OUKA
The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ナノ微粒子の細胞内取り込み及び上皮細胞透過性の評価
Author(s)	今井, 峻司
Citation	大阪大学, 2015, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/52261
rights	
Note	やむを得ない事由があると学位審査研究科が承認したため、全文に代えてその内容の要約を公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、大阪大学の博士論文についてをご参照ください。

The University of Osaka Institutional Knowledge Archive : OUKA

https://ir.library.osaka-u.ac.jp/

The University of Osaka

様式３

論　文　内　容　の　要　旨

氏　名　（　今井峻司　）	
論文題名	ナノ微粒子の細胞内取り込み及び上皮細胞透過性の評価

論文内容の要旨

我々は日常的に、経皮・経口・経肺など、多様な経路を通じて、意図的あるいは非意図的に様々な物質に曝露されている。特に経口経路は、飲食を通じ、生物の生存に必須である栄養素や水分に加え、化学物質などを体内に取り込む最も主要な経路である。近年のナノテクノロジーの発展に伴い、様々な食品中にナノ粒子が含まれていることを鑑みると、腸管などの消化器官は日常的にナノ粒子に曝露されていることが想定される。複数の報告から、ナノ粒子は従来のサブミクロンサイズの粒子とは異なる経路で体内に吸収されている可能性が示唆されており、ナノ粒子の腸管吸収性を含めた体内動態評価は重要課題と考えられる。一方で、現在のナノ粒子の動態研究は、マウスやラットを用いた、*in vivo*での各臓器への移行性評価がその大部分を占めており、ナノ粒子の腸管吸収機序等に関する理解は未だに不足しているのが現状である。そのため、食品中ナノ粒子の有効活用や安全性の担保に向けては、*in vivo*での解析のみならず、腸管透過性を詳細に解析可能な*in vitro*における解析も重要となる。また、物質の腸管透過は、物質の管腔側から基底膜側への透過（腸管側から体内へ吸収される過程を模した評価系）のみが注目されているが、一度基底膜側に透過した物質が、同様の経路で再び管腔側に到達することも考えられる。さらに、腸管においては、管腔側と基底膜側でトランスポーターなど取り込みや排出に関与する蛋白質の発現状況が異なることも知られている。従って、基底膜側から管腔側への透過は、管腔側から基底膜側への透過とは全く異なる挙動を示す可能性も考えられるが、管腔側から基底膜側への解析と比較すると、圧倒的に情報が不足しているのが現状である。本観点から著者は、ナノ粒子の腸管超過性に関する、より詳細な情報収集を目的に、ヒト腸管様単層膜を形成させたCaco-2細胞を用いて、粒子径や表面性状の異なる銀ナノ粒子、金ナノ粒子の細胞内への取り込み及び透過性を、腸管上皮細胞の極性を加味しつつ評価した。

本検討では、粒子径5、10、50、100 nmの銀ナノ粒子及び銀イオンを用いた。Caco-2細胞の管腔側（apical側）に銀ナノ粒子、銀イオンを添加し、4、8、24時間後の細胞内及び基底膜側（basolateral側）の銀量を測定した結果、いずれの銀ナノ粒子、銀イオンにおいても、時間の経過に伴い、細胞内及びbasolateral側の銀量の増加が認められた。また、粒子径が小さい銀ナノ粒子ほど、細胞内及びbasolateral側の銀量が高い傾向が認められた。従って、小さい銀ナノ粒子ほど、細胞内へ取り込まれる効率・腸管透過性が高いことが明らかとなった。次に、素材の違いによる動態の変化について検討する目的で、粒子径10、50、90 nmの金ナノ粒子をapical側に添加し、24時間後の細胞内及びbasolateral側の金量を測定した。その結果、粒子径が大きい金ナノ粒子ほど、細胞内の金量が多い一方で、basolateral側の金量は粒子径の違いにより変化は認められなかった。本結果は、細胞内・basolateral側共に、粒子径が小さいほど多く移行していた銀ナノ粒子とは異なる傾向であった。従って、ナノ粒子の細胞内取り込みや腸管透過性は、粒子の素材によっても規定されることが明らかとなった。

次に、銀ナノ粒子の基底膜側から管腔側への透過性を評価する目的で、銀ナノ粒子、銀イオンをbasolateral側に添加し、24時間後の細胞内及びapical側の銀量を測定した。その結果、apical側には、粒子径が小さい銀ナノ粒子ほど多くの銀が同定された一方で、細胞内には粒子径が大きい銀ナノ粒子ほど銀が同定された。これは、apical側に銀を添加した結果と比較して、小さい粒子ほど高い腸管透過性を示すという点で同様の傾向が認められた一方で、細胞内への取り込みについては、粒子径と逆の相関が認められた。従って、ナノ粒子の細胞内への取り込み経路や効率が、apical側とbasolateral側で異なる可能性が示された。

上記の検討では、ナノ粒子を管腔側と基底膜側に曝露した際の細胞内取り込み・腸管透過性の違いを評価したが、次に、管腔側と基底膜側に曝露した際の細胞影響の違いについて、細胞間隙の透過性に与える影響に着目して検討した。銀ナノ粒子、銀イオンをapical側もしくはbasolateral側に添加し、24時間後に細胞間隙の透過性の指標として膜抵抗値（TEER）を測定した。その結果、apical側に5 μg/mLで添加した場合は、いずれの銀ナノ粒子でもTEERに変化が認められなかった。一方で、basolateral側に5 μg/mLで添加した場合には、5、10 nmなどの小さい銀ナノ粒子と銀

イオンにおいて、TEERの減少が認められた。また、銀ナノ粒子、銀イオンを添加した24時間後の細胞間隙での物質透過を、蛍光修飾された分子量4000Daのdexstran（FD4）の透過を指標に確認したところ、5、10 nmの銀ナノ粒子と銀イオンをbasolateral側に5 μg/mL添加した際に、FD4の透過速度が顕著に増加した。なお、上記のTEERの減少やFD4の透過性亢進が認められる条件において、銀ナノ粒子が細胞傷害性を示さないことをLDHアッセイ、WST8アッセイにより確認している。従って、銀ナノ粒子をbasolateral側に添加した場合には、銀ナノ粒子は細胞傷害性を示すことなく、細胞間隙を緩める可能性が示唆された。

以上、本研究では、ナノ粒子を経口摂取後の吸収性を精査する目的で、*in vitro*の単層膜モデルを用いて腸管透過性を評価した。ナノ粒子の腸管透過性について、物性との連関を解析した知見は乏しいことから、本結果は、ナノ粒子の経口摂取後の吸収性を考えるうえでの重要な基礎情報となると考えられる。本研究により、ナノ粒子の腸管吸収性が、粒子径・素材などにより規定されることを見出したことは、将来的に、腸管吸収されない安全なナノ粒子の開発、腸管を効率的に突破する画期的なDDS担体の開発等に有用であると考えられる。また、本研究により、ナノ粒子の腸管透過性、細胞影響を考える上で、細胞の極性を加味する重要性を示した。今後、本知見に基づき、ナノ粒子の吸収性や細胞影響のデータが見つめなおされることで、管腔側からの曝露のみを想定していた従来の検討では説明できなかった、*in vivo*における動態・生体影響の理解が進展すると考えられる。本研究を契機として、ナノ粒子の腸管吸収性に関する研究が、益々進展することを期待している。

様式 7

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名	（　今井　峻司　）

	(職)	氏　名
論文審査担当者	主査　教　授	堤　康央
	副査　教　授	高木　達也
	副査　教　授	平田　收正

論文審査の結果の要旨

本論文は、最先端テクノロジーの進展も相俟って、意図的・非意図的な曝露機会が飛躍的に高まっている「ナノ粒子」について、その経口曝露後の吸収性など、体内動態を追求する目的で、in vitroの単層膜モデルを用いて腸管透過性を評価したものであり、以下の結論・知見が得られている。

1. 極性を有する腸管上皮細胞における「ナノ粒子」の細胞内取り込みや腸管透過性は能動輸送で行われ、さらに粒子径や素材により効率が異なることを先駆けて明らかとした。

2. 腸管上皮細胞内に取り込まれた「ナノ粒子」は、管腔側・基底膜側の双方向に排泄されることを見出した。

3. 「ナノ粒子」を管腔側から曝露した場合と基底膜側から曝露した場合とで、細胞内への取り込みや腸管透過性が変化することを先駆けて明らかとした。

4. 「ナノ粒子」を基底膜側から曝露すると、細胞傷害が生じない濃度において、腸管バリア機能を低下させる可能性を見出した。

「ナノ粒子」の経口曝露後の腸管透過性についての情報は極めて乏しく、特に、粒子径や表面電荷、形状など、「ナノ粒子」の物性との連関を解析した知見は皆無に等しい。そのため、本結果は、「ヒトの健康確保を考究する」薬学的視点から、ナノ微粒子の経口摂取後の吸収性やその後の安全性を考えるうえで重要なものであり、緊急性の高い基礎情報となり得るものと考えられる。逆に言えば、本研究成果は、将来的に、腸管吸収されない安全な「ナノ粒子」の開発など、環境薬学領域だけでなく、創薬領域においても、画期的なDDS担体の開発等に有用となり得るものであり、今後のさらなる研究が期待される。このような「ナノ粒子」のADMET（動態・毒性）研究による情報収集が進展していくことで、安心・安全にナノ微粒子を使用可能な持続的なナノ技術（Sustainable Nanotechnology）の発展に寄与することを期待される。

以上より、今後のNano-Safety Science：ナノ安全科学、Nano-Safety Design：ナノ最適デザイン、Sustainable Nanotechnology：安全かつ有効に持続利用可能なナノテクノロジーに向けた興味深い知見であり、博士(薬科学)の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。