

ゾウリムシにおける銀粒子の細胞毒性試験

阿部 大基, 芳賀 信幸 (石巻専修大・理工)

Cytotoxicity testing of Ag nanoparticles in *Paramecium*

Taiki ABE and Nobuyuki HAGA (Ishinomaki Senshu University, Ishinomaki, Japan)

SUMMARY

Nanomaterials have a large potential in a wide variety of technological fields, including information technology, electronics, biological engineering and biomedicine. However, for many nanomaterials, little is known about their environmental effects or their potential danger to human health. In this study, we examined the cytotoxicity of Ag nanoparticles in *Paramecium caudatum* to elucidate the safety standards. We found that Ag nanoparticle dispersion causes severe cytotoxicity in *Paramecium* cells. Similar effects were caused by both dialyzed particle suspensions of Ag and by the water used during Ag nanoparticle dialysis. These results suggest that two different kinds of materials may be responsible for the cytotoxicity; that is, the Ag particles and the products from the interaction between Ag particles and environmental materials such as water. During this study we found that BSA (bovine serum albumen) has a detoxification effect against the cytotoxicity produced by Ag nanoparticles. The stoichiometrical analysis of Ag nanoparticle cytotoxicity and the detoxification effect of BSA are discussed.

[目的] ナノテクノロジーは電子材料や医療など広範な分野で利用されている技術である。しかし、多くのナノマテリアルにおいて環境及び人体に対する安全基準値は設定されていないのが現状であり、多くの研究機関においてその有害性に関する研究がなされている。一方、カーボンナノチューブに関しては我々は、ゾウリムシに対する毒性試験を行い、ゾウリムシはナノ粒子の毒性試験に適した材料であることを確認している (Haga and Haneda, 2007)。

我々はナノマテリアルの毒性を細胞レベルで評価するために、ゾウリムシを用いた細胞毒性試験を行ってきた。本研究ではゾウリムシにおける安全基準値を設定することを目的とし、今回は銀粒子(17 nm・21 nm・28 nm)の細胞毒性について検討した。

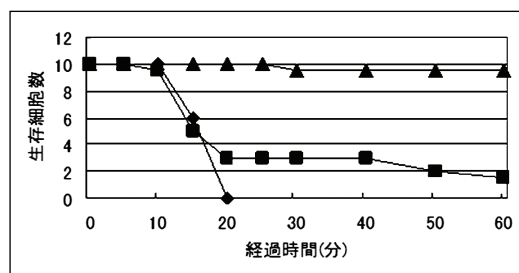


図1. 平均粒子サイズの異なるAg粒子懸濁液 (10 µg/ml) 中での生存曲線。◆: 平均粒子サイズ17 nm、■: 21 nm、▲: 28 nm。横軸の最大目盛りは60分である。

【方法・結果】

1. 株と培養

本実験に用いた株は金沢で採集された KNZ シリーズ (syngen 3、金沢大学・遠藤) のかけ合わせの子孫である TAZ0460(O³) と TAZ0462(E³) である。培養はレタスジュース法で行った (Hiwatashi, 1968)。銀粒子はそれぞれ 24 時間脱イオン水に対して透析処理を行った試料を K-DS (Na を K に置き換えた Dryl 氏液) で調整 (1 mg/ml) したものを原液とした。原液は冷蔵保存し、使用時は約 30 分の超音波処理の後 K-DS で希釈した。

2. 生存曲線

はじめに銀分散液を K-DS を用いて分散度 (1 ~ 100 µg/ml) を変えてゾウリムシ (n=10 cells) の生存曲線を求めた結果、実験に用いた全てのゾウリムシは死亡した。粒子の分散量が多いほど毒性は強くなり、同じ分散量でも粒子サイズが小さくなるほど毒性は強く表れた事より (図 1)、銀粒子の細胞毒性は粒子サイズに依存する事が明らかになった。銀分散液中では、ゾウリムシは正常な遊泳行動を停止し、後退遊泳や尾部を支点とした回転運動を行い、細胞の変形の後死亡した。

次に透析処理を行った際の外液を用いてゾウリムシ (n=10 cells) の生存曲線を求めた。透析外液は 24 時間ごとに水を交換しながら約 2 週間行ったが、透析 1 日目と 2 週間後に 24 時間の透析をしたどちらの外液の場合でも実験に用いたゾウリムシは全て死亡した (図 2)。

3. BSA (ウシ血清アルブミン) の解毒効果

銀粒子の細胞毒性を緩和させる物質として BSA を発見した。銀粒子 (17 nm) 分散液 50 µg/ml 中ではゾウリムシは約 10 分で死亡するが、BSA 加えた場合死亡するまでの時間は 10 分以上に延長される事が確認された。40 µg/ml 以下では 10 分以内に死亡するが、60 µg/ml では 20 分で死亡し、80 µg/ml では 30 分で死亡し、300 µg/ml を超えると 1 時間以上経過しても生存しており、解毒効果は BSA 濃度に依存することがわかった (図 3)。しかし BSA 存在下でも 24 時間経過した場合にはゾウリムシは死亡した。透析外液の場合でも BSA の効果は同様に確認されたが、この場合には 24 時間経過してもゾウリムシは生存している。

銀粒子のもつ細胞毒性は粒子サイズに依存するため銀粒子自体が細胞に作用していると考えていたが、透析外液を用いた場合でもゾウリムシは死亡する結果が得られた。

【考察】今回用いた透析膜の平均ポアサイズは 50 Å なので銀粒子が膜を通過することは不可能である。ゾウリムシを死亡させる要因は銀粒子と銀粒子が水分子もしくは溶存物質などの相互作用によって生じた透析可能な 2 次的要因によるものの 2 通りであると推測される。

また、BSA による細胞毒性緩和作用実験で透析外液の場合は 24 時間経過してもゾウリムシは生存する

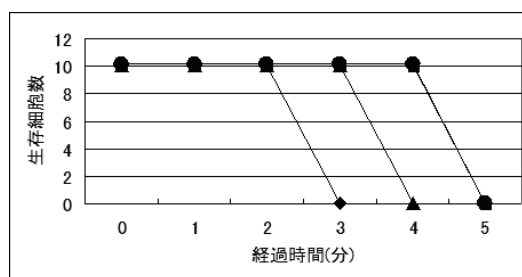


図 2. 銀粒子分散液 (50 µg/ml) と透析外液における生存率の比較。◆ : ①液、■ : ⑦液、▲ : ⑬液、● : Ag粒子分散液 (50 µg/ml)。横軸の最大目盛りは5分である。

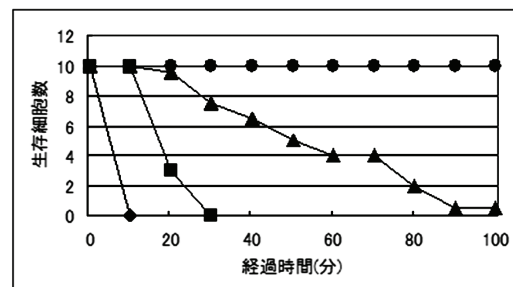


図 3. BSAのAg粒子毒性に対する解毒効果。Ag粒子懸濁液 (50 µg/ml) にBSAを加えた場合の生存率を表す。◆ : SBA 0 µg/ml、■ : 80 µg/ml、▲ : 100 µg/ml、● : 300 µg/ml。横軸の最大値は100分。

結果が得られたが、銀分散液の場合は 24 時間経過するとゾウリムシは死亡する結果が得られた。BSA は死亡要因と相互作用する事により毒性を緩和させていると仮定すると、銀分散液に BSA を加えた場合はすでに存在している原因物質に関しては BSA が作用して無毒化させるが、後から銀粒子によって生産された物質に対しては対応されなくなるのではないかと考えられる。一方、透析外液に BSA を加えた場合はすでに存在している死亡要因は BSA により無毒化されるが、銀粒子は存在しないのでその後死亡要因は生産されないので 24 時間後もゾウリムシは生存していると考えられる。

【文献】

- Hiwatashi, K. 1968 Determination and inheritance of mating type in *Paramecium caudatum*. *Genetics* 58, 373-386.
- Haga, N. and Haneda, K. 2007 *Paramecium* as a bioassay system for elucidation of cytotoxicity and biocompatibility of nanoparticles: effects of carbon nanofibers on proliferation and survival. *Jpn. J. Protozool.* 40. No.2 139-14.