

L126

動物細胞へのナノ粒子の付着・取り込みと毒性

(京大院工)○(正)新戸 浩幸*, (学)岩井 祐樹, (京大工)宮坂 昌宏

1. はじめに

2000年代前半からナノメートルサイズの粒子が世界中の工場や研究室で盛んにつくられるようになり、高度な機能をもつ材料、医薬品、化粧品、食品、農薬などに使用されている。一般にナノ粒子は、比表面積が極めて大きいこと、高い表面活性・反応性を示すだけでなく、バルク体とは異なる特性をも示す。このため、ナノ粒子材料の生体暴露や環境放出による影響が問題になる可能性があり、今後は、このナノリスク問題を慎重に検討することが極めて重要になると思われる。

本研究では、現在多量に使用されているナノ粒子の1つであるシリカ粒子を取り上げる。動物細胞へのシリカ粒子の付着・取り込みを共焦点レーザー顕微鏡 (CLSM) により観察するとともに、シリカ粒子の細胞毒性を LDH assay により評価し、シリカ粒子のサイズと表面官能基が結果に与える影響、細胞種による結果の差異を検討した。

2. 実験

動物細胞株 B16F10 (マウス皮膚がん由来メラノーマ細胞), A549 (ヒト肺がん由来上皮細胞), および TIG-3 (ヒト胎児肺由来繊維芽細胞) を用いた。CLSM 観察と LDH assay のためのサンプルとして、 $\phi 35$ mm ガラスボトムディッシュ (IWAKI) に 2.0×10^4 cells/cm², または 96 穴マイクロプレート (IWAKI) に 4.0×10^4 cells/cm² の密度で各細胞を播種し、インキュベーター内 (37.0 °C, CO₂ 5.0 %) で 24 h 培養した。

シリカ粒子 粒径 $D_p = 30\text{--}200$ nm の蛍光シリカ (SiO₂) 粒子 (表面修飾基 = 無修飾 (-OH), -COOH, -NH₂; 励起波長 = 485 nm, 蛍光波長 = 510 nm; micromod 製) を用いた。以後、COOH で表面修飾された SiO₂ 粒子を COOH/SiO₂ 粒子のように表記する。

細胞への粒子暴露方法 細胞サンプルの培養液 (MEM + 10 % 胎仔ウシ血清) を取り除き、リン酸緩衝液で細胞表面を洗浄した後、シリカ粒子が濃度 $C_{\text{exp}} = 0.01\text{--}0.08$ % (v/v) で添加された培養液 (D-MEM) 中で一定時間 (暴露時間 t_{exp}) 培養した。

CLSM 観察 暴露時間経過後、粒子含有培養液を取り除き、細胞表面を D-MEM で洗浄した。必要に応じて、グルタルアルデヒドで細胞を固定した。その後、CLSM (Nikon C1si-ready TE2000-E, レーザー波長 488 nm, 水浸対物レンズ 60x) を用いて、細胞の底面から 0.45 μm 毎に蛍光像・微分干渉像を取得した。

LDH assay 暴露時間経過後の粒子含有培養液に含まれる LDH の量を、試薬 (CytoTox-ONE™, Promega 製) とマイクロプレートリーダー (Tecan Infinite M200) を用いて測定し、細胞毒性を評価した。

3. 結果と考察

Fig. 1 に、粒子径が異なる Bare/SiO₂ 粒子の B16F10 細胞に対する細胞毒性の粒子濃度依存性 ($t_{\text{exp}} = 0.5$ h) を示す。大きい粒子 ($D_p = 200$ nm) は有意な毒性を示していないが、粒子が小さくなる ($D_p \leq 100$ nm) につれて、有意でより高い毒性を示している。

Fig. 2 に、異なる暴露時間での 70-nm COOH/SiO₂ 粒子の B16F10 細胞に対する毒性の粒子濃度依存性を示す。暴露時間が短い場合 ($t_{\text{exp}} \leq 6$ h), 有意な毒性は観測されなかった。 $t_{\text{exp}} = 24$ h で有意な毒性がみられ、 $t_{\text{exp}} = 48$ h では 50–60 % の毒性を示している。

A549 と TIG-3 についても、同様に SiO₂ 粒子の毒性を調べたところ、 $t_{\text{exp}} = 0.5$ h では Bare/SiO₂ 粒子はどの粒径 ($D_p = 30\text{--}200$ nm) でも有意な毒性を示さなかった。この結果は、B16F10 細胞の結果と異なる。しかし、暴露時間が 2 h 以上になると、小さい Bare/SiO₂ 粒子ほど高い毒性を示し、B16F10 細胞と同様な傾向が得られた。このように、細胞の種類によって、細胞毒性が現れる時間が異なることがわかる。

発表当日には、蛍光 SiO₂ 粒子暴露後の細胞の CLSM 画像などの結果を示すと同時に、種々の動物細胞の SiO₂ 粒子の取り込みと毒性に影響を及ぼす諸因子について述べる予定である。

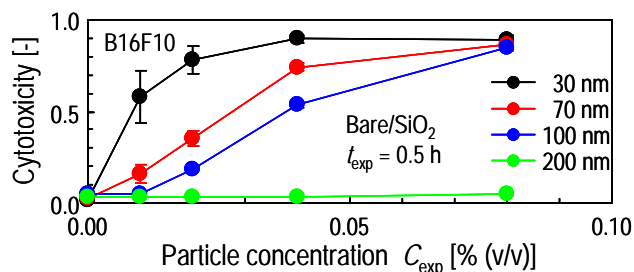


Fig. 1 粒子径が異なる Bare/SiO₂ 粒子の B16F10 細胞に対する毒性の粒子濃度依存性 ($t_{\text{exp}} = 0.5$ h)

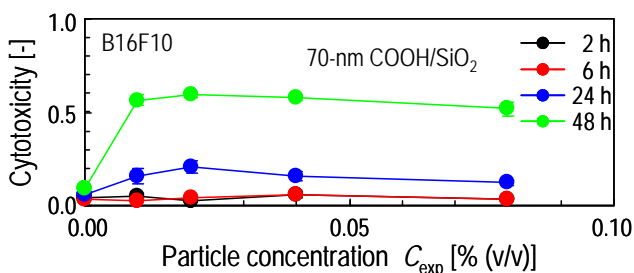


Fig. 2 異なる暴露時間での 70-nm COOH/SiO₂ 粒子の B16F10 細胞に対する毒性の粒子濃度依存性

* shinto@cheme.kyoto-u.ac.jp