

201236008A

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24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成25 (2013) 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

(H22-化学-若手-009)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

藤 岡 宏 樹

平成25 (2013) 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・・・7
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. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の脳内移行性に関する研究・・・17
花田 三四郎 国立国際医療研究センター・研究所・研究員
2. 神経幹細胞株を用いた、ナノ粒子の神経への影響評価・・・・・・・・・・26
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
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・・・・・・・・・・33
井上 由理子 東邦大学・医学部解剖学講座・助教
4. 脳移行性解析のためのシリカ・磁性ナノ粒子作製と評価・・・・・・・・・・39
白石 貢一
東京慈恵会医科大学・医用エンジニアリング研究室・講師
5. 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・・・・・・・・44
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・・・・・・・・・・・・・・・・・・51

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
(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・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
研究分担者：白石 貢一 東京慈恵会医科大学・医用エンジニアリング研究室・講師
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：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：宮村 聡枝 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。本研究の遂行によって、より簡便かつ定量的な試験法を開発すると共に、動物実験の削減を目指してきた。

本年度は、ラット血液脳関門モデルを用いたナノ粒子透過性の検証と透過機構の予測、神経幹細胞株や、ラット胎児初代培養神経細胞を使った毒性影響の検討、及び脳組織内へのナノ粒子の移行性を評価し、脳組織内の変化を知ることのできるシリカコーティングMRI造影剤の作製を行なった。更に、Nanosafe 2012 会議など国内外の学会や会議で発表を行い、これらの細胞・組織を組み合わせたボトムアップモデルによって、毒性影響を予測する試験法として活用できることを講演し、試験法のバリデーションに向けた研究協力を呼びかけた。

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、アスベストの長期曝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、ナノマテリアル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. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の脳内移行性に関する研究

本研究では、薬剤の脳内移行性を評価するモデルとして動物試験と有効な相関性を有しているラット細胞培養ベースの血液脳関門(以下、BBB)モデルを用い、ナノ粒子の脳内移行性試験の評価を行い、動物試験との一致性、定量性、簡便性を有する評価指標としての利用可能性を検討した。本年度は、透過性を検討するサンプルとして蛍光シリカナノ粒子(直径30, 100, 400, 1500 nmの計4種類)を用いて検討を行った。

2. ヒト神経幹細胞株、及びラット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

ナノマテリアルが中枢細胞に与える毒性的な影響を、ヒト神経幹細胞株、及びラット胎児の初代培養大脳皮質細胞を用

いて検証した。

3. 脳移行性解析のためのシリカ-磁性ナノ粒子作製と評価

脳組織への移行や蓄積について、リアルタイムに評価する方法を開発するため、MRIにより可視化可能な、「シリカで表面コーティングされた酸化鉄ナノ粒子」を作製しその評価を行った。

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

本年度は、Nanosafe 2012 や、日本動物実験代替法学会など国内外の学会や会議において研究成果を発表し、研究協力の呼びかけを行なった。

<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. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の脳内移行性に関する研究

30 nm のシリカナノ粒子においては BBB の透過性が確認された。一方 100 nm 以上の粒子に関しては、わずか、もしくは

は検出限界以下であった。蛍光顕微鏡による観察では、30 nm シリカナノ粒子において、粒子添加側の血管内皮細胞層とともに、細胞層下層の脳ペリサイト細胞層にもシリカナノ粒子が蓄積していることが確認された。以上の結果は、30 nm のシリカナノ粒子が明らかに細胞層に取り込まれ、一部が BBB を通過していることを示唆している。

30 nm 粒子の透過性について、濃度の影響を検討した。0.1 から 0.5 mg/mL では、透過係数に有意な差がないのに対して、1.0 mg/mL の高濃度では透過係数が亢進していることが確認された。このことは、高濃度負荷が、局所的な細胞障害による細胞間透過性の亢進や細胞内取込みに影響を与え、ナノ粒子の BBB の通過に寄与していることを示唆している。

また、BBB 通過試験の時間的解析を行ったところ、30分から120分において顕著な差は見られなかった。従って、BBB の透過性に受動的な輸送であると考えられる。また、長期の培養試験が可能なことから、本モデルを長期毒性評価モデルへと適用できる可能性も示唆される。

表面修飾の異なる量子ドットに関して同様に BBB 通過試験を実施した。カチオン性ナノ粒子であるアミン修飾量子ドットにおいて中性 PEG 修飾量子ドットに比べてより透過性が高いことが示された。これは、粒子の正電荷と細胞表面の負電荷の相互作用によるものと理解される。しかしながら、マウス動物試験における量子ドットの脳内移行性については、負電荷のカルボキシル基修飾量子ドットが最も臓器蓄積性が高いことが示されている。

る。このことは、生体の環境がナノ粒子の取り込みに影響していることを示しており、今後本モデルを適用するにあたって血中環境を模倣した評価系の確立などが必要である。

2. ヒト神経幹細胞株、及びラット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

本年度は、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。神経幹細胞株を使った毒性評価法では、細胞膜透過性による毒性指標の方が、ミトコンドリア活性よりも高感度で毒性を評価できることがわかった。また、神経幹細胞株に対して、急性毒性を与える濃度が 31.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上であることが示唆された。

100 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で細胞への影響を検討した結果、サイトカインの上昇や分化への影響などが見られることがわかった。

また、胎児神経への影響について調査するため、ラット胎児 21DIV (days in vitro) の大脳皮質の神経細胞に 1 時間、30 nm シリカ粒子の添加培養を行った。シリカ粒子の濃度が 0.01 mg/ml より大きくなると、すぐに細胞死を引き起こした。細胞傷害性については、lactate dehydrogenase assay、reactive oxygen species (ROS) assay、及び caspase 3/7 活性を用いて調査を行った。高濃度のシリカナノ粒子が与える神経毒性について、(1)神経細胞・神経突起・シナプスへの傷害が起きること (2)神経細胞のアポトーシスが引き起こされること、及び(3)細胞表面における活性酸素種が関与している可

能性について明らかにした。

3. 脳移行性解析のためのシリカ-磁性ナノ粒子作製と評価

脳組織内へのナノ粒子の移行性を評価し、脳組織内の変化を知ることのできる MRI 造影剤の作製を目指し、シリカで表面コーティングされた酸化鉄ナノ粒子を作製した。

作製したシリカ-酸化鉄ナノ粒子は粒子径 19-21 nm であり、高い MRI 造影効果を示した。一方で、各粒子は溶液中において 5-60 nm 程度の凝集構造を示し容易に凝集する様子が伺えた。このことからシリカ表面ナノ粒子は凝集形態を形成して生体に曝露される可能性が示唆された。

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

本研究では、1. 血液脳関門 (以下、BBB) モデル、2. 神経細胞培養系、3. 脳スライス組織、による 3 種類のボトムアップモデルを検証してきた。

本研究初年度に参加したナノ素材の安全な製造・利用の国際会議 Nanosafe で構築したネットワークを活かし、本年度フランス MINATEC で開催された Nanosafe 2012 で、上記 3 種類の当研究班発エビデンスを発表し、多施設間比較可能な国際基準の働きかけを行った。

その結果、今後継続的に国際動物試験と我々の新規モデルとのバリデーションを行う必要があるが、EU 内のネットワークである NanoImpactNet (Michael Riediker 代表)、および The International Team in Nanosafety

(TITNT, Claude Emond 代表)の評価や基準策定に役立てられる可能性が得られた。

D:考察

1. 血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の脳内移行性に関する研究

ナノ粒子の脳内移行性を、薬剤透過性試験で使用されている BBB モデルにより評価した。30 nm シリカナノ粒子による BBB 通過性を確認し、暴露濃度依存的なしきい値を持つ通過性を確認した。

また、評価時間を検討したところ、30分から120分まで実施可能であることが分かった。表面電荷特性の異なる量子ドットを用いた評価を行ったところ、正電荷量子ドットにおいて BBB 通過性が有意に高い傾向を示した。

暴露されるナノ粒子の生体内での挙動は、本モデルとは異なる可能性があり、今後検討が必要である。具体的には、適用濃度、生体内環境の模倣（血清、血流など）、低濃度実物質検出系の確立などである。

本試験の結果は、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ことを示唆しており、今後も継続的な検討が必要であろう。例えば、酸化チタンナノ粒子などを含めたその他のナノ粒子についても同様の検討を行い、材料依存的な毒性などを評価することで統一的なナノ粒子の脳内透過性に関するメカニズム（特異性、サイズ性など）を調べることは大変意義深いものと考えられる。

2. ヒト神経幹細胞株、及びラット大脳皮

質初代培養細胞を用いた細胞毒性の評価法の構築

今年度の研究結果からは、脳への透過が予想される 30 nm の粒子が高濃度で暴露された場合に、神経幹細胞や胎児神経細胞に影響を与える可能性が示唆された。

神経幹細胞株では、31.3 $\mu\text{g/mL}$ 以上での細胞膜への影響、胎児神経細胞では 10 $\mu\text{g/mL}$ 以上での細胞への影響を観察した。これらの濃度は、動物試験などから得られた単回投与による透過量を考えると高い値であるが、慢性暴露における脳内への蓄積の可能性や血液脳関門が脆弱な胎児・乳幼児、及び高齢者への影響を考慮した場合には、注意すべき濃度であると考えられる。今後、胎仔や高齢の動物などを用いて、血液脳関門が脆弱な場合の影響を調査する必要があると考えられる。

3. 脳移行性解析のためのシリカ-磁性ナノ粒子作製と評価

今回の脳組織内移行性を評価するために MRI により追跡可能なナノ粒子の作製において、5-8nm 酸化鉄コアを有する 19-21nm のシリカ-酸化鉄ナノ粒子を作製した。作製したナノ粒子は表面にシリカの性質を有しており、血液中から脳組織内への移行性は、その大きさとシリカ表面の性質により影響されると考えられる。一方、作製したシリカ-酸化鉄ナノ粒子は溶液に溶解し、均一であるようにみえるが、透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察によると複数のシリカ-酸化鉄ナノ粒子が集まった 5-60nm 程度の凝集形態をとっていることが分かった。これはシリカナ

ノ粒子のようなナノサイズの粒子において静電反発作用による粒子の分散がマイクロサイズの粒子と比べて極めて困難になり、安定な分散を得るためには非常に高い表面電位が必要となるためである。またナノサイズの粒子は粒子間の距離が短く静電反発効果を得ることが難しいことも原因と考えられる。これらの点はナノ粒子の毒性という観点から非常に重要な情報である。

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

本研究班では新規試験法を検証する上で、情報発信の早い段階で海外のナノ毒性評価ネットワークと持続的な連携作りをしたことが評価された。長期的な粒子暴露の影響や、より現実的な暴露濃度・経路等、共通の関心事項を検討する上で、継続してエンドポイント評価上の教訓を共有した上で、お互いの実験デザインにフィードバックすることが戦略的に有利であることを示すことができた。今後ナノ粒子の脳内透過性の機序を統一的に検討していく上で有意義と考えられる。

E:結論

本年度は、ラット血液脳関門モデルによる評価、及びヒト神経細胞株・ラット初代培養細胞を使った評価を進め、脳に影響を与える可能性がある濃度について、定量的な値を求めることができた。また、これらの研究成果について、Nanosafe 2012 など国内外の学会・会議で発表し、研究の協力を呼びかけた。

更に、MRI 造影可能なシリカコーティ

ング粒子の作製に成功し、今後、動物評価を行う際に必要な生体内における粒子の状態について情報を得ることができた。

今後は、これらの研究成果と動物試験との結果を比較することで、より有用な評価法の構築に結びつけたい。

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) S. Hanada, K. Fujioka, Y. Futamura, N. Manabe, A. Hoshino, K. Yamamoto Evaluation of Anti-Inflammatory Drug-Conjugated Silicon Quantum Dots: Their Cytotoxicity and Biological Effect, International Journal of Molecular Science, 14: 1323-1334, 2013.
- (2) M. Hamon, S. Hanada, T. Fujii, Y. Sakai. Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells, Cell Transplantation, 21(2-3): 401-410, 2012.
- (3) A. Hoshino, S. Ueha, S. Hanada, T. Imai, M. Ito, K. Yamamoto, K. Matsushima, A. Yamaguchi, T. Iimura. Roles of chemokine receptor CX3CR1 in maintaining murine bone homeostasis through the regulation of both osteoblasts

- and osteoclasts, *Journal of Cell Science*, 125(22): 2012 [Epub ahead of print]
- (4) N. Manabe, S. Hanada, N. Aoki, Y. Futamura, K. Yamamoto, Y. Adschiri. Flocculation and re-dispersion of colloidal quantum dots, *Journal of Chemical Engineering Japan*, 45(11): 917-923, 2012.
- (5) K. Fujioka, S. Hanada, Y. Inoue, K. Shiraishi, F. Kanaya, Y. Manome, Evaluation of nanotoxic effects on brain using in vitro models, *Proceedings of the 25th Annual Meeting of Japanese Society for Alternative to Animal Experiments, Alternative Animal Test Experiment*, 17(Suppl.): 156, 201,2012
- (6) Yuriko Inoue, Masaaki Takayanagi, and Hiroyuki Sugiyama. Presynaptic protein Synaptotagmin1 regulates the activity-induced remodeling of synaptic structures in cultured hippocampal neurons, *Journal of Neuroscience Reserch*, in press
- (7) S. Hanada, K. Fujioka, Y. Inoue, F. Kanaya, Y. Manome, K. Yamamoto. Cell-based in vitro blood-brain-barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification, *Toxicology In Vitro*, under revision
2. 学会発表
- (1) 藤岡 宏樹、花田 三四郎、井上 由理子、白石 貢一、叶谷 文秀、馬目佳信、ナノマテリアルが脳に与える影響評価法の開発、日本動物実験代替法学会 第 25 回大会 (口演)、東京、2012 年 12 月.
- (2) Fumihide Kanaya, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Yoshinobu Manome, Kohki Fujioka, Communicating nanotoxicology: Three evaluations using in vitro central nerve models, *Nanosafe 2012 (Oral)*, Grenoble, France, Nov., 2012.
- (3) Sanshiro Hanada, Kohki Fujioka, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Yoshinobu Manome, Kenji Yamamoto, Application of in vitro BBB model to measure permeability of nanoparticles, *Nanosafe 2012 (Oral)*, Grenoble, France, Nov. 2012.
- (4) Yuriko Inoue, Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Toxicological influence of giving the silica nanoparticles on cultured central nerves cells, *Nanosafe 2012 (Poster)*, Grenoble, France, Nov. 2012.
- (5) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Highly concentrated silica

nanoparticles affect the activities of neural stem cell line, Nanosafe 2012 (Poster), Grenoble, France, Nov. 2012.

(6) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Yuriko Inoue, Fumihide Kanaya, Kouichi Shiraishi, Yoshinobu Manome, Evaluation of nanotoxic effects using in vitro central nerve models, Nanotoxicology 2012 (Poster), Beijing, China, Sep. 2012.

(7) 藤岡宏樹、池田恵一、馬目佳信、ナノ粒子が与える神経幹細胞への影響評価、第 11 回 Conference for BioSignal and Medicine(口演)、三重、2012 年 9 月.

(8) 白石貢一、濱野幹子、川野久美、米谷芳枝、横山昌幸、高分子ミセルMR I 造影剤のPEGに対する免疫現象、日本分子イメージング学会 (ポスター)、浜松、2012 年 5 月

(9) 白石貢一、濱野幹子、川野久美、米谷芳枝、青枝大貴、石井健、横山昌幸、ABC 現象を担う IgM 抗体と PEG の認識領域の検証、日本 DDS 学会 (口頭)、札幌、2012 年 6 月

3. その他の業績

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)

血液脳関門モデルを用いたナノ粒子の脳内移行性に関する研究

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・研究員
研究代表者：藤岡 宏樹 東京慈恵会医科大学・分子生物学研究部・助教
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・研究所・協力研究員
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／総長特任補佐
研究協力者：馬目 佳信 東京慈恵会医科大学・分子生物学研究部・教授

研究要旨

ナノ粒子は、その粒子サイズ、表面特性がバルクの材料と異なるため、脳内への容易な移行性が指摘されている。そこで、本研究では、薬剤の脳内移行性を評価するモデルとして動物試験と有効な相関性を有しているラット細胞培養ベースの血液脳関門（以下、BBB）モデルを用い、ナノ粒子の脳内移行性試験の評価を行い、動物試験との一致性、定量性、簡便性を有する評価指標としての利用可能性を検討した。本研究では、市販のローダミン B 誘導体を含有した蛍光シリカナノ粒子および互いに表面修飾の異なるセレン化カドミウム量子ドットを試験材料として用い検討を行った。

蛍光シリカナノ粒子としては、直径 30, 100, 400, 1500 nm の計 4 種類について検討を行った。結果、30 nm のシリカナノ粒子においては BBB の透過性が確認された。一方 100 nm 以上の粒子に関しては、わずか、もしくは検出限界以下であった。蛍光顕微鏡による観察では、30 nm シリカナノ粒子において、粒子添加側の血管内皮細胞層とともに、細胞層下層の脳ペリサイト細胞層にもシリカナノ粒子が蓄積していることが確認された。以上の結果は、30 nm のシリカナノ粒子が明らかに細胞層に取り込まれ、一部が BBB を通過していることを示唆している。

30 nm について、その濃度依存性を検討した。0.1 から 0.5 mg/mL では、透過係数に有意な差がないのに対して、1.0 mg/mL の高濃度では透過係数が亢進していることが確認された。このことは、高濃度負荷が、局所的な細胞障害による細胞間透過性の亢進や細胞内取込みに影響を与え、ナノ粒子の BBB の通過に寄与していることを示唆している。

また、BBB 通過試験の時間的解析を行ったところ、30 分から 120 分において顕著な差は見られなかった。従って、BBB の透過性が受動的な輸送であると考えられる。ま

た、長期の培養試験が可能なことから、本モデルを長期毒性評価モデルへと適用できる可能性も示唆される。

表面修飾の異なる量子ドットに関して同様に BBB 通過試験を実施した。カチオン性ナノ粒子であるアミン修飾量子ドットにおいて中性 PEG 修飾量子ドットに比べてより透過性が高いことが示された。これは、粒子の正電荷と細胞表面の負電荷の相互作用によるものと理解される。しかしながら、マウス動物試験における量子ドットの脳内移行性については、負電荷のカルボキシル基修飾量子ドットが最も臓器蓄積性が高いことが示されている。このことは、生体の環境がナノ粒子の取り込みに影響していることを示しており、今後本モデルを適用するにあたって血中環境を模倣した評価系の確立などが必要である。

本研究では、ナノ粒子の脳内移行性について、サイズ依存的な BBB 通過を確認した。今後さらに本評価系を改善することで生体との相関性を高めたモデルの構築を試みたい。

A:研究目的

ナノ粒子は、その粒子サイズ、表面特性がバルクの材料と異なるため、生体内への選択的な蓄積が危惧されている。とくに、脳内への移行性については、マウス動物モデルにおいて大阪大学の堤らによりシリカナノ粒子の血液脳関門（以下、BBB）透過性が報告されている（Yamashita et al., Nature Nanotech 2011, Nabeshi et al., Biomaterials 2011）。同様に、本研究室の共同研究者である京都府立医大の伏木らのグループは、量子ドットに特殊な表面修飾を施すことで、マウスの腹腔内投与において量子ドットが脳内への移行・蓄積することを示した（Kato et al., Nanotechnology 2009）。これらの結果は、ナノ粒子が脳内にどのような影響をもたらすかを示した結果ではないが、将来ナノ粒子が様々な脳疾患への影響する可能性について検討の余地があることを示唆している。

しかしながら、動物試験によるナノ粒子試験法は、（１）実験が６時間から、数ヶ月など長期にわたること、（２）評価系のエンドポイントの設定が困難であること、など予測が不能な点が多い。

そこで、本研究は、薬効評価試験に採用されている細胞アッセイベースの BBB モデルを活用し、ナノ粒子の BBB 通過性に関する簡便かつ定量的かつ再現性の高い評価系の確立を目指した。本研究におけるナノ粒子は、蛍光色素含有シリカ粒子および異なった表面特性のセレン化カドミウム量子ドットである。

B:研究方法

薬剤の脳内移行性試験に用いられる、ラット脳微小血管内皮細胞とペリサイトの間層細胞層による BBB 再構成モデル（ファーマコセル社）を用い、ナノ粒子の BBB 通過試験を実施した。ナノ粒子としてローダミン B 誘導体蛍光色素含有シリカナノ粒子（以下、蛍光シリカ）および異なった表面特性の量子ドットを用いた。細胞透過係数は、 P_{app} [cm/sec]を用いた。計算式は次頁のとおりである。

$$P_{app} = \frac{V_{脳側}}{S \times C_{血漿側}} \times \frac{\Delta C_{脳側}}{\Delta t}$$

C : 濃度

S : 膜面積

V : (脳側) 培養液体積

各種サイズの蛍光シリカナノ粒子（粒径：30 nm, 100 nm, 400 nm, 1500 nm）およ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、中性電荷：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（粒径：25 nm）を用い、添加濃度 0.1-1 mg/mL、アッセイ時間 30 分および 60 分、120 分の培養後、透過側培養液を回収し、蛍光強度を指標とした検量線から透過係数 P_{app} を算出し、サイズおよび表面特性の違いによる BBB 通過性を比較検討した。

（倫理面への配慮）

特になし。

C:研究結果

昨年度以降、本試験を継続的に実施し、

粒子サイズ依存性、濃度依存性、評価時間依存性、表面特性依存性についての統計的有意性のある評価を実施している。以下、昨年度と重複になる結果も含めて報告する。

本試験に用いたナノ粒子の物性評価

本試験に用いたナノ粒子を動的光散乱法により、粒子サイズ、ゼータ電位を測定した。結果を Table 1 に示す。

Table 1. Characterization of nanoparticles.

Particle	Peak diameter (nm)	Z-average Diameter (nm)	PdI (-)	Zeta potential (mV)
Silica				
30 nm	32.0±1.1	29.5 ± 0.5	0.162 ± 0.013	-15.6 ± 1.2
100 nm	137.0 ± 1.5	129.7 ± 1.4	0.042 ± 0.005	-19.7 ± 1.05
400 nm	481.4 ± 22.1	460.3 ± 10.1	0.164 ± 0.030	-21.8 ± 2.4
Bulk/1500nm	367.4 ± 157.1		0.869 ± 0.080	-29.3 ± 2.1
Qdots				
Carboxyl	49.85 ± 7.8		0.49 ± 0.028	-32.0 ± 1.3
PEG	32.9 ± 9.07		0.31 ± 0.028	-3.6 ± 2.1
Amino	47.9 ± 3.0		0.44 ± 0.005	-7.3 ± 3.8

We measured silica NPs and Qdots in PBS-based assay buffer (1 mg/mL or 40 nM, respectively) with dynamic light scattering. All data are the average ± SD of three independent measurements.

シリカナノ粒子は、負に帯電しており、粒子サイズに依存したゼータ電位を示していた。1500 nm のナノ粒子は、PdI (多分散指数) が高く、粒子が分布していることが確認された。1 次ピーク粒子として 367 nm の粒子が確認された。

BBB 通過性のサイズ依存性

透過係数 P_{app} の結果について、図 1 (A) に示す。シリカナノ粒子粒径 30 nm においてのみ、BBB モデルを通過することが確認された (N=8)。一方、100 nm およびそれ以上では、透過係数はわずかもしくは、検出限界以下であった。

また、細胞層のないブランク膜による評価で、30 から 400 nm において、 P_{app} の差がなく、膜による粒子の拡散阻害がないことを確認した (図 1 (B))。

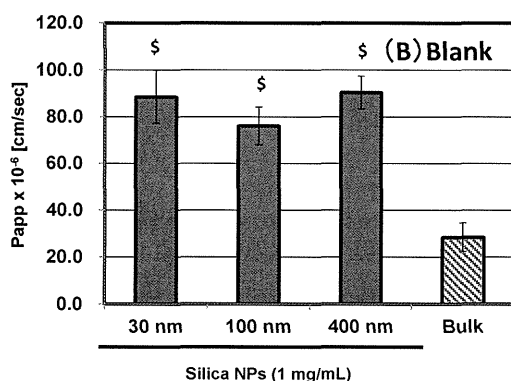
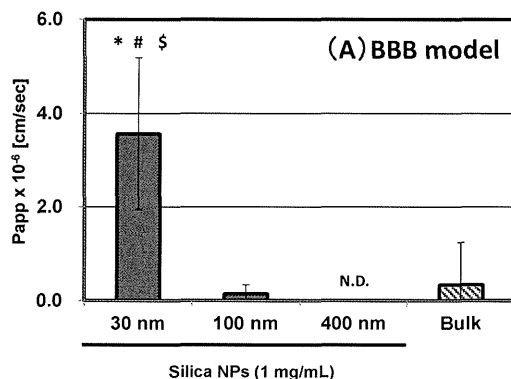


図 1 蛍光シリカ粒子の (A) BBB モデルおよび (B) ブランク膜における通過性

蛍光顕微鏡による BBB モデルの評価

粒径 30 nm では上層の血管内皮細胞および下層のペリサイト層の両方の細胞層にナノ粒子の蓄積が確認された (図 2・次頁)。一方で、100 nm, 400 nm では、粒子の蓄積、とくに、ペリサイト層への蓄積はわずかであり、1500 nm では粒子が沈降し内皮細胞層に大量の粒子が蓄積しているが、下層には確認されなかった。

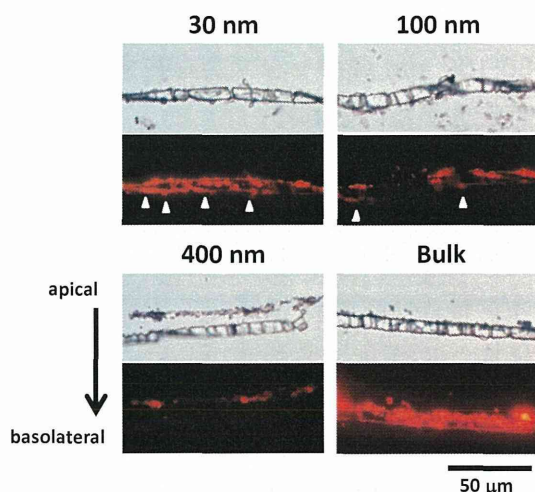


図2 蛍光シリカの BBB 細胞層蓄積

BBB 通過性の濃度依存性

蛍光シリカナノ粒子 30 nm について、各種濃度 (0.1, 0.25, 0.5, 1.0 mg/mL) における BBB 通過性試験を実施した。Papp は、0.5 から 1.0 mg/mL の間で有意に充進する結果を示した (図 3)。

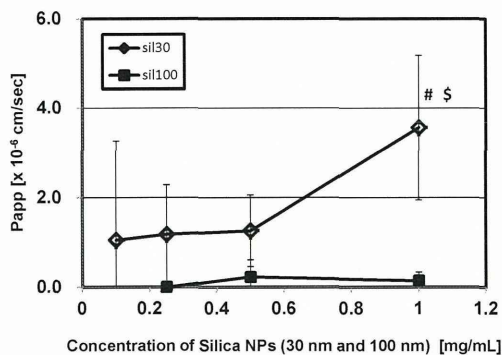


図3 BBB 通過試験の濃度依存性

BBB 通過性の時間依存性

蛍光シリカナノ粒子 30 nm について、本試験の確立された評価時間 30 分に対して、60 分および 120 分における Papp の評価を実施した。図 4 の結果より、評価時間による有意な差は確認されなかった。

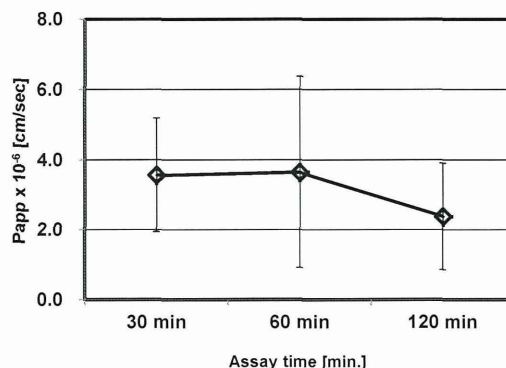


図4 BBB 通過試験の評価時間依存性

BBB 通過性の表面特性依存性

3 種類の表面修飾 (カチオン性、アニオン性、中性) の異なる粒子径 25 nm の量子ドットを用いた BBB 通過性試験を実施した。カチオン性 (正電荷) のアミン表面量子ドットにおいて、粒子透過係数が 7.82×10^{-6} cm/sec と電荷のない PEG 表面修飾ナノ粒子に比べて有意に高い Papp を示した (図 5)。

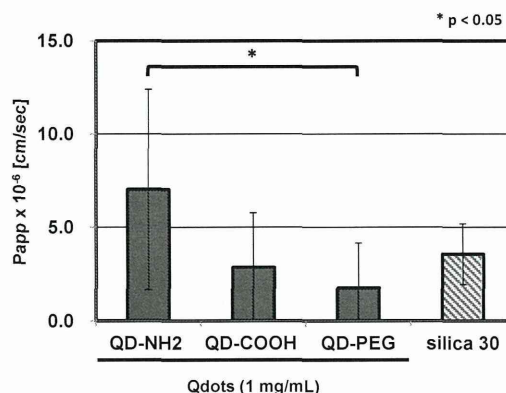


図5 BBB 通過試験の表面修飾依存性

D:考察

蛍光シリカナノ粒子の BBB 通過性について、粒子サイズ 100 nm と 30 nm の間にナノ粒子通過性の有意なしきい値が存在することが確認された。この値は、薬剤の通過性を指標とした場合、「わずか

に通過する」レベルである。動物実験においても、70 nm シリカナノ粒子における BBB 通過の報告がなされており、本 BBB モデルは、ナノ粒子の透過性を検討するうえで有用なツールになりうるものと考えられる。とくに、今年度は、繰り返し実験により、時間依存性、濃度依存性、表面特性依存性において、有意な差を得ることができた。

BBB 通過のメカニズムを評価するために、濃度依存性、時間依存性、表面特性依存性について評価を行った。本試験の 30 nm シリカナノ粒子濃度依存性より、0.5 mg/mL および 1.0 mg/mL の間をしきい値として、BBB 通過性が亢進することが確認された。この結果は、高濃度暴露による BBB の破綻によるものであると推測される。BBB の破綻にはいくつかのメカニズムが考えられる。(1) 細胞間隙の破綻：タイトジャンクションが傷害されてナノ粒子が容易に移行する可能性、(2) 細胞内への粒子の取り込み：取り込まれた粒子が、(a) 細胞を傷害または (b) トランスサイトシスなどの輸送メカニズムにより脳内へ通過する可能性が考えられる。(つまり、細胞間の通過、細胞内の通過の 2 つのメカニズムが考えられる。) 過去の研究から、粒子サイズ 50 nm 付近に細胞の特異的なナノ粒子取り込み能があるという報告 (Jiang et al., Nature Nanotech 2008) や、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という本研究での結果から、細胞内を介したナノ粒子の移行性の可能性について検討が必要であろう。一方、細胞間においては、一旦 BBB のタ

イトジャンクションが破綻すると、30-100 nm のギャップが存在するという可能性が示唆される。

粒子特性の違いによる BBB 透過性について、表面電荷が異なる量子ドットを用いて透過係数を算出したところ、カチオン性のナノ粒子に関して中性ナノ粒子に比べて有意に通過性が高いことが確認された。これは、カチオン性のナノ粒子が相対的に正であるのに対して、細胞表面がリン脂質により負電荷であるため、細胞・粒子間の接着性が高まるためであると考えられる。しかしながら、以上の結果は、生体においてアニオン性量子ドットが有意に組織に蓄積するという結果とは異なるものであった (Praetner et al., Biomaterials 2010)。

本研究で用いたナノ粒子の添加濃度 0.1-1.0 mg/mL は、外界から生体に取り込まれると予測される濃度と比べると極めて高い濃度であると考えられるが、これは、本試験が蛍光を指標としたことによる検出限界が理由である。しかしながら、長期的なナノ粒子の蓄積や、ナノ粒子の過剰暴露が、ナノ粒子がわずかでも脳内移行を引き起こす可能性があるということは、十分に考慮すべきことであろう。

一方、より生体に類似した結果を導くためには、生体に近い評価系の改善が必要である。(1) 血清を含有した評価系の必要性：生体内には当然ながら血清が存在する、最近の報告ではナノ粒子が血清と作用することで、細胞との相互作用が変化することが報告されている。その多くは、細胞傷害性のしきい値を緩和する

ものである。一方、粒子表面に何らかの特性がある場合、血清タンパク質はナノ粒子表面に蓄積し、プロテインコロナといわれる複合体を形成している。この複合体は細胞との相互作用を特異的に帰る可能性があり、本評価系においても検討の必要があろう。本評価系は、30分から120分まで評価が可能であったことから、今後血清タンパク質を含んだアッセイ系の確立を検討したい。(2) 低濃度および実物質検出系の確立：本試験ではナノ粒子として蛍光色素含有シリカおよび蛍光性量子ドットを用いた。これは、蛍光値を検量線として濃度を定量したものであるが、ナノ粒子が凝集する、色素が漏出するなど、誤った見積をする可能性が考えられる。本試験では、含有色素類似物による BBB 透過性試験において蛍光値ベースで P_{app} が有意に低いことが確認されたため、30分から120分の試験による蛍光物質の漏出はないと考えられるが、今後は、実物質を測定する検出系が必須である。また、本試験の検量線では、より低濃度の試験を実施することが不可能であったため、低濃度域の検出系も必要となる。このような条件を満たす装置としては、ICP-MS などが考えられ、今後の改善が必要である。

E:結論

ナノ粒子の脳内移行性を、薬剤透過性試験で使用されている BBB モデルにより評価した。30nm シリカナノ粒子による BBB 透過性を確認し、暴露濃度依存的なしきい値を持つ透過性を確認した。また、評価時間を検討したところ、30分か

ら120分まで実施可能であることが分かった。表面電荷特性の異なる量子ドットを用いた評価を行ったところ、正電荷量子ドットにおいて BBB 透過性が有意に高い傾向を示した。

暴露されるナノ粒子の生体内での挙動は、本モデルとは異なる可能性があり、今後検討が必要である。具体的には、適用濃度、生体内環境の模倣（血清、血流など）、低濃度実物質検出系の確立などである。

本試験の結果は、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ことを示唆しており、今後も継続的な検討が必要であろう。例えば、酸化チタンナノ粒子などを含めたその他のナノ粒子についても同様の検討を行い、材料依存的な毒性などを評価することで統一的なナノ粒子の脳内透過性に関するメカニズム（特異性、サイズ性など）を調べることは大変意義深いものと考えられる。

F:健康危機情報

なし

G:研究発表

1. 論文発表

1. M. Hamon, S. Hanada, T. Fujii, Y. Sakai. Direct oxygen supply with polydimethylsiloxane (PDMS) membranes induces a spontaneous organization of thick heterogeneous liver tissues from rat fetal liver cells, *Cell Transplantation*, 21(2-3):