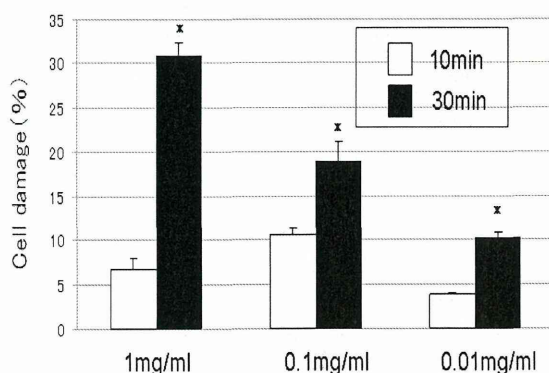


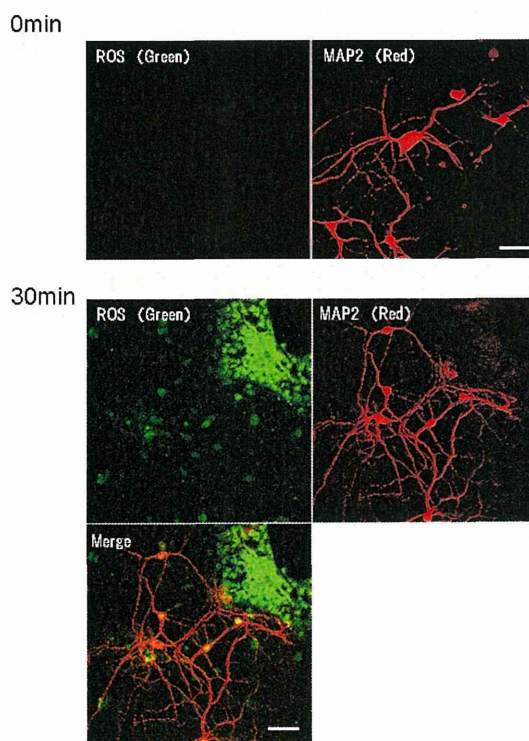
シリカナノ粒子の濃度が増加するに従って、神経細胞が消滅するのが観察される。神経細胞の MAP2 染色とシリカ粒子がほとんど共局在していない(図 8)。また、シリカナノ粒子は、直接細胞に接した像が観察されなかった。

図 9. 各時間における神経細胞への損傷率(LDH 試験)



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



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10)。

D:考察

ローダミン含有粒子サイズ30nmシリカ、蛍光色素を持たない12nm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大脳皮質は、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大脳皮質の初代培養細胞は、グリア細胞も多い事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）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)

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(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も、脳組織内の変化を知ることでできる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(Fe_3O_4)を生成させ、洗浄により酸化鉄

(Fe₃O₄)ナノ粒子を作製した。

作製した酸化鉄(Fe₃O₄)に対して、テトラエトキシシラン(Si(OC₂H₅)₄)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

Fe₃O₄ 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

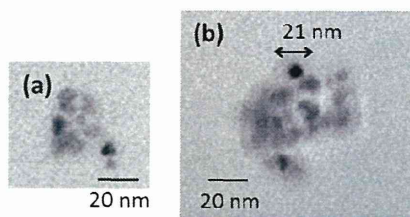


Figure 1. TEM images of (a) Fe₃O₄ and (b) Si-Fe₃O₄.

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。

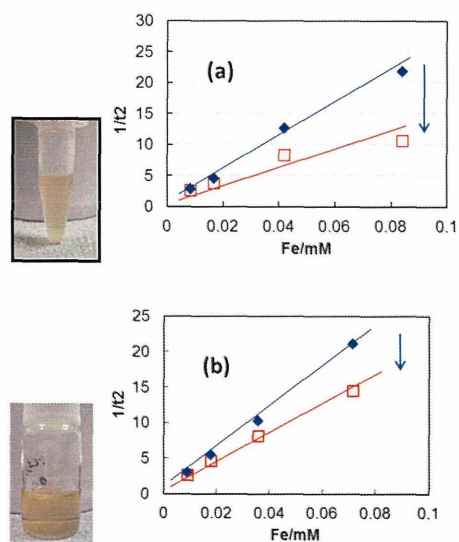


Figure 2. r_2 measurements of (a) pH=7.4 in D-PBS(-) and (b) pH=9.2 in borate buffer.

その結果、Figure 2(a)に示すように緩和能 r_2 は 254.2(mM⁻¹s⁻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(mM⁻¹s⁻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。 r_2 の値は289.2(mM \cdot s $^{-1}$)となり、さらに時間を追いつながり測定を行うと、前述と同じ溶液調製後6分後においても、 r_2 の値は186.1(mM \cdot 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T₂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T₂強調画像において、0.5 μ 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)。

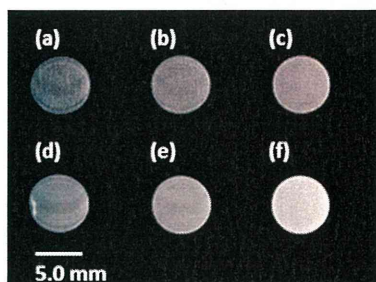


Figure 3. T₂-weighted MRI images of Si-Fe₃O₄ nanoparticles at various concentrations (a) 10, (b) 4.0, (c) 2.0, (d) 1.0, (e) 0.5, and (g) 0 μ g/mL. Fast spin echo (TR/TE=2500/33, FOV=4.0x3.0,

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

5. 論文発表

なし

6. 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

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)

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
Evaluating novel testing methods by facilitating international guidelines

分担研究者

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
公益法人日本エイズ予防財団・リサーチレジデント
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：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・医学部解剖学生体構造学分野・助教
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

表面特性やサイズ等、ナノ粒子特有の動態による膜透過性を評価する上で、*in vitro* の系と動物試験の間で齟齬のあるフラーレン毒性比較結果が報告されている (Says. Nano Lett. 2007)。本研究により分担研究者は、Says の指導を仰ぎに NanoOEH 2011 に行き、いかに「毒性の可能性」を比較評価し、効果的に情報発信を行えるか、国際コミュニケーション上の可能性・リスクを考察した。それをふまえ、脳内への移行性が指摘されているナノ粒子について、本研究班が検証してきたボトムアップモデルを、いかにコミュニケーションすれば国際的働きかけにとって有効か検討した。

本研究班では、動物試験との一致性、定量性、簡便性があり、利用を検討する評価モデルとして、血液脳関門（以下、BBB）モデル、神経細胞培養系（ヒト神経幹細胞およびラット大脳皮質初代培養細胞）、脳スライス組織培養系による 3 種類のボトムアップモデルを検証してきた。ナノ粒子の安全製造・利用ネットワークである Nanosafe において、この新規試験法の有効性に関して、国際ネットワーク指標作りの現場で働きかけを行った。

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 の指標作り (Michael Riediker 代表)、および The International Team in NanosafeTy の基準策定 (TITNT, Claude Emond 代表) に役立てられる可能性が得られた。

情報発信の早い段階で国際指標評価ネットワークとの持続的な連携作りをしたことが評価され、互いのエンドポイント評価上の教訓を共有して、それぞれの研究デザイン

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。情報発信の早い段階で国際指標評価ネットワークとの持続的な連携作りをしたことが評価され、互いのエンドポイント評価上の教訓を共有して、それぞれの研究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。

A: 研究の背景・目的

表面特性やサイズ等、ナノ粒子特有の生体内動態による疾病の可能性が検討されて久しい。中枢神経系においても、ナノ粒子に特化した病理モデルが報告されているが、実際には標準的にナノ粒子の神経への影響を評価する試験法はまだ確立されていないのが現状である。

本研究班は新規試験法の検討を行ってきたが、結果を一方的に国際発信するだけでなく、試験標準化のための国際ネットワークとしての共同開発を目指すことで、評価法を世界に向けてより効果的に提案することを目標に設定した。

Says は *in vitro* の系で、難溶性ナノ粒子凝集体を含む水溶液では、高水溶性 OH 基誘導体と比較して数倍の毒性が検出されたにもかかわらず、ラットの系では難溶性 nano-C60 凝集体と水溶性 C60(OH)₂₄ 両者間で毒性がほぼ同等であったことを示している (Nano Lett. 2007)。そこで本研究では直接、Says の指導を得た。

その結果、ナノ粒子のサイズや表面特性による特有な生体内動態の危険性について、動物試験で脳内移行性を指摘した先行研究はあるが、動物によるナノ粒子試験法は、検討が長期にわたり、評価項目の全組合せを一度に網羅できるエンド

ポイント設定は不可能なことを、新規試験法によっていかに提案するか、を検討した。

以上の経緯をふまえ、これまで本研究班で検討・構築してきた国際ネットワークを用いて、実際に動物実験の国際コミュニケーションの現場で動物実験の期間およびコスト削減について効果的な働きかけを行い、ナノ粒子脳内移行性に関する複数のボトムアップ試験モデルの情報発信上、ナノ粒子特有の物性による留意点を検討した。

B: 研究方法および結果

研究初年度にはナノマテリアルの安全製造・利用を目指す国際会議 Nanosafe 2010 で、「シリコン系蛍光ナノ粒子の毒性試験」に関する情報発信を行い、安全性評価国際ネットワークのリサーチ・参加の模索を行った。



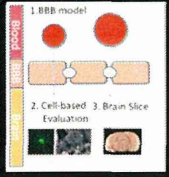
module ⑤	module ⑥	module ⑦	module ⑧	module ⑨	module ⑩	module ⑪
Particle Type	Production Method	Exposure Pathway	Study Design	Hazard Target	Risk Group	Audience
Carbon	Engineered	Oral/Ingestion	Synthesis	Aquatic Ecosystem	Industrial/Research Worker	Technical Research
Metal	Incidental	Dermal/Mucous Membrane	Material Analysis and Applications	Mammalian	Consumers	General Public
Organic/Polymers	Both	Inhalation	System Modeling	Soil Ecosystem	General Population	Public Policy
Semiconductor		Injection	In Vitro	Atmospheric Ecosystem	Ecosystem	Other
Oxide		Multiple	In Vivo	Multiple	Other/Unspecified	
Multiple		Other/Unspecified	Ex-vivo	Other/Unspecified		
Other/Unspecified		Multiple	Environmental Study			

研究二年目には、NanoOEH 2011 に Says の指導を仰ぎに向い、いかに「毒性の可能性、危険情報」を比較評価し、効果的に発信できるか、実験デザインや国際コミュニケーションの可能性・リスクを考察し、上記モジュールモデルで標準評価法を提案していく成果を得た。

また同時に第5回国際ナノテクノロジー労働・環境保健研修(2011)で、本研究により「トキシコロジーと健康」課程を履修し、新規試験法の有用性の検証と国際的な基準策定への働きかけのスキル構築を行った。また海外研究者との指導関係を構築し、継続的に維持した。

本研究班では、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が、研究最終年度は初年度に参加した Nanosafe で構築したネットワークを活かし、フランス

**Communicating Nanotoxicology
Three Evaluations Using *In vitro*
Central Nerve Models**

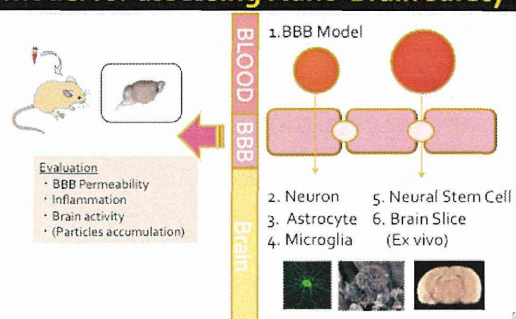


Fumihide Kanaya, Sanshiro Hanada,
Yuriko Inoue, Yoshinobu Manome,
Kouki Fujioaka

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検証し、多施設間比較可能な国際基準の働きかけを行った。

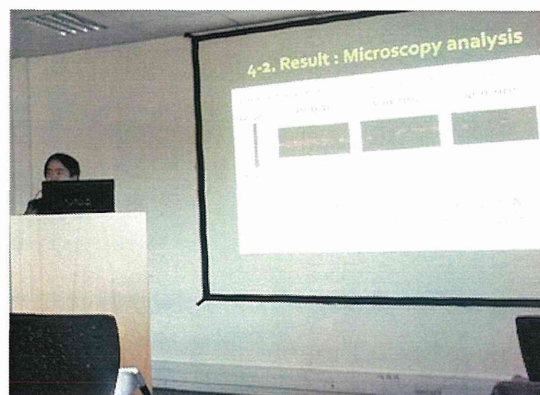
ナノ毒性評価コミュニケーション法:
中枢神経系ボトムアップモデル

AIM: Development of *In vitro* bottom-up model for assessing Nano-Brain safety



Bottom-Up1. BBB モデルのコミュニケーション:

既存の通常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 モデルをナノ毒性評価に活用したことを強調した。ボトムアップモデルの優位性である、簡便性・定量性・再現性の確立が可能になることをアピールした。また指標粒子は、蛍光色素含有シリカ粒子、表面特性の異なるセレン化カドミウム量子ドットであることをコミュニケーションした。細胞透過係数 P_{app} [cm/sec]を用いることで定量的比較ができることを分担研究者が示した意義を説明した。



Bottom-Up2. 中枢神経細胞培養系を用いたコミュニケーション:

シリカナノ粒子 30nm をヒト神経幹細胞株に 1日添加後染色する系によって、濃度依存的な細胞膜傷害性の増加と、ミトコンドリア活性の低下が検出できることをコミュニケーションした。濃度依存的細胞死、神経細胞の分化に影響する中枢細胞マーカーを発現遺伝子レベルで検討できることを説明した。

ラット大脳皮質初代培養細胞を用いた神経ネットワーク系では、濃度依存的な神経細胞数減少が観察できることをコミュニケーションした。LDH アッセイが、従来の毒性評価系に比べて感度・特異性共に優れた細胞傷害性を検出できる可能性を示した。

Bottom-Up3. 脳スライス組織培養によるコミュニケーション:

東京慈恵会医科大学でノウハウを蓄積

してきた脳スライス培養系を用い、酸化ナノチタンと共培養した組織の mRNA 由来の cDNA を、次世代シーケンサ (Roche GS Junior) で解析することで、686 種類のマーカー遺伝子候補を検出できることを示した。

また、アルツハイマー病関連酵素である Bace1 が 0.1 mg/mL の濃度で発現されることをコミュニケーションした。



(Nanosafe 2012, MINATEC, France)

D: 考察

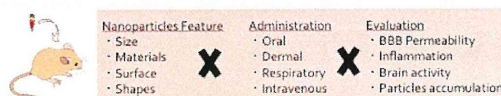
新規毒性試験法の有用性検証による国際基準働きかけ

本研究班の働きかけにより毒性に関する評価項目について、

1. 粒子: サイズ・組成・表面特性・物理的形狀等
2. 暴露経路: 経口・皮膚・呼吸・静脈等

Introduction: Difficulty to assess the Brain effects

"General" assessment categories about nanoparticles effects on the "Brain"



How much time do we need ?

> Difficult to test whole the categories with animal models.

We need convenient, quantitative, reproducible assays for (1) limiting the assessment categories and (2) reducing animal tests.

3. エンドポイント: BBB 透過性・炎症・脳機能・粒子の蓄積・濃度依存性・時間依存性等

の、すべての組合せについての動物試験法開発は非現実的であることについては、国際ナノ安全利用法コミュニティーで好意を持って共有され、新規試験法の有用性が受け入れられた。

本研究によるボトムアップ新規試験法と、欧米の国際動物試験によるコラボレーション

本研究で働きかけの場に選んだ MINATEC は Nanosafe 2012 の主催施設で、欧州唯一のイノベーションサイトを構成するナノテクノロジー分野世界最高峰の融合クラスターである。

我々の訪れたグルノーブル拠点は、フランス原子力庁 (CEA)、国立科学技術センター (CNRS) 等の大規模な国立研究所が近接した横断的研究拠点で、研究グループ間に緻密な連携が生まれ、研究ツールの共用・相互扶助により、互いの研究評価の交流にも繋がり、非常に有効な運営実績を生み出している。

今回の情報発信では、我々のボトムアップモデルに各レベルからの問合せが集

まり、BBB モデル・中枢神経細胞培養系・脳スライス組織培養全てのレベルでの可能性をアピールすることができた。

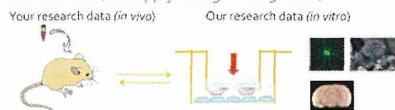
Introduction: Difficulty to assess the Brain effects

"General" assessment categories about nanoparticles effects on the "Brain"

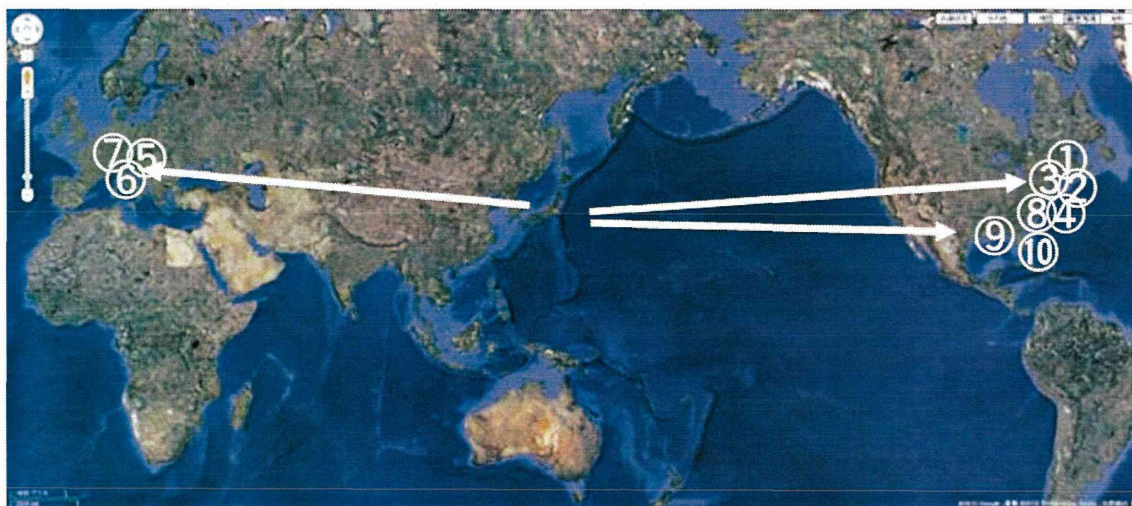
Nanoparticles Feature	Administration	Evaluation
<ul style="list-style-type: none"> Size Materials Surface Shapes 	<ul style="list-style-type: none"> Oral Dermal Respiratory Intravenous 	<ul style="list-style-type: none"> BBB Permeability Inflammation Brain activity Particles accumulation

How much time do we need ?

• Please collaborate us (and apply new grant together.)



さらに、我々の新規試験法の応用として、海外の研究グループによる in vivo での毒性評価試験とコラボレーションする形で、相互比較可能なボトムアップ評価系開発の共同研究のネットワーク作りを行うことができた。これにより、継続的に動物試験との相関性の有効性を検討する国際システム策定が可能になった。



1. University of Montreal: Dr. C. Emond
2. University of Massachusetts Lowell, USA: Dr. M. Ellenbecker, Dr. SJ Tsai
3. University of Rochester: Dr. G. Oberdorster
4. NIOSH, USA: Dr. Vince Castranova
5. Institute for Work and Health, Switzerland: Dr. M. Riediker
6. CEA France: Dr. M. Carriere
7. Leuven Catholic University: Dr. P. Hoet
8. TRI International, USA: Dr. Christie Sayes
9. Rice University: Dr. K. Kulinowski
10. RTI International: Dr C. Sayes

(構築した試験法標準化ネットワーク)

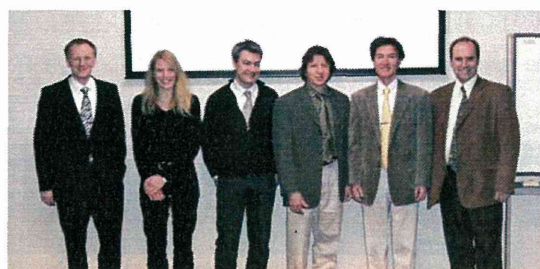
E: 結論

ナノ粒子の脳内移行性を、複数のボトムアップモデルにより評価し、国際ネットワークへの働きかけを行った。EU の NanoImpactNet はアジアとの一貫的横断研究の拠点立上げを行っており、M. Riediker 代表から毒性評価上の連携扶助の依頼を受けた。モンリオールを拠点にした TITNT ネットワークからは、継続的な動物実験との相互評価の枠組み策定の提案を C. Emond 教授より得た。



(NanoImpactNet, M. Riediker, Coordinator)

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。



(TITNT, C. Emond, Leader)

本研究により、細胞・組織を組み合わせたボトムアップモデルは、毒性影響を予測する試験法として活用できることを、効果的に国際ネットワーク化することができた。試験法のバリデーションに向けた研究協力を、国際的なナノリスク専門家から依頼されたので、本研究で構築した新規試験法リスクの予測・低減、健康被害の防止の貢献に役立てたい。



F: 健康危機情報

なし

G: 研究発表

1. 論文発表

1. K. Fujioka, S. Hanada, F. Kanaya, A. Hoshino, K. Hirakuri, K. Sato, A. Shiohara, RD Tilley, Y. Manome. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. Journal of

- Physics Conference Series 2011
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. Y. Maruoka, F. Kanaya, et al. Study of Osteo-/Chondropenia Caused by Impaired Chemokine Receptor and for Progressive/Idiopathic Condylar Resorption. Jpn J. Jaw Deform. 22: S15–S12 Dec. 2012.
 4. 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. Toxicity test: Fluorescent silicon nanoparticles. K. Fujioka, F. Kanaya, et al. Nanosafe 2010, November 18, 2010. Grenoble, France.
 2. Application of in vitro BBB model to measure permeability of nanoparticles. S. Hanada, K. Fujioka, Y. Inoue, F. Kanaya, Y. Manome, K. Yamamoto. NanoSafe 2012, Grenoble, France
 2. Communicating Toxicology: Three Evaluations using in vitro central nerve models. F. Kanaya, S. Hanada, Y. Inoue, Y. Manome, K. Fujioka. NanoSafe 2012, Grenoble, France
 3. Highly concentrated silica nanoparticles affect the activities of neural stem cell line. K. Fujioka, S. Hanada, Y. Inoue, F. Kanaya, K. Shiraishi, Y. Manome. NanoSafe 2012, Grenoble, France
 4. Toxicological influence of giving the silica nanoparticles on cultured central nerves cells. Y. Inoue, K. Fujioka, S. Hanada, F. Kanaya, K. Shiraishi, Y. Manome, M. Takayanagi. NanoSafe 2012, Grenoble, France
 5. Deficiency of chemokine receptor type 1 is associated with left ventricular diastolic dysfunction. F. Kanaya, M. Moroi, et al. Gordon Research Conferences Cardiac Regulatory Mechanism 2012, New London, USA
 6. 化学療法: ART服用者の有害事象および患者リテンションについての観察研究, F. Kanaya, S. Oka, et al.

第 26 回日本エイズ学会学術集会総
会 2012

7. Establishment of a
hospital-based cohort of
HIV-infected individuals in
Vietnam: The NHTD-ACC
Collaborative HIV Cohort Study. J.
Tanuma, F. Kanaya, Kinh N, et al.
Asia-Africa Research Forum on
Emerging and Reemerging
Infectious Diseases 2012, 日本

8. Monitoring of ART related
adverse events in Hanoi, Viet Nam.
Ha N, Kanaya F, Kinh N, et al.
Asia-Africa Research Forum on
Emerging and Reemerging
Infectious Diseases 2012, 日本

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に関する研究
(H22-化学-若手-009)

蛍光ナノ粒子の中枢神経系への取り込みとその影響

分担研究者：星野 昭芳 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・協力研究員
分担研究者：花田三四郎 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・流動研究員
分担研究者：叶谷 文秀 （独）国立国際医療研究センター研究所副所長室・協力研究員
協力研究者：山本 健二 （独）国立国際医療研究センター研究所・副所長
協力研究者：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
協力研究者：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

研究要旨

化学物質の暴露に関する健康被害に関しては、わが国では化学物質審査規制法により新規物質の安全規制が1970年代より実施されている。一方でナノ材料については、既存物質の粒子径が微細化されたものに対しては、審査対象となる新規物質とはみなされていない。しかし近年飛躍的に進歩したナノ材料の研究により、ナノ材料は微小化に伴い、従来考えられていた物理的・化学的性質のみならず、生物学的活性に関する性質においても全く新たな特性を示すことが示唆されている。このことから既存物質についても、微小化に伴い毒性や生体内挙動といった生物学的反応性が変化することが懸念されている。とりわけ、従来ならば血液脳関門によって物質の出入りが厳密に制御されていると考えられてきた脳内へと、ナノ粒子が容易に移行してしまう可能性を検討することは喫緊の課題である。そこで本研究では、マウスの暴露部位によるナノ粒子の脳内移行性の差異について検討した。

A:研究目的

21世紀初頭に入り微細加工技術が急速に進展したことから、ナノテクノロジーという研究分野が登場した。久保亮五先生の量子理論から半世紀の時を経てようやく具現化したナノ材料は、予言されていたとおりにその原子の物理的・化学的特長が超微細化により著しく変化することから、多種多様な元素を材料にした多種多様なナノ粒子が生産されてきた。これまで注目されてきたカーボンナノチューブやフラーレンとい

った炭素化合物に加えて、金属原子を材料に微細化されたナノ粒子もまた一部生産物は産業応用されつつある。脱臭作用や光酸化作用などが注目されたナノ銀粒子やナノ酸化チタン粒子などは、化粧品産業や繊維産業界の手によってすでに上市され大量生産され、消費され、廃棄されている。さらに新規ナノ材料を医療生物分野へ応用する動きさえ注目を集めていた。

ナノ粒子は、その物理的・化学的性質がナノ化に拠って顕著に変化することが確認

された一方で、生体においては従来のマイクロメートルサイズ材料与同様に皮膚・粘膜・血管壁などにある間隙を透過することができないと妄信されてきた。しかしながらナノ材料はこれら間隙を透過することができる可能性がにわかに指摘され始め、体内の特定の部位や組織への特異的集積性といった問題が懸念されるようになった。通常の多種多様な合成高分子が、数多の毒性試験を課され、医薬品にいたっては吸収・分散・代謝・排泄といった生体内の全挙動（いわゆるADME）がくまなく追跡されていることと比較して、ナノ材料の場合はこれが軽視されているのが現状である。ナノ化は体積に対して比表面積が増大するので、物理的・化学的・生物学的性質もナノ化により決定的に変化してしまう可能性が高いことは明白である。

一般にバルクの酸化チタンやバルク銀は化学的には安定であり急性毒性はないとされているが、その粉末を扱う産業現場では塵肺の原因になる粉塵として扱われている。粉塵については経験的に特定のサイズの粒子に危険性があることが知られていたが、ナノ粒子については化学工業業界において「サイズの大きな粒子が安全な場合には、同じ物質で構成されたナノ粒子も安全であろう」とする仮定で製品化されてきたのが現状である。また既存の動物実験報告では、ナノ粒子の吸入暴露の危険性が指摘され、ナノ粒子を吸入させた場合にだけ炎症反応が生じたことが報告され、炎症惹起性には粒子サイズのみならず投与経路が影響する可能性も示唆されてきている。生体毒性においては、従来ならば血液脳関門によって物質の出入りが厳密に制御されていると考

えられてきた脳内へナノ粒子の脳内移行性の検討は喫緊の課題である。

今回我々は、静脈内ならびに腹腔内という2つの経路でナノ粒子を投与した際の脳内移行性を含む体内動態、粒子挙動とについて検証したマウス動物実験について報告する。

B:研究方法

(1) ナノ粒子投与実験

投与経路に拠る組織集積性について解析するために、C557BL/6Jマウスに蛍光ナノ粒子カンタムドット(QD)を、尾静脈投与もしくは腹腔投与した。また投与する粒子の表面加工形態が異なる2種類のナノ蛍光粒子による分布挙動の際についても検討した。この実験のために、逆ミセル法によって合成した疎水性ナノ粒子(TOPO-QD)を常法に従い2種類の親水性の表面加工を施した。使用した表面被覆分子は、(2S)-1-[(2S)-2-methyl-3-sulfanylpropanoyl]pyrrolidine-2-carboxylic acid(QD-cap)ならびにpolyglycine-polyethyleneglycol(QD-PEG)である。粒子の体内動態は、蛍光in vivoイメージングは、Realtime In Vivo MacroImaging System (Relyon社製)にて検出した。組織切片における観察はtwo-photon excitation system搭載共焦点レーザー顕微鏡にて行い、背景組織との蛍光差分を比較して粒子の存在を決定した。

(2) 中枢神経内に到達した粒子の定量的解析

臓器における粒子分布を検討する目的で、投与動物は脱血灌流する。目的臓器

を分離抽出後、誘導結合プラズママススペクトル法(島津 ICPM-8500)にて粒子カドミウムを微量検出した。カドミウム濃度の定量的検出は、脳においては 0-1.5 ppb、その他の臓器では 0-1000 ppb の金属カドミウム標準の校正に拠った。

C:研究結果

蛍光ナノ粒子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、QD-cap 被覆体で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(図1)。組織切片では脾臓の赤脾髄への集積が認めら



図1 QD-cap 被覆体における臓器分布の蛍光イメージング

投与4時間後には、肺に緑色蛍光の集積が確認される。

れたことから、主として組織マクロファージによる貪食である可能性が示唆されている。また QD-PEG 被覆体では主として肝臓に集積したほか、腎臓を介して尿中への排泄が確認されている(図2)。しかしながら両者に共通して、脳内への移行は観察され

なかった。



図2 QD-PEG 被覆体における臓器分布の蛍光イメージング

投与4時間後には、肝臓に緑色蛍光の集積が確認される。

一方、蛍光ナノ粒子を腹腔内投与した場合には、その分布は表面加工によらないことが判明した。

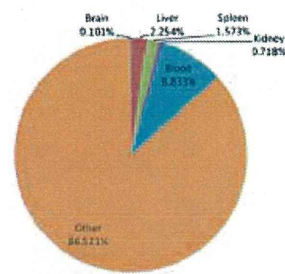


図3 静脈内投与6時間後における臓器内粒子分布

血液中に8.8%、肝臓に2.3%、脾臓中に1.6%程度、ナノ粒子の集積が確認される。

ナノ粒子投与6時間後の体内分布は、血液内滞留が最も多くおよそ9%を占めて