₂ (21)	21.0	317.1±23.2	453.1± 64.6
TiO ₂ (300)	300.0	275.4± 1.6	387.6± 11.0
Al ₂ O ₃ (13)	13.0	301.1± 6.8	1067.1±188.6
Al ₂ O ₃ (300)	300.0	270.7± 7.7	415.9± 16.9

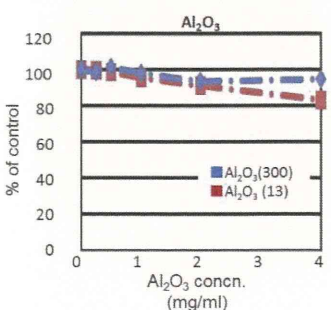
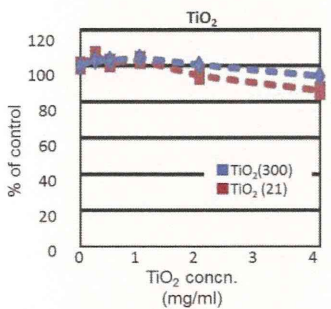
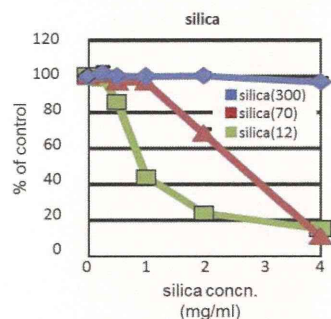
各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 急性毒性評価（細胞播種後作用）

これまでの多数の研究報告と同様、12, 70 nmのナノシリカでは濃度依存的な細胞障害性が観察され、1次粒子径の小さいもので強い細胞障害性が認められた。シリカ粒子においても300 nmのシリカでは細胞障害性は見られなかった。また、酸化チタンおよび酸化アルミニウムにおいては、細胞障害性は認められず、1次粒子径の違いによる差も認められなかった。



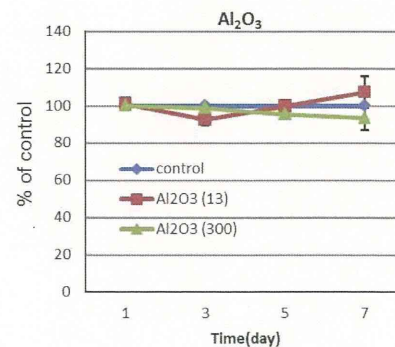
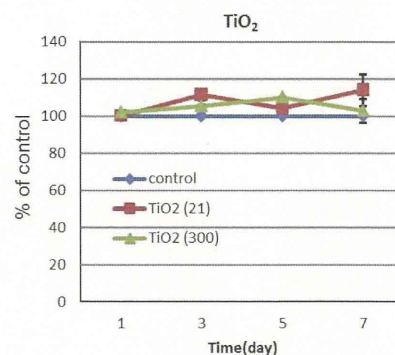
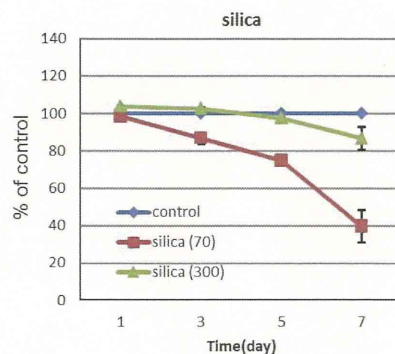
各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 急性毒性評価（細胞播種時作用）

前述の細胞播種後のナノマテリアル作用時と同様、12, 70 nmのナノシリカでは濃度依存的な細胞障害性が観察され、1次粒子径の小さいもので強い細胞障害性が認められた。また、シリカ粒子においても300 nmのシリカでは細胞障害性は見られなかった。酸化チタンおよび酸化アルミニウムにおいては、細胞障害性は認められず、1次粒子径の違いによる差も認められなかった。しかしながら、細胞播種時にナノマテリアルを作用させた場合において、高濃度のマテリアル作用時に生細胞数の減少が認められた。この結果より、細胞播種後または細胞播種時にナノマテリアルを作用させた細胞障害性評価は、比較的低濃度では同様の結果であることが示された。中・長期的細胞増殖能に対する影響を検討する際（0.5mg/ml以下）、細胞播種時にナノマテリアルを作用させることによる直接的な毒性の影響は小さいと考えられる。



各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 中・長期毒性評価（細胞播種時作用）

急性毒性評価系においては、ナノシリカのみが濃度依存的な細胞障害性を示すことが示された。ナノシリカはこれまでの検討より、中・長期的な細胞増殖抑制能があることも明らかとしていることから、酸化チタンおよび酸化アルミニウムにおいても細胞増殖能に関する検討を行った。その結果、短期的な細胞障害性の検討と同様に、中・長期的な細胞増殖抑制能に関しても、ナノシリカ以外のナノマテリアルでは顕著な差は認められなかった。



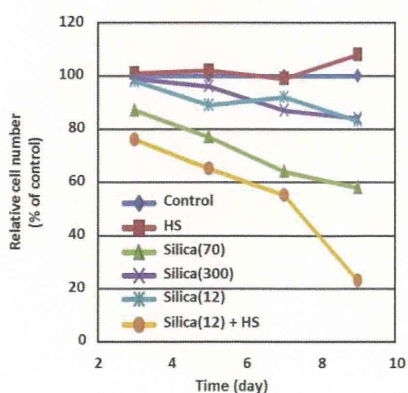
ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いた各種マテリアルの細胞培養液中ナノ分散系の確立

水または細胞培養液中でのナノマテリアルの粒子径は、非常に大きくなり、溶液中では平均粒子径が100nm以上となっていた。そこで、分散剤として医薬品添加物にも用いられているヒドロキシプロピルメチルセルロースを用い、ナノ分散系の確立をおこなった結果、各ナノマテリアルの細胞培養液中の平均粒子径を100nm以下にすることが可能であった。ナノサイズでの水中分散が可能であったことから、培養細胞等への影響についてナノサイズ特有の現象が捉えられる系の確立が可能になると考えられる。

ナノマテリアル	メディウム中粒子径 (nm)	
	単純分散	HS分散
酸化チタン(ルチル型) (21nm)	453	60
酸化アルミニウム (13nm)	1067	40
シリカ (12nm)	1140	85

ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノシリカ分散系による *in vitro* 中・長期毒性評価 (細胞播種時作用)

これまで、中・長期的な細胞増殖抑制がみられているナノシリカを用いて検討を行った。ヒドロキシプロピルメチルセルロースを用いたナノ分散調整法にて調整したナノシリカの中・長期的な細胞増殖抑制能について検討したところ、ナノ分散をしたシリカにおいて最も顕著な細胞増殖抑制が認められた。また、ヒドロキシプロピルメチルセルロースのみにおいては、細胞障害性および細胞増殖抑制は認められなかった。



D. 考察

本年度においては、ナノシリカと培養細胞を用いて構築した急性毒性評価系、および中・長期的な細胞増殖抑制評価系について、種々のナノマテリアル（酸化チタン、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した。その結果、ナノシリカ以外では、顕著な差は認められず、本評価系において毒性は認められなかった。酸化チタンおよび酸化アルミニウムはマウスへの投与後の免疫反応の惹起が報告されていることから、本評価系における毒性は直接的な細胞障害についてのみ検出が可能と推察される。今後、免疫細胞を用いて免疫反応の誘導を評価可能な評価系についても確立したいと考えている。また、培養細胞を用いた毒性評価系を用いる際に懸念される、ナノマテリアルの凝集性に関しても、医薬品添加物として用いられるヒドロキシプロピルメチルセルロースを利用することにより、水溶液中でのナノ分散が可能となった。ナノマテリアルは、その粒子径の小ささと表面積の増大により、物理的表面特性が先鋭化されて、生体毒性が増幅されると考えられる。このことから、ナノマテリアルの障害性を正確に測定するためには、ナノサイズの安定的な分散系を確立した意義は大きく、今後の検討に重要な成果を達成することができたと考えられる。

E. 結論

本年度においては、上記に示した検討を行い培養細胞を用いた中・長期的な毒性評価系における各種ナノマテリアルの評価を行った。また、ナノサイズの安定的な分散系を確立し、評価系への利用が可能であることを示した。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、最終年度においては種々の表面特性を持ったナノマテリアル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

小泉直也、三上真智子、藤井まき子、渡辺善照：*in vitro* ナノマテリアル毒性評価における細胞膜分布型 HSP の有用性

日本薬学会第134年会、2014年3月28日（開催地：熊本）

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

