

201236008B

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

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22年度～平成24年度 総合研究報告書

研究代表者

藤岡宏樹

平成25（2013）年3月

目次

I. 総合研究報告（総括）

- 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. 総合研究報告（分担）

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・・・ 19
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・脳スライスを用いた、ナノ粒子の神経への影響評価・・・ 27
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・・・ 39
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・・・ 47
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・・・ 52
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
6. 蛍光ナノ粒子の中枢神経系への取り込みとその影響・・・ 61
星野 昭芳 国立国際医療研究センター研究所・協力研究員

III. 研究成果の刊行に関する一覧表・・・ 67

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：叶谷 文秀 国立国際医療研究センター・
エイズ治療・研究開発センター・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：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
研究分担者：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：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・放射線生命科学研究部門・教授
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：佐藤 二美 東邦大学・医学部解剖学講座・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す。

現在までに本研究で明らかにしたことは、次の3点である。

① 3種類の細胞を使った血液脳関門モデルが、動物試験との整合性 (100 nm 以上・以下で透過性が異なる点、表面修飾に依存した透過性がある点) があり、薬剤の評価で使用される透過係数 Papp を用いて、定量的な評価が可能であることを示した。

② 細胞試験では、シリカ粒子の濃度と、神経シナプス数の減少、神経分化への影響について関連性を明らかにした。また、脳スライス培養法を使った試験では、次世代シーケンサ解析によって、アルツハイマー病や、若年性抑鬱の発症に関連する酵素 Bace1 の発現や、ALS 関連遺伝子、及び細胞死に関連した遺伝子の発現を検出した。

③ 動物個体を使った評価法では、100 nm 未満の粒子である量子ドットを用いて、異なる投与方法 (静脈、腹腔) で脳内への移行を調査した。静脈からの脳への移行は確認できなかったが、腹腔から脳内への移行を観察した。特に脳組織内の分布では、大脳皮質、視床、及び嗅球において、血管周囲だけでなく、脳実質組織へ移行することが示唆された。更に、脳内へのナノ粒子の侵入・蓄積をより簡便に評価するため、MRI を使った非侵襲リアルタイム解析を可能にするシリカ-酸化鉄ハイブリッドナノ粒子を作製することに成功した。今後、この粒子を用いることで、脳内への侵入・蓄積がより簡便に評価できるようになることが期待される。

Nanosafe 2012 会議では、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。本研究で構築した試験法を用いることで、ナノ粒子への曝露によって起き得る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、近年、大阪大学・堤康央教授、東京理科大学・武田健教授らによって、妊娠マウスへのナノ粒子の暴露によって、胎児の脳へ移行することが示されており、次世代への影響を考慮した場合、特に脳に対する安全性の評価や試験法の開発は急務である。

現状では、既に化粧品や食品など人体に直接接触する分野にもナノマテリアルは活用されている。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ると予想される。

そこで、本研究では、中枢神経に与える毒性学的影響を、簡便に評価できる手法の開発を行う(図1)。

まず、ナノ粒子の透過性を予測する血液脳関門モデルの検討を進め、これまでに報告されてきた動物試験との整合性について検討する。次に、透過が予測されるナノ粒子を用いて、細胞・組織を用いた安全性試験を行い、どのような影響が脳内で起き得るかを予測する。

更に、動物試験を用いて、細胞レベルでは明らかにできない、脳組織への蓄積部位について詳細に検討する。

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、起き得る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。

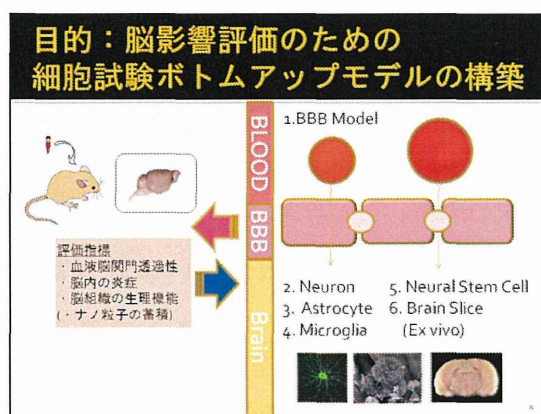


図1. ナノマテリアルが与える、脳への影響評価を行うための試験法の概要図

B:研究方法

1. 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

血管内皮細胞、ペリサイト、及びアストロサイトで構成された BBB モデルを用い、ナノ粒子透過試験を実施した。

ナノ粒子には蛍光粒子を用い、各サイズのシリカナノ粒子 (30nm, 100nm, 400nm, 1500nm)、及び表面電荷の異なるセレン化カドミウム量子ドット (大きさ約 30 nm、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)) を用いて、添加濃度 1 mg/mL・培養時間 15 分で、透過側培養液を回収し、蛍光強度から薬剤の

評価にも使われる透過係数 Papp を算出し、比較検討した。

2. 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・ラットアストロサイトを用いた細胞毒性の評価法の構築

ナノ材料が中枢細胞に与える毒性学的な影響を、ヒト神経幹細胞株、ラット胎児の初代培養大脳皮質細胞を用いて検証した。

シナプス形成については、微小管タンパク質の骨格を染色する MAP2 抗体を用いて細胞を観察した。

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 の酸化チタン粒子(1 µg/mL, 及び 100 µg/mL)を共培養し、遺伝子の変化を次世代シーケンサーにより解析した。

4. 動物個体での評価：量子ドットの中枢組織への侵入とその影響

マウスへの静脈内投与と腹腔内投与の2種類の投与方法を用いて、投与方法の違いによる脳組織内の分布、及びナノ粒子の脳内移行性の差異について検討した。

5. 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。

6. 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

本研究の目的と評価法を共有するため、国立国際医療研究センターの叶谷文秀研究員を中心として、国内及び海外の研究機関に向けて発信を行い、試験法のバリデーションに向けた協力を呼びかけた。

<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. 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

BBBモデルを用いて、粒子サイズの異なるシリカナノ粒子の透過係数 Papp を計測した。

粒径 30 nm のシリカ粒子では、BBB の透過性が示唆される透過係数が得られた (Papp = 4.17 x 10⁻⁶ cm/sec) (図 2)。この数値は、ナトリウム蛍光色素と同様の数値であり、動物試験においてわずかに透過するレベルであることが示唆される。

一方、100 nm 以上では、透過係数は 0.3 未満であり、既存の薬剤では、ほとんど透過性のないシクロスポリンやアルブミンと同程度であることが示唆された。

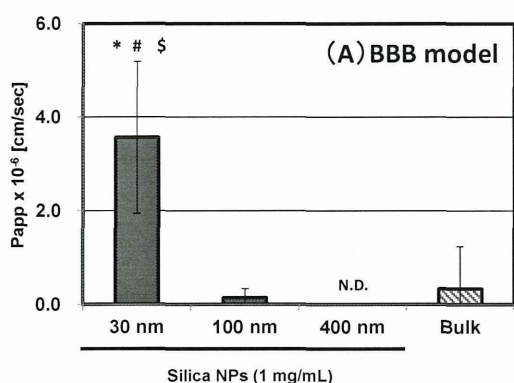


図 2. シリカ粒子のサイズに依存した BBB モデルの Papp 係数

透過係数 Papp は、本来、血液側の濃度に依存しない係数である。しかし、濃度の異なるシリカ粒子を用いた試験では、30 nm のシリカ粒子において Papp が濃度依存的に上昇することが示されており(図 3)、この結果は、シリカナノ粒子の透過性が、(1)受容体によるものである可能性、または、(2)細胞傷害性によるものである可能性を示唆している。

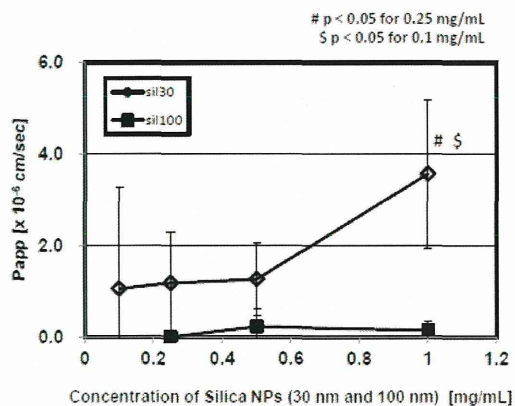


図 3. 血液側濃度に伴った、Papp 係数

の上昇

また、表面電荷の異なる量子ドット(約 30 nm)を用いた BBB 透過性試験では、正電荷であるアミン修飾ナノ粒子において Papp 係数が高く (7.82×10^{-6} cm/sec)、負電荷修飾や中性修飾の表面加工に比べて高い傾向を示した(図 4)。

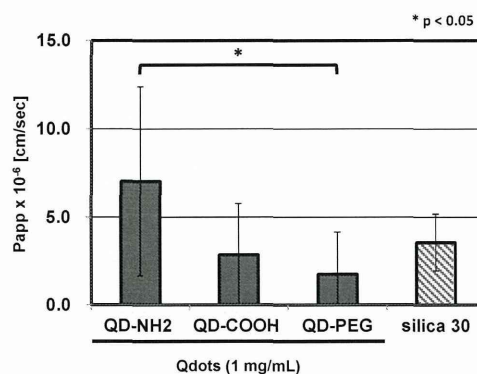


図 4. 表面修飾の違いによる量子ドットの Papp 係数の違いと、無修飾シリカ粒子との比較

2. 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・アストロサイトをを用いた細胞毒性の評価法の構築

BBB モデルから、脳内への透過性が示唆された 30 nm のシリカ粒子を用いて、ヒト神経幹細胞株、ラット胎児の初代培養大脳皮質細胞、及びラットアストロサイトを用いた安全性試験を行なった。

神経幹細胞株を使った毒性評価では、シリカや酸化チタン粒子の取込みによって、神経やアストロサイトなどの分化マーカーの発現に影響を与えることを示した。更に、30 nm の粒子のみ、神経細胞への分化に必須である HMGA1 遺伝子の発現が減少することを示した(図 5)。

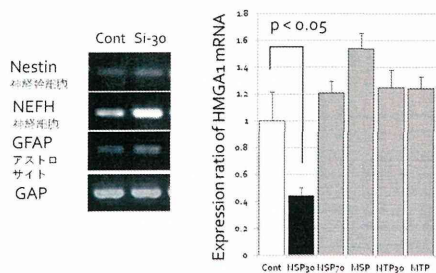


図 5. シリカ粒子(30 nm・100 µg/mL)が与えるヒト神経幹細胞への分化マーカーへの影響(左)と、神経の発現に必須である HMGA1 遺伝子の低下(右)。

更に、胎児の神経への影響を検討するため、ラット胎児の大脳皮質細胞を用いて、30 nm のシリカ粒子を 1 時間添加培養し観察した(図 6)。

微小管タンパク質骨格 (MAP2) の染色によって、神経細胞・シナプスを観察し (図 6)、高濃度のシリカ粒子の急性毒性によって神経細胞毒性、及びシナプス数の減少が示された。

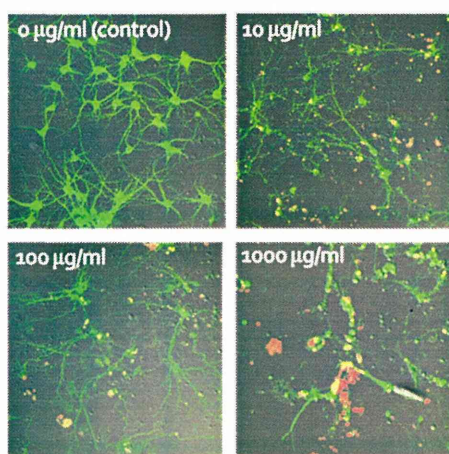


図 6. シリカ粒子(30 nm)が与えるラット胎児神経細胞、及びシナプスへの影響。

3. 脳スライス培養法を用いた評価法の構築

396,000 個の mRNA の解析を行った結果、低濃度・高濃度(1 µg/mL・100 µg/mL)の酸化チタン粒子を共培養することで共通して発現される 686 種類の遺伝子 (ALS 関連遺伝子、細胞死関連遺伝子など) を明らかにした。また、高濃度群では、アルツハイマー病や若年性の抑鬱と関連性のある酵素 Bace1 の発現が検出された。

4. 動物個体での評価：量子ドットの中枢神経系への取り込みとその影響

量子ドットを静脈内投与した場合には、その分布は表面加工により異なり、負電荷のカプトプリルで修飾した量子ドットは主として肺に集積したほか、脾臓や腎臓への集積が認められた。しかしながら、脳への移行は確認できなかった。

一方、腹腔から投与した粒子は、脳内に移行し、視床への集積が最も高く、次いで脳幹部、大脳皮質の順になっている。また、少量ながら海馬や小脳、嗅球内への分布も確認された。海馬や脳幹部においては血管辺縁部に集積していた。また、大脳皮質や視床、嗅球においては、主として脳の実質組織に集積することが明らかとなった。

5. 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。

6. 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 2010 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

本研究は、ナノマテリアルが与える脳への影響を、簡便に予測する方法の構築を目的としている。

BBBモデルのナノ粒子透過性について、粒子サイズ100nmと30nmの間に透過性のサイズ閾値があることが有意に示され、

また、表面修飾によって透過性に違いがあることが示された。これらの結果は動物試験の結果と整合性が高く、また、Papp 係数を導入することで定量的に比較することを可能にした。

更に、同モデルの結果から、ナノ粒子の脳内への透過性が、細胞傷害や受容体依存的な取込みであることが示唆されている。動物個体におけるナノ粒子の透過性機構は明らかになっていないため、本研究をもとに、現在、機構の解析を進めている。

細胞試験からは、ナノ粒子が与える神経幹細胞から神経への分化の影響、神経細胞・シナプスの減少が観察された。また、脳スライス培養試験からは、アルツハイマー病や若年性抑鬱性と関連性のある Bace1 酵素の発現が検出された。

観察された濃度は、10 µg/mL 以上と高濃度であるため、単回曝露における現実的な濃度とは乖離があるが、慢性曝露における脳内蓄積の可能性や、血液脳関門が脆弱な胎児・乳幼児、高齢の方の使用には注意を払った方がよい可能性がある。

現在までに、ナノマテリアルと、アルツハイマーや若年性抑鬱などの脳疾病との関連性について、個体レベルで明らかにした研究は報告されていないが、今後、動物試験による検討を進める必要があるだろう。

E:結論

以上のように、本研究で用いた血液脳関門モデルによって、ナノ粒子の透過性が予測できる可能性があること、また、細胞・組織による試験から、一部のナノ粒

子に高濃度で暴露された場合、神経細胞数の減少、アルツハイマー病や若年性抑鬱への影響が懸念されることを示した。

今後、多くの粒子を用いたバリデーションによる精度の向上、並びに低濃度・長期暴露の影響を評価する方法の検討が必要であるが、本研究で構築した試験法を活用し改良を進めることで、起き得る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したい。

F:健康危機情報

現在までに、未確定である。

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) 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.
- (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) Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K. Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications *Arch. Toxicol.* 85(7):721, 2011.
- (5) Yamamoto K., The Exposure of nanoparticles for Human Body. *J. Soc. Powder Technol. Jpn.* 48(1):34-38, 2011.
- (6) K Fujoka, 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.
- (7) Kato S, Itoh K, Yaoi T, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Kanamura N, Hoshino A, Nanabe N, Yamamoto K, Fushiki S., Organ distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with special reference to area-specific distribution in the brain. *Nanotechnology*, 21(33):335103, 2010.
- (8) 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) 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
- (10) 藤岡 宏樹、花田 三四郎、叶谷 文秀、井上 由理子、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(口演)、札幌、2012 年 3 月
- (11) Kouki Fujioka, Sanshiro Hanada, Keisuke Sato, Kenji Hirakuri, Amane Shiohara, Richard D. Tilley, Yoshinobu Manome, Fumihide

Kanaya, Yuriko Inoue, and Kenji Yamamoto, Silicon Nanocrystal' Potential Effective Mechanisms on Cells, International Conference on Biological Responses to Nanoscale Particles (Poster), Essen, Germany, Sep. 2012

- (12) Hanada S, Miyaoi K, Hoshino A, Yamamoto K. Size and structure-dependent toxicity of silica particules, Biomedical Optics Meeting, SPIE Photonics West Conference 2011 (Oral), San Francisco, CA, USA., Jan. 2011
- (13) Fushiki S, Itoh K, Kato S, Yaoi T, Umekage M, Tozawa T, Yoshikawa Y, Yasui H, Hoshino A, Manabe N, Yamamoto K. Distribution of quantum dots after intraperitoneal administration, with reference to area-specific distribution in the brain, Bios meeting, SPIE Photonic West. (Invited Paper), San Francisco, CA, USA., Jan. 2011.
- (14) Fujioka K, Hanada S, Hoshino A,

Hirakuri K, Sato K, Shiohara A, Tilley RD, Manome Y, Kanaya F. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Nanosafe 2010 (Oral), Grenoble, France, Nov. 2010.

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

Ⅱ. 分担研究総合報告

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）総合研究報告書

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)

分担研究報告

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 東京慈恵医科大・分子生物学研究部・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：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 東京慈恵医科大・分子生物学研究部・教授

研究要旨

我々は、ナノ粒子のサイズが、生体にどのような特異的な相互作用を持つかについて興味を持ち、従来研究を行なっており、本研究課題では、細胞培養ベースのモデルを用いてナノ粒子の安全性評価を実施することを目的とし、各種サイズのナノ粒子、表面特性、構造物性などの視点からナノ粒子の生物応答を評価した。

初年度は、マウス由来の不活化肺胞マクロファージ細胞株を用い、粒子サイズおよび結晶構造の異なるナノおよびマイクロ粒子（主にシリカ）において、肺胞マクロファージがどのような生体応答をするかについて検討を行った。結果、細胞毒性は、粒子の表面積に依存した結果が得られたのに対し、慢性呼吸器疾患に関連するサイトカインは、粒子サイズよりも粒子の結晶状態に関係することが示唆された。

2年次および最終年次は、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。結果、30 nm と 100 nm のシリカナノ粒子の間に BBB の透過性のしきい値があることが確認された。このことは、蛍光顕微鏡下で BBB 細胞層にシリカナノ粒子が蓄積している観察結果からも確認され、過去の動物試験の結果とも相関した。濃度依存性および評価時間の違いによる評価から、

高濃度負荷が、局所的な細胞障害による BBB の破綻（細胞間透過性の亢進や細胞内取込みによる）を生じ、BBB を通過することが示唆された。

しかしながら、現状では、本モデルでナノ粒子の脳内移行性を評価するためには改善が必要である。例えば、表面の電荷が異なる量子ドット（アミノ基、カルボキシル基、PEG）について BBB 通過試験を実施したところ、マウス動物試験と異なる結果が得られた。今後改善が必要であろう。

本研究では、ナノ粒子サイズ依存的な特性を（１）肺胞マクロファージの生物応答と（２）BBB モデルを用いた脳内移行性により評価した。どちらの実験系においても、より低濃度や長期暴露を予測した評価が必要と考えられるが、それは将来の研究課題としたい。

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、生体内における特異的な生物応答や臓器選択的な蓄積などが危惧されている。インビボ試験については、近年、マウス動物モデルにおけるナノ粒子の脳内移行性 (Yamashita et al., Nature Nanotech 2011, Nabeshi et al., Biomaterials 2011, Kato et al., Nanotechnology 2009) について、すでに本邦からも報告がなされている。ナノ粒子が脳内にどのような影響をもたらすかに関しては現時点では不明ではあるが、これらの結果は、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。

動物試験によるナノ粒子試験法は、様々な報告から (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、など予測が不能な点が多い点が課題である。一方で細胞培養ベースのバイオアッセイ法は、生体を簡便な指標で表すモデルとして有用である。

我々は、ナノ粒子の粒子サイズが、生体にどのような特異的な相互作用を持つかについて興味を持ち、従来研究を行なっていた。本研究課題においてもナノ粒子のサイズ依存的な生体応答や組織移行性、疾患との関連性などを評価する一端を担うことが出来ればという信念のもと、「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」の分担研究者として参加させていただくに至った。

具体的には、初年度に (1) マウス由

来肺胞マクロファージ細胞株によるシリカナノ粒子のサイズおよび構造物性依存的な生物応答評価、2年次、最終年次にすでに薬効評価試験に採用されている細胞培養ベースの BBB 再構築モデルを活用し、(2) 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について検討を行った。

B:研究方法

(1) 肺胞マクロファージ細胞株を用いたシリカナノ粒子のサイズおよび構造物性依存的な生物応答評価

シリカナノ粒子およびマイクロ粒子 12-1400 nm について、その粒子サイズおよび結晶構造 (アモルファスおよび結晶質シリカ) の違いにおける肺胞マクロファージの生物応答を評価した。評価指標としては、WST-8 アッセイによる細胞生存率評価、培養液中の炎症性ケモカイン MIP-2 (ヒトにおける IL8 のホモログ)、肺線維化マーカーである TGF- β (Transforming growth factor- β) の ELISA による評価を行った。これらの結果を細胞数あたり、粒子の表面積基準などにより評価し、統一的な比較を行った。

(2) 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

薬剤の脳内移行性試験に用いられ、動物試験との相関性を有するモデルである、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。本モデルは、ラット脳微小血管内皮細胞とペリサイトの二層細胞層の培養系により構成されている。ナノ粒子として 30-1200 nm のローダミン B 誘導体蛍光色素含有シリカナノ粒子（以下、蛍光シリカ）および電荷の異なった表面特性を有する量子ドット（粒子径：約 25 nm）を用い、細胞透過係数は、Papp [cm/sec]により評価した。評価項目は、粒子サイズの違い、濃度依存性、アッセイ時間依存性、表面特性依存性などであった。

（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、動物実験委員会、バイオセーフティ委員会などに申請している。本研究は、医療上の倫理的配慮は特に必要としていない。

C:研究結果

（1）肺胞マクロファージ細胞株を用いたシリカナノ粒子のサイズおよび構造物性依存的な生物応答評価

細胞生存率は、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基準に換算すると、その毒性は表面積に依存した毒性であった。炎症性ケモカイン MIP-2 はヒト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、結晶質シリカのみに分泌が確認され、炎症とは異なるフェーズによる慢性疾患因子としての発現の可能性が示唆された。

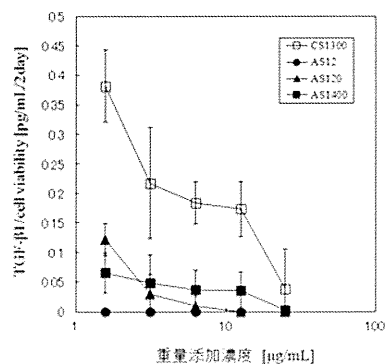


図1 シリカナノ粒子による TGF-β 産生

（2）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

シリカナノ粒子の BBB 透過性試験において、30 nm シリカナノ粒子において Papp 値が 3.56×10^6 [cm/sec] と BBB モデルを通過していることが確認された。一方、100 nm またはそれ以上の粒子については BBB モデルの通過は僅かであった。蛍光顕微鏡観察下で、BBB モデルの細胞層を確認すると、30 nm において、上層の内皮細胞と下層のペリサイト両方に赤色蛍光が確認されたのに対し、100 nm 以上では、下層への蓄積は僅かであった。従って、BBB の通過と細胞層への蓄積に関連性があることがわかった。

濃度依存的な評価においては、1 mg/mL において有意に Papp が上昇していた。また、時間依存性については、Papp に変化が生じなかったことから、高濃度負荷によって生じた BBB の破綻による受動的な拡散がナノ粒子の移行性の原因ではないかと考えられる。

表面電荷の異なる量子ドットの比較では、正電荷のアミン修飾量子ドットが中性 PEG 修飾量子ドットと比較して有意に BBB モデルを通過した。

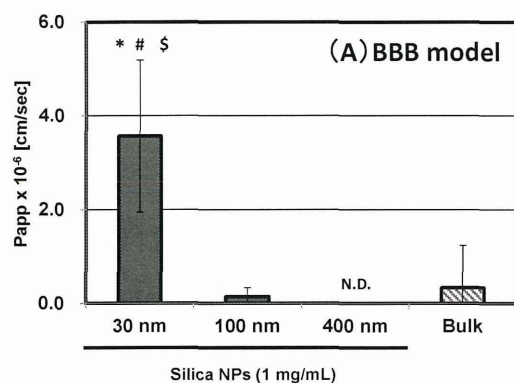


図2 蛍光シリカ粒子の (A) BBB モデル通過性

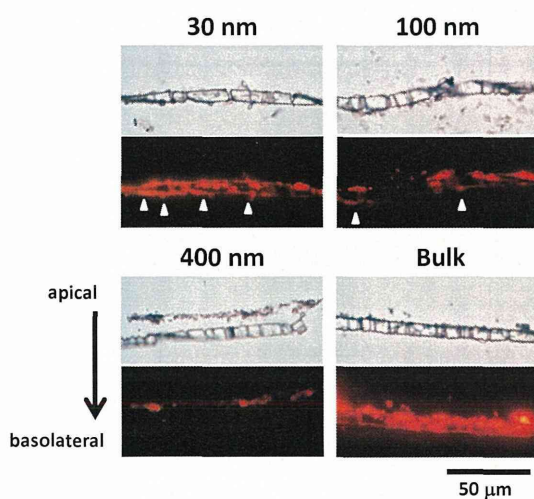


図3 蛍光シリカの BBB 細胞層蓄積

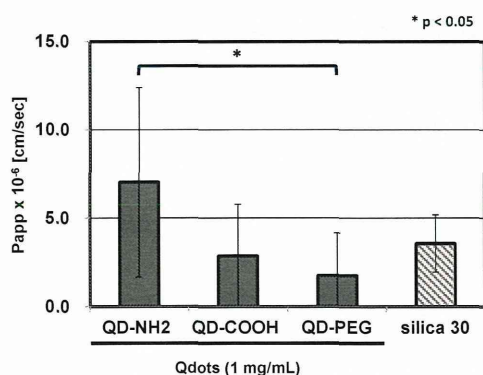


図4 BBB 通過試験の表面修飾依存性

D:考察

すでに、数多くの研究においても示唆されている通り、ナノ粒子は、サイズ、物性、表面特性により生物応答が顕著に異なる。本研究においても、肺胞マクロファージ細胞株および細胞培養ベース BBB 再構成モデルから、ナノ粒子特異的な生物応答が確認された。

肺胞マクロファージを用いたシリカナノ粒子の安全性試験からは、粒子のサイズは急性疾患に関連し、粒子の物性が慢性疾患に関連することが示され、シリカナノ粒子がそのイニシエーションになりうることを示唆された。特に低濃度域での応答性を理解することが今後意義深いと考えられる。

BBB 再構成モデルを用いた脳内通過性試験については、粒子サイズ 30 nm と 100 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。この結果は、動物実験における、70 nm シリカナノ粒子の脳内移行性に関する報告と一致しており、本 BBB 再構成モデルは、ナノ粒子の脳内移行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。

上記の細胞培養モデルは、生体の模倣という観点からは、数多くの限界があり、それはバイオアッセイの現状での課題そのものでもある。例えば、表面電荷が異なる量子ドットを用いた BBB 透過性試験の結果において、カチオン性のナノ粒子は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