The University of Osaka
Institutional Knowledge Archive

Title	ナノマテリアルの安全性評価基盤の構築
Author(s)	永野, 貴士
Citation	大阪大学, 2016, 博士論文
Version Type	
URL	https://hdl.handle.net/11094/56179
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　（　　永野貴士　　）	
論文題名	ナノマテリアルの安全性評価基盤の構築

論文内容の要旨

少なくとも１次元の大きさが100 nm以下の素材であるナノマテリアル（NM）は、従来型素材に比べて、組織浸透性の向上をはじめとした有用機能を発揮することから、既に香粧品・医薬品などの分野で利用されている。一方で、NM特有の画期的な機能が、予期せぬ生体影響を誘発し得ることが懸念されており、NMの安全性研究が世界的に推進されている。しかし、これまでの知見は、依然としてハザード発現に関するものが中心であり、安全なNMの開発に向けた情報は乏しいのが現状である。従って、リスク解析に資する安全性情報の収集や安全性確保に向けた取り組みが喫緊の課題である。この点、当研究室ではこれまでに、NMの物性-生体内動態-生体影響の連関を解析することで、安全なNMの創製や安全性予測に資する安全性評価基盤の構築を目指してきた。その成果として、高用量投与でのハザード同定において、①サブミクロンサイズの非晶質シリカと比較して、ナノサイズのシリカ（nSP）では致死毒性や肝障害などを誘発し得ること、さらに上記ハザードは、②nSPの表面性状を変化させることにより軽減可能であることを明らかとし、安全性の高いNMを創製するための足がかりとなる基盤情報を見いだしてきた。しかし、NMの表面性状とハザード軽減との連関は、未だ十分に理解されていないのが現状であり、安全性の高いNMの開発に向けては、表面性状に着目した解析が必要である。本背景から著者は、表面性状の変化によるハザード軽減に対する原因追及を目指し、我々の生活に浸透しているNMの一つであるnSPをモデルとして、表面性状と肝障害の軽減との関係性について解析した。

本検討では、粒子径が70 nmのnSP（nSP70）、およびnSP70の表面をカルボキシル基、アミノ基で修飾したnSP70-C・nSP70-Nを用いた。これまでに当研究室では、従来型のサブミクロンサイズの非晶質シリカは、主にクッパー細胞に局在するのに対し、nSP70はクッパー細胞のみならず、肝実質細胞やその核内にまで局在し得ることを見出してきた。従って、表面修飾による肝障害の軽減は、肝臓組織における分布に起因している可能性を考え、各粒子を投与した際の局在について評価した。その結果、nSP70-C・nSP70-Nは、未修飾のnSP70と同様に、肝実質細胞とクッパー細胞の両細胞に分布していることが示唆され、肝障害の軽減は局在の違いに起因している可能性は低いことが示唆された。本結果において、各粒子が分布していたクッパー細胞は、異物排除を担う細胞として知られている。そこで次に、クッパー細胞が、各粒子を貪食し、肝障害の軽減に寄与している可能性を考え、塩化ガドリニウムによりクッパー細胞の貪食作用を阻害させた際の影響を評価した。未修飾のnSP70を投与した結果、塩化ガドリニウムの前処置によって肝障害の指標であるALTが有意に上昇したのに対し、nSP70-C・nSP70-N投与群では、ALTに変動は認められなかった。従って、表面修飾nSP70投与における肝障害の軽減に対して、クッパー細胞の寄与は少ない可能性が示され、肝実質細胞に対する作用の違いに起因している可能性が考えられた。そこで次に、肝実質細胞への直接的な作用を検証すべく、マウス肝実質細胞株に各nSP70を添加し、細胞傷害性を評価した。その結果、未修飾nSP70作用群では、濃度依存的に生存率が低下した一方で、nSP70-C・nSP70-N作用群では、生存率の低下は認められなかった。従って、表面修飾による肝障害の軽減理由として、肝実質細胞に対する傷害性の違いに起因する可能性が考えられた。

一方で、今後も様々な領域への応用を目指して、新規NMが数多く開発されることが予想される。各NMには、予期せぬ生体影響を誘発する可能性があることを鑑みると、上記のような各NMが誘発するハザードを個別に解析することに加え、数多くのNMの安全性を簡便に検証する手法も重要である。そこで著者は次に、安全性を評価する手法の充実を目指して、開発段階における化学物質の安全性や毒性評価に有用なバイオマーカーに着目した。特に近年、生体影響を組織特異的に評価可能であり、PCRでの増幅により微細な生体影響の変化を判断可能なバイオマーカーとして期待されているmicroRNA（miRNA）に焦点を当てた。まず、miRNAが、NMによる生体影響を反映可能なバイオマーカーとなり得るかについて、nSP70による肝障害をモデルに、肝臓に高発現しているmiRNA（miR-122、miR-192、miR-194）に着目し検証した。マウスに粒子径300 nm、1000 nmの非晶質シリカ、およびnSP70を尾静脈投与し、従来の肝障害マーカーであるALT・ASTおよび各miRNA量を評価した。その結果、ALT・ASTは、nSP70投与群においてのみ上昇することが確認された。そこでこれらサンプルにおける各miRNA量を解析したところ、miR-122・miR-192は、ALT・ASTと同様に、nSP70

投与群でのみ、有意に増加することが示された一方で、miR-194は、本条件での変化は認められなかった。今後、投与量や検出時間など、様々な条件における各miRNAの変動を解析する必要があるものの、本検討で最も変動率が高かったmiR-122に着目して以降の検討を実施した。次に、miR-122の有用性を検討するために、nSP70の投与量依存的に誘発される肝障害におけるmiR-122の変動、miR-122の経時的な変動、およびnSP70-C・nSP70-Nにおける肝障害の軽減を反映し得るかについて各項目を検討した。その結果、miR-122は、ALT・ASTと同様に、肝障害に応じて変動することが示された。また、これらすべての結果についてvehicle群に対する相対値で表した場合、miR-122の相対値はALT・ASTと比較して、全体的に高い値を示すことが明らかとなった。即ち、今後、他のマーカーや病理検査などと合せて解析し、miR-122の上昇率と肝障害の程度について精査する必要があるものの、miR-122は、nSP70による肝障害に対する感度のよい指標となる可能性が考えられた。

以上、本研究では、表面修飾したnSP70による肝障害の軽減効果は、肝非実質細胞であるクッパー細胞の取り込み減少などに寄与するものではなく、むしろ肝実質細胞側への効果である可能性を示した。これまでに当研究室では、他の細胞株での検討ではあるものの、表面修飾nSP70は、未修飾体と比較して細胞内局在が異なる可能性を見出している。そのため、今後、細胞内局在と傷害性との関連について精査し、安全性の高い適切な修飾体の特徴を理解していく必要がある。また、miR-122は、nSP70による肝障害を感度良く判定する指標となる可能性を提示した。今後、当研究室で見出しつつある胎仔発育不全・嗅覚異常など、NMにより誘発される他の生体影響に対するmiRNAの探索・同定を推進し、NMの安全性を網羅的・簡便に判断可能な手法を充実させていくことが重要である。将来的に、適切な修飾法を見出すために個別にNMの安全性を評価すると共に、miRNAを活用してNMによる生体影響を網羅的・簡便に評価していくことで、NMの安全性評価基盤の構築につながり、ひいては安全で有用なNMの開発・実用化が促進されることを期待する。

様式７

論文審査の結果の要旨及び担当者

氏　名　（永野　貴士）		
	（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

本博士論文では、多くのナノマテリアルの主要な毒性である「肝毒性」と、ナノマテリアルの物性、特に表面性状にフォーカスし、ナノマテリアルの安全性評価基盤の構築の観点から、基礎情報を収集したものである。また、今後、数多くの開発が予想されるナノマテリアルの安全性を、開発段階から迅速かつ簡便に検証できるよう、miRNAなどの安全性評価バイオマーカーとしての可能性を追究し、以下の知見を得た。

1. 粒子径70nmの未修飾非晶質ナノシリカは肝障害を誘発すること、同粒径の表面修飾非晶質ナノシリカは安全であることを確認した。従来までは、肝臓における異物処理を担うクッパ-細胞への取り込みが肝毒性軽減の主たる要因と考えられてきたが、非晶質ナノシリカの表面修飾による肝障害の軽減は、肝実質細胞側への正の影響によることを認めた。

2. 上記に関して、粒子径70nmの未修飾非晶質ナノシリカは肝実質細胞に対して、直接的な傷害性を発揮し得ること、一方で、表面をカルボキシル基、アミノ基により修飾することで、肝実質細胞への傷害性を軽減し得ることを示し、この軽減効果（安全性向上効果）は、細胞内局在の変化などが要因となり得ることを認めた。

3. miR-122は、粒子径70nmの未修飾非晶質ナノシリカによる肝障害を検出できること、相対値で比較した際に、他のバイオマーカーであるALT・ASTと比べて高値であったことから、肝障害を感度良く判定する指標となり得ることを提示した。

以上、本研究成果は、Nano-Safety Science：ナノ安全科学とNano-Safety Design：ナノ最適デザインの双方向の研究を加速し、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貢献し得ることが期待され、ナノ科学の発展とその恩恵を享受できる社会に寄与するものである。

以上より、人の健康環境を科学する薬学領域において、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。