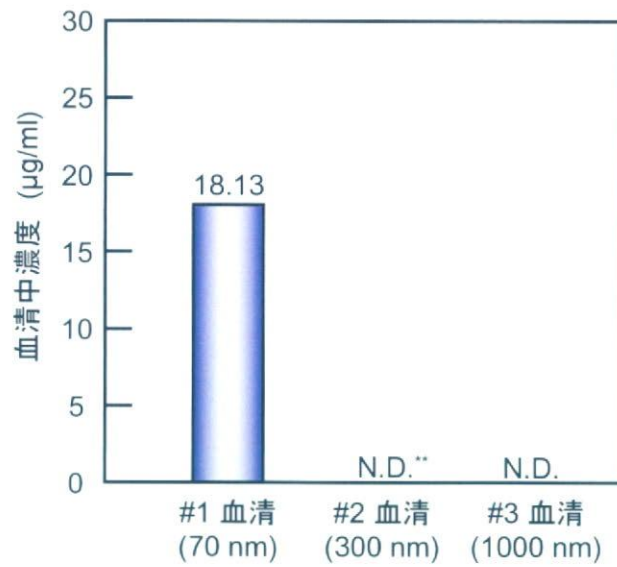
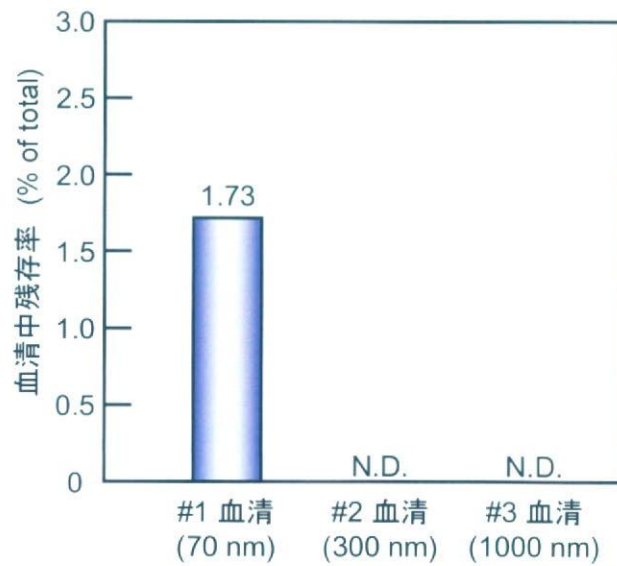


Fig.6

21日後に血中に残存するナノシリカ濃度



全投与量に対する21日後に血中に残存するナノシリカ量の割合*



* プタの全血清量は1.0 Lと概算した

** N.D. : Not Detectable

Fig.7

トキシコキネティクス解析によるナノマテリアルの安全性評価

分担研究者 角田 慎一 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロテオミクスプロジェクト

研究要旨

我々は、ナノマテリアルの性状と生体影響に関する情報収集ならびに標準化された安全性試験法の確立を目指して、ナノマテリアルの生体影響と細胞内/生体内動態特性の連関の解明”と“トキシコプロテオミクスによる生体影響発現機序の解析と毒性マーカーの探索”を融合的に推進している。本年度は、表面未修飾ナノシリカ (SP) を標準品として用い、SP の体内/細胞内動態解析、各種蛍光標識 SP の *in vivo* 急性毒性評価、ヒト皮膚角化細胞を用いた細胞傷害性ならびにプロテオームの解析に向けて、種々実験条件の設定・技術確立を試みた。

まず、ナノマテリアルの細胞障害性を評価するため、放射性同位体である ^3H -Thymidine の取り込み量を指標として細胞増殖能を測定した。その結果、 ^3H を用いることで、粒子の影響を受けることなく細胞増殖能を測定することが可能であり、標準粒子である SP はいずれの粒子径であっても $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ 以上の濃度では細胞傷害性を示す可能性が示唆された。さらに、ランゲルハンス細胞においては、粒子径が小さい SP ほど高い細胞障害性を示すことが明らかとなった。また、*in vivo* での急性毒性をマウスで評価した結果においても、 70 nm の SP が 1000 nm 、 300 nm の SP に比べて顕著な急性毒性を発現することが判明した。そこで次に、各粒子径の SP の体内挙動を解析するため、マウスに 7×10^{10} particles の DY676 標識 SP ($70, 300, 1000 \text{ nm}$) を尾静脈内より投与し、*in vivo* imaging system (IVIS) を用いて粒子由来の蛍光像を経時的に撮影した。その結果、いずれの粒子径の SP を投与した場合においても、投与後 3 時間後から 24 時間にかけて、SP 由来の蛍光が肝臓および腸管内に観察され、SP が胆汁排泄される可能性が示唆された。また、ナノマテリアルの細胞内局在を直接的かつ詳細に解析するために、透過電子顕微鏡 (TEM) を用いた解析を行った。標準粒子である SP を作用させたヒト皮膚角化細胞を観察したところ、SP は黒いドット状に確認できた。また、 70 nm の粒子は、細胞内に取り込まれるのみならず、核内へと移行し、核小体を集積すること、 1000 nm の粒子を作用させた場合にはリソソーム小胞の過形成が認められるなど、粒子径の差異によって特徴的な現象が認められた。以上の結果より、粒子径の違いにより、SP は大きく異なった体内動態挙動を示すこと、さらに、粒子径が小さいほど毒性が高いことが示唆された。そこで次に、SP が細胞に与える影響を分子レベルで解析する目的で、プロテオームの変化の解析を試みた (トキシコプロテオミクス)。 $100 \mu\text{g}/\text{ml}$ の SP ($70, 1000 \text{ nm}$) を作用させた HaCaT 細胞を二次元電気泳動によって分離し、SP 処理によって変動する蛋白質を探索したところ、粒子を作用させることで 1.5 倍以上発現が増減する蛋白質を同定できた。本検討により、二次元ディファレンシャル電気泳動法 (2D-DIGE) が SP のトキシコプロテオミクス解析に適用可能であることを示した。以上、本年度は標準粒子 SP を用いて種々実験系の確立を推進し、上記実験系が SP の毒性解析手法として有効であることが明らかとなった。

A. 研究目的

経皮暴露されたナノマテリアルの安全性を、化粧品を一例に考えてみた場合、“250nm以上のマテリアル”は皮膚の細胞間を通過できないため、従来までの化粧品は基本的に、肌の表面で無害に留まっていた。しかし昨今、ナノマテリアル化することで、肌の細胞間をすり抜け、皮膚の奥底や細胞内にまで浸透させることが可能となったため、ナノマテリアルの機能を活用した様々な有用性化粧品の開発が進展し、製品化されるに至っている。この反面、ナノマテリアルは経皮吸収され、全身血流に移行し、皮膚局所のみならず、全身分布してしまうこと、特に数10nm以下のサイズになると、皮膚を効率よく透過し、脳など、全身組織に分布することが報告されている。また皮膚沈着してしまったナノマテリアルの場合、細胞膜を容易に通過し、遺伝子が格納されている細胞核にまで侵入してしまうことも知られている。これら皮膚局所や全身組織に分布したナノマテリアルは、米国NTP programの研究から、ナノマテリアルの発する遠赤外線や放電、光反応性・熱反応性による遺伝子・蛋白質変性などにより、アレルギーなどの未知毒性が誘発され得ることが指摘されている。そのうえナノフラーレンが体外から体内に侵入し、循環血中を介して脳組織に移行し、傷害性を示すことなどが判明しており、厚生労働行政においては、ナノマテリアルの社会受容の促進や国民の健康と福祉の向上の観点から、経皮曝露されたナノマテリアルの健康への影響を評価出来る新たな試験法の開発やその有害性発現メカニズムの解明が緊急課題となっている。そこで本研究では、種々物性(表面電荷やサイズ、親水-疎水バランス)を有するモデルナノマテリアルを用い、体内動態と生体への影響の相関情報を集積することによって、ナノマテリアルの安全性予測、リスク評価に有用な知見を得ることを目指す。本研究成果は我が国のナノ産業の進展のみならず、国民の保健・医療・福祉の向上に大きく貢献するものと期待できる。以上の目的のもと、本年度は標準ナノマテリアルとしてシリカ粒子を用いることとし、各種生体影響の評価法、体内挙動の解析法の確立を試みた。

B. 研究方法

B1. シリカナノ粒子の細胞傷害性評価

シリカ粒子(SP)は市販のSicaster-plain (Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany)を用いた。赤色蛍光標識(SP-RedF)、暗赤色蛍光標識(SP-DY676)、また、各種平均粒子径(カタログ値70nm, 100nm, 300nm, 1000nm)の粒子を用いた。ヒト不死化ケラチノサイトHaCaTあるいはランゲルハンス細胞株XS52 (Dr. Takashima, The University Toledo より分与)を96穴プレートに 1×10^4 cells/wellで播種し、24h後に各濃度のSP-RedFあるいはSP-DY676を添加した。18h後 ^3H -thymidineを $1 \mu\text{Ci/well}$ 添加し、さらに6h培養後、セルハーベスターにより細胞を回収し、放射活性をシンチレーションカウンター (TopCount NXT, PerkinElmer)により測定した。

B2. シリカナノ粒子の *in vivo* 急性毒性の評価

Balb/cマウス(雌8週齢)に70, 300, 1000nm径のSP-RedFを2mg/headで静脈内投与し、24時間後までの死亡率で急性毒性を評価した。

B3. シリカナノ粒子の細胞内動態解析

各種粒子径のSPをチャンバースライド上で培養したHaCaT細胞に $100 \mu\text{g/ml}$ で24hr作用させた。培地を除去し、PBSで洗浄後、冷2.5%グルタルアルデヒド液で1時間固定、0.1Mリン酸緩衝液で洗浄、1%四酸化オスミウムで30分間後固定し、上昇エチルアルコールで脱水した。常法に従い、エポキシ樹脂で包埋し、熱重合により硬化させた。熱重合で硬化した標本をダイヤモンドナイフで超薄切片を作製し、無染色あるいは酢酸ウラニウムおよびクエン酸鉛の二重電子染色後、透過電子顕微鏡(TEM)で観察した。

B4. シリカナノ粒子のトキシコプロテオーム解析

HaCaT細胞を150φディッシュに播種し、各粒径のSPを $100 \mu\text{g/ml}$ となるように添加し、24h共培養した。その後細胞をセルスクレイパーで回収し、2D-DIGE細胞溶解液に懸濁、さらに超音波処理を行うことで蛋白質を抽出した。2D-Quant Kitにより蛋白質量を定量し、SP無処理、70, 1000nmのSP処理群について2次元ディファレンシャル電気泳動(2D-DIGE)解析(pIレンジ3-10, 12.5%SDS)により

プロテオームの変動を比較した。また、核を単離して、オルガネラレベルでのプロテオームの変動も同様に 2D-DIGE により解析した。

B5. In vivo imaging によるナノシリカの体内動態挙動解析

SP の in vivo 動態のトレースには、生体透過性の高い波長の蛍光を発する DY676 標識 SP を用いた。アルファルファ・フリーの飼料で飼育したヌードマウス (Balb/c nu/nu) に粒径 70, 300, 1000nm の 7×10^{10} particle/head で静脈内投与し、イソフルラン麻酔下で経時的に in vivo imaging system (IVIS 200, Xenogen Inc.) で解析した。

B6. ナノシリカ粒子径測定

SP の水溶液中での粒径は、動的光散乱法に基づいて ZetaSizer nano (Malvern Instruments) により計測した。また、同時に表面電位 (Z 電位) も測定した。

C. 研究結果

C1. シリカナノ粒子の細胞傷害性評価

化粧品添加物としての SP の毒性を評価する目的で、まず粒子径 70, 300, 1000nm の SP 存在下で培養した際のケラチノサイト HaCaT に対する細胞傷害性を ^3H -thymidine の取り込みで評価した。その結果、Red-F 標識および DY676 標識 SP いずれにおいても濃度依存的に細胞増殖の阻害が認められた (Fig. 1)。また、粒子径による明確な違いは認められなかった。次に、皮膚ランゲルハンス細胞株 XS52 に対する影響を検討したところ、粒子径に依存した細胞増殖抑制効果を示し、70nm 径の粒子が XS52 に対して最も高い細胞毒性を示した (Fig. 2)。XS52 細胞での IC50 値は 70nm: $4.2 \mu\text{g/ml}$, 300nm: $32.6 \mu\text{g/ml}$, 1000nm: $75.0 \mu\text{g/ml}$ であった。

C2. ナノシリカの in vivo 急性毒性の評価

SP の in vivo 急性毒性を評価するため、マウスに SP を静脈内投与し、その後の生死を観察した。その結果、1000nm および 300nm 径の SP-redF を 2mg/head 投与しても死亡例は認められなかったが、70nm 径の SP-redF 投与群では 18 時間までに 3 例中 3 例が死亡

した (Fig. 3)。

C3. シリカナノ粒子の細胞内動態解析

SP の細胞内取込み、および細胞内挙動を調べるため、SP と共培養した HaCaT 細胞の TEM 観察を行った (Fig. 4)。70nm 径の SP 適用群では、細胞膜を通過し、細胞質中および核内にまで到達している粒子が認められた。さらに、核の内部の核小体に SP が集積している像が認められた。一方、1000nm 径の SP 適用群では細胞質内への移行が認められ、また、リソソーム小胞が過形成している様子が観察された。

C4. シリカナノ粒子のトキシコプロテオーム解析

各粒子径の SP の細胞に及ぼす影響を詳細に解析するために、SP を作用させた HaCaT 細胞のプロテオーム変化を 2D-DIGE 法により解析した。無処理細胞と 70nm, 1000nm 径の SP を作用させた細胞で whole cell プロテオームを比較した結果、70nm-SP、1000nm-SP 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 25 個、17 個、発現減少が認められたスポットが 8 個、6 個検出された (Fig. 5)。また、70nm-SP 作用細胞で 1000nm-SP 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 23 個、減少していたスポットが 10 個検出された。さらに、細胞内動態観察によって 70nm-SP が核に移行することが示唆されたことから、核を単離してオルガネラレベルでのプロテオームを解析した。その結果、70nm-SP、1000nm-SP 作用により発現上昇が認められた蛋白質スポットがそれぞれ 147 個、119 個、発現減少が認められたスポットがいずれも 50 個検出された (Fig. 5)。また、70nm-SP 作用細胞で 1000nm-SP 作用細胞よりも発現上昇していたスポットが 4 個、減少していたスポットが 3 個検出された (Fig. 6)。これら蛋白質スポットについて、質量分析法による同定を進めている。

C5. In vivo imaging によるナノシリカの体内動態挙動解析

経皮適用されたナノマテリアルが皮膚を透過すると全身循環に入ることになる。そこで、SP が静脈内投与した場合の体内挙動の解析を行った。生きたマウスでの経時的な観察を可能とするよう、蛍光色素 Dy676 標識 SP (SP-Dy676) を用いて in vivo imaging

system (IVIS 200, Xenogen Inc.)により計測を行った。70nm-SP, 300nm-SP, 1000nm-SPいずれも静注後3時間には肝臓に集積する傾向が観察され、その後6時間、24時間でも同様であった (Fig. 7)。さらに詳細な解析のために24時間後に安楽死させ、開腹して臓器分布を評価したところ、肝臓および、特に胆嚢で強い蛍光が観察され、糞便中にも蛍光が認められた (Fig. 8)。

C6. ナノシリカ粒子径測定

Zeta-sizer を用いて動的光散乱法による SP の物理化学的特性の評価を試みたところ、粒子径はほぼカタログ値に近い値として計測された (Fig. 9)。製品ロット間、あるいは蛍光標識の種類によっても、粒子径の値に差が認められた。Z 電位は SP-non-label, SP-RedF, SP-Dy676 で大きな差は認められず、ほぼ非電荷であると考えられた。

D. 考 察

本研究では、化粧品機能性材料として汎用されているシリカナノ粒子を標準ナノマテリアルとして用いて各種解析手法の有用性を検討した。その結果、³H-thymidine の取り込みによる細胞傷害性試験、透過電子顕微鏡観察、トキシコプロテオーム解析、蛍光 *in vivo* imaging 法等の手法がナノマテリアルの特性評価法として有用であることが明らかとなった。ランゲルハンス細胞に対する細胞傷害性、およびマウスでの *in vivo* 急性毒性の検討では、SP の粒子径の違いにより、生体影響の程度が異なり、70nm-SP が最も高い毒性を発現することが示唆された。電子顕微鏡観察の結果、細胞内動態および細胞反応が粒子径により異なることが判明したことから、動態の違いが生体反応の違いに関わっている可能性が考えられた。今後、トキシコプロテオーム解析を進めることにより、粒子径による生体反応の違いのメカニズム解明を試みる予定である。また、SP の生体内動態の解析法としては、蛍光標識体を用いることができれば *in vivo* imaging システムが適用可能であることが判明した。今後、蛍光色素やイメージング装置の最適化を行うことにより、よりの確な解析と各

種ナノマテリアルと体内動態の相関解析を進める予定である。

E. 結 論

本年度は、表面未修飾ナノシリカ (SP) を標準品として用い、SP の体内/細胞内動態解析、各種蛍光標識 SP の *in vivo* 急性毒性評価、ヒト皮膚角化細胞を用いた細胞傷害性ならびにプロテオームの解析に向けて、種々実験条件の設定・技術確立を試みた。その結果、³H-thymidine の取り込みによる細胞傷害性試験、透過電子顕微鏡観察、トキシコプロテオーム解析、蛍光 *in vivo* imaging 法等の手法がナノマテリアルの特性評価法として有用であることが明らかとなった。来年度はこれらの手法を駆使して、表面未修飾 SP の粒子径・物性と体内動態、毒性との関連評価ならびに毒性予測法の解析を進めると共に、SP で確立した本系が酸化チタンをはじめとする実サンプルに対しても適用可能であるか否かを解析する予定である。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Kamada H., Okamoto T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Nomura T., Sato M., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Tsutsumi Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S. : Creation of novel cell-penetrating peptides for intracellular drug delivery using systematic phage display technology originated from Tat transduction domain. Biol. Pharm. Bull., 30(2):218-223, 2007.
2. Shibata H., Kamada H., Nishibata K., Yoshioka Y., Nishibata T., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Minowa K., Mukai Y., Nakagawa S., Mayumi T., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Role of amino acid residue 90 in bioactivity and receptor binding

- capacity of tumor necrosis factor mutants., *BBA - Proteins and Proteomics.*, 1774(8):1029-1035, 2007.
3. Nomura T., Kawamura M., Shibata H., Abe Y., Ohkawa A., Mukai Y., Sugita T., Imai S., Nagano K., Okamoto T., Tsutsumi Y., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S. : Creation of novel cell penetrating peptide, using random 18mer peptides library., *Pharmazie*, 62(8):569-573, 2007.
 4. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Yamato T., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Improved cytosolic translocation and tumor-killing activity of Tat-shepherdin conjugates mediated by co-treatment with Tat-fused membrane-disruptive HA2 peptide., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 363:1027-1032, 2007.
 5. Shibata H., Yoshioka Y., Ohkawa A., Minowa K., Mukai Y., Abe Y., Tani M., Nomura T., Kayamuro H., Nabeshi H., Sugita T., Imai S., Nagano K., Yoshikawa T., Fujita T., Nakagawa S., Yamamoto A., Ohta T., Hayakawa T., Mayumi T., Vandeenabeele P., Aggarwal BB., Nakamura T., Yamagata Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation and X-ray structure analysis of the tumor necrosis factor receptor-1-selective mutant of a tumor necrosis factor-alpha antagonist., *J. Biol. Chem.*, 283:998-1007, 2008.
 6. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Yamanada N., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Shibata H., Yoshioka Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Comparative Study on transduction and toxicity protein transduction domains., *Br. J. Pharmacol.*, 1-10, 2008..
 7. Abe Y., Yoshikawa T., Kamada H., Shibata H., Nomura T., Minowa K., Kayamuro H., Katayama K., Miyoshi H., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Simple and highly sensitive assay system for TNFR2-mediated soluble- and transmembrane-TNF activity., *J. Immunol. Methos.*, in press.
- ② 学会発表
1. 野村鉄也, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 鎌田春彦, 堤 康央 : 抗腫瘍活性に優れた TNF レセプター指向性変異体の創製., 第23回DDS学会, 熊本, 2007年6月.
 2. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : プロテオミクス創薬を志向した疾患関連蛋白質抗体の迅速単離システムの開発., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 3. 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 野村鉄也, 蓑輪恭子, 鍋師裕美, 中川晋作, 角田慎一, 堤 康央 : 腫瘍壊死因子- α の活性に及ぼす90番目のアミノ酸の影響に関する検討., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 4. 阿部康弘, 野村鉄也, 鍋師裕美, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 鎌田春彦, 中川晋作, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤 康央 : フェージ表面提示法を駆使したTNFR2指向性アゴニストの創製., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 5. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤康央 : 三酸化ヒ素の抗白血病治療効果発現に関連した蛋白質の探索., 日本ヒトプロテオーム機構第5回大会, 東京, 2007年7月.
 6. Tsunoda S., Mukai Y., Yoshikawa T., Kamada H., Nakagawa S., Tsutsumi Y. : A method for rapid preparation of antibodies to tumor-related proteins by the combination of phage library and 2D-DIGE., 第66回日本癌学会学術総会, 横浜, 2007年10月.
 7. 吉川友章, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 細胞膜透過性 TAT ペプチドと膜融合性 HA2 ペプチドを活用した核内高分子送達法の開発., 第66回日本癌学会学術総会,

- 横浜, 2007年10月.
8. 向 洋平, 今井 直, 吉川友章, 長野一也, 中川晋作, 堤 康央, 角田慎一 : 新規抗体医薬の開発を目指した乳がん細胞特異マーカーの探索とそれらに対する網羅的抗体創製法の開発., 第57回日本薬学会近畿支部大会, 大阪, 2007年10月.
 9. 今井 直, 長野一也, 杉田敏樹, 吉田康伸, 向洋平, 吉川友章, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央: 血栓性疾患の機能解明・治療を目指した新規抗体単離システムの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 10. 長野一也, 今井 直, 杉田敏樹, 向 洋平, 吉川友章, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血栓性疾患の機能解明・治療を目指したファージ抗体ライブラリの構築., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 11. 向 洋平, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : TNF レセプター選択的阻害剤開発を目指した TNFR2-TNF 複合体の X 線結晶構造解析., 第 30 回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 12. 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 13. 杉田敏樹, 吉川友章, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 吉田康伸, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管機能制御を目指した効率的な細胞内高分子導入技術の開発-2., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 14. 吉田康伸, 吉川友章, 杉田敏樹, 向 洋平, 今井 直, 長野一也, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規細胞内移行ペプチドの創出と血管機能制御技術としての展開., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 15. 鍋師裕美, 鎌田春彦, 阿部康弘, 野村鉄也, 萱室裕之, 蓑輪恭子, 吉岡靖雄, 角田慎一, 堤康央 : プロテオーム解析を用いた白血病における血栓症発症に関与する蛋白質の探索., 第30回日本血栓止血学会学術集会, 志摩, 2007年11月.
 16. 萱室裕之, 鎌田春彦, 吉岡靖雄, 吉川友章, 形山和史, 廣井隆親, 角田慎一, 堤 康央 : Intranasal immunization with mutant TNF induces antigen specific mucosal and systemic immune responses in mice., 第37回日本免疫学会総会・学術集会, 東京, 2007年11月.
 17. 吉田康伸, 今井 直, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向 洋平, 小泉桂一, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 血管新生阻害剤を用いたリンパ管新生シグナル伝達経路の解析., 第80回日本生化学会大会, 横浜, 2007年12月.
 18. 杉田敏樹, 吉川友章, 長野一也, 鍋師裕美, 向洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 新規 Protein Transduction Domain peptide の細胞内 DDS キャリアーとしての特性解析., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 19. 阿部康弘, 向 洋平, 角田慎一, 中川晋作, 堤康央 : 創薬プロテオミクスの実現に叶う機能性人工蛋白質の迅速創出技術の開発., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 20. 今井 直, 角田慎一, 中川晋作, 堤 康央 : 疾患関連蛋白質の同定およびこれらに対する抗体を一挙かつ短期間で網羅的作製できる抗体プロテオミクスの確立., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 21. 鍋師裕美, 吉川友章, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての安全性評価(1): トキシコプロテオーム解析., 日本薬学会 第128年会, 横浜, 2008年3月.
 22. 吉川友章, 鍋師裕美, 杉田敏樹, 長野一也, 向洋平, 今澤孝喜, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : ナノシリカの医薬品/化粧品基材としての

- 安全性評価(2):細胞内局在解析., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
23. 萱室裕之, 吉岡靖雄, 鎌田春彦, 形山和史, 阿部康弘, 野村鉄也, 廣井隆親, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央 : 活性増強型 TNF 変異体の粘膜炎ワクチンアジュバントとしての応用., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
24. 長野一也, 吉川友章, 杉田敏樹, 今井 直, 鍋師裕美, 向 洋平, 中川晋作, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 免疫制御技術の開発に向けた制御性 T 細胞の抗体プロテオミクス研究., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
25. 野村鉄也, 吉岡靖雄, 柴田寛子, 阿部康弘, 蓑輪恭子, 萱室裕之, 中川晋作, 山本昌, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : アンタゴニスト活性を有する I 型受容体指向性 TNF 変異体の評価 (1) : 関節リウマチモデルに対する治療効果の検討., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
26. 吉田康伸, 今井 直, 杉田敏樹, 阿部康弘, 萱室裕之, 長野一也, 鍋師裕美, 野村鉄也, 小泉桂一, 吉川友章, 鎌田春彦, 角田慎一, 堤 康央 : 抗体プロテオミクスによるリンパ管新生関連分子の探索と機能評価に向けて., 日本薬学会 第 128 年会, 横浜, 2008 年 3 月.
27. 西森 光, 磯田勝広, 近藤昌夫, 今澤孝喜, 角田慎一, 堤 康央, 八木清仁 : ナノシリカの急性肝毒性と粒子径の相関., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
28. 亀井数正, 向 洋平, 小島拓記, 吉川舞, 角田慎一, 堤 康央, 吉岡靖雄, 岡田直貴, 中川晋作 : 化粧品材料としてのナノマテリアルの経皮リスクに関する基礎検討., 日本薬学会第 128 年会., 東京, 2007 年 3 月.
29. 角田慎一 : 疾患関連たんぱく質の探索とその有効活用技術の開発-1., 大阪大学大学院薬学研究科特別講演会, 大阪, 2007 年 6 月.
30. Minowa K., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Fujita T., Yamamoto A., Yoshioka Y., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNFR1-selective mutant TNF using phage display system, Pharmaceutical Sciences World Congress, Amsterdam (Netherlands), April, 2007.
31. Tsunoda S., Imai S., Yoshida Y., Nagano K., Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsutsumi Y. : An efficient method for the production of monoclonal antibodies to tumor-related proteins using a combination of phage display library and 2-dimensional differential gel electrophoresis, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
32. Mukai Y., Nakamura T., Shibata H., Abe Y., Tsunoda S., Nakagawa S., Yamagata Y., Tsutsumi Y. : Crystal structure of the receptor subtype I selective antagonistic TNF revealed its molecular basis as the proteo-antagonist, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
33. Sugita T., Yoshikawa T., Mukai Y., Imai S., Nagano K., Yoshida Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of a novel therapeutic approach using an intracellular targeting strategy with membrane-permeable peptides., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
34. Nabeshi H., Kamada H., Shibata H., Abe Y., Nomura T., Minowa K., Yoshioka Y., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Arsenic trioxide alters expression and oxidative modification of the proteome in leukemic cells, HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
35. Nomura T., Shibata H., Abe Y., Minowa K., Mukai Y., Yoshioka Y., Nakagawa S., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of bioactive Lysine-deficient tumor necrosis factor for antitumor therapy., HUPO 6th Annual World Congress, Seoul (Korea), October, 2007.
36. Yoshikawa T., Imai S., Nagano K., Sugita T., Mukai Y., Nakagawa S., Kamada H., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Simultaneous identification of

tumor-specific proteins and their antibodies by combining a proteomics technique and phage display library, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

37. Minowa K., Yoshioka Y., Abe Y., Nomura T., Nabeshi H., Kayamuro H., Shibata H., Fujita T., Yamamoto A., Tsunoda S., Kamada H., Tsutsumi Y. : Creation of TNF receptor1-selective mutant TNF using phage display system, 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.
38. Abe Y., Nabeshi H., Nomura T., Kayamuro H., Minowa K., Kamada H., Nakagawa S., Tsunoda S., Tsutsumi Y. : Development of the valuable cell line which evaluates the bioactivity through TNFR2 using chimeric receptor strategy., 15th Annual Meeting of the International Cytokine Society, San Francisco (USA), October, 2007.

H. 知的財産権の出願・登録状況

①特許取得

該当なし

②実用新案登録

該当なし

③その他

I. 研究協力者

吉川 友章 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

鍋師 裕美 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

杉田 敏樹 独立行政法人医薬基盤研究所 創薬プロ
テオミクスプロジェクト

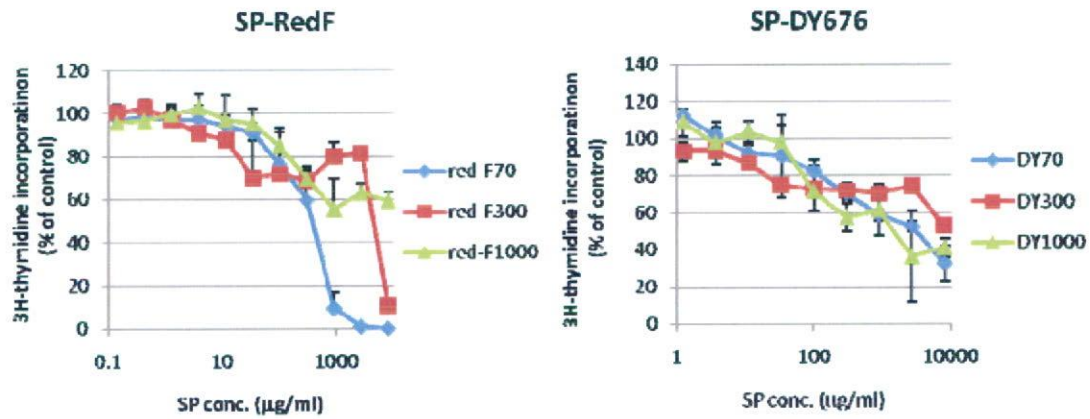


Fig.1 シリカナノ粒子の角化細胞に対する細胞傷害性評価
 各種粒径のred-F標識シリカナノ粒子あるいはDY676標識シリカナノ粒子
 存在下で24時間培養したHaCaT細胞の³H-thymidine取り込みを測定した。

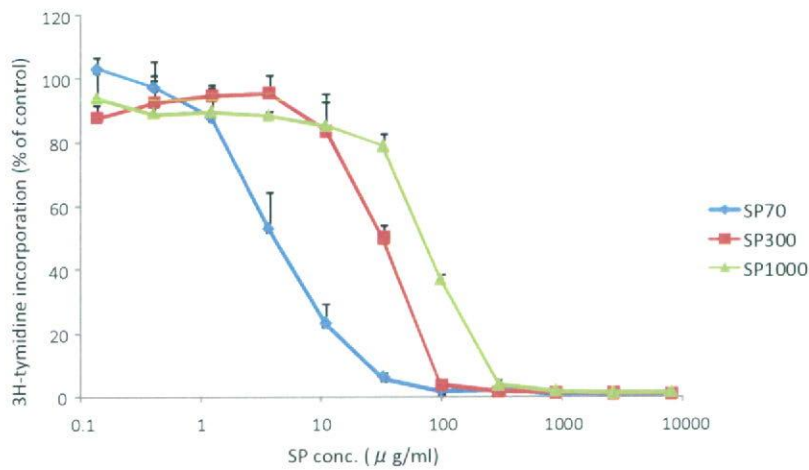


Fig.2 シリカナノ粒子のランゲルハンス細胞に対する細胞傷害性評価
 各種粒径のred-F標識シリカナノ粒子存在下で24時間培養したXLS52細胞
 の³H-thymidine取り込みを測定した。

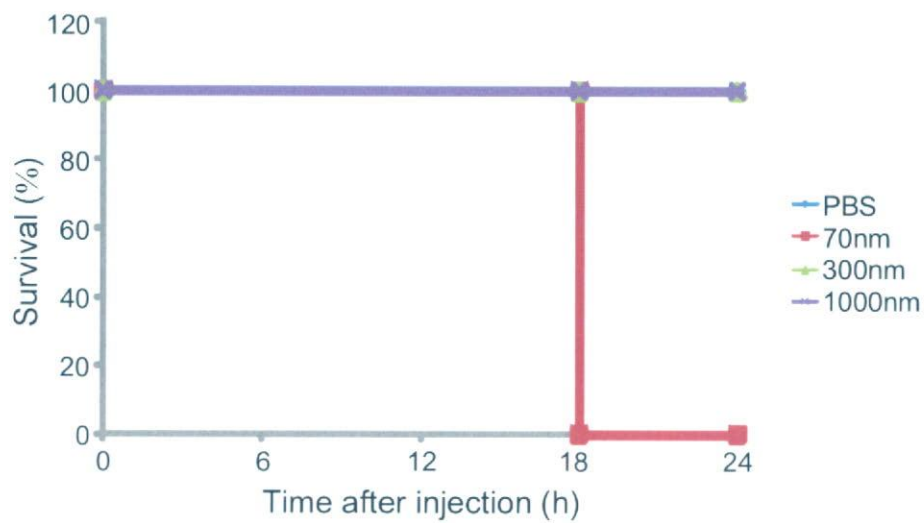


Fig.3 in vivoにおけるシリカナノ粒子の急性毒性

各粒子径のred-F標識シリカナノ粒子を2.0mg/mouseで尾静脈投与後、各観察時間における生存率を示した。観察時間は投与後0,6,18,24 hr。

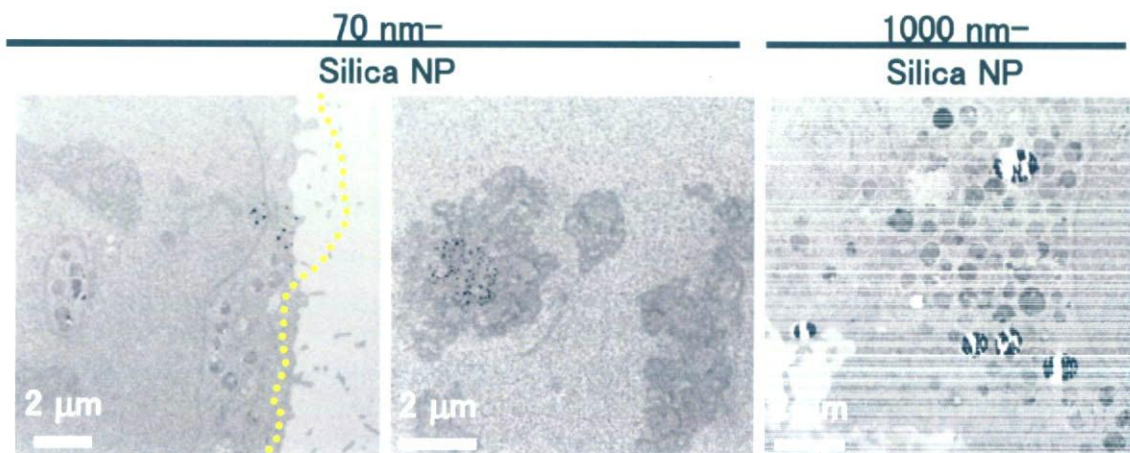


Fig.4 シリカナノ粒子の細胞内動態(TEM観察)

HaCaT細胞にred-F標識シリカナノ粒子100 μ g/ml存在下で24hr培養後、洗浄、固定し、電子顕微鏡にてシリカナノ粒子の細胞内局在を観察した。

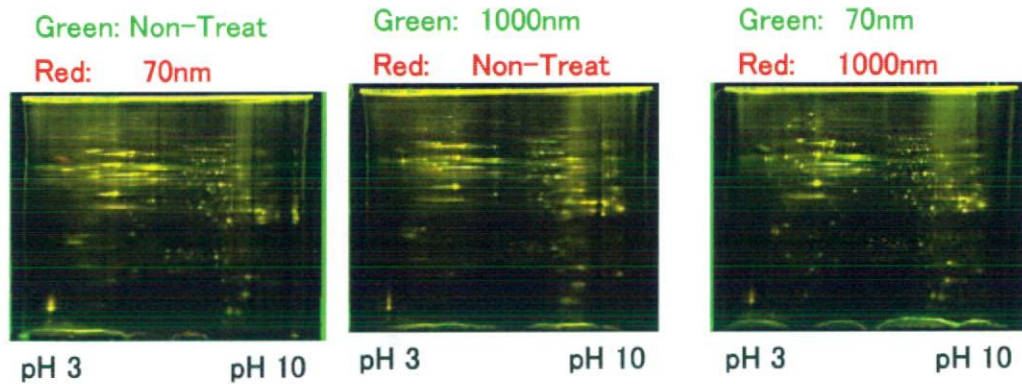


Fig.5 2D-DIGEによるシリカナノ粒子のトキシコプロテオーム解析
 HaCaT細胞を70nm又は1000nmの未標識シリカナノ粒子100 μ g/ml存在下で24hr培養後、細胞溶解液(whole cell lysate)を作製した。シリカナノ粒子未処理および、シリカナノ粒子処理細胞溶解液50 μ gをそれぞれcy3およびcy5で標識し、それらを混合して2次元電気泳動を行った。

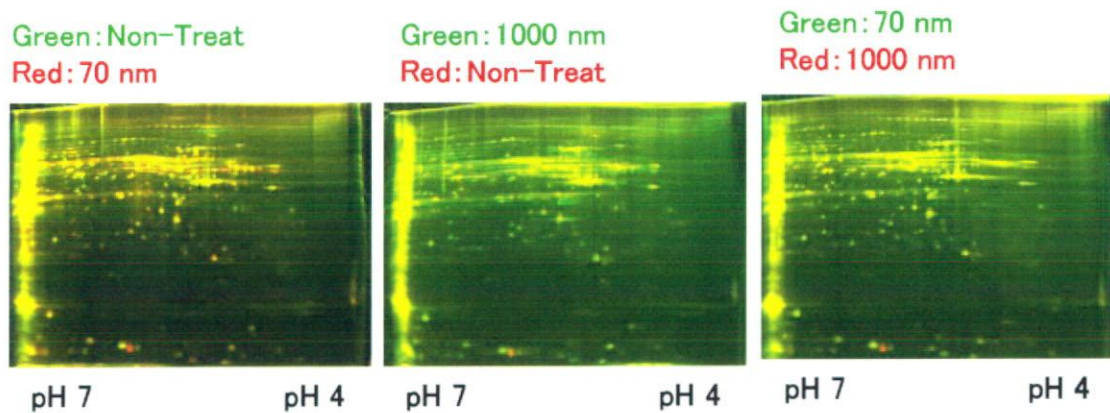


Fig.6 オルガネラ(核)レベルでのシリカナノ粒子のトキシコプロテオーム
 HaCaT細胞を70nm又は1000nmのred-F標識シリカナノ粒子100 μ g/ml存在下で24hr培養後、その細胞溶解液から核を分画しサンプルとした。シリカナノ粒子未処理およびシリカナノ粒子処理細胞の核画分サンプル50 μ gをそれぞれcy3およびcy5で標識し、それらを混合して2次元電気泳動を行った。

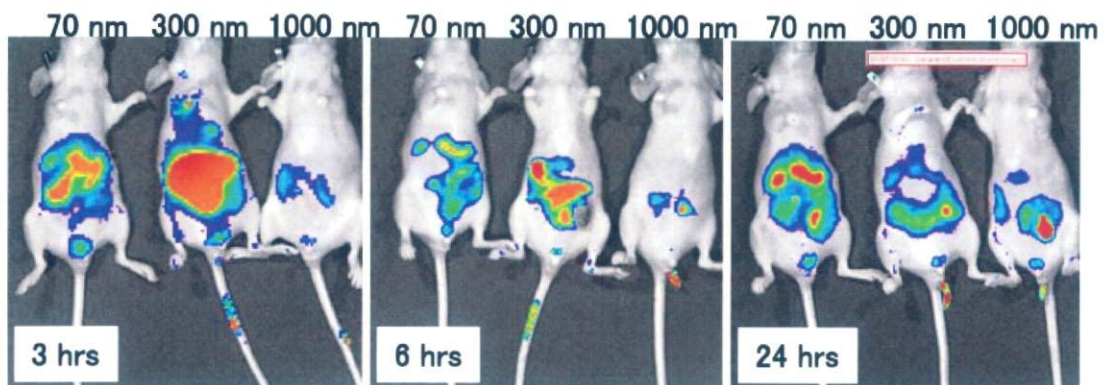


Fig.7 In vivo imaging によるナノマテリアルの挙動解析
 各粒子径のDY676ラベルシリカナノ粒子を約 7×10^{10} particle/mouseとなるように尾静脈投与し、投与後3, 6, 24 hrの粒子の挙動をin vivo imager (Xenogen IVIS 200 imaging system)にて撮影した。

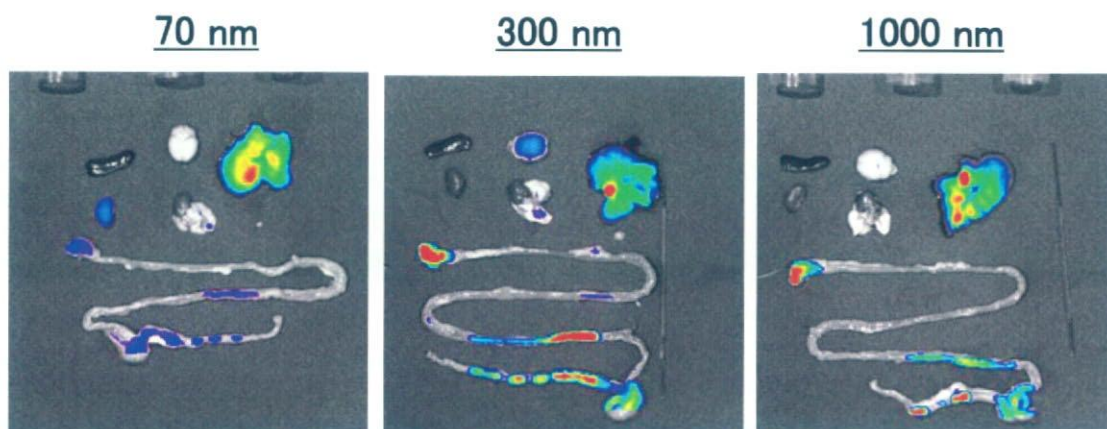


Fig.8 ex vivo imaging 解析 (24hr)
 各粒子径のDY676ラベルシリカナノ粒子を約 7×10^{10} particle/mouseとなるように尾静脈投与し、投与後24hrの粒子の各組織への集積をex vivoにて撮影した。

	カタログ値	Z-average D. (nm)	Peak Top D. (nm)	Zeta Potential (mV)
sicastar® non-labeled	70nm	77.7	85.3	-55.2
	300nm	322	336	-62.1
	1000nm	1140	896	-67.0
sicastar®-redF	70nm	82.8	88.4	-55.8
	300nm	354	371	-60.3
	1000nm	1400	800	-72.2
	70nm	66.1	74	-51.6
	300nm	350	367	-61.7
	1000nm	1290	1320	-81.1
sicastar®-F (DY-676)	70nm	101	113	-29.1
	300nm	317	349	-41.5
	1000nm	1270	875	-37.8

Fig.9 ZetaSizerIによるシリカナノ粒子の粒径と表面電荷測定
各粒子径のシリカナノ粒子を蒸留水にて100倍に希釈し、粒子径を動的光散乱法にて、
表面電荷(ゼータ電位)をレーザードップラー電気泳動法にて測定した。

ナノマテリアルの細胞傷害性評価並びにその誘導機序に関する研究

分担研究者 吉岡 靖雄 大阪大学臨床医工学融合研究教育センター 特任講師 (常勤)

研究要旨

本研究では、各種ナノマテリアルの細胞内挙動の解析を行うとともに、皮膚細胞・幹細胞・血管内皮細胞・貪食細胞など様々な細胞における細胞応答に関して検討を進めている。本年度は、化粧品などに使用されているナノ粒子シリカが、マウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞・4 種のヒト正常血管内皮細胞・マウス神経幹細胞 (NSC) に及ぼす影響を、細胞傷害性、サイトカイン産生誘導能を指標に評価した。粒子径 70nm、300nm、1000nm のシリカを用い、細胞傷害性に関して検討した結果、RAW 細胞・NSC に対して濃度依存的な傷害活性を示した。また、粒子径が小さいほど、強い細胞傷害活性を示す傾向にあった。一方で、ヒト脳・肺・皮膚・臍帯血由来正常血管内皮細胞に対しては、全く細胞傷害活性を示さず、炎症性サイトカインであるインターロイキン 8 (IL-8) の産生も誘導しなかった。更に、オートファゴソーム染色剤、オートファジー関連分子の挙動解析から、シリカは粒子径に関係なく RAW 細胞に対してオートファジーを誘導することが明らかとなった。来年度は、シリカの細胞傷害活性誘導メカニズムを検討すると共に、オートファジー誘導機序の解明を目指す。また、他のナノ粒子を用いた検討も進める予定である。

A. 研究目的

近年、酸化チタンやシリカ粒子などの種々のナノマテリアルが、日焼け止め・紫外線防御剤・老化防止剤などの化粧品成分として汎用されるようになってきた。また、医薬品領域においても、経皮吸収医薬・経皮ワクチンをはじめとする製剤の薬物徐放化基材として、ナノマテリアルの応用が試みられており、現在も新たな機能性ナノマテリアルが続々と開発されている。しかし、これらナノマテリアルの有効性評価が積極的に行われる一方で、体内動態や生体への影響等、安全性に関する基礎情報は極めて乏しいのが現状である。これまでに、フラーレン等のナノマテリアルが細胞膜を透過すること、高い電子反応性を有することなど、マイクロマテリアルとは大きく異なる特性を示すことが明らかにされている。さらにナノマテリアルは、その粒子サイズ・表面電荷の違いにより、体内分布特性が大きく異なることが予想されることから、個々のナノマテリアルに関

して詳細な特性評価を行うと共に、体内動態挙動も考慮した体系的評価法の確立が早急に望まれる。本観点から我々は、各種ナノマテリアルの細胞内・生体内挙動の解析を行うと共に、皮膚細胞・幹細胞・血管内皮細胞・貪食細胞など様々な細胞における細胞応答に関して検討を進めている。本年度は、化粧品などに使用されているナノ粒子シリカをモデルとし、マウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞・4 種のヒト血管内皮細胞・マウス神経幹細胞 (NSC) に及ぼす影響を細胞傷害性、サイトカイン産生誘導能を指標に評価した。また、シリカがオートファジーを誘導するか否かについても検討した。

B. 研究方法

・使用したナノマテリアル；本研究では、粒子径が 70 nm、300 nm、1000 nm のローダミンで蛍光標識されたシリカ (以下 Si70、Si300、Si1000) を使用した。

・マウスマクロファージ細胞株 RAW264.7 細胞における細胞傷害性評価 (メチレンブルーアッセイ); RAW264.7 細胞は 10%ウシ胎児血清 (FCS) 及び抗生物質を含む DMEM にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 0.8、4、20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後、0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、96 穴プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (655-415 nm) を測定し、細胞生存率を評価した。

・RAW264.7 細胞における細胞傷害性評価 (WST アッセイ); 96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 0.8、4、20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間培養後、WST-1 (生細胞数測定試薬、ナカライテスク) を 10 $\mu\text{l/well}$ で添加し、1 時間 37 °C で培養後、吸光度 (455-600 nm) を測定した。

・RAW264.7 細胞における細胞傷害性評価 (BrdU アッセイ); 96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 0.8、4、20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間培養後、100 μM BrdU を 10 $\mu\text{l/well}$ で添加し、2 時間 37 °C で培養した後、cell proliferation BrdU ELISA kit (Roche Diagnostics) を用いて評価した。

・RAW264.7 細胞におけるシリカの取り込みに関する検討; 96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気

相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間培養後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、KEYENCE) により細胞を観察した。

・シリカ作用により誘導されるオートファジーに関する検討 (MDC 染色); 96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。8 時間培養後に MDC (Sigma) を 12 μM (最終濃度)、10 分間、37 °C 作用させた。溶液を除去後、3%paraformaldehyde で 30 分固定、洗浄した後、蛍光顕微鏡 (BZ-8000、KEYENCE) により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS (Sigma) (100 ng/ml) と ZVAD (Calbiochem) (50 μM) を併用した群についても同様に検討した。

・シリカ作用により誘導されるオートファジーに関する検討 (GFP-LC3); 96 穴プレートに 1×10^4 cells の RAW264.7 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、OPTI-MEM (Sigma) 中で Lipofectamine 2000 (Invitrogen) を用い pEGFP-LC3 (大阪大学微生物学病研究所 吉森先生より供与頂いた) を 200 ng/well で細胞へトランスフェクションした。24 時間培養後に培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 100 $\mu\text{g/ml}$ (final 濃度) で作用させた。12 時間後に蛍光顕微鏡により細胞を観察した。また、ポジティブコントロールとして RAW264.7 細胞にオートファジーを誘導することが報告されている、LPS (100 ng/ml) と ZVAD (50 μM) を併用した群についても同様に検討した。

・樹状細胞 DC2.4 における細胞傷害性評価; DC2.4 細胞は 10% FCS、50 μM 2-mercaptoethanol、抗生物質を含む RPMI1640 培養液 (Sigma) を用いて培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供し

た。96 穴プレートに 1×10^4 cells の DC2.4 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、Si70、Si300、Si1000 を 20、100 $\mu\text{g/ml}$ (final 濃度) で作用させた。24 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、96 穴プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルーを溶出させた。吸光度 (655-415 nm) を測定し、比活性を評価した。

・神経幹細胞における細胞傷害性並びに取り込みに関する検討；神経幹細胞は DMEM/F12 (GIBCO/BRL) を基本培地とし、EGF、bFGF 等の各種添加剤を加えて継代培養に用い、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。96 穴プレートに 2×10^4 cells の神経幹細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、Si70、Si300、Si1000 を 20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、WST-1 を 20 $\mu\text{l/well}$ で添加し、6 時間 37 °C で培養後、吸光度 (455-600 nm) を測定した。また、各シリカ作用後 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

・血管内皮細胞における細胞傷害性並びに取り込みに関する検討；ヒト脳血管内皮細胞 (HuBME)、ヒト臍帯静脈内皮細胞 (HuVEC)、ヒト皮膚血管内皮細胞 (HuADM)、ヒト肺血管内皮細胞 (HuLME) は、抗生物質を含む CS-C 培地にて継代培養し、サブコンフルエント状態のものを実験に供した。なお、細胞培養にはコラーゲンコートされた器材を使用している。96 穴プレートに 5×10^3 cells の HuBME、HuVEC、HuADM、HuLME 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 0.8、4、20、100 $\mu\text{g/ml}$ (final 濃度) で作用させた。24 時間または 72 時間培養を行った後、25%グルタルアルデヒドにて細胞を固定した。洗浄後 0.05%メチレンブルー溶液で細胞を染色し、96 穴プレートを洗浄・風乾した後、0.33 N HCl によりメチレンブルー

を溶出させた。吸光度 (655-415 nm) を測定し、比活性を評価した。また、各シリカ作用後 24 時間後の細胞を蛍光顕微鏡にて観察した。

・血管内皮細胞における取り込みに関する検討 (4 °C 条件下)；96 穴プレートに 5×10^3 cells の HuBME 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、4 °C で 1 時間細胞をプレインキュベーションした。培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用した後、8 時間後に PBS で 3 回洗浄し、蛍光顕微鏡で観察した。またコントロールとして 37 °C 条件下で同様に取り込みを観察した。

・血管内皮細胞の IL-8 産生に関する検討；96 穴プレートに 5×10^3 cells の HuBME、HuVEC、HuADM 細胞を播種し、37 °C、飽和蒸気圧、5%炭酸ガス気相下で 24 時間培養を行った後、培地を除去し、Si70、Si300、Si1000 を 20、100 $\mu\text{g/ml}$ (最終濃度) で作用させた。24 時間培養した後、培養上清を回収、200 倍に希釈して IL-8 ELISA kit (R&D Systems) にて IL-8 量を測定した。なお、ポジティブコントロールとしてリコンビナント hTNF- α (10 ng/ml)、LPS (30、300 ng/ml) 作用群も測定した。

C. 研究結果

ナノ粒子はあらゆる経路で生体内に取り込まれる可能性がある。化粧品や医薬品として使用される場合は経皮・静脈内経路で、大気汚染物質としてのナノ粒子は、経鼻・経肺経路などで取り込まれるものと考えられる。どの経路で取り込まれた場合にも、各組織に存在するマクロファージ様細胞に貪食されることが予想される。そこでまず、マウスマクロファージ細胞株である RAW264.7 細胞に各濃度のシリカを 24 時間または 72 時間作用させた際の細胞傷害性についてメチレンブルーアッセイにて検討した (Fig. 1)。その結果、24 時間、72 時間共に各粒子径のシリカにおいて、濃度依存的な細胞死が誘導されることが判明した。特に Si70 において顕著な細胞死が観察された。また、各粒子の細胞傷害性に関し

て、ミトコンドリアの酵素活性を指標とした **WST-1 assay** 並びに **DNA 合成**を指標とした **BrdU assay** にて同様に検討した (Fig. 2)。その結果、**WST-1 assay** ではメチレンブルーアッセイと同様に、濃度依存的な細胞傷害性が観察された。一方、**BrdU assay** においては **Si300**、**Si1000** 作用群で傷害性は見られなかったものの、**Si70** 作用群では強い傷害性が観察された。また、各シリカを作用後 **24** 時間における細胞を蛍光顕微鏡にて観察した結果、蛍光強度の強い **Si300** 及び **Si1000** において、細胞内に取り込まれたと考えられるドット上の蛍光が観察された (Fig. 3)。以上の結果から、**RAW264.7** 細胞は各シリカを取り込んだ後に、何らかの機序で細胞死を誘導していることが示唆されると共に、粒子径 **70 nm** のシリカでその傾向が強いことが明らかとなった。

オートファジーは元来、細胞が飢餓状態になった際、発動される細胞応答である。一方で近年、細菌・ウイルスなどの異物が細胞内に侵入した際、これら異物を排除する目的でオートファジーが誘導されることが知られている。そこで次に、ナノ粒子が細胞に取り込まれた際、オートファジーが誘導されるか否かに関して検討した。まず、オートファジーの際に形成されるオートファゴソームを、汎用される **MDC** 試薬を用い検出した (Fig. 4)。その結果、**MDC** 染色により、オートファジーを誘導することが知られている **LPS+ZVAD** 作用群と同様の染色像が、各シリカ作用群で観察された。さらに、**GFP** 融合 **LC3** (オートファゴソームのマーカー蛋白質) を発現するプラスミドをトランスフェクションした細胞を用いて、各シリカ作用後の形態観察を試みた (Fig. 5)。その結果、各シリカ作用により、**positive control** である **LPS+ZVAD** 作用群と同様に、**GFP** が **dot** 状に観察されるというオートファゴソームの形成が確認された。以上の結果より、**RAW264.7** 細胞において、シリカを作用することでオートファジーが誘導されることが示唆された。

生体内でマクロファージと並び異物取り込み能の高い細胞として、樹状細胞が挙げられる。そこで次に、マウス樹状細胞株 **DC2.4** 細胞に対する各シリカの影響を細胞傷害性を指標に評価した (Fig. 6)。そ

の結果、**RAW264.7** 細胞の場合とは一部異なり、高濃度の **Si70** を作用した際にのみ若干の細胞傷害性が観察された。これらの細胞傷害性の違いがシリカの取り込み量あるいは各細胞の性質に起因するのかは不明であり、今後の検討課題である。

近年、経口投与や経肺投与において、ナノ粒子が血液を介して全身の主要臓器のみならず脳にも分布することが報告され、それらの血液脳関門の通過や生体毒性に及ぼす影響が注目されている。そこで、脳血管内皮を含む全身の血管内皮細胞や脳に存在する神経幹細胞への影響に注目して各シリカの毒性評価を試みた。まず、脳、臍帯静脈、肺、皮膚由来のヒト正常血管内皮細胞に対して各シリカが及ぼす影響を、細胞傷害性を指標に評価した (Fig. 7)。その結果、**RAW264.7** 細胞とは異なり、作用 **24** 時間において全く細胞死は見られなかった。また **72** 時間という長期間粒子を作用させた際においても、細胞死は全く観察されなかった (Fig. 8)。そこで **Si1000** を作用後 **24** 時間における **HuBME** 細胞を蛍光顕微鏡にて観察したところ、細胞内に取り込まれたと考えられるドット上の蛍光が観察された (Fig. 9)。さらにシリカが細胞表面に吸着している可能性を除くために、エネルギー依存的な取り込み阻害条件である **4°C** における細胞の形態を観察した (Fig. 10)。その結果、**37°C** 条件下では見られたドット上の蛍光が、**4°C** 条件下では全く観察されなかったことから、**HUBME** 細胞はエネルギー依存的にシリカを取り込んでいるものの、細胞死には至らないことが判明した。また、各シリカが炎症性のサイトカインである **IL-8** の産生誘導に及ぼす影響を検討した結果、いずれの細胞においてもシリカ作用による **IL-8** の産生誘導は観察されなかった (Fig. 11)。今後、内皮細胞における取り込み経路や、細胞内応答の詳細を解明していくと共に、血液脳関門への影響などを評価していく予定である。

続いて、**GFP** を発現する神経幹細胞を用いて、各シリカが及ぼす影響を細胞傷害性を指標に検討した (Fig. 12)。その結果、高濃度のシリカを **24** 時間あるいは **72** 時間作用させることで、細胞傷害が誘導される傾向が見られた。さらに **24** 時間後の細胞を

蛍光顕微鏡にて観察したところ、蛍光強度の強い Si1000 や Si300 において細胞への粒子の取り込みが見られると共に、粒子作用により神経幹細胞が形成するスフェア（細胞塊）数の減少が見られた（Fig. 13）。今後、神経幹細胞の分化に及ぼす影響を検討していく予定である。

D. 考 察

化粧品・医薬品など様々な分野でナノ粒子は使用されつつある。そのためナノ粒子は、経口・経鼻などからの吸入、皮膚への塗布、静脈内投与など、様々な経路から生体内に取り込まれる。どの経路においても、血流に達した場合、まず血管内皮細胞と接触し、更に肝臓のクッパー細胞・肺胞マクロファージ・皮膚ランゲルハンス細胞などの貪食作用を有する細胞に多くが取り込まれると考えられている。また、組織に移行した後、組織幹細胞・実質細胞など様々な種類の細胞に作用することとなる。しかし、これら細胞に対して、ナノ粒子がどのような作用を及ぼすかに関して、粒子の違い・粒子径の違い・細胞の感受性の違いなど、詳細に検討した例は皆無である。本観点から、本年度は、種々粒子径のシリカをナノ粒子のモデルとし、マウスマクロファージ細胞株 RAW 細胞・4 種のヒト正常血管内皮細胞・マウス神経幹細胞（NSC）に及ぼす影響を *in vitro* において検討した。

まず、細胞傷害性を検討した結果、特に RAW 細胞に対して強い傷害性を示すことが明らかとなった。100 µg/ml の濃度では、70 nm シリカ作用群で、ほぼ全ての細胞が死滅した。また、粒子径の小さいシリカのほうが、強い細胞傷害性を示すことが明らかとなった。この粒子径による違いが、シリカの細胞内取り込まれ効率に起因するのか、細胞に取り込まれた後の影響によるものなのかに関しては、現在検討中である。他の細胞に対する細胞傷害性を検討した結果、神経幹細胞においても強い細胞傷害性が認められたが、血管内皮細胞では細胞傷害性は認められなかった。神経幹細胞へ細胞傷害性が認められるという事実は、ナノ粒子が脳にも移行することを考えると貴重な知見であり、今後より詳細な検討が必

要である。生体内において、神経幹細胞は、自己増殖能・未分化能を有し、神経細胞・アストロサイト・ミクログリアなど、各種細胞に分化する（多分化能）幹細胞である。神経幹細胞の破綻により、脳組織が正常な機能を失うことは自明であり、ナノ粒子が神経幹細胞の未分化能・多分化能に与える影響を詳細に検討していく必要がある。

オートファジーは、元来細胞が飢餓状態になった時、細胞が自らを守るために作動するものである。近年、飢餓状態のみならず、細菌やウイルス感染などによっても誘発することが知られている。ナノ粒子がオートファジーを誘導した意味は不明であるが、細胞がストレスから身を守るために誘導し、細胞死を免れようとしたのかもしれない。また、オートファジーが細胞死を誘導することも報告されており、ナノ粒子による細胞傷害とオートファジーの関連を詳細に検討する必要がある。

本年度行った検討は、全て高濃度のシリカを作用させた場合の結果であり、ナノ粒子の生体内濃度を考慮に入れた検討ではない。今後は、ナノ粒子の生体内動態、濃度を正確に測定・推定し得る方法論の確立が期待され、それらデータと共に安全性を議論する必要がある。しかし、たとえ高濃度であったとしても、上記現象が誘発されることを加味した上で、その使用用途・濃度を厳密に規定していく必要があると思われる。

E. 結論

モデルナノマテリアルとして粒子径の異なるシリカ粒子を用いて、各種細胞に対する細胞傷害性・サイトカイン産生誘導能・オートファジー誘導能を評価した。その結果、使用した全ての細胞に対して、ナノ粒子が取り込まれていることが明らかとなった。マウスマクロファージ細胞株に対して、粒子径減少に伴い細胞傷害性を強く誘導した。また、マウス神経幹細胞に対しても細胞傷害性を誘導することが明らかとなった。一方で、4 種のヒト由来血管内皮細胞に対しては、細胞傷害性を示さなかった。更に、マウスマクロファージ細胞株を用いた検討から、シリカはオートファジーを誘導することが明らかとな