

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 4 日現在

機関番号：14401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24659075

研究課題名(和文)医療ナノマテリアルのin vitro発生毒性試験法の新規開発

研究課題名(英文)Development of in vitro embryotoxic test for nanomaterials

研究代表者

吉岡 靖雄 (Yoshioka, Yasuo)

大阪大学・薬学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00392308

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らはこれまでに、ナノマテリアルが、過剰量の投与であるものの、胎盤障害を誘発し胎仔発育不全や流産を惹起し得ること、ナノマテリアルを投与した母体から出生した新生仔は成長後に異常行動を呈することなどを先駆けて明らかとしている。本申請研究では、有害性が未解明な医療用のナノマテリアルの発生毒性(特に胎仔への影響)をin vitroで評価可能な、in vitro発生毒性試験法(代替法)の開発に資する基盤情報の収集を目的に、ナノマテリアルのin vivoにおける胎仔毒性誘発メカニズムを精査した。

研究成果の概要(英文)：Recently, research into potential safety of nanomaterials is increasing. However, few studies are examined the embryotoxicity of nanomaterials. Therefore, we had investigated the embryotoxicity of nanomaterials, and revealed that some nanomaterials might have a potential to cause pregnancy complications. To assess more detail embryotoxicity of nanomaterials, we tried to accumulate the basic information for the development of embryotoxicity method of nanomaterials in vitro.

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・医療系薬学

キーワード：ナノマテリアル 生殖発生毒性 安全性

1. 研究開始当初の背景

夢の新素材として期待されるナノマテリアルを配合した数多くの製品が、医薬・食品・化粧品領域において実用化されており、我々は既にナノマテリアルの意図的・非意図的な曝露を避け得ない現状にある。特に、医薬品領域においては、医療ナノマテリアル（以下、単にナノマテリアル）をキャリアあるいは添加剤として配合した医薬品や、そのものの薬効を利用したナノメディシンが期待されている。一方で、ナノマテリアル特有の革新的機能が、予期しにくい毒性を発現してしまうことが懸念されている。中でも“発生毒性”は、医薬品の安全性評価には必須であり、数世代にわたって毒性が継承されてしまう危険性があることから、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となる。この点で申請者らは既に、ナノマテリアルは、過剰量の投与であるものの、胎盤障害を誘発し胎仔発育不全や流産を惹起し得ること、ナノマテリアルを投与した母体から出生した新生仔は成長後に異常行動を呈することなどを先駆けて明らかにしている。

一方で、既に数多くのナノマテリアルの医薬品応用が進むと共に、粒子径の縮小化・表面修飾体など、莫大な種類の新規ナノマテリアルが続々と開発され続けている。これらを、既存のマウス・ラットを用いた手法により発生毒性を評価した場合、時間・労力が膨大にかかることから、ハイスループットな試験法が待望されている。さらに、安全・安心への社会的ニーズの高まりとは逆に、特に欧米においては、動物愛護の観点から、ナノマテリアルを含めた化学物質の毒性評価を目的とした動物実験の削減が望まれている。そのため、in vivo との整合性に優れたハイスループットな in vitro 発生毒性試験法（代替法）の確立が切実な課題となっている。

2. 研究の目的

近年、本邦を初めとする多くの先進諸国で、流産・超早産・先天異常が飛躍的に増加すると共に、超未熟児として生まれた乳幼児の多くに、発達障害やメタボリックシンドロームなどが後天的に頻発するなど、社会問題となっている。これら疾患の多くは、医薬品・食品・化粧品を含めた環境中化学物質による胎盤・胎児の機能異常（不全）に原因があると考えられている。また、抗癌剤 5-FU や抗てんかん薬バルプロ酸が強い催奇形性を有することが知られているなど、医薬品開発においても発生毒性評価は最重要検討項目となっている。従って、妊婦を含めあらゆる世代が、例えば添加剤やキャリアとして医薬品に含有されているナノマテリアルに曝露される現状では、ナノマテリアルの発生毒性に関する安全性情報の収集とリスク評価は緊急の課題と位置付けられている。ましてや、ナ

ノメディシンが次世代医薬として台頭が間近であることを鑑みると、その緊急性は言うに及ばない。本観点から申請者は、ナノマテリアルの発生毒性評価の重要性を先駆け提唱してきた。一方で、ハイスループットな in vitro 発生毒性試験法（代替法）の確立が切実な課題となっているものの、in vivo との整合性が如何にとれるかが課題となっている。

本申請研究では、有害性が未解明な医療用のナノマテリアルの発生毒性（特に胎仔への影響）を in vitro で評価可能な、in vitro 発生毒性試験法（代替法）の開発に資する基盤情報の収集を目的に、ナノマテリアルの in vivo における胎仔毒性誘発メカニズムを精査した。

3. 研究の方法

本検討では、試薬グレードの非晶質シリカ（Micromod partikeltechnologie GmbH, Germany）を用いた。100 nm 以下のナノシリカ（nSP）として一次粒子径が 70 nm（nSP70）の粒子を用いた。

妊娠 16 日、17 日目のマウスに、nSP70 を 2 日間連続で静脈内投与した。抗 Ly-6G 中和抗体の前処置として、anti-mouse Ly-6G antibody (clone; 1A8, BioLegend.) \ Rat IgG_{2a}

Isotype Control (clone; RTK2758, BioLegend.) をマウスの腹腔内に投与した。

4. 研究成果

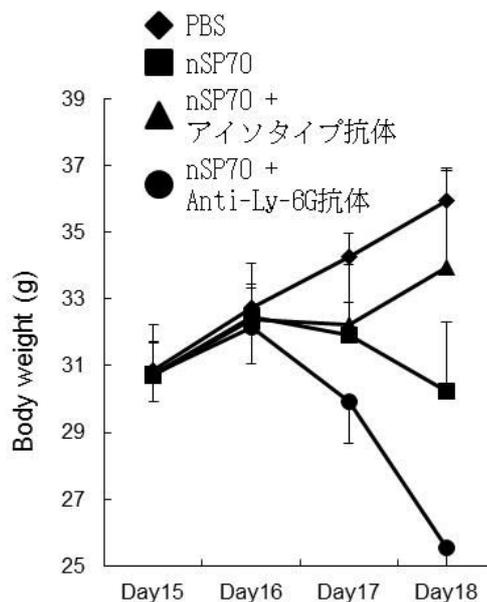
現在、in vitro における発生毒性試験法として EST 法が挙げられる。EST 法は、ES 細胞から心筋細胞への分化に及ぼす影響を指標に、催奇形性を予測する試験である。ES 細胞は、その凝集体である胚様体（EB）を形成させた後、接着培養することで心筋細胞に分化し、分化開始から 10 日目に拍動が観察される。分化の初期段階より催奇形性物質を作用させることで、心筋細胞への分化が抑制され、拍動が認められなくなる。申請者はこれまでに、EST 法を用いて、ナノシリカの催奇形性を in vitro で評価してきた。その結果、粒子径 100 nm 以上のサブミクロンサイズのシリカを作用させた群では 100 µg/mL の濃度においても拍動率に影響を及ぼさなかった一方で、ナノシリカを作用させた群では、100 µg/mL の濃度でのみ拍動率が 50 % 近くまで低下し、分化を阻害している傾向を認めている。一方で、ナノシリカをマウスに投与しても、催奇形性はほとんど認められないことも確認している。即ち、in vitro における結果と in vivo における結果が相関していない。一方で、妊娠期のマウスにナノシリカを投与することで、胎仔死亡や胎仔発育不全が誘発されることを明らかにしている。従って現状では、本 EST を用いた in vitro 試験法は、in vivo における胎仔毒性とは相関する結果

といえる。しかし、ナノシリカによって誘導される胎仔毒性（胎仔死亡および胎仔発育不全）の誘発メカニズムの詳細が不明であるため、in vivo を反映し得る方法論になり得ているかは定かでない。そこで本検討では、ナノシリカの胎仔毒性（胎仔死亡および胎仔発育不全）メカニズムを明確にすることで、in vitro 試験法確立に向けた基盤情報になり得ることを期待した。

これまでの検討において、ナノシリカを妊娠マウスに投与した際、定性的な解析であるものの、ナノシリカが胎盤に移行すること、さらには、胎盤においてアポトーシスが多数観察され、胎盤機能不全に陥ることを明らかにしている。そのため、ナノシリカの体内動態や胎盤移行を制御するメカニズムを明確にすることが必要不可欠であると考えた。この点、近年の報告によると、ナノマテリアルの排泄・分解機構において、自然免疫系の中心的な細胞である好中球の寄与が着目されつつある。例えば、カーボンナノチューブが、好中球に含まれる酵素の働きにより生物分解を受けること、顆粒球やマクロファージがナノマテリアルの取り込み・排泄に寄与する可能性が報告されている。また、好中球は、取り込んだ病原微生物を様々な機構により殺傷するが、近年その機構の一つとして、好中球が自己DNAを放出し、これらDNAやヒストンを中心としたNETs（neutrophil extracellular traps）と呼ばれる構造物を形成することで、異物排除に働くことが報告されている。NETsは、細菌等を捕捉し感染防御に働くことが知られている一方で、NETsの発生と自然流産やIUGR（intrauterine growth restriction）との関連性が示唆されるなど、NETsの形成が宿主に対する障害を惹起し得ることが報告されている。そこで本検討では、好中球に着目して、ナノシリカの胎仔毒性誘発メカニズムの解明を図った。妊娠16日目のBALB/cマウスに粒子径70 nmの非晶質ナノシリカ（nSP70）を尾静脈より投与し、末梢血中の好中球画分をFlow cytometryにより解析した。その結果、これまでの検討と同様に、nSP70を投与することで、流産や胎仔死亡に起因した母体マウスの体重減少が認められると共に、nSP70投与により、コントロール群と比較して、末梢血好中球画分が有意に増加することを明らかにした。さらに、好中球特異的な中和抗体である抗Ly-6G抗体を前処置したところ、nSP70投与による母体重量の減少が促進する傾向が示された。これらの結果から、nSP70投与による末梢血好中球画分の増加が、nSP70投与により誘導される妊娠障害の悪化を防ぐ働きを有する可能性が示された。

本結果が、好中球のどのような機能に依存しているかは現段階では不明である。静脈内のナノシリカが好中球に貪食されていたものが、好中球が枯渇することで、胎盤により多く移行し、胎盤障害を誘発しやすくなった

可能性が考えられる。さらに、一般的に、好中球は、流産などを促進すると考えられているものの、ナノシリカによる胎仔毒性においては、防御的に作用した可能性も考えられる。これらの詳細は今後の検討課題といえる。さらに、これらを明確にすることで、ナノマテリアルのin vivoにおける胎仔毒性を、如何にin vitroに反映させるのか、即ち、in vivoとの整合性に優れたin vitro評価系の構築に向けた情報を提供できると考えている。



5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計0件)

〔学会発表〕(計12件)

1. 佐藤宏祐, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 野尻奈央, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 堤康央: サブナノ素材の妊娠期曝露による胎仔影響の基礎検討., 第39回日本毒性学会学術年会., 仙台(宮城), 2012年7月.
2. Ogura T., Yoshioka Y., Yamashita K., Taira M., Aoyama M., Tsunoda S., Kawabata K., Mizuguchi H., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.: In vitro evaluation of the embryotoxic potency of amorphous nanosilica, The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012), Beijing (China), 4-7 September, 2012.
3. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Ago Y., Satoh H., Nojiri N., Takuma K., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuda T., Miyakawa T., Tsutsumi Y.: Postnatal effects of prenatal exposure to amorphous nanosilica particles on neonatal cognitive functions, SETAC Asia/Pacific 2012,

Kumamoto (Japan), 24-27 September,
2012.

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕
出願状況(計0件)

〔その他〕
該当無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉岡 靖雄 (YOSHIOKA, Yasuo)
大阪大学・大学院薬学研究科・准教授
研究者番号：00392308