

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が、この結果は、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る (Praetner et al., Biomaterials 2010)。

つまり、生体を模倣するような培養系(血清添加など)の改善が必要であることが示唆される。このような視点は近年プロテインコロナなど粒子と組織のインタラクションを緩和するメカニズムとして指摘されているが、ナノ粒子表面に付着した血清タンパク質が臓器に対して特異的な相互作用を生じ異なった生物応答を生じる可能性もあり、今後の検討課題として興味深い。

また、本研究で用いたナノ粒子の添加濃度域は、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高い濃度であると考えねばなるまい。(1) ICP-MSなどを用いたナノ粒子の低濃度域での検出法、ナノ粒子のリスクは急性疾患よりも慢性疾患に視点を置くべきであろうから、(2) 慢性疾患を評価するような鋭敏なマーカーの探索などが今後必要となってくるであろう。

粒子取り込みメカニズムの評価も今後重要な視点である。本試験では、肺胞マクロファージの食作用による生物応答の評価と血管内皮細胞などによる非特異的な取り込みメカニズム両面から検討を行う必要があるが、それぞれの詳細な検討には至らなかった。

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メカニズムの解析が必要であろう。

## E:結論

シリカナノ粒子を中心として、細胞培養ベースの安全性評価を実施した。肺胞マクロファージについては、表面積依存的な細胞死と炎症、構造物性に依存した慢性疾患マーカーの発現などが確認された。BBB 再構成モデルを用いた脳内移行性試験については、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。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。

細胞培養ベースのモデルは、生体を模倣する観点において改善の余地がある。また、今後急性応答だけではなく、慢性疾患を予測するマーカーの探索や試験法の開発にシフトしていく必要があり、それは必然的な検討課題である。

## F:健康危機情報

なし

## G:研究発表

### 1. 論文発表

1. 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
2. Hoshino A, Hanada S, Yamamoto K., Toxicity of nanocrystal quantum dots: The relevance of surface modifications. *Arch. Toxicol.* 2011 Jul; 85(7) : 707-20.
  3. 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. *J Phys: Conf Ser* 2011, 304, 012042
  4. 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
  5. 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]
  6. 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
  7. 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
  8. 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

9. 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. Size- and structure-dependent toxicity of silica particulates.

○Sanshiro Hanada, K. Miyaoi, A. Hoshino, K. Yamamoto. Biomedical Optics meeting, SPIE Photonics West Conference 2011 San Francisco, CA, USA.

2. 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

3. 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

4. Highly concentrated silica nanoparticles affect the activities of neural stem cell line. Kouki Fujioka, S. Hanada, Y. Inoue, F. Kanaya, K. Shiraiishi, Y. Manome (The Jikei University School of Medicine, Japan), NanoSafe 2012, Grenoble, France

5. Toxicological influence of giving the silica nanoparticles on cultured central nerves cells. Yuriko Inoue, K. Fujioka, S. Hanada, F. Kanaya, K. Shiraiishi, 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）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)

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：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：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。

本分担研究では、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。また、神経幹細胞株を使った毒性評価法では、ミトコンドリア活性を指標にした細胞内代謝測定の結果と、顕微鏡観察像から得られた細胞傷害性の結果に解離が見られており、代謝測定だけでなく、顕微鏡による観察や細胞膜透過性なども、評価に加える必要があると考えられる。

本研究結果からは、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に影響を与える可能性が示唆されており、今後は、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。特に脳への評価については、ナノ粒子が脳内に侵入することは明らかになっているものの、神経に与える毒性学的影響は研究レベルにおいても、詳細が不明である。

そこで、我々は中枢神経に与える毒性学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。

更に、神経毒性に関する情報をより簡便なシステムで得ることができる評価法の構築を目指し、神経幹細胞株を用いた評価法を検討した。

本分担研究を進めることで、まだ明らかになっていない動物で起きうる神経毒性を予測し、毒性の閾値や毒性機構について明らかにすることが目的である。

## 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  $\mu\text{m}$  の厚さでスライスを行った。

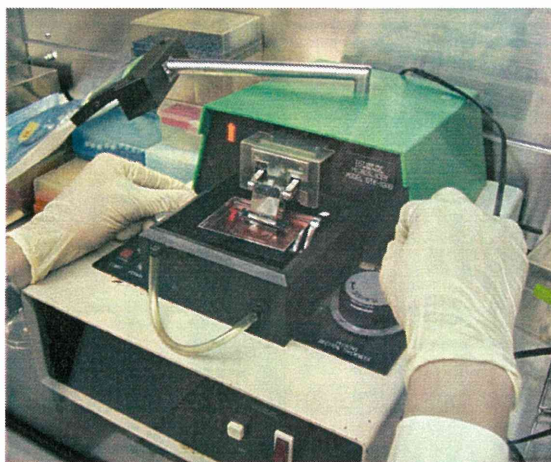


図1. 脳スライス作製時の様子。採取した脳を、中央の試料台に接着剤で固定後、スライス培養液に浸した状態で薄切する。試料台の周りには冷水を入れている。

#### (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  $\mu\text{m}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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; 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。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  $\mu\text{L}$  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。

#### (5) サイトカインの測定

HumanCytokine/Chemokine 96-Well Plate Assay (Cat. No. MPXHCYTO 60KPMX42) (MERCK MILLIPORE)のプレートを用いて、Luminex® 200TM System (Luminex)の装置でそくていした。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-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-1 $\gamma$ , 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-1 $\alpha$ , MIP-1 $\beta$ , PDGF-AA, PDGF-AB/BB, RANTES, sCD40L, sIL-2Ra, TGF $\alpha$ , TNF $\alpha$ , TNF $\beta$ , 及びVEGF

#### (6) 核・ミトコンドリアの観察、及び活性酸素種の検出

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。

## (7) 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。

### <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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )共培養組織からは 6588 個、高濃度(100  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )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。

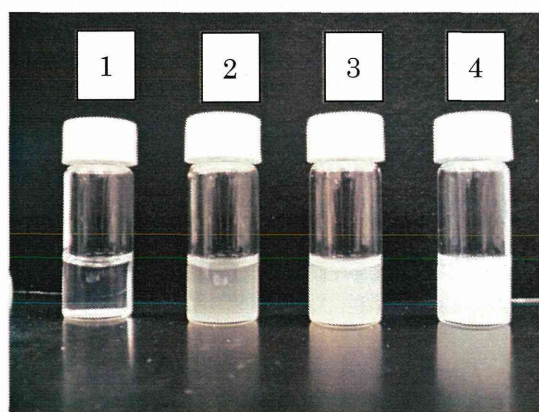


図 2. 本研究で用いた無蛍光シリカナノ粒子 70 nm 【1】、酸化チタンナノ粒子 80 nm 【3】、及び同種素材のマイクロ粒子の分散像 (シリカ 325 mesh 【2】、酸化チタン 325 mesh 【4】。)



## (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。

## (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)。

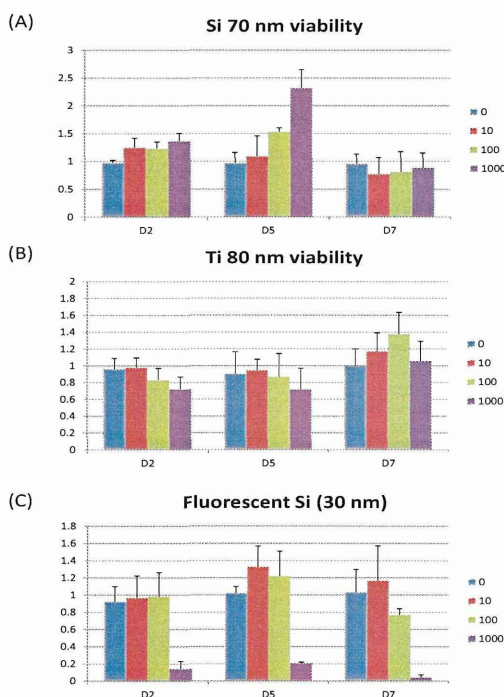


図3. ナノ粒子共培養時におけるミトコンドリア活性の経時変化。無蛍光シリカナノ粒子 70 nm (A)、酸化チタンナノ粒子 80 nm (B)、及び蛍光シリカナノ粒子 (C) を 10, 100, 及び 1000  $\mu\text{g/mL}$  で 2, 5, 及び 7 日間共培養した。

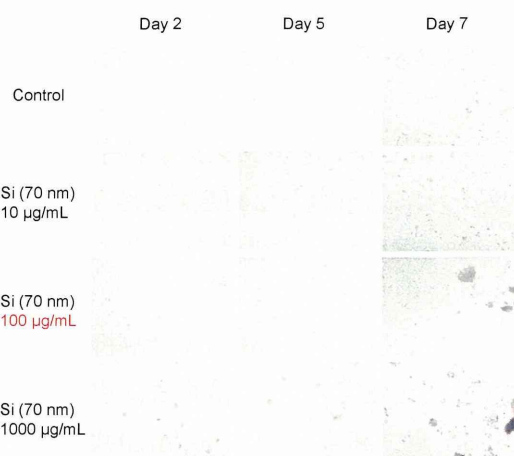


図4. 無蛍光シリカナノ粒子共培養時における細胞像の経時変化。

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、及び 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  において、7 日目に細胞凝集塊が顕著に見られた。特に、1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で観察を行った。共培養 2 日目から、100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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)。

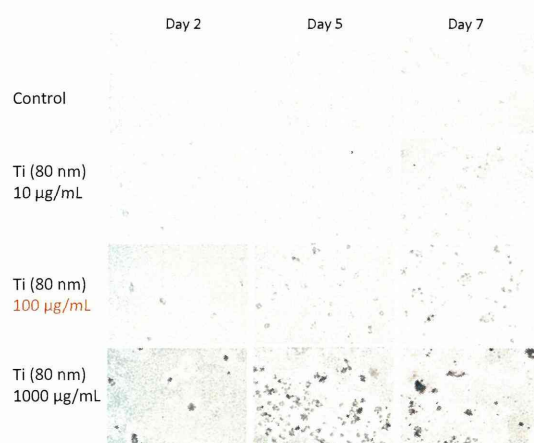


図5. 酸化チタンナノ粒子共培養時における細胞像の経時変化。



図6. 1000  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の蛍光シリカナノ粒子を 2 日間共培養した細胞像。

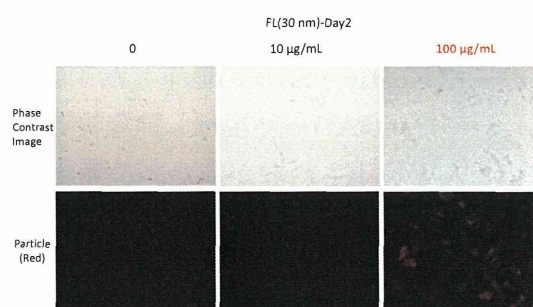


図7. 各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 2 日間共培養した細胞像。

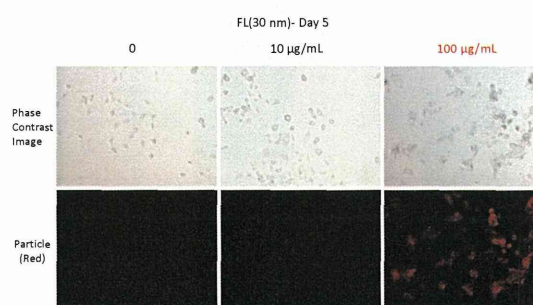


図8. 各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 5 日間共培養した細胞像。

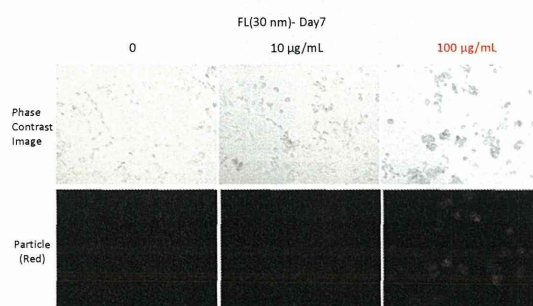


図9. 各濃度の蛍光シリカナノ粒子を 7 日間共培養した細胞像。

#### (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 1 0)。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 1 1)。

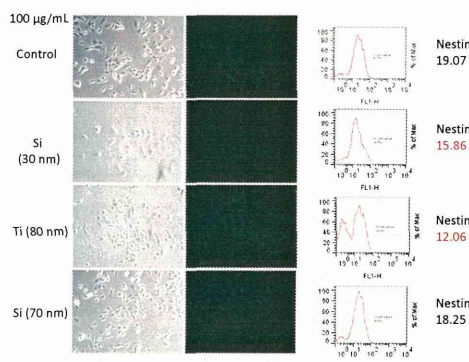


図 1 0. 各ナノ粒子 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  共培養 2 日目における神経幹細胞の Nestin 染色。

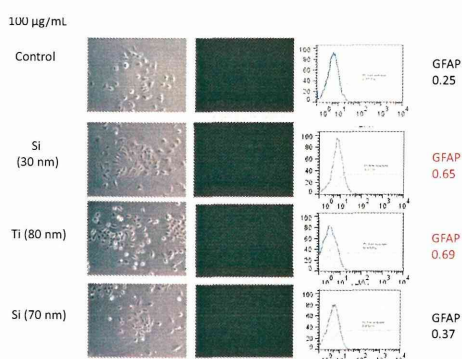


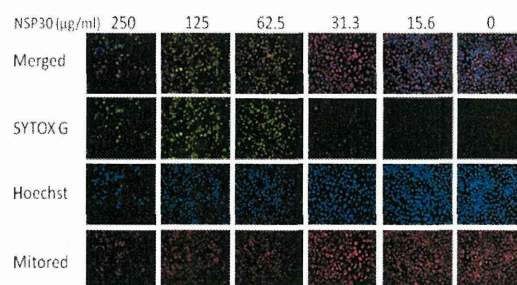
図 1 1. 各ナノ粒子 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  共培養 2 日目における神経幹細胞の GFAP 染色。

### (5) 神経幹細胞株の核・ミトコンドリアへの影響

他の粒子とは異なり、30 nm シリカ粒子ではミトコンドリア活性の低下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 1 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)



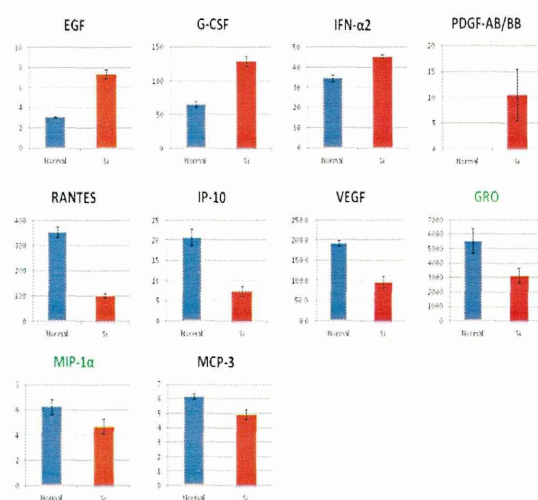
染色に用いた SYTOX Green (SG) は核染色試薬である。細胞膜透過性がないため、SG 染色像は細胞膜透過性が上昇していることを示す。31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上で透過性が向上し、125  $\mu\text{g}/\text{mL}$  以上では、大部分の細胞が SG で染色される。

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  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の濃度で濃度依存的に下降する傾向がみられる。

31.3  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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サイトカイン変化を検証した。始めに、hNSC と 100  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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 13 に示す。EGF, G-CSF,  $\text{INF } \alpha 2$ , 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 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。

図 13. 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)



## 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 などで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、本研究から、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。

分化に影響を与えるサイトカインの発現変化からは、100 µg/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-1α、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-α2 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。

30 nm のシリカ粒子は、研究分担者・花田らの研究により、脳内への移行が予測されている。本研究結果から得られたシリカ粒子が神経幹細胞に影響を与える濃度は、動物への単回曝露試験を考慮した場合には高濃度であるが、慢性的な曝露や血液脳関門が脆弱な胎児・乳幼児・高齢者においては注意する必要があるだろう。

## 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、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

##### 4. 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, 2012

(2) Fujioka 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

- (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。
- (5) 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（口演）、札幌、2012 年 3 月。

##### 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

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)

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  
研究協力者：佐藤 二美 東邦大学・医学部解剖学講座 教授

## 研究要旨

本研究は、人間への影響が詳しくわかっていない、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法の開発を行うものである。本分担研究では、ラット大脳皮質細胞を用いて、「細胞を使った評価法」を開発することを目的とした。

ナノテクノロジーは、急速に発展しており、新しい人工的なナノ粒子が増加している。しかしながら、人類の健康におけるこれらの粒子の影響は知られていない。ナノ粒子のサイズとその粒子の表面特性によって、ナノ粒子は人類の健康に影響を与える可能性がある。最近の研究では、ナノ粒子が脳内に侵入することが報告されており、中枢神経系におけるナノ粒子の影響を理解する事は重要である。

本研究では、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を用いて、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

脳内にナノ粒子が侵入するという研究結果は多数報告されており、神経活動に与える影響を早急に調査する必要がある。さらに、大阪大学・堤教授らの報告では、妊娠マウスにナノ粒子を投与した際に、胎仔の脳に到達することも報告されている。

そこで本研究では、ラット胎仔大脳皮質細胞を用いて、胎児の脳に対する影響を評価する試験法の開発に主題をおいて研究を行った。

従来法では、実験動物にナノ粒子を投与するなどを行って、ナノ粒子の影響を直接見る事が必要になる。

しかしながら、

1. 試験をできる施設が限られてしまう。
2. 中枢神経レベルで何が起きているか報告が少ない。
3. 何を解析すればよいのが具体的にしぼり込む必要がある。

という問題点があり、動物試験で直接脳機能への影響を調査することは、現時点では多くの困難が伴う。

以上の点からラットの胎児の大脳皮質初代培養細胞を用いて、簡便な試験法を開発することを目的とした。

## B:研究方法

ナノマテリアルの中枢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（I

nvitrogen)、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, リカ（12 nm）は、Micromod Partikeltechnologie GmbH, Germany から購入した。

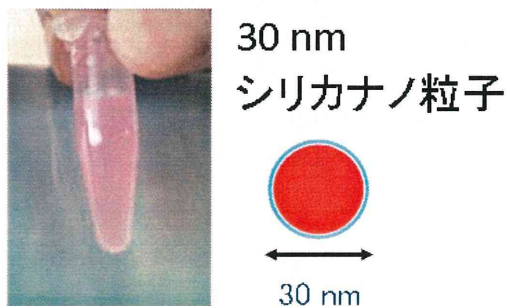
上記 1, 2 のシリカを濃度:0, 1 mg/ml, 0.01 mg/ml, 0.001 mg/ml の濃度で1時間培養を行った。

### 細胞の観察

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



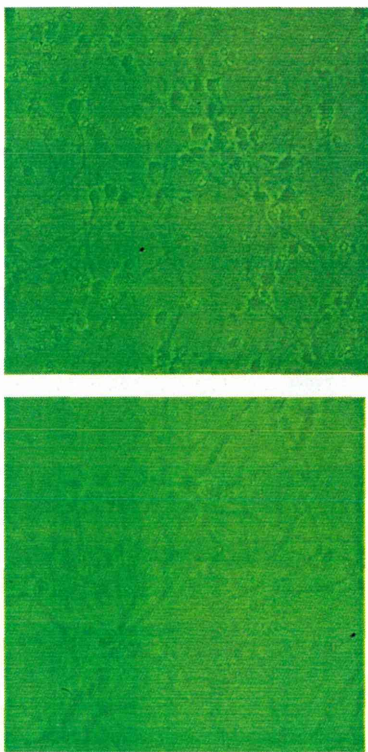
### 細胞障害性試験

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 LDH の測定を行った。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: 研究結果

まず始めに大脳皮質初代培養細胞における経時変化を図 2 に示した。

図 2. DIV7(上)と DIV21(下)における細胞の観察像

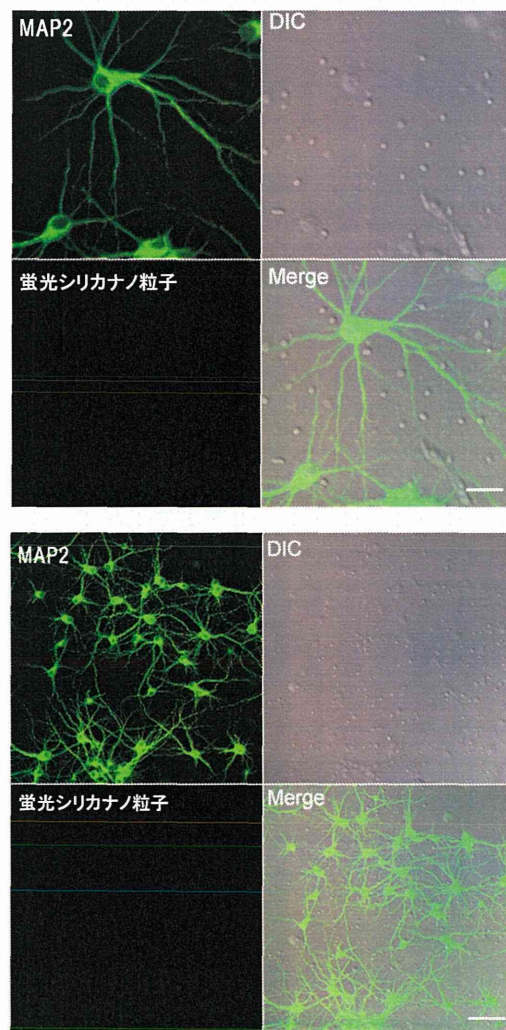


DIV21 では、DIV7 に比べて樹状突起が、

太く神経ネットワークを形成していることがわかる。この結果を踏まえ、本検討では、DIV21 の細胞を用いることにした。

次に、シリカ粒子の添加培養試験を行った。

図 3. シリカ粒子が無い状態の神経細胞の観察像



#### 図 4. シリカ粒子の添加培養

蛍光ナノ粒子（ローダミン蛍光ナノ粒子）を各濃度で添加した後、1 時間後に二重染色を行った。×10 で撮影

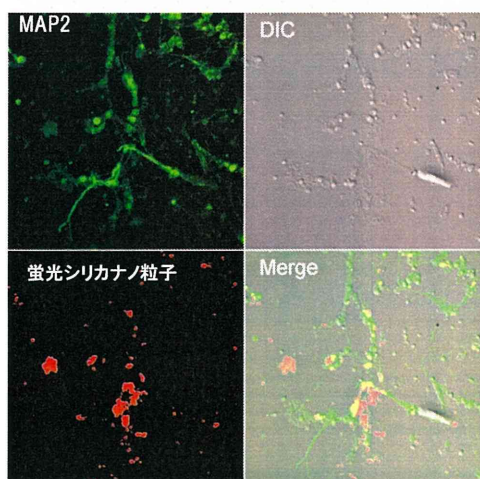
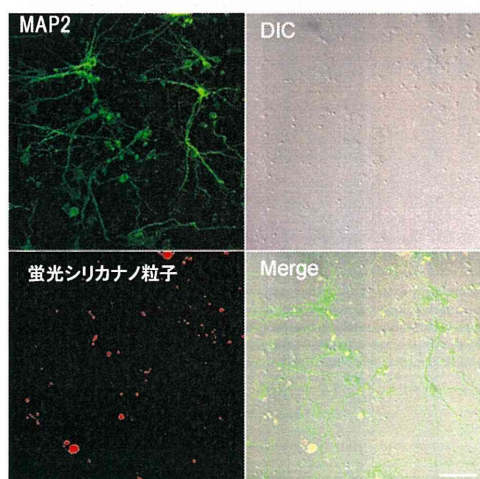
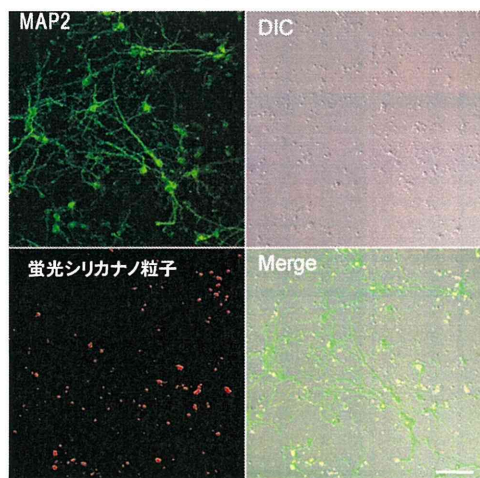
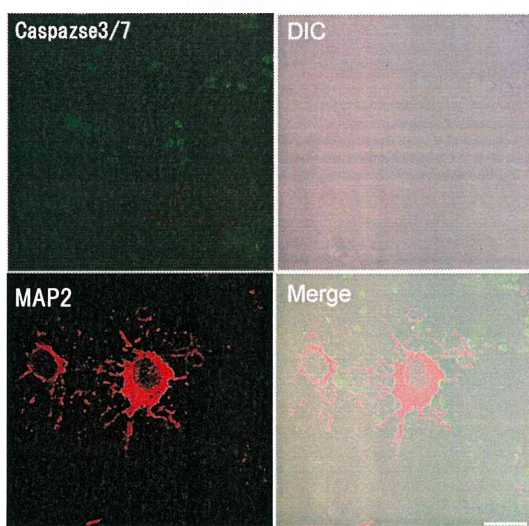


図 3, 図 4 の結果から、シリカ粒子の添加培養によって、神経細胞で染色された MAP2 の染色像が少なくなり神経細胞への毒性影響が示唆される。

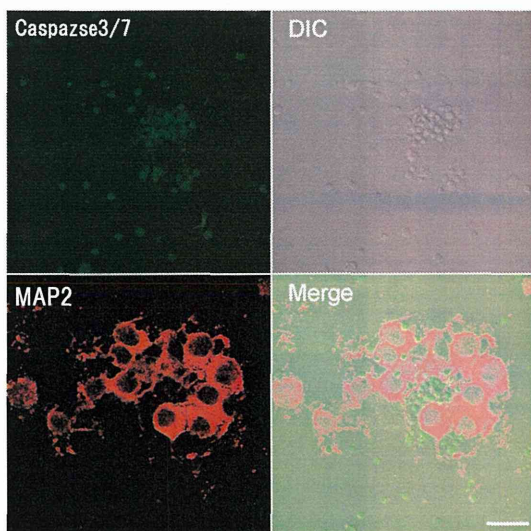
次に、毒性機構を検討するため、アポトーシスのカスケードである Caspase3/7 を用いて死細胞や死に近い細胞をラベルした(図 5-7)。また、本検討では、無蛍光シリカ (12nm) を神経細胞に添加培養した。カスパーゼ (Caspase) とは、細胞にアポトーシスを起こさせるシグナル伝達経路を構成する、一群のシステインプロテアーゼである。

図 5 : シリカナノ粒子 12 nm 0.01 mg/ml の濃度で 1 時間添加



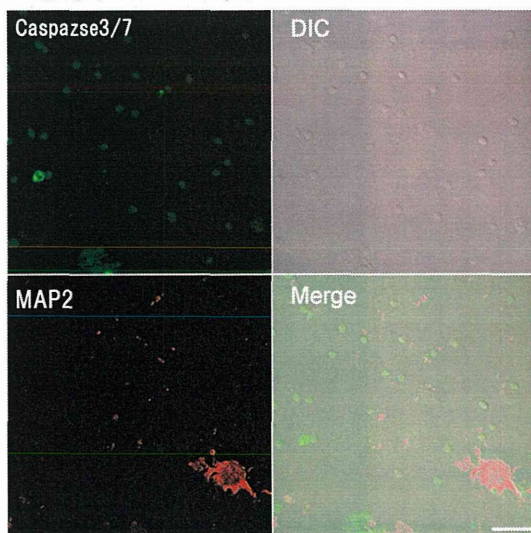
MAP2 の染色像から細胞状態が悪く、樹状突起が切れてなくなり、細胞体のみが残っている。Caspase の染色が見られる (図 5)。

図 6. 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(図 6)。また Caspase の染色も多く見られる

図 7. 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 による染色像が多く見られる(図 7)。

図 8. DIV21 (Days in Vitro) シリカ曝露における MAP2 の観察

