

14. ナノ粒子の脳移行性に対する定量的評価基盤の構築

藤岡 宏樹

東京慈恵会医科大学 医学部 基盤研究施設

Key words : 血液脳関門, ナノ粒子, 透過性, スクリーニング

緒言

本研究は、脳への透過性が懸念されているナノサイズの粒子について、(1) 曝露頻度の高い粒子を中心に透過性を「定量的」に評価すること、また、(2) 脳への透過・排出機構について明らかにすることを目的とする。本研究を遂行することにより、ナノ粒子の脳への透過性について、簡便にスクリーニングを行う方法を構築し、定量データに基づいたリスク評価を行う研究基盤を構築する。

近年、機能性の高いナノ粒子が大量生産できるようになり、食品・化粧品・印刷など、身近な製品の品質を向上させている。また、ナノ薬剤の開発なども進められており、米国 FDA には 100 種類を超えるナノ薬剤が申請されている。更に、環境問題にもなっている PM2.5 にも多くのナノ粒子 (PM0.1) が含まれている。

このように、我々の身近に存在するナノ粒子ではあるが、安全性については解明途上である。現在、日本・欧米を中心として、細胞や実験動物を使用した毒性評価が進められており、吸入暴露による肺への傷害、癌化への影響などが報告されてきた。また、最近の研究結果からは、脳へのリスクが懸念されている。東京理科大学・武田教授ら、大阪大学・堤教授らの研究では、(1) 妊娠マウスへのナノ粒子投与によって、胎仔の脳に到達すること、(2) 皮膚へのナノ粒子の塗布で、脳に移行することが報告された。このことから、脳関連疾患へのリスク評価に対する関心が高まっている。

脳に対するナノ粒子の影響については、主として実験動物を対象とした評価が行われている。現在までに、透過性の有無、血管周囲の炎症反応、及びうつ症状の傾向などが明らかとなってきた。しかしながら、これまで行われてきたナノ粒子の安全性評価法には課題がある。それは、ガイドラインなどの標準手法が確立されていないことによる評価手法の非統一性である。これまでに標準化ができない背景には、ナノ粒子が薬剤とは異なる動態 (移行性・分布・分散性) を示し、更に、粒子ごとに異なる挙動を示すという難しさがある。この難しさのため、多くの論文では、他の論文とは異なる濃度や異なる投与・曝露方法が使われており、更に、定量的な評価が行われていない報告も散見される。このように、脳への移行性に対して、現状では論文間での比較や、リスク評価のための定量的なデータの検証が難しい場合が多い。

そこで本研究では、脳に透過するというリスクについて、定量的なデータに基づき評価するための研究基盤を構築したいと考えている。これまでに、筆者らは細胞を用いたナノ粒子の安全性評価と毒性機構の解明に取り組んできており、特に、半導体・シリコン・シリカ粒子について報告してきた¹⁻⁷⁾。

近年、我々はこれらの研究成果を生かし、血液脳関門モデル (BBB モデル) と細胞・組織で構成された脳のボトムアップモデルによる安全性評価法の開発に取り組んできた^{1,2)}。現在までに明らかになった重要な点は、BBB モデルによってナノ粒子の透過性が定量的に評価できる可能性を、動物試験との比較で示したことである (定量データ Papp の導入)¹⁾。製薬分野で薬剤移行の評価に使われてきた定量的な透過係数 (Papp: 移行しやすいほど高い) を、ナノ・マイクロ粒子の評価にも適用し、動物曝露試験の結果と整合性があることをシリカ粒子等で示した。定量化によってデータの検証がしやすくなり、他の粒子との比較が簡便になる。更に、市販医薬品の透過係数とも比較できるようになり、動態予測がしやすくなる。

また、BBB モデルを使った筆者らの研究からは、脳毛細血管内皮細胞へのダメージがナノ粒子の透過性機構の一部を規定する可能性が示唆されていた¹⁾。そこで、本課題では、ナノ粒子共存時の血管内皮細胞の挙動に焦点を当て、透過機構について検討を行った。

方法

ラット脳毛細血管内皮細胞、脳毛細血管内皮細胞用培養液、脳毛細血管内皮細胞用コーティング液、及び脳毛細血管内皮細胞用コート済みプレート（24 well）はファーマコセル株式会社から購入した。また、リアルタイム細胞アナライザー RTCA iCelligence システム、及び E-plate L8 は、ACEA Biosciences 社製のものを用いた。ナノ粒子は、既報論文¹⁾で BBB モデルでの透過性を確認した 30 nm シリカ粒子（Sicastar-red 30、Micromod Partikeltechnologie 社製）を用いた。

細胞観察による検討では、24 well plate に内皮細胞を 10,000 cells/well の密度で脳毛細血管内皮細胞用培養液に懸濁し培養を開始した（5 % CO₂、37 °C）。8 日間培養の後、3 種類の濃度（0.01、0.1、または 1 mg/mL）のシリカナノ粒子を添加し、60 分後に顕微鏡（BZ-9000、キーエンス社製）による観察を行った。

リアルタイム細胞アナライザーによる検討では、脳毛細血管内皮細胞用コーティング液でコートした E-plate L8 を用いた。E-plate L8 の各ウェルにコーティング液を 100 μ L 加え、4 °C で一晩静置した。静置後、コーティング液を除去しクリーンベンチ内で風乾、更に、紫外線照射を 30 分間行った。このコートした E-plate L8 に 40,000 cells/well で内皮細胞を播種、室温で 30 分間静置した。その後、37 °C で 1 日培養し、1.0 mg/mL になるようにシリカナノ粒子の溶液を加え、約 1 時間、電気抵抗値（Cell index）を測定した。

結果

脳毛細血管内皮細胞に対して、30 nm のシリカナノ粒子を 60 分間添加培養し、観察した結果を図 1 に示す。粒子なしのコントロール（a）、及び 0.01-1 mg/mL の粒子を添加した細胞の観察像（b） - （d）には、見かけ上大きな変化は観察されなかった。

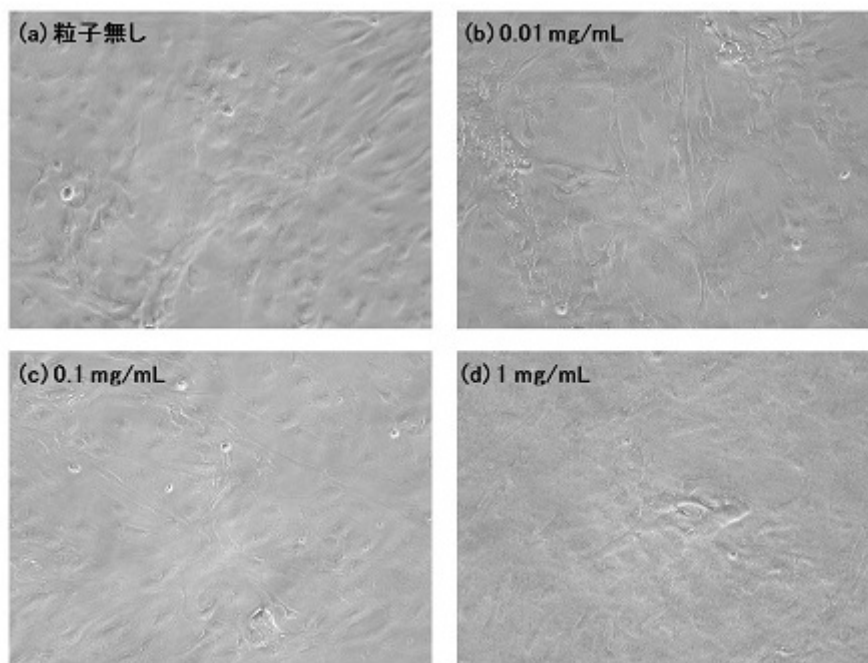


図 1. ナノ粒子添加培養後の観察像

ラット脳毛細血管内皮細胞を培養後、30 nm のシリカナノ粒子を各濃度で添加し、60 分後に顕微鏡で観察した。

リアルタイム細胞アナライザー iCelligence による検討結果を図 2 に示す。37 °C で培養を開始してから、12 時間後には Cell index が定常状態（約 2.9-3.0）に達しており、内皮細胞がしっかりとプレートに定着したことがわかる。シリカナノ粒子を添加することによって、添加直後から Cell index が大きく低下し、測定開始から 60 分後には細胞を播種し

た直後の状態とほとんど変わらない値となった (Cell index: 1.8→0.1)。一方、ナノ粒子を添加しなかったコントロールでは、Cell index に大きな変化は見られなかった (Cell index: 2.8→3.0)。

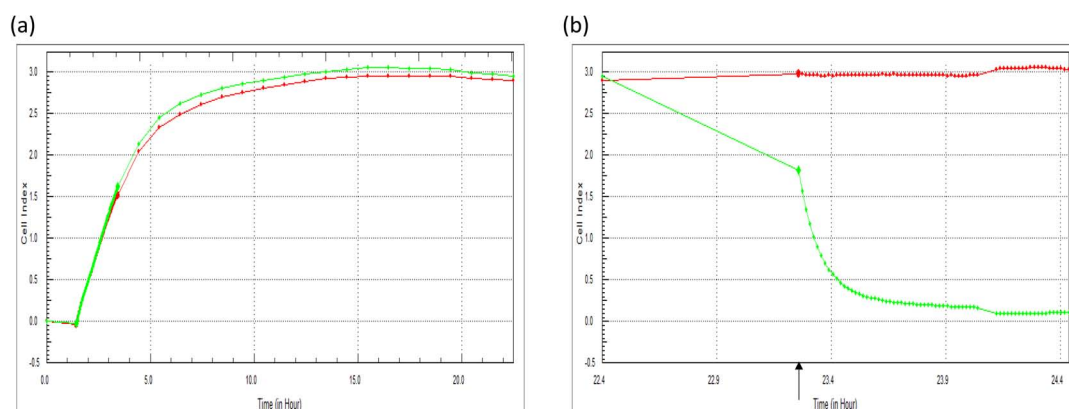


図2. 脳毛細血管内皮細胞の培養時、及びナノ粒子添加時における電気抵抗値の経時変化

(a) 細胞の播種からナノ粒子添加前における電気抵抗値 (Cell index) の経時変化。(b) 30 nm のシリカナノ粒子を添加した際の Cell index の経時変化。緑色の線はナノ粒子添加群、赤色の線はナノ粒子を添加していない対照群を示す。(b) の矢印はナノ粒子を添加した時間を示す。

考 察

以上の結果から、ナノ粒子添加後1時間では、顕微鏡による細胞観察像に大きな変化が見られないものの、細胞の結合状態には変化が起きている可能性が示唆された。我々の既報論文の結果からは、30 nm のナノ粒子を添加した BBB モデルにおいて、透過係数が向上するとともに、細胞傷害性が示唆される観察結果が得られていた¹⁾。今回、得られた結果からは、早期の段階で電気抵抗値が低下しており、BBB モデルにおいて、細胞とフィルター、または細胞同士の結合が緩み、ナノ粒子の透過性を向上させていることが示唆される。本法を応用することで、ナノ粒子の血液脳関門透過性について、Cell index から予測できる可能性があり、より簡便な評価系が構築できる可能性がある。今後、細胞の結合状態を変化させる機構を解明することで、より効果的なナノマテリアルの安全性評価法の構築に貢献したい。

共同研究者

本研究を遂行するにあたり、ナノ粒子の血液脳関門モデル評価法について御助言いただいた Johannes Gutenberg-Universität Mainz の花田三四郎博士に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Hanada S, Fujioka K, Inoue Y, Kanaya F, Manome Y, Yamamoto K. Cell-based in vitro blood-brain barrier model can rapidly evaluate nanoparticles' brain permeability in association with particle size and surface modification. *Int J Mol Sci.* 2014;15(2):1812-25. doi: 10.3390/ijms15021812. PubMed PMID:24469316.
- 2) Fujioka K, Hanada S, Inoue Y, Sato K, Hirakuri K, Shiraiishi K, Kanaya F, Ikeda K, Usui R, Yamamoto K, Kim SU, Manome Y. Effects of silica and titanium oxide particles on a human neural stem cell line: morphology, mitochondrial activity, and gene expression of differentiation markers. *Int J Mol Sci.* 2014;15(7):11742-59. doi: 10.3390/ijms150711742. PubMed PMID: 24992594.
- 3) Hanada S, Fujioka K, Futamura Y, Manabe N, Hoshino A, Yamamoto K. Evaluation of anti-inflammatory drug-conjugated silicon quantum dots: their cytotoxicity and biological effect. *Int J Mol Sci.* 2013;14(1):1323-34. doi: 10.3390/ijms14011323. PubMed PMID: 23306154.
- 4) Shiohara A, Hanada S, Prabakar S, Fujioka K, Lim TH, Yamamoto K, Northcote PT, Tilley RD. Chemical reactions on surface molecules attached to silicon quantum dots. *J Am Chem Soc.* 2010;132(1):248-53. doi: 10.1021/ja906501v. PubMed PMID: 20000400.

- 5) Prabakar S, Shiohara A, Hanada S, Fujioka K, Yamamoto K, Tilley RD. Size Controlled Synthesis of Germanium Nanocrystals by Hydride Reducing Agents and Their Biological Applications. *Chem Mater.* 2010;22(2):482-6. doi: 10.1021/cm9030599.
- 6) Fujioka K, Hiruoka M, Sato K, Manabe N, Miyasaka R, Hanada S, Hoshino A, Tilley RD, Manome Y, Hirakuri K, Yamamoto K. Luminescent passive-oxidized silicon quantum dots as biological staining labels and their cytotoxicity effects at high concentration. *Nanotechnology.* 2008;19(41):415102. doi: 10.1088/0957-4484/19/41/415102. PubMed PMID: 21832637.
- 7) Hoshino A, Fujioka K, Oku T, Suga M, Sasaki YF, Ohta T, Yasuhara M, Suzuki K, Yamamoto K. Physicochemical Properties and Cellular Toxicity of Nanocrystal Quantum Dots Depend on Their Surface Modification. *Nano Letters.* 2004;4(11):2163-9. doi: 10.1021/nl048715d.