

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 30 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2014

課題番号：24241013

研究課題名(和文) 樹状ナノ粒子(デンドリマー)の生体影響評価に関する研究

研究課題名(英文) Health assessment of PAMAM dendrimer with a spherical dendritic structure

研究代表者

福田 秀子(曾根秀子)(FUKUDA, HIDEKO)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・室長

研究者番号：60280715

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 36,700,000円

研究成果の概要(和文)：樹状ナノマテリアルであるPAMAMデンドリマー(PD)の生体影響を調べた。PDは、細胞培養液および認証標準河川水ではサブマイクロメートル以上の凝集塊を形成した。この凝集は2価イオンの共存によって急速に誘導されると考えられた。動物実験では、蛍光標識PDの点鼻投与、放射性標識PDの血管内投与のいずれにおいても、脳内組織への移行は検出されなかったが、点鼻投与による脳組織の遺伝子発現が有意な変動を示した。またヒト神経前駆細胞を用いた曝露実験では、表面アミノ基のPDが用量依存的な細胞毒性を示した。これらの結果から、PDは液相で凝集するが、神経細胞および組織への反応性を有することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：We examined the potential adverse effect of PD by using physico-chemical analysis and in vivo/in vitro exposure tests. Monitoring particle size in various liquid revealed that PD showed rapid aggregation in the presence of divalent cations. The aggregates became bigger than the submicron size in culture media or the standard river water. Animal experiments showed that intranasal instillation of PD caused changes in mRNA expression level of neurological markers in the brain tissues. However, we did not find translocation of fluorescent-labeled or radio-labeled PD after intranasal or intravenous administration. Moreover, we also found that exposure to PD of different surface amino groups dose-dependently inhibited cellular proliferation and differentiation in human neural precursor cell. Our results suggest that PDs aggregate in liquid environments, but exposure to PD causes cellular toxicity and alteration of gene expression in neural cells and nervous tissues.

研究分野：環境学

キーワード：ナノマテリアル 環境リスク 健康 生体影響評価 in vitro 細胞 毒性 脳

## 1. 研究開始当初の背景

「デンドリマー」は 1985 年より合成が開始されるようになった樹状・球形のポリマー製ナノマテリアルである。その粒子表面が高い化学修飾能をもつことから、単独もしくは他のマテリアルとの結合型として DDS、遺伝子キャリア、イメージング造影剤などの医療向けの用途がここ 10 数年で検討され続けている。またすでに、紙の流動性調整剤、化粧品の水・撥油性調整剤として実用も開始されており、我々が環境中でデンドリマーに曝露される可能性はすでに現実のものとなっている。経済協力開発機構 (OECD) は 2010 年の報告書の中で、生体への影響が懸念される 13 種類のナノマテリアルのひとつとしてデンドリマーを選び、そのリスク評価の緊急性について記載していたが、物理化学的・生物学的な評価・研究が不十分であった。

## 2. 研究の目的

我々は、研究の対象を代表的なデンドリマーであるポリアミドアミン (PAMAM) デンドリマー (以下、PD と略記) にしぼり、PD がヒトや生物の生体にどのような毒性作用を与えようかを明らかにしようと考えた。その目標に到達するための課題として、以下の 3 つを設定した。

- (1) PD の液相での物性に関する研究において、PD が生体にとりこまれた場合、あるいは環境中の液相に分布する場合に、どのような分散・凝集の状態に変化し、その様態変化が PD の生体影響発現にどのように関わるのかを知ること。
- (2) PD の体内分布に関する研究において、生体に投与された PD が生体内で、特に脳神経系組織においてどのように分布するかを、マウスを用いた *in vivo* 実験などにより知ること。
- (3) PD の細胞レベルでの分布・反応に関する研究において、生体にとりこまれた PD が細胞レベルでどのような細胞内分布・毒性反応を示すかを、ヒト神経由来の培養細胞を用いて知ること。

## 3. 研究の方法

### (1) PD 粒子

全ての PD 標品はシグマ-アルドリッチ社より購入した。世代数 (樹枝状合成のくりかえし数)・表面基の種類によって多数の PD が存在する中で、表面がアミノ基・第 4 世代の PD を研究の中心にすえ、それ以外に表面がアミノ基で第 1 ~ 第 7 世代の 6 種と、第 4 世代で表面がアミドエタノール基、トリメトキシシリル基、スクシニアミド酸基、アミノ基 / C12 基混合型の 4 種を用いた。

### (2) 粒径の評価

非標識の PD の粒径は、動的光散乱法による計測と走査型プローブ顕微鏡を用いた液中観察によって評価した。蛍光物質で標識した PD については、共焦点レーザー顕微鏡 (以下、CLSM と略記) を用いた蛍光相関分光法によって評価した。

### (3) 粒子の表面電位の評価

PD のゼータ電位を光ドップラー法で計測することにより評価した。

### (4) 粒子の標識

蛍光物質の標識においては、Alexa488 または Alexa546 を蛍光物質として用い、スクシンイミドとアミンとの結合反応を利用して PD の表面アミノ基に蛍光物質を結合させた。放射性物質の標識においては、合成した STB (N-Succinimidyl 3-(tri-n-butylstannyl) benzoate) と  $[^{123}\text{I}]\text{NH}_4$  を反応させた後に、その生成物 ( $[^{123}\text{I}]\text{SIB}$ ) に PD を反応させることにより行なった。

### (5) 生体試料・細胞中の粒子の同定

蛍光標識した PD を生体・細胞への曝露粒子として用い、CLSM により粒子由来の蛍光を検出した。また放射性ヨウ素で標識した PD を曝露粒子として用い、SPECT イメージングにより粒子の検出を試みた。

### (6) 生体毒性反応の評価

個体レベルの実験では、6 週齢の雄 BALB/c マウスを用いた。一個体あたり 15  $\mu\text{g}$  前後の PD を点鼻投与し、24 時間後に脳、血液、肝臓および腎臓を採取し、病理組織学的検査、血液生化学的検査および遺伝子発現解析を行なった。

細胞レベルの実験では、神経前駆細胞 (ENStem-A, Millipore 社) を使用した。PD に曝露された細胞において、免疫染色などにより増殖活性、アポトーシス、神経線維の伸展度を評価し、また細胞から全 RNA を抽出して遺伝子発現解析を行なった。

遺伝子発現解析においては、マイクロアレイ (SurePrint G3 8x60, Agilent 社) による網羅的解析およびリアルタイム RT-PCR 法による半定量的分析を行なった。発現プロファイルの解析には GeneSpring を使用した。

## 4. 研究成果

### (1) PD の液相での物性

#### 各種液相での分散・凝集

PBS(-) や Tris、HEPES などの一般緩衝液にけん濁させると PD の分散状態は良好に保たれるのに対し、PBS(+) や各種細胞培養液、ヒト血漿にけん濁させると速やかな凝集反応が認められ、2 価イオンが PD の急速凝集を誘発させることが示唆された。アルブミンは PD と結合して 10nm 程度の分子塊を形

成すると推測されたが、2価イオンの共存下では急速凝集によりその反応がおおい隠れてしまうと考えられた。結論として、in vitro 実験、in vivo 実験でのPDのけん濁環境(培養液もしくは生体の体液)では、PDはその大部分が、投与後の経過時間に応じた直径がサブマイクロメートル以上の浮遊凝集塊として存在することが推察された。

また、環境中の液体として計量用標準物質の一つである認証標準物質の河川水 NMIJ CRM 7202-a を用いて、その液相でのPDの分散状態を調べた。その結果、培養液の場合と同様に、PDの凝集が観察された。すなわち、PDは生体内のみならず環境中でも凝集形態をとることが示唆された。

#### 物理化学的解析およびシミュレーション

用いたPDの表面電位やけん濁液の電解質濃度より計算した結果、上記の分散・凝集現象はコロイド科学上の「DLVO理論」のみでは説明が困難であると考えられた。すなわち2価イオンの存在下で発生するPD粒子間引力、あるいは表面電位の低いPD(表面がアミドエタノール基のPDなど)の高塩環境での分散をもたらすPD粒子間斥力は、「非DLVO力」(静電相互作用、van der Waals力以外の実体未解明の力)である可能性が高いと考えられた。またブラウン動力学とモンテカルロ法を用いて培養液でのPD急速凝集の様態をコンピュータ上でシミュレーションした場合、培養細胞の表面に付着するPDは、その実質量のほとんどがサブマイクロメートル以上の凝集塊に由来するもので占めることが観察された。従って、培養細胞の内部にとりこまれるPDの大部分は、macropinocytosisによってとりこまれることが示唆された。

## (2) PDの体内分布

### 実験動物における体内分布

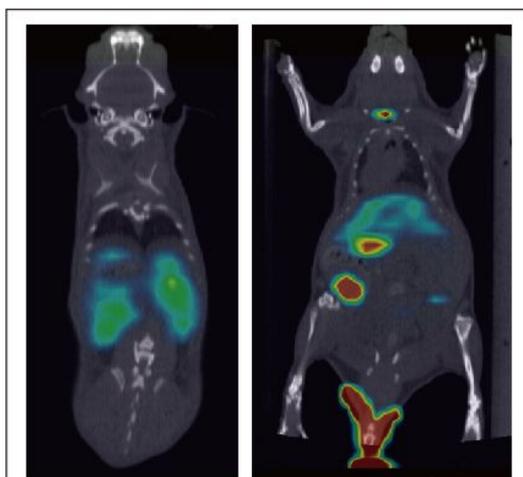


図1. 投与3時間目のSPECTイメージングの結果

純水にけん濁した蛍光標識PDをマウスに

単回点鼻投与し、マウス体内での分布を組織切片のCLSM観察で調べた。その結果、投与してすぐの肺組織にPD粒子が検出されるも、1日後までに摘出した脳・肝臓・腎臓では検出されなかった。

また、放射性ヨウ素で標識したPDを単回静脈内投与して1, 3, 7時間後のマウスでSPECTイメージング検査を実施した結果、PDの肝臓・腎臓への集積が確認されたものの、脳において信号は検出されなかった(図1参照)。

#### 脳-血液関門(BBB)の通過性

マウス脳由来細胞を利用したBBBの模擬試験系を用いて、蛍光標識PDのBBB通過性を調べた。その結果、通過の度合いはPDでは低い程度にとどまり、またその通過はカベオラ依存性のendocytosis inhibitorで阻害を受けることがわかった。すなわち、BBBを通過するPDのほとんどは、血漿内での急速凝集のごく初期の段階で血管内皮細胞に付着して脳実質内へとtranscytosisを果たしたPDに限定されることが示唆された。

#### PD投与動物の臓器における反応

点鼻投与24時間後の脳、肝臓および腎臓の病理組織学的所見では、対照標本と比べて有意な影響は認められなかった。血液学的検査においても、組織壊死に由来するような所見は認められなかった。一方、マイクロアレイによる遺伝子発現解析では、嗅球において多能性シグナル、セロトニン・不安ストレス関連、TGF受容体シグナルの経路が、大脳皮質においてプロスタグランジン合成、血液凝固カスケード、多能性シグナルの経路が、海馬領域においてケモカインシグナル、TGF受容体シグナルの経路が有意に変動していた。リアルタイムRT-PCR法での解析では、炎症性および酸化ストレス関連遺伝子の発現に有意な変化は認められなかったものの、大脳皮質と海馬においてBDNF mRNA発現の増加が認められた。

## (3) PDの細胞レベルでの分布・毒性反応

### 細胞内分布

ヒト神経前駆細胞の培養液に蛍光標識PDを添加してCLSM観察を行なった結果、添加数時間後に、LysoTrackerで同定されるリソソームに一致したPDの分布が見られた。しかし、MitoTrackerで同定されるミトコンドリアに一致した分布は認められなかった。すなわち、細胞膜に吸着し、endocytosisで細胞内に取り込まれ、リソソームで処理されるという、従来より指摘されていたPDの細胞内移行過程の存在があらためて確認された。

### PD 負荷細胞に見られる毒性反応

ヒト多能性細胞（ヒト ES 細胞由来の神経前駆細胞）の未分化時期に PD を培養液に添加し、細胞の機能的・形態的变化を調べた。従来法である 2 次元培養での検討では、表面がアミノ基の PD において、細胞増殖活性・細胞形態への用量依存的な影響が認められた。一方、表面がアミノ基以外のアニオン基や中性基の PD では、上記のような細胞毒性反応は認められなかった。この表面アミノ基 PD の細胞毒性効果は、カチオン基に由来する PD の表面電位に依存する効果が示唆された（図 2 参照）。

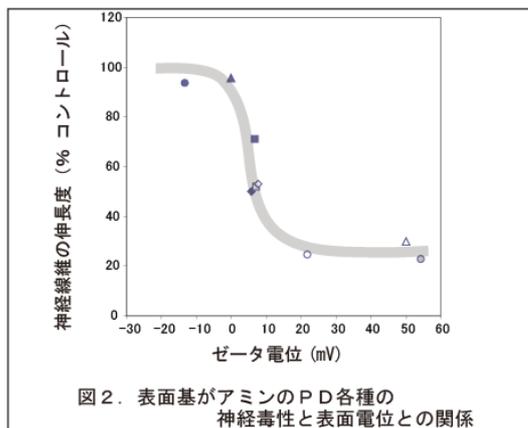


図 2. 表面基がアミンの PD 各種の神経毒性と表面電位との関係

また同細胞を用いて胚様体（Embrioid Body：EB）形成過程を組み込んだ 3 次元培養での検討を行なったところ、PD は EB から神経細胞への分化過程において神経線維の伸展には影響を及ぼさず、細胞遊走に抑制的影響を及ぼす可能性が示唆された。

### PD 負荷細胞における mRNA の網羅的解析

マイクロアレイ分析では、direct interaction シグナル、network targets and regulators シグナル、および脂質合成関連の経路が有意に変動していた。とくに変動の大きかった遺伝子は、カリウムチャネル調節蛋白 KCNJ2、組織分化因子蛋白 TFPI2 および初期成長因子蛋白 EGR1 であり、これらはいずれも PD 曝露により 1/10 のレベルまで抑制された。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Tin-Tin Win Shwe, Hideko Sone, Yoshika Kurokawa, Zeng Y, Zeng Q, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano. Effects of PAMAM dendrimers in the mouse brain after a single intranasal instillation. *Toxicol Lett*

(査読あり), 228(3): 207-15, 2014.

Win-Shwe TT, Fujitani Y, Kyi-Tha-Thu C, Furuyama A, Michikawa T, Tsukahara S, Nitta H, Hirano S. Effects of diesel engine exhaust origin secondary organic aerosols on novel object recognition ability and maternal behavior in BALB/c mice. *Int J Environ Res Public Health* (査読あり), 11(11):11286-11307, 2014.

Win-Shwe TT, Fujitani Y, Sone H, Furuyama A, Nitta H, Hirano S. Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice. *J Toxicol Sci* (査読あり), 38(1):71-82 2013.

〔学会発表〕(計 13 件)

黒河佳香、曾洋、Tin-Tin Win Shwe、木村寛之、小山陽介、松井康人、平野靖史郎、曽根秀子。 dendroliマナーノ粒子の神経組織への分布 (in vitro および in vivo 研究) 第 38 回日本神経科学大会(2015 年 7 月 29 日、神戸)

Yang Zeng, Tin-Tin Win-Shwe, Qin Zeng, Yoshika Kurokawa, Hiroko Nansai, Zhen Ya Zhang, Hideko Sone. Mechanism study of polyamidoamine (PAMAM) dendrimers nanoparticle induced neurotoxicity 環境ホルモン学会第 17 回研究発表会 (2014 年 12 月 9 日、東京)

曽根秀子, 曾洋, 南齋ひろ子. ベイジアンネットワーク解析によるナノマテリアルの毒性予測に関する研究. 第 3 回生命医薬情報学連合大会 (2014 年 10 月 2 日、仙台)

黒河佳香、曾洋、曾勤、Tin-Tin Win Shwe、平野靖史郎、曽根秀子。 dendroliマナーノ粒子の神経発達毒性 (in vitro 研究). 第 37 回日本神経科学大会(2014 年 9 月 13 日、横浜)

Yang Zeng, Tin-Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Zhen Ya Zhang, Hideko Sone. Effect of polyamidoamine (PAMAM) dendrimer nanoparticles on neuronal differentiations in human neural progenitor cells. 環境ホルモン学会第 16 回研究発表会 (2013 年 12 月 12 日、東京)

Yang Zeng, Tin-Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Zhen Ya Zhang, Hideko Sone. Effect of PAMAM dendrimer exposure during neuronal differentiation from

human neural progenitor cells. シンポジウム「細胞アッセイ技術の現状と将来」(2013年11月25日、東京)

Tin-Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Yang Zeng, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano, Hideko Sone. In vitro and in vivo biological effects and biodistribution of PAMAM-NH<sub>2</sub> dendrimers. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health(2013年10月29日、名古屋)

Yoshika Kurokawa, Tin-Tin Win Shwe, Qin Zeng, Seishiro Hirano, Hideko Sone. Intracellular distribution of PAMAM dendrimers in cultured human cells. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health(2013年10月29日、名古屋)

Hideko Sone, Masashi Yamazaki, Hiroko Nansai, Yang Zeng, Yoshika Kurokawa, Tin-Tin Win Shwe, Seishiro Hirano. Determination of PAMAM particles in culture media using SPM techniques. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health(2013年10月29日、名古屋)

Yang Zeng, Tin-Tin Win Shwe, Qin Zeng, Yoshika Kurokawa, Seishiro Hirano, Zhen Ya Zhang, Hideko Sone. Effect of PAMAM dendrimers on differentiation of hNPCs: A study of morphological analysis. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health(2013年10月29日、名古屋)

Tin-Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano, Hideko Sone. Biodistribution and toxicological effects of intranasally instilled polyamidoamine (PAMAM) dendrimers in BALB/c mouse brain. EuroTox 2013 (2013年9月3日, Switzerland)

黒河佳香、Tin-Tin Win Shwe、平野靖史郎、曽根秀子 . デンドリマーナノ粒子のニューロン内分布 (in vitro 研究). 第36回日本神経科学大会(2013年6月22日、京都)

曽根秀子、赤沼宏美、黒河佳香、南齋ひろ子、山崎将嗣、平野靖史郎 . PAMAM デンドリマーのヒト ES 由来胚様体および神経系分化細

胞への分子送達に関する研究 . 第28回日本DDS学会学術集会(2012年7月4日、札幌)

〔図書〕(計0件)

〔その他〕(計1件)

曽根秀子 (2013) 新素材として開発されるナノデンドリマーとその生物学的影響. 東京大学環境安全研究センター 環境安全, 136, 4-7.

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

曽根 秀子 (HIDEKO SONE)  
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク  
研究センター・室長  
研究者番号: 60280715

##### (2)研究分担者

黒河 佳香 (KUROKAWA YOSHIKA)  
国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員  
研究者番号: 30205231  
Tin Tin Win-Shwe (WIN-SHWE TINTIN)  
国立環境研究所・環境健康研究センター・  
主任研究員  
研究者番号: 00391128

##### (3)連携研究者

なし

##### (4)研究協力者

平野靖史郎 (HIRANO SEISHIRO)  
国立環境研究所・環境リスク研究センター  
曽洋 (ZENG YANG)  
国立環境研究所・環境リスク研究センター  
松井 康人 (MATSUI YASUTO)  
京都大学大学院・工学研究科  
木村 寛之 (KIMURA, HIROYUKI)  
京都大学大学院・薬学研究科  
山崎 将嗣 (YAMAZAKI MASASHI)  
産業技術総合研究所  
羽山 和美 (HAYAMA KAZUMI)  
産業技術総合研究所