

機関番号：14401
 研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2009～2010
 課題番号：21700489
 研究課題名 (和文) 有効かつ安全なナノ医薬品の開発を目指した、ナノマテリアルの生殖発生毒性評価
 研究課題名 (英文) Reproductive toxicity of nanomaterials for the development of nanomedicine with safety and efficacy
 研究代表者
 吉岡 靖雄 (YOSHIOKA YASUO)
 大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター・特任講師 (常勤)
 研究者番号：00392308

研究成果の概要 (和文)：

本研究では、次世代型医薬の筆頭として期待されるナノマテリアルの生殖発生に及ぼす影響を、体内動態の観点から評価した。ナノシリカや酸化チタンを妊娠マウスに投与し、胎盤や胎仔への移行を評価した。その結果、大量に静脈内投与する検討ではあるものの、粒子径の小さなナノサイズのナノシリカや酸化チタンは、母体の肝臓のみならず、胎盤にまで移行することが明らかとなった。本結果は、ナノマテリアルの生殖発生毒性の重要性を提示するとともに、胎盤への薬物送達を目的とした新規キャリアーとしての有用性をも示すものである。

研究成果の概要 (英文)：

The increasing use of nanomaterials has raised serious concern about their safety. Here, we investigated the biodistribution of nanomaterials in pregnant mice using nanosilica particles and nano-TiO₂ with different sizes for the clarifying reproductive toxicity. Nanosilica particles of 70 nm diameter and nano-TiO₂ of 35 nm diameter were detected not only in the maternal liver but also in the placenta, although microscale silica particles were not observed in these tissues at all. We believe that these data provide basic information that should help to create nanomaterials that are safe for human exposure.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2009 年度 | 1,800,000 | 540,000 | 2,340,000 |
| 2010 年度 | 1,600,000 | 480,000 | 2,080,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：人間医工学 医用生体工学・生体材料学

キーワード：ナノマテリアル、非晶質シリカ、酸化チタン、薬物送達キャリアー、体内動態、生殖発生、胎盤、胎仔

1. 研究開始当初の背景

昨今のナノテクノロジー技術の発展により、ナノマテリアルを用いた医薬品開発が盛んに試みられている。このナノ医薬の台頭は、例えば癌組織へのターゲティング効率や標

的疾患組織への浸透性・到達効率、病態細胞内への導入効率などの点で、従来までの粒子レベルでのドラッグデリバリーシステム (DDS) 研究に劇的な革新をもたらしている。一方で最近、ナノマテリアルが、従来までの

マイクロマテリアルとは決定的に異なった体内・細胞内動態特性を示してしまうため、予期せぬ毒性を招いてしまうことが明らかとされつつある。しかしながら、現在のナノマテリアルの安全性研究は、個々のナノマテリアルを実験動物に投与した際に生ずる急性/亜急性/慢性毒性といった一般毒性の評価に関する知見のみが散在しているのが現状であり、免疫毒性、遺伝毒性、生殖発生毒性といった特殊毒性に関する知見はほぼ皆無であると言っても過言ではない。中でも、過去のダイオキシンやサリドマイドの例にみられるように、“生殖発生毒性”は、親から子へ、子から孫へと数世代にわたって毒性が継承されてしまう危険性を秘めていることから、ナノマテリアルの安全性確保研究における最優先かつ最重要課題であると考えられる。

2. 研究の目的

申請者はこれまで、医薬品・化粧品で既に汎用されている非晶質ナノシリカをモデルとして、皮膚に塗布後の体内動態・安全性評価を進め、①ナノマテリアルが皮膚塗布後に皮膚バリアーを通過し血中に移行すること、②血中移行後、肝臓、脾臓、リンパ節、肺といった種々の組織に移行することで組織傷害を誘発する可能性があること、③DNA 傷害を惹起するなど遺伝毒性を有する可能性があること、を世界に先駆け明らかとしてきた。以上の結果は、もしナノマテリアルが、生殖器官・胎児へ移行した場合、催奇形性をはじめとする予期せぬ毒性を発現し得る可能性をも示唆している。従って今後は、過去のダイオキシン、サリドマイドでの惨劇を繰り返さないためにも、次世代影響を見据えた精子・卵子・受精卵などに対する安全性、及び胎児に及ぼす影響を精査することが必要不可欠となっている。以上の観点から本申請課題では、ナノシリカや酸化チタンといった既に医薬品・化粧品・食品で利用されているナノマテリアルに関して、ナノマテリアルの物性（一次粒径、形状、表面電荷）-生殖発生毒性との関連解析を最終目標に、妊娠マウスにおける体内動態に焦点を絞り解析した。本研究成果は、未だ世界的に未確立なナノマテリアルのリスクマネジメントを科学的根拠に基づき行うための基盤情報になるとともに、ナノ DDS 医薬の発展を促進することで、国民の健康・安全の確保に大きく貢献するものと考えている。

3. 研究の方法

表面未修飾の非晶質シリカ（直径 70、300、1000 nm; それぞれ nSP70、nSP300、mSP1000）、直径 35 nm の酸化チタンを使用した。妊娠 16 日目の BALB/c マウスに 0.8 mg/mL の非晶質

シリカおよび酸化チタンを静脈内投与した。24 時間後に、各臓器を回収し、透過型電子顕微鏡により各臓器への移行を評価した。

4. 研究成果

昨今のナノテクノロジー技術の発展により、ナノマテリアルを用いた医薬品開発が盛んに試みられている。一方で最近、ナノマテリアルが、従来までのマイクロマテリアルとは決定的に異なった体内・細胞内動態特性を示してしまうため、予期せぬ毒性を招いてしまうことが明らかとされつつある。しかしながら、リスク評価の基盤となる体内動態解析が全くなされておらず、ハザード情報のみで安全性が議論されている状況である。そこで本研究では、粒子径の異なる非晶質ナノシリカと酸化チタンをマウスに投与した際の、胎盤への集積性を中心とした体内動態を評価した。蛍光修飾された各粒子径の非晶質シリカを、胎盤が形成され安定期に入った妊娠 16 日目のマウスに尾静脈内投与し、in vivo imaging により体内動態を観察した。その結果、いずれの粒子径の非晶質シリカを投与した群においても、肝臓で強い蛍光が観察され、肝臓への集積が認められた。一方で、nSP70 投与群においてのみ、未処理群と比較して胎盤で強い蛍光が観察され、直径 70 nm のシリカは胎盤にまで移行することが示唆された。次に、より詳細な体内動態を解析するため、透過型電子顕微鏡を用いてシリカの局在を評価した。in vivo imaging と同様に各粒子径の非晶質シリカを妊娠後期のマウスに尾静脈内投与し、出生直前に帝王切開により胎盤を回収し、胎盤への移行を観察した。その結果、in vivo imaging の結果と同様に、nSP70 においてのみ、胎盤の栄養膜層や迷宮層部分において局在が確認された。また、幾つかの粒子が集団で凝集して存在する様子も観察された。次に、直径 35 nm の酸化チタンを、非晶質シリカと同様に、妊娠 16 日目のマウスに尾静脈内投与した後、出生直前に帝王切開により胎盤を回収し、透過型電子顕微鏡を用いて酸化チタンの局在を評価した。その結果、直径 35 nm の酸化チタンにおいても、胎盤の栄養膜層や迷宮層部分において局在が確認された。以上の結果から、少なくとも粒子径の小さな非晶質ナノシリカや酸化チタンは、胎盤へ移行する可能性が示された。また、胎盤は胎仔の発育に重要な役割を担う組織であるため、nSP70 や酸化チタンが胎盤へと移行することにより、胎仔へ影響が及ぶ可能性が示唆された。

今回の検討は定性的な検討であることか

ら、今後は、定量的に移行量を評価することで、より詳細な体内動態評価を実施する必要があると考えられる。さらに、今回の検討は、大量に静脈内投与した場合の体内動態評価であり、より少ない量を、経口・経鼻・経皮など実際の曝露実態を加味したルートで投与した場合での検討も必要と考えられる。その上で、催奇形性・流産や胎仔発育不全など生殖発生毒性を評価することで、リスク評価が可能になると考えられる。一方で、上記のように、詳細に安全性を評価するのみならず、これら情報を基盤として、どのようにしたら安全なナノマテリアルを創製できるかについて考える必要もある。例えば我々は、ナノマテリアルの物性を変化させることで、安全性を高度に確保できる可能性を他の研究により見出している。すなわち、ナノマテリアルの物性（一次粒径、形状、表面電荷）—胎盤・胎仔を含めた体内動態評価—生殖発生毒性との3者連関解析を推進することで、安全なナノマテリアルの創製に資する基盤情報を得ることができよう。さらに、安全性が確保されたナノマテリアルについては、ナノ医薬品として展開することで、次世代型医薬品を開発できると考えられる。例えば、本結果からも、ナノマテリアルは従来までの素材とは異なり、胎盤移行能が優れていることから、流産や胎仔発育不全など胎盤不全により誘発される疾患に対する新たな薬物送達キャリアーになり得る可能性が示唆された。

以上のように、本結果は、ナノマテリアルの生殖発生毒性の重要性を提示するとともに、胎盤への薬物送達を目的とした新規キャリアーとしての有用性をも示すものである。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計4件)

- ① Yoshioka Y. NanoSafety Studies of Nanomaterials about Biodistribution and Immunotoxicity. *Yakugaku Zasshi*. 2011;131(2):221-4.
- ② Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Yamashita K, Higashisaka K, Nakanishi R, Morishita Y, Kayamuro H, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Tsunoda S, Yoshikawa T, Itoh N, Tsutsumi Y. Potential adjuvant effect of intranasal urban aerosols in mice through induction of dendritic cell maturation. *Toxicol Lett*.

2010;199(3):383-8.

- ③ Yoshida T, Yoshioka Y, Fujimura M, Kayamuro H, Yamashita K, Higashisaka K, Nakanishi R, Morishita Y, Nabeshi H, Yamashita T, Muroi M, Tanamoto K, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Kawai Y, Mayumi T, Itoh N, Yoshikawa T, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Urban aerosols induce pro-inflammatory cytokine production in macrophages and cause airway inflammation in vivo. *Biol Pharm Bull*. 2010;33(5):780-3.
- ④ Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Morishita Y, Yoshida T, Fujimura M, Kayamuro H, Nabeshi H, Yamashita T, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Kawai Y, Mayumi T, Yoshikawa T, Itoh N, Tsunoda S, Tsutsumi Y. Carbon nanotubes elicit DNA damage and inflammatory response relative to their size and shape. *Inflammation*. 2010;33(4):276-80.

[学会発表] (計5件)

- ① Yoshioka Y, Morishige T, Tsunoda S, Mukai Y, Okada N, Tsutsumi Y, Nakagawa N. Safety assessment of nanomaterials: inflammatory responses of nanosilica with different sizes and surface properties. The XII International Congress of Toxicology. Barcelona (Spain), 19-23 July, 2010.
- ② Yoshioka Y, Morishige T, Inakura H, Tsunoda S, Tsutsumi Y, Mukai Y, Okada N, Nakagawa S. Silica particle, major component of Asian dust, induces IL-1 β production through NALP3 activation mediated by cathepsin B. The Asia/Pacific Chapter of Environmental Toxicology and Chemistry 2010 Conference (SETAC). Cuangzhou (China), 4-7 June, 2010.
- ③ 吉岡靖雄, 吉川友章, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤康央: ナノ化粧品の安全性確保および安全なナノ化粧品の開発に向けて-2: ナノマテリアルの粒子径と免疫系への影響. 第35回日本化粧品学会, 東京(東京), 2010年6月.
- ④ 吉岡靖雄: ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性. 日本薬学会 第130年会, 岡山(岡山), 2010年3月.

- ⑤ 吉岡靖雄，森重智弘，吉田徳幸，稲倉裕，藤村真穂，鍋師裕美，阿部康弘，長野一也，吉川友章，今澤孝喜，角田慎一，向洋平，岡田直貴，堤康央，中川晋作：ナノマテリアルの安全確保に向けて-4 ナノマテリアルの動態特性と免疫毒性. 第 98 回日本食品衛生学会学術講演会，函館（北海道），2009 年 10 月.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 靖雄 (YOSHIOKA YASUO)

大阪大学・臨床医工学融合研究教育センター

・特任講師 (常勤)

研究者番号：00392308

(2) 研究分担者

該当無し

(3) 連携研究者

該当無し