

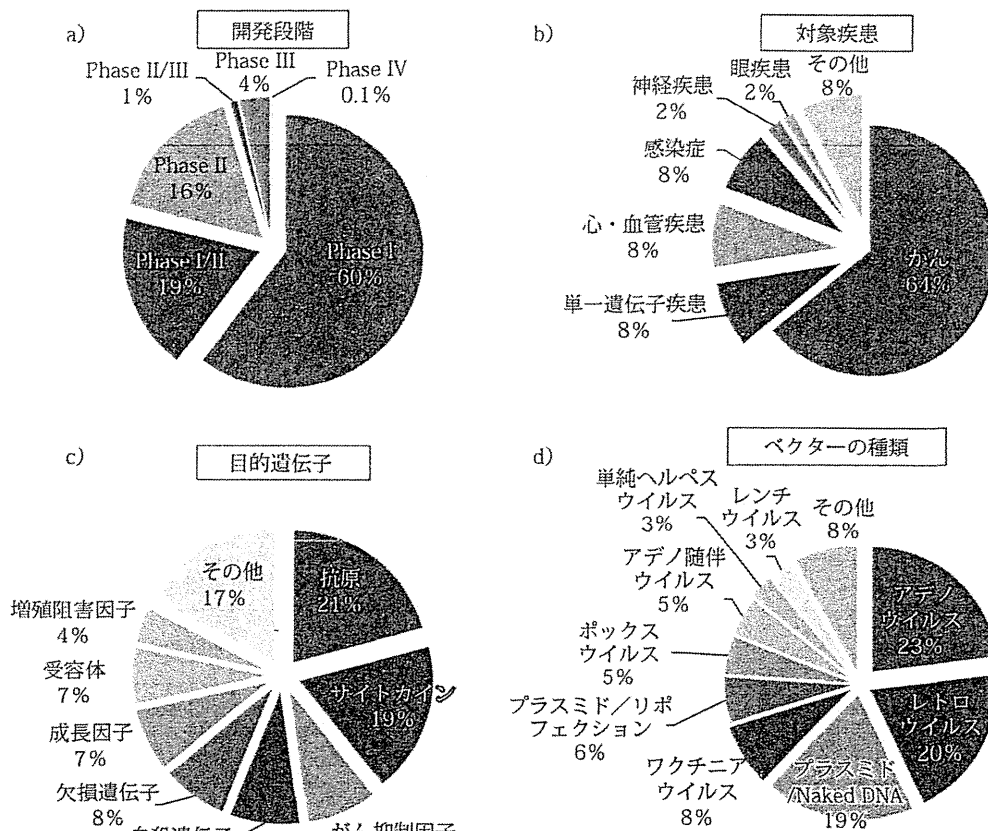
中の異常遺伝子と交換することは難しいためあらゆる遺伝子疾患に対応できるわけではないが、正常遺伝子の発現を補うことで治療効果が得られる疾患では効果的な治療法になる可能性がある。2012年にASGCT（米国遺伝子細胞治療学会）は、早期臨床試験の成功を受け、今後5～7年間で遺伝子治療薬の実用化が期待される10の対象疾患をTarget 10として提示したが、これらの多くは遺伝子疾患、希少疾患である（表5）。この他にも神経変性疾患（パーキンソン病等）、眼疾患、感染症など多様な疾患に対して遺伝子治療薬開発が進められている（図1）。以下に、疾患別の遺伝子治療の具体例を紹介する。

表4 臨床開発後期～承認された遺伝子治療薬の例

製品名 (INN)	ベクターの種類	目的遺伝子	適応症	開発段階
Gendicine	アデノウイルスベクター	P53	頭頸部がん	承認 (中国 2002)
Rexin G	レトロウイルスベクター	cyclin G1	固形がん	承認 (フィリピン 2006)
Oncoline	腫瘍溶解性アデノウイルス	—	がん	承認 (中国 2006)
Neovasculgen	プラスミドベクター	VEGF	末梢血管疾患	承認 (ロシア 2011)
Glybera	AAV ベクター	LPL (S447X バリエント)	LPL 欠損症	承認勧告 (EU 2012)
コラテジェン	プラスミドベクター	HGF	重症下肢虚血	承認申請 (取り下げ)
NV1FGF	プラスミドベクター	FGF-1	重症下肢虚血	Phase III
Allovectin-7	プラスミド /DMRIE : DOPE 複合体	HLA-B7 β2 ミクログロブリン	転移性メラノーマ	Phase III
Generx	アデノウイルスベクター	FGF-4	冠動脈疾患	Phase III
OncoVEX	腫瘍溶解性ヘルペスウイルス	GM-CSF	メラノーマ, 頭頸部がん	Phase III
TK-DLI	レトロウイルスベクター	HSV-TK/ΔLNGFR	白血病 (ドナーリンパ球輸注療法 GVHD 予防)	Phase III
(amolimogene bepiplasmid)	プラスミド/生分解性ポリマー複合体	16, 17 型 HPV 抗原 エピトープ	子宮頸部上皮内病変	Phase II/III
Reolysin	腫瘍溶解性レオウイルス	—	頭頸部がん	Phase III
GSK2696273	レトロウイルスベクター	ADA	ADA 欠損症	Phase III
CG0070	腫瘍溶解性アデノウイルス	GM-CSF	膀胱がん	Phase III
AAV2-hRPE65v2	アデノ随伴ウイルスベクター	RPE65	レーバー先天性黒内障	Phase III

表5 今後5～7年で実用化が期待される遺伝子治療薬の対象疾患 Target 10 (ASGCT による)

- レーバー先天性黒内障 (LCA)
- アデノシンデアミナーゼ欠損症 (ADA-SCID)
- 血友病
- X連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)
- パーキンソン病
- 加齢黄斑変性 (AMD)
- 副腎白質ジストロフィー (ALD)
- サラセミア
- EBウイルス関連リンパ腫
- メラノーマ



Journal of Gene Medicine (www.wiley.co.uk/genmed/clinical) より改変

図1 遺伝子治療薬開発の現状

1.3 遺伝性疾患の遺伝子治療

遺伝性疾患のうち、造血幹細胞移植により治療が可能な原発性免疫不全症や血液疾患などの造血系の単一遺伝子欠損症に対しては、染色体組込み能を持つレトロウイルスベクター又はレンチウイルスベクターを用いて正常遺伝子を自己の造血幹細胞に *ex vivo* で導入する造血幹細胞遺伝子治療の臨床試験が数多く実施され、顕著な効果が得られている³⁾。一方、増殖性の低い神経や筋肉細胞に対しては、AAVベクターを用いて正常遺伝子を局所に直接導入する *in vivo* 遺伝子治療が行われている。

1.3.1 原発性免疫不全症

(1) アデノシンデアミナーゼ (ADA) 欠損症

ADAはプリン系代謝酵素で、ADA欠損症はT細胞、B細胞が減少する原発性免疫不全症である。米国、日本ともにはじめての遺伝子治療はADA欠損症に対して実施された。当初のプロトコールはレトロウイルスベクターを用いて末梢血Tリンパ球にADA遺伝子を遺伝子導入する方法が用いられたが、遺伝子治療だけではなくADAの補充療法が併用された。後に骨髓由来造血幹細胞(CD34⁺細胞)への遺伝子導入が行われ、一回の治療で数年以上の長期間に渡り遺伝子発現が持続し、副作用もなく有効性が確認されている³⁾。現在、治験Phase IIIが実施されている。

(2) X連鎖重症複合免疫不全症(X-SCID)とレトロウイルスベクターによる発がんリスク

X-SCIDは免疫細胞への分化に関与するIL-2受容体コモンγ鎖遺伝子の欠損によりT細胞、NK細胞が欠損して重篤な免疫不全となる疾患である。1999年にフランスで開始された遺伝子治療では、レトロウイルスベクターを用いてコモンγ鎖遺伝子を造血幹細胞に *ex vivo* で導入する造血幹細胞遺伝子治療が実施された結果、ほとんどの患者で効果が認められたことから世界で初めての遺伝子治療の成功例として報告された⁴⁾。しかし、治療から3~5年後に、英国

での臨床試験と合わせて 20 名中 5 名という高頻度で染色体への挿入変異（LMO2 というがん原遺伝子部位の活性化）により白血病が発症するという重篤な副作用が明らかになった^{2,5)}。

レトロウイルスベクターはこれまで 300 件以上の臨床プロトコルに使用されている。先天性免疫不全症全体では 82 名の患者のうち、9 名に造血系異常の発症が確認されているが、分化した T 細胞への遺伝子導入では白血病発症は認められていない。また、先天性免疫不全症に対する造血幹細胞遺伝子治療の中でも、造血系異常の発症が確認されているのは X-SCID や Wiscott-Aldrich 症候群への遺伝子治療など T リンパ球の機能異常による免疫不全症、あるいは遺伝子発現効率の高い SFFV 由来レトロウイルスベクターを使った場合に限られている。さらに、白血病を発症した患者のうち 1 名以外は白血病の治療が成功し、X-SCID 遺伝子治療では 10 年後のフォローアップ解析の結果、白血病を発症した患者を含めて遺伝子治療の長期にわたる有効性が確認されている⁶⁾。このため、原発性免疫不全症の治療の第一選択は骨髄移植であるが、骨髄移植が実施できない患者ではリスク・ベネフィットを考慮すると造血幹細胞遺伝子治療はベネフィットがリスクに勝り、遺伝子治療を積極的に行うべきと考えられており、現在、数多くの原発性免疫不全症に対する遺伝子治療薬の開発研究が実施されている（表 6）。遺伝子治療による白血病の発症リスクが明らかになった後は、ベクターにより宿主遺伝子を活性化しないようにウイルスプロモーターを自己不活化（self-inactivating: SIN）したレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターの使用や、細胞あたりの導入遺伝子数を減らすなどの安全な投与法の検討、発がんの兆候となる細胞のクローン増殖を早期に発見するための患者の長期フォローアップの実施などが安全対策として取られている。

表 6 遺伝子治療研究が実施されている原発性免疫不全症（参考文献 3 より改変）

非臨床試験	臨床試験
複合免疫不全症	ADA 欠損症 (ADA-SCID)
・ RAG1 欠損症	X 連鎖重症複合免疫不全症 (X-SCID)
・ RAG2 欠損症	慢性肉芽腫症 (CGD)
・ アルテミス欠損症	JAK3 欠損症
・ IL7 受容体欠損症	白血球粘着異常症 (LAD)
・ PNP 欠損症	Wiscott-Aldrich 症候群 (WAS)
SAP 欠損症	
CD40L 欠損症	
X 連鎖無ガンマグロブリン血症	
IPEX 症候群	

(3) 慢性肉芽腫症 (CGD)

CGD は食細胞の機能異常による原発性免疫不全症のひとつである。CGD の中でも最も頻度が高く重症度も高いのが好中球の活性酸素生成酵素である NADPH オキシダーゼの gp91phox 変異であり、正常な gp91phox 遺伝子を用いた造血幹細胞遺伝子治療が複数実施され、長期的な治療効果が認められている⁷⁾。しかし遺伝子発現効率の高い SFFV レトロウイルスベクターを用いた臨床試験では、ベクターの MDS1-Evi1 部位への挿入による活性化が認められている⁸⁾。このため、最近ではレンチウイルスベクターを用いた臨床試験が行われている。日本では、成育医療センターにより MFGS レトロウイルスベクターを用いた臨床研究が実施される予定である。

(4) Wiskott-Aldrich 症候群 (WAS)

WAS は、Wiskott-Aldrich syndrome protein (WASP) 遺伝子変異による血小板減少、難治性湿疹、易感染性を三主徴とする X 連鎖性劣性原発性免疫不全症である。レトロウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療の有効性が認められている⁹⁾ が、1 名の患者で遺伝子導入による T 細胞白血病の発症が認められた¹⁰⁾。現在は、レンチウイルスベクターを用いた臨床試験が欧米で実施されている。

1.3.2 その他の遺伝性疾患

(1) X連鎖副腎白質ジストロフィー (ALD)

ALDはABCトランスポーターABCD1遺伝子の欠損により進行性脱髄を引き起こし、短期間で植物状態になる重篤な遺伝性疾患である。レンチウイルスベクターによりABCD1遺伝子を造血幹細胞に導入する造血幹細胞遺伝子治療により、治療を受けた小児2名とも症状の進行停止が確認されるという目覚ましい成果が報告されている¹¹⁾。

(2) βサラセミア

サラセミアはヘモグロビンを構成するグロビン遺伝子の欠失によりおこる先天性溶血性貧血である。レンチウイルスベクターを用いた造血幹細胞遺伝子治療では、治療から2年後でも効果が維持されていることが報告されている¹²⁾。レンチウイルスベクターもレトロウイルスベクターと同様染色体に組み込まれるため挿入変異の可能性があり、βサラセミアの遺伝子治療では遺伝子導入細胞のクローン性増殖も認められたが、これまでがん化は確認されていない。

(3) 家族性リポ蛋白リパーゼ (LPL) 欠損症

LPL欠損症はLPLの欠損による原発性高カイロミクロン血症である。Amsterdam Molecular Therapeutics社により開発されたGlybera(一般名alipogene tiparvovec)はLPLのバリエーションを発現するAAV1型ベクターで、適応は重度あるいは複数の膵炎発作を伴うLPL欠損症であり、筋肉内投与で用いられる。LPL欠損患者では血清中にトリグリセリドに富むリポ蛋白が蓄積するが、Glyberaには天然型LPLよりもトリグリセリドを低下させる作用が強いバリエーション遺伝子が用いられている。2010年に欧州で承認申請されたが、最近、欧州医薬品評価委員会により販売承認の勧告が出されており、正式に承認されると欧州で初めての遺伝子治療薬となる(表4)。

(4) レーバー先天性黒内障 (LCA)

LCAは網膜色素上皮細胞に特異的に発現するRPE65遺伝子の欠損により小児期に視力が低下し、失明に至る先天性視覚障害である。LCAの遺伝子治療は複数実施されているが、RPE65遺伝子をAAV2型ベクターを用いて網膜内に遺伝子導入したところ、投与した12名全員が視力(光感受性)を回復し、一回の投与で効果が1年以上持続したという極めて有望な成果が報告されている¹³⁾。最近、臨床試験Phase IIIが開始されている。

(5) 血友病

血友病は血液凝固第Ⅷ因子(血友病A)または第Ⅸ因子(血友病B)の欠損あるいは低下による血液凝固異常症である。血友病に対する遺伝子治療は複数試みられているが、重症血友病Bの患者に対して第Ⅸ因子遺伝子を搭載したAAV2/8型シュードタイプベクターを静脈内に投与した結果、単回投与により1年以上にわたり第Ⅸ因子の血中レベル維持が確認され、6例中4例で第Ⅸ因子の予防的投与が不要になったと報告されている¹⁴⁾。

1.3.3 Genethonの希少疾患に対する遺伝子治療薬開発の取り組み

フランスのNPO団体であるGenethonは、フランスの筋疾患協会がTelethonというテレビマラソンから得た資金により、遺伝性疾患の理解に役立つツールの開発を目的として1990年に設立したNPO団体である。1990年代はヒトゲノムのマッピングや遺伝性疾患の遺伝子探索を手掛け、さらに遺伝子治療用ベクター(AAV, レトロ, レンチ)の開発に取り組み、現在は希少疾患・難病に特化した臨床用遺伝子治療薬の製造、臨床開発を行っている。現在、サルコグリカン異常症に対する遺伝子治療臨床試験Phase Iが終了し、またWASに対するPhase I/II国際共同治験を実施中である。その他にもCGD, Duchenne型筋ジストロフィー(DMD), レーバー症候群, 放射線感受性重症複合免疫不全症, Crigler-Najjar症候群, アルファサルコグリカン異常症, 脊髄性筋萎縮症, ジスフェリン異常症, 心筋ミオパチー, 筋細管ミオパチーといった希少疾患に対する遺伝子治療薬の開発研究が実施されている。希少疾患・難病はその希少性ゆえに採算がとれず企業レベルでの遺伝子治療薬開発が行われにくいという現状があり、ほとんどは大学等での臨床研究に終わっているが、Genethonの取り組みはこのような希少疾患に対する遺伝子治療薬の開発の一つの方向性を示すものである。一方、大手の製薬会社の中にも企業の社会的責任として希少疾患・難病治療薬開発への取り組みを始めている会社がある。現在、イタリアではGlaxoSmithKline(GSK)社によりレトロウイルスベクターを用いたADA欠損症に対する造血幹細胞遺伝子治療の治験が開始されており、遺伝子治療薬の製品化が期待される。

1.4 非遺伝性疾患に対する遺伝子治療

1.4.1 パーキンソン病

パーキンソン病は中脳の黒質の神経細胞の変性脱落が原因となる神経変性疾患で、ほとんどは遺伝性ではないが、若年発症の一部は家族性に発現する。パーキンソン病では黒質により産生され線条体の神経終末に蓄積される神経伝達物質のドパミンが欠乏することにより運動症状が出現する。ドパミンはチロシンから合成されるが、まずチロシンからチロシン水酸化酵素 (TH) と GTP シクロヒドロラーゼ I (GCH) の作用により L-DOPA が産生し、さらに L-DOPA に芳香族アミノ酸脱炭酸酵素 (AADC) が作用してドパミンに変換される。パーキンソン病の遺伝子治療では、AAV ベクターを用いて AADC を線条体に導入する遺伝子治療が米国及び日本 (自治医大) で実施され、一定の効果が確認されている¹⁵⁾。また、レンチウイルスベクターを用いて TH, GCH, AADC を導入する遺伝子治療や、パーキンソン病に対する別のアプローチとして Neurturin という神経栄養因子の遺伝子を導入する臨床試験も行われている¹⁶⁾。

1.4.2 血管新生遺伝子治療

2011 年、ロシアで初めての遺伝子治療薬として Neovasculgen が承認された (表 4)。Neovasculgen は血管内皮細胞増殖因子 (VEGF) 遺伝子を搭載したプラスミドベクターで、適応は動脈硬化による重症下肢虚血を含む末梢血管疾患である。血管新生を誘導して側副血行路の形成により治療効果が期待される。

日本で 2008 年に遺伝子治療薬で初めて承認申請されたコラテジェン (一般名ベペルミノゲン ペルプラスミド) も血管新生遺伝子治療薬である。コラテジェンは肝細胞増殖因子 (HGF) 遺伝子を搭載したプラスミドベクターで、難病のバージャー病や重症下肢虚血を対象疾患として 2008 年に承認申請された。現在、申請は取り下げられているが、今後、国際共同試験 Phase III が予定され製品化を目指している。投与法は筋肉内への直接投与である。また、HGF は血管新生作用のほかにリンパ管新生作用を持つことが見出されており、難病の原発性リンパ浮腫を対象疾患とする Phase I 臨床試験も開始が予定されている。

1.4.3 がん遺伝子治療

遺伝子治療臨床試験の 6 割以上はがんを対象疾患としたものである (図 1b)。がん抑制遺伝子、自殺遺伝子、増殖阻害因子、免疫活性化因子など様々な目的遺伝子を搭載した遺伝子治療薬の臨床試験が行われてきたが (図 1c)、従来の非増殖性ウイルスベクターはその効果が感染細胞に限定され、十分な抗腫瘍効果は得られていない。最近の開発動向としては、がん細胞で特異的に増殖する腫瘍溶解性ウイルスや、遺伝子改変した細胞傷害性 T 細胞を用いる方法など、従来のがん遺伝子治療の欠点を克服する試みが行われている。

(1) 自殺遺伝子

単純ヘルペスウイルス I 型チミジンキナーゼ (HSV-TK) 遺伝子をがん細胞に導入し、プロドラッグであるガンシクロピルの投与により、HSV-TK 遺伝子が導入された細胞を選択的に細胞死に導く自殺遺伝子療法が検討されているが、これまで十分な効果は得られていない。しかし、自殺遺伝子は他の使い方も検討されている。白血病などの造血器悪性腫瘍の治療で同種造血幹細胞移植を行う際、白血病細胞や腫瘍組織への攻撃を期待してドナーリンパ球輸注療法が行われるが、ドナーリンパ球により宿主細胞が攻撃される移植片対宿主病 (GVHD) が発症する可能性がある。MolMed 社により開発中の遺伝子治療は、HSV-TK 遺伝子を導入したドナー T 細胞を輸注し、GVHD が発症した場合はガンシクロピル投与により遺伝子導入ドナー T 細胞を殺すことで重篤な GVHD の発症を予防するというものである。現在、Phase III 臨床試験が実施されている。

(2) 腫瘍溶解性ウイルス

腫瘍溶解性ウイルスは、標的とするがん細胞内で特異的に増殖するウイルスであり、感染細胞内で増殖して細胞を破壊・死滅させるのみならず、その際放出されたウイルスが周辺のがん細胞や遠隔転移したがん細胞にも感染したり、腫瘍溶解に伴い抗腫瘍免疫を誘導することによる高い抗腫瘍効果が期待されている。腫瘍溶解性ウイルスには腫瘍で特異的に増殖する性質を持つ野生型ウイルスや弱毒化ウイルスを利用したもの、ヘルペスウイルスやアデノウイルスから病原性に関与する遺伝子を除きがん細胞で増殖するように遺伝子改変したもの、さらに治療用遺伝子を搭載して抗腫瘍効

果を高めたものなどが開発されている。中国では腫瘍溶解性アデノウイルス Oncorine が承認されている（表 4）。

国内では、希少癌である神経膠芽腫を対象疾患として増殖型遺伝子組換え単純ヘルペスウイルス G47Δ の臨床研究が東京大学で実施されており、今後、前立腺癌に対しても臨床研究が行われる予定である。タカラバイオが開発中の単純ヘルペスウイルス自然変異弱毒株 HF10 は、米国で頭頸部がんを対象とした第一相臨床試験を実施中である。また、テロメラインはオンコリスバイオファーマが開発中の腫瘍溶解性アデノウイルスで、ヒトテロメラーゼ逆転写酵素プロモーターがアデノウイルス 5 型の E1 領域に組み込まれており、テロメラーゼ活性が上昇している癌細胞で特異的に増殖して殺腫瘍効果を発揮することが期待される。各種進行性固形癌を対象にした米国での Phase I 臨床試験を終了しており、国内でも臨床研究の実施が予定されている。

(3) 遺伝子改変 T 細胞療法

がん細胞に対する抗腫瘍免疫を誘導して治療するがんの免疫療法は、がん遺伝子治療でも古くからサイトカインなどの導入により様々な方法で試みられてきたが十分な効果は得られていない。しかし最近、ex vivo 遺伝子導入により、患者の末梢血 T 細胞を抗腫瘍免疫の中心となるがん細胞特異的な細胞傷害性 T 細胞（CTL）に改変して患者に投与する遺伝子改変 T 細胞療法が活発に行われている。T 細胞に導入する遺伝子は、がん抗原特異的な T 細胞受容体遺伝子、またはキメラ抗原受容体（Chimera antigen receptor ; CAR）遺伝子が用いられている。CAR とは、がん抗原と結合する単鎖抗体と T 細胞受容体シグナルドメインとのキメラ分子で、CAR を発現する CTL はがん抗原を認識すると活性化される（図 2）。T 細胞への遺伝子導入にはレトロウイルスベクターやレンチウイルスベクターが用いられる。T 細胞受容体遺伝子治療は、国内では三重大学で MAGE-A4 抗原を発現する食道がんを対象とした臨床研究が実施されている。また、CAR 遺伝子治療では、米国で行われた難治性 B 細胞腫瘍の遺伝子治療において、CD19（B 細胞抗原）を認識する CAR 遺伝子をレンチウイルスベクターにより導入した遺伝子改変 T 細胞の投与により、3 名中 2 名で完全寛解が認められたという極めて有望な成果が得られている¹⁷⁾。この報告はがんの遺伝子治療で顕著な有効性が確認された初めての例であり、今後の臨床開発が注目される。

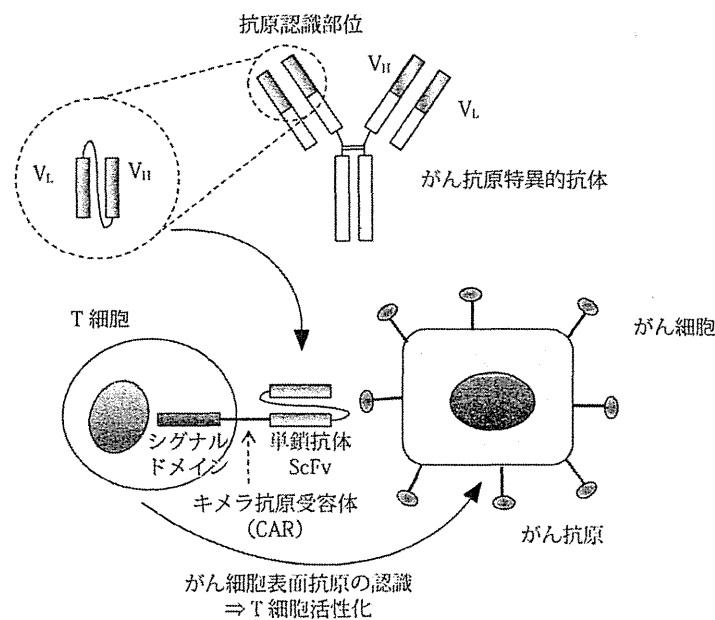


図 2 キメラ抗原受容体（CAR）を導入した改変 T 細胞遺伝子治療

1.5 遺伝子治療薬開発の新たな動向

遺伝子治療は先に述べたように先天性単一遺伝子欠損症に対しては有効性が得られているが、現在の遺伝子治療は異常遺伝子を正常な遺伝子に交換する gene correction ではなく、正常遺伝子を不特定の部位に導入する gene addition

であり、そのために挿入変異が生じたり、異常遺伝子の発現が原因となる疾患には適用できないことや遺伝子発現の調節が困難で対象疾患が限定されるなどの問題が生じている。このような問題を解決する方法のひとつに、最近進歩の著しいゲノム編集技術を利用する方法が検討されており、ゲノム編集技術により異常遺伝子を正常遺伝子に置き換える遺伝子修正、究極の遺伝子治療が可能になりつつある。

ゲノム編集技術とは、人工ヌクレアーゼを用いてゲノム上の標的部位に対して特異的に二本鎖切断（DSB）を行い、部位特異的に相同組換えを誘導する技術であり、Zinc Finger Nuclease（ZFN）¹⁹⁾、Transcription Activator-Like Effector Nuclease（TALEN）¹⁹⁾などが開発されている。ZFNは、Zinc-Fingerと呼ばれるDNA結合ドメインと、Fok IのDNA切断ドメインの2つの機能ドメインで構成された人工キメラタンパク質で、Zinc-Finger部分は一つの α -helixが3塩基を認識するというfinger構造がタンデムに並んでゲノム上の特異的な遺伝子配列を認識し、Fok I部分はDNA鎖を切断して非常に特異性の高い二本鎖切断（DSB）を引き起こす。哺乳動物細胞は相同組換え効率が非常に低いが、DSBがおこると相同組換え効率は数千倍高くなるため、ZFNを利用してゲノム編集が可能となる。既に、AIDS患者T細胞のCCR5受容体をZFNを利用して不活化し、HIV感染抵抗性T細胞を作製するという遺伝子治療臨床試験も実施されている。また、動物実験レベルでは、ZFNを用いた相同組換えにより血友病モデルマウスの異常遺伝子のin vivo修正に成功したこと²⁰⁾や、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症患者由来iPS細胞で $\alpha 1$ アンチトリプシン遺伝子の完全修復に成功したこと²¹⁾などが報告されている。TALENもZFNと同様、DNA結合部位とFok Iからなる人工酵素で、ZFNが3塩基ずつ認識するのに対し、TALENはTALEと呼ばれる34アミノ酸からなる繰り返しユニット一つが1塩基を認識する。TALENはZFNよりも新しい技術で、DNAの4種類の塩基A、G、C、Tに対応する4種類のユニットの組み合わせによりどのような配列にも対応できることからZFNよりも作製が容易であり、今後、ゲノム編集での活用が進むと考えられる。

一方、従来の遺伝子治療用ベクターは搭載できる遺伝子サイズに限界があるが、これを解決する一つの手段としてヒト人工染色体ベクターの開発も行われている。2.4Mbという巨大なジストロフィン遺伝子は通常のウイルスベクターに搭載できないが、ヒト人工染色体ベクターには搭載が可能であり、人工染色体ベクターを用いて幹細胞に遺伝子導入することにより筋ジストロフィーモデルマウスの運動機能の回復に成功したことが報告されている²²⁾。ゲノム編集技術や人工染色体などの新しい技術はまだオフ・ターゲット効果や細胞へのベクターの導入方法などに課題があるが、今後、遺伝子治療薬の応用範囲が広がる可能性を秘めた技術として注目される。

2. 核酸医薬品

2.1 核酸医薬品の種類

核酸医薬品とは、タンパク質をコードすることなく、核酸そのものが機能を有する医薬品の総称で、アンチセンス、siRNA、デコイ核酸、アプタマー、miRNA関連医薬品などが該当する。いずれも化学合成されたオリゴヌクレオチドが用いられるが、構造、性質、作用機構はそれぞれ異なる（表7）。アンチセンス医薬品やRNAi医薬品は標的遺伝子のmRNAとの相互作用により遺伝子発現抑制に働くが、アプタマーはタンパク質に結合し、その機能の抑制に働く分子標的医薬である。なお、アンチセンスやshRNAをベクターで発現させる場合もあるが、これは遺伝子治療薬に分類される。核酸医薬品は従来の低分子医薬品や抗体医薬品では標的にできなかった多くの“Undruggable”な分子をターゲットにできることから、抗体医薬品に続く次世代の分子標的医薬として注目されている。生体内安定性やDDS、オフ・ターゲットなどの問題があり、現在は世界で2品目が承認されているだけであるが、数多くの臨床試験が行われており、開発段階の進んだものも増えてきている。核酸医薬品はその物質的性質、機能的性質から、ひとつのプラットフォームが完成すれば短期間のうちに新規医薬品が次々と誕生すると考えられており、核酸修飾技術やドラッグデリバリー技術の進展に伴い承認医薬品が増加することが期待される。以下に主な核酸医薬品の特徴と、希少疾患・難病治療薬としての開発例について概説する。

表7 核酸医薬品の種類

	アンチセンス	siRNA	miRNA 関連医薬品	デコイ核酸	アプタマー
構造	一本鎖 DNA/RNA (13-25 塩基)	二本鎖 RNA (21-23 塩基)	一本鎖 RNA (20-25 塩基)	二本鎖 DNA	一本鎖 RNA/DNA (15-100 塩基)
標的	mRNA	mRNA	miRNA	転写因子	タンパク質
機能	mRNA に結合して翻訳を阻害	RNAi の機構により mRNA を切断して発現抑制	・miRNA の補充 ・miRNA の阻害 (アンチセンスを利用)	転写因子をトラップして転写を阻害	標的タンパク質と結合して、その機能を阻害
製品化	「Vitravene」 標的：サイトメガロウイルス遺伝子 適応：CMV 性網膜炎 1998 年承認 (米国)	—	—	—	「マクジェン」 標的：VEGF 適応：加齢黄斑変性 2008 年承認 (日本)

表8 希少疾患、難病に対する核酸医薬品開発の例

核酸医薬品の種類	一般名又は開発コード	標的	適応症	開発段階
アンチセンス	Vitravene	サイトメガロウイルス	AIDS 患者の CMV 性網膜炎	承認
アンチセンス	mipomersen	apoB100	家族性高コレステロール血症 (LDL 受容体変異)	承認申請中
アンチセンス	GSK968	ジストロフィン (エキソン 51)	Duchenne 型筋ジストロフィー	Phase III
アンチセンス	eteplirsen	ジストロフィン (エキソン 51)	Duchenne 型筋ジストロフィー	Phase II b
アンチセンス	ALT1103	成長ホルモン受容体	末端肥大症, 糖尿病性網膜症	Phase II
アンチセンス	miravirsin	miR-122	C 型肝炎	Phase II
アンチセンス	ISIS-SMNRx	サバイバルモーターニューロン	脊髄性筋萎縮症	Phase I
アンチセンス	ISIS-TTRx	トランスサイレチン遺伝子	トランスサイレチンアミロイドーシス	Phase I
アンチセンス	ISIS-AATrx	$\alpha 1$ アンチトリプシン	$\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症	前臨床
siRNA	ALN-TTR	トランスサイレチン	トランスサイレチンアミロイドーシス	Phase II
siRNA	ALN-PCS	PCSK9	高コレステロール血症	Phase I
siRNA	ALN-APC	アンチトロンピン	血友病	前臨床
siRNA	ALN-HPN	トランスフェリン受容体 2 型	難治性貧血	前臨床
siRNA	ALN-TMP	膜貫通セリンプロテアーゼ 6	異常ヘモグロビン症	前臨床
アプタマー	ペガプタニブ	VEGF165	加齢黄斑変性	承認
アプタマー	ARC1779	vWF	血栓性血小板減少性紫斑病	Phase II
アプタマー	ARC29499	組織因子経路インヒビター	血友病	Phase I

2.2 アンチセンス核酸医薬品

アンチセンス核酸は、標的タンパク質の mRNA の塩基配列 (センス配列) と相補的な塩基配列 (アンチセンス配列) を持つ 13 ~ 25 塩基程度の短い一本鎖の核酸で、特定の mRNA と特異的に結合することにより標的タンパク質の発現を抑制する分子標的薬である。作用機構としては mRNA との結合による転写や翻訳の阻害に加えて、内在性の RNase H が DNA と RNA の結合に作用して mRNA を特異的に切断することで遺伝子発現が抑制されると考えられている。アンチセンス技術は 20 年以上の歴史があり、1998 年に世界で初めての核酸医薬として承認された Vitravene もアンチセンス医薬品であった。Vitravene は、サイトメガロウイルス (CMV) を標的とするアンチセンスで、AIDS 患者の CMV 性網膜炎の治療薬として承認されたが、AIDS 治療薬の進歩により対象疾患が減少したため現在は販売が中止されている。その後、siRNA の登場により遺伝子の発現抑制に働く核酸医薬品としては siRNA の開発に注目が集まって

いるが、第二世代のアンチセンスの登場により臨床開発が急速に進んでいる。

アンチセンス核酸はそのままでは血清や細胞に含まれるヌクレアーゼにより加水分解されてしまうため、ヌクレアーゼに耐性を持つ様々な化学修飾が開発されて用いられている。第一世代のアンチセンスではリン酸バックボーンにS基を導入して血中滞留性に優れたホスホロチオエート型修飾核酸が広く用いられた。第二世代のアンチセンスは①2'-O-メチル化核酸、②ヌクレオチドの2'と4'位を架橋したロックド核酸 (Locked Nucleic Acid ; LNA)、③人工核酸であるモルフォリノ (Phosphorodiamidate morphorino oligomer ; PMO) など、様々な修飾核酸が用いられている。第二世代のアンチセンスは生体内での安定性や標的配列との結合性が向上しており、局所投与に限定されていたアンチセンス DNA の限界が突破された。

アンチセンスはさまざまな疾患を対象に開発が進んでいるが、希少疾患・難病に対するアンチセンスとして最も開発が進んでいるのは、Genzyme 社の mipomersen であり、2011年に欧州、米国で2012年に米国で承認申請されている。mipomersen は家族性高コレステロール血症のうち、LDL 受容体遺伝子に変異をホモで持っている重症患者を対象とするアンチセンスであり、標的分子はリポタンパク質 apoB100 である。2'-O-メチル化アンチセンスであり、静脈内投与で作用する。

Duchenne 型筋ジストロフィー (DMD) の治療薬としては、エキソン・スキッピング誘導療法に用いられるアンチセンスが複数開発されている。筋ジストロフィーの原因遺伝子であるジストロフィン遺伝子は79ものエキソンからなる巨大な遺伝子で、DMD では遺伝子変異により特定のエキソン以降が発現されなくなるために機能するジストロフィタンパク質が欠如している。エキソン・スキッピング誘導療法とは、アンチセンスを使って変異のあるエキソンを読み飛ばして読み取り枠を修正し、少し短縮されているが機能を持つジストロフィタンパク質を発現させる方法である。GSK 社の GSK2402968 (GSK968) はエキソン 51 をスキップする 2'-O-メチル化アンチセンスで、現在、国際共同治験 Phase III が行われており、日本も参加している。エキソン 51 のスキッピングにより治療効果が得られるのは DMD 患者の約 16% と考えられている²³⁾。米国 Sarepta Therapeutics 社が開発中の eteplirsen も DMD を対象とするエキソン 51 スキッピングアンチセンスであり、Phase II b が実施されている。eteplirsen は生体内の酵素による分解を受けず、免疫応答も誘導しないモルフォリノアンチセンスオリゴである。

アンチセンス開発の中心的なベンチャーである ISIS Pharmaceutical 社は、重篤希少疾患を対象とするアンチセンスの開発を行っている。ATL1103 は成長ホルモン受容体を標的とするアンチセンスで、末端肥大症、糖尿病性網膜症を対象とし、2012年にPhase IIが予定されている。他にも脊髄性筋萎縮症 (開発コード ISIS-SMNRx)、トランスサイレチンアミロイドーシス (ISIS-TTRx)、 $\alpha 1$ アンチトリプシン欠損症 (ISIS-AATrx) を適応症とするアンチセンスを開発中である。

2.3 siRNA 医薬品

siRNA (small interfering RNA) は、21 ~ 23 塩基の短い二本鎖 RNA であり、これと相補的な塩基配列を有する mRNA を特異的に分解して、その遺伝子発現を抑制する作用を持つ (RNA interference : RNAi)。RNAi の原理により遺伝子発現を抑制する核酸医薬品は RNAi 医薬品と呼ばれる。RNAi の発見以降、siRNA はアンチセンスよりもサイレンシング効果が高いため基礎研究でよく用いられ、特定の遺伝子発現をノックアウトする分子標的医薬品としての開発も期待されている。しかし、今のところ生体内安定性や DDS、標的以外に作用するオフ・ターゲット効果などの問題があり、まだ医薬品として実用化はされていない。これまで開発が進められている siRNA は、眼球内などの局所投与か、あるいは核酸が集積しやすい肝臓、腎臓を標的としたものである。

希少疾患に対する siRNA の開発例としては、Alnylam 社が unmet medical needs に特化した siRNA の開発を行っている。ALN-TTR は肝臓で発現するトランスサイレチンを標的とする siRNA であり、トランスサイレチンアミロイドーシスを対象に Phase II 臨床試験が実施されている。投与法は静脈内投与である。また、ALN-PCS は高コレステロール血症を対象疾患とする siRNA で、Phase I が実施されている。LDL コレステロールの代謝に関与する PCSK9 を標的とする siRNA で、血中の PCSK9 レベルを下げることで肝臓の LDL 受容体が増加し、LDL コレステロールレベルを下げることで期待される。その他にも非臨床段階のものでは、血友病 (ALN-APC)、難治性貧血 (ALN-HPN)、 β サラセミア

や鎌状赤血球貧血等の異常ヘモグロビン症（ALN-TMP）に対する siRNA の開発が行われている。

2.4 miRNA 関連医薬品

miRNA (microRNA) とは、細胞内に存在する 20 ~ 25 塩基の短い一本鎖 RNA であり、他の遺伝子の発現を調節するがタンパク質に翻訳はされない non coding RNA の一種である。がん遺伝子やがん抑制遺伝子の機能を持つ miRNA や、神経変性疾患、心血管疾患、代謝性疾患など様々な疾患に関わる miRNA が同定されてきており²⁴⁾、miRNA は新たな治療標的として注目されている。miRNA 関連医薬品としては、①低下した miRNA を補充するために用いられる miRNA 補充療法（基本的に生体内に存在する miRNA と同じ作用機序）、②増加した miRNA を抑制する miRNA 阻害剤（miRNA に対するアンチセンス）、の 2 種類の開発が現在進められている。

miRNA 関連医薬品として最も開発が進んでいるのは Santaris 社が開発中の miR-122 阻害剤であり、C 型肝炎ウイルス（HCV）感染症治療薬として Phase II 臨床試験が行われている。HCV が人に感染するには肝臓で発現している miR-122 を必要とすることから、miR-122 を阻害することにより HCV の増殖抑制が期待される。アンチセンスには生体内安定性を高めた LNA 修飾核酸が使用されている。

miRNA 補充療法はまだ臨床では用いられていないが、がんが発現が低下している let-7、miR-34、miR-29 などのがん抑制遺伝子タイプの miRNA を補充する治療法の研究開発が行われている。

2.5 アプタマー医薬品

アプタマーは 20 ~ 100 塩基程度の一本鎖の RNA 又は DNA 分子で、その立体構造により、抗体と同様に標的分子に特異的に結合して機能を阻害する核酸医薬である。核酸医薬のうち、アンチセンス核酸や siRNA、miRNA は塩基配列を標的としているが、アプタマーは細胞外で作用するサイトカイン等の因子やその受容体などのタンパク質を標的としている。細胞内に入る必要はないため核酸医薬品で問題となる DDS をあまり考慮する必要がない。アプタマーは、試験管内人工進化（SELEX）法と呼ばれる目的タンパク質に結合する人工配列 RNA の選択サイクルを何度も繰り返すことにより、高い親和性を持つものを選択して作製する。抗体よりも親和性、特異性が高いものを得ることが可能といわれる。また、抗体と異なり化学合成が可能で免疫原性も低いという利点があり、抗体に代わる次世代の分子標的薬として期待されている。

アプタマー医薬品は、既に日本で初の核酸医薬品であるマクジェン（一般名ペガプタニブナトリウム）が加齢黄斑変性症治療薬として 2008 年に承認され、医療現場で使用されている。マクジェンは、血管内皮増殖因子（VEGF）の中でも眼内における血管新生への関与が最も深い VEGF165 を選択的に阻害するアプタマーで、脈絡膜新生血管の成長を抑え、視力の低下スピードを抑制する作用を持つとされる。投与法は眼内局所投与である。

希少疾患治療薬としてのアプタマーの例としては ARC1779、ARC29499 などの開発が Archemix 社により行われている。ARC1779 は von Willebrand factor (vWF) を標的とするアプタマーで、vWF の活性を阻害することにより血液凝集を阻害し、血栓の形成を防ぐ作用が期待される。血栓性血小板減少性紫斑病治療薬として Phase II 臨床試験が行われている。また、ARC19499 は、血友病を対象疾患とするアプタマーで、標的分子は外因性血液凝固反応抑制作用を持つ組織因子経路インヒビター（Tissue factor pathway inhibitor : TFPI）である。血友病 A は第Ⅷ因子、血友病 B は第Ⅸ因子が欠損した遺伝性血液凝固異常症で、欠損している凝固因子の補充療法が行われているが、アプタマーにより生体内の TFPI を阻害することで凝固因子の補充を減らす効果が期待される。ARC29499 は Phase I での効果と安全性が確認されている。

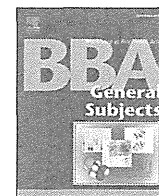
おわりに

近年、先天性代謝異常症の酵素補充療法に用いるバイオ医薬品が希少疾病用医薬品（オーファンドラッグ）として相次いで承認されている。代謝異常症は酵素補充療法により治療が可能であるが、根治療法ではないため生涯にわたる薬の投与が必要であり、高額な薬剤費負担がかかる。これが例えば遺伝子治療であれば、一回の治療で長期間の有効性が得られる可能性があり、有望な治療法になる可能性がある。このように遺伝子治療薬や核酸医薬のアプローチが有効な

希少疾患が様々にあると思われる。遺伝子治療のように一回の治療で根治するとなると企業による開発が進みにくいと思われるが、Genethon や GSK 社のような取り組みが増え、希少疾患・難病の治療薬開発が進むことを期待したい。希少疾患を中心に遺伝子治療薬と核酸医薬の開発の具体例を紹介してきたが、紹介できたものはごく一部である。本稿が希少疾患・難病の治療薬開発を考える一助になれば幸いである。

文 献

- 1) E. Marshall, *Science*, 286, 2244 (1999)
- 2) Hacein-Bey-Abina S et al : *Science*, 302, 568 (2003)
- 3) A. Aiuti & M. G. Roncarolo, *Hematology*, 2009, 682 (2009)
- 4) Hacein-Bey-Abina S et al : *N. Engl. J. Med.*, 364, 1185 (2002)
- 5) Hacein-Bey-Abina S et al : *J. Clin. Invest.*, 118, 3132 (2008)
- 6) Hacein-Bey-Abina et al, *New Engl. J. Med*, 363, 35 (2010)
- 7) E. M. Kang et al., *Blood*, 115, 783 (2010)
- 8) M. G. Ott et al., *Nat. Med.*, 12, 401 (2006)
- 9) K. Boztug et al : , *Net Engl. J. Med.*, 363, 1918 (2010)
- 10) Hannover Medical School Press Release, 11th Nov. (2010)
- 11) N. Cartier et al., *Science*, 326, 818 (2009)
- 12) Cavazzana-Calvo N. et al, *Nature*, 467, 318 (2010)
- 13) Maguire AM et al, *N. Engl. J. Med.*, 358, 2240 (2008)
- 14) A. C. Nathwani et al : *N. Engl. J. Med.*, 365, 2357 (2011)
- 15) 村松慎一, *医学のあゆみ*, 237, 247 (2011)
- 16) Marks K et al., *Lancet Neurol.*, 9, 1164 (2010)
- 17) M. Kalos et al., *Sci. Transl. Med.*, 3, 95 (2011)
- 18) F. D. Urnov et al., *Nature*, 435, 646 (2005)
- 19) J. C. Miller et al., *Nature Biotechnol.*, 29, 143 (2011)
- 20) H. Li, V. Haurigo et al., *Nature*, 475, 217 (2011)
- 21) K. Yusa et al., *Nature*, 478, 391 (2011)
- 22) F. S. Tedesco et al., *Sci. Transl. Med.*, 3, 78 (2011)
- 23) 武田伸一, *臨床神経*, 49, 856 (2009)
- 24) T. Kozu, *医学のあゆみ*, 238, 463 (2011)



Physicochemical properties and in vitro intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles, performed in simulated gastrointestinal fluids



Kumiko Sakai-Kato ^{a,*}, Masayuki Hidaka ^a, Keita Un ^a, Toru Kawanishi ^b, Haruhiro Okuda ^b

^a Division of Drugs, National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

^b National Institute of Health Sciences, 1-18-1 Kamiyoga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan

ARTICLE INFO

Article history:

Received 11 July 2013

Received in revised form 10 December 2013

Accepted 13 December 2013

Available online 19 December 2013

Keywords:

Nanomaterial

Silica particle

In vitro model

Simulated gastrointestinal fluid

ABSTRACT

Background: Amorphous silica particles with the primary dimensions of a few tens of nm, have been widely applied as additives in various fields including medicine and food. Especially, they have been widely applied in powders for making tablets and to coat tablets. However, their behavior and biological effects in the gastrointestinal tracts associated with oral administration remains unknown.

Methods: Amorphous silica particles with diameters of 50, 100, and 200 nm were incubated in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids. The sizes, intracellular transport into Caco-2 cells (model cells for intestinal absorption), the Caco-2 monolayer membrane permeability, and the cytotoxicity against Caco-2 cells were then evaluated for the silica particles.

Results: Silica particles agglomerated in fed-state simultaneous intestinal fluids. The agglomeration and increased particles size inhibited the particles' absorption into the Caco-2 cells or particles' transport through the Caco-2 cells. The in vitro cytotoxicity of silica particles was not observed when the average size was larger than 100 nm, independent of the fluid and the concentration.

Conclusion: Our study indicated the effect of diet on the agglomeration of silica particles. The sizes of silica particles affected the particles' absorption into or transport through the Caco-2 cells, and cytotoxicity in vitro, depending on the various biological fluids.

General significance: The findings obtained from our study may offer valuable information to evaluate the behavior of silica particles in the gastrointestinal tracts or safety of medicines or foods containing these materials as additives.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Nanomaterials are materials that have at least one dimension in the nanoscale range (approximately 1 nm to 100 nm). Recently, nanomaterials have been applied in various fields, including medicine, cosmetics, and foods, because nanomaterials may have physical, chemical, or biological properties that are different from those of their bulk. While nanotechnology can exploit the improved and often novel properties of materials, there have been publications about concerns regarding the safety to humans and potential environmental impact of such materials [1–4].

In the medical field, nanomaterials have been used as drug carriers for drug delivery systems (DDS) [5–8].

Abbreviations: DDS, drug delivery system; PDI, polydispersity index; TEM, transmission electron microscopy; FaSSGF, fasted-state simulated gastric fluids; FeSSGF, fed-state simulated gastric fluids; FaSSIF, fasted-state simulated intestinal fluids; FeSSIF, fed-state simulated intestinal fluids; DMEM, Dulbecco's modified Eagle's medium; PBS, Phosphate buffer saline; HBSS, Hanks' balanced salt solution; FBS, fetal bovine serum; TEER, transepithelial electrical resistance

* Corresponding author. Tel./fax: +81 3 3700 9662.

E-mail address: kumikato@nihs.go.jp (K. Sakai-Kato).

Amorphous silica particles have been widely applied as additives for various purposes, for example, to improve the flowability used in powders for making tablets; they have also been applied as additives to coat tablets, to improve their hardness. In solid oral dosage form, silicates are often used as glidants. Glidants are substances that improve the flowability of cohesive powders and granules. Silicates are well suited for that purpose, because of their small particle size and large specific surface area. One of the most frequently used glidants is colloidal silica (e.g., Aerosil 200), which exhibits very small particle sizes in the nanometer range, and a large specific surface area of approximately 200 m²/g [9]. Although the primary dimensions of these particles are a few tens of nm, they form aggregates of a few hundred nm. These novel materials have been the focus of medical developments in a number of areas, and many researchers have investigated their use not only as additives in tablets, but also as novel carriers for poorly-water-soluble drugs [10–12].

Amorphous silica particles have also been used in other fields, where they are applied directly to the human body as ingredients in cosmetics and toothpaste, or even as powdered food ingredients to prevent caking [13,14].

However, when amorphous silica particles were swabbed on skin, it was reported that the nano-sized materials penetrated through the skin, became distributed in the body, and induced unexpected toxicity [2]. It has been reported that the toxicity derived from amorphous silica particles depends on the particle size and the surface properties [15,16].

Generally, tablets are taken via oral administration. Using this administration route, the particles contained in the tablets do not remain at specific sites for a long period. However, if the particles are absorbed from the intestine and enter the blood circulation, it is important to consider whether the phenomena that occur when the drugs are administered intravenously would also occur in this case. In addition, no studies have been performed to investigate the toxicity associated with the oral administration of amorphous silica particles as additives in oral solid dosage forms; the evaluation of the physicochemical properties, intestinal permeability properties, and intestinal cell toxicity resulting from the oral administration of nano- or submicron-size amorphous silica particles is therefore essential to ensure the safety of solid oral dosage forms containing these materials.

In the present study, we evaluated the size, the absorption from the intestine, and the cytotoxicity using *in vitro* models of amorphous silica particles after oral administration. In particular, we investigated the effects of the size of the particles and the composition of the intestinal tract fluid on the intestinal permeability properties and the intestinal cell toxicity. In this study, we used amorphous silica particles with diameters of 50, 100, and 200 nm. In the oral administration of medicines, the physiological conditions in the intestinal tract are dramatically different in the fasted state and the fed state. It is known that these differences affect the absorption of drugs from the gastrointestinal tract. This study therefore investigated the changes in the size of amorphous silica particles in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids.

As an *in vitro* model for intestinal absorption, we used the Caco-2 cell. Caco-2 cells grown as a monolayer become differentiated and polarized such that their morphological and functional phenotype resembles that of the enterocytes that line the small intestine [17,18]. Caco-2 cells express tight junctions, microvilli, and numerous enzymes and transporters that are characteristic of such enterocytes. The Caco-2 monolayer is widely used throughout the pharmaceutical industry as an *in vitro* model of the human small intestinal mucosa to predict the absorption of orally administered drugs. The correlation between the *in vitro* apparent permeability across Caco-2 monolayers and the *in vivo* fraction absorbed is well established [19]. Caco-2 cells have in fact been used as a model to investigate the possible harmful effect of silica nanoparticles in the gastrointestinal tract [20]. Furthermore, Caco-2 monolayers have been used to evaluate the intracellular uptake of nanosized-drug delivery systems [21,22].

In this study, the intracellular transport into Caco-2 cells, the Caco-2 monolayer membrane permeability, and the cytotoxicity against Caco-2 cells were then evaluated for the amorphous silica particles, in the fasted-state and fed-state simulated gastric and intestinal fluids.

2. Materials and methods

2.1. Silica particles

Suspensions of fluorescently labeled amorphous silica particles (nominal diameters as stated by suppliers: 50 nm, SP-50; 100 nm, SP-100; and 200 nm, SP-200) were obtained from Micromod Partikeltechnologie (Rostock, Germany). These were amorphous silica particles [16]. Silica suspensions were shaded and stored at 4 °C and diluted in various fluids before each experiment. The suspensions were sonicated for 10 min, and then vortexed for 1 min immediately prior to use. The silica particles were suspended in various fluids, and then incubated at 37 °C for 1 h before the measurements were performed. The mean particle size, the polydispersity index (PDI), and the ζ -potentials of the silica particles were measured using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), with a concentration of 0.1 mg/mL in water (Table 1). The water used

Table 1

The mean particle size, the polydispersity index (PDI), and the ζ -potentials of the silica particles used in this study.

Sample	Particle size (nm)	PDI	ζ -Potential
Silica			
SP-50	47.5 ± 4.0	0.14 ± 0.053	-43.2 ± 2.0
SP-100	99.0 ± 3.2	0.03 ± 0.030	-53.8 ± 1.4
SP-200	176 ± 6.4	0.16 ± 0.024	-51.8 ± 1.4

Samples were dissolved in MilliQ water with a concentration of 0.1 mg/mL. Each value represents the mean ± S.D. ($n = 3$).

in this study was purified using Milli-Q system (Millipore, Tokyo, Japan). Fig. 1 shows transmission electron microscopy (TEM) images of the silica particles used in this study. The images were obtained using an H-9000 UHR instrument (Hitachi, Tokyo, Japan).

2.2. Cell culture

Caco-2 cells—human epithelial colorectal adenocarcinoma cells (American Type Culture Collection (ATCC), Manassas, VA, USA)—were cultured in Dulbecco's modified Eagle's medium (Life Technologies, Brooklyn, NY, USA) supplemented with 10% FBS (Nihon Biosciences, Tokyo, Japan), 100 U/ml penicillin/streptomycin (Life Technologies). Cells were grown in a humidified incubator at 37 °C under 5% CO₂, and the culture medium was changed every other day.

2.3. Composition of simulated gastric and intestinal fluids

The fasted-state simulated gastric fluids (FaSSGF) and the fed-state simulated gastric fluids (FeSSGF) were prepared according to a previous report [23]. The fasted-state simulated intestinal fluids (FaSSIF) and the fed-state simulated intestinal fluids (FeSSIF) were prepared according to the manufacturer's instructions (Celeste Co., Tokyo, Japan). An Ubbelohde-type viscometer was used for the viscosity measurements. The detailed components of each fluid are shown in Table 2.

2.4. Stability of fluorescence labeling

Fluorescently labeled silica particles were diluted to 1 mg/mL in various types of fluids (MilliQ water, D-MEM, PBS, FaSSIF, FeSSIF, FaSSGF, FeSSGF, 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid, and lysis buffer (1.0% Triton X-100 in HBSS)) and incubated at 37 °C for 6 h. After incubation, the particles were centrifuged (20,000 g, 30 min) and the precipitated silica particles were resuspended with the same volumes of fresh fluids as those before centrifugation. The fluorescent intensities of the suspension before and after centrifugation were measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 602 nm in a fluorescence spectrophotometer (F-7000; Hitachi High-Technologies, Tokyo, Japan). The percentage of the fluorescent dye retained in the silica particles after 6-h incubation was expressed as follows:

$$A/B \times 100(\%),$$

where A represents the fluorescence intensity of the silica particles resuspended with fresh fluid after centrifugation, and B represents the fluorescence intensity of the silica suspension before centrifugation.

2.5. Intracellular uptake study

Fluorescently labeled silica particles were used in this study to evaluate the intracellular uptake of silica particles. Caco-2 cells (1×10^6) were plated in a 6-well plate in medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (D-MEM, PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the

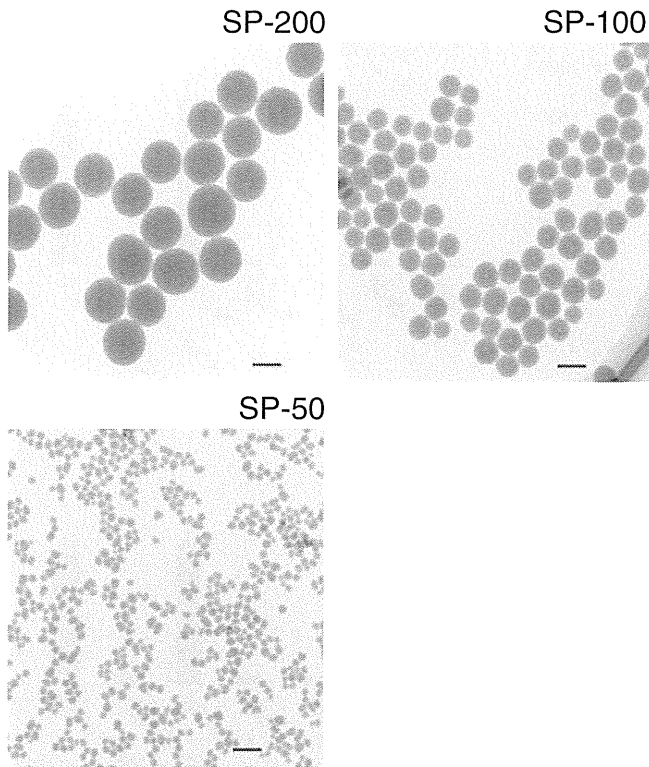


Fig. 1. TEM images of silica particles used in this study. The scale bar represents 100 nm.

gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), fluorescently labeled silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. Subsequently, the diluted silica particles were further diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the cells, which were pre-incubated for 96 h (37 °C, 5% CO₂). After incubation for 2 h in the silica particle-containing fluid, the cells were washed, and the incubation medium was replaced with Hanks’ balanced salt solution (HBSS). The cells were then trypsinized with 0.25% trypsin-ethylenediamine tetraacetic acid (Life Technologies), washed with HBSS three times, and suspended in lysis buffer (1.0% Triton X-100 in HBSS). The cell suspension was shaken, centrifuged at 15,000 ×g and 4 °C for 10 min, and the fluorescence intensity of the resulting supernatant was measured at an excitation wavelength of 542 nm and an emission wavelength of 602 nm in a fluorescence spectrophotometer (F-7000). The fluorescence intensity was expressed as incorporated particle mass per unit protein content of cells. The protein concentration was determined using a protein assay kit (Dojindo Molecular Technologies, Tokyo, Japan).

Table 2
Composition of FaSSGF, FeSSGF, FaSSIF, and FeSSIF.

	FaSSGF	FeSSGF	FaSSIF	FeSSIF
Sodium taurocholate (μM)	80	–	3	15
Sodium acetate (mM)	–	29.75	–	–
Sodium chloride (mM)	34.2	237.02	105.4	203.1
Sodium hydroxide (mM)	–	–	10.5	101
Sodium dihydrogen-orthophosphate (mM)	–	–	28.7	–
Acetic acid (mM)	–	17.12	–	144.17
Lecithin (μM)	20	–	0.75	3.75
Pepsin (mg/mL)	0.1	–	–	–
pH	1.6	5	6.5	5.0
Osmolality (mOsm/kg)	120.7 ± 2.5	400	270 ± 10	635 ± 10

2.6. Confocal microscopy study

To observe the intracellular uptake of the fluorescently labeled silica particles, Caco-2 cells (5.0×10^4) were plated in 35 mm glass-bottom dishes coated with poly-L-lysine (Matsunami Glass, Osaka, Japan) in medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. After the cells were pre-incubated for 48 h (37 °C, 5% CO₂), the diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the cells. After incubation for 2 h in the silica particle-containing fluid (37 °C or 4 °C, 5% CO₂), the cells were washed and kept in HBSS for imaging using confocal microscopy (Carl Zeiss LSM 510, Oberkochen, Germany). To observe co-localization, endosomes and lysosomes of cells were labeled with AlexaFluor-488-conjugated transferrin (Life Technologies) and LysoTracker Green DND-26 (Life Technologies), respectively, in accordance with the manufacturer’s instructions. Data were collected using dedicated software supplied by the manufacturers, and exported in tagged image file format.

2.7. Transcellular transport study

Caco-2 cells were suspended in a serum-free medium consisting of D-MEM and Mito + Serum Extender (BD Biosciences, San Jose, CA, USA), and seeded on 24-well size BD Falcon cell culture inserts (BD Biosciences) at 2×10^5 cells/well [24]. In experiments that required the use of differentiation medium, the seeding medium was replaced with optimized differentiation medium 48 h after cell seeding; the medium was replaced every 24 h thereafter. The transepithelial electrical resistance (TEER) was also measured using a Millicell-ERS resistance system (Millipore, Billerica, MA, USA) every 24 h, and the wells with TEER values of over 200 Ω cm² were used as Caco-2 cell monolayers. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and then incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), fluorescently labeled silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. The diluted silica particles were subsequently further diluted to a concentration of 1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The diluted and incubated fluorescently labeled silica particles were added to the apical side of the Caco-2 cell monolayers. Phosphate buffer saline (PBS) was added to the basal side at the same time. Samples (fluorescently labeled silica particles) were drawn out of the basal side at 15 min intervals. An equal volume of PBS was added to the basal side immediately after each sampling. The TEER was simultaneously determined using a Millicell-ERS resistance system.

2.8. Cytotoxicity study

The cytotoxicity of the silica particles was assessed using a WST-8 assay (Cell Counting Kit-8, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan). Caco-2 cells (1×10^5) were plated in 96-well plate in medium containing 10% FBS and 100 U/mL penicillin/streptomycin. Silica particles were diluted to concentrations of 0.1, 1, or 10 mg/mL in various types of fluids (D-MEM, PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and incubated at 37 °C for 1 h to mimic the intestinal conditions. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as “FaSSGF → FaSSIF” and “FeSSGF → FeSSIF”), silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, and incubated at 37 °C for 1 h. The diluted silica particles were subsequently further diluted to concentrations of 0.1 or 1 mg/mL in FaSSIF or FeSSIF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. After the cells were pre-incubated for 72 h (37 °C, 5% CO₂), the diluted and subsequently incubated particles were added to the cells. After

incubation for 6 h, the cells were washed, the fluid was replaced with fresh culture medium without silica particles, and an additional 0, 6, 24, or 48 h of incubation was applied. Cell counting kit-8 solutions were then added to each well, and the cells were incubated for 2 h. After incubation, absorbance values at 450 nm were measured using a microplate reader (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA), and the results were expressed as viability (%).

2.9. Statistical analyses

The results are presented here as the mean \pm S.D., calculated from more than three experiments. An analysis of variance (ANOVA) was used to test the statistical significance of the differences between groups. Multiple comparisons between control and test groups were performed using Dunnett's test.

3. Results

3.1. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the size of silica particles

The effects of various fluids on the size of the amorphous silica particles were evaluated. Following the dispersion of the silica particle samples (nominal diameters: 50 nm, SP-50; 100 nm, SP-100; and 200 nm, SP-200, as stated by the supplier) SP-50, SP-100 and SP-200 in MilliQ water, the mean particle sizes were approximately 48 nm, 99 nm, and 176 nm, respectively (Table 1), which agreed well with the nominal diameters as stated by the supplier. The ζ -potentials of the silica particles ranged from -43.2 to -53.8 mV (Table 1). Then, to investigate how the state of the silica particles changed after oral administration, and during their passage through the gastrointestinal tract, the silica particles were dispersed in various types of simulated fluids. As shown in Fig. 2, when these silica particles were dispersed in fasted- and fed-state simulated gastric fluids (FaSSGF and FeSSGF) and fasted-state simulated intestinal fluids (FaSSIF), the mean particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 were not affected. By contrast, when the silica particles were dispersed in fed-state simulated intestinal fluids (FeSSIF), the mean measured particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 all significantly increased, to more than 1000 nm (Fig. 2). In addition, the PDI values of the silica particles dispersed in FeSSIF also increased to approximately 0.6, indicating that the SP-50, SP-100, and SP-200 particles all agglomerated in FeSSIF, regardless of the primary particle size. Then, to investigate conditions more similar to those encountered in actual oral administration before the passage through the intestinal tract, the silica particles were first diluted with simulated gastric fluids; this was then followed by dispersion in simulated intestinal fluids. As shown in Fig. 2, when the silica particles were dispersed in fasted-state simulated fluids (FaSSGF and FaSSIF), the mean particle sizes of SP-50, SP-100, and SP-200 were not affected. By contrast, when SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in fed-state simulated fluids (FeSSGF and FeSSIF), the mean measured particle sizes increased to more than 1000 nm (Fig. 2). These results suggested that silica particles—at least those used in this study—would agglomerate after postprandial oral administration.

3.2. Stability of fluorescent labeling of silica particles

The intracellular uptake and transcellular transport assay of silica particles depend on the accuracy of the measured fluorescence. The studies supporting stability of fluorescent labeling were performed. After incubation of fluorescently labeled silica particles in various fluids, the recovery of fluorescent dye was examined. As shown in Table 3, the fluorescent labeling of silica particles used in this study was stable in every fluid under the conditions used in this study.

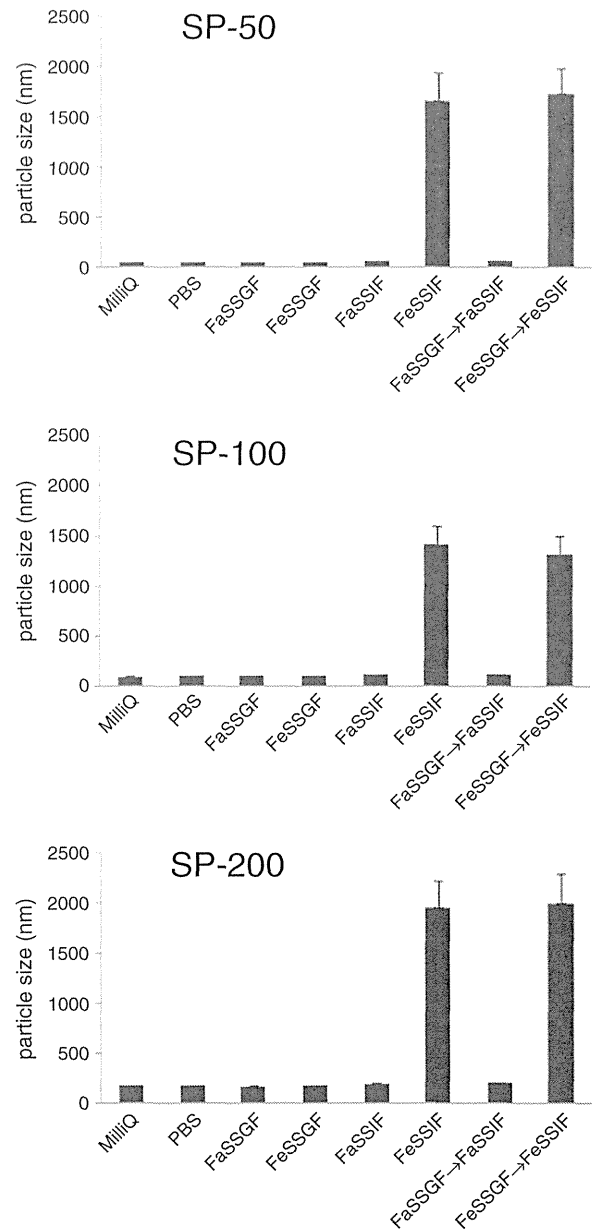


Fig. 2. Sizes of amorphous silica particles (SP-50, 100, and 200, 0.1 mg/mL) in various types of fluids. The mean particle size of the silica particles was measured using a Zetasizer Nano-ZS (Malvern Instruments, UK), with a concentration of 0.1 mg/mL. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 3$).

3.3. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the intracellular uptake of fluorescently labeled silica particles

The effects of dispersion in simulated fluids on the intracellular uptake of silica particles were investigated using Caco-2 cells. In the preliminary experiments, we confirmed that the internalization occurs linearly with times around 2 h after the addition of silica particles (Supplementary Fig. 1). Therefore, the intracellular amounts of silica particles were measured after incubation for 2 h with silica particles. Similarly, the silica particle concentrations for incubation were determined based on the linearity between silica particle masses and fluorescent intensities of internalized silica particles (Supplementary Fig. 2). As shown in Fig. 3, the intracellular amounts of SP-50, SP-100, and SP-200 dispersed in fasted-state simulated fluids (FaSSGF and FaSSIF) were almost the same as those in cultured medium (control). However, when SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in fed-state simulated

Table 3
Stability of fluorescent labeling.

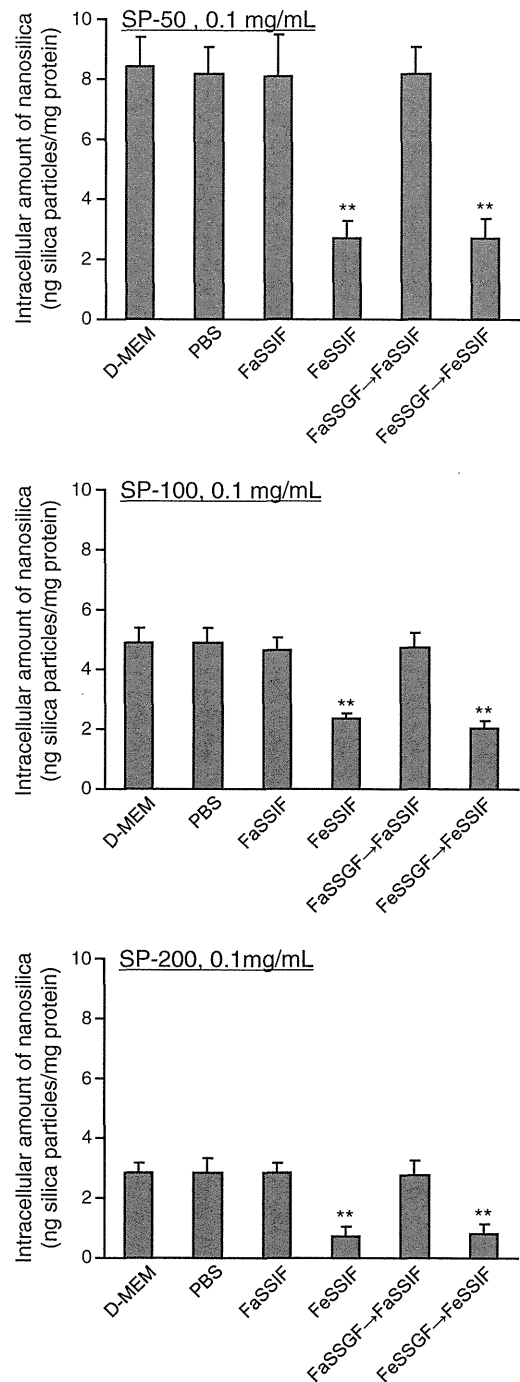
Solution	SP-50	SP-100	SP-200
	Average SD	Average SD	Average SD
MilliQ water	97.8 ± 0.62	99.8 ± 1.40	98.5 ± 4.18
PBS	98.2 ± 1.06	99.3 ± 1.05	98.9 ± 3.55
D-MEM(+)	98.8 ± 0.91	99.5 ± 1.04	98.2 ± 3.34
FaSSiF	99.1 ± 0.53	99.8 ± 1.00	98.4 ± 3.48
FeSSiF	98.4 ± 0.37	99.1 ± 0.68	98.5 ± 2.30
FaSSGF	98.4 ± 0.73	99.0 ± 0.49	98.1 ± 2.56
FeSSGF	97.6 ± 0.61	99.1 ± 0.37	98.5 ± 1.61
Trypsin	98.5 ± 5.90	98.3 ± 7.49	99.9 ± 11.2
Lysis buffer	101.5 ± 5.76	103.8 ± 6.29	99.9 ± 8.63

After incubation of fluorescent labeled silica particles in various solutions, the recovery of fluorescent dye was examined and expressed as percentage of the fluorescent intensity of the resuspended silica particles to that before centrifugation as described in "Materials and methods." Each value represents the mean ± S.D. ($n = 3$).

intestinal fluids (FeSSiF), the measured amounts of intracellular silica particles significantly decreased (Fig. 3). This decrease in the intracellular amounts of silica particles was also observed when the silica particles were serially diluted using FeSSGF and FeSSiF (Fig. 3). We then examined the intracellular uptake of silica particles into Caco-2 cells using confocal microscopy. As shown in Fig. 4 (a), when silica particles were pre-incubated in fasted-state simulated fluids (FaSSiF), the intracellular uptake of silica particles was almost the same as that in PBS. In contrast, when silica particles were pre-incubated in fed-state simulated intestinal fluids (FeSSiF), the intracellular uptake of silica particles significantly decreased (Fig. 4 (a)). This result agreed with the quantitative values obtained using fluorescent spectroscopy described above (Fig. 3). It was also shown that silica particles pre-incubated in PBS and FaSSiF were observed to co-localize with endosomes and lysosomes after incubation for 2 h with Caco-2 cells (Fig. 4 (a)). On the other hand, the internalization of silica particles was not observed when the particles were incubated with Caco-2 cells at 4 °C (Fig. 4 (b)). These indicated that the silica particles were internalized by endocytosis, and that the silica nanoparticles are not simply adhering to the cells.

3.4. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the Caco-2 cell monolayer transport of silica particles

To investigate the effect of various fluids on the transcellular transport of silica particles, SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in PBS, FaSSiF, and FeSSiF, and silica particle transport studies were performed using Caco-2 cell monolayers (Fig. 5). Fig. 6 shows the time-dependent variations in the TEER and the cumulative amount of transported silica particles dispersed in various types of fluids. The TEER is well known as an indicator of the integrity, or tightness, of junctions (a tight junction is described as the closely associated area between two cells whose membranes have joined together to form a virtually impermeable barrier against various materials) [25]. As shown in Fig. 6, the TEER was hardly affected by the addition of SP-50, SP-100, or SP-200 under these experimental conditions, suggesting that the silica particles used in this study did not significantly change the structure of the tight junctions in the Caco-2 cell monolayers. From the investigation of the cumulative amounts of transported silica particles, it was clear that after 30 min, the transported amounts of SP-50 suspended in PBS and fasted-state fluid were significantly higher than those of SP-50 in fed-state fluid. The transported amounts of SP-50 dispersed in FeSSiF were significantly lower than those of SP-50 dispersed in PBS or fasted-state fluids. In the case of SP-100 and SP-200, the cumulative amount of transported silica particles was negligible until 60 min, even in the PBS and fasted-state fluids (Fig. 6).



** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of D-MEM.

Fig. 3. The intracellular uptake of amorphous silica particles, 2 h after their addition to Caco-2 cells. SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in various types of fluids and pre-incubated for 1 h. After incubation for 2 h in the silica particle-containing suspension, the cells were then trypsinized, washed, and lysed. The cell suspension was shaken, centrifuged, and the fluorescence intensity of the resulting supernatant was measured as described in Section 2.5. ** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of D-MEM. Each value represents the mean ± S.D. ($n = 6$).

3.5. Effects of simulated gastric and intestinal fluids on the cytotoxicity of silica particles

The effects of various fluids on the cytotoxicity of the silica particles were then evaluated. Silica nanoparticles (final concentration 1.0 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and exposed to cells for

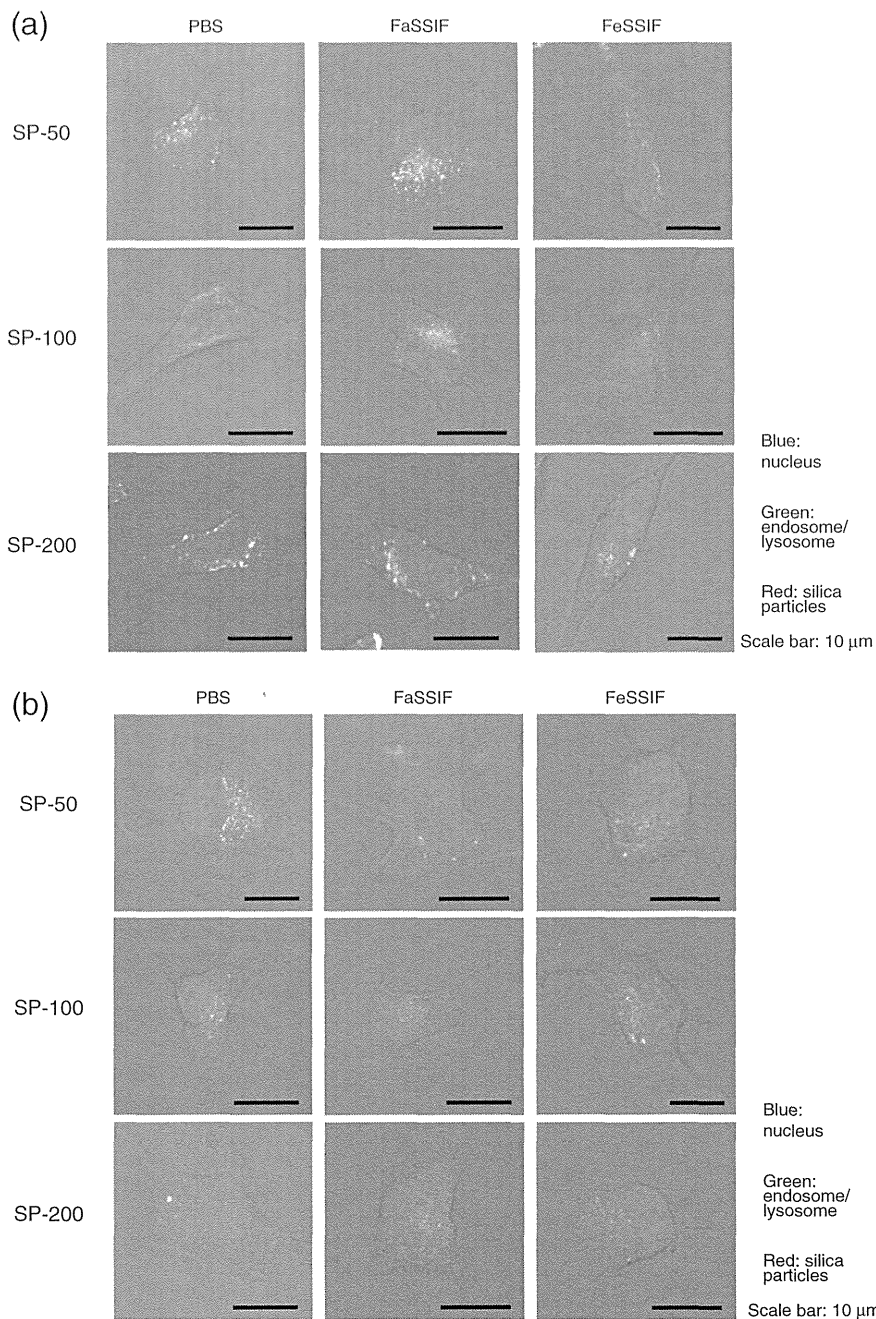


Fig. 4. Confocal images of the intracellular amorphous silica particles, taken 2 h after their addition to Caco-2 cells. The fluorescently labeled silica particles were diluted to a concentration of 0.1 mg/mL in various types of fluids (PBS, FaSSIF, and FeSSIF), and pre-incubated for 1 h to mimic the intestinal conditions. Confocal images of the intracellular amorphous silica particles were taken 2 h after their addition to Caco-2 cells at 37 °C (a) or 4 °C (b). To observe co-localization, endosomes and lysosomes of cells were labeled with AlexaFluor-488-conjugated transferrin and LysoTracker Green DND-26, respectively. The scale bars represent 10 μm.

6 h. Up to this time point, no cytotoxicity was observed in Caco-2 cells exposed to SP-50, SP-100, or SP-200. The cultured media was then replaced with fresh medium without silica particles to eliminate any effect of the fluid itself, and the cells were incubated for another 0, 6, 24, and 48 h (Fig. 7). During this additional incubation with fresh medium, time-dependent toxicity was observed in Caco-2 cells that had been initially exposed to SP-50 dispersed in PBS or fasted-state simulated fluids. By contrast, no cytotoxicity was observed for SP-100 or SP-200 even after 48-h incubation (Fig. 7). We then investigated the concentration dependency of the silica particle toxicity on Caco-2 cells. Silica nanoparticles (final concentration 0.1, 1.0, and 10 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and exposed to cells for 6 h. The cultured media was then replaced with fresh medium without silica particles, and the

cells were incubated for another 48 h at which time the cytotoxicity of SP-50 was considerable (Fig. 7). As shown in Fig. 8, cytotoxicity was not observed for SP-100 or SP-200 in any of the various types of fluids, even at a concentration of 10 mg/mL. By contrast, when SP-50 was dispersed in PBS or the fasted-state simulated fluids, significant cytotoxicity was detected for all concentrations of the particles, with the cytotoxicity depending on the concentration. However, when SP-50 was dispersed in FeSSIF, cytotoxicity was not observed.

4. Discussion

With the increasing interest in nanotechnology, nanomaterials have been applied in various fields including medicines. Nanoparticles can

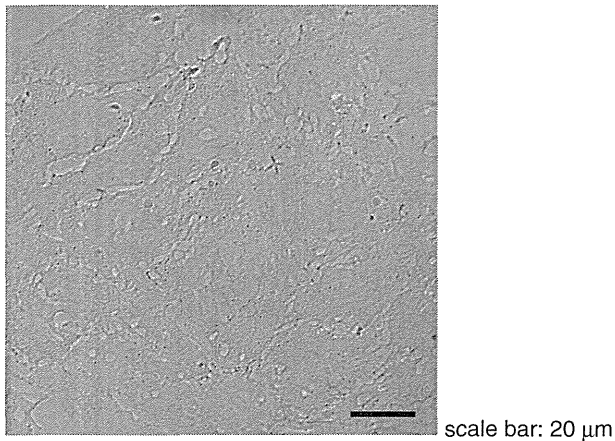
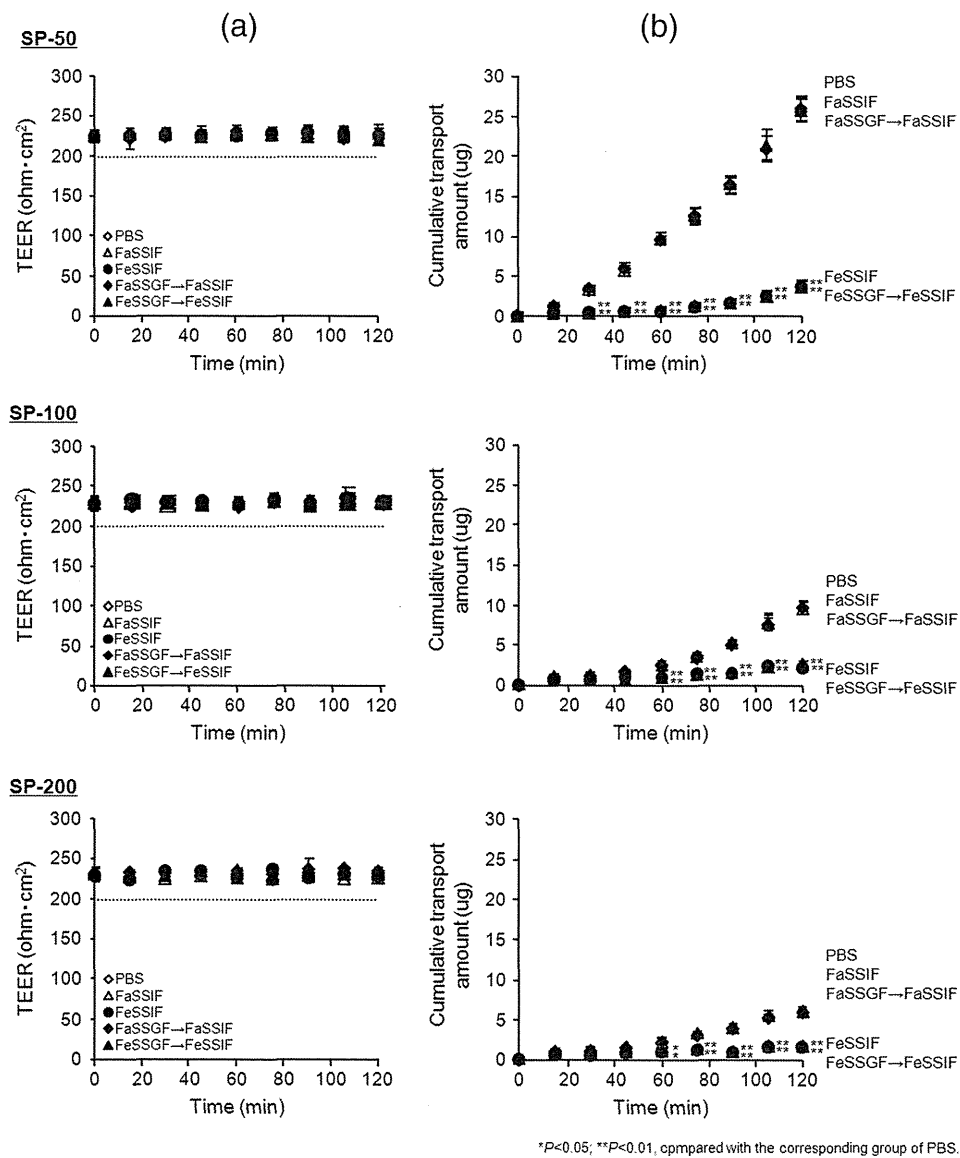


Fig. 5. Phase-contrast image of the Caco-2-cells. The scale bar represents 20 μm .

also be used as excipients of solid oral dosage forms and other products that are absorbed in a body in a variety of ways.

In solid oral dosage form, silicates are commonly used as glidants. Although the primary particle size of the most frequently used colloidal silica (Aerosil 200) is between 7 and 40 nm, these particles group together into so-called aggregates of a few hundred nanometers during the sintering production process [26]. This study therefore investigated the size and in vitro behavior using gastrointestinal models; the Caco-2 cell models and bio-relevant dissolution media simulated conditions in the gastrointestinal system, allowing an evaluation of the intestinal permeability properties and the intestinal cell toxicity associated with oral administration. The critical question regarding the safety of oral dosage forms is whether the material used as an excipient will penetrate the intestinal barrier of the intestinal membrane.

We used fluorescently labeled silica particles to trace the intake and the translocation of the intestinal barrier. The silica particles consisted of amorphous and nonporous silicates, and had a negative charge (Table 1); these characteristics are the same as those of silicates frequently used in solid oral dosage form (approximately -40 mV in



* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of PBS.

Fig. 6. Trans-epithelial electrical resistance across Caco-2 cell monolayers (a), and cumulative transported amounts of amorphous silica particles (b). SP-50, SP-100, and SP-200 were dispersed in various types of fluids to a final concentration of 1 mg/mL and pre-incubated at 37 °C for 1 h. The incubated fluorescently labeled silica particles were added to the apical side of the Caco-2 cell monolayer. After indicated duration, TEER and the transported amount of nanoparticles were measured as described in “Materials and methods”. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, compared with the corresponding group of “PBS”. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 4$).

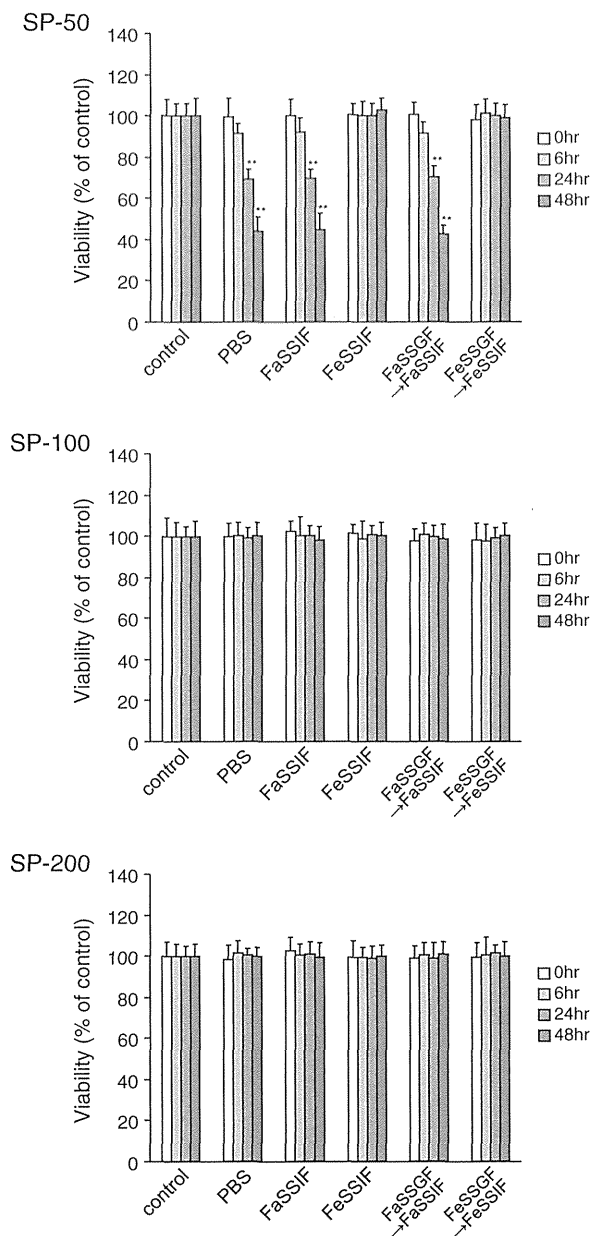


Fig. 7. The cytotoxicity of amorphous silica particles against Caco-2 cells. Silica nanoparticles (final concentration 1.0 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and pre-incubated at 37 °C for 1 h. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as "FaSSGF → FaSSiF" and "FeSSGF → FeSSiF"), silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, incubated at 37 °C for 1 h, and the diluted silica particles were subsequently further diluted to concentrations of 1.0 mg/mL in FaSSiF or FeSSiF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The pre-incubated particles were added to the cells. After incubation for 6 h, the cultured media was then replaced with fresh medium to eliminate the effect of the fluid itself, and the cells were incubated for another 0, 6, 24, and 48 h. Cell viability was evaluated by using the WST-8 assay at each time point (0, 6, 24, and 48 h). ** $P < 0.01$, compared with the corresponding control group. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 4$).

water at pH 7 [27]). We also investigated the size dependence of the absorption and the in vitro toxicity, using silica particles with diameters of 50, 100, and 200 nm.

First, we investigated whether the silica particles would agglomerate after oral administration. Simulation of gastrointestinal conditions is essential to adequately predict the in vivo behavior of drug formulations. We used biorelevant dissolution media that can be used for the in vitro simulation of different dosing conditions (fasted and fed states) [28]. Regardless of the primary particle size, the observed tendency was the

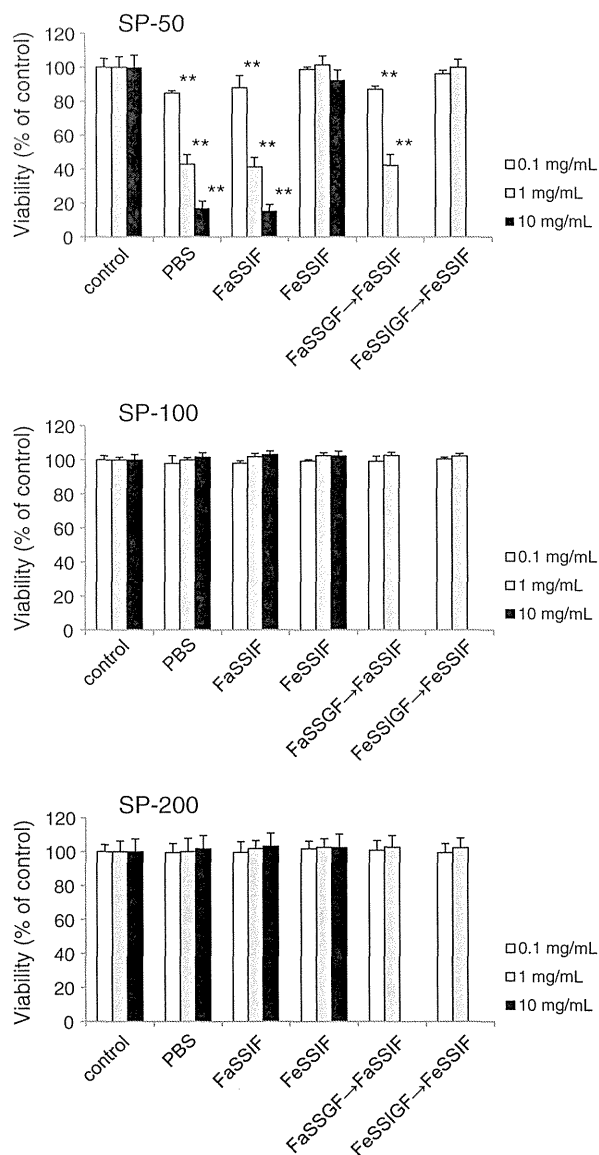


Fig. 8. The concentration dependency of the silica particle toxicity on Caco-2 cells. SP-50, SP-100, and SP-200 (final concentration 0.1, 1.0, and 10 mg/mL) were dispersed in various types of fluids and pre-incubated at 37 °C for 1 h. In addition, to mimic the gastric and intestinal conditions (indicated as "FaSSGF → FaSSiF" and "FeSSGF → FeSSiF"), silica particles were diluted to 10 mg/mL in FaSSGF or FeSSGF, incubated at 37 °C for 1 h, and the diluted silica particles were subsequently further diluted to concentrations of 0.1 or 1.0 mg/mL in FaSSiF or FeSSiF, and incubated at 37 °C for an additional 1 h. The pre-incubated particles were added to the cells. After incubation for 6 h, the cultured media was then replaced with fresh medium to eliminate the effect of the fluid itself, and an additional 48 h of incubation was applied, followed by measurement of cytotoxicity. ** $P < 0.01$, compared with the corresponding control group. Each value represents the mean \pm S.D. ($n = 4$).

same. In all cases, the particles formed agglomerates in the medium representing the fed-state intestinal fluid. It is known that acidic conditions promote agglomeration, due to a decrease in the electrostatic repulsion between negatively charged silica particles; the formation of agglomerates can therefore occur after passage through the stomach, which has lower-pH conditions. However, in this case, lower-pH conditions did not cause agglomeration, under fed or fasted conditions. Furthermore, the viscosity of the FaSSGF = 0.688 mPa s and FeSSGF = 0.704 mPa s were almost the same, which suggested that the viscosity did not affect the agglomeration of the silica particles. Judging from the composition of the bio-relevant dissolution media, and the above results, we concluded that the high salt concentration was a major factor causing the agglomeration. In fact, we reported previously

that silica particles easily agglomerated with high sodium ion concentrations in solution eluents [29], and the same phenomenon was also reported by other researchers [30]. The Derjaguin Landau-Verwey-Overbeek (DLVO) theory is often used to explain the aggregation/agglomeration behavior of silica suspensions [31,32]. Briefly, the DLVO theory combines the effects of the attractive van der Waals forces and the electrostatic repulsion between charged surfaces. As discussed earlier, the presence of silanol groups (Si–O–H) on amorphous silica surfaces and the charge of silanol groups determine the extent of the repulsive energy needed to keep the silica nanoparticles dispersed. The surface charge of silica nanoparticles differs as the pH changes due to protonation and deprotonation of the silanol groups. At pH 2–3, silica nanoparticles reach the isoelectric point (IEP) where the particles carry no net charge, causing the nanoparticles to agglomerate. In the case of biological conditions with high (0.1–0.3 M) salt concentrations, ion-specific effects also play a prominent role [33]. Amiri et al. pointed out that in aqueous media, because pure particles are electrostatically stabilized, interparticle interactions at a given concentrations can be changed by varying the ionic strength, particle size, and pH of the suspension; they demonstrated that high salt concentration causes agglomeration of silica particles [27].

Next, we studied the cellular uptake of silica particles, using Caco-2 cells as an *in vitro* model to assess the barrier integrity/permeability effects of the silica particles. The TEER, which is well known as an indicator of the integrity of junctions, was not affected by the addition of SP-50, SP-100, or SP-200 under these experimental conditions, suggesting that the silica particles used in this study did not significantly change the structure of the tight junctions between the cells in the Caco-2 cell monolayer, regardless of the particle size, at least for 2 h of exposure to the particles. Because the length of the tight junction between the cells is approximately 10–20 nm [25], the silica particles used in this study did not penetrate the junction. Therefore, the increase in the amount of particles showed that translocation through the Caco-2 cells occurred. The transport experiments showed that the cumulative number of transported silica particles increased with exposure time, and it is notable that translocation occurred under conditions that did not cause agglomeration. In the investigation of the cumulative amount of transported silica particles, Fig. 6 showed that the transported amounts of SP-50 were much higher than those of SP-100 and 200 when these silica particles were dispersed in PBS and FaSSIF. Moreover, the transported amounts of all of the silica particles were significantly lower when they were dispersed in FeSSIF than when they were dispersed in PBS or FaSSIF. However, in the case of SP-100 and SP-200, the amounts of silica particles transported were negligible for times shorter than 1 h, regardless of which fluid was used. Because the transit time in the gut is approximately 1 h per 1 m of gut length [34], these results suggest that the intestinal absorption of silica particles or aggregates/agglomerates larger than 100 nm would be negligible. Further *in vivo* testing would be necessary to confirm the possibility of silica particle absorption into the systemic circulation.

We then investigated the cytotoxicity of the silica particles towards Caco-2 cells. We confirmed that the exposure for 6 h to the silica particles (SP-50, 100, and 200) did not induce cytotoxicity in any of the various types of fluids, and this coincides with our results that the structure of the tight junctions of Caco-2 monolayer was not changed at least for 2 h of exposure to the silica particles (Fig. 6). However, after another incubation with fresh medium, SP-50 showed time-dependent toxicity for up to 48 h when SP-50 was dispersed in PBS or fasted-state simulated fluids. On the other hand, SP-100 and SP-200 did not show any cytotoxicity, at least for 48 h (Fig. 7). The time lapse of toxicity observed in SP-50 in this study indicates that the smaller size of silica particles inhibited cellular proliferation, which has also been reported by Nabeshi et al. [35]. They showed the size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica particles (70, 300, and 1000 nm) on mouse epidermal Langerhans cells. The smallest particles induced greater cytotoxicity and inhibited cellular proliferation [35]. We investigated the concentration

dependency of silica particles on Caco-2 cells and found that SP-50 was cytotoxic. No cytotoxicity was observed, however, for SP-100 or SP-200, in any of the various types of fluids, even at a concentration of 10 mg/mL (Fig. 8). By contrast, when SP-50 was dispersed in PBS or fasted-state simulated fluids, significant cytotoxicity was detected for all concentrations of the particles, with increasing cytotoxicity as the silica concentration increased. Although SP-100 and 200 were also internalized in the Caco-2 cells in the fasted state, cytotoxicity was not observed.

The size-dependent toxicity of amorphous nanosilica has been also reported by other researchers [16]. The relationship between cytotoxicity and particle sizes observed in our study has been discussed previously by others. Yu et al. examined the cytotoxic activity of well-dispersed amorphous silica particles (30–535 nm) in mouse keratinocytes [36]. All sizes of particles were taken up into the cell cytoplasm. The toxicity was dose- and size-dependent, with 30- and 48-nm particles being more cytotoxic than 118- and 535-nm particles. Nabeshi et al. showed the size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica particles (70, 300, and 1000 nm) on mouse epidermal Langerhans cells [35]. They found that the smallest particles induced the greatest cytotoxicity and inhibited cellular proliferation. These observed effects were associated with the quantity of particle uptake into the cells. This association was also present in our study, where the cytotoxicity of SP-50 correlated with the concentration (Fig. 8). Yang et al. evaluated the effects of amorphous silica particles (15 and 30 nm) on cellular viability, the cell cycle, and apoptosis in the human epidermal keratinocyte cell line HaCaT [37]. Their microscopic examination revealed morphological changes after 24-h exposures. Cell growth also appeared to be significantly inhibited, and the smaller silica particles were more cytotoxic and induced a higher rate of apoptosis. Oberdörster et al. argued that since smaller particles have a bigger surface area per unit of mass, the surface area is a pivotal factor for the displayed biological activity [38]. The mechanisms by which silica particles exert their cytotoxic effects are still largely unknown, and recent research illustrates the complexity in identifying the hazards of nanoparticles for human health [39]. However, there are many possibilities, including damage to the plasma membrane before particles penetrate the cells, intracellular interference after uptake in late or lysosomal structures, and lysosomal escape [16]. Another research indicated that the effect of silica nanoparticles on HT-29 cells is mediated by the interference with the signaling pathway such as MAPK/ERK1/2 [40].

Our study showed that when SP-50 was dispersed in FeSSIF, large agglomerates were formed, and cytotoxicity was not observed. This indicated that even if the primary particle size was less than 100 nm, the cytotoxicity was largely affected by the agglomerate formation.

Guidance for the assessment of risks associated with the application of nanoscience and nanotechnologies in the food and feed chain [41] recommends *in vitro* tests, including assessments of the effect of particles on the integrity of the gastrointestinal barriers. Our studies proposed one model to assess the integrity/permeability of the gastrointestinal barrier, and the cytotoxicity based on differentiated Caco-2 cells. Parameters such as the cell viability and the TEER can be also considered to be recommended in the guidance.

5. Conclusions

In the present study, we developed the *in vitro* assay systems including cellular uptake, transport study, and cytotoxicity study models using Caco-2 cells and simulated gastrointestinal fluids to help the evaluation of the intestinal permeability properties and intestinal cell toxicity of silica particles after they were administered orally. Our study showed that the agglomeration of silica particles was affected by the diet and gastrointestinal fluids. Our study also indicated that there was no significant penetration of silica particles through *in vitro* models (Caco-2 cells), and the cytotoxicity was not observed if the mean size was larger than 100 nm. This study further showed that the secondary size, including