

価., 日本薬学会第 136 年会., 横浜(神奈川), 2016 年 3 月.

26. 衛藤舜一, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 半田貴之, 和泉夏実, 堤 康央: 獲得免疫に着目した、非晶質ナノシリカのハザード同定., 日本薬学会第 136 年会., 横浜(神奈川), 2016 年 3 月.
27. 笠原淳平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 田中康太, 西川雄樹, 真木彩花, 田熊一徹, 長野一也, 松田敏夫, 堤 康央: ナノ銀粒子の 28 日間連日経鼻曝露による脳への影響評価., 日本薬学会第 136 年会., 横浜(神奈川), 2016 年 3 月.

【国際学会発表: 合計 2 件】

1. Higashisaka K., Iwahara Y., Yanagihara I., Saito S., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Neutrophil depletion increase silica nanoparticle-induced placental cellular damage., 51st Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox 2015), Porto (Portugal), 13-16 September, 2015.
2. Aoyama M., Yoshioka Y., Arai Y., Ishimoto R., Nagano K., Nagai T., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The quantitative assessments of the intracellular movements of nanoparticles and sub-micron particles., The American Society for Cell Biology 2015 Meeting, San Diego (USA), 12-16 December, 2015.

H. 知的財産権の出願・登録状況

- ① 特許取得
該当無し
- ② 実用新案登録
該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科毒性学分野（職員6名・大学院生/学生19名）：長野一也准教授、東阪和馬助教、三浦直樹研究員、村山香理、長橋里佐子、橋野修代、畑 勝友、平井敏郎、森下裕貴、今井峻司、永野貴士、青山道彦、石本里緒、難波佑貴、西川雄樹、半田貴之、和泉夏実、清水雄貴、真木彩花、向井美穂、石坂拓也、大須賀絵理、竹谷苑子、芳賀優弥、平井はるな、井阪 亮、泉 雅広、衛藤舜一、笠原淳平

大阪大学微生物病研究所 BIKEN 次世代ワクチン協働研究所（職員 1 名）：吉岡靖雄准教授

独立行政法人医薬基盤研究所バイオ創薬プロジェクト（職員 3 名）：角田慎一リーダー、鎌田春彦サブリーダー、國丸亜記

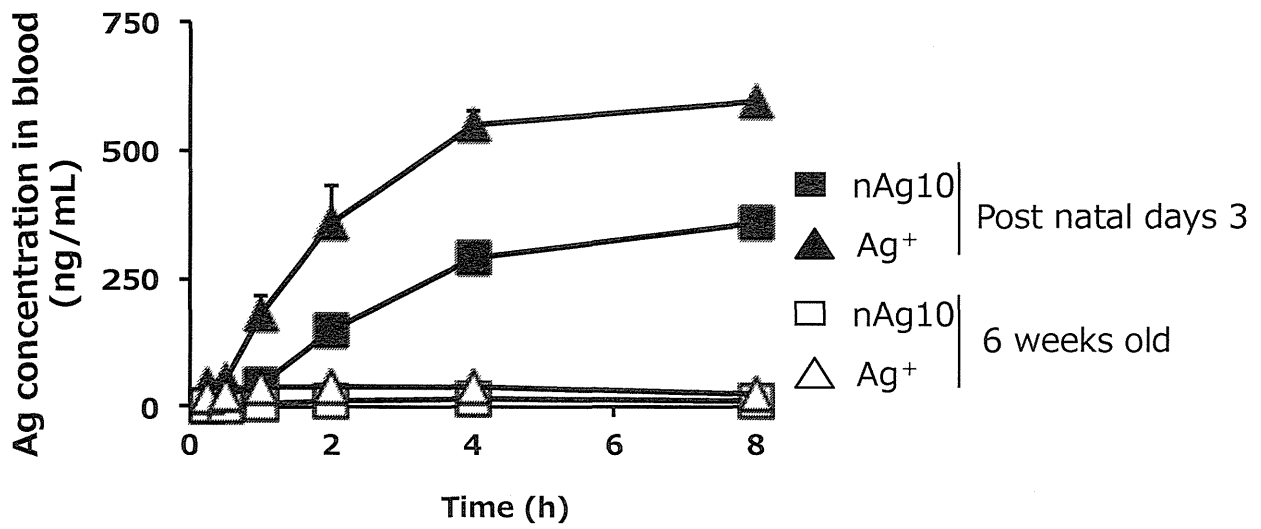


Fig.1. 乳幼児と成体におけるナノ銀の吸収性. 終濃度0.25mg/mLのnAg10及びAg⁺を調整し、2.5 mg/kgで生後3日齢若しくは6週齢のBALB/cマウスに経口投与した。投与後0.025, 0.5, 1, 2, 4, 8時間後に血液を回収し、ICP-MSにより血中Ag濃度を測定した。

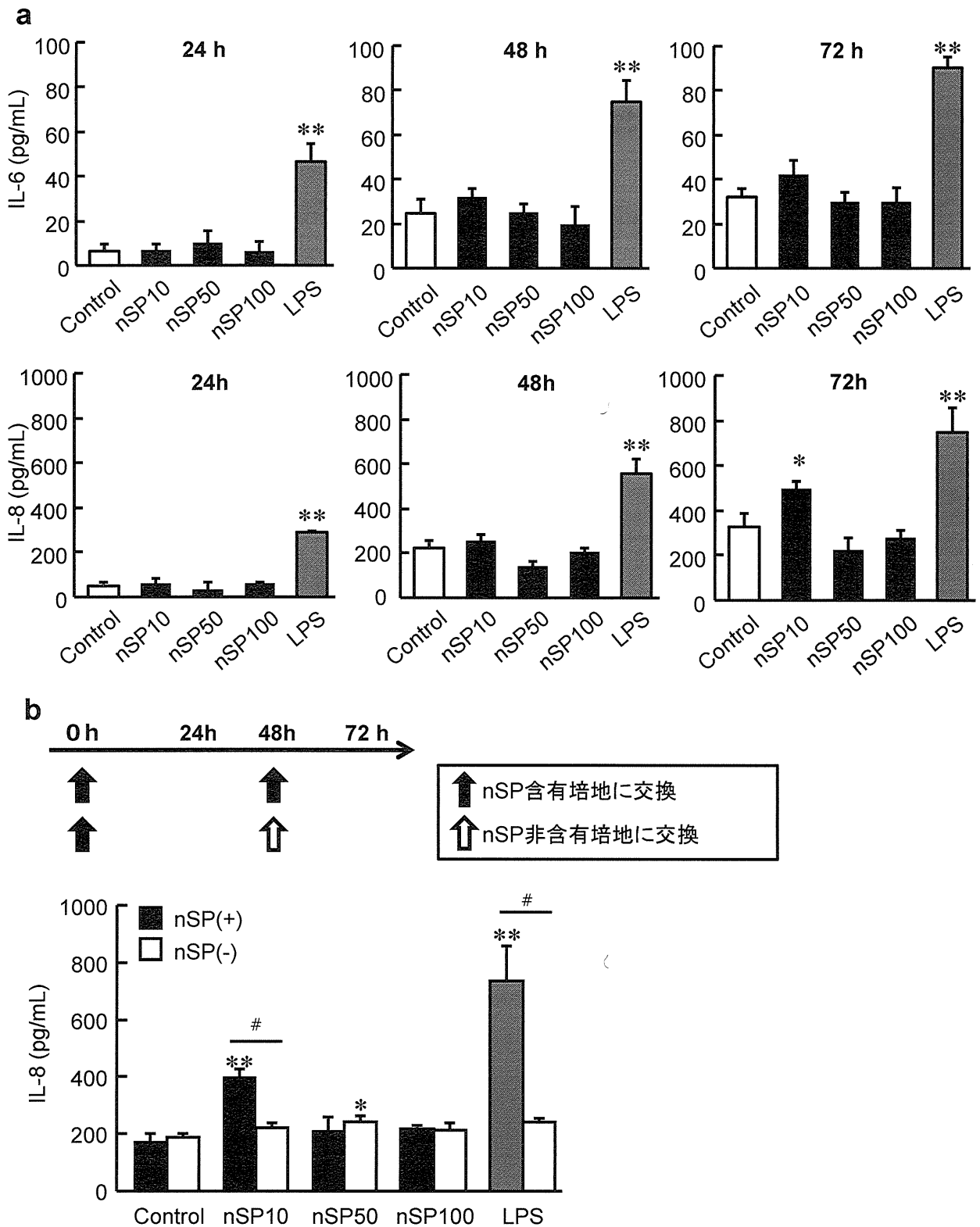


Fig.2. 非晶質ナノシリカ連日曝露時のA549細胞における起炎性評価。 (a) 非晶質ナノシリカの起炎性：終濃度125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の10, 50, 100 nmの非晶質ナノシリカ(nSP10,nSP50,nSP100)をA549細胞に曝露させた際の培養上清中のIL-6,IL-8産生を経時的に測定した。(b) 起炎性の継続性：非晶質ナノシリカを48時間曝露後、ナノシリカ含有/非含有培地に交換し、さらに24時間曝露させた際の培養上清中のIL-8産生を測定し、非晶質ナノシリカの起炎性の継続性を評価した。

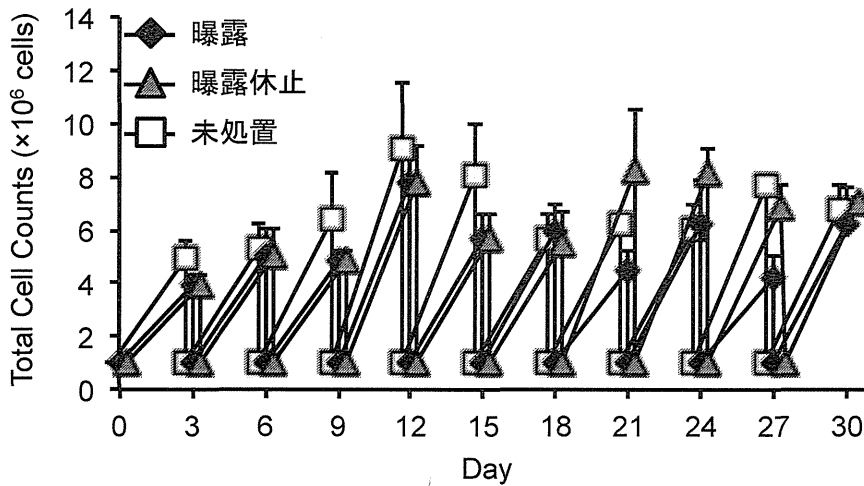
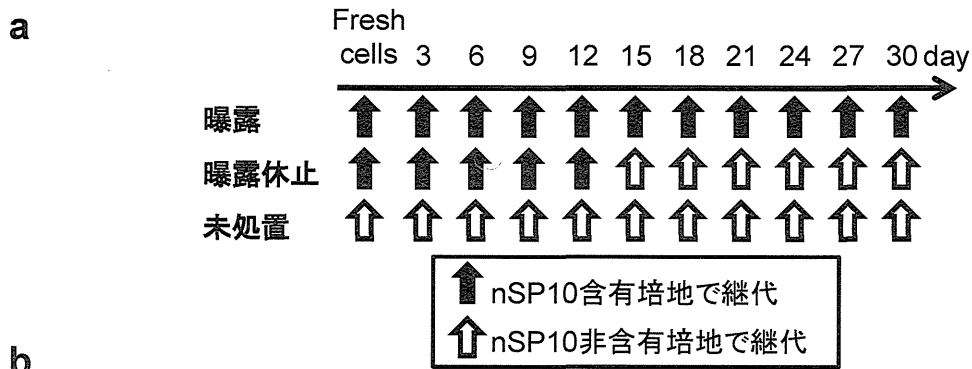
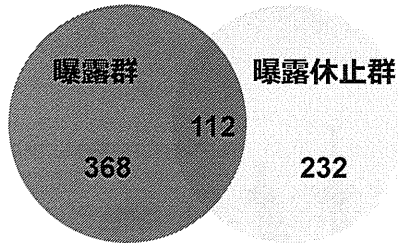


Fig.3. 非晶質ナノシリカ長期曝露・曝露から時間がたった際の影響評価. 非晶質ナノシリカに長期曝露した際に可逆的/不可逆的に変化する影響を評価する目的で、3日ごとの継代をはさみながら、A549細胞を125 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP10含有培地で30日間培養した（曝露）群、nSP10含有培地で15日間培養した後、非含有培地で15日間培養した（曝露休止）群、非含有培地で30日間培養した（未処置）群における影響評価を試みた。（a）各群の模式図、（b）30日間培養した際のnSP10の慢性曝露が細胞増殖に与える影響を評価する目的で、3日ごとの細胞継代時における細胞数を計測した。

a

	曝露群	曝露休止
All	783	709
Upregulated	480	344
Downregulated	303	365

b Upregulated genes



c Downregulated genes

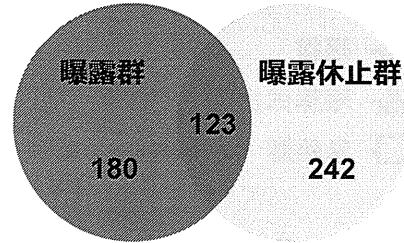


Fig.4. 非晶質ナノシリカ長期曝露時の遺伝子変動の網羅的解析 非晶質ナノシリカに長期曝露した際の可逆的/不可逆的な遺伝子変動に関して、マイクロアレイにより解析を試みた。(a) 曝露群、曝露休止群の遺伝子のうち、未処置群と比較して、2倍以上発現変動が認められた遺伝子を変動遺伝子とした。(b) 変動遺伝子のうち、2倍以上の発現上昇が認められた遺伝子、(c) 2倍以上の発現低下が認められた遺伝子をそれぞれ、グラフとした。

Network	Genes	Functions and diseases	Score ^a
1	AKT, ALOX12 , ANGPT1 , BCL11B , CCL19 , CD3, CD163 , DIO2 , ERK, ERK1/2, FGF21 , FLNA , GRP, IgG, IL21 , IL15RA , IL21R , KRT13 , LANCL2 , LTA, LTB , MAP3K8, miR-515-3p, NF-kB(complex), P38 MAPK, PTPRC , RORC , RUNX2 , SERPINA1 , SPAG11B , SPTB , TCF, TCL1A , TGFA , TJP2	Tissue Morphology, Lymphoid Tissue Structure and Development, Hematological System Development and Function	41
2	ACSL5, ADH4 , CD40, CDX2, CTNNB1, CXCL10, EGR1, FAM167A , FAS, HNF1A, HNMT , IFNA7 , IRF1, IRF3, IRF7, LAMA4 , MAPK1, MYRIP , NCALD , NXF5 , PDGF BB, POU5F1, PSG9 , PTGS2, RARA, RNF148 , S100G , SFTPB , SMARCA4, SRC, SRF, TAGLN, TCAF2, TLR4, TRPM8	Cellular Development, Hematological System Development and Function, Hematopoiesis	19
3	AHSP , Alpha tubulin, CD33 , COL6A3 , CXCL8, CXCR1, EPB41 , FAS, FASLG, FBN1, FBXL13 , FGFR2, GRHL3 , Histone h3, ILK, IRF6, KAT5, LTBP2 , MAP3K8, MAP3K14, MAPK1, MMP25, OR2M4 , Pkc(s), PPRC1, RELA, RGS1 , SELPLG , SIRT1, SPDEF, TGFA , TGFB1, TGFB1, TM6SF1 , TPM1	Cellular Movement, Hematological System Development and Function, Immune Cell Trafficking	17
4	ADGRF5 , ARFGEF2, CCND1, CHTOP, Cofilin, DYSF, ELF5 , ERG, ETV5, FMNL3 , FN1, Focal adhesion kinase, FOXC2 , FYN, GAS1 , ILK, ITGA4, ITGA5, ITGAV, ITGB1, ITGB7, MADCAM1 , PARVA, PDGFRA, PPP2R1A, PTPN11, RAC1, RUFY3 , SIGLEC5 , SIKE1, SPTBN5 , SRC (family), STRIP1, TNK2 , TRAF3IP3	Cell-To-Cell Signaling and Interaction, Embryonic Development, Tissue Development	15
5	AASS , ADORA1, BMP2, CH17-360D5. 1/NPY4R, ESR1, ESRRA, ETV6 , FAAP20 , FAM186A , FANCA, FANCC, FANCD2, FANCE, FANCL, FANCM, Gsk3, GSK3B, HAMP, HDAC7 , HDAC9, ILK, NCOR1, NCOR2, NFKB1, PARVB , PPY , RARA, RPRM, RPS6KB1, SYTL5 , TRIM41 , TXK , WWOX, ZMYM6 , ZNF24	Cardiovascular Disease, Developmental Disorder, Hematological Disease	15

The rest of the genes either did not show any significant change or were not detected from array; ^aA score > 5 was significant. (Changed genes in bold face)

Table 1. 非晶質ナノシリカ長期曝露時の曝露群・曝露休止群で共通して変動していた235遺伝子のネットワーク解析結果 非晶質ナノシリカに長期曝露した際に曝露群・曝露休止群で共に発現変動していた235遺伝子を基に、ネットワーク解析を行い、関係の深い経路と関連遺伝子の絞り込みを行った。その結果、上記の5つの経路、それらを構成する下線を引いた70個の遺伝子に分類することができた。

Gene Symbol	Gene Name	Protein Class	Fold change	
			曝露群	曝露休止
TGFA	Transforming growth factor alpha	growth factor	6.80	3.67
RUNX2	Runt-related transcription factor 2	transcription factor	5.29	2.62
FGF21	Fibroblast growth factor 21	growth factor	5.23	7.93
IL21	Interleukin-21	type I cytokine	4.81	4.50
IL21R	Interleukin-21 receptor	type I cytokine receptor	4.81	4.50
PTPRC	Protein tyrosine phosphatase, receptor type, C	protein phosphatase	4.70	2.40
KRT13	Keratin, type I cytoskeletal 13	structural protein iodothyronine	2.89	2.14
DIO2	Deiodinase, iodothyronine, type II	deiodinase family	2.50	4.14
ANGPT1	Angiotensin-1	signaling molecule	2.27	5.20
RORC	RAR-related orphan receptor C	nuclear hormone receptor	-2.42	-2.52
CD163	Scavenger receptor cysteine-rich type 1 protein M130	serine protease	-2.73	-3.90
FLNA	Filamin-A	non-motor actin binding protein	-3.20	-5.84
CCL19	C-C motif chemokine 19	chemokine	-3.25	-2.55
TCL1A	T-Cell Leukemia/Lymphoma 1A	development of T cell leukemia	-6.10	-7.24
LTB	Lymphotoxin-beta	tumor necrosis factor family	-17.8	-15.8

Table 2. 経路1に関連しており、発現変動が高い発現変動が認められた15遺伝子

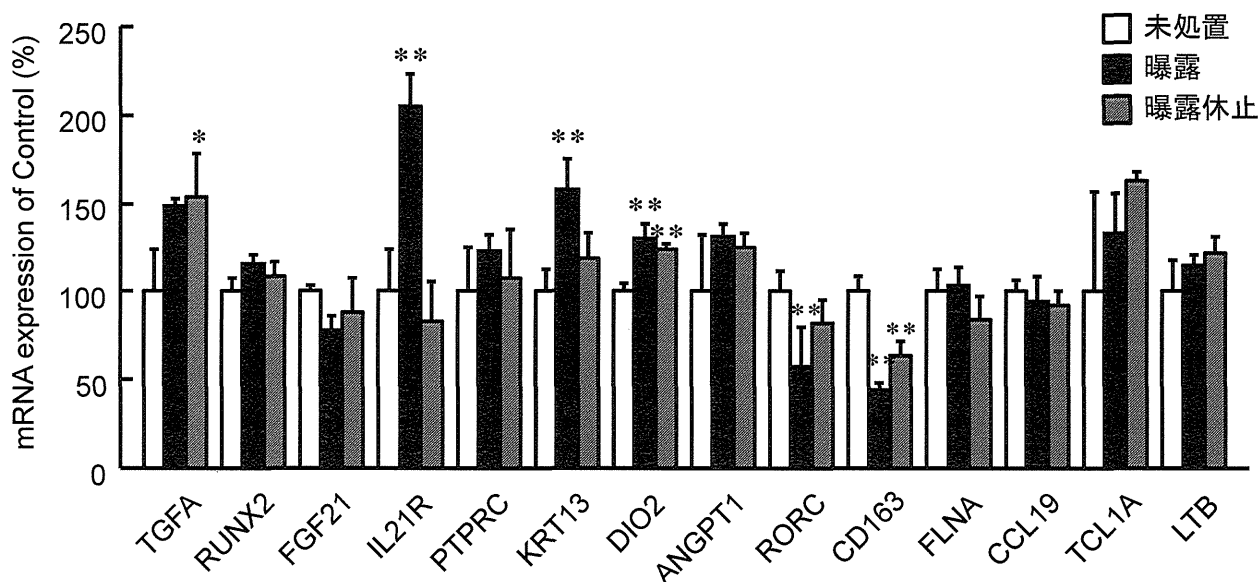


Fig.5. RT-PCRを用いた変動遺伝子の半定量的解析 マイクロアレイにより、長期曝露による変動の可能性のある遺伝子のうち、特に関連の深い15遺伝子に関して、RT-PCRを用い、発現変動に関して、半定量的に解析した。

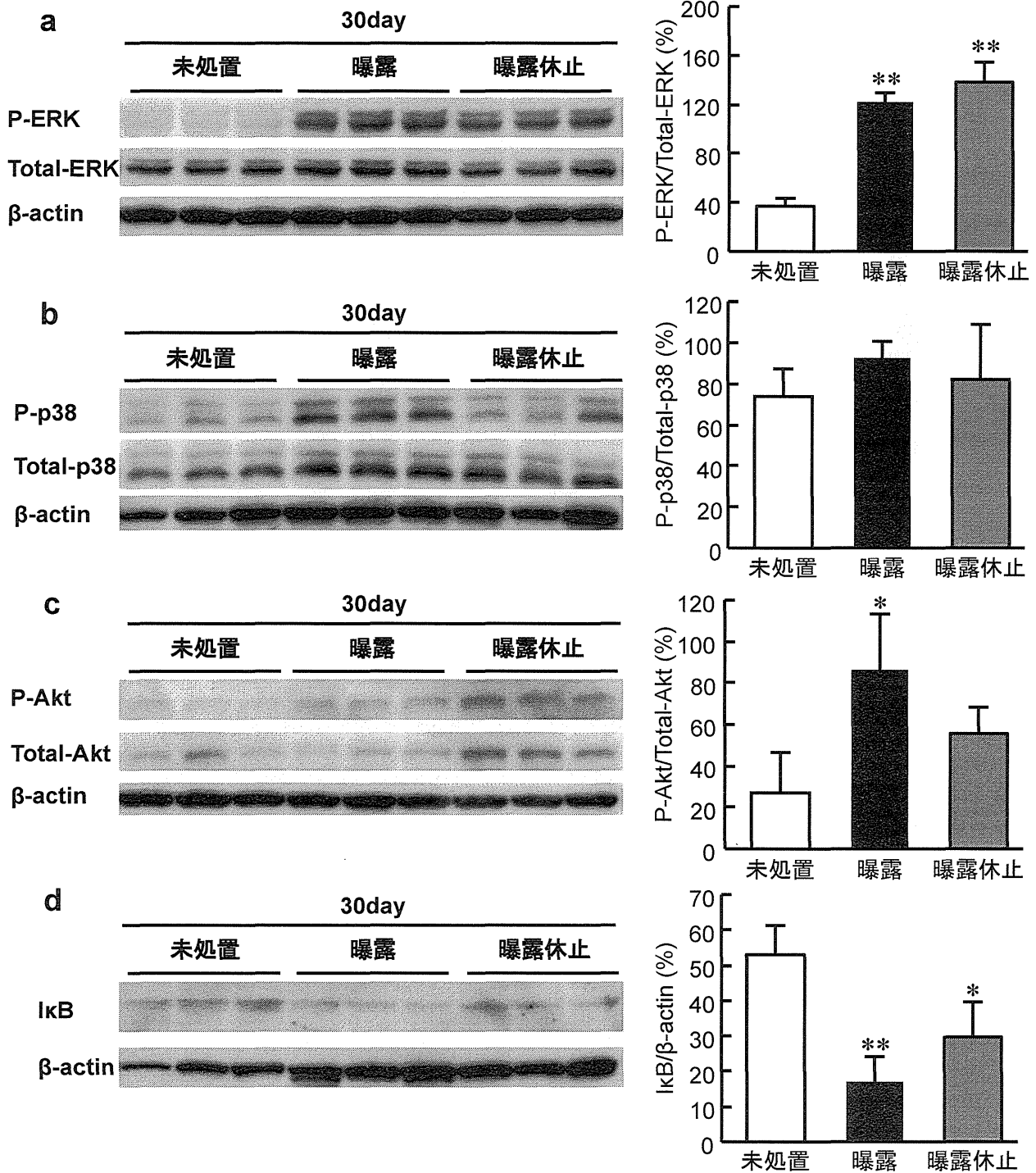


Fig.6. Western blottingによるERK、p38、Akt、NF κ Bの活性の変動解析 RT-PCRにより、変動が認められた遺伝子と同じ経路に存在する蛋白質の活性化をwestern blottingにより、解析した。(a-c) ERK、Akt、p38の活性化をリン酸化蛋白質の割合を指標に評価した。(d)NF- κ Bの活性化をI κ Bの分解を指標に評価した。

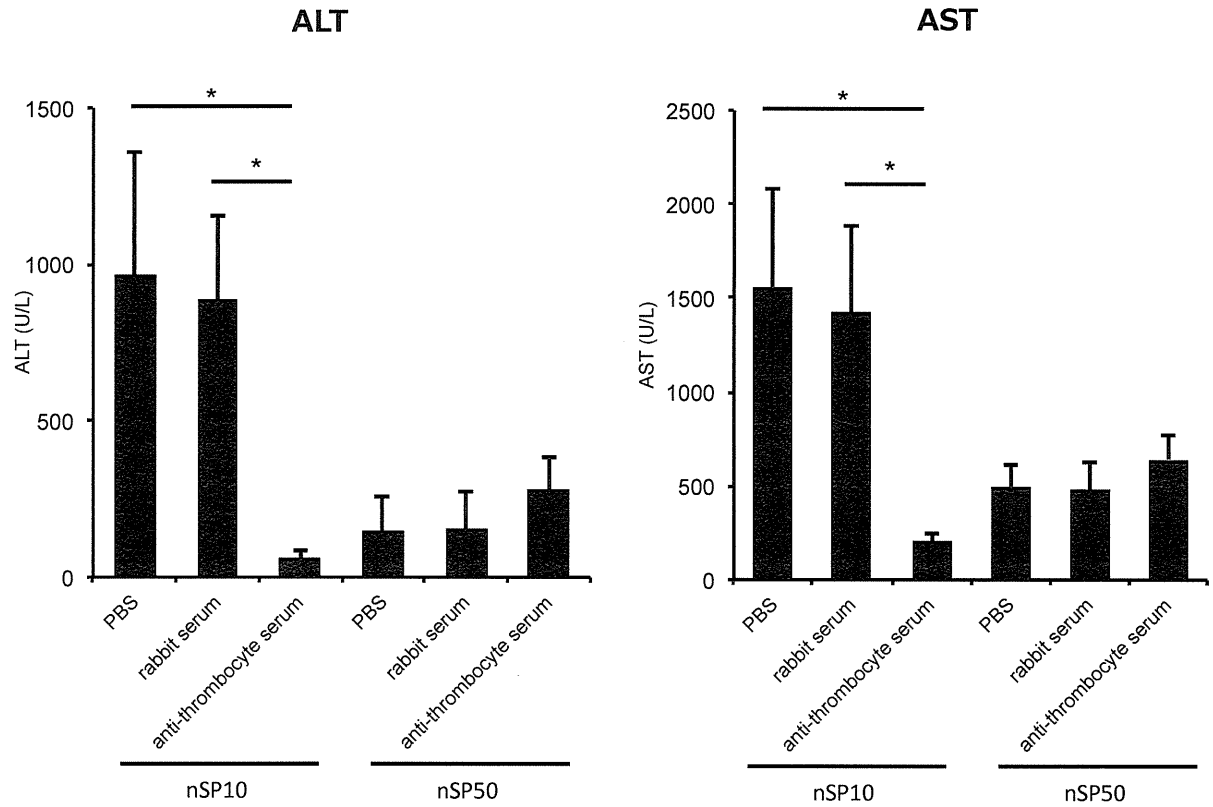


Fig. 7. 抗血小板血清による血小板の枯渇がnSP10、nSP50の肝障害に与える影響評価
 C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=4) に、PBS、抗血小板血清(50 μ L/mouse)、コントロールであるウサギ血清を前処置した後、24時間後に15 mg/kg nSP10もしくは80 mg/kg nSP50を静脈内投与した。投与4時間後に血漿を回収し、肝障害マーカーであるALT およびASTを測定した。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=4)。*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group.

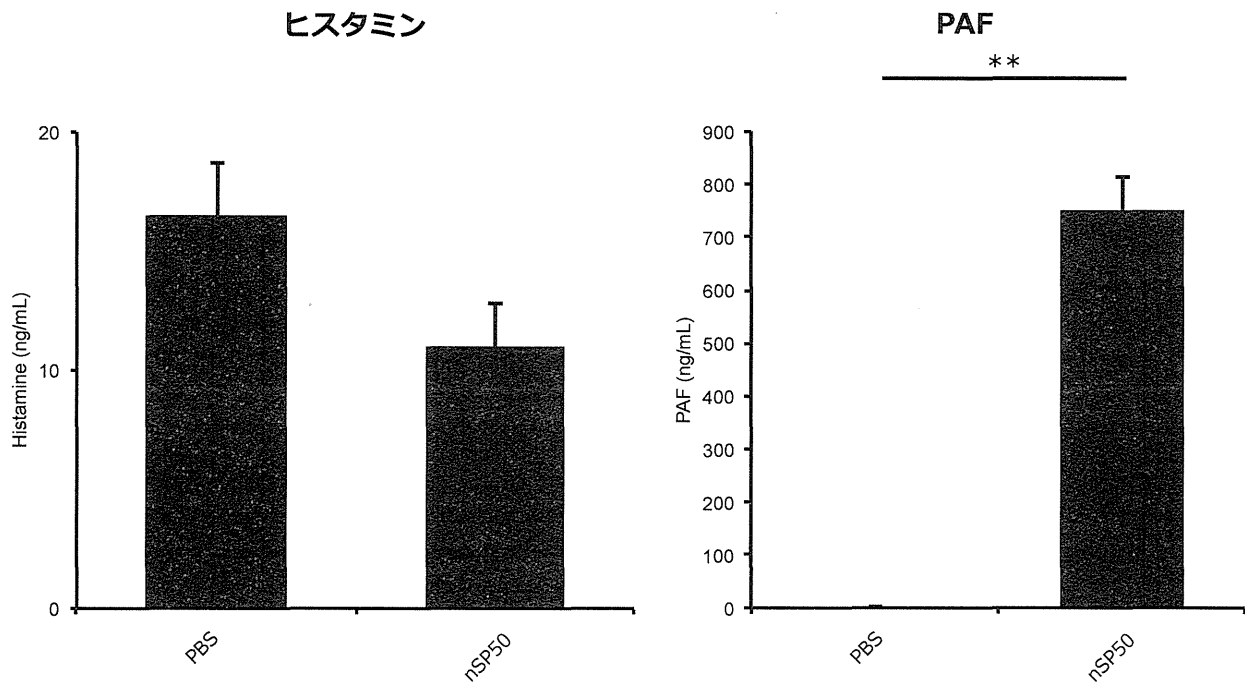


Fig. 8. 非晶質ナノシリカ投与による血液中のヒスタミンおよび、PAFの産生量の評価
 C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=4) に80 mg/kg nSP50およびコントロールとしてPBSを静脈内投与した。投与20分後に血漿を回収し、血液中のヒスタミンおよびPAFの産生量をELISAにより測定した。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=4)。*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group.

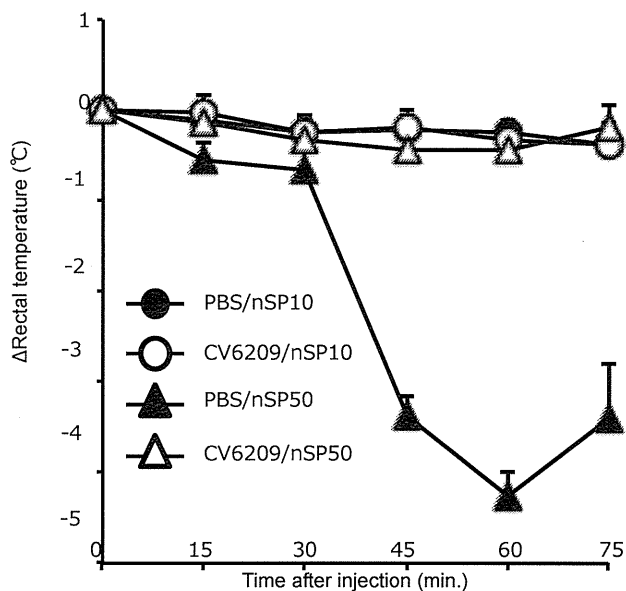


Fig 9. 非晶質ナノシリカ誘導性の体温低下におけるPAFの関与

C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=5) に、PAF受容体阻害剤 CV6209 (50 μ g/mouse)、コントロールであるPBSを前処置した30分後に、15 mg/kg nSP10もしくは80 mg/kg nSP50を静脈内投与し、直腸体温を静脈投与後0分から75分まで15分毎に測定した。(a) 経時的な体温低下 (b)最大体温低下値をそれぞれグラフとした。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=5).

*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group.

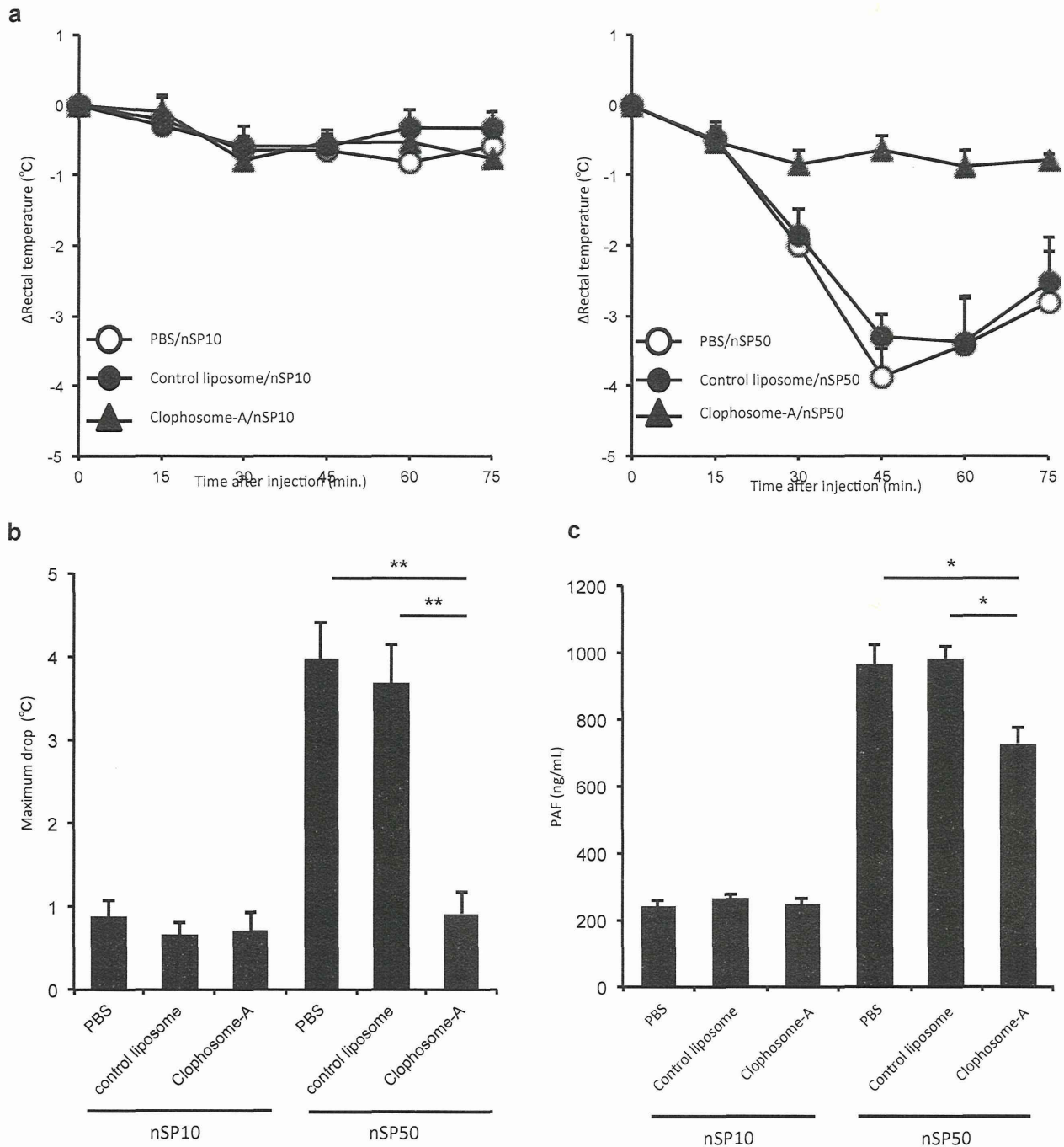


Fig. 10. PAF依存的な非晶質ナノシリカ誘導性の体温低下におけるマクロファージの関与
 C3H/HeN mice (雄性, 10 週齢, n=5) に、Clophosome-A (150 μ L/mouse) を前処置し、マクロファージを枯渇させた。前処置を行ったマウスとコントロールであるPBSを前処置したマウスに、24時間後に、15 mg/kg nSP10 もしくは80 mg/kg nSP50 を静脈内投与し、直腸体温を静脈投与後0分から75分まで15分毎に測定した。(a) 経時的な体温低下 (b) 最大体温低下値をそれぞれグラフとした。(c) 非晶質ナノシリカ投与後20分の血漿を回収し、ELISAにより、血漿中のPAF産生量を測定した。実験結果は、平均値および標準誤差で表記(n=6-7).
 *P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group.

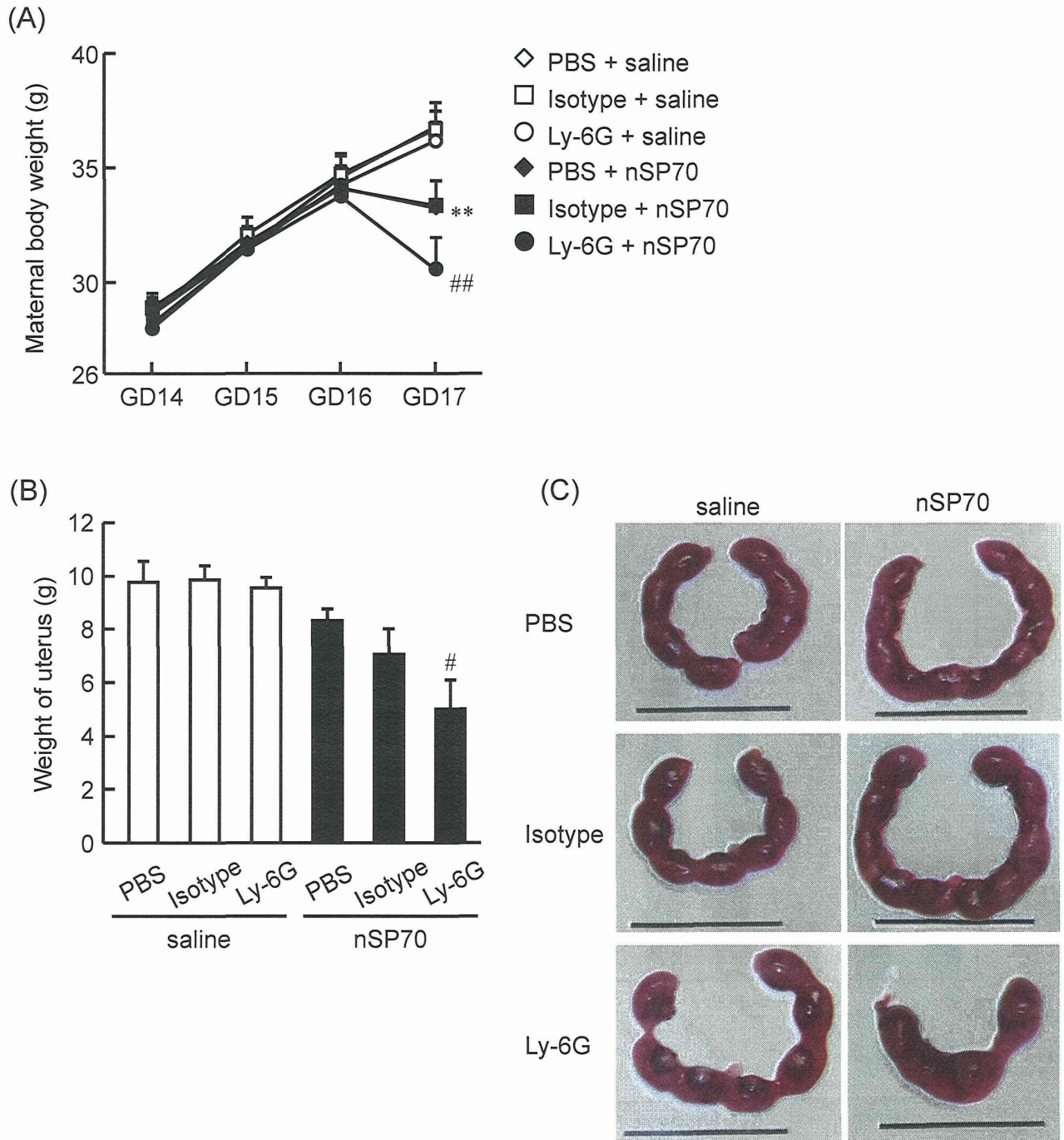


Fig.11. 好中球のdepletionがnSP70投与による母体重量の減少を悪化する

妊娠15日目のBalb/cマウスに抗Ly-6G抗体、またはIsotype抗体を腹腔内投与し(150 μ g/mouse)、投与24時間後、nSP70 (0.8 mg/mouse)、あるいはsalineを尾静脈内より投与した。(A) 母体体重の推移を連日解析すると共に、(B) 妊娠17日目に解剖し、子宮重量を測定後、肉眼的解剖所見を実施した。Data are presented as mean \pm SEM; n = 9-10; **P < 0.01 vs saline-treated group with pretreatment of PBS; ##P < 0.01 vs nSP70-treated group with pretreatment of anti-Ly-6G antibody.

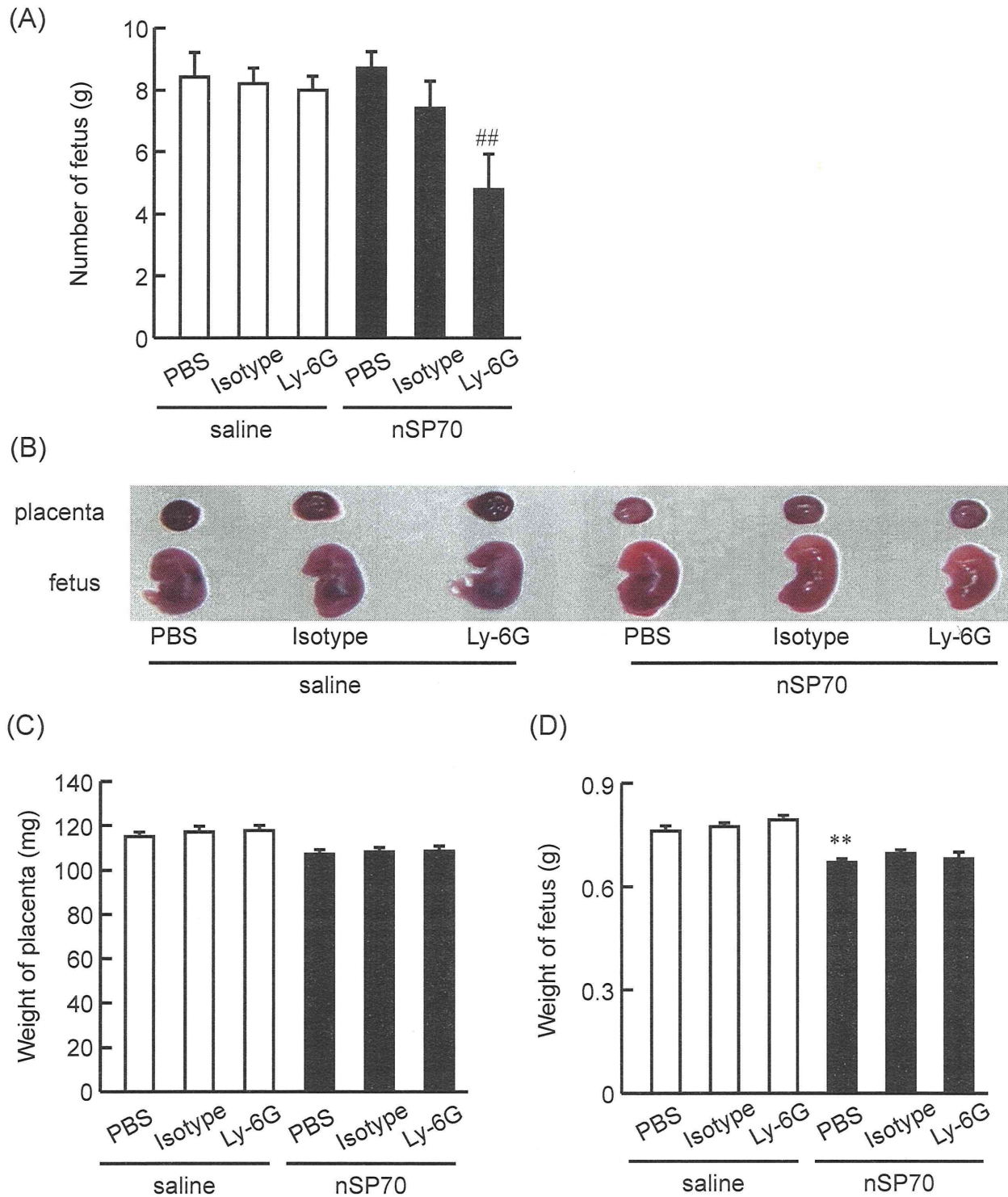


Fig.12. 好中球のdepletionがnSP70投与による妊娠障害を悪化する

妊娠15日目のBalb/cマウスに抗Ly-6G抗体、またはIsotype抗体を腹腔内投与し(150 μ g/mouse)、投与24時間後、nSP70 (0.8 mg/mouse)、あるいはsalineを尾静脈内より投与した。妊娠17日目に解剖し、(A) 胎仔数の測定、ならびに (B) 胎仔の肉眼的解剖所見の実施、(C) 胎盤重量、(D) 胎仔重量を評価した。Data are presented as mean \pm SEM; n = 9-10; **P < 0.01 vs saline-treated group with pretreatment of PBS; ##P < 0.01 vs nSP70-treated group with pretreatment of anti-Ly-6G antibody.

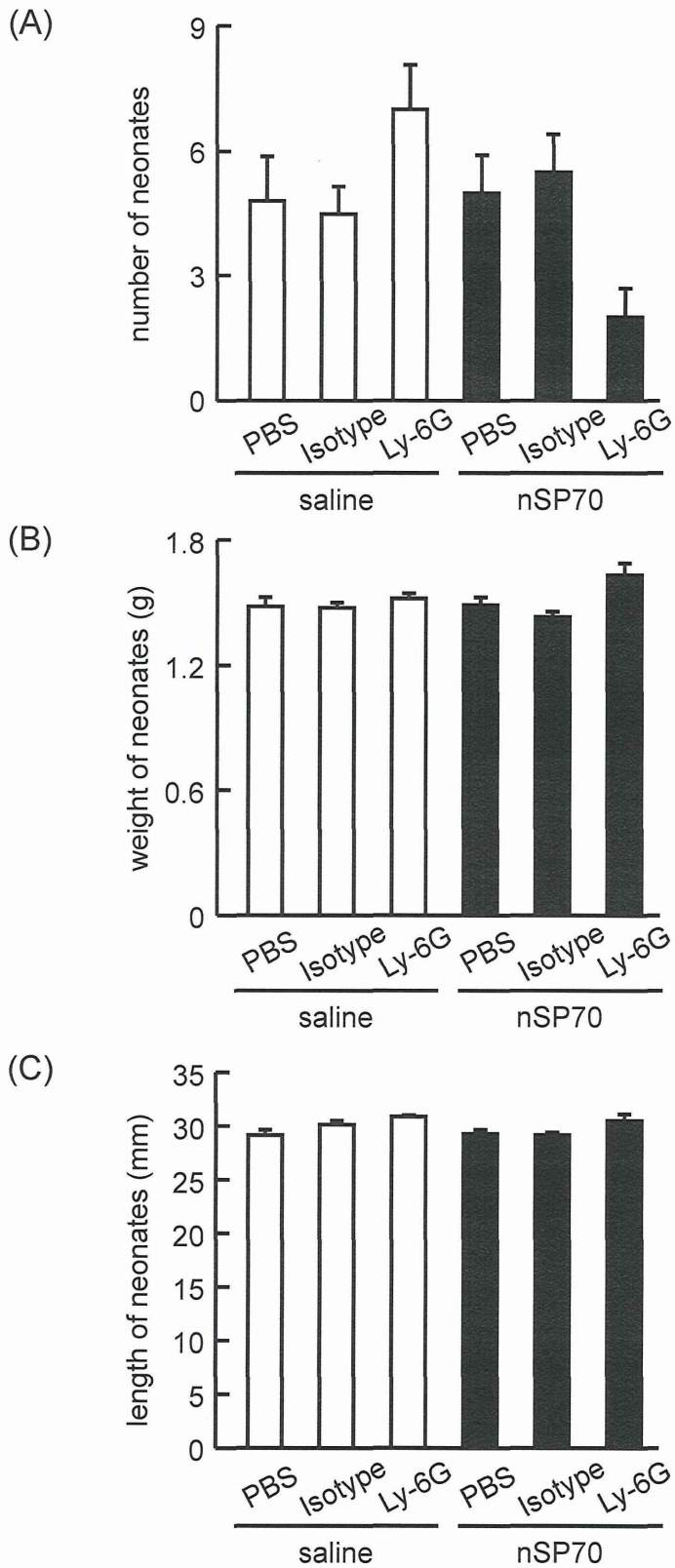


Fig. 13. 好中球のdepletionがnSP70投与後の生存出生仔に及ぼす影響

妊娠15日目のBalb/cマウスに抗Ly-6G抗体、またはIsotype抗体を腹腔内投与し(150 μ g/mouse)、投与24時間後、nSP70 (0.8 mg/mouse)、あるいはsalineを尾静脈内より投与した。その後自然分娩させ、(A) 新生仔数の測定、ならびに (B) 新生仔の重量、(C) 新生仔の体長を測定した。Data are presented as mean \pm SEM; n = 5-6.

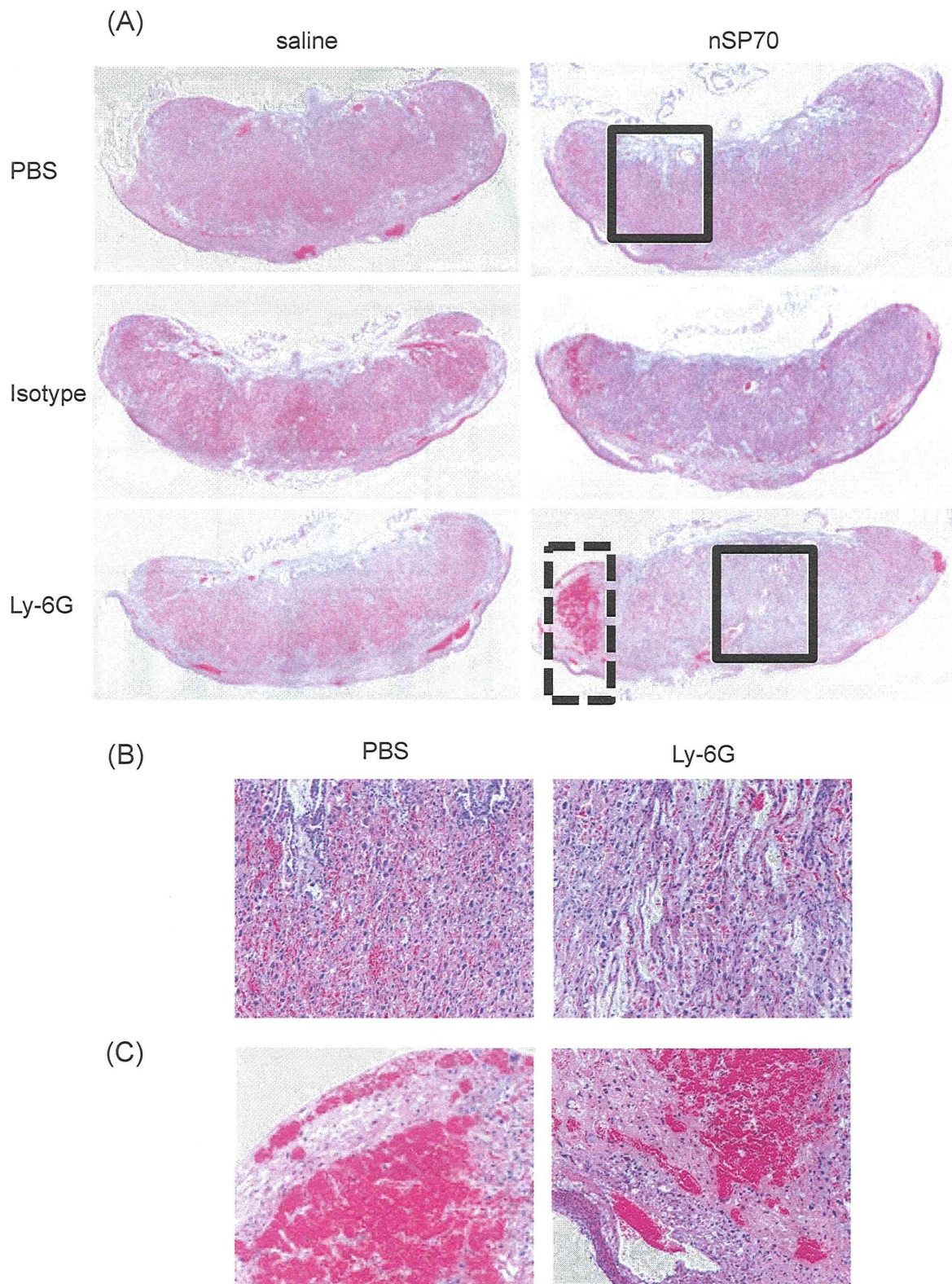


Fig.14. 好中球のdepletionがnSP70投与による胎盤障害を悪化させる

妊娠15日目のBalb/cマウスに抗Ly-6G抗体、またはIsotype抗体を腹腔内投与し(150 μ g/mouse)、投与24時間後、nSP70 (0.8 mg/mouse)、あるいはsalineを尾静脈内より投与した。(A) 妊娠17日目に解剖し、胎盤を回収した後、HE染色により胎盤の機能異常を評価した。(B) 病理画像内の黒枠部分を拡大、(C) 破線部を拡大した写真を示す。

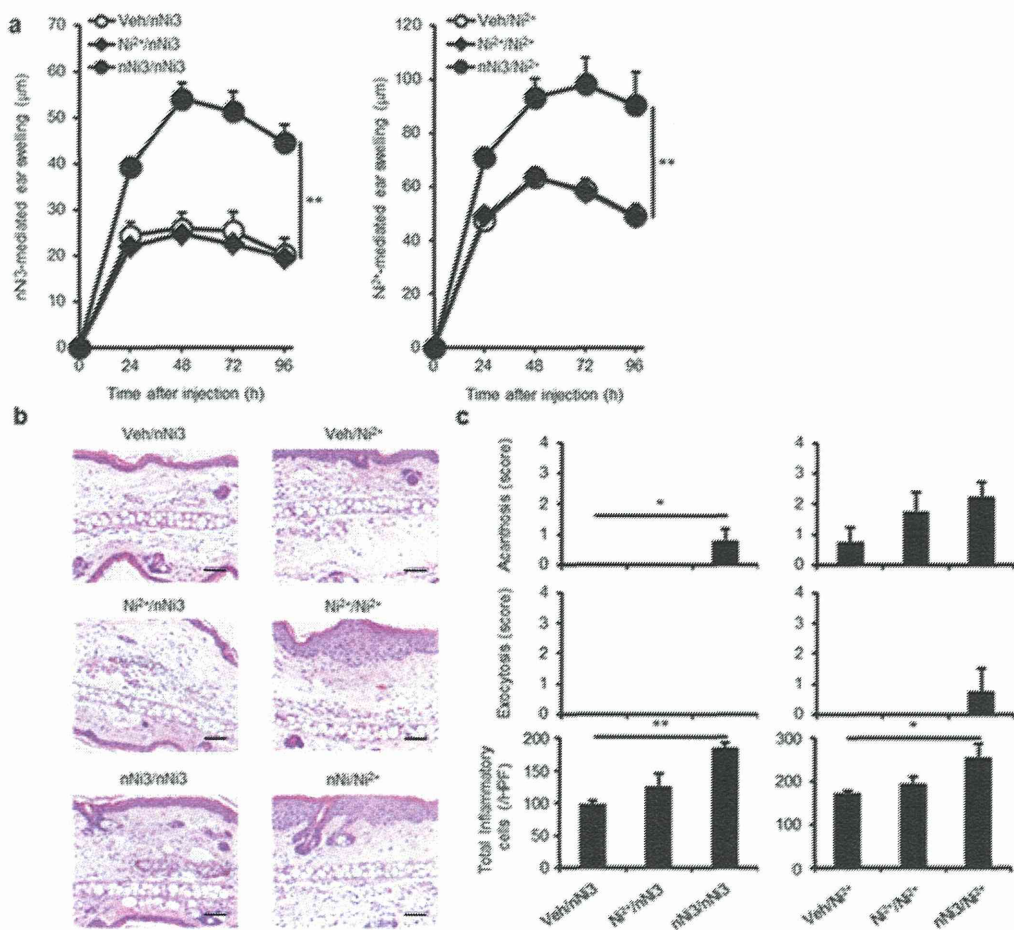


Fig.15. nNiの感作性の評価.

800 µl/ml nNi溶液を20 µlずつ、BALB/cマウスの足蹠に週1回4週にわたり感作投与した。最終投与1週間後にマウス左耳介部皮内に、同濃度のnNi3またはNi²⁺を10 µlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnNi3またはNi²⁺の惹起投与による経時的な耳介部の腫れの増強 (a)、投与4日後の病理像 (b)、また炎症性細胞浸潤数 (c) でnNi3の感作性を評価した。

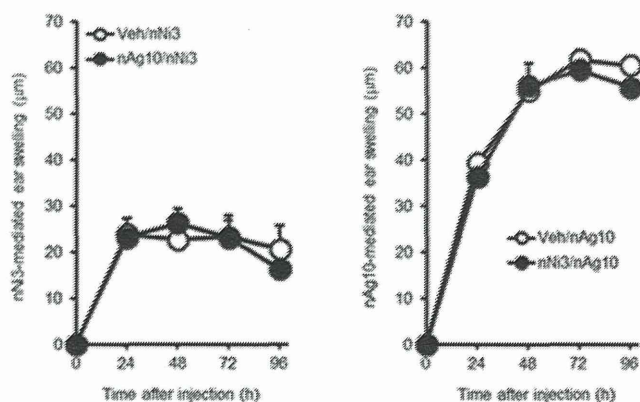


Fig.16. nAg10とnNiの金属間交差性の評価.

nAg溶液感作投与後、マウス左耳介部皮内にnNi3を10 µlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnNi3の惹起投与による経時的な耳介部の腫れの増強を指標に交差性を評価した。また、nNi3感作投与後、nAgを惹起投与した際の経時的な耳介部の腫れの増強も測定した。

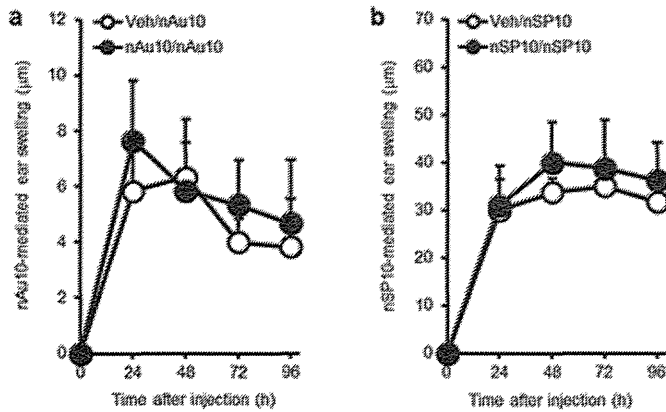


Fig.17. nAu10、nSP10の感作性の評価.

800 μl/ml nAu10溶液もしくはnSP10を20 μlずつ、BALB/cマウスの足蹠に週1回4週にわたり感作投与した。最終投与1週間後にマウス左耳介部皮内に、同濃度のnAu10またはnSP10を10 μlを病態誘導のための惹起投与した。右耳介部皮内には同量の溶媒を投与した。この際のnAu10またはnSP10の惹起投与による経時的な耳介部の腫れの増強 (nAu10:a、nSP10:b) でそれぞれの粒子の感作性を評価した。

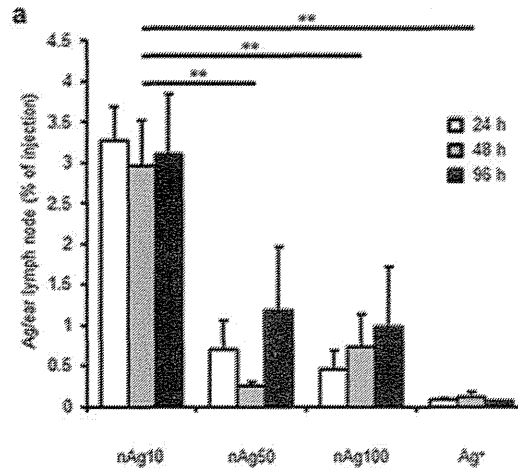


Fig.18. nAg10のリンパ節移行性、滞留性の評価.

800 μl/ml nAg10、nAg50、nAg100またはAg+溶液を10 μlずつ、BALB/cマウスの耳介部皮内に投与した。投与後24 h、48 h、96 h後に所属リンパ節を回収し、含有銀量をICP-MSにて測定した。

ヒトインターフェースに着目したナノリスク解析基盤 の構築に関する研究

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

ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品など様々な分野で広範に利用されている。しかしナノサイズ化により物質に独自の物性を付与するため、生体や環境に対して今までに予想もしなかった未知なる影響が起こり得るのではないかと懸念されている。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。今年度は C-CPE 添加でコレステロール生合成系遺伝子群が一斉に発現低下することに着目し、ナノマテリアルの安全性評価のマーカー遺伝子として用いることができるか否か、ナノシリカ粒子を使用して検討を行った。

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 が開講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. Real-time PCR による解析

平成 26 年度までのアレイ解析によって絞り込まれたマーカー候補遺伝子について Real-time PCR による解析を行った。12well Transwell plate に EpH-4 細胞を 1.18×10^5 cells/well で播種し、TER が安定するまで培養した。TER の安定後 C-CPE、Ib421-664 をそれぞれ投与し、0hr, 12hr, 24hr 後に TJ バリア機能の低下を確認後、それぞれの時間に細胞を回収し、「セパゾールを用いた Total RNA の抽出方法」によって Total RNA の抽出を行った。その後抽出した Total RNA を用いて cDNA を作製した (Roche Transcriptor First Strand cDNA Synthesis Kit を利用)。Real-time PCR 解析の試薬として、SYBR® Premix Ex Taq™ II (Tli RNaseH Plus)

を使用した。そして解析装置として Life Technologies; StepOnePlus™ Real-Time PCR System を用いた。

2. SREBP2 の関与に関する検討

コレステロール生合成系の遺伝子群を制御することが報告されている SREBP2 に着目し、ノックダウン解析を行った。siRNA SREBP2 は、Dharmacon 社よりデザイン済み siRNA の SMARTpool を購入した。トランスフェクション試薬には、Lipofectamine® RNAiMAX Reagent を使用した。6well plate に 2×10^5 cells/well で EpH4 細胞を播種し、24 時間後に siRNA SREBP2 を添加し 72 時間培養後 RNA 抽出し Real-time PCR 解析を行った。膜電気抵抗値 (Trans epithelial electric resistance : TEER) を測定する場合は 33 時間培養後、Transwell に播種し解析を行った。

3. ナノマテリアルの上皮バリア機能に与える影響

EpH-4 細胞を 12well Transwell plate に播種し、TEER が安定した後、ナノシリカ、ナノ銀を種々の濃度で添加した。以降 6 時間おきに TEER の測定を行った。ナノシリカ (sicaster®, フナコシ) は粒子径 10、50、300nm のものを使用した。ナノ銀 (nano Composix 社) は粒子径 10nm で表面をクエン酸修飾したものを使用した。いずれも使用直前に粒子分散液を 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。

4. ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現変動

EpH-4 細胞を 12well Transwell plate に播種しナノシリカを種々の濃度で添加した。24 時間後に RNA を抽出、cDNA 作成後 Real-time PCR 解析を行った。またナノシリカの細胞障害性に関して LDH assay で評価を行った。96well plate に 3×10^4 cells/well で EpH4 細胞を播種し、ナノ