

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～26年度 総括研究報告書

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-----	8
考察-----	13
結論-----	13
研究発表-----	14
健康危険情報-----	14
知的財産権の出願・登録状況-----	14

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

本研究事業は、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った。安全性における分類システムを構築することで、安全性の高い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。

3カ年の研究事業により、マウスまたは培養細胞等を用いた検討において生体毒性が報告されているナノシリカを用いて、培養細胞を用いた簡便な中・長期毒性評価モデルを構築し、多種のマテリアルサンプルを迅速に1次スクリーニングとして評価することが可能となった。さらに医薬品添加物としても利用されている疎水化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ことから、水溶液中で100 nm以上の二次粒子径を形成するマテリアルにおいても、ナノサイズのマテリアルに特化した毒性を評価可能となった。さらに、構築した評価系を用いた結果より、ナノシリカは長期的な細胞増殖抑制を誘導し、短期的な障害性だけでなく長期的な細胞機能への影響について新たな知見が得られた。さらに、細胞増殖抑制メカニズムの解析により、細胞周期への影響およびストレスタンパク質の1つであるヒートショックプロテインとの相互作用の可能性についても示唆された。

一方で、簡便な *in vitro* 評価系の構築およびその妥当性の評価に多くの時間が費やされ、最終的な安全性分類システムの構築まで到達することができなかった。しかしながら、これらの成果はマテリアルがナノサイズになることで引き起こされる新たな生体毒性および生体分布等の研究に、非常に有用なものであり、基礎的な技術の確立ができたと考えられることから、本技術および知見から更なる発展をさせることで、有益な安全性分類システムの構築が可能と考えられ、今後の進展が期待される。

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。

本研究事業では、ナノマテリアルの簡便な *in vitro* 評価系の構築およびナノスケールに特化した生体毒性を評価可能な評価方法の確立をおこない、さらに中・長期的なナノマテリアルの影響についてメカニズムを明らかとすることを目的とした。具体的には水溶液中での強固な凝集を起こすことが知られているナノマテリアルに分散剤を用いたナノ分散系を確立した。本ナノ分散系を用い、培養細胞における急性期または中・長期毒性評価モデルを構築した。また、本評価モデルを用いて検討を行ったところ、ナノスケールに特異的な細胞増殖抑制が存在することが明らかとなった。さらに、分子特異的なメカニズムの解

析を行ったところ、ナノマテリアルが細胞核周辺に分布すること、また細胞増殖抑制は細胞周期の進展を阻害していること、さらに細胞内ストレス応答分子であるヒートショックプロテインとの相互作用が示唆されることを見出した。これら評価系の構築と、細胞増殖抑制機構能解明は、慢性的なナノマテリアルの安全性評価に貢献できると考えられる。

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 (DMEM : SIGMA)

操作

各ナノマテリアルが50 mg/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。

疎水化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、本検討では疎水化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

疎水化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 (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

HSを3 mg/mlになるように精製水にて調整し、95 30分間攪拌後、氷冷下において60分間攪拌した。各ナノマテリアルを50 mg/mlになるようにHS溶液にて懸濁させた。その後、超音波装置 (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。

in vitro急性毒性評価系の構築

ナノマテリアル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た細胞毒性評価系の構築を行った。本検討では、多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*での急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

シリカ

silica(70)

silica(300)

操作

各細胞を12 well plateに3x10⁵ 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。

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)

培養細胞への毒性能を反映する簡便な評価系を確立したことから、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 (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200μl/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)

培養細胞への毒性能を反映する簡便な評価系を確立したことから、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 (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200μl/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。

疎水化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急性毒性評価(細胞播種時作用)

HSを用いたナノマテリアルのナノ分散系を確立していることから、HSのナノマテリアル細胞障害性への影響について検討し、評価系へのHSの利用が可能であるか各種ナノマテリアルを用いて検討した。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

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

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)

酸化チタン

TiO₂(21)

酸化アルミニウム

Al₂O₃(13)

in vitro慢性毒性評価系の構築

培養細胞を用いた細胞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

細胞培養液

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

使用マテリアル

シリカ

silica(70)

silica(300)

操作

各細胞を2.5 μg/mlのトリプシンによりdishより剥離し、12 well plateに3x10⁵ 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 μg/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。

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)

培養細胞を用いた細胞慢性毒性能を反映する評価系を確立したことから、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、マテリアルの中・長期毒性への影響について解析した。

細胞

HepG2細胞：ヒト肝癌細胞

細胞培養液

Dulbecco's Modified Eagle's Medium - high glucose (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48 well plateに播種し、播種時に全量150 μl/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。

疎水化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)

培養細胞を用いた中・長期毒性評価系が構築されたことから、HSを用いたナノマテリアル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。

細胞

HepG2細胞: ヒト肝癌細胞

細胞培養液

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

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

2×10^4 の HepG2 細胞を 48 well plate に播種し、播種時に全量 150 μ l/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 μ g/ml のトリプシンにより剥離し、12 well plate または 6 well plate に 3×10^4 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。

in vitro 中・長期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評

価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

使用マテリアル

シリカ

silica(70)

silica(300)

操作

A549細胞を 2.5 μ 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 μ 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。

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

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

使用マテリアル

シリカ

silica(70)

silica(300)

操作

2×10^4 の HepG2 細胞を 48well plate に播種し、播種時に全量 $150 \mu\text{l}/\text{well}$ 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、 $2.5 \mu\text{g/ml}$ のトリプシンにより剥離し、12 well plate または 6 well plate に $3 \times 10^4 \text{ cells/well}$ 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 にて洗浄後メディアムを加え、培養 0, 8, 10, 12, 14, 16, 18 時間後に $2.5 \mu\text{g/ml}$ 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 $50 \mu\text{g/ml}$ Rnase A、 $50 \mu\text{g/ml}$ 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

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

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、 $100 \mu\text{g/mL}$ の濃度に調整した。また、 $1000 \mu\text{g/mL}$ のHepG2細胞溶解液 $100 \mu\text{L}$ と混合し、4 で2時間ローテーションした(lysis buffer: 1% TritonX-100/DW)。 2M NaClを少量づつ添加し、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 $4 \times \text{SDS}$ bufferを加えて、 $97 \text{ }^\circ\text{C}$ 、3分間で熱処理した。グラジエントゲル ($5\text{-}20\%$, 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 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 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 で 2 時間振とうした。2 時間後、PBS-T にて洗浄を 4 回を行い、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。

マテリアル	平均粒子径 (nm)		
	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

疎水化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HS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	メディアム中粒子径 (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

*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を構築が可能と考えた。

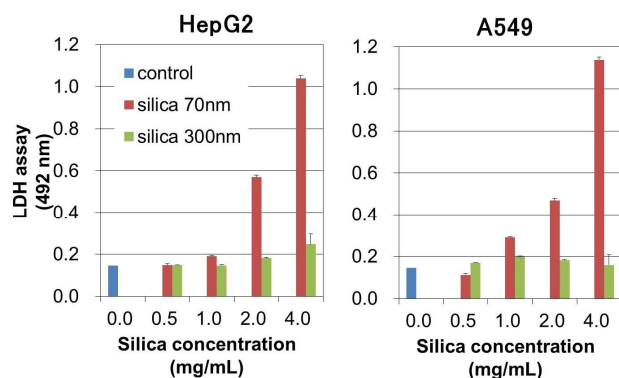
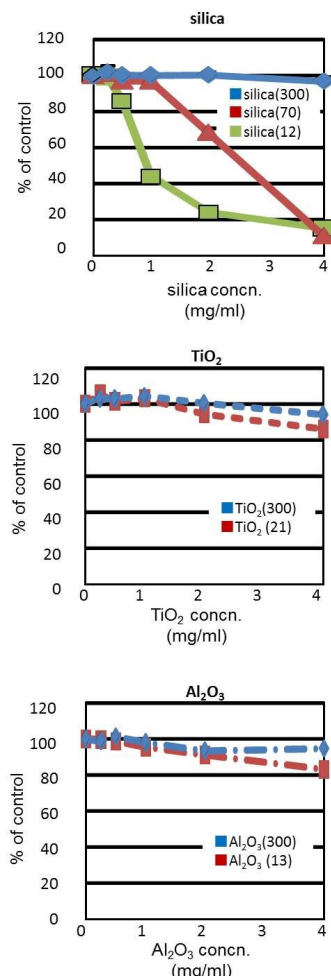


図 *in vitro*急性毒性評価系を用いたナノシリカによる細胞障害性

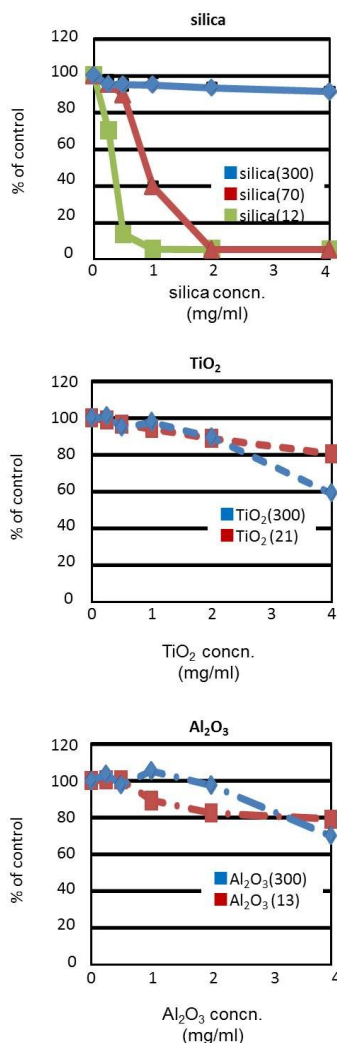
各種ナノマテリアルを用いた *in vitro*急性毒性評価 (細胞播種後作用)

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。



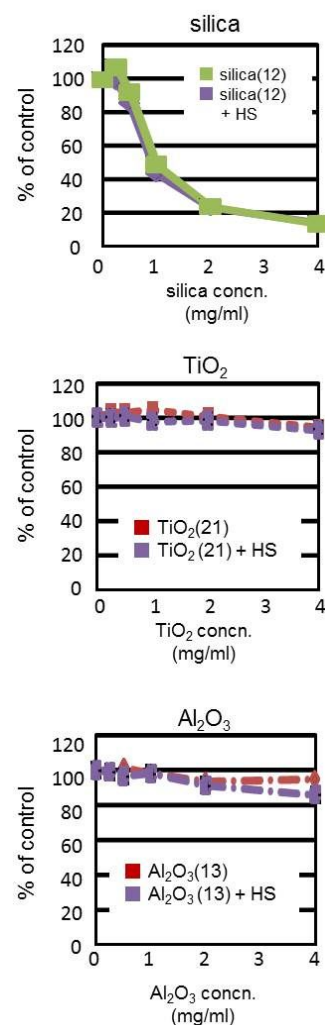
各種ナノマテリアルを用いた *in vitro* 急性毒性評価（細胞播種時作用）

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。



疎水化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* 急性毒性評価（細胞播種時作用）

これまで、急性毒性評価系がみられているナノシリカを用い、HSを用いたナノ分散調整法にて調整したナノシリカの障害性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障害性が認められた。また、酸化チタンおよび酸化アルミニウムに関してはHSの有無にかかわらず細胞障害性は見られなかった。よって、HSはナノマテリアルの表面特性に影響を与えず、本評価系に利用可能であることが示された。



in vitro 慢性毒性評価系の構築

急性毒性評価系はこれまでも多くの報告がされており、他の研究報告においてもナノシリカが強い細胞障害性を示すことが明らかとなっている。しかしながら、生体毒性にお

ける問題点として、中・長期的な慢性毒性の有無について検討する必要がある。本検討では、細胞をトリプシン処理し、70 nmの蛍光ナノシリカを作用させることで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。さらに本シリカ作用細胞を培養したところ、細胞障害性の指標であるLDHの放出は低い一方で、経時的な細胞増殖能の低下が観察された。また、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。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。

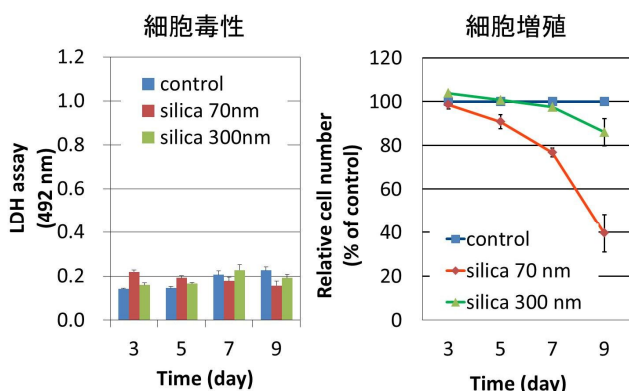
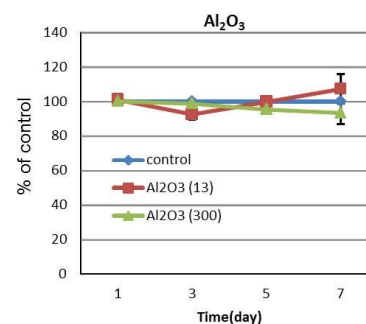
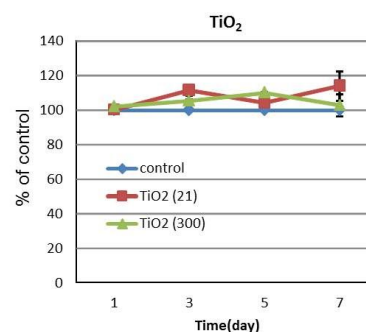
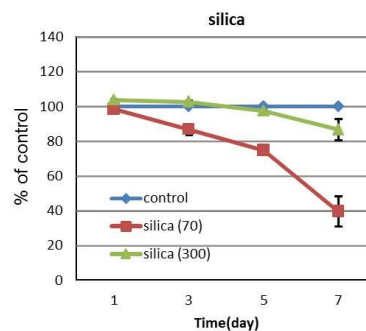


図 *in vitro*慢性毒性評価系を用いたナノシリカによる細胞増殖抑制

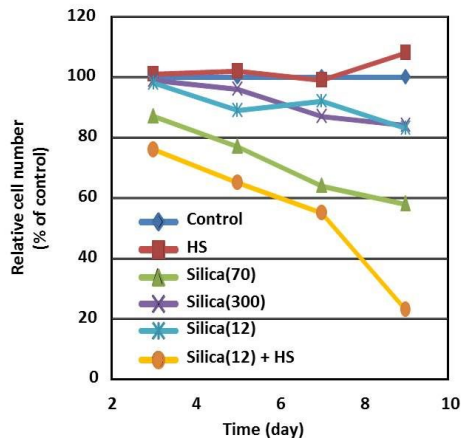
各種ナノマテリアルを用いた*in vitro*中・長期毒性評価

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。ナノシリカを用いた検討より、中・長期的な細胞増殖抑制が検出可能であることが示されたことから、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。



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、HS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、HS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ことから、HSは本評価系に利用可能であることが示された。



in vitro慢性毒性評価系における蛍光シリカの細胞内分布

中・長期的な細胞増殖抑制が認められたナノシリカ作用時のシリカ粒子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ると判断した。

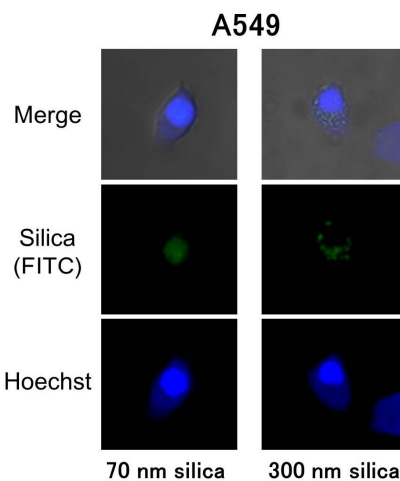
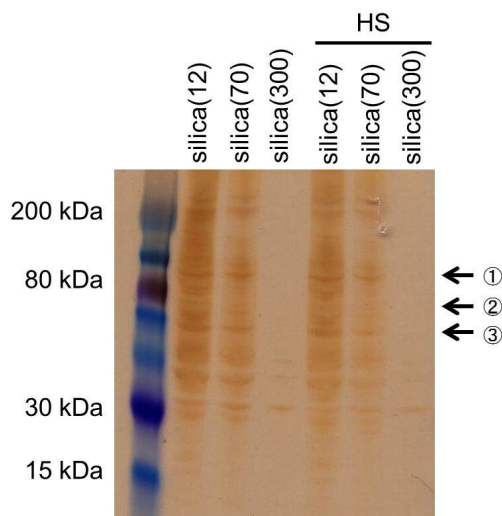


図 *in vitro*慢性毒性評価系を用いた蛍光シリカの細胞内分布

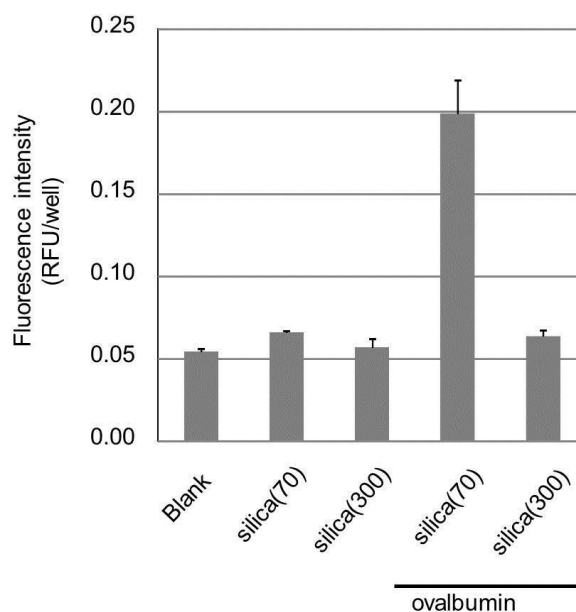
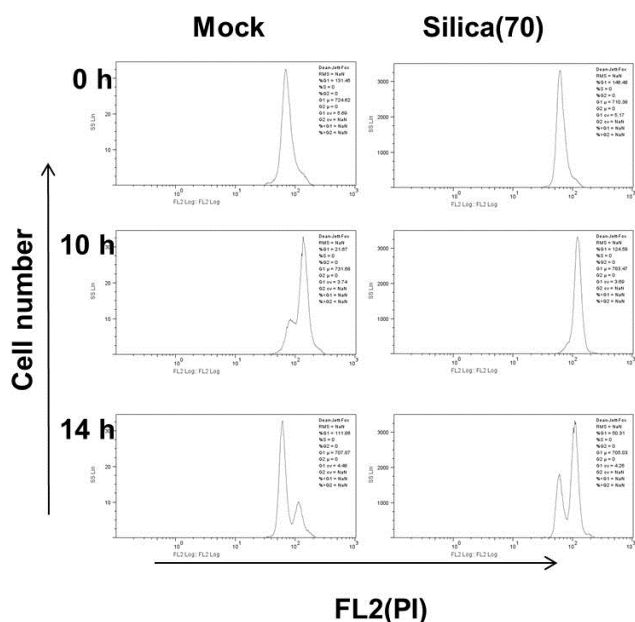
ナノシリカ作用時の細胞増殖抑制メカニズムの解明

*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（HSP90b, HSP79, 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

本研究事業においては、ナノマテリアルの慢性毒性を予測可能な評価系の構築と、その解析結果からマテリアルの物性より安全性を予測するシステムの構築が最終目標であった。しかしながら、簡便な*in vitro*評価系の構築およびその妥当性の評価に多くの時間が費やされ、最終的なシステムの構築まで到達することができなかった。しかしながら、簡便な培養細胞を用いた中・長期的な細胞毒性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抑制機構の解明、およびその抑制メカニズムについて一端を解明できたことは今後の評価系の妥当性検証に有用な成果であると考えられる。さらに、水溶液中でのナノスケールに特化した評価が可能なHSを用いた分散系の構築は、今後広くナノマテリアル研究に貢献可能な成果であると考えられ、有益な成果であると考えられる。これら成果を組み合わせた研究において、新たな知見も得られたことから、ナノマテリアルの安全性評価研究に利用可能と考えられる。

一方、疎水性の表面特性を保持していると考えられるナノマテリアル表面に、非特異的なタンパク吸着が起こり、さらに吸着したタンパク質と相互作用するHSPタンパク質の存

在を明らかとしたことから、ナノマテリアルと直接的な相互作用をするだけでなく、間接的な相互作用による細胞内分布の可能性を見出したことも新たな知見として有益な成果であると考えられる。最終目標となるナノマテリアルの物性から生体分子への相互作用を推察し、個体における毒性の予測をするための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

本研究事業では、水溶液中での強固な凝集を起こすことが知られているナノマテリアルにHSを用いたナノ分散系を確立し、培養細胞における中・長期毒性評価モデルを構築することができた。また、本評価モデルを用いて、ナノスケールに特異的な細胞増殖抑制機構を明らかとし、分子特異的なメカニズムが存在することを見出した。これら評価系の構築と、細胞増殖抑制機構能解明は、慢性的なナノマテリアルの安全性評価系の構築に貢献できる成果であると考えられる。

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)

2. 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)

3. 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

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)

2. 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)

3. 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