

図 13 : nAg の 2 週間連続経口投与における乳幼仔への移行性評価.

Ag⁺、snAg10 を滅菌水で 0.075 mg/mL に調整し、0.5 mg/kg となるように経口投与した。対照群には滅菌水を投与した。0.1 mg/kg、0.02 mg/kg を経口投与する際は 0.075 mg/mL に調整した溶液を 5 倍ずつ希釈した。出産後の授乳期マウスに 2 週間連続経口投与し、投与期間は自由育仔させた。最終投与後 24 時間で乳幼仔の血液を回収した(n=4-5)。(a)血中銀濃度は ICP-MS により測定した。(b)銀濃度を定量後、血中移行率を算出した。Data are presented as mean ± SEMs (n=4-5)。N.D.: Not Detected.

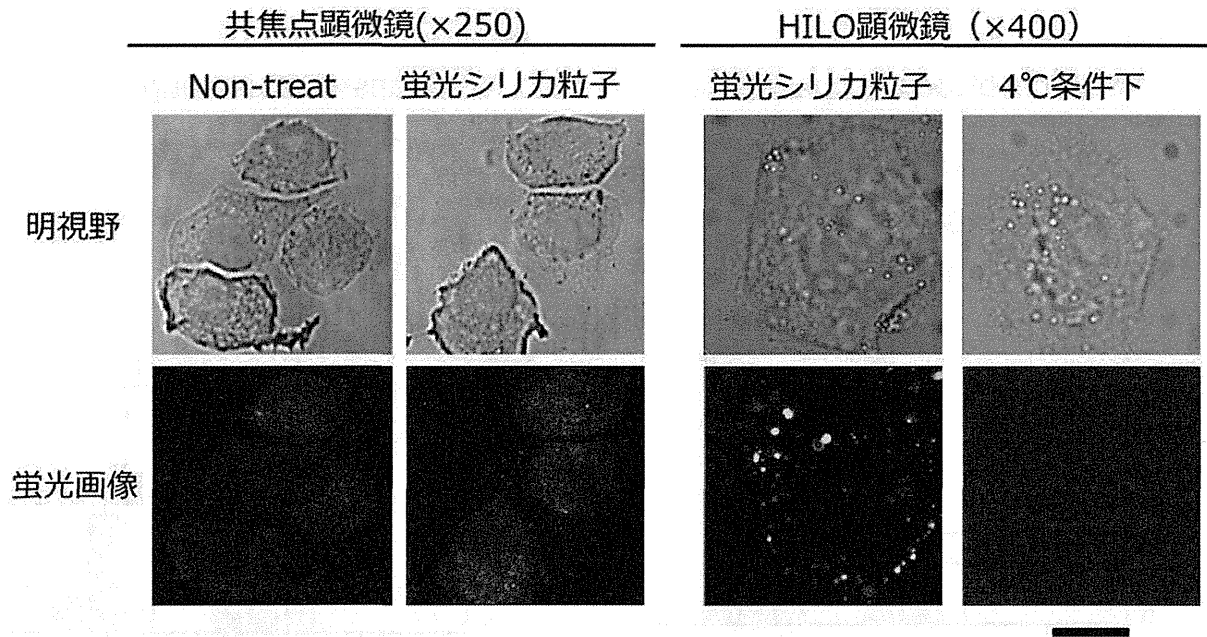


図 14 : HILO 法を用いた 1 粒子イメージングによる細胞内動態解析。

A549 細胞に蛍光修飾ナノシリカを添加した後、HILO 法を用いて、細胞内に存在する粒子を観察した。

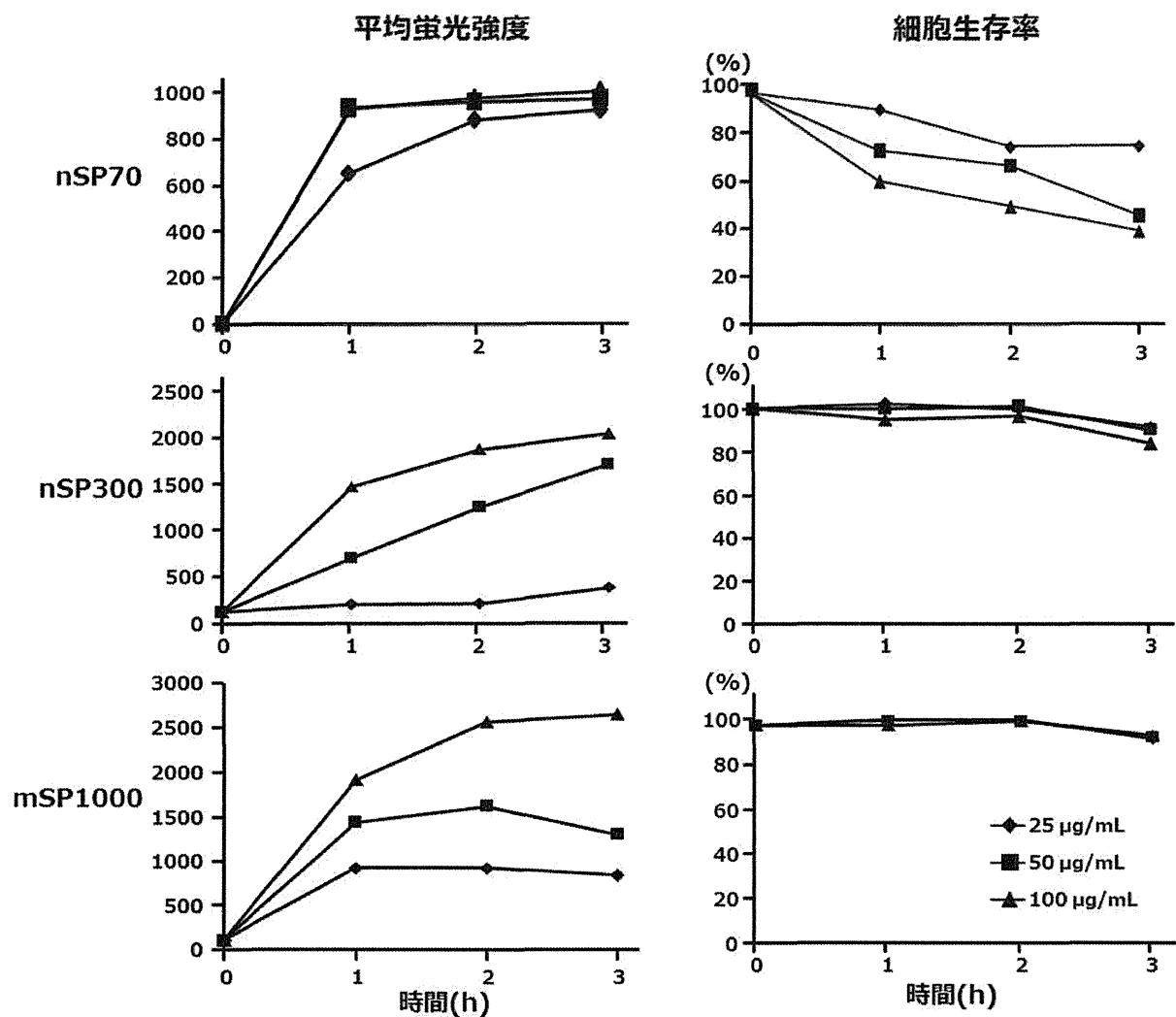


図 15. 細胞内に移行したシリカ粒子の移行量と細胞傷害性の評価

粒子径の異なる FITC 修飾シリカ粒子を用いて、細胞内に存在するシリカ粒子の量を蛍光強度を指標に評価し、細胞生存率を 7-AAD による細胞染色を指標に評価した。

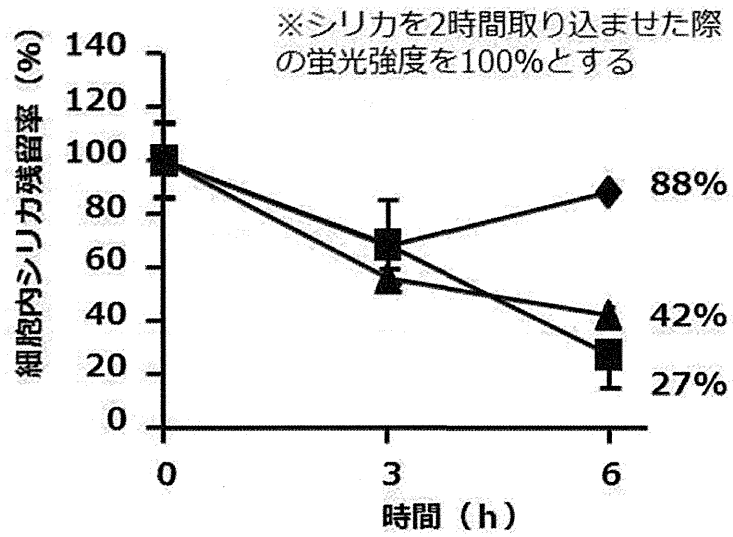


図 16. シリカ粒子の細胞外への排出効率の比較

蛍光修飾シリカ粒子を細胞に取り込ませた後の細胞内からの排出を、細胞内の蛍光強度の低下を指標に評価した。

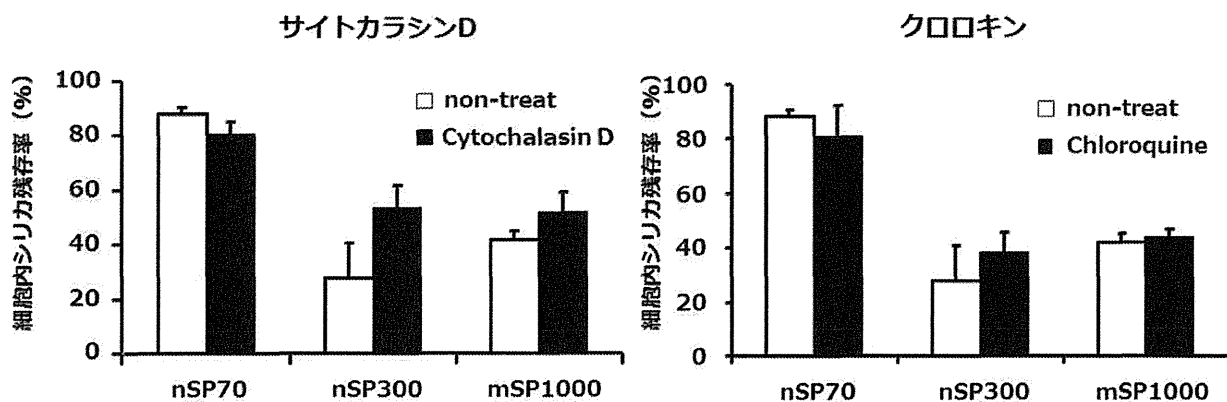


図 17. シリカの細胞外排出機構の解明に向けた検討

粒子径の異なる FITC 修飾シリカ粒子を用いて、細胞内に存在するシリカ粒子の量を蛍光強度を指標に評価し、細胞生存率を 7-AAD による細胞染色を指標に評価した。

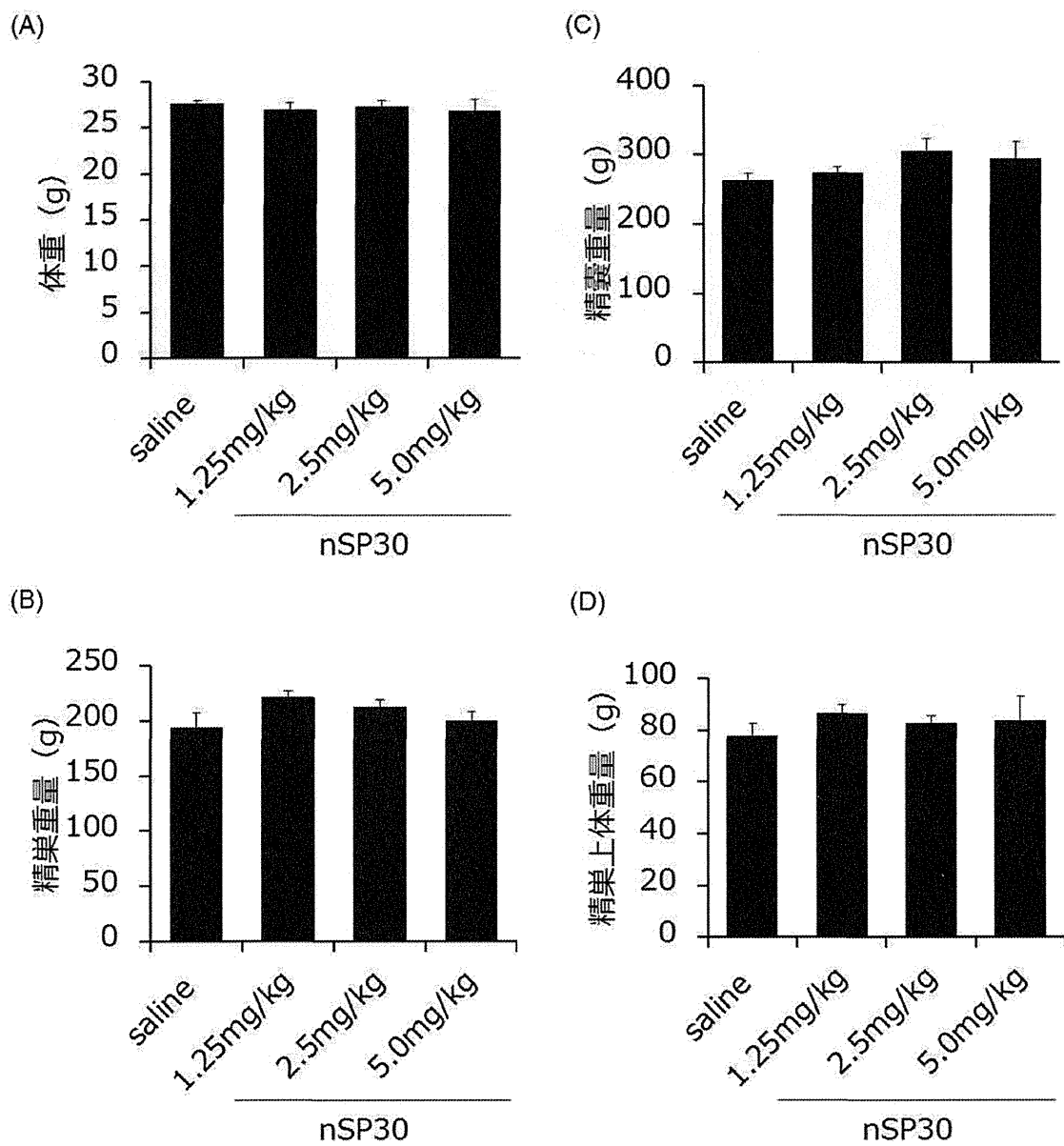


図 18. nSP30 を曝露した雄マウスの体重、生殖組織重量

10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与 35 日後に解剖し、(A) 体重、(B) 精巣重量、(C) 精巣上体重量、(D) 精囊重量を評価した。Data are presented as mean \pm SEMs (n=4-5)

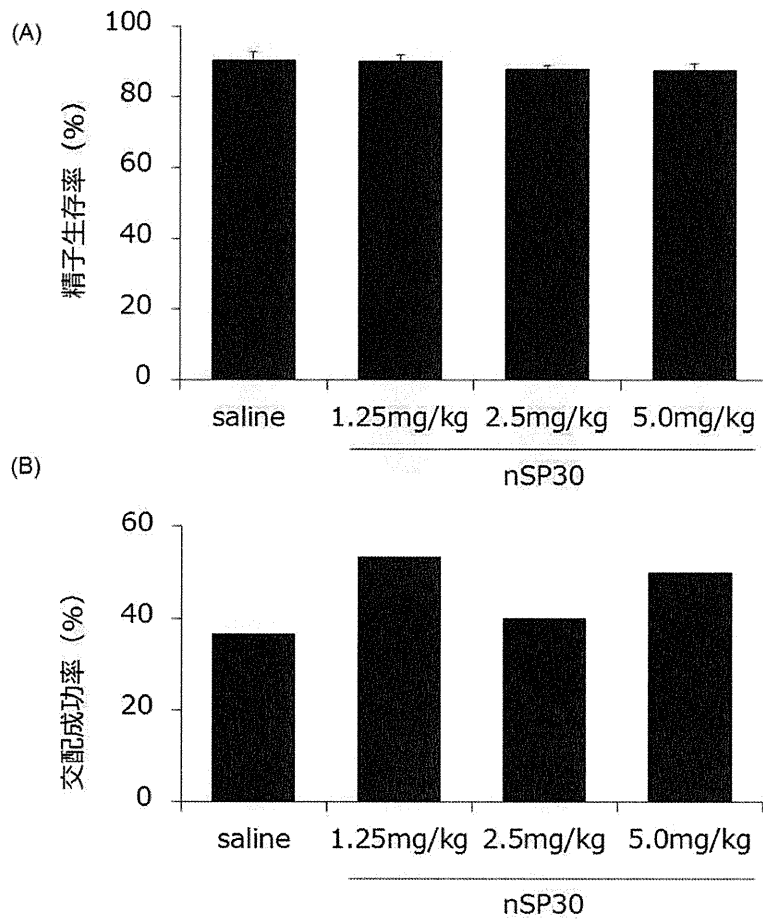


図 19. nSP30 を曝露した雄マウスの精子生存率、交配成功率

10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回、静脈内投与した。(A) 最終投与 35 日後に精巣上体中の精子の生存率を flow cytometry により評価すると共に、(B) 最終投与日から 4 日間、無処置の雌マウスと同居させた際の交配成功率 (妊娠した雌マウスの数/交配させたマウスのペア数) を算出した。Data are presented as mean \pm SEMs (n=4-5)

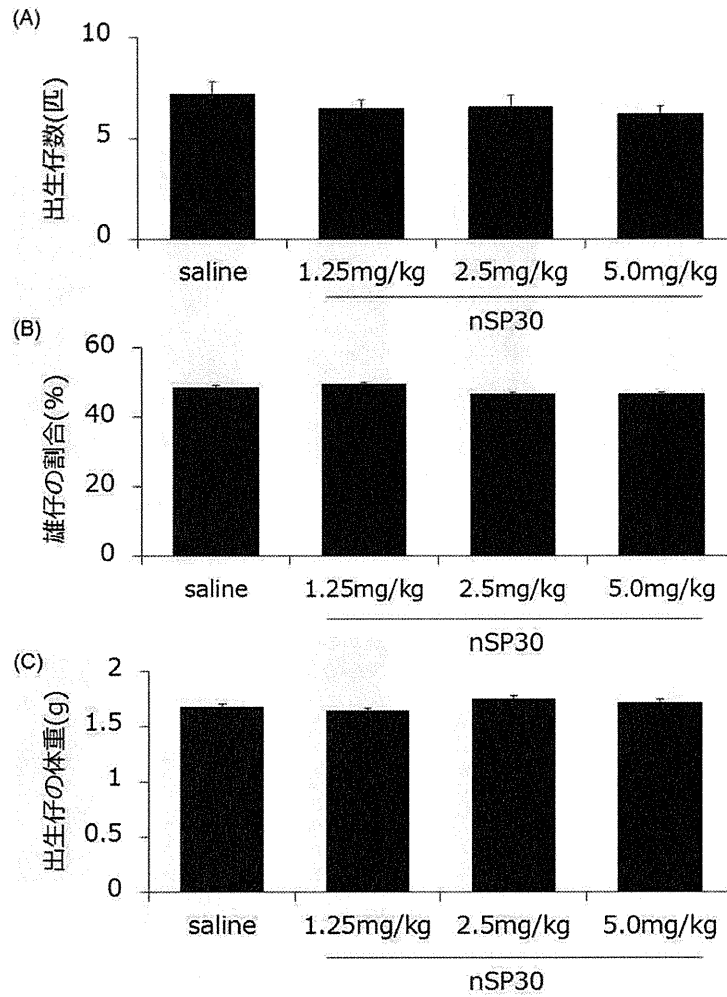


図 20. nSP30 を曝露した雄親の子の出生仔数、雌雄比、出生時体重.

10 週齢の雄性 BALB/c マウスに、nSP30 を 1.25mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回、静脈内投与した。最終投与から 35 日後に、4 日間、無処置の雌マウス (BALB/c、9 週齢) と同居させ、交配させた。(A) 出生仔数、(B) 出生仔の雄仔の割合、(C) 出生仔の出生時体重を評価した。Data are presented as mean \pm SEMs (n=63-95)

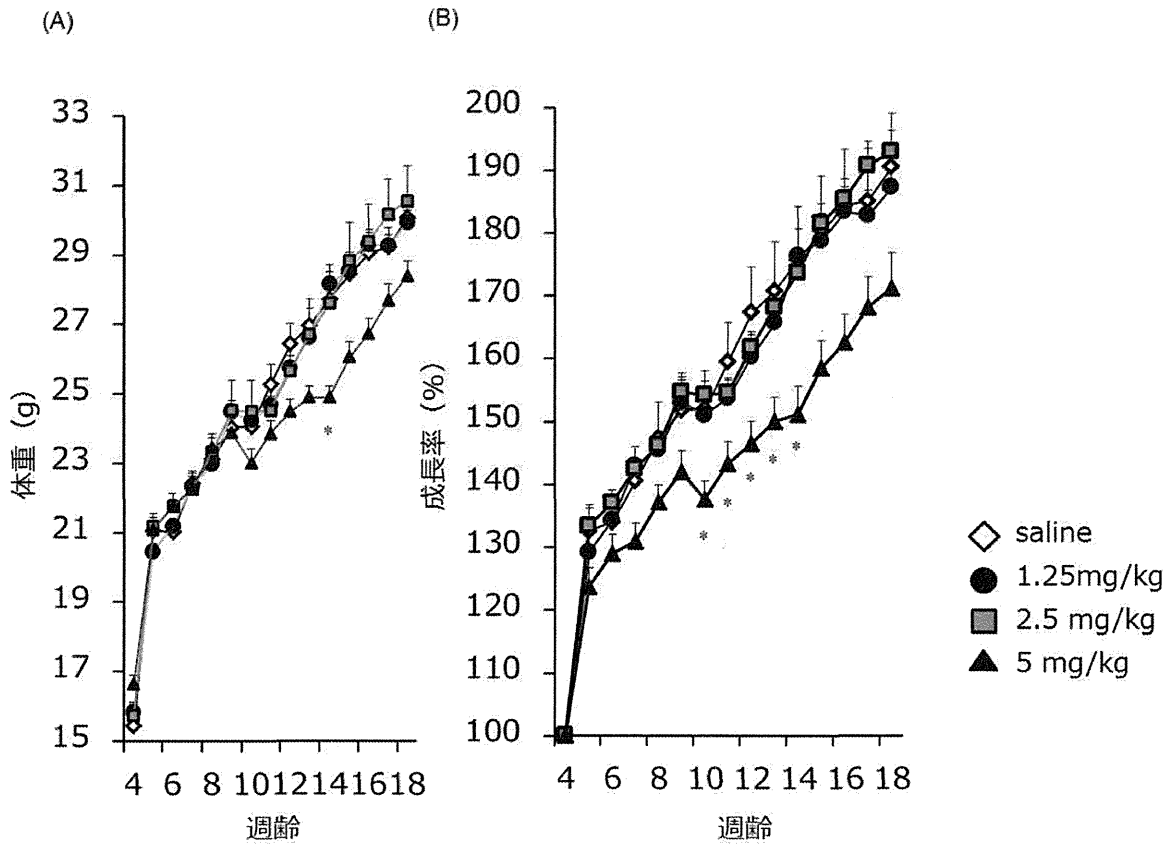


図 21. nSP30 を曝露した雄親の仔の体重推移と成長率

10 週齢の雄性 BALB/ c マウスに、nSP30 を 1.25 mg/kg、2.5 mg/kg、5 mg/kg で 1 日おきに 4 回静脈内投与した。最終投与から 35 日後に、4 日間、無処置の雌マウス (BALB/c、9 週齢) と同居させ、交配させた。(A) 出生後の体重を経過的に測定すると共に、(B) 各群の 4 週齢時の体重に対する成長率を算出した。Data are presented as mean \pm SEMs (n=10-18; *p < 0.05, **p < 0.01 versus value for control group by one-way ANOVA followed by tukey post hoc test)

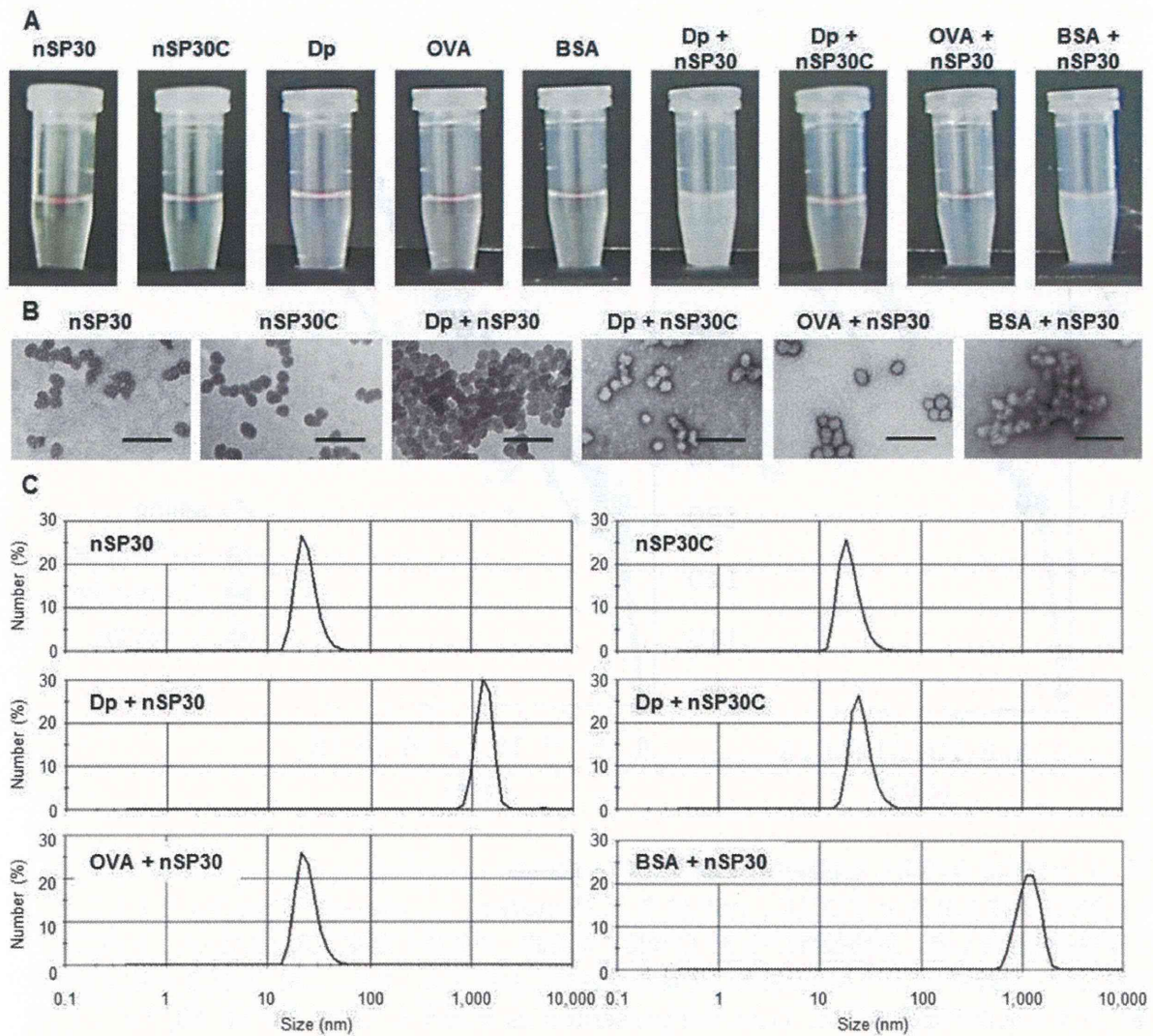


図 22. 塗布サンプルの性状。

各塗布サンプルの肉眼 (A)、および透過型電子顕微鏡 (B) による観察を行った。また、各サンプルの凝集状態を評価するため、動的光散乱法により、サンプル中粒子の粒子径を測定した (C)。

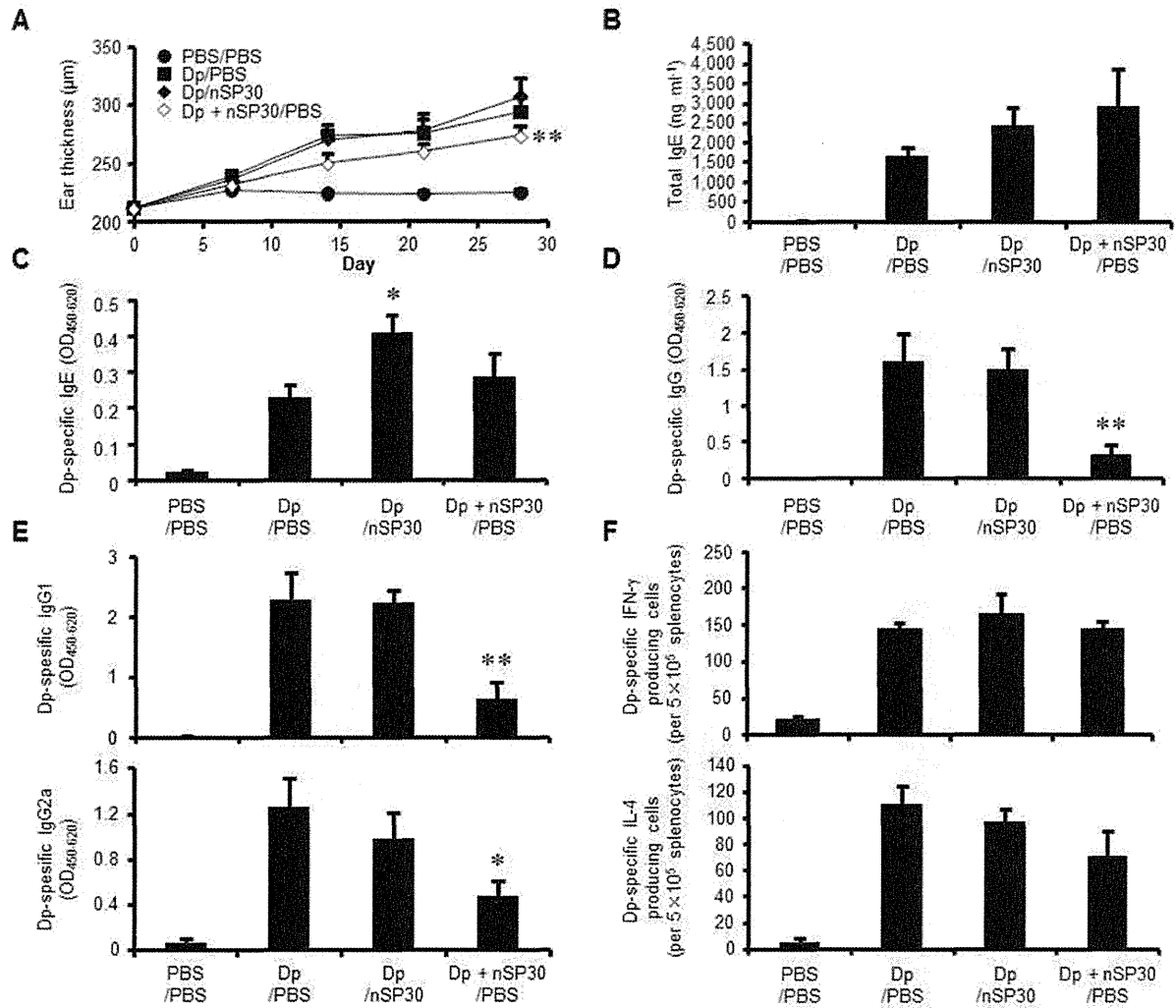


図 23. Dp と nSP30 の交互塗布がアトピー病態、及び Dp 特異的免疫誘導に与える影響。

NC/Nga slc マウス（雌性 6 週齢）の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原（Dp）と nSP30 の混合溶液（Dp ; 1 mg/ml、 nSP30 ; 12.5 mg/ml）（Dp + nSP30/PBS 群）、または Dp と nSP30 を 24 時間間隔で別々に塗布し（Dp/nSP30 群）、それぞれがアトピー病態、及び Dp 特異的免疫誘導に与える影響を評価した。各サンプルはそれぞれ週 3 回、4 週間塗布した。病態の重症度は、経過的に耳介厚を測定することにより解析した。最終投与から 24 時間後に解剖し、血中の total IgE 量（B）抗原特異的抗体価（C-E）、および脾臓中の抗原特異的 IFN- γ 、IL-4 産生細胞数（F）を ELISPOT 法により評価した。Data are means \pm SEMs ($n = 5$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Dp/PBS group.

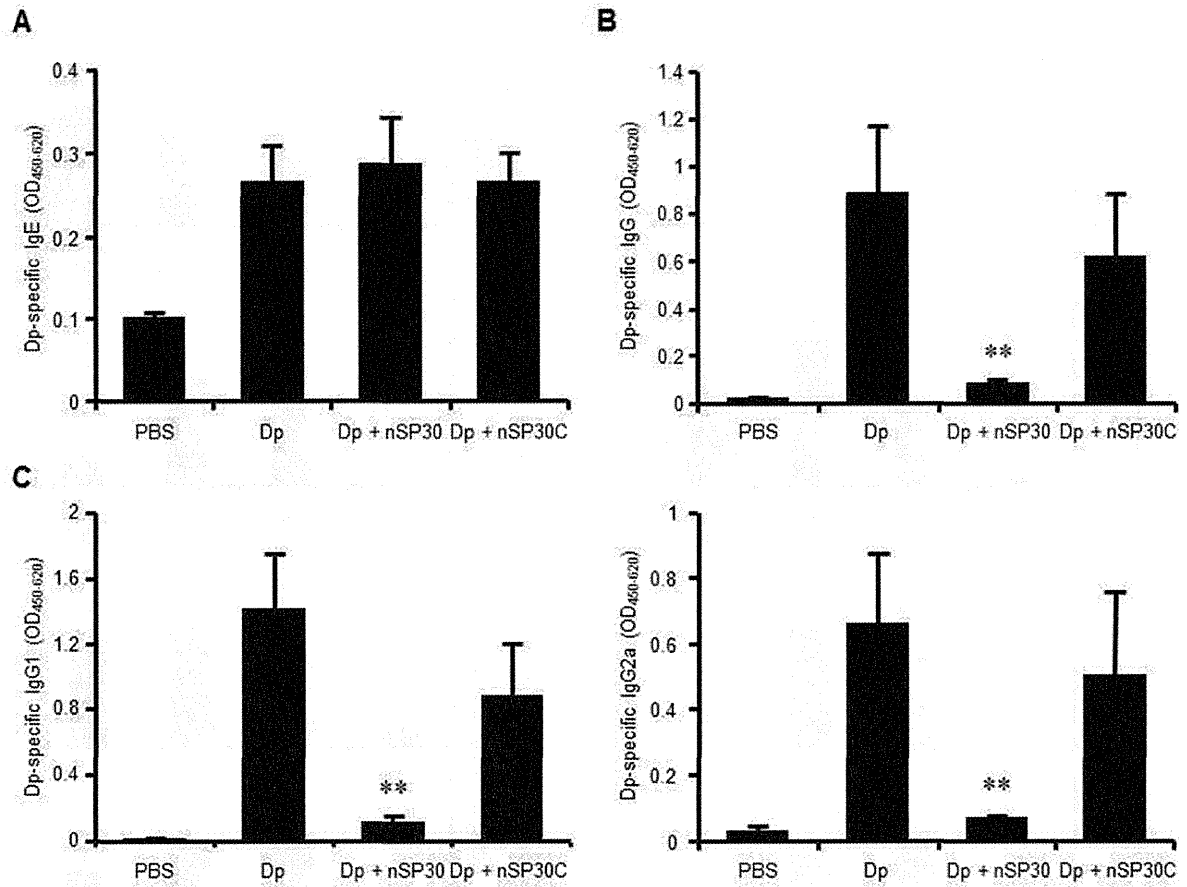


図 24. Dp と nSP30C の混合塗布が Dp 特異的抗体産生に与える影響.

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ヤケヒョウダニ抽出抗原 (Dp ; 1 mg/ml)、Dp と nSP30、またはその表面をカルボキシル機で修飾した nSP30C の混合溶液 (Dp ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖し、Data are means \pm SEMs ($n = 5$). ** $P < 0.01$ vs. Dp group.

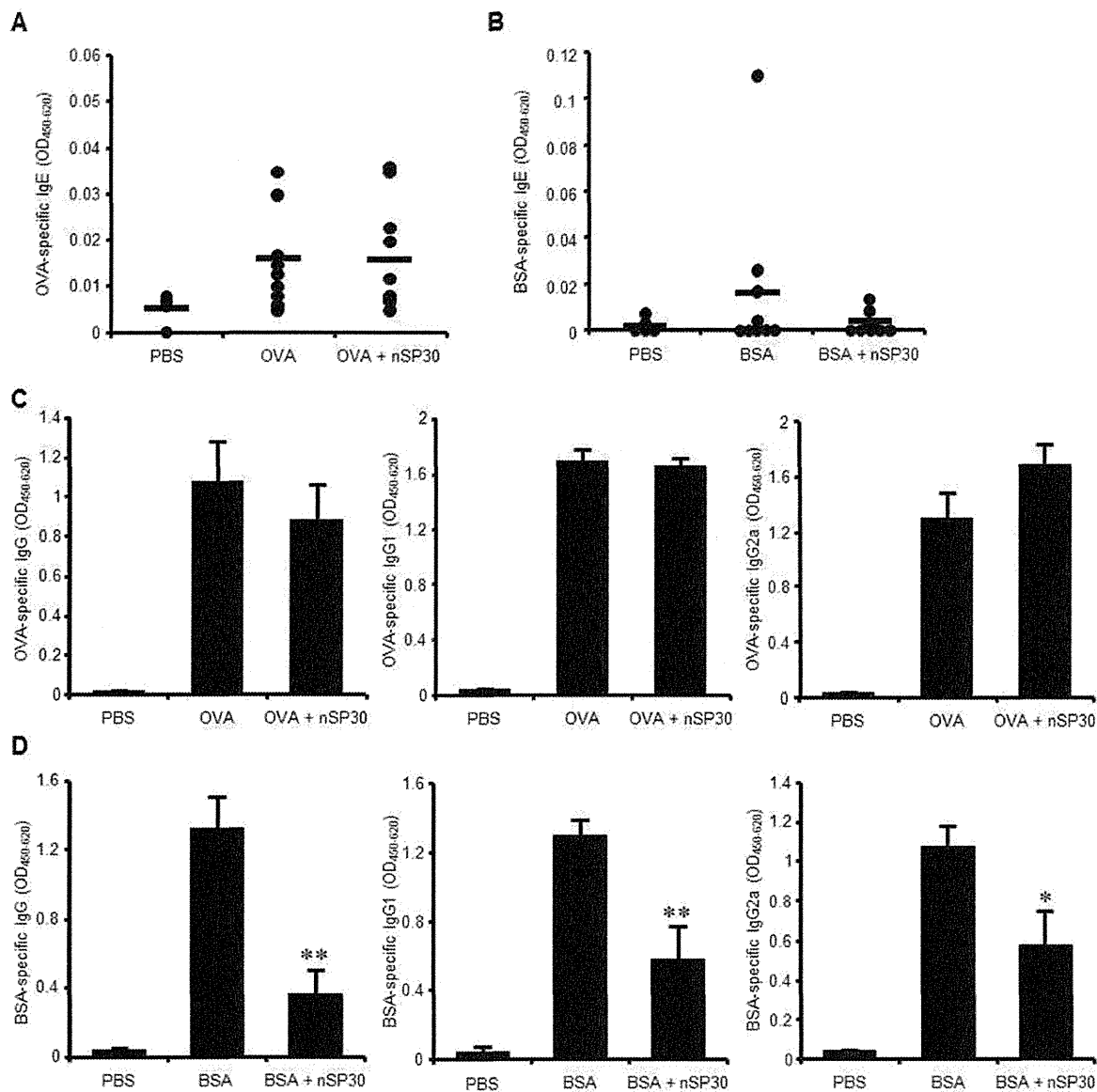


図 25. nSP30 と抗原の相互作用と IgG 抑制作用の関連.

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) の両耳介の内側、および除毛した上背部に、ニワトリ卵白アルブミン (OVA ; 1 mg/ml)、ウシ血清アルブミン (BSA ; 1 mg/mL)、または、それぞれの抗原と nSP30 の混合溶液 (OVA or BSA ; 1 mg/ml、nSP30 ; 12.5 mg/ml) をそれぞれ 20 μ l/ear、80 μ l/back で週 3 回、4 週間塗布した。最終投与から 24 時間後に解剖し、血中の OVA 特異的抗体価 (A, C)、もしくは BSA 特異的抗体価(B, D)を ELISA 法により測定した。Data are means \pm SEMs ($n = 5-10$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. OVA or BSA group.

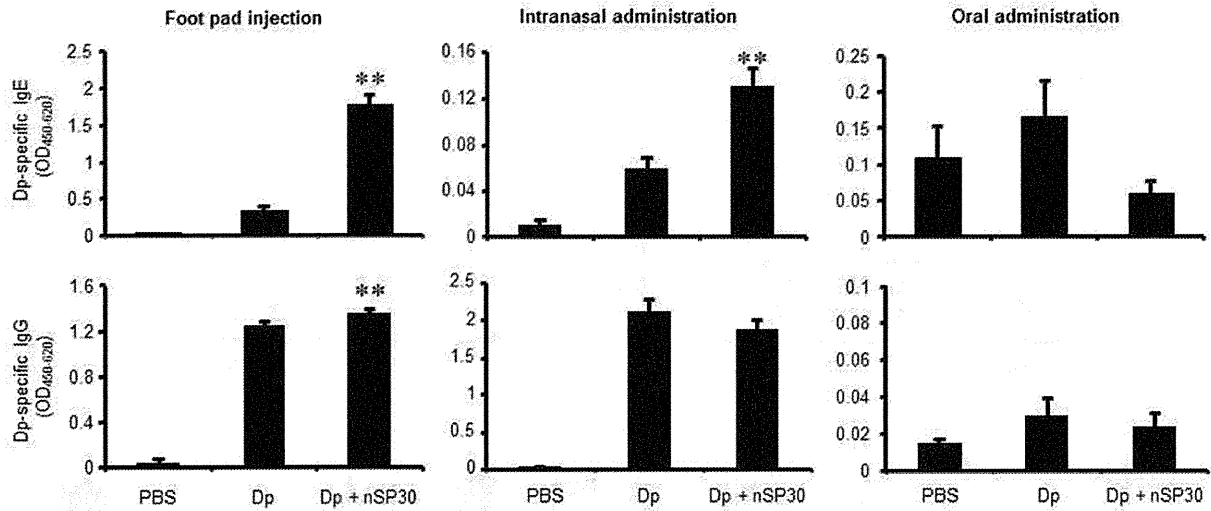
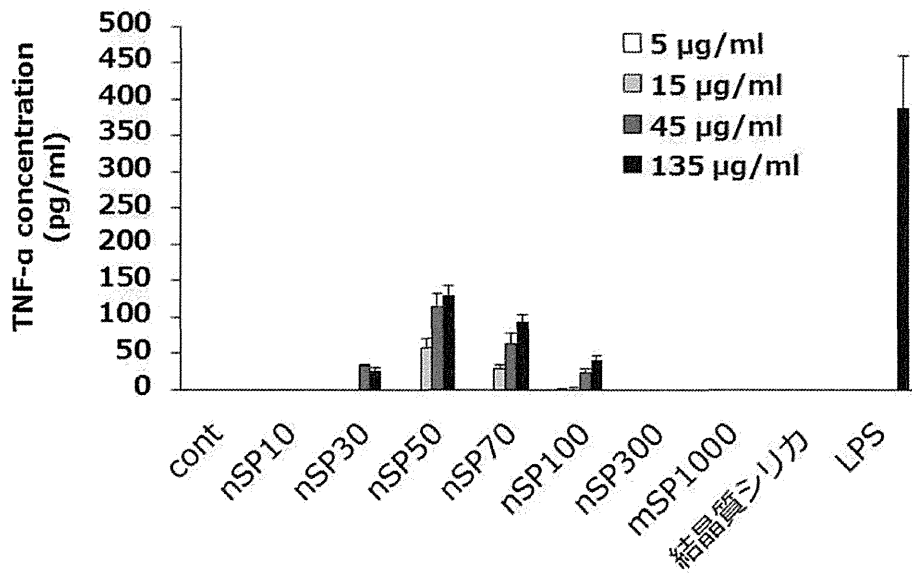


図 26. nSP30 が Dp 特異的抗体産生に与える影響と投与経路の連関。

NC/Nga slc マウス (雌性 6 週齢) に、ヤケヒヨウダニ抽出抗原 (Dp ; 1 mg/ml) または Dp と nSP30 の混合溶液 (Dp ; 1 mg/ml, nSP30 ; 12.5 mg/ml) を、週 3 回、4 週間、フットパッドへ皮内投与 (40 μ l/mouse)、経鼻投与 (20 μ l/mouse)、あるいは経口投与 (120 μ l/mouse) した。最終投与から 24 時間後に解剖し、血中の Dp 特異的抗体価を ELISA 法により解析した。Data are means \pm SEMs ($n = 3-6$). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs. Dp group.

(A)



(B)

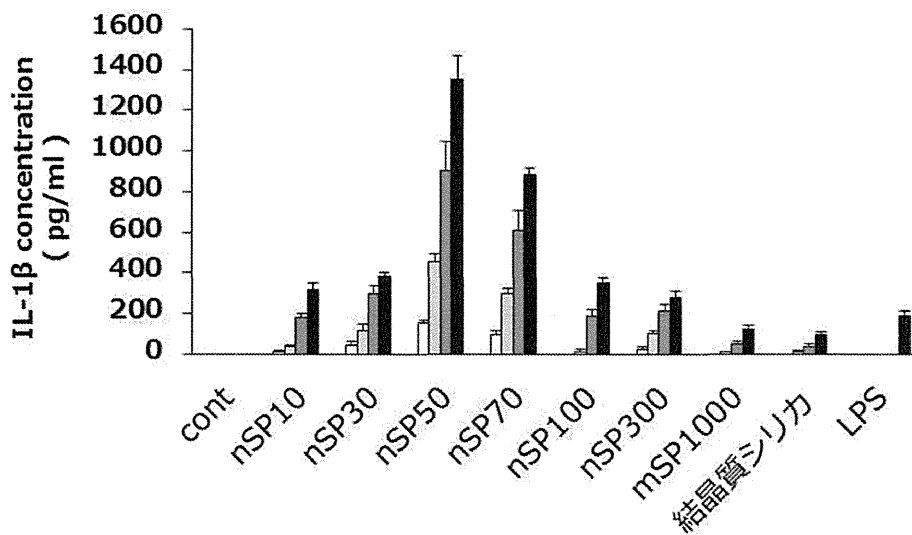
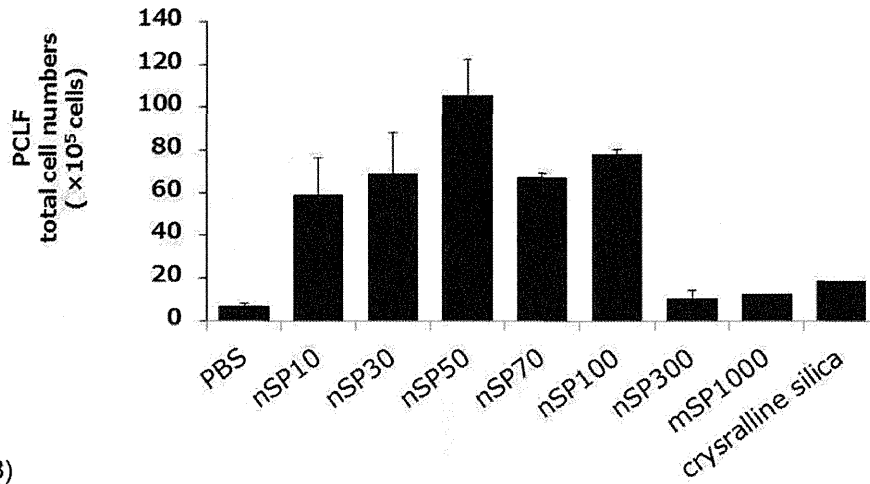


図 27. 非晶質ナノシリカが誘導するサイトカイン産生量の評価。

ヒト単球細胞株(THP-1)を 3.0×10^4 cells/well で 96 穴プレート上に播種し、分化促進のために、12-O-テトラデカノイルホルボル 13-アセタート(PMA)を $0.5 \mu\text{M}$ となるように加えた。一晚培養後、各粒子径の非晶質ナノシリカ溶液、結晶質シリカ、または LPS ($1 \mu\text{g/ml}$) を各濃度で添加し、24 時間後に ELISA 法によって細胞上清中の (A) TNF- α 、(B) IL-1 β 産生量を評価した。

(A)



(B)

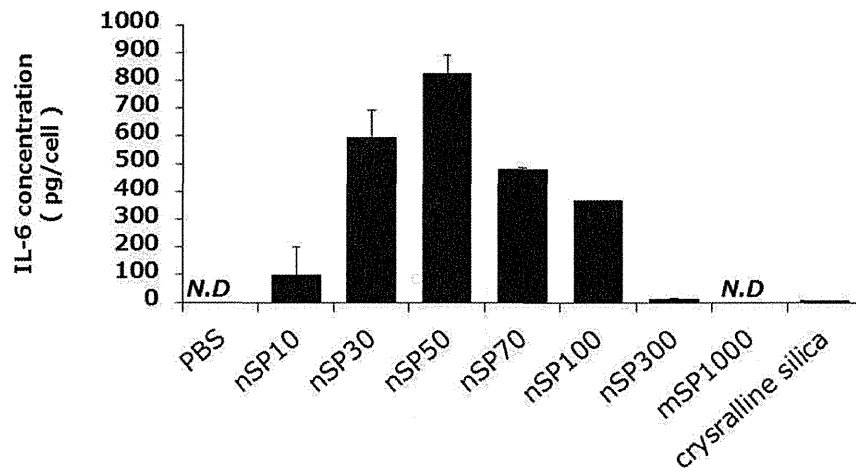


図 28. 非晶質ナノシリカを腹腔投与したマウス腹水中の浸潤細胞数及びサイトカイン産生. C57BL/6 マウスに各粒子径の非晶質シリカ、結晶質シリカを 1 mg/200 μ l/mouse で腹腔投与し、24 時間後に腹水を回収した。(A) 腹水中の浸潤細胞数を nucleo counter によって計数した。(B) 腹水中の IL-6 量を ELISA 法によって計測した。Data are presented as mean \pm SEMs

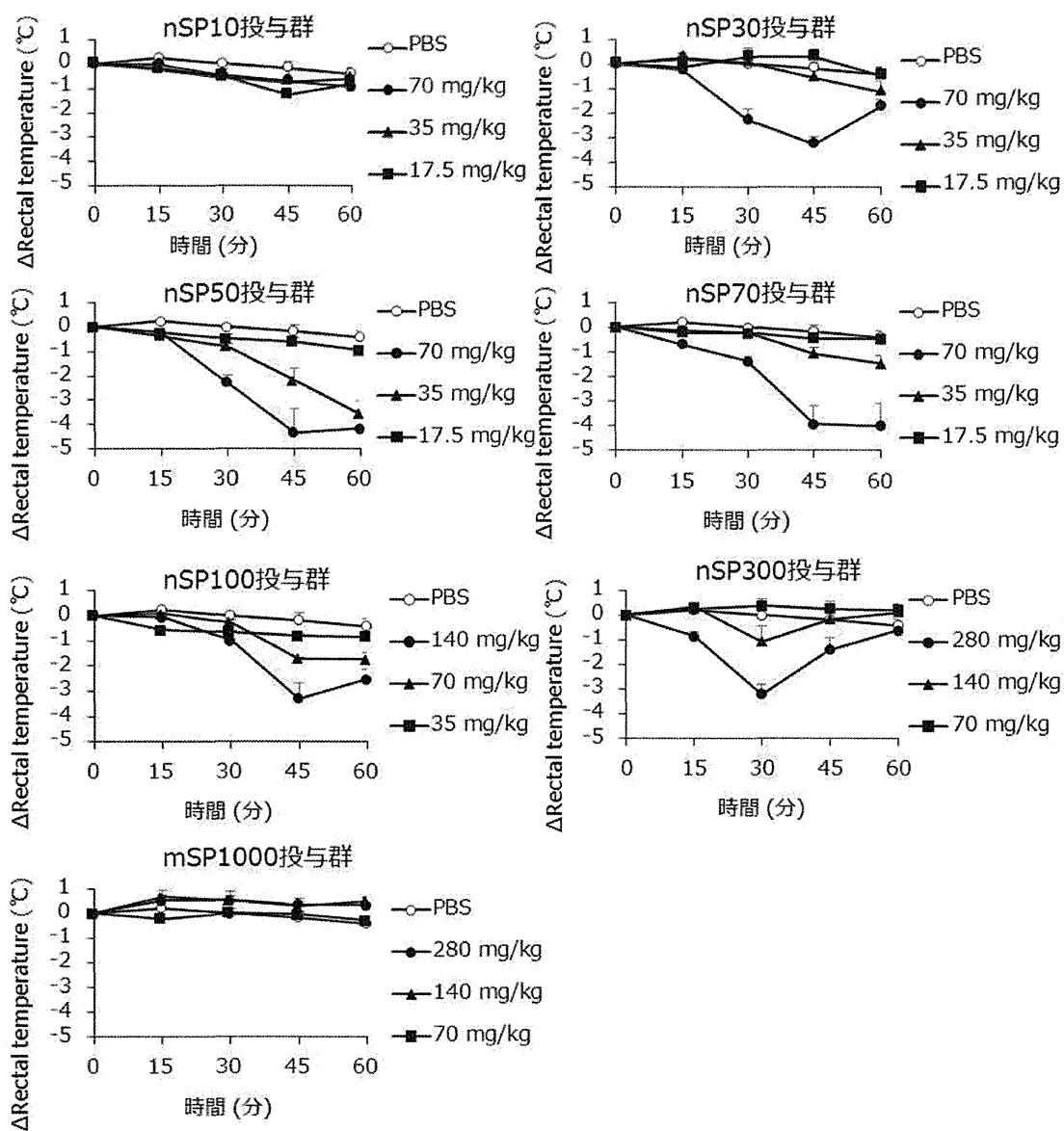


図 29. 非晶質シリカ過剰量投与時の急性毒性とサイズの連関解析.

C3H/HeN マウス (雌性 10 週齢) に PBS で希釈した nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000 (nSP10~70 : 17.5, 35, 70 mg/kg、nSP100 : 35, 70, 140 mg/kg、nSP300~mSP1000 : 70, 140, 280 mg/kg) をそれぞれ尾静脈より投与し、対照群には PBS を投与した。その後、投与後から 15 分毎に 60 分まで直腸体温の測定を行った。Data are presented as mean \pm SEMs

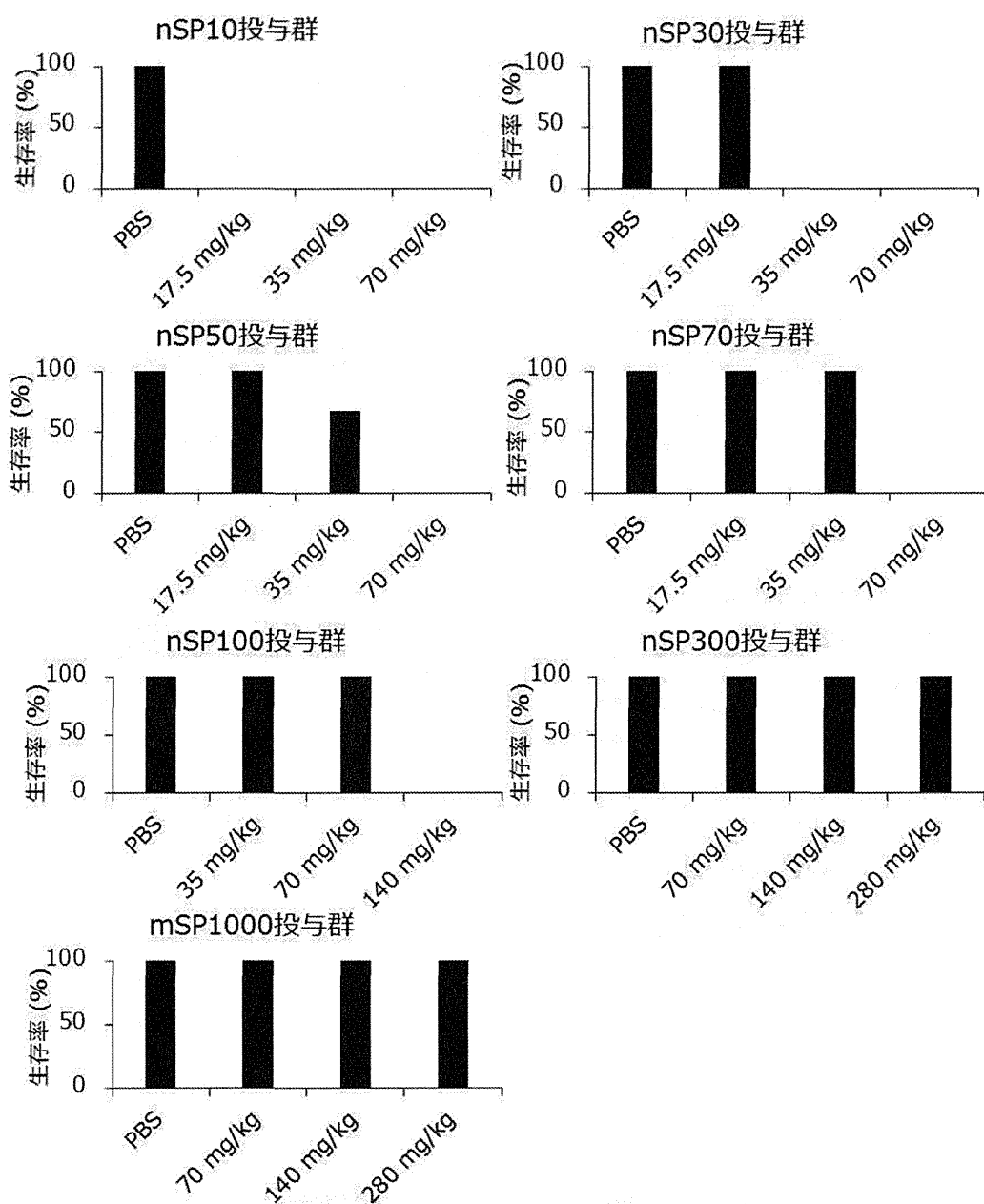


図 30. 非晶質シリカ過剰量投与時の急性毒性とサイズの連関解析. C3H/HeN マウス (雌性 10 週齢) に PBS で希釈した nSP10、nSP30、nSP50、nSP70、nSP100、nSP300、mSP1000(nSP10~70 : 17.5,35,70 mg/kg、nSP100 : 35,70,140 mg/kg、nSP300~mSP1000 : 70,140,280 mg/kg)をそれぞれ尾静脈より投与し、対照群には PBS を投与した。その後、投与 24 時間後における生存率を測定した。

ナノ・サブナノ素材の臓器毒性における閾値追求

研究分担者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野

研究要旨

近年、酸化アルミニウムナノ粒子が脳微小血管内皮細胞層のタイトジャンクション (TJ) 機能を崩壊させる、また酸化鉄ナノ粒子がヒト胎盤上皮細胞層の TJ シール機能を破壊するといったナノマテリアルの上皮バリア機能に及ぼす悪影響が報告されている。ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品分野において優れた機能を発揮する素材として世界的に使用量が飛躍的に増大している。したがって生体に対する影響を正確に評価する方法の確立が急務とされ、本研究においては上皮バリア機能に対するナノマテリアルのリスク解析基盤の構築を目的として、危険性を評価するためのマーカー遺伝子の同定を試みる。

生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。TJ には 2 細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と 3 細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ) があり上皮バリアを構築している。bTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌下痢毒素の受容体結合分子 (C-CPE184)、tTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌イオタ毒素受容体結合分子 (Ib421-664) を用い、C-CPE あるいは Ib421-664 を上皮細胞層に添加した時、発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ技術により網羅的に解析した。その結果、C-CPE184、1 2 時間処理後に 2 倍以上発現量が低下する遺伝子 800 個、上昇する遺伝子 422 個、Ib421-664、1 2 時間処理後に 2 倍以上発現量が低下する遺伝子 425 個、上昇する遺伝子 512 個が抽出された。今後、2 4 時間処理後の結果によりクラスター分けを行い更なる絞り込みを行う予定である。

A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーは、今世紀における重要案件である地球温暖化、生物多様性保持などの環境・エネルギー問題、また高齢化社会で必要とされる医薬品分野の他、食品分野、化粧品分野へ向けて技術革新に資する大きな期待が寄せられている。

このように、あらゆる分野で利用されているナノテクノロジーにおいて中核を成しているのがナノマテリアルである。ナノマテリアルは ISO (国際標準化委員会) により、「少なくとも 1 次元の大きさが 100 nm 以下に人工的に制御された素材」として定義され、従来までのサブミクロンサイズの素材に比して、粒子径の微小化に伴う組織浸透性や表面積の劇的増加により、電気・磁気・光学的特性や組織浸透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし既に食

品・医薬品・化粧品などの領域で様々な改善が施された製品が流通し、ナノマテリアルの使用量・利用範囲共に世界的に広がり続けている。

最近、ナノ粒子が上皮細胞層のタイトジャンクション (TJ) を破壊するという報告がなされ、生体の上皮バリアに与える悪影響が懸念されている。生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。

TJ には 2 細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と 3 細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ) があり上皮バリアを構築している。TJ が何らかの原因で崩壊すると異物や抗原となる物質が透過し炎症性疾患を引き起こすことになる。上述のように食品、医薬品、化粧品に使用されているナノ粒子が上皮バリアを破壊すれば重篤な疾病につながる可能性がある。したがって上皮バリアに対する

リスクを解析することはナノマテリアルの安全な使用において重要であると考えられる。

本研究においてはナノマテリアルの安全性評価に使用できるマーカー遺伝子の同定を目的として、bTJ と tTJ に作用し TJ を開口させる物質を用い、TJ が開口した時に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。

B. 研究方法

1. TJ binder の作製

ウェルシュ菌下痢毒素 (CPE) の C 末端側に存在する受容体結合部位 (C-CPE184) を bTJ binder として用いた。ネガティブコントロールとして受容体結合能が非常に低下した変異体 (C-CPE_{Y/L}) を用いた。C-CPE184 および C-CPE_{Y/L} は GST 融合蛋白質として大腸菌株 BL21 (DE3) で発現させた。まず、pGEX-C-CPE184 または pGEX-C-CPE_{Y/L} プラスミドを BL21 に導入し、100 mL の LB (+amp) 液体培地で一晚振盪培養した。翌日、small culture を 1 L の TB (+amp) 液体培地に加え、IPTG を終濃度 1 mM で用いて発現誘導した。次に、増幅した大腸菌を集菌し、STE buffer (10 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA) で懸濁後、ソニケーションにより菌体を破壊した。菌体抽出物は Glutathione Sepharose 4B カラム (GE Healthcare) に添加し、GST-C-CPE184 または GST-C-CPE_{Y/L} をカラムに結合させた。STE buffer を用いてカラムを丁寧に洗浄した後、Thrombin で GST を切断した。Thrombin は Benzamidine Sepharose 6B カラム (GE Healthcare) で除去し、C-CPE184 または C-CPE_{Y/L} は PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて PBS にバッファー置換した。精製した C-CPE184 または C-CPE_{Y/L} の濃度は BCA protein assay kit (Pierce Chemical) を用いて測定し、純度は SDS-PAGE により確認した。

ウェルシュ菌イオタ毒素 b (Ib) の C 末端側に存在する受容体結合部位 (Ib421-664) を tTJ

binder として用いた。Ib421-664 は GST 融合蛋白質として大腸菌株 BL21 (DE3) で発現させた。まず、pGEX-Ib421-664 プラスミドを BL21 に導入し、200 mL の TB(+amp) 液体培地で一晚振盪培養した。翌日、small culture を 2 L の TB (+amp) 液体培地に加え、IPTG を終濃度 1 mM で用いて発現誘導した。次に、増幅した大腸菌を集菌し、BufferF (50 mM Tris-HCl, pH7.5, 150 mM NaCl, 2 mM CaCl₂) で懸濁後、ソニケーションにより菌体を破壊した。菌体抽出物は Glutathione Sepharose 4B カラム (GE Healthcare) に添加し、GST-Ib421-664 をカラムに結合させた。BufferF を用いてカラムを丁寧に洗浄した後、Thrombin で GST を切断した。Thrombin は Benzamidine Sepharose 6B カラム (GE Healthcare) で除去し、Ib421-664 は PD-10 カラム (GE Healthcare) を用いて PBS にバッファー置換した。精製した Ib421-664 の濃度は BCA protein assay kit (Pierce Chemical) を用いて測定し、純度は SDS-PAGE により確認した。

2. 膜電気抵抗値 (TEER) の測定

EpH4 細胞を 12 well transwell insert (Corning) に 1×10^5 cell/cm² で播種し、1 日毎に経上皮膜電気抵抗値 (Transepithelial electric resistance : TEER) を Millicell ERS (Millipore) により測定しながら培地交換を行い、TEER 値が安定するまで 6 日から 7 日程度培養した。TEER 値が安定した段階で培地交換を行ってから TJ binder 添加、12 時間、24 時間後、TEER 値を測定し、サンプル添加時 (0 時間) の TEER 値に対する相対値を算出した。

3. RNA の抽出、品質検査

RNA later 試薬により細胞を回収し、溶解した細胞からの RNA 抽出は、RNesay mini kit (QIAGEN) のプロトコルに従って行った。抽出された RNA は UV 吸収測定とバイオアナライザにより品質検査を行い、マイクロアレイ解析に用いることができる十分な濃度と純度が得られたこと