

Title	安全なナノマテリアルの開発に資する安全性評価研究 ： 生殖発生毒性に関する新知見
Author(s)	山下, 浩平
Citation	大阪大学, 2013, 博士論文
Version Type	
URL	<a href="https://hdl.handle.net/11094/60074">https://hdl.handle.net/11094/60074</a>
rights	
Note	著者からインターネット公開の許諾が得られていないため、論文の要旨のみを公開しています。全文のご利用をご希望の場合は、 <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed"〉</a> 大阪大学の博士論文について <a href="https://www.library.osaka-u.ac.jp/thesis/#closed">〈/a〉</a> をご参照ください。

***Osaka University Knowledge Archive : OUKA***

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

Osaka University

【24】

氏名	やま した こう へい 山 下 浩 平
博士の専攻分野の名称	博 士 (薬学)
学位記番号	第 2 5 9 7 6 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	安全なナノマテリアルの開発に資する安全性評価研究～生殖発生毒性に 関する新知見～
論文審査委員	(主査) 教 授 堤 康 央 (副査) 教 授 高 木 達 也 教 授 橋 本 均 教 授 藤 尾 慈

論 文 内 容 の 要 旨

ここ20年間におけるナノテクノロジーの発展は目覚ましく、1次元が100 nm以下の素材であるナノマ

テリアルが多数開発され、医薬品や化粧品、食品といった人体に直接適用する分野での実用化が進展している。従って、老若男女、妊婦、病人など、あらゆる健康状態のヒトが、微量ではあるものの、既にナノマテリアルの意図的・非意図的な曝露を避けられない状況となっている。一方で近年、我々の薬・食・環境に対する安全への懸念や健康への関心が年々高まりつつある。従って、有用性だけでなく、安全性の担保が今後のナノマテリアル開発における喫緊の課題とされている。本観点から我々は、各種ハザード情報と動態情報を加味し、ナノマテリアルのリスク解析を目指すナノ安全科学研究（Nano-Safety Science）を実施している。さらに、ナノマテリアルの有用性・安全性の向上を図るナノ最適デザイン（Nano-Safety Design）を推進することで、持続的に安心してナノマテリアルを利用できるナノ技術（Sustainable Nanotechnology）の確立を目指している。これら安全性研究を進める中で、本検討では特にナノマテリアルの生殖発生毒性に着目した。過去のメラミン問題や原発事故などでも胎児・乳幼児への影響が大きく話題となったように、子どもや次世代への影響を評価する生殖発生毒性は、社会的関心の高い問題である。環境省においても、2010年よりエコチル調査と呼ばれるコホート研究が開始され、妊婦・乳幼児期における化学物質曝露の影響を子どもが成長するまで追跡して検討している。しかし、社会的ニーズの高さにも関わらず、ナノマテリアルの生殖発生毒性に関する検討は遅れているのが現状である。そこで本検討では、医薬品・食品・化粧品分野で最も使用されているナノマテリアルである非晶質ナノシリカを妊娠マウスに投与し、胎仔への影響を検討することで、ナノマテリアルの生殖発生毒性情報の収集を図った。

本検討では、粒子径の違いによる生体影響の変化を観察するため、粒子径が1000、300 nmのサブミクロン（数百nm～数十μm）以上の非晶質シリカ（mSP1000、nSP300）、および粒子径が70 nmの非晶質ナノシリカ（nSP70）を用いた。まず、蛍光修飾された各非晶質シリカを妊娠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、すべての非晶質シリカ投与群において、非晶質シリカが肝臓に集積していることが確認された。一方で、nSP70を投与した群においてのみ、胎盤においても蛍光が観察され、nSP70は胎盤にまで移行する可能性が示された。さらに、透過型電子顕微鏡を用いて胎盤・胎仔を観察した。その結果、nSP70投与群においてのみ、胎盤や胎仔脳、胎仔肝臓で粒子が観察され、nSP70は血液胎盤関門を通過し、胎仔にまで移行することを明らかとした。

次に、妊娠16日目のマウスに非晶質ナノシリカを0.8 mg/匹ずつ2日間連続で尾静脈投与し、母体・胎仔への影響を評価した。その結果、nSP70投与群では、正常範囲内での変化ではあるものの母体血液中の白血球数と顆粒球数が有意に増加した。一方で、母体の肝障害マーカー（ALT）や腎障害マーカー（BUN）、血圧/心拍数を測定したところ、すべての群で有意な変化は認められなかった。次に、最終投与から24時間後に、胎仔を回収し、胎仔重量、胎仔死亡率を測定した。その結果、mSP1000やnSP300を投与した群では、有意な変化が認められなかった一方で、nSP70を投与した群では、胎仔体重の減少や胎仔死亡率の増加が認められた。本結果から、過剰量の静脈内投与による検討ではあるものの、nSP70が胎仔死亡や胎仔発育不全を誘発する可能性が示された。

そこで、nSP70による胎仔への毒性発現メカニズムの解明に向けて、妊娠後期における胎仔発育不全の最も大きな要因である胎盤への影響に着目した。先ほどの検討で回収した胎盤をHE染色により評価した結果、mSP1000、nSP300投与群においては、コントロール群と同様に正常に胎盤が形成されており、母体から胎仔への血流も正常に認められた。一方で、nSP70投与群の胎盤は、コントロール群と比較して全体的に色調が淡く血流が乏しいことが明らかとなった。次に、グリコーゲンを染色するPAS染色により胎盤を脱着膜層、栄養膜層、迷官層の3層に染分け、それぞれの層が総面積に占める割合を比較した。その結果、nSP70投与群では総面積に占める栄養膜層の割合が有意に減少していた。また、TUNEL染色で胎盤を染色し、栄養膜層におけるアポトーシスを観察したところ、nSP70投与群では有意にアポトーシス陽性率が増加していた。以上の結果より、胎盤栄養膜がnSP70により直接又は間接的に傷害を受け、胎仔死亡や胎仔発育不全を起していることが示唆された。

さらに、Nano-Safety Designの観点から、安全なナノマテリアルの創製に資する基礎情報の収集を目指し、nSP70の粒子表面にカルボキシル基修飾を施したnSP70-C、およびアミノ基修飾を施したnSP70-Nを用いて胎仔への影響を評価した。その結果、nSP70-C、nSP70-N投与群では、死亡胎仔率の増加や胎仔重量の低下が、nSP70投与群と比較して有意に改善された。以上の結果は、粒子径以外にもナノマテリアルの安全性を決定する要因があること、また、表面修飾を最適化することで、高度に安全性を確保し得ることを示す非常に重要な知見であると考えられる。

以上、本検討では、100 nm以下の非晶質ナノシリカが体内動態/生体影響の点において従来までのサ

ブミクロン以上の非晶質シリカとは異なる胎仔への影響を示すことを実証した。本研究成果は、ナノマテリアルの生殖発生毒性評価の重要性を先駆けて明らかとした重要な知見である。また、有用機能に関して、今後さらなる検討を進める必要があるものの、有用機能のみを搭載した安全な非晶質ナノシリカを創製出来る可能性を明らかとした。さらに本論においては、ナノマテリアルの有効利用に向けて、カーボンナノチューブやフラーレンといったカーボンナノ素材の安全性情報の収集を進めることで、ナノ医薬の開発に資する基礎情報を収集している。これらの研究をさらに発展させ、ナノマテリアルの生殖発生毒性をさらに精査すると共に、安全なナノマテリアルの創製に資する基礎情報を収集することで、ヒト健康の確保はもちろんのこと、ナノ産業界の発展に繋がることを期待する。

## 論文審査の結果の要旨

本研究では、Nano-Safety Science：ナノ安全科学およびNano-Safety Design：ナノ最適デザインを先駆けて推進することを目指し、種々物性（サイズ、表面電荷など）の非晶質ナノシリカの生殖発生毒性を初めて解明すると共に、主剤（主薬）がナノ・サブナノであるナノ医薬品（ナノメディシン）の開発を目的に、カーボンナノ素材の安全性に関する基礎情報を収集し、下記のように、新しく、有益な数多くの新知見・結論を得ている。

1. 直径70 nmの表面未修飾ナノシリカ（nSP70）を妊娠後期のマウスに投与することで、血液胎盤関門を通過し、胎盤や胎仔にnSP70が移行することを最初に認めた。
2. nSP70を妊娠後期のマウスに投与することで、母体に急性毒性を示さない濃度においても、胎仔発育不全や胎仔死亡を誘導するなど、胎仔の妊娠・出産に大きな影響を与えることを初めて明らかとした。
3. nSP70は、胎盤栄養膜層でアポトーシスを誘導し、胎盤栄養膜層の減少など、胎盤構造異常を誘導することを先駆けて発見した。
4. nSP70の粒子表面を適切な官能基で修飾することにより、流産や胎仔発育不全を回避できる可能性を見出した。
5. より太く、長いMWCNTが、DNA傷害性と起炎性を持つことを明らかとし、カーボンナノチューブの安全性評価において、物性情報に着目することの重要性を示した。
6. 短期間での検討ではあるものの、PVP包接フラーレンは、経口投与において低毒性を示すことを明らかとした。

以上、本研究は、今後の曝露実態（ADME）とハザード（T）の定量的解明によるリスク（ADMET）解析と安全性確保情報の発信など、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進展にも多大に寄与するものであり、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。