

Title	ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に関する基礎情報の収集
Author(s)	赤瀬, 貴憲
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	VoR
URL	https://hdl.handle.net/11094/55461
rights	© Nabeshi et al.
Note	

Osaka University Knowledge Archive : OUKA

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

Osaka University

氏名	赤瀬貴憲
博士の専攻分野の名称	博士(薬学)
学位記番号	第 25978 号
学位授与年月日	平成 25 年 3 月 25 日
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当 薬学研究科応用医療薬科学専攻
学位論文名	ナノマテリアルの経皮・口腔毒性に関する基礎情報の収集
論文審査委員	(主査) 教授 堤 康央 (副査) 教授 那須 正夫 教授 高木 達也 教授 平田 收正

論文内容の要旨

近年のナノテクノロジーの発展に伴い、一次元の大きさが100 nm以下のナノサイズに制御された、ナノマテリアルの開発が急速に進展している。ナノマテリアルはその粒子径の減少に伴い、電気的・磁氣的・光学的特性や組織浸透性といった点において、従来までのサブミクロンサイズ（数百 nm-数 μm ）以上の素材とは異なる、特徴的な機能を有するため、既に化粧品、化粧品、食品など、様々な産業領域において実用化が進んでいる。このような状況を踏まえ、昨今の国民の健康、および食品・化粧品への安全・安心の希求も相俟って、ナノマテリアルの安全性への関心が高まっている。しかし、安全性評価研究の現状は、ナノマテリアルの曝露状況（製品に含有されている素材の情報や実際の含有量、ヒトの摂取量など）が不明瞭なこともあり、ハザード情報（有害性情報）が発信されるばかりで、安全性評価に肝心の体内吸収性や体内動態などの曝露実態情報の収集は進んでいない。このまま体内吸収性/生体内動態に関する検討がなされることなく、ハザード情報のみを鵜呑みにしたナノマテリアルの安全性評価が実施されると、全てのナノマテリアルが危険であるかのような誤った解釈を生んでしまう可能性がある。ひいては、ナノマテリアルの有用性を享受した豊かな社会の構築や産業発展が阻害されてしまいかねない。そこで申請者は、ナノマテリアルの安全性確保に向けて、我々の生活に最も浸透しているナノマテリアルの1つである非晶質ナノシリカを対象とし、経皮/口腔曝露を想定した安全性情報の収集を図った。

本検討では、直径が70 nmのナノシリカ（nSP70）、および300 nm、1000 nmのサブミクロンサイズの従来型シリカ（それぞれnSP300、mSP1000）を使用した。まず、ナノシリカがファンデーションや日焼け止めなど、経皮塗布製品に多く含有されていることを加味し、経皮曝露実態情報の収集を図った。3日間連続でnSP70をマウスに塗布し、塗布部位である耳介部および所属リンパ節を回収し、電子顕微鏡により観察した。その結果、経皮塗布したnSP70は、表皮層に存在する免疫担当細胞であるランゲルハンス細胞内に移行するだけでなく、真皮層の細胞、あるいは所属リンパ節にまで到達することが明らかとなった。以上の結果から、ナノシリカの安全性

を評価するにあたっては、皮膚局所における影響のみではなく、ランゲルハンス細胞が起点となる、あるいは二次リンパ組織で誘導される免疫応答を含めた、総合的かつ詳細な生体影響評価の必要性が示された。そこで次に、多くの疾患の発症や細胞内ストレス応答に関与する活性酸素種（ROS）産生の観点から、ランゲルハンス細胞株（XS52細胞）におけるシリカの細胞影響を評価した。その結果、全てのシリカにおいて、作用濃度に依存したROS産生が認められた。特にnSP70作用群では、nSP300、mSP1000作用群でROS産生が認められなかった低用量作用時においても、コントロール群と比較して約2倍のROS産生が認められ、従来型シリカよりも高いROS誘導能を有することが明らかとなった。従って、今後、ナノシリカの安全性評価にあたっては、ROSに起因することが知られている遺伝毒性や免疫毒性などの特殊毒性の観点からも、詳細な検討が必要であろう。

次に申請者は、歯磨き粉などのオーラルケア製品に含まれるナノシリカの安全使用に向け、口腔毒性の1つとして、口腔内の歯槽骨への影響を精査するために、ナノシリカが骨芽細胞および破骨細胞の分化に与える影響を評価した。オーラルケア領域でのナノシリカは、研磨性の向上、歯表面の細菌付着の抑制、さらにエナメル芽細胞の分化促進による歯の再生など、高機能性の歯磨き粉として注目されている。まず、骨芽細胞（MC3T3-E1細胞）に各粒子径のシリカを3日間作用させ、骨芽細胞分化の指標として汎用されるAlkaline phosphatase (ALP) 活性を測定した。その結果、nSP70作用群では変化は認められなかったものの、nSP300、mSP1000作用群では、ALP活性が有意に減少した。本結果から、ナノシリカは骨芽細胞分化に影響を与えない一方で、従来型シリカは骨芽細胞分化を阻害する可能性が示された。次に、破骨細胞が免疫担当細胞であるマクロファージが骨芽細胞と相互作用して分化した細胞であることを踏まえ、マクロファージ細胞株（RAW264.7細胞）を用いて、ナノシリカが破骨細胞への分化に与える影響をTartrate-resistant acid phosphatase (TRAP) 活性を指標として評価した。その結果、破骨細胞分化因子であるRANKLと各シリカを共作用させた場合、TRAP活性はRANKL単独作用群とほぼ同等であり、シリカの粒子径の違いによる変化も観察されなかった。すなわち、RANKL共存下においては、シリカは破骨細胞の分化に影響を及ぼさないことが示唆された。一方で、同様の検討をRANKL非共存下で実施したところ、nSP70作用群においてのみ、RANKL作用時と比較して圧倒的に少ないものの、TRAP活性の増加、多核化したTRAP陽性細胞が認められた。この事実は、nSP70単独の作用により、僅かながら破骨細胞への分化が促進されることを示している。そこで、nSP70による破骨細胞分化の促進メカニズム解析の一環として、破骨細胞の分化促進因子の1つとして知られるTNF- α の産生量を評価した。その結果、TNF- α は、粒子径の減少に伴って産生増加することが判明した。すなわち、nSP70を作用させることで、RAW264.7細胞がTNF- α を産生しオートクライン的に作用することで、破骨細胞への分化を促進することが明らかとなった。

本検討では、ナノマテリアルのリスク解析に必須の曝露実態の一部を明らかにすると共に、ナノマテリアルによる生体影響を考察する際には、ナノマテリアルを従来のサブミクロンサイズの素材とは別個の素材として捉える必要性を示した。特に、オーラルケア製品に多くのナノマテリアルが含有されているものの、これまで本研究領域において全くの手つかずであった口腔組織への影響を解析し骨代謝への影響を明らかとした点で、本結果は極めて意義深いと考えられる。本研究成果が将来的に、ナノマテリアルの安全性確保（Nano-Safety Science）や安全なナノマテリアルの創製（Nano-Safety Designによる成果）に資するのみならず、国民や社会が、安全かつ安心して、何よりも納得のうえで、ナノマテリアルの継続的な利用を可能にし、社会受容を図るためのSustainable Nanotechnologyの発展に貢献することを祈念している。

ナノマテリアルの実用化は加速度的に進展しているものの、ナノマテリアルの安全性に関する理解は十分に進んでおらず、昨今では、ナノマテリアル特有の毒性（ナノ毒性）が地球規模で懸念されている。本観点から、ナノマテリアルの安全性把握、リスクの理解に向け、経口曝露・経皮曝露後の動態（ADME）と経口腔ハザードなど、毒性（T）の解析に焦点を絞り、非晶質ナノシリカ等の安全性情報を集積し、下記のように、興味深い多くの知見を得た。

1. 直径70 nmの表面未修飾ナノシリカ（nSP70）が生体で最も強固な皮膚バリアを透過して、表皮や真皮の細胞内に侵入することを示した。
2. ナノシリカは、サブミクロンサイズ以上の従来型シリカとは異なるROS誘導性を示すことを明らかにした。
3. ナノシリカが、MC3T3-E1細胞の骨芽細胞分化には影響しないことを明らかとした。
4. ナノシリカは、RANKL存在下ではRAW264.7細胞の破骨細胞分化には影響しないものの、RANKL非存在下において分化促進に働く可能性を明らかとした。

以上、本研究では、100 nm以下のナノシリカが、経皮/口腔毒性の点において、サブミクロンサイズ（数百 nm～数十 μ m）の従来型シリカとは異なる性質を発揮することを実証した。本研究成果は、医薬品、食品、化粧品などの領域でのSustainable Nanotechnology：安全かつ有効に持続利用可能なナノテクノロジーの発展に貢献するものであり、博士（薬学）の学位を授与するにふさわしいものと考えられる。

植物は昆虫などから食害を受けると直ちに緑葉揮発成分 (Green leaf volatiles, GLVs) を放散する。GLVs は葉緑体膜より遊離される α -リノレン酸やリノール酸といった C18 脂肪酸より酸化分解を経て産生される C6, C9 の揮発性化合物の総称である。また、 α -リノレン酸を前駆体とする化合物としてジャスモン酸 (JA) が知られており、JA とその揮発性誘導体であるメチルジャスモン酸 (MeJA) は、植物のストレス応答、特に防御応答に対して重要な役割を果たす生理活性物質である。具体的には、JA や MeJA は、抗菌性タンパク質の合成などを強力に誘導することが知られており、直接的に食害の拡大を抑制するための防御に利用されている。

GLVs も JA や MeJA と同様に植物の防御応答に利用されるが、その機能は、それらとは異なり、防御応答を予め準備する「プライミング効果」の誘導であることが示唆されている。予め GLVs を処理した植物では、食害を受けた場合、プライミング効果によって GLVs 未処理の植物に比べより強い防御応答が観察される。GLVs の単独処理では、防御応答が確認されないため、食害を受けた植物から放散される GLVs は、周囲の植物が食害の危険を予め察知し、食害を受けた場合に、より強い防御応答を迅速に誘導するために用いられていると推察されている。GLVs によるプライミング効果は、JA のシグナル伝達経路に作用するものと予想されるが、この作用機構はほとんど解明されていない。GLVs はその化学特性として揮発性が高く、GLVs の基本骨格である (Z)-3-hexenal, *n*-hexanal から様々な化学修飾を受けるため、種々の化合物によって構成されている。

申請者らは、GLVs によるプライミング効果を詳細に検証するため、簡便な新規閉鎖型アッセイ系を構築した。プライミング効果は、MeJA によって誘導される二次代謝産物であり、昆虫の忌避物質として知られるアントシアニンを測定することで評価し、GLVs によるプライミング効果と MeJA 応答の関係性を検証した。構築したアッセイ系では、前処理として行う GLVs 添加と、その後に防御応答を誘導するために行う MeJA の処理を合わせて二回行うことが特徴となる。試験に供する GLVs として、代謝経路が明らかにされている九種類の化合物を選定し、それらのプライミング効果を検証した。まず、MeJA 処理のコントロールとして使用した MeOH 処理では、GLVs の処理の有無にかかわらず、植物内で合成されるアントシアニン量に違いが見られず、GLVs の単独処理ではアントシアニン合成が誘導されないことが示された。MeJA 処理区では、*n*-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal, (E)-2-hexenyl acetate, (Z)-3-hexenyl acetate で前処理した場合に、その後の MeJA 処理によって誘導されるアントシアニン量が、GLVs で前処理を行わなかった MeOH-MeJA 処理区と比べ、有意に増加した。以上より、これらの GLVs が MeJA 応答に対するプライミング効果を有する化合物であることを示した。一方、試験に供した GLVs の中で、*n*-hexanol, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol, *n*-hexyl acetate による前処理では、アントシアニン量が MeOH-MeJA 処理区と同程度であり、プライミング効果が観察されなかった。これらの結果から、GLVs の構造に着目すると、アルデヒド基を有する GLVs である、*n*-hexanal, (E)-2-hexenal, (Z)-3-hexenal はプライミング効果を示したが、水酸基を有する GLVs である、*n*-hexanol, (E)-2-hexenol, (Z)-3-hexenol ではプライミング効果が認められないという結果を得た。

さらに、GLVs には C9 化合物の存在も確認されており、今回 C6 GLVs においてプライミング効果を示した *n*-hexanal, (E)-2-hexenal の構造に着目し、それらの構造に類似する *n*-nonanal, (E)-2-nonenal を選定し、プライミング効果の検証を行った。

その結果、試験に供した C9 の GLVs の中で、アルデヒド基を有する (E)-2-nonenal, *n*-nonanal の前処理によって、MeOH-MeJA 処理区よりも有意なアントシアニン量の増加がみられ、C6 化合物と同様にプライミング効果が確認された。一方、水酸基を有する *n*-nonanol や (E)-2-nonenol の前処理では、プライミング効果は認められなかった。これらの結果より、MeJA 応答に対してプライミング効果を誘導する GLVs は、アルデヒド基を有する化合物であることが明らかとなり、水酸基を有する GLVs は MeJA によるアントシアニン合成を促進しないという興味深い知見を得た。また、試験に供した GLVs の中で、最も高いプライミング効果を発揮する物質は、(E)-2-hexenal であった。以上、申請者らは、(E)-2-hexenal がシロイヌナズナにおいてアントシアニン蓄積を誘導する MeJA の感受性を増強することを初めて見出した。

本研究において示された (E)-2-hexenal によるプライミング効果の分子メカニズムを理解するために、申請者らは、アントシアニン生合成系と JA シグナル伝達経路に関わる酵素遺伝子の発現量解析を試みた。アントシアニン生合成経路に関わる遺伝子発現量解析の結果、(E)-2-hexenal-MeJA 処理区において、MeOH-MeJA 処理区よりも有意な発現量の増加が見られた遺伝子は、*PAL*, *CHS*, *F3'H*, *DFR*, *LDOX*, *UF3GT* そして、転写因子の *PAP1* であり、アントシアニン合成を促進させるプライミング効果は、遺伝子の転写レベルでも確認された。特に、アントシアニンの生合成に関与する転写因子である *PAP1* は MeJA 処理後早い段階にてその転写量が著しく上昇しているため、アントシアニン生合成経路の後半部分の反応を触媒する酵素の *DFR*, *LDOX*, *UF3GT* の遺伝子発現量を強く活性化することが示唆された。(E)-2-hexenal 処理によるアントシアニン生合成酵素遺伝子の発現量の促進は、*PAP1* 転写因子の発現量上昇によるものであると推察される。次に、アントシアニンの生合成を制御している JA シグナル伝達経路に関わる鍵遺伝子の発現量について調べた。その結果、MeOH-MeJA 処理区の発現量と比較して、(E)-2-hexenal-MeJA 処理区において有意な発現量の上昇を示した遺伝子は、JA シグナル伝達経路において中心的な役割を担う *COII* と二次代謝経路の活性化に関わる転写因子 *MYC2* であった。アントシアニン生合成遺伝子の発現量解析の結果と合わせれば、(E)-2-hexenal のプライミング効果によって、MeJA 応答時の転写因子の転写レベルが大きく上昇させられることによって、下流の二次代謝経路の活性化が強力に促進させることが示唆された。

以上、本研究では、アルデヒド基を有する GLVs が MeJA 応答性のアントシアニン蓄積におけるプライミング物質であることを明らかにした。また、プライミング効果によって、*PAP1* や *MYC2* などの転写因子の遺伝子発現量が大きく増加させることにより、アントシアニンを含めた二次代謝経路の活性化が起こっていると考えられた。これらの知見は、植物の有用二次代謝生産に適用することで、新たな栽培技術の開発に貢献できるものと考えられる。

論文審査の結果の要旨

博士論文「植物の防御応答に対する緑葉揮発成分のプライミング効果に関する研究」では、植物の防御応答反応として知られるメチルジャスモン酸 (MeJA) によって誘導される二次代謝物質生合成促進作用における緑葉揮発成分 (GLVs) のプライミング効果について、以下のような知見を得た。