

- 401-410, 2012
2. 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]
  3. 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
  4. 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
  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, 2012
  6. 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. Application of in vitro BBB model to measure permeability of nanoparticles. Sanshiro Hanada, K. Fujioka, Y. Inoue, F. Kanaya, Y. Manome, K. Yamamoto. (National Center for Global Health and Medicine, Japan), NanoSafe 2012, Grenoble, France
  2. Three Evaluations using in vitro central nerve models. Fumihide Kanaya, S. Hanada, Y. Inoue, Y. Manome, K. Fujioka. (National Center for Global Health and Medicine, Japan), NanoSafe 2012, Grenoble, France
  3. Highly concentrated silica nanoparticles affect the activities of neural stem cell line. Kouki Fujioka, S. Hanada, Y. Inoue, F.

Kanaya, K. Shiraishi, Y. Manome  
(The Jikei University School of  
Medicine, Japan), NanoSafe 2012,  
Grenoble, France

4. Toxicological influence of giving  
the silica nanoparticles on  
cultured central nerves cells.  
Yuriko Inoue, K. Fujioka, S.  
Hanada, F. Kanaya, K. Shiraishi,  
Y. Manome, M. Takayanagi. (Toho  
University, Japan), NanoSafe 2012,  
Grenoble, France

3. その他の業績

書籍等

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)

神経幹細胞株を用いた、シリカ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」・「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、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。

本研究から明らかになった細胞に影響を与える濃度(31.3  $\mu\text{g/mL}$  以上で細胞膜透過性の向上)は、動物試験から予想される脳への透過性(0.1%程度)から考えると、現実的に使用される濃度では、神経幹細胞への影響は少ないと考えられる。しかしながら、血液脳関門の状態や、蓄積の可能性などを考慮すると、長期曝露では影響が出る可能性がある。本年度の研究結果からは、脳への透過が予想される30 nmの粒子で神経幹細胞の分化へ影響を与える可能性が示唆されており、今後は、胎仔や老齢の動物など、血液脳関門が脆弱な生体への影響を調査する必要があると考えられる。

## 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の解析を行う。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、神経幹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)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

シリカナノ粒子には、無蛍光粒子の Silicon Dioxide, 70 nm (321-38372, 和光純薬; NSP70)、325 mesh (342890-100G)、赤色蛍光粒子の sicastar-redF, 30, 400, 1500 nm (Micromod; NSP30, 400, 及び1500)を用いた。

### (3) サイトカインの測定

Human Cytokine/Chemokine 96-Well Plate Assay (Cat. No. MPXHCYTO 60KPMX42) (MERCK MILLIPORE) のプレートを用いて、Luminex® 200TM

System (Luminex) の装置で測定した。測定は、Genetic Lab Co., Ltd. Japan に委託した。測定項目は、以下の通りである。EGF, Eotaxin, FGF-2, Flt-3 Ligand, Fractalkine, G-CSF, GM-CSF, GRO, IFN $\alpha$ 2, IFN $\gamma$ , IL-1a, IL-1b, IL-1ra, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17A, IP-10, MCP-1, MCP-3, MDC, MIP-1a, MIP-1b, PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sCD40L, sIL-2Ra, TGF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , 及び VEGF

#### (4)細胞の観察

核・ミトコンドリアの観察には、High Content Imaging System Operetta (PerkinElmer) を用いた。細胞を Sytox Green 11 Nucleic Acid Stain (Invitrogen), 及び MitoRed (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)で核・及びミトコンドリアを染色後、パラホルムアルデヒドで固定、更に Hoechst 33342 solution (Dojindo Molecular Technologies, Inc.)で核を染色した。

活性酸素種の観察や蛍光シリカ粒子との相互作用の観察については、BZ-9000 顕微鏡(キーエンス)を用いた。活性酸素種の染色には、CellROX Green Reagent (Invitrogen)を用いた。

#### (5) PCR

PCR 反応には、Quick Taq HS DyeMix (Toyobo)を用いた。反応後、1.5% Agarose S (Nippongene)で電気泳動を行った。

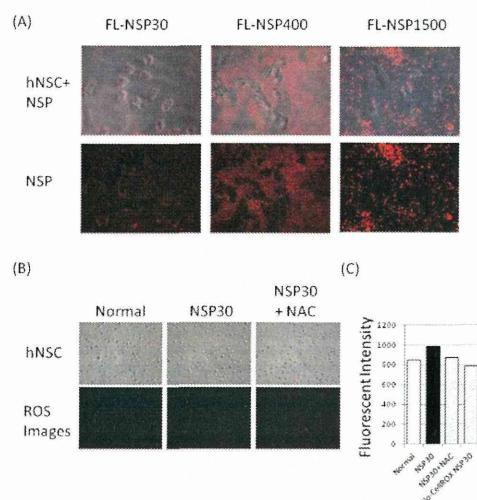
### C:研究結果

#### ヒト神経幹細胞株を用いた細胞毒性評価法の構築

昨年度の研究結果から、大きさの異なるシリカ粒子との共培養で細胞の活性に違いが見られたることがわかった。このため、粒子と細胞の吸着性の違いを検討した(図 1)。

hNSC と大きさの異なる 100  $\mu$ g/mL の FL-NSP30, 400, 1500 を 1 時間共培養し PBS で well を洗浄した結果、特に NSP30において細胞膜に粒子の吸着が見られ、NSP1500 では、ほとんど結合している粒子が観察されなかった(図 1A)。また、NSP30 では、わずかではあるが同じ時間で ROS の発生が観察された(図 1B)。

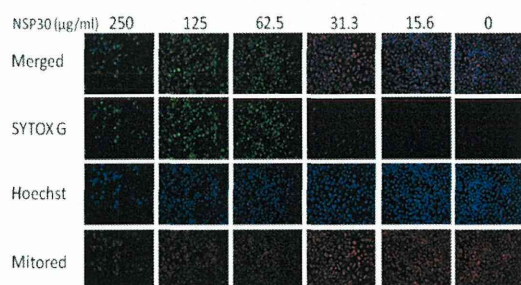
図 1. hNSC と大きさの異なる粒子との共培養像と NSP30 共培養時の ROS の観察



他の粒子とは異なり、NSP30 ではミトコンドリア活性の低下や高い細胞吸着能が観察されたことから、毒性閾値を詳細に検討するため、hNSC と粒子を 24 時間

共培養し、核、ミトコンドリアの状態を経時的に観察した(図 2)。

図 2. hNSC と NSP30 共培養時における核・ミトコンドリアの様子 (24 時間)



染色に用いた SYTOX Green (SG)は核染色試薬である。細胞膜透過性がないため、SG 染色像は細胞膜透過性が上昇していることを示す。31.3  $\mu\text{g/mL}$  以上で透過性が向上し、125  $\mu\text{g/mL}$  以上では、大部分の細胞が SG で染色される。

ミトコンドリア活動電位の指標となる Mitored (赤) の蛍光強度はほとんど変化がみられなかった。また、アポトーシスの指標となる核染色試薬のヘキスト (青) では0~125  $\mu\text{g/mL}$  の濃度で濃度依存的に下降する傾向がみられる。

31.3  $\mu\text{g/mL}$  以上で細胞膜透過性の上昇がみられたことから、このときの神経幹細胞の変化を検証した。始めに、hNSC と 100  $\mu\text{g/mL}$  の NSP30 を 24 時間共培養したときに放出されるサイトカインのうち、42 種類をタンパク質レベルで測定した。有意な差が見られたサイトカインを図 3 に示す。EGF, G-CSF, INF  $\alpha$  2, PDGF の有意な増加が見られた。特に

PDGF は、対照群においては検出域になく、NSP30 によって 10  $\text{pg/mL}$  まで上昇している。一方、RANTES, IP-10, VEGF, GRO, MIP1-1  $\alpha$ , 及び MCP-3 は減少した。

また、このときの分化指標の遺伝子発現を調べたものが図 4 である。シリカ粒子共培養による Nestin(幹細胞)、NEFH (神経)の上昇が観察された。一方、GFAP (アストロサイト) は NSP30 で増加し、MBP (オリゴデンドロサイト) は NSP30 で減少した

図 3. hNSC と NSP30 (赤) を共培養した際に差が見られたサイトカイン (24 時間共培養)

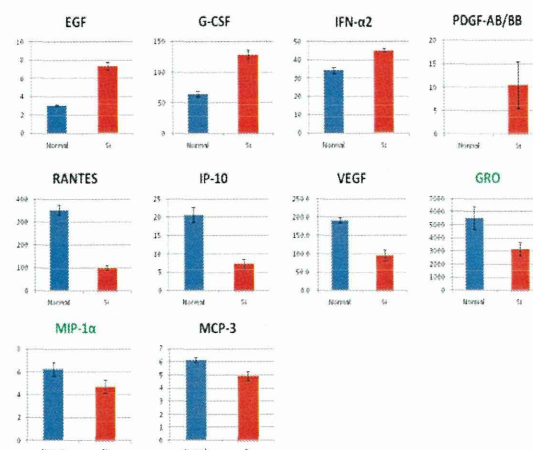
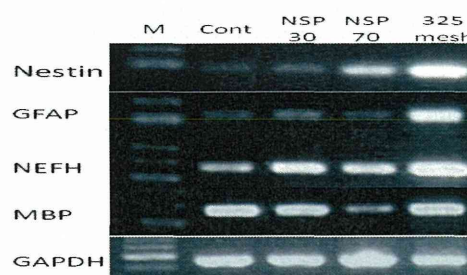


図 4. hNSC と大きさの異なる粒子を共培養した際の遺伝子発現の変化(24 時間共培養)



#### D:考察

サイトカインの発現変化からは、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の NSP30 が EGF などを増加させ、RANTES などを減少させることが示された。EGF は幹細胞の細胞分裂促進因子として働き、その後アストロサイトへの分化に導く因子の一つである。また、PDGF は神経細胞を形成するための因子である。NSP30 によって傷害を受けた hNSC が、自身の分裂や、アストロサイト、神経細胞への分化を始めることが示唆される。

一方で、hNSC の増殖に関わる RANTES は減少していることから、炎症様の作用とは異なる細胞分化を行っているのかも知れない。また、神経幹細胞の migration に関わる RANTES、IP-10、GRO、MIP-1 $\alpha$ 、VEGF は減少しており、NSP30 が存在する部位に対して、他の幹細胞の侵入を妨げている可能性がある。他のサイトカインの働きは未解明であるが、INF- $\alpha$ 2 は、神経幹細胞株への HIV 感染を防ぐ働きがあり、MCP-3 は ventral mid brain においてドーパミンニューロンの形成を担っているとの報告がある。このため、これらのサイトカインは神経幹細胞の防御や神経分化に関わっている可能性がある

分化マーカーへの影響については、遺伝子発現レベルで影響があることを示した。シリカ粒子との共培養により、Nestin (幹細胞) や NEFH (神経) の発現を増加させることが示された。また、NSP30 では GFAP(アストロサイト)の増加が見られ、NSP70 では MBP(オリゴデンドロサイト)の減少が見られた。これらの結果から、NSP30 では、自身の複製だけでなく、神経、アストロサイトへの分化を促進する

ことが示唆され、サイトカインの発現の結果と一致することがわかる。

NSP70 における MBP の減少は、オリゴデンドロサイトの減少につながる可能性があり、新生された神経の活動に影響を与える可能性がある。一方、325 mesh では全ての遺伝子発現が増加する傾向にあり、細胞の傷害によって、活発な細胞分裂を行っていることが示唆される。また、神経再生に必須因子である HMGA 遺伝子の発現は、NSP30 でのみ減少が確認されている。このことは、NSP30 が、神経幹細胞からの神経新生に影響を与える可能性を示唆している。今後、NSP30 と共培養した hNSC が正常な神経新生を行うことができるか検討が必要だろう。

NSP30 共培養時の核・ミトコンドリアの観察した結果からは、SG 染色割合の増加が見られた。SG 染色は、細胞膜の不完全性を示す。閾値としては、31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で細胞への急性毒性が発生することが示された。一方で、15.6  $\mu\text{g}/\text{mL}$  では、SG 染色の割合に変化が見られないことから、同濃度までは細胞膜への影響が少ないことが示唆される。細胞死の機構としては、SG で染色されることからネクローシスが示唆されるが、ネクローシスの指標であるミトコンドリアの膨大化 (Mitored の染色強度の増加) が観察されていない。一方で、アポトーシスの指標となる Hoechst の蛍光強度は 125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  まで低下傾向にあることから、アポトーシスとも異なる機構で細胞死が起きている可能性が示唆される。

NSP30 の毒性機構については未解明であるが、細胞への吸着力の大きさやわず

かな ROS の発生が影響を与えている可能性がある。ただし、今回の観察からは ROS の発生はわずかにしか観察されておらず、他の要因も毒性に影響を与えていることが示唆される。最近の研究では、ナノ粒子の細胞毒性の機構として、細胞内に取り込まれたナノ粒子によるオートファジーとリソソームの機能障害が報告されている。細胞膜への高い吸着や集積性から、他の細胞内組織への吸着も高いことが示唆され、オートファゴソームやリソソームの働きにも影響を与えている可能性がある。細胞内分布を調査することで、毒性機構が明らかになるだろう。

昨年度の結果から、ミトコンドリア活性と細胞の状態が解離していることが示唆されており、本研究結果からは、62.5  $\mu\text{g/mL}$  以上で幹細胞の細胞膜に傷害を与える可能性が示唆され、また、ナノ粒子が暴露されることによって、神経幹細胞の分化に影響を与える可能性が示唆された。

31.3  $\mu\text{g/mL}$  という濃度は、動物投与試験で予測される脳内の濃度に比べ、高濃度に位置する。しかしながら、脳における積極的な排出システムが明らかになっていない点や、慢性暴露における脳内への蓄積、また、乳幼児や高齢者における脳血液関門の脆弱性を考慮した場合には、局所的に濃度が高まる可能性がある。

#### E:結論

本研究では、神経幹細胞株を使った評価法を検討し、高濃度のナノ粒子は幹細胞の分化に影響を与えることが示唆された。今後、妊娠マウスなどを使用した動

物試験の結果から、胎児の神経活動への影響について明らかになると考えられるが、本研究で明らかにした分化への影響などのスクリーニング手法がナノ粒子の安全性評価につながれば幸甚である。

#### 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) 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

##### 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) 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.

(3) 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.

(4) 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.

3. その他の業績  
書籍等 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)

大脳初代培養細胞を用いたナノ粒子影響評価法の開発

研究分担者 井上 由理子 東邦大学医学部解剖学講座 助教

## 研究要旨

今年度は、化学物質ナノマテリアルの中枢神経に与える毒性学的な影響の評価を行った。

妊娠 18 日目のウイスターラットの脳皮質の初代培養細胞において、ナノ粒子の細胞毒性の影響を調査した。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、添加後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(LDH)、 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。

これらの結果を考慮して、生体における毒性学的影響を調査する必要があるだろう。

## A:研究目的

化学物質（ナノ粒子）の神経細胞に対する影響を評価する事を目的とする試験法の開発に主題をおいて今年度も研究を行った。

ラットの大脳皮質の初代培養細胞を作成し、神経細胞への毒性影響をLDHアッセイ、ROSアッセイ、カスパーゼの活性を測定する事によって行う。

## B:研究方法

ナノマテリアルの中樞神経に及ぼす影響を、ラット胎児（18日目）のCortex primary culture（大脳皮質）を用いて調査する。

細胞の生死に関しては、死細胞のカスケードで見られるCaspase3/7（Invitrogen）、微小管タンパクの骨格を染め分け樹状突起の形態を観察出来るMAP2（Chemicon）の抗体を用いて細胞の様子を観察した。

### 用いたシリカ粒子

1. ローダミン含有シリカ（30 nm）
2. 無蛍光シリカ（12 nm）

ローダミン含有シリカ（30 nm）と無蛍光シリカ（12 nm）は、Micromod Partikeltechnologie GmbH、シリカ（12 nm）は、Micromod Partikeltechnologie GmbH、Germany から購入した。

### 細胞生存率の測定について

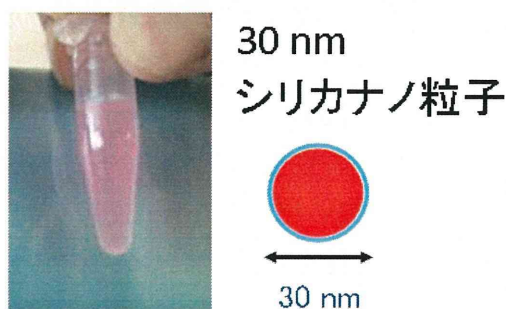
上記 1, 2 のシリカを濃度:0, 1 mg/ml,

0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml の濃度で1時間培養を行った。

上記2種類のナノ粒子ローダミン含有粒子（30 nm）、無蛍光シリカ（12 nm）を用いて細胞に添加して実験を行う。ローダミンは、543 nm のレーザーを当てると励起する。

### 図1：シリカナノ粒子

シリカナノ粒子に543nmで励起する蛍光物質がついてある



### 細胞ダメージのアッセイについて

細胞ダメージについては、ロシュ社のCytotoxicity Detection Kitを用いて、0.01, 0.1 及び 1 mg/ml の3種類のシリカナノ粒子の曝露において、0分、10分、30分の3点で測定を行った。TritonX-100 (2% (v/v))は、ポジティブコントロールとして用いた。ROSアッセイについては、CellROX Green Reagent (Invitrogen)を用いた。

## C:実験結果

アポトーシスのカスケードである Caspase3/7 を用いて死細胞や死に近い細胞をラベルした (図 2-4)。カスパーゼ (Caspase) とは、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群のシステインプロテアーゼである。

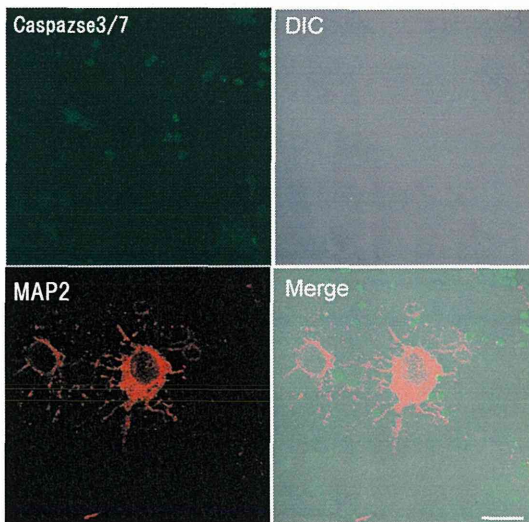


図 2 : シリカナノ粒子 12 nm 0.01 mg/ml の濃度で 1 時間添加

MAP2 の染色像から細胞状態が悪く、樹状突起が切れてなくなり、細胞体のみが残っている。Caspase の染色が見られる (Green)。

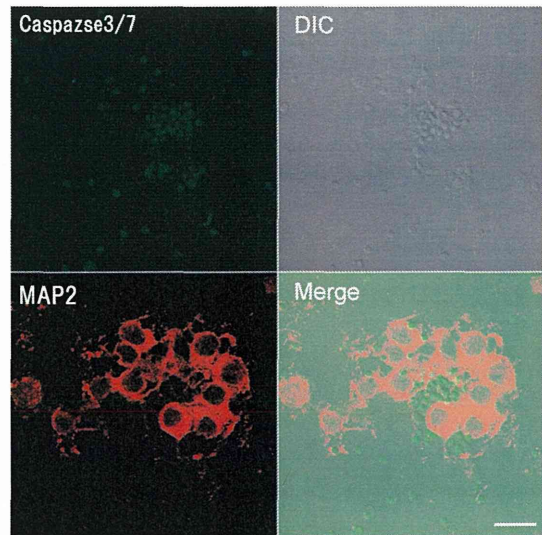


図 3 : シリカナノ粒子 12 nm 0.1 mg/ml の濃度で 1 時間添加

MAP2 の染色像から細胞状態が悪い事がわかった。樹状突起が切れてなくなり、細胞体のみが残っている事が顕著である。

また Caspase の染色も多く見られる

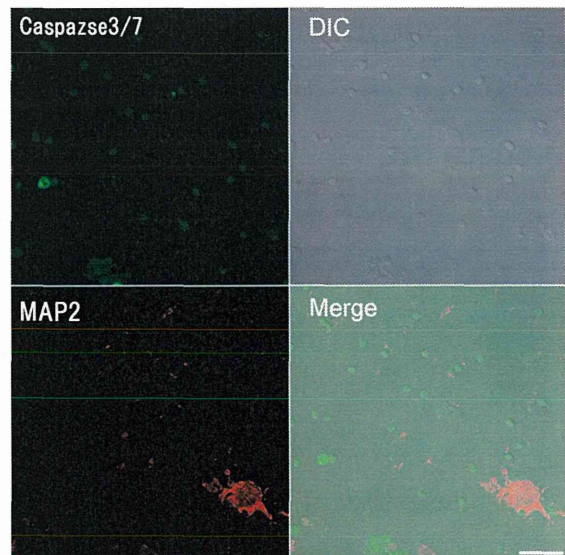
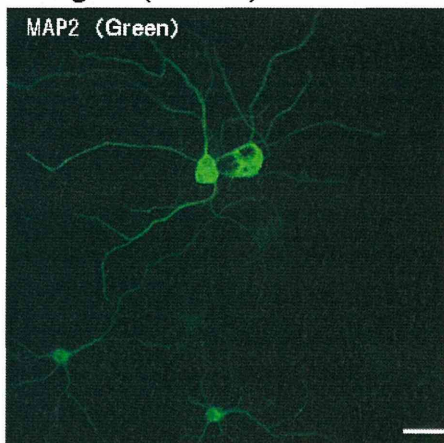


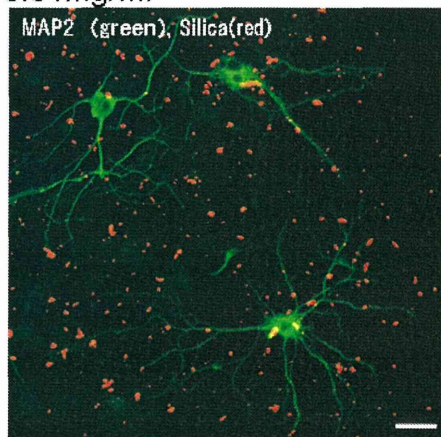
図 4 : シリカナノ粒子 12 nm 1 mg/ml の濃度で 1 時間添加

細胞がほとんど観察されず、また、Caspase による染色像が多い。

0mg/ml (control)



0.01mg/ml



1mg/ml

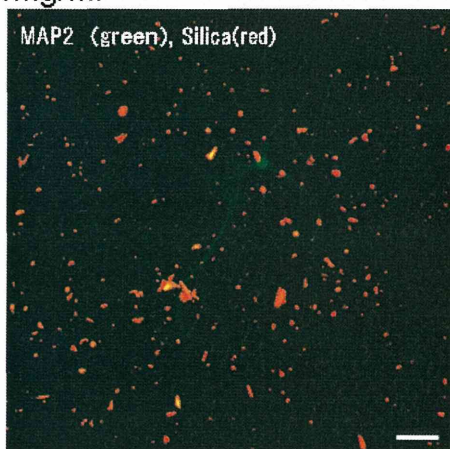


図 5 DIV21 (Days in Vitro) シリカ曝露における MAP2 の観察

シリカナノ粒子の濃度が増加するに従って、神経細胞が消滅するのが観察される。神経細胞の MAP2 染色とシリカ粒子がほとんど共局在していない。また、シリカナノ粒子は、直接細胞には接していない(図 5)。

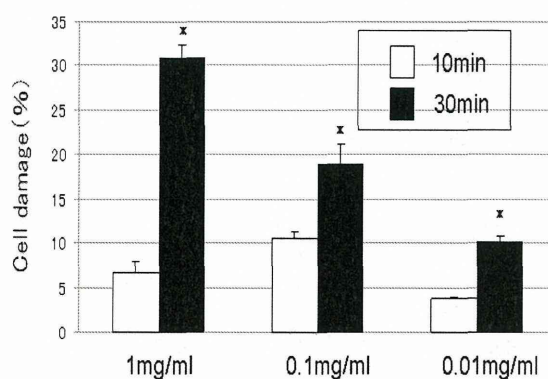
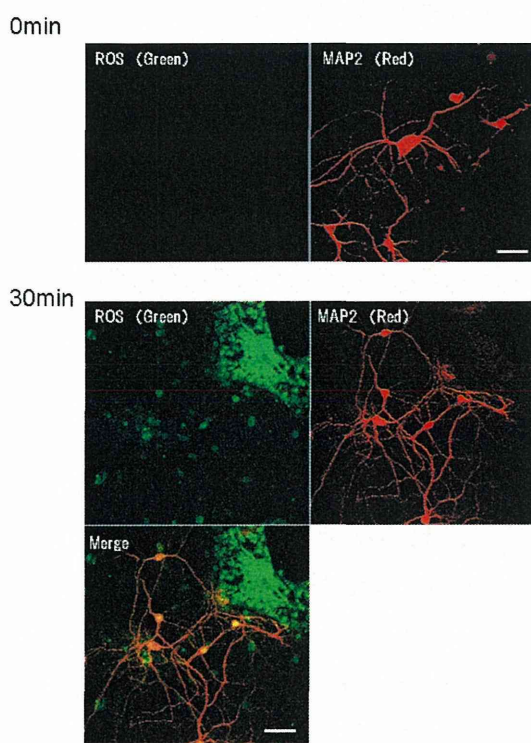


図 6 : LDH アッセイを行い、神経細胞への損傷率

神経細胞の細胞死を定量的に測定する為に、神経細胞の生存率を3つの濃度のシリカ粒子を30分間添加後LDHアッセイにて測定を行った(図6)。LDHアッセイは、神経細胞の膜のダメージによる細胞内からの酵素流出を測定する。細胞からのLDHは、早い段階でのネクロシスおよびアポトーシスを示唆している。シリカ粒子添加後30分では、シリカ粒子の濃度が高濃度(1mg/ml)で最も細胞損傷率が高い。



**図7 DIV21細胞へのシリカナノ粒子添加 (1 mg/ml) 時における ROS の観察。**

ROS の発生が顕著に観察された。30 分間のシリカ共培養により ROS の発生が示唆される緑色にラベルされた細胞体が観察された(図 7)。

#### D:考察

ローダミン含有粒子サイズ 30 nm シリカ、蛍光色素を持たない 12 nm のシリカを用いて神経細胞に投与する実験を行ったが、粒子の培養液濃度に応じた、神経細胞死が観察された。蛍光観察から粒子が確実に培地に入っていることが示された。

どのような過程を経て、樹状突起が切れ、細胞が死んでいくか調べる必要

がある。

研究では、大脳皮質の初代培養細胞へのシリカの影響を測定した。ローダミンが付随した 30 nm のシリカと蛍光色素がつかない 12 nm のシリカを使用した。シリカと細胞との共培養によって神経細胞の細胞損傷を染色像と LDH アッセイと ROS アッセイにより測定した。観察だけでは見落とされてしまう細胞毒性を考慮すると、これらのアッセイによる評価は重要である。

観察像からは、シリカナノ粒子の濃度が高濃度になるに従って、樹状突起やシナプスの減少が起き、細胞体だけが残る傾向にあった。また、神経細胞付近へのシリカ粒子の分布が観察されていたが、細胞内への積極的な粒子の取込は観察されなかった。LDH の漏出や ROS の影響が観察されていることから、神経細胞死の機構として、ROS が発生することで細胞膜が傷害され、アポトーシスが誘導されているものと考えられる。

ROS の産生は、神経細胞内のミトコンドリアに変性を起こす。ミトコンドリアに機能障害が起るために細胞死が誘導される。ROS 産生による神経変性病には、例えばアルツハイマー病やパーキンソン病などの疾患に関連されていることが指摘されている。

過去の研究において、20nm から 40nm の大きさのシルバーナノパーティクル (SNP) を用いて、出産後 3 日以内のラットの胎児の大脳皮質の初代培養細胞で、シリカ投与により神経

細胞から ROS の産生が報告されていた。(Toxicol. Sci. (2012) 126(2): 457-468)。今回、私達が用いた出産前の妊娠後期の胎児の脳皮質は、錐体細胞が多い。出産後の胎児の培養細胞とは細胞分布が違い、より生体内の神経細胞分布に近いと考えられ、シリカへの影響が、より正確に測定できると示唆される。出産後のラットの子供から作られた脳皮質の初代培養細胞は、グリア細胞も多いことからシリカへの影響がより少ないと考えられる。

大阪大学・山下らの報告では、妊娠マウスに高濃度のシリカ粒子を投与することで胎児の脳にシリカ粒子が到達することが示されている。しかしながら、神経細胞への影響については詳細には観察されていない。本研究で行った、神経細胞による簡便な傷害評価によって、シリカ周辺部の ROS の発生など *in vivo* での傷害機構の予測に役立ち、今後、脳疾患との関連性が明らかになるかも知れない。加えて、LDHやROSの評価からシリカ粒子種類や表面修飾と毒性影響について簡便なスクリーニングができることが期待される。

#### E:結論

シリカの添加実験の結果から、高濃度のシリカに神経細胞が曝露された場合には毒性が考慮される必要がある。

現在、細胞レベルの評価のみであり、今後、動物個体へのナノ粒子の影響を

調査する必要がある。

F:健康危機情報  
特になし

#### G:研究発表

##### 1. 論文発表

(1) 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)

##### 2. 学会発表

(1) 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.

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)

脳移行性解析のためのシリカ・磁性ナノ粒子作製と評価

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

#### 研究要旨

ナノ粒子の中枢神経系発達に及ぼす影響を評価する法の開発として、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、その評価を行った。作製したシリカ・酸化鉄ナノ粒子は粒子径 19-21nm 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 5-60nm 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。



## A:研究目的

近年、ナノテクノロジーの進歩とともにナノサイズに制御された材料の開発が多く進められている。ナノ材料は高度に大きさが制御されることにより、新たな機能が付与される。一方、その体への影響についても既存の領域では捉えられない新たな領域であると考えられている。

新たな疾患治療に対する手法として、ナノ粒子を用いた手法が基礎研究、臨床研究の両面から注目がおかれている。特に、ナノ粒子化製剤は疾患部位への効率的なターゲティングを基に主作用を増強し、副作用を軽減させるドラッグデリバリーシステム(DDS)として、ナノ化DDSの研究が1980年代後半からなされてきている。ところが、DDSの領域においても、脳組織内へのナノ粒子の移行性についてはそれほど研究がなされていない。これは、脳疾患を対象とした場合に、それを実行するモデル動物、またデリバリーを行う際に障壁となるBBBの透過性の評価法など様々な観点から研究を行うために必要な状況が整っていなかったことが原因と考えられる。

しかしながら、近年、テクノロジーの発達とともに測定装置の精度・感度の向上がなされ、これまでに得ることのできなかった情報が容易に得られるようになってきている。特に、ナノ粒子の特異的な挙動を動物の生きた状態において、かつ非侵襲的に可視化することが蛍光法、MRI、CT、PETなどによって可能になってきている。これらの手法を用いて脳内に移行されたナノ粒子を生きた状態で長期的に観察することができれば、脳組織

内に移行したナノ粒子の分布性、及び蓄積性、さらに脳組織内における移行性を定量的に可視化することができれば、ナノ粒子が曝露されることに伴う脳組織内への影響を明らかにすることができる。とともに、その防止策についても検討することが可能になると考えられる。

そこで本研究はナノ粒子としてシリカナノ粒子に着目した。シリカナノ粒子とは酸化ケイ素( $\text{SiO}_2$ )からなり、室温において安定なナノ粒子であるが、このナノ粒子は生体に曝露されることによって脳組織内への移行性が確認されている。このように脳組織内への移行が認められているシリカナノ粒子を用いて、脳組織内を高解像度で、非侵襲的、かつ長期的に観察することがMRIにより可能になる。本研究は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の分担項目として、脳組織内へのシリカナノ粒子の移行性ととともに、脳組織内の変化を知ることのできるMRI造影剤ナノ粒子を作製・評価を行い、ナノ粒子の脳組織内への影響を検討することを目的とした。

## B:研究方法

### 1. MRIにより可視化可能なシリカ-酸化鉄ナノ粒子の作製

ナノ粒子コアにMRI造影剤となる酸化鉄の性質を有し、表面にシリカの性質を有するシリカ-酸化鉄ナノ粒子の作製を試みた。まず、酸化鉄(II)(2.0mmol)及び酸化鉄(III)六水和物(4.0mmol)水溶液にオレイン酸を加え、そこへアンモニア水(15wt%)を加えることにより酸化鉄( $\text{Fe}_3\text{O}_4$ )を生成させ、洗浄により酸化鉄

(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)ナノ粒子を作製した。

作製した酸化鉄(Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>)に対して、テトラエトキシシラン(Si(OC<sub>2</sub>H<sub>5</sub>)<sub>4</sub>)を加え、酸化鉄表面をシリカにより 3 日間室温においてコーティングした。

## 2. シリカ-酸化鉄ナノ粒子の形態観察

作製したシリカ-酸化鉄ナノ粒子の粒子径、及びシリカ表面コーティングは透過型電子顕微鏡(TEM、Hitachi-H7500)にて観察を行った。

## 3. シリカ-酸化鉄ナノ粒子の造影能評価

作製したシリカ-酸化鉄ナノ粒子のMRI造影剤としての効果(緩和能)を60 MHz(1.5 T)緩和時間測定装置において測定し、緩和能( $r_2$ )を評価した。

## 4. シリカ-酸化鉄ナノ粒子のMRI画像

9.4 T 高磁場 MRI によってシリカ-酸化鉄ナノ粒子の T2 強調画像取得を行った。シリカ-酸化鉄ナノ粒子を含む水溶液を作製し、ファストスピンエコー法(TR/TE=2500/33 ms, FOV=4.0 cmx3.0 cm, matrix=256x192, thickness=2.0 mm)を用いて測定を行った。

## C:研究結果

Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> 酸化鉄の作製により、直径 6-8 nm の粒子を作製した(Figure 1(a))。オルトケイ酸テトラエチルにより表面コーティングした酸化鉄ナノ粒子は、酸化鉄コアに対して 5-8 nm のシリカ層で覆われた構造を示し、シリカ-酸化鉄ナノ粒子のサイズは 19-21 nm を示した (Figure 1(b))。

次に、MRI造影剤としての評価を行った。MRI造影剤は水中に存在する水プロトンの緩和時間を短縮することが知られ

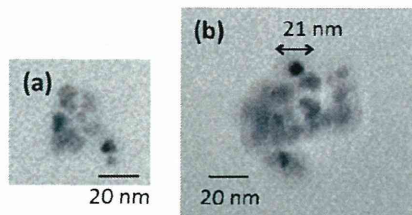


Figure 1. TEM images of (a) Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub> and (b) Si-Fe<sub>3</sub>O<sub>4</sub>.

ている。この緩和時間を短縮する能力は各濃度の水の緩和時間から緩和能( $r_2$ )という指標で与えられる。この緩和時間の短縮効果により、周囲の水環境との差が生まれ、画像のコントラストが形成される。 $r_2$ の測定には、濃度既知のシリカ-酸化鉄分散溶液を用いて、pH=7.4、及びpH=9.2において測定を行った。各グラフの傾きから  $r_2$  を求めた。

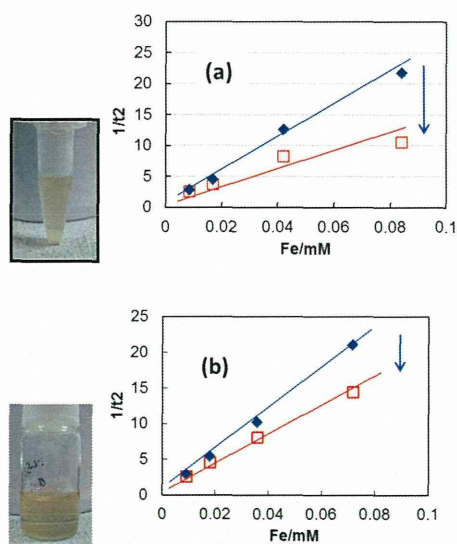
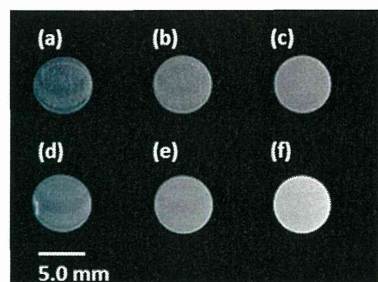


Figure 2.  $r_2$  measurements of (a) pH=7.4 in D-PBS(-) and (b) pH=9.2 in borate buffer.

その結果、Figure 2(a)に示すように緩和能  $r_2$  は  $254.2(\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ であった。一方、シリカ-酸化鉄溶液は、時間とともに緩和能が減少し、およそ 6 分後には  $106.2(\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ へと減少した(減少率

58%)。これは、シリカ-酸化鉄ナノ粒子が凝集を形成したためと考えられる。元の溶液は見かけ上は均一に溶けていることが確認されたが、ミクロな環境においては凝集が形成されており、さらなる凝集を誘導したことを示している。シリカ表面の表面電位をあげ静電反発をより高め、分散安定性を確保するために、溶液のpH=9.2として測定を行った。 $T_2$ の値は $289.2(\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ となり、さらに時間を追いながら測定を行うと、前述と同じ溶液調製後6分後においても、 $T_2$ の値は $186.1(\text{mM}^{-1}\text{s}^{-1})$ へと減少した(減少率36%)。このことは、シリカ層がコーティングされた酸化鉄ナノ粒子表面は水酸基で覆われているが、pKa10付近のシリカ水酸基表面をより親水化し、静電反発を誘導することで凝集抑制が働いたためと考えられる。

次に、9.4T高磁場MRIにおいて作製したシリカ-酸化鉄粒子の各濃度における $T_2$ 強調画像の取得を行った。シリカ-酸化鉄ナノ粒子を含む溶液は $T_2$ 強調画像において、 $0.5\mu\text{g Fe/mL}$ においても顕著に画像コントラストを高めることが確認された(Figure 3)。



**Figure 3.**  $T_2$ -weighted MRI images of Si- $\text{Fe}_3\text{O}_4$  nanoparticles at various concentrations (a) 10, (b) 4.0, (c) 2.0, (d) 1.0, (e) 0.5, and (g) 0  $\mu\text{g/mL}$ . Fast spin echo (TR/TE=2500/33, FOV=4.0x3.0,

matrix=256x192, thickness=2.0mm)

#### D:考察

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、5-8 nm 酸化鉄コアを有する19-21 nm 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5-60 nm 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。ナノサイズのシリカ粒子の場合は分散安定性に乏しく、容易に凝集する。しかしながら、凝集の結果得られる粒子サイズは数十 nm であり、見かけ上(肉眼)は沈殿を認めることができない。個々のシリカナノ粒子のサイズは規定することができるが、むしろ生体に曝露される際の挙動は凝集構造の動きが主であるとするほうが妥当と考えられる。大きさの異なるナノサイズのシリカ粒子はそれぞれ

れが有する表面エネルギーが異なるため分散度合が異なる。しかしながら、ナノサイズの粒子が生体に曝露された際の挙動は、ナノサイズの粒子が凝集して形成される数十 nm の大きさの挙動として共通に理解できることが示唆された。それを評価することが脳組織内の中枢神経系に与える影響を評価することにつながると考えられる。

#### E:結論

本研究において、脳移行性を可視化するためのプローブとしてシリカを表面に有する酸化鉄ナノ粒子を作製した。作製したシリカ-酸化鉄ナノ粒子は直径 19-21 nm の粒子であることを TEM 測定によって確認した。また、シリカ-酸化鉄ナノ粒子の MRI 造影能を評価し、MRI 画像取得を行った。MRI 造影能や TEM の評価からシリカ-酸化鉄ナノ粒子は凝集形成が観察され、この凝集形態が生体に曝露される可能性が示唆された。

#### F:健康危機情報

特になし。

#### G:研究発表

##### 4. 論文発表

なし

##### 5. 学会発表

(1)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MRI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

(2)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

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