

201035030A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の 影響に関する試験法の開発に関する研究

(H22-化学-若手-009)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の 影響に関する試験法の開発に関する研究

(H22-化学-若手-009)

平成22年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成23 (2011) 年 3 月

目次

| | |
|--|----|
| I. 総括研究報告 | 1 |
| 中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発に 関する研究 藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・助教 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. 神経関連細胞株を用いた、ナノ粒子の神経への影響評価法の開発 . . . 8 | |
| 藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・助教 馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・共用研究施設・教授・施設長 | |
| 2. シリカ微粒子の安全性試験・毒性機構の解析 15 | |
| 花田三四郎・(独) 国立国際医療研究センター研究所・流動研究員 | |
| 3. 蛍光ナノ粒子の中枢神経系への取り込みとその影響 18 | |
| 星野 昭芳・(独) 国立国際医療研究センター研究所副所長室 協力研究員 | |
| 4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な基準策定への働きかけ 24 | |
| 叶谷 文秀・(独) 国立国際医療研究センター副所長室・協力研究員 | |
| III. 班会議資料一覧 | 27 |
| IV. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 37 |

I . 総括研究報告

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

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発に関する研究
(H22-化学-若手-009)

研究代表者：藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・助教

研究分担者：馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・共用研究施設・教授・施設長

研究分担者：花田 三四郎 国立国際医療研究センター研究所・副所長室・流動研究員

研究分担者：星野 昭芳 国立国際医療研究センター研究所・副所長室・協力研究員

研究分担者：叶谷 文秀 国立国際医療研究センター研究所・副所長室・協力研究員

研究協力者：井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学生体構造学分野・助教

研究協力者：山本健二 国立国際医療研究センター研究所・副所長

研究協力者：伏木 信次 京都府立医科大学大学院・医学研究科・分子病態病理学研究分野・教授

研究協力者：伊東 恭子 京都府立医科大学大学院・医学研究科・分子病態病理学研究分野・准教授

研究協力者：稲垣 豊 東海大学・医学部医学部基盤診療学系・教授

研究協力者：藤井 紀子 京都大学原子炉実験所・放射線生命科学部門・教授

研究協力者：真鍋 法義 東北大学多元物質科学研究所・研究員

研究協力者：宮負 健一 国立国際医療研究センター研究所・研究生

研究要旨

本研究は化学物質、特にナノマテリアルの中枢神経に与える毒性学的な影響を「細胞を使った評価」・「脳スライス培養法 (ex vivo) での評価」・「動物個体での評価」の3つの評価法を関連付けることで、「細胞・ex vivo の評価から、個体での中枢神経への影響を簡易かつ高精度に予測できる試験法」を開発することを目的とするものである。

本年度は、細胞レベルと動物個体でのナノ粒子の影響を中心に解析を行った。細胞レベルでは特にヒト神経幹細胞株、及び血液脳関門モデルを用いて、ナノ粒子の影響を検討している。今後は、これらの細胞・動物におけるデータを補助的に活用することで、より高精度な脳スライス培養 (ex vivo) 評価法の構築に役立てたい。

また、本研究はナノ粒子の安全性に対して、国際的な基準策定を目指すものである。海外においてナノ粒子の安全性を検討しているグループとの協力関係を構築するため、Nanosafe 2010 への参加を行い、基礎データの発表、並びに意見交換を行った。

A:研究目的

近年、加工技術の発達により、カーボンナノチューブなど種々のナノマテリアルが、工業的に大量生産できるようになった。しかしながら、ナノマテリアルの毒性については、細胞レベルでの検討は行なわれているが、動物個体での解析は十分であるとは言えない。また、細胞レベルと動物個体での結果に差があることもあり課題が多い。

現状では、既に化粧品など人体に直接接触する分野にも活用されている。これらの製品にナノ特有の有害な性質が合った場合、アスベストの長期暴露性中皮腫などと同様、将来的に社会問題化する可能性は否定できない。

一方、ナノ毒性の試験検討を行うためには多数の動物を用い、多額な費用と長期間の労力をかける必要であるために、事業者レベルでの解析は困難を極めている。

そこで、我々は中枢神経に与える毒学的影響を、簡易に評価できる手法の開発を行なう。近年、中枢神経系における高次機能を測定する手段として、脳スライス培養法が構築されている。脳組織を薄く切片化して、脳の各種細胞の機能を維持したまま検討できる手法であり、1匹の動物から約5枚の切片を得ることができる。本研究では、この手法を安全性評価に応用することで、大量の動物個体を使用せずに、培養細胞よりも高次元な情報を得ることができると期待される。

この新しい評価法の信頼性を確かめるため、本研究では、細胞・動物個体での評価も推進する。細胞では神経系への分

子レベルの影響を検討し、障害性が見られる場合には、その機構を検証する。動物個体レベルでは、ナノ粒子曝露時の個体全体や組織としての影響評価、及びナノ粒子の脳内移行について調査を行う。これら、脳スライス・細胞・動物での評価を比較することで、脳スライス法によるナノ粒子評価法の精度を確かめる。

本年度は、脳スライス培養での評価法を構築する傍ら、特に細胞での影響評価法を中心に解析を進めた。

以上のように、本研究は、ナノマテリアルの中枢神経に与える影響を高精度に予測する方法を開発し、国民の健康増進に貢献することを目的とするものである。

B:研究方法

1. 神経関連細胞株を用いた、ナノ粒子の神経への影響評価法の開発：

細胞を使った評価法を構築し、分子レベルでの影響を調べるため、神経関連細胞株・脳血液関門モデルを用いた検討を行った。

2. シリカ微粒子の安全性試験・毒性機構の解析：

中枢神経系の毒性評価の前段階として、各種サイズのシリカ微粒子および物性の異なるシリカ微粒子を用い、マウス肺胞マクロファージ細胞株の毒性を評価し、炎症および線維化に関する応答の評価を行った。

3. 蛍光ナノ粒子の中枢神経系への取り込みとその影響：

静脈内投与と腹腔内投与の2種類の投

与法を用いて、マウスにおける暴露部位の違いによる組織分布、及びナノ粒子の脳内移行性の差異について検討した。

4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な基準策定への働きかけ：

欧州でのナノ粒子の安全性評価会議 Nanosafe 2010 において、現在までに構築した細胞レベルでの評価法やナノ粒子の毒性機構について発表を行った。また、海外でナノ粒子安全性評価を行っている研究者との意見交換を行った。

5. 脳スライス培養法の評価法・動物個体での評価：

現在、通常マウス、及び東海大学・稲垣教授らの開発した線維化モデルマウスを用いて、安全性評価に応用できる条件を構築している段階である。また、京都大学・藤井教授らの開発した抗 D-Asp 抗体を用いて、初期段階の神経異常を早期に検出できるかどうかを検討している。

<倫理面への配慮>

本研究では動物を用いた試験が含まれている。動物の愛護及び管理に関する法律、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針の趣旨を尊重し、実験施行時の苦痛の軽減等、動物愛護への配慮を行ない、研究を推進している。

その上で、各研究機関における動物実験委員会において、実験内容が事前に検証され、承認を得た方法で行っている。

C:研究結果

1. 神経関連細胞株を用いた、ナノ粒子の神経への影響評価法の開発：

本研究において、血液脳関門モデルを使用した QD-PEG、QD-COOH の透過性評価を行い、マウスを用いた投与試験の報告と比較した。この結果、脳血液関門モデルからは、わずかに透過するということが示唆されており、マウス個体での結果と一致していた。

加えて、ナノ粒子共存時に神経幹細胞株での取込み、分化への影響、及び QD-COOH ではミトコンドリア活性への影響が示唆された。

2. シリカ微粒子の安全性試験・毒性機構の解析：

シリカ微粒子のサイズに依存した毒性が確認され、炎症性ケモカインの分泌と相関があった。

線維化マーカーについては、結晶質のシリカのみ分泌が確認され、炎症とは異なるフェーズでの毒性発現の可能性が示唆された。各々のフェーズは濃度域に違いがあり、長期的な分泌が協調的に働いた場合にのみ、生体における疾患発症に関与する可能性があることが示唆された。

3. 蛍光ナノ粒子の中樞神経系への取り込みとその影響：

静脈内ならびに腹腔内という 2 つの経路でナノ粒子を投与し、その生体内挙動を比較検証した。腹腔内よりナノ粒子を投与されたマウスでは静脈内投与とは異なり、ナノ粒子が脳実質組織内へと移行することを確認した。

ナノ粒子の生体への影響を検討する上において、投与経路・暴露部位が正確なナノ粒子の暴露リスクを評価するために重要な要因のひとつであることを証明した。

4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な基準策定への働きかけ：

ナノ物質安全性国際会議 Nanosafe 2010 での口頭発表を通じて、シリコン系ナノ粒子の毒性機構解明の成果を発表しただけでなく、本研究事業の目的である国際的なガイドライン策定を目指すという目標をスライドでアピールした。

D:考察

1. 脳スライス培養法による安全性試験法の構築：

現在、スライス培養を開始しており平成23年1月からナノ粒子を共培養した試験を開始している。当初の研究計画に比べ、3ヶ月の遅れを生じているが、平成23年度中に種々のナノ粒子を用いた結果を得る計画である。

2. 動物個体を用いたナノ粒子の中樞神経系への影響検討：

当初の予定より早く8月末より検討を進めている。正常マウスに加え、東海大学・稲垣教授から提供された線維化レポーターマウスを導入することで、脳への影響と同時に、肺・肝臓への影響も簡便に評価できる系を検討している。

3. マウス中枢細胞・ヒト中枢細胞株を使った安全性試験・血液脳関門透過性の検

証：

ヒト神経関連細胞での安全性評価を行っている。現在までに、MTT 試験では、低濃度のカドミウムセレンのナノ粒子(QD)・シリコン系ナノ粒子についての評価を行った。血液脳関門モデルでは QD での評価を行っている。今後は、体系的に、他のナノ粒子での評価や表面加工の違いの影響を検討する必要がある。

E:結論

細胞レベル・動物レベルでの評価は進んでおり、中枢神経系における分子レベルでの毒性や動物における脳への蓄積について、データが集まってきている。

次年度からは、脳スライス培養での評価との比較を行い、簡便に評価できる方法の構築と、国際的な基準策定に向け、研究を推進する。

F:健康危機情報

現在のところ無し。

G:研究発表

業績一覧の項を参照。

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

II. 分担研究報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発
(H22-化学-若手-009)

神経関連細胞株を用いた、ナノ粒子の神経への影響評価法の開発

研究代表者：藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・助教
研究分担者：馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・共用研究施設・教授・施設長
研究分担者：花田 三四郎 国立国際医療研究センター副所長室・流動研究員
研究分担者：星野 昭芳 国立国際医療研究センター副所長室・協力研究員

研究要旨

本研究は化学物質、特にナノマテリアルの中枢神経に与える毒性学的な影響を「細胞を使った評価」・「脳スライス培養法（ex vivo）での評価」・「動物個体での評価」の3つの評価法を関連付けることで、「細胞・ex vivo の評価から、個体での中枢神経への影響を簡易かつ高精度に予測できる試験法」を開発することを目的とするものである。

本年度は、分子レベルでのナノ粒子の影響を調べるため、特にヒト神経幹細胞株、及び血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の影響を検討した。ヒト神経幹細胞株での実験結果からは、ナノ粒子(Quantum dot: QD)が細胞内に取り込まれ、分化に影響を与える可能性が示唆された。一方、血液脳関門モデルからは、既存薬剤の透過係数との比較から、QD がごくわずかに透過する可能性が示唆された。

今後は、これらの基礎データを補助的に活用することで、より高精度な脳スライス培養（ex vivo）評価法の構築に役立てたい。

A:研究目的

近年、加工技術の発達により、カーボンナノチューブなど種々のナノマテリアルが、工業的に大量生産できるようになった。しかしながら、ナノマテリアルの毒性については、細胞レベルでの検討は行なわれているが、動物個体での解析は十分であるとは言えない。また、細胞レベルと動物個体での結果に差があることもあり課題が多い。

現状では、既に化粧品など人体に直接

接触する分野にも活用されている。これらの製品にナノ特有の有害な性質が合った場合、アスベストの長期暴露性中皮腫などと同様、将来的に社会問題化する可能性は否定できない。

一方、ナノ毒性の試験検討を行うためには多数の動物を用い、多額な費用と長期間の労力をかける必要であるために、事業者レベルでの解析は困難を極めている。

そこで、我々は中枢神経に与える毒性

学的影響を、簡易に評価できる手法の開発を行なう。近年、中枢神経系における高次機能を測定する手段として、脳スライス培養法が構築されている。脳組織を薄く切片化して、脳の各種細胞の機能を維持したまま検討できる手法であり、1匹の動物から約5枚の切片を得ることができる。本研究では、この手法を安全性評価に応用することで、大量の動物個体を使用せずに、培養細胞よりも高次元な情報を得ることができると期待される。

この新しい評価法の信頼性を確かめるため、本研究では、細胞・動物個体での評価も推進する。細胞では神経系への分子レベルの影響を検討し、障害性が見られる場合には、その機構を検証する。動物個体レベルでは、ナノ粒子曝露時の個体全体や組織としての影響評価、及びナノ粒子の脳内移行について調査を行う。これら、脳スライス・細胞・動物での評価を比較することで、脳スライス法によるナノ粒子評価法の精度を確かめる。

本年度は、脳スライス培養での評価法を構築する傍ら、特に細胞での影響評価法を中心に解析を進めた。

以上のように、本研究は、ナノマテリアルの中枢神経に与える影響を高精度に予測する方法を開発し、国民の健康増進に貢献することを目的とするものである。

B:研究方法

1. 神経幹細胞株：

ブリティッシュコロombia大学の Kim Seung 博士らが樹立し、供与して頂いたヒト神経幹細胞株を用いて評価を行った。(Lee HJ. et al., Stem Cells (2007))

2. QD と神経幹細胞との共培養試験：

神経幹細胞は、 $2.5 \times 10^4/\text{mL}$ で各培養容器に捲いた (96 穴プレート: $100 \mu\text{L}$, チャンバースライド: $400 \mu\text{L}$)。2 日間培養した後、QD-streptavidin (Qdot® 655 Streptavidin Conjugate) または、QD-COOH (Qdot® 655 ITK™ Carboxyl Quantum Dots) を各濃度で共培養した。48 時間後、ミトコンドリア活性を測定するため、指示薬に Cell Counting kit-8 (同仁化学) を用いて MTT 試験を行なった ($n=3$ で 2 回検討を行い、平均値を出した)。一方、取込みの観察は、QD-streptavidin を共培養し、48 時間後に DPBS で細胞表面を洗浄、蛍光顕微鏡 (BZ-9000、キーエンス) を用いて観察した。

3. 脳血液関門モデルを使った透過性の評価：

国内企業のファーマコセル社が開発した脳血液関門モデル BBB キット (RBT24H) を用いて評価を行なった。モデルを構築する 3 種類の細胞 (脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイト) の解凍から 4 日目に、透過試験を行なっている。

透過係数を調べるため、 40 nM の QD-PEG (Qtracker™ 655 non-targeted Quantum Dots)、QD-COOH (Qdot® 655 ITK™ Carboxyl Quantum Dots) が用いられた。本検討では、1 回分のみのデータを示している。

倫理面への配慮：

本研究では動物を用いた試験が含まれている。動物の愛護及び管理に関する法

律、研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針、及び厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針の趣旨を尊重し、実験施行時の苦痛の軽減等、動物愛護への配慮を行ない、研究を推進している。

その上で、本研究で検討している実験動物を用いた脳スライスの作製・評価法の構築、線維化モデルを用いた評価法は、東京慈恵会医科大学・動物実験委員会において、実験内容が事前に検証され、承認を得た方法で行なった。

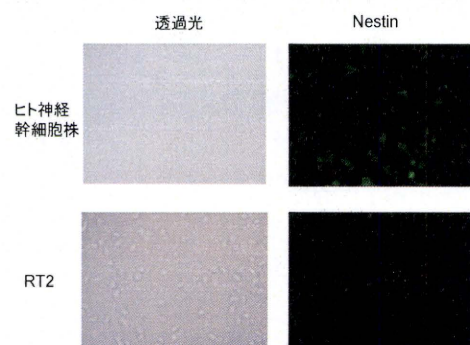
C:研究結果

1. 神経幹細胞株を用いた、ナノ粒子共培養時のミトコンドリア活性の評価、及び分化への影響評価：

影響の評価法には、MTT 試験、神経系細胞のマーカーを用いた RT-PCR、及び取込の観察を行った。

まず初めに、本細胞が神経幹細胞であることを確かめるため、神経幹細胞の発現マーカーである、ヒト Nestin 抗体で染色を行なった。(図1)。ネガティブコントロールのラット脳神経膠腫細胞株 RT2 では、染色されなかった。

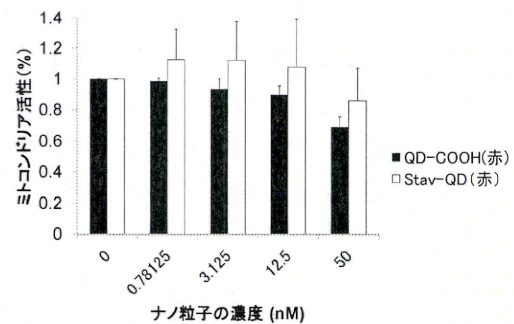
図1. 抗ヒト Nestin 抗体による染色



本細胞への、ナノ粒子共培養時の影響を評価するため、QD を用いて検討を行った。QD は、CdSe を核とする蛍光ナノ粒子であり、紫外線などの光によって蛍光を発する。現在は、主に生化学用蛍光試薬として市販が行われている。

本検討では、赤色の蛍光を発する Qdot® 655 Streptavidin Conjugate (QD-streptavidin)、比較対照群として、Qdot® 655 ITK™ Carboxyl Quantum Dots (QD-COOH)を用いた。図2は、48時間共培養時のミトコンドリア活性試験 (MTT 試験) の結果を示している。

図2. ヒト神経幹細胞における、QD 共培養時のミトコンドリア活性への影響 (n=3, 検討回数 2 回の平均値)

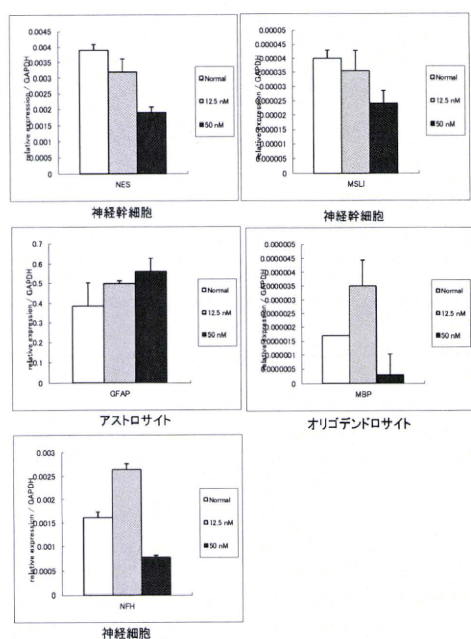


現在までに、QD-streptavidin では、50 nM まで活性への影響がほとんど見られなかった。一方、QD-COOH では、濃度が 50 nM になるとミトコンドリア活性が下がっていた。

図3は、QD-streptavidin 共培養時における、神経幹細胞分化マーカーの遺伝子挙動を示している。QD-streptavidin の濃度依存的に、神経幹細胞のマーカーである Nestin、Musashi-1 の発現が減少

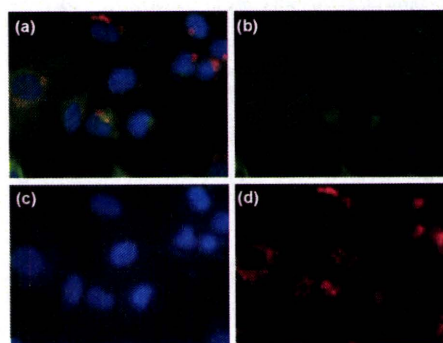
し、アストロサイトのマーカーである GFAP の発現が増加している。一方、オリゴデンドロサイトのマーカーである MBP や神経細胞のマーカーである NFH は 12.5 nM の濃度において発現が上昇し、25 nM の濃度では減少している。

図3. RT-PCR (GAPDH基準) を使った分化マーカーのmRNA発現量の測定



MTT 試験においてミトコンドリア活性への影響が見られなかった 12.5 nM の観察像において、QD-streptavidin の取込み像が観察された(図 4)。

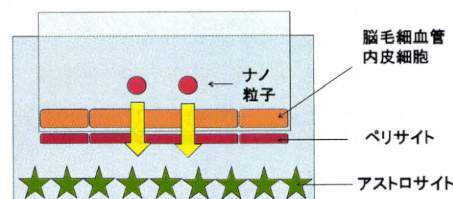
図 4. 神経幹細胞における QD の取込み。濃度 12.5 nM, 共培養時間 48 時間。
(a)Merge 像, (b)抗 Nestin 抗体による染色, (c)DAPI による核染色, (d)取り込まれた QD-streptavidin の蛍光像。



2. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の血液脳関門透過性評価:

国内企業のファーマコセル株式会社から発売されている BBB キット™ (RBT-24H)を用いて、血液脳関門透過性を検証した。本キットは、ラットの脳毛細血管内皮細胞・ペリサイト・アストロサイトの 3 種類の細胞から構成されているキットである(図 5)。

図5. BBBキット™ (ファーマコセル社製)を用いたナノ粒子透過性の評価



透過性を評価するサンプルには、他研究グループで動物への投与試験が行われた QD-PEG、QD-COOH を用いた (Praetner, M. et al., Biomaterials (2010)). Praetner 氏らの論文中的のグラフでは、大腿動脈から投与された QD は、脳の重さに対して、QD-PEGは約0.1%/g、

QD-COOH は 0.6%/g、24 時間後に蓄積していると示されている。脳の重さが 350 mg だと仮定した場合、QD-PEG は、約 0.035%、QD-COOH は約 0.21%が蓄積している計算になる。

BBB キットで血液脳関門モデルを作成したところ、経内皮電気抵抗 TEER は 6 サンプルの平均で $425 \Omega \times \text{cm}^2$ であり、十分な密着結合が示唆された。上記論文で用いられたサンプルを測定したところ、測定 30 分時における透過係数(Pe)が QD-PEG では $0.871 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、QD-COOH では $0.587 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ であった(表 1)。

表 1: BBB キットを用いた QD の透過係数

| 名称 | Pe($10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$) | 脳移行性 |
|---------|-------------------------------------|------------|
| QD-PEG | 0.871 | ごくわずかに移行する |
| QD-COOH | 0.587 | ごくわずかに移行する |

表 2: 他の薬剤の透過係数と透過性

| 名称 | Pe($10^{-6}\text{cm}^2/\text{s}$) [*] | 脳移行性 |
|-------|--|------------|
| カフェイン | 222.51 | 透過性有 |
| シメチジン | 2.99 | ごくわずかに移行する |
| ジゴキシン | 0.44 | ごくわずかに移行する |

*表 2 の Pe は、Nakagawa S. et al., Neurochem. Int. (2009) より引用

この時の透過割合は、初期の量を基準にするとそれぞれ 0.26%、0.02%と計算された。長崎大学・中川慎介博士らの論文によると、現在市販されている薬剤の透過係数は、シメチジン $2.99 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ 、ジゴキシン $0.44 \times 10^{-6} \text{ cm}^2/\text{s}$ となっている(表 2)。ジゴキシン・シメチジンは、ヒ

トにおいて脳への移行性がわずかに認められており、透過係数は、その間にあることがわかった。

また、1 時間の透過試験を行った後の BBB キットでの QD 回収率は、QD-PEG で約 73.1%、QD-COOH で約 67.5%であった。このことから、それぞれの QD の約 30%が細胞内に取り込まれている可能性が示唆される。

D: 考察

ラット細胞の脳血液関門モデルを用いた試験において、40 nM のナノ粒子 QD は、ジゴキシンとシメチジンの間の透過係数を示していた。このことから、大部分は透過しないが、わずかながらに QD が脳血液関門を透過する可能性が示唆された。

QD が動物個体に投与された場合の脳への蓄積については、研究分担者・星野らによって報告されている。本年度の研究結果において、表面加工の種類は異なるが、カプトプリルが表面加工された QD を腹腔投与した研究が行われた。この検討では、投与後 6 時間において、全体量の 0.1%程度がマウス脳へ蓄積されることが示されている (Kato, S. et al., Nanotechnology (2010))。

加えて、他の研究グループではあるが、Praetner 氏らの論文から推測される蓄積の割合は、投与後 24 時間において、QD-PEG は約 0.035%、QD-COOH は約 0.21%が脳へ蓄積していることが示唆される (Praetner, M. et al., Biomaterials (2010))。

更に、透過試験後の回収率の低さから、

QD が脳血液関門を構成する細胞に取り込まれることが示唆されている。QD-PEG に比べて、QD-COOH で回収率が低く、脳血液関門モデルを使った透過係数や透過割合の大小と、動物個体での蓄積量の大小が一致しないのは、細胞内への取り込みが影響している可能性がある。

このため、脳血液関門を構成する、脳毛細血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイトが、ナノ粒子を取り込んだ際にどのような挙動を示すのか、また、ナノ粒子共存時にバリア機能は低下するのか等について経時的に評価していく必要がある。

一方、ヒト神経幹細胞株のミトコンドリア活性は QD-COOH において 50 nM の濃度で低下していた。ヒトの脳への透過性がマウスと同程度と仮定し、かつ、マウスでの蓄積割合である約 0.21% がヒトでも蓄積すると仮定した場合、QD-COOH は、23.8 μM 以上の投与によって、神経幹細胞株の活性に影響を与える可能性が示唆される。

未確定ではあるが、QD と共培養した神経幹細胞株の mRNA の RT-PCR の結果から神経幹細胞株の一部がアストロサイト様細胞へと分化している可能性がある。今後は、分化マーカーの染色による FACS や観察、タンパク質の解析を行うことで、分化への影響を検証したい。

E:結論

本研究において、血液脳関門モデルを使用した QD-PEG、QD-COOH の透過性評価を行い、マウスを用いた投与試験の

報告と比較した。この結果、脳血液関門モデルからは、わずかに透過するということが示唆されており、マウス個体での結果と一致していた。

加えて、ナノ粒子共存時に神経幹細胞株での取込み、分化への影響、及び QD-COOH ではミトコンドリア活性への影響が示唆された。

今後は、検討するナノ粒子の種類を増やすと共に、経時的な変化、脳血液関門を構成する細胞への影響や神経幹細胞株の分化への影響を検証する。これらのデータを補助的に用いることで、より精度の高い脳スライス培養評価法を構築したい。

F:健康危機情報

現在のところ無し。

G:研究発表

1. 論文発表

1 Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series 2011, in press

2. 学会発表

なし

3. その他の業績

なし

H:知的所有権の出願・取得状況（予定を含む）

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発
(H22-化学-若手-009)

シリカ微粒子の安全性試験・毒性機構の解析

分担研究者：花田三四郎・(独) 国立国際医療研究センター研究所・流動研究員
協力研究者：宮負健一・(独) 国立国際医療研究センター研究所・研究生
協力研究者：星野昭芳・(独) 国立国際医療研究センター研究所・協力研究員
協力研究者：叶谷文秀・(独) 国立国際医療研究センター研究所・協力研究員
協力研究者：真鍋法義・東北大学多元物質科学研究所・研究員
協力研究者：山本健二・(独) 国立国際医療研究センター研究所・副所長

研究要旨

ナノ微粒子材料は、表面活性の大きさなどから、バルクナノ粒子よりも高い毒性を有することが示唆される。本研究では、中枢神経系の毒性評価の前段階として、各種サイズのシリカ微粒子および物性の異なるシリカ微粒子を用い、マウス肺胞マクロファージ細胞株の毒性を評価し、炎症および線維化に関する応答の評価を行った。結果、シリカ微粒子のサイズに依存した毒性が確認され、炎症性ケモカインの分泌と相関があった。線維化マーカーについては、結晶質のシリカのみ分泌が確認され、炎症とは異なるフェーズでの毒性発現の可能性が示唆された。各々のフェーズは濃度域に違いがあり、長期的な分泌が協調的に働いた場合にのみ、生体における疾患発症に関与する可能性があることが示唆された。

A:研究目的

シリカ粒子は、珪肺症など呼吸器疾患の可能性が示唆され、安全性の評価が行われてきた。ナノ微粒子材料は、表面活性の大きさなどから、バルクナノ粒子よりも高い毒性を有することが示唆される。呼吸器における毒性は、マクロファージの微粒子の貪食による様々な生物応答が毒性発現のイニシエーションになると考えられ、その評価が不可欠である。当研究室では、すでに、炎症や組織再構成に

関与すると考えられる、マクロファージのケモカイン応答が、各種疾患における特異的な発現を示している事例をいくつかの組織において報告してきた。このことは、中枢神経系においても、マクロファージ由来のミクログリアが関与する可能性を示唆している。本研究では、中枢神経系の毒性評価の前段階として、各種サイズのシリカ微粒子および物性の異なるシリカ微粒子を用い、マウス肺胞マクロファージ細胞株の毒性を評価し、炎症

および線維化に関する応答の評価を行った。

B:研究方法

1. 細胞培養

マクロファージ細胞株 (MH-S) を用いて、各種サイズ (粒子径 12-1400 nm) および物性 (結晶およびアモルファス) のシリカ微粒子に関する毒性評価を行った。

2. 毒性評価試験

細胞毒性は、培養 2 日後の WST-8 アッセイを行った。炎症に関する応答として、好中球遊走因子: MIP-2 および、線維化因子: TGF- β の分泌を ELISA にて測定した。各種炎症性サイトカインおよびケモカインについて、定量的 RT-PCR による発現を測定した。

(倫理面への配慮)

国立国際医療研究センター研究所の倫理規定に従い、すべての検討を行った。

C:研究結果

WST-8 アッセイにおいて、シリカ微粒子のサイズに依存した毒性が確認された。これをナノ粒子の表面積に換算すると、その毒性は表面積に依存した毒性を示した。炎症マーカーである、MIP-2 はヒトにおける IL-8 のホモログであるが、その分泌は、非致死毒性域において細胞毒性と相関があった。一方、線維化マーカーである TGF- β については、結晶質のシリカのみにおいて、特に低負荷域において、分泌が確認され、炎症とは異なるフェーズでの毒性発現の可能性が示唆された。

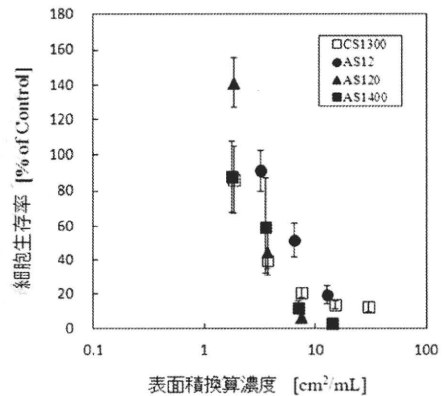


図 1 細胞毒性の表面積依存性

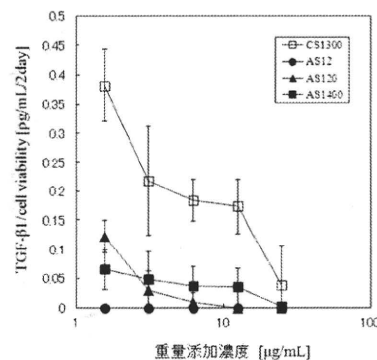


図 2 シリカ微粒子による TGF- β 産生

D:考察

上記結果から、以下のことが示唆された。(1) シリカ微粒子の毒性は、粒子表面積に依存した毒性を示し、それは炎症性ケモカインの分泌と相関がある。(2) 線維化については、物性の違い、表面特性の違いが関与する可能性がある。したがって、炎症と線維化が異なった濃度域により発現しているため、各々のフェーズが長期的な分泌により協調的に働いた場合にのみ、生体における疾患発症に関与する可能性がある。

E:結論

シリカ微粒子の毒性について、炎症フェーズと線維化フェーズによる生物応答が示唆された。動物実験における検討が必要だが、これらのフェーズが協調的に作用することによってはじめて、珪肺の発症に関与している可能性がある。一方で、ナノ材料の毒性は用量を低下させるが、高濃度で暴露されない限り、生体の恒常性維持により、安全性に影響を与えない可能性もある。以上は、今後の検討が必要である。今後は、中枢神経系の毒性に焦点を変え、微粒子材料における血液脳関門 (BBB) の通過効果やミクログリアのケモカイン応答などを探っていく予定である。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

- 1 Fujoka K, Hanada S, Kanaya F, Hoshino A, Sato K, Yokosuka S, Takigami Y, Hirakuri K, Shiohara A, Tilley RD, Manabe N, Yamamoto K, Manome Y. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Journal of Physics: Conference Series 2011, in press
- 2 Hoshino A, Iimura T, Ueha S, Hanada S, Maruoka Y, Mayahara M, Suzuki K, Imai T, Ito M, Manome Y, Kirino T, Yamaguchi A, Matsushima K, Yamamoto K.

Deficiency of chemokine receptor CCR1 causes osteopenia due to impaired functions of osteoclasts and osteoblasts. J. Biol. Chem. 2010; 285(37): 28826-28837,
3 Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications. Arch. Toxicol. 2011, in press

2. 学会発表

1 Hanada S, Miyaoi K, Hoshino A, Yamamoto K. Size- and structure-dependent toxicity of silica particulates Biomedical Optics meeting, SPIE Photonics West Conference 2011 Jan 22, 2011. San Francisco, CA, USA.

3. その他の業績

書籍等

H:知的所有権の出願・取得状況 (予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）分担研究報告書

中枢神経系の発達に及ぼす化学物質の影響に関する試験法の開発に関する研究
(H22-化学-若手-009)

蛍光ナノ粒子の中枢神経系への取り込みとその影響

分担研究者：星野 昭芳 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・協力研究員
分担研究者：花田三四郎 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・流動研究員
分担研究者：叶谷 文秀 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・協力研究員
協力研究者：山本 健二 （独）国立国際医療研究センター研究所・副所長
協力研究者：伏木 信次 京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学研究分野・教授
協力研究者：伊東 恭子 京都府立医科大学大学院医学研究科分子病態病理学研究分野・准教授

研究要旨

化学物質の暴露に関する健康被害に関しては、わが国では化学物質審査規制法により新規物質の安全規制が 1970 年代より実施されている。一方でナノ材料については、既存物質の粒子径が微細化されたものに対しては、審査対象となる新規物質とはみなされていない。しかし近年飛躍的に進歩したナノ材料の研究により、ナノ材料は微小化に伴い、従来考えられていた物理的・化学的性質のみならず、生物活性に関する性質においても全く新たな特性を示すことが示唆されている。このことから既存物質についても、微小化に伴い毒性や生体内挙動といった生物学的反応性が変化することが懸念されている。とりわけ、従来ならば血液脳関門によって物質の出入りが厳密に制御されていると考えられてきた脳内へと、ナノ粒子が容易に移行してしまう可能性を検討することは喫緊の課題である。そこで本研究では、マウスの暴露部位によるナノ粒子の脳内移行性の差異について検討した。

A:研究目的

21 世紀初頭に入り微細加工技術が急速に進展したことから、ナノテクノロジーという研究分野が登場した。久保亮五先生の量子理論から半世紀の時を経てようやく具現化したナノ材料は、予言されていたとおりその原子の物理的・化学的特長が超微細化により著しく変化することから、多種多様な元素を材料にした多種多様なナノ粒子が生産されてきた。これまで注目されてきたカーボンナノチューブやフラーレンとい

った炭素化合物に加えて、金属原子を材料に微細化されたナノ粒子もまた一部生産物は産業応用されつつある。脱臭作用や光酸化作用などが注目されたナノ銀粒子やナノ酸化チタン粒子などは、化粧品産業や繊維産業界の手によってすでに上市され大量生産され、消費され、廃棄されている。さらに新規ナノ材料を医療生物分野へ応用する動きさえ注目を集めていた。

ナノ粒子は、その物理的・化学的性質がナノ化に拠って顕著に変化することが確認