

201428023A

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26年度 研究報告書

研究代表者 小泉 直也

平成27(2015)年 5月

目 次

I. 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）研究年度終了報告書

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、ナノマテリアル作用による細胞増殖性の抑制機構について、検討するため細胞周期の変動について検討を行った。また、ナノシリカ粒子との細胞内相互作用分子として、ヒートショックプロテイン（HSP）が候補として検出されたことから、ナノ粒子とヒートショックプロテインの相互作用形式の解明に関する検討をおこなった。

まず、構築した中・長期毒性評価モデルを用いて、細胞増殖性の低下が認められたナノシリカを作用後の細胞周期を測定したところ、ナノサイズのシリカ粒子を作用させた際にのみ細胞分裂速度が遅くなることが示された。また、ナノシリカ粒子による細胞周期の停滞はG2期に強く認められたことから、ナノシリカ粒子特異的なメカニズムの存在が示唆された。そこで、ナノシリカ粒子の相互作用分子の同定を目的に、プルダウンアッセイの改変法により、ナノシリカの沈降分画にHSPが存在することを明らかとした。次に、組み換えHSPを用いてシリカ粒子との結合性を検討したところ、直接の結合は認められなかった。しかしながら、アルブミンタンパク質の共存によりシリカ粒子とも間接的な結合をすることが明らかとなり、ナノ粒子とHSPタンパク質が生体内で相互作用する可能性が示された。

これら結果は、ナノシリカを中心としてナノ粒子と生体分子との相互作用の一端を明らかとしたものであり、中・長期毒性評価モデルにより引き起こされる細胞増殖性の低下を引き起こすメカニズムの解明の一助になると考えられる。ナノマテリアルの長期的な細胞への影響について、詳細なメカニズムが明らかとなることで、簡便な安全性評価基準の確立にもつながることから非常に有用な成果であると考えられる。

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から中・長期的な生体影響を予測可能な、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様々な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、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を確立した。本ナノ分散系を用いて、生体障害性および培養細胞を用いた毒性等が報告されている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用いてナノ分散系の有用性を評価したところ、ナノ粒子による細胞増殖抑制が観察された。そこで、本年度においては、ナノ粒子による細胞増殖抑制のメカニズムおよび生体

分子との相互作用について検討をおこない、安全性評価の指標確立にむけ検討をおこなった。

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 Sicas tar®plain, micromod)
- silica(300) (Fluorescent 300nm Sicas tar®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 (DMEM : 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* 中・長期毒性評価

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

DMEM

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 we

ll 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。

ナノシリカ作用時の細胞増殖抑制メカニズムの解明

化学物質の安全性を評価するためには、その評価系の妥当性が非常に重要となってくる。ナノシリカの作用により細胞増殖能の低下が認められたことから、そのメカニズムを解明することで長期的な細胞機能への影響が検出されているのかについて検証をおこなった。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

DMEM

使用マテリアル

シリカ

silica (70)

silica (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。翌日、2.5 mM Thymidine/DMEMにて、20時間培養し、細胞周期を揃えた。20時間後に、PBSにて洗浄後メディウムを加え、培養0, 8, 10, 12, 14, 16, 18時間後に2.5 μg/mlのトリプシンにより剥離し、細胞を回

収した。回収した細胞を、2% formaldehyde/PBSにて15分間固定後、氷冷した70%エタノール溶液を加え、氷上にて30分間放置した。30分後、遠心し、上清を除去し50 μ g/ml Rnase A、50 μ g/ml PI の PBS 溶液を加え、37度30分間作用させた。PBSにて2回洗浄後フローサイトメトリー (FACScaliber, BD) にて、細胞周期の測定を行った。

ナノシリカとの相互作用分子の探索

ナノ粒子の生体への影響を考える場合、特定の分子との相互作用が明らかとなれば、その影響と生体毒性が予測しやすくなる。さらに、相互作用分子の機能から安全性試験では明らかとならない生体影響についても推察することが可能となる。そこで、水中でのナノマテリアルのナノ分散系を確立したことで、凝集体との相互作用分子とは異なる生体分子の検出が可能と考え、その探索を試みた。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

DMEM

分散試薬

ヒドロキシプロピルメチルセルロース (サンジェロース60L, パウレック)

使用マテリアル

シリカ

silica(12)

silica(70)

silica(300)

操作

HSにて分散したsilica(12)、silica(70)、silica(300)を精製水にて希釈し、100 μ g/mLの濃度に調整した。また、1000 μ g/mLのHepG2細胞溶解液100 μ Lと混合し、4 $^{\circ}$ Cで2時間ロー

ーションした(lysis buffer:1% TritonX-100/DW)。2M NaClを少量ずつ添加し、遠心分離後の上清を除去し、沈殿にlysis bufferを加え、転倒混和を10回行った後に、遠心分離して上清を除去する操作を5回行った。沈殿画分に4 \times SDS bufferを加えて、97 $^{\circ}$ C、3分間で熱処理した。グラジュエントゲル(5-20%, e-PAGEL)に熱処理したサンプルを加え、SDS-PAGE(0.02 A/枚、約90分)を行った。その後電気泳動後のグラジュエントゲルを超純水で洗浄し、銀染色MSキット(和光純薬)を用いて銀染色を行った。

電気泳動したゲルを100 mLの固定液1(メタノール50 mL, 酢酸5 mL, 超純水45 mL)に浸し、20分間振とうした。固定液1を除去し、ゲルを100 mLの固定液2に浸し、10分間振とうした。その後、固定液2を除去し、ゲルを100 mLの超純水に浸し、10分間振とうした。超純水を除去した後、ゲルを100 mLの増感液(増感原液10 mL, 超純水90 mL)に浸し、1分間振とうした。増感液を除去し、ゲルを100 mLの超純水に浸し1分間振とうし、これを2回行った。超純水を除去した後、ゲルを100 mLの染色液(染色原液10 mL, 超純水90 mL)に浸し、20分間振とうした。染色液を捨て、100 mLの超純水に浸し1分間振とうする操作を2回行った。超純水を除去し、ゲルを100 mLの現像液中に浸し、適当な染色像が得られるまで3から10分間振とうし、10 mLの停止液を加え約1分間振とうした。現像液を除去し、ゲルを100 mLの超純水に浸し、1分間振とうさせる操作を3回繰り返した。

銀染色を行ったアクリルアミドゲルより、特異的なバンドを有する部位を切り出し、nano LC-MS/MS(和光純薬に委託解析)により解析した。

ナノシリカおよびHSPとの相互作用機構の解析

ナノシリカ粒子との相互作用分子として、ヒートショックプロテイン (HSP) ファミリーが検出されたことから、相互作用機構の解明を目的に、検討をおこなった。

使用マテリアル

シリカ

silica(70)

silica(300)

タンパク質試薬

ニワトリ卵白由来 アルブミン (OVA:Sigma)

サンプル

HSC70 タンパク質 (HSC70:StressMarq Biosciences Inc)

操作

Ni-NTA HisSorb™ Plate (QIAGEN) に 0.2% ウシ血清アルブミン (Sigma-Aldrich) /ダルベッコリン酸緩衝生理食塩水 (D-PBS) で希釈した 0.5 µg/mL HSC70 タンパク質を 150 µL/well 加え plate を、4°C で一晩作用させた。翌日 HSC70 タンパク質溶液を除去し、PBS-T (0.05% Tween-20/PBS) を加え、4 回洗浄した。その後、1% OVA/DW にて希釈したシリカ溶液を 4°C で 2 時間振とうした。2 時間後 2M NaCl を少量ずつ添加し、遠心分離後の上清を除去し、OVA 作用シリカ粒子とした。OVA を表面に結合させたシリカ粒子を HSC70 を固定化した plate に作用させ、4°C で 2 時間振とうした。2 時間後、PBS-T にて洗浄を 4 回行い、蛍光強度 (488/509 nm) を測定した。

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

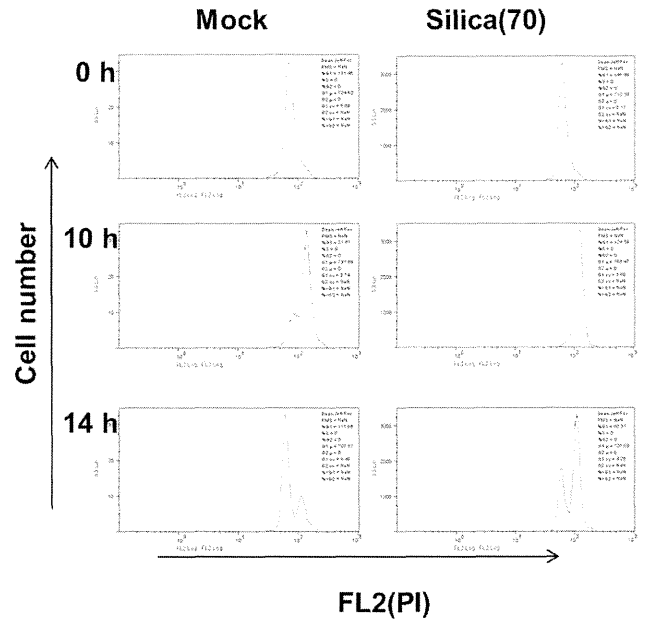
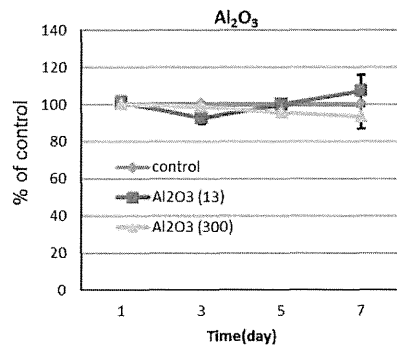
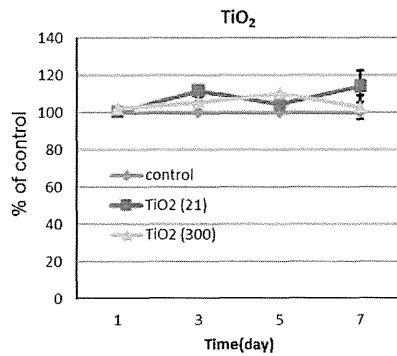
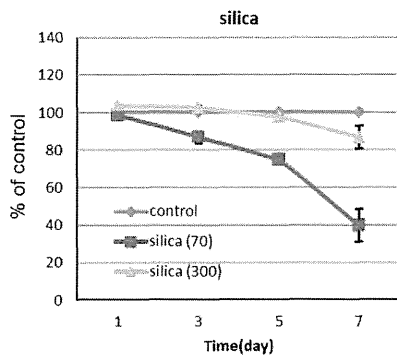
各マテリアルの水中および細胞培養液中で

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られる。しかしながら、二次粒子径により培養細胞に取り込まれるマテリアル量やマテリアルの分布および排泄等の挙動は変化することが予想されることから、二次粒子径も100nm以下に保つような分散系の開発は必要と考えられる。

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* 中・長期毒性評価

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ることを報告してきた。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。よって、生体への影響を検出するための評価系構築のためには、ナノシリカ粒子を用いて評価系を確立することが必要と考えた。

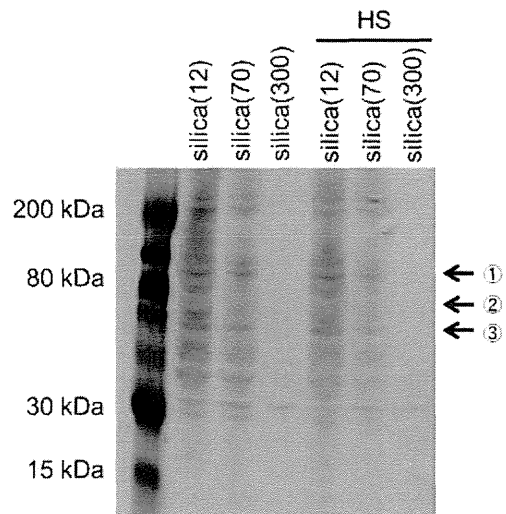


ナノシリカ作用時の細胞増殖抑制メカニズムの解明

*in vitro*中・長期的毒性評価において、ナノシリカにおいてのみ長期的な細胞増殖性の低下が示された。これまでの検討により、細胞障害性は変化しておらず、増殖能のみが変化していることを明らかとしていることから、細胞周期の検討を行った。その結果、ナノシリカを作用させた際において、細胞周期の減速が起こっており、特にG2期への停滞が顕著に認められた。詳細な検討が求められるが、M期の分裂過程に入れないことから、細胞核または紡錘体、細胞膜等への影響が引き起こされているのではないかと考えられる。

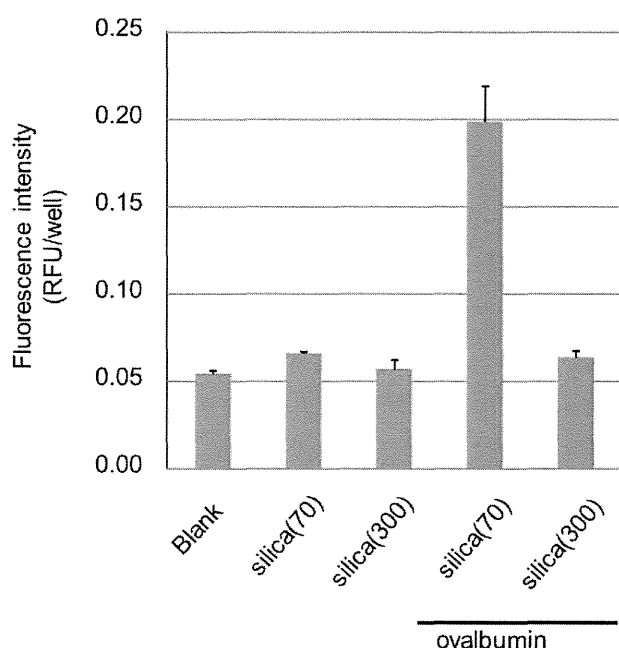
ナノシリカとの相互作用分子の探索

ナノシリカ粒子による長期的な細胞増殖抑制、その際の細胞周期の停滞が観察されたことから、特定の生体分子との相互作用があるのではないかと考え、相互作用分子の同定を試みた。その結果、これまで報告したナノマテリアルのナノ分散系を用いて、プルダウンアッセイにより結合分子を検出したところ、HSPファミリーが検出された。HSPタンパク質は細胞が各種ストレスを受けることにより細胞核への移行が報告されており、ナノシリカ粒子が細胞核へ分布する結果との関連性について検討が必要である。



ナノシリカおよびHSPとの相互作用機構の解析

ナノシリカとの相互作用分子の探索の結果、HSPタンパク質（① HSP90b, ② HSP79, ③ HSC/HSP70）が同定された。そこで、相互作用メカニズムの解明を目的にナノシリカ粒子および組み換えHSC70タンパク質を用いて、結合能について検討した。その結果、シリカ粒子はHSC70タンパク質との直接的な結合能は非常に低いものであり、有意な結合は認められなかった。一方、ナノシリカ粒子は粒子表面に非特異的なタンパク吸着を起こすことをこれまでに明らかとしていることから、アルブミンタンパク質を吸着させたシリカ粒子を用いて、HSC70タンパク質との結合能について検討した。その結果、ナノサイズのシリカ粒子でのみHSC70との結合が認められ、HSPファミリーはシリカ粒子表面に吸着したタンパク質と結合していることが示唆された。細胞内でも同様の現象が起こっている可能性があることから、本現象もナノマテリアルの生体分布および生体毒性等に影響を及ぼしている可能性が考えられる。



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中・長期的な細胞増殖抑制評価系において観察されたナノシリカ粒子による細胞増殖性の抑制メカニズムについて検討を行った。その結果、ナノシリカ粒子による細胞増殖抑制効果は、細胞周期の停滞により引き起こされることが明らかとなった。また、その細胞周期はG2期への停滞であり、細胞分裂期であるM期への移行をシリカ粒子が阻害している可能性が示された。一方、細胞周期の停滞が分子特異的なメカニズムによる現象であるかの検討を行ったところHSPファミリーとの相互作用が明らかとなり、その結合は非特異的なナノシリカ粒子表面に吸着したタンパク質を介したものであることが示唆された。

ナノマテリアルはその表面積の大きさから非特異的なタンパク質吸着や核酸等の吸着も報告されている。本検討結果からも、ナノサイズにすることで、吸着タンパク質を介したHSPタンパク質との結合量が大きくなっており、この相互作用がナノマテリアルの分布等に影響していることが考えられる。HSPタンパク質は細胞が各種ストレスを受けることにより細胞核への移行が報告されており、ナノシリカが細胞核周辺に分布することが報告されていることから、核への分布にHSPが影響している可能性がある。一方、ナノシリカ粒子が細胞周期に影響することからも、細胞核への分布による影響であることが推察される。化学物質の生体毒性を予測するためには、その生体分子への相互作用を明らかとし、個体における毒性の予測を立てることが必要となる。このことから、ナノマテリアルの障害性を正確に予測するためにメカニズムの一端を解明した意義は大きく、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、中・長期的な毒性評価

系におけるナノシリカのメカニズム解明および相互作用因子の同定をおこなった。これら結果はナノマテリアルの毒性予測に貢献できる成果と考えられる。

F. 研究発表

1. 学会発表

小泉直也、藤井まき子、渡辺善照：疎水化ヒドロキシプロピルメチルセルロースの球状ナノマテリアル分散剤としての有用性
日本薬学会第135年会、2015年3月28日（開催地：兵庫）

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

