

201133018A

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

(H22-化学-若手-009)

平成23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成24 (2012) 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23年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成24 (2012) 年 3 月

# 目次

## I. 総括研究報告

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	3
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	

## II. 分担研究報告

1. 神経幹細胞株・脳スライスを用いた、ナノ粒子の神経への影響評価	11
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. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の血管透過性に関する研究	21
花田 三四郎 国立国際医療研究センター研究所・流動研究員	
3. 大脳初代培養細胞を用いたナノ粒子影響評価法の開発	27
井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学講座・助教	
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	33
叶谷 文秀 国立国際医療研究センター病院	
エイズ治療・研究開発センター・研究員	

## III. 研究成果の刊行に関する一覧表

39

# 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・流動研究員  
研究分担者：井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学講座・助教  
研究分担者：叶谷 文秀 国立国際医療研究センター病院・  
エイズ治療・研究開発センター・研究員  
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：佐藤 二美 東邦大学・医学部解剖学講座・教授  
研究協力者：藤井 紀子 京都大学原子炉実験所・放射線生命科学研究所・教授  
研究協力者：稲垣 豊 東海大学・医学部基盤診療学系・教授  
研究協力者：臼井 律子 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・研究補助員  
研究協力者：星野 昭芳 国立国際医療研究センター・研究所・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「細胞を使った評価法」・「脳スライス培養法（ex vivo）を使った評価法」・「動物個体を使った評価法」の3つの評価法を関連付けることで、「個体における中枢神経への影響を、細胞・脳スライス培養の評価から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。

細胞を使った評価法では、①ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価、②ラット中枢細胞を使った血液脳関門（BBB）モデルによる評価を行い、濃度依存性の細胞毒性、及びサイズ 100 nm 未満の粒子の BBB モデル透過性を見出した。

脳スライス培養法では、80 nm の酸化チタンナノ粒子を共培養した際の遺伝子変化を、次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。この結果から、共培養することで発現される遺伝子群（ALS 関連遺伝子、アルツハイマー病関連遺伝子、及び細胞死関連遺伝子など）を明らかにした。

現在、同一ナノ粒子を用いた細胞、脳スライス培養、動物個体での評価を進めており、最終年度にこれらの成果を統合することで、評価法の有用性と限界点を検証する。

## 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材料が、工業的に大量生産できるようになった。しかしながら、ナノ材料の毒性については、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があるために、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、更に細胞・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、細胞・脳スライス・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検討する。

以上のように、本研究は、ナノ材料の中枢神経に与える影響を簡便かつ高精度に予測する方法を開発することで、リスクを事前に予測し、健康被害の防止やリスクの低減に貢献することを目的とするものである。

## B:研究方法

### 1. ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価法の構築

ナノ材料の中枢神経細胞に与える毒性学的な影響を、ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いて検証した。

初代培養細胞では、微小管タンパク質の骨格を染色する MAP2 抗体を用いて、シナプス形成の観点から細胞を観察した。更に、アポトーシス関連タンパク質として、カスパーゼ 3/7 の発現を観察した。

### 2. ラット中枢細胞を使った血液脳関門 (BBB) モデルによる評価法の構築

薬剤透過性試験用の血管内皮細胞とペリサイトによる二層細胞層で構成された BBB 透過モデルを用いて、ナノ粒子透過試験を実施した。ナノ粒子は蛍光ナノ粒子を用いた。各種サイズのシリカナノ粒

子（30nm, 100nm, 400nm, 及び1500nm）、及び表面電荷の異なる（正電荷：アミノ基、負電荷：カルボキシル基、電荷なし：ポリエチレングリコール基（PEG））セレン化カドミウム量子ドットを用い、添加濃度1 mg/mL、15分の培養の後、透過側培養液を回収し、蛍光強度から透過係数を算出し、比較検討した。

### 3. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

マウス新生仔の脳をビブラトームによってスライスを行い、培養によって神経組織スライスを作成した。これらと80 nmの酸化チタンナノ粒子(0.1, 及び0.001 mg/mL)を24時間共培養し、遺伝子発現の変化を次世代シーケンサーにより網羅的に解析した。

### 4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な協力に向けた働きかけ

国内・国際研究機関からの過去の発信情報の調査、比較・分析、国際ナノネットワークへの参加を行った。

#### <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. ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価法の構築

種々のナノ粒子を神経幹細胞と共培養した際の、(1) 細胞内代謝への影響、(2) 細胞の形態観察、及び(3) 細胞の分化への影響を検討した。

無蛍光シリカナノ粒子や、酸化チタンナノ粒子の場合、1 mg/mLの高濃度ナノ粒子共培養下では、細胞内代謝と細胞の形態観察から推察される細胞障害性との関連性が、かい離している結果が得られた。細胞内代謝は対照群からほとんど低下していないのに対して、観察像からは多くの細胞死が推察された。今回、ミトコンドリア活性を基にした細胞内代謝を測定しているため、わずかに残る細胞の代謝が上昇して、全体としての代謝低下を妨げている可能性が示唆された。

一方、蛍光シリカナノ粒子では、細胞内代謝と細胞の形態観察像との関連性は、一致しており、1 mg/mLの高濃度ナノ粒子共培養下では、代謝の大幅な低下と大部分の細胞死が見られた。

以上の事から、ナノ粒子の細胞毒性を評価する場合、指示薬による代謝測定法に加え、細胞状態の観察が必須であると考えられた。

また、マウス大脳皮質初代培養細胞を用いた観察において、シリカナノ粒子を共培養した群は各濃度(1, 10, 及び100 µg/mL)で、細胞の形態に異常がみられた。また、微小管タンパク質骨格 (MAP2)

の染色の結果から、高濃度のシリカ粒子の毒性によってシナプス形成異常を起こすことが示唆された。更に、アポトーシス関連タンパク質である、カスパーゼ 3/7 の染色像が得られ、ナノ粒子共培養時に、神経細胞死が誘導されることが示唆された。

## 2. ラット中枢細胞を使った血液脳関門 (BBB) モデルによる評価法の構築

粒子サイズの異なるシリカナノ粒子の BBB 透過係数を計測した。粒径 30 nm では、BBB 透過が確認された (透過係数  $4.17 \times 10^{-6}$  cm/sec)。一方、100 nm では、透過係数はわずかだった ( $0.157 \times 10^{-6}$  cm/sec)。蛍光顕微鏡により確認したところ、粒径 30 nm では細胞層に粒子の蓄積が確認された。一方、100 nm, 400 nm では、粒子の蓄積はわずかであり、1500 nm では粒子が沈降し、細胞上面に蓄積したのみであった。

また、表面電荷の異なる粒子径約 30nm の量子ドットを用いた BBB 透過性試験では、アミン表面ナノ粒子において粒子透過係数が  $7.82 \times 10^{-6}$  cm/sec とカルボキシル基表面、及び PEG 表面に比べて高い傾向を示した。

## 3. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

約 396,000 個の mRNA の解析を行った結果、低濃度 (1  $\mu$ g/mL) 共培養組織からは 6588 個、高濃度 (100  $\mu$ g/mL) 共培養組織からは 4760 個、また、対照群であるナノ粒子非共培養組織からは、1236 個の発現遺伝子候補が得られた。

対照群と酸化チタンナノ粒子共培養群で差が見られるようになる遺伝子候補は 686 種類あり、ALS 関連遺伝子、細胞死関連遺伝子、及び酸化抵抗関連抵抗遺伝子などが含まれていた。

また、高濃度共培養時に初めて発現される遺伝子候補は 1702 種類あり、その中にはアルツハイマー病関連酵素遺伝子の発現が見られた。

## 4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な協力に向けた働きかけ

研究分担者の叶谷は、米国で開催された International Symposium on Nanotechnology Occupational and Environmental Health に参加、更に Education Course Toxicology and Health を講習し、ナノ粒子毒性試験構築に向けた注意点について習得した。習得した内容を基に、本研究班で構築を行っている評価法の問題点について抽出・検討し、今後の評価法開発のための提案を行った。

### D:考察

#### 1. ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価法の構築

ヒト神経幹細胞株を用いた検討から、低濃度では影響が少ないものの、高濃度のナノ粒子が脳内に侵入したときに、神経幹細胞の活性・分化へ影響を与える可能性が示唆された。また、細胞毒性を評価する際には、細胞内代謝活性に加え、細胞の共培養像を観察することが必須であることが示唆された。



マウス大脳皮質初代培養細胞を用いた検討から、高濃度のシリカナノ粒子ではシナプス形成に影響を与える可能性が示唆された。また、カスパーゼ 3/7 タンパク質の発現が観察されており、高濃度シリカ粒子存在下では、神経細胞のアポトーシスが起ることが示唆される。

## 2. ラット中枢細胞を使った血液脳関門 (BBB) モデルによる評価法の構築

ナノ粒子の BBB 透過性について、粒子サイズとしては、30 nm と 100 nm の間に透過性のしきい値があることが有意に確認された。これは、30-100 nm の細胞間のギャップが存在する、もしくはナノ粒子により細胞が炎症を受けることで細胞間ギャップが緩み透過性が増す可能性が考えられる。また、蛍光観察から 30 nm 粒子が特異的に細胞内に蓄積している可能性があることが考えられ、細胞内を介してナノ粒子が移行する可能性も考えられる。

細胞表面の違いによる透過性については、有意ではないが正電荷のナノ粒子に関して透過性が高い可能性が示唆された。これは、細胞表面が相対的に負電荷であり、粒子の接着性が高いためと考えられる。

本研究で用いたナノ粒子の添加濃度は、外界から生体に取り込まれる濃度と比べて高いと考えられるが、ナノ粒子が蓄積することで細胞透過を引き起こすことが示唆された。

以上のことからナノ粒子の血液脳関門透過性について、薬剤透過性試験を応用することで検討し、その粒子サイズ依存

性、及び表面電荷依存性を確認した。実際に生体に取り込むナノ粒子濃度とは、かい離があるが、長期的なナノ粒子の暴露が最終的に脳内への通過を促す可能性を考慮すべきである。

## 3. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

今回の研究で見つかった遺伝子群には、疾病関連遺伝子、細胞死遺伝子、及び酸化への抵抗遺伝子などが含まれている。RT-PCR での遺伝子発現の確認を進めると共に、動物実験での結果と比較することで、神経への影響を鋭敏に検出するためのバイオマーカー候補を探索していく。

## 4. 新規試験法の有用性の検証、国際的な協力に向けた働きかけ

毒性評価の基準には、多種類の指標が必要となる。これまでの知見は、マウスへの (Hazard Target)、静注による (Exposure Pathway)、in vivo (Study Design) データから、産業従事者 (Risk Group) への Medical Surveillance (Policy) を結論づける等、比較困難な一方向発信が多く、メソッドもよく共有されていないことがわかった。今年度以降、本研究班ではこうした教訓を生かした評価法の開発を進めている。

## E: 結論

本年度は、細胞、及び脳スライス培養での評価法の構築を進めた。

細胞を使った評価法では、1. ヒト神経幹細胞株、及びマウス大脳皮質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価、2. ラ

ット中枢細胞を使った血液脳関門 (BBB) モデルによる評価を行い、濃度依存性の細胞毒性、及びサイズ 100 nm 未満の粒子の BBB モデル透過性を見出した。

脳スライス培養法では、80 nm の酸化チタンナノ粒子を共培養した際の遺伝子変化を、次世代シーケンサーにより網羅的に解析、共培養することで発現される遺伝子群 (ALS 関連遺伝子、アルツハイマー病関連遺伝子、及び細胞死関連遺伝子など) を明らかにした。

次年度は、これらの成果を統合し、動物実験での結果と比較することで、各評価法の有用性について検討を行っていく。

#### 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. Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications *Arch. Toxicol.* 85(7):707-20, 2011.
2. K Fujioka, S Hanada, F Kanaya, A Hoshino, K Sato, S Yokosuka, Y Takigami, K Hirakuri, A Shiohara, R D Tilley, N Manabe, K Yamamoto and Y Manome, Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles, *Journal of Physics: Conference Series*, 304, 012042, 2011.

##### 2. 学会発表

藤岡宏樹, 花田三四郎, 叶谷文秀, 井上由理子, Seung KIM, 馬目佳信, ナノ粒子共培養時における、中枢神経幹細胞株への影響.日本薬学会第 132 年会 (札幌), 2012 年 3 月(予定)

##### 3. その他の業績

Fujioka, K, Fujii, N., Sato, K., Hirakuri, K., Kim, S.U., Manome, Y., Effect of Co-cultured Silicon Particles on Neural Stem Cell, *KURRI Prog. Rep.* 2010. 262, 2011.

#### 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)

神経幹細胞株・脳スライスを用いた、ナノ粒子の神経への影響評価

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・流動研究員  
研究分担者：井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学生体構造学分野・助教  
研究分担者：叶谷 文秀 国立国際医療研究センター病院・  
エイズ治療・研究開発センター・研究員  
研究協力者：藤井 紀子 京都大学原子炉実験所・放射線生命科学研究所科学部門・教授  
研究協力者：臼井 律子 東京慈恵会医科大学・分子細胞生物学研究部・研究補助員

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、1. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築、及び2. ヒト神経幹細胞株を用いた細胞毒性評価法の構築を行った。脳スライス培養法を使った評価法では、中枢神経系疾病関連の遺伝子発現が観察されており、動物個体での評価と比較することで、バイオマーカーの探索等、実践的な活用が期待される。一方、神経幹細胞株を使った毒性評価法では、細胞内代謝だけでなく、細胞状態の観察が必須であることがわかった。今後は、分化していく細胞種や細胞毒性の機構を明らかにすることで、1次スクリーニングでの活用を目指したい。

**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行う。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、脳スライスとナノ粒子との共培養時の網羅的遺伝子解析、及び細胞での影響評価法の構築について検討を行った。

## B:研究方法

### 1. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

#### (1)脳スライスの作製

C57/BL6 マウスの新生仔(生後4日目)を犠牲死させた後、脳を採取した。MicroSlicer DTK-1000(堂阪イーエム)の試料台に脳を固定後、150 $\mu$ mの厚さでスライスを行った。

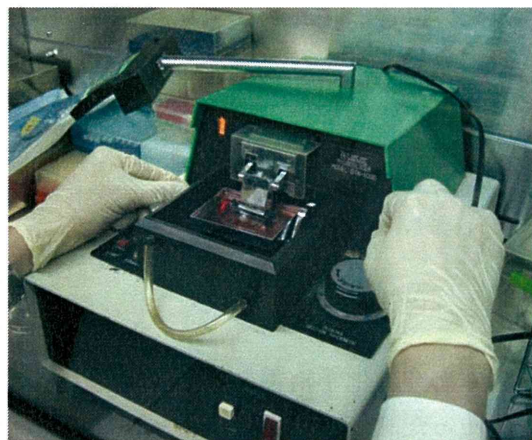


図1. 脳スライス作製時の様子。採取した脳を、中央の試料台に接着剤で固定後、スライス培養液に浸した状態で薄切する。試料台の周りには冷水を入れている。

#### (2)スライス培養液

650 mgのD-(+) Glucose, Anhydrous (168-06, ナカライテスク)と、200 mgのSodium hydrogen carbonate (28-1850-5, Sigma Aldrich)を25 mLのMEM (12360-038, Invitrogen)に溶解させる。この溶液を0.45 $\mu$ mフィルターで濾過後、25 mLのMEM、25 mLのHBSS (24020-117, Invitrogen), 及び25 mLのheat-inactivated horse serum (26050-088, Invitrogen)を加える。更に

100 units/mL の Penicillin Streptomycin (15140-122, Invitrogen) を添加して、スライス培養液を作製した。

### (3) スライス培養とナノ粒子の共培養

スライス作製後、直ちに Millicell CM (PICM03050, Millipore) に載せ 6 穴シャーレ内で培養を開始した。スライス上面が培養液に浸らないよう培養液の量を調節し、2~3 日ごとに培養液を交換した。47 日後、チタンナノ粒子 (Titanium(IV) Oxide, 80 nm, 和光純薬) を 0, 1, 及び 100 µg/mL の濃度で共培養を開始した。共培養から 24 時間後、mRNA を FAST PURE RNA Kit (タカラバイオ) で回収した。cDNA は、Ovation RNA Amplification System V2 (NuGen) で作製された。

### (4) 次世代シーケンサーによる RNA 配列解析

GS junior (Roche) により、cDNA 配列の解析を行った。スライス組織から得られた cDNA ライブラリは、GS Titanium Rapid Library Preparation Kit (Roche) を使って調整された。また、GS Titanium Rapid Library MID Adaptors Kit (Roche) で、それぞれのサンプルにアダプタを結合した。更に、GS Junior Titanium emPCR Kit (Lib-L, Roche) でエマルジョン PCR 後、配列を解析した。得られた配列は、米国国立生物工学情報センター (NCBI) に登録されたマウス遺伝子配列と照合し、それぞれのサンプルにおける発現遺伝子候補を決定した。

## 2. ヒト神経幹細胞株を用いた細胞毒性評価法の構築

### (1) 神経幹細胞株

ブリティッシュコロンビア大学の 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))。培養には、DMEM (11995-065, Invitrogen) に 10% FCS、100 units/mL の Penicillin Streptomycin (15140-122, Invitrogen) を含む培地を用いた。

### (2) 粒子

シリカ粒子には、無蛍光粒子の Silicon Dioxide, 70 nm (321-38372, 和光純薬)、赤色蛍光粒子の sicastar-redF, 30 nm (40-00-301, Micromod) を用いた。チタンナノ粒子には、Titanium(IV) Oxide, 80 nm (325-38392, 和光純薬) を用いた。

### (3) ミトコンドリア活性の測定

神経幹細胞株を、96 穴プレートに 100 µL ずつ、 $1 \times 10^4$  個/mL の濃度でまいた。2 日後、ナノ粒子の共培養を開始し、2, 5, 及び 7 日間の共培養を行った。ミトコンドリア活性の測定には、ナノ粒子共存下で指示薬に Cell Counting kit-8 (同仁化学) を用いて測定を行った。

### (4) 抗体染色した細胞の観察、及びフローサイトメーター測定

神経幹細胞株を 6 穴プレートに 2 mL ずつ、 $1 \times 10^5$  個/mL の濃度でまいた。2 日後、ナノ粒子の共培養を開始し、2, 5, 及び 7 日間の共培養を行った。

培養終了後、DPBS で細胞表面を洗浄、

4% パラホルムアルデヒド・りん酸緩衝液(163-20145, 和光純薬)で 15 分間固定した後、0.2% Triton X-100 (Eastman) を含む DPBS 溶液で細胞膜を透過した。

その後、神経幹細胞のマーカーである Nestin、及びアストログリア細胞マーカー GFAP の染色には、Anti-human Nestin Alexa Fluor 488 (Clone: 10C2, 53-9843-82, eBioscience)、及び Anti-Glial Fibrillary Acid Protein (GFAP) Alexa Fluor 488 (Clone: GA5 (53-9892-82, eBioscience) を 10 µg/mL の濃度でそれぞれ用いた。抗体の反応は、4°C で 16 時間行った。対照抗体として、Mouse IgG1 K Isotype Control Alexa Fluor 488 (clone: P3.6.2.8.1, 53-4714-42, eBioscience) を用いた。細胞の観察には、BZ-9000 顕微鏡(キーエンス) を用いた。

上記染色細胞を用いて、フローサイトメーターでの解析を行った。解析は BD FACSCalibur (ベクトン・ディッキンソン) を用いて行った。

#### <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、研究を行っている。

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. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

80 nm の酸化チタンナノ粒子を、脳スライス培養組織と 24 時間共培養し、発現した mRNA を次世代シーケンサーにより解析した。

約 396,000 個の mRNA の解析を行った結果、低濃度(1 µg/mL)共培養組織からは 6588 個、高濃度(100 µg/mL)共培養組織からは 4760 個、また、対照群であるナノ粒子非共培養組織からは、1236 個の発現遺伝子候補が得られた。

対照群と酸化チタンナノ粒子共培養群で差が見られるようになる遺伝子候補は 686 種類あり、ALS 関連遺伝子、細胞死関連遺伝子、及び酸化抵抗関連抵抗遺伝子などが含まれていた。

また、高濃度共培養時に初めて発現される遺伝子候補は 1702 種類あり、その中にはアルツハイマー病関連酵素遺伝子の発現が見られた。

### 2. ヒト神経幹細胞株を用いた細胞毒性評価法の構築

#### (1)粒子の分散性

細胞毒性の評価にあたり、本研究で用いているナノ粒子の水溶液中の分散性について検討を行った。DPBS に分散させた結果、酸化チタン粒子(80 nm)や対照のマイクロ粒子に比べてシリカナノ粒子(70 nm)は分散性が悪くすぐに沈降した。

一方、蛍光シリカナノ粒子 30 nm の分散



性は高く、同濃度での沈殿は観察できなかった。

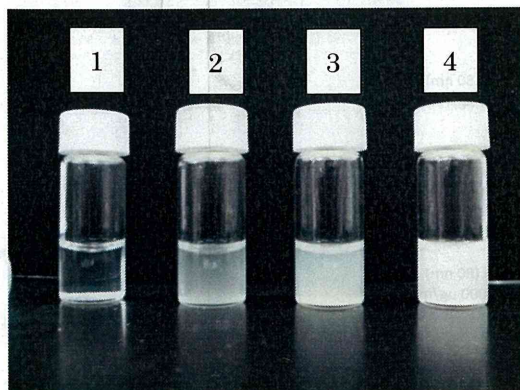


図 2. 本研究で用いた無蛍光シリカナノ粒子 70 nm 【1】、酸化チタンナノ粒子 80 nm 【3】、及び同種素材のマイクロ粒子の分散像（シリカ 325 mesh 【2】、酸化チタン 325 mesh 【4】。）

## (2) ナノ粒子共培養時におけるミトコンドリア活性の変化

次に、ナノ粒子が与える細胞内代謝への影響を検討するため、共培養時のミトコンドリア活性の経時変化を検討した（図 3）。

無蛍光シリカナノ粒子では、濃度 100  $\mu\text{g/mL}$ 、及び 1000  $\mu\text{g/mL}$  の共培養 5 日目において活性が上昇する傾向を示した。7 日目においては、有意差は見られないものの、ミトコンドリア活性は低下する傾向を示した。

酸化チタンナノ粒子では、有意差は見られないが、2、5 日目において 1000  $\mu\text{g/mL}$  で活性が低下する傾向を示した。しかし、7 日目のチタン共培養群の活性は対照群以上に上昇した。

一方、蛍光シリカナノ粒子では、1000  $\mu\text{g/mL}$  の濃度の全ての測定日で、有意に

ミトコンドリア活性の低下が見られた。また、100  $\mu\text{g/mL}$  の濃度では、有意差は見られなかったが 7 日間共培養した際に活性が低下する傾向が見られた。

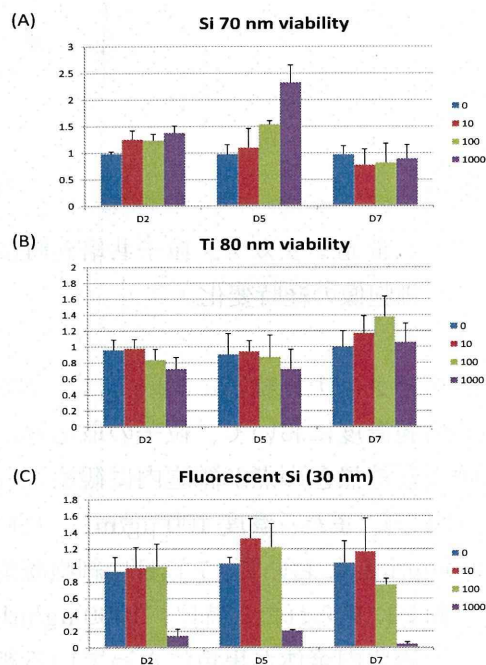


図 3. ナノ粒子共培養時におけるミトコンドリア活性の経時変化。無蛍光シリカナノ粒子 70 nm (A)、酸化チタンナノ粒子 80 nm (B)、及び蛍光シリカナノ粒子 (C) を 10, 100, 及び 1000  $\mu\text{g/mL}$  で 2, 5, 及び 7 日間共培養した。

## (3) ナノ粒子共培養時における神経幹細胞株の経時的観察像

ナノ粒子を共培養した際の神経幹細胞像を経時的に観察した。無蛍光シリカナノ粒子において、濃度 1000  $\mu\text{g/mL}$  で共培養 5, 7 日目に細胞障害が疑われる凝集塊が顕著に観察され、濃度 100  $\mu\text{g/mL}$  では 7 日目に凝集塊が観察された（図 4）。



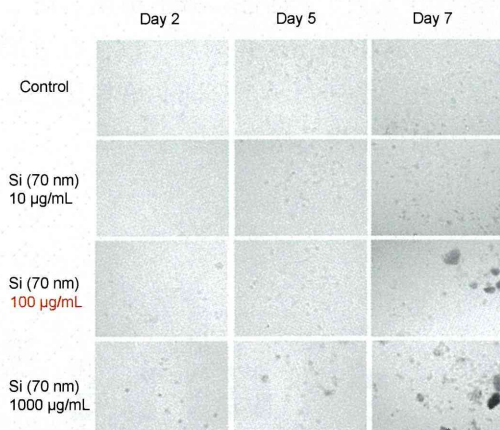


図4. 無蛍光シリカナノ粒子共培養時における細胞像の経時変化。

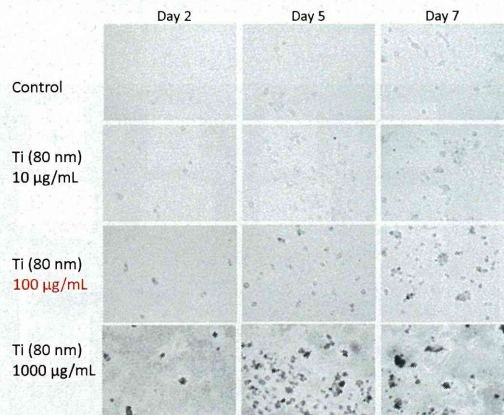


図5. 酸化チタンナノ粒子共培養時における細胞像の経時変化。

酸化チタンナノ粒子においては、全ての共培養濃度において、粒子の取込みが示唆される黒色の点が細胞内に観察された(図5)。また、濃度 100 µg/mL、及び 1000 µg/mL において、7 日目に細胞凝集塊が顕著に見られた。特に、1000 µg/mL では、細胞内全体が黒色になっている細胞像が多数観察された(図5)。

蛍光シリカナノ粒子においては、濃度 1000 µg/mL で 2 日間共培養した際に、大部分が死細胞であった(図6)。このため、共培養濃度 0、10、及び 100 µg/mL で観察を行った。共培養 2 日目から、100 µg/mL の濃度で蛍光粒子の取込みが顕著に見られ(図7)、5、7 日目には細胞凝集塊が観察された(図8、9)。



図6. 1000 µg/mL の蛍光シリカナノ粒子を 2 日間共培養した細胞像。

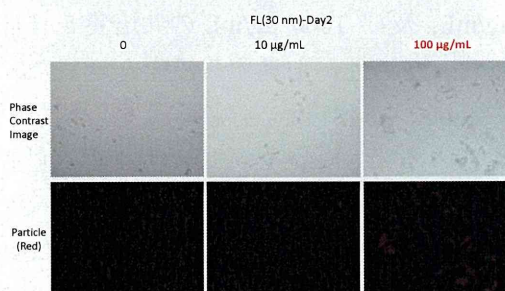


図7. 各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 2 日間共培養した細胞像。



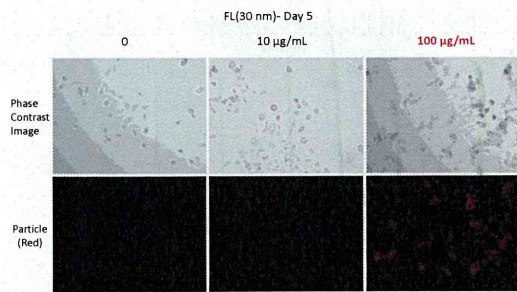


図 8.各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 5 日間共培養した細胞像。

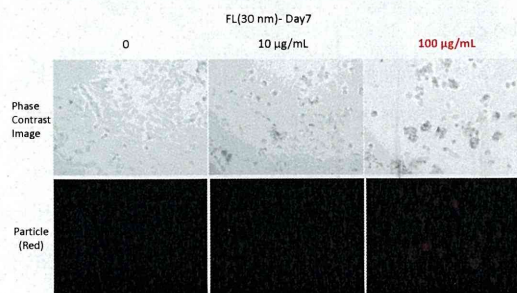


図 9.各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 7 日間共培養した細胞像。

#### (4) ナノ粒子共培養時における神経幹細胞株の分化についての検討

ナノ粒子が与える幹細胞分化への影響を調べるため、神経幹細胞のマーカーである Nestin、及び分化が進んだグリア細胞のマーカーである GFAP の発現を検討した。

共培養 2 日目の細胞を染色した結果、蛍光シリカナノ粒子、及び酸化チタンナノ粒子で Nestin の発現が低下した (図 10)。一方、GFAP の発現は、神経幹細胞にほとんど検出されなかったが、蛍光シリカナノ粒子、及び酸化チタンナノ粒子でわずかに上昇していた (図 11)。

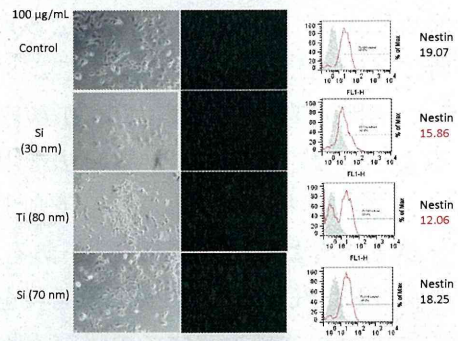


図 10. 各ナノ粒子 100 µg/mL 共培養 2 日目における神経幹細胞の Nestin 染色。

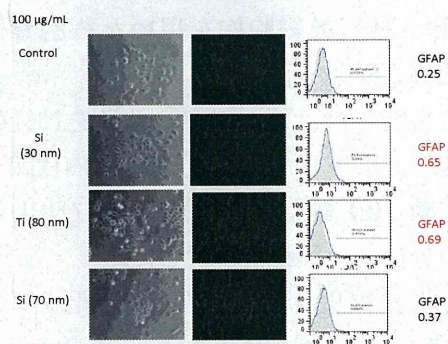


図 11. 各ナノ粒子 100 µg/mL 共培養 2 日目における神経幹細胞の GFAP 染色。

### D:考察

#### 1. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

脳スライスとナノ粒子との共培養実験から、多くの発現遺伝子プロファイルを得ることができた。

大阪大学・堤らの研究において、妊娠マウスの高濃度ナノ粒子曝露実験では、胎児の脳へナノ粒子が到達し、脳の発育や中枢神経系疾患への影響が示唆されている。

今回の研究で明らかにした遺伝子プロファイルは、主に神経細胞からの遺伝子

の発現によるものである。ナノ粒子共培養時に ALS 関連遺伝子の発現、アルツハイマー病関連遺伝子の発現などが観察されるようになることから、本手法を用いることで、動物個体での影響を予測することができるようになる可能性がある。

今後、RT-PCR など遺伝子発現を定量的に検討し、動物個体での曝露実験の結果と比較することで、バイオマーカーとしての活用が期待される。

## 2. ヒト神経幹細胞株を用いた細胞毒性評価法の構築

本研究では、種々のナノ粒子を神経幹細胞と共培養した際の、(1) 細胞内代謝への影響、(2) 細胞の形態観察、及び(3) 細胞の分化への影響を検討した。

無蛍光シリカナノ粒子や、酸化チタンナノ粒子の場合、1 mg/mL の高濃度ナノ粒子共培養下では、細胞内代謝と細胞の形態観察から推察される細胞障害性との関連性が、かい離している結果が得られた。細胞内代謝は対照群からほとんど低下していないのに対して、観察像からは多くの細胞死が推察される。今回、ミトコンドリア活性を基にした細胞内代謝を測定しているため、わずかに残る細胞の代謝が上昇して、全体としての低下を妨げている可能性が示唆される。

一方、蛍光シリカナノ粒子では、細胞内代謝と細胞の形態観察像との関連性は、一致しており、1 mg/mL の高濃度ナノ粒子共培養下では、代謝の大幅な低下と大部分の細胞死が見られた。

以上の事から、ナノ粒子の細胞毒性を評価する場合、指示薬による代謝測定法

に加え、細胞状態の観察が必須となるであろう。

また、これらのナノ粒子で差が見られる原因として、粒子の分散性や大きさの影響が考えられる。今後、細胞内への取り込みと分散性との関連性を検討していくことで、ナノ粒子毒性の低減につながる可能性がある。

更に、今回の研究から、共培養時における幹細胞の分化への影響が示唆されている。

神経幹細胞を使った評価法としては、国立環境研究所・鈴木らの研究によって、トリブチルスズが幹細胞のアポトーシスを起こすこと、また、金沢大学・米田らの研究によって、ニコチンによる神経幹細胞の神経への分化が示されている。

本研究では、ナノ粒子曝露時における Nestin 発現の減少と GFAP 発現のわずかな上昇までを示しており、今後、長期培養ではどのような細胞に分化するのか、または、アポトーシスなどの影響があるのかを検討していく必要があるだろう。これらを明らかにする手法を確立することによって、神経幹細胞株を使った簡便な評価法が、より動物個体での神経状態を反映するものに近づくと考えられる。

## E:結論

本研究では、脳スライス培養法を使った評価法、及び神経幹細胞株を使った評価法を検討した。脳スライス培養法を使った評価法では、疾病関連遺伝子の発現が観察されており、動物個体での評価と比較することで、バイオマーカーの探索等、実践的な活用が期待される。一方、

神経幹細胞株を使った毒性評価法では、細胞内代謝だけでなく、細胞状態の観察が必須であることがわかった。今後は、分化していく細胞種や、細胞毒性の機構を明らかにすることで、1次スクリーニングでの活用を目指したい。

#### 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

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, 304 012042

##### 2. 学会発表

藤岡宏樹, 花田三四郎, 叶谷文秀, 井上由理子, Seung KIM, 馬目佳信, ナノ粒子共培養時における、中枢神経幹細胞株への影響. 日本薬学会第132年会(札幌), 2012年3月(予定).

##### 3. その他の業績

Fujioka, K., Fujii, N., Sato, K., Hirakuri, K., Kim, S.U., Manome, Y., Effect of Co-cultured Silicon Particles on Neural Stem Cell, *KURRI Prog. Rep.* 2010. 262

#### 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