

遺伝子配列解明

産流慣

藤田保健衛生大

効果的治療に期待

藤田保健衛生大学
(愛知県豊明市)は1

日、一部の女性が流産
しやすいとされる遺伝子の
塩基配列を大阪府立母
子保健総合医療センタ
ー研究所との共同研究
で突き止めたと発表し
た。遺伝子分析によっ
て、妊婦にもっとも効
果のある治療ができる
としている。欧州の学
術誌「モレキュラー・
ヒューマン・リプロダ
クション」のオンライ

ン速報版に近く掲載さ
れる。

全妊娠の6分の1は
あり、3回以上は「習

慣流産」と呼ばれる。
一部は染色体異常や感
染症などが原因と分か
っているが、6割以上
は不明だった。

倉橋浩樹・藤田保健
衛生大教授らは、血液
凝固を防ぐたんぱく質
2倍前後に達すること

「アネキシンA5」の生
成を制御する遺伝子に
着目。習慣流産する女
性の場合、この遺伝子
の塩基配列が通常と異
なっている割合が、正
常妊娠する女性に比べ

が分かった。アネキシ
ン生成量が少ないため
胎盤で母体の血液が凝
固、胎児の発達が阻害
され、流産につながる
と推定されるという。
習慣流産の女性の遺
伝子を分析し、該当す
る女性のみ抗凝固療法
を行えば、出産につ
ながる可能性がある
という。倉橋教授は「も
っとも効果のある治療
法が選択できる。子ど
もをほしくても持てな
かった夫婦に夢を与え
る結果になってほし
い」と話した。

【山田一晶】

クシジョン」のオンライ

「習慣流産」遺伝子を発見

藤田保健衛生大

効果的治療に期待

妊娠しても流産を繰り返す「習慣流産」の危険性を高める遺伝子を、藤田保健衛生大(愛知県豊明市)の倉橋浩樹教授(分子遺伝学)らの研究チームが発見し、1日に発表した。妊婦がこの型の遺伝子を持つかどうかを調べれば、効果的に薬を投与して治療できる可能性がある。近く欧州ヒト生殖学会の学会誌電子版に掲載される。

3回以上の流産を繰り返す習慣流産は全妊娠の1〜2%とみられる。染色体異常や感染症などがかわつていないと考えられているが、多くは原因がわかっていない。

妊婦の胎盤内側の表面では、血液がゆっくりと流れて胎児に栄養を送っている。倉橋教授らは、この血液が固まるのを防ぐたんぱく質「アネキシンA5」に着目。習慣流産の女性243人と、そうではない女性118人について、このたんぱく質の遺伝子を調べた。

その結果、流産を繰り返す女性では、このたんぱく質の遺伝子の6カ所で、流産しない人たちと配列が異なっている割合が高かった。配列が異なっている場合、このたんぱく質が十分に作られず、胎盤内で血液が固まりやすくなり、胎児が育たずに流産につながると見られる。

血が固まるのを防ぐ治療薬はすでに広く使われており、今後、習慣流産の妊婦の遺伝子型を調べて配列の違いがあることが分かれば、薬を使って流産を防ぐことができるといふ。

(高山裕喜)

習慣流産の遺伝子発見

藤田衛生大教授ら

三回以上流産を繰り返す習慣流産の原因の一つとなる遺伝子を、藤田保健衛生大(愛知県豊明市)の倉橋浩樹教授、宮村浩徳助教、大阪府立母子保健総合医療センター研究所免疫部門の柳原格部長らのグループが突き止めた。欧州の国際生殖学会誌「モレキュラー・ヒューマン・リプロダクション」電子版に近く発表する。

これまで習慣流産の原因の一部に、胎盤の中で過剰に血液が固まり、胎児の発育が阻害される種類の病気があったと知られていた。グループはこれらの病気以外にも、血液の凝固が原因となる習慣流産があると考え、母親の血液が固まるのを防ぐ働きを持つタンパク質「アネキシンA5」に注目した。

原因不明の習慣流産の患者二百四十三人と、健常者百十八人の血液を調べ、アネキシンA5を作る遺伝子のうち六カ所の塩基対について、異常の多さを比較。すると、患者の10〜22%に遺伝子の異常があったが、健常者は6〜13%しかなく、習慣流産の患者の

「治療で副作用」低減も

方が健常者より平均二倍、異常の割合が多かった。グループは、遺伝子に異常があると、アネキシンA5の作られる量が少なく、胎盤内で血液が固まることを防げずに、流産の回数が増えることを推定した。

これまで、原因不明の患者に血液が固まらないよう溶かす薬を使うと、血液の凝固以外が原因だった場合に、出血などの副作用が出る恐れがあった。研究の中心となった宮村助教は「遺伝子を調べて、異常がある患者だけに血液が固まるのを溶かす薬を使うなど、オーダーメイドの治療につなげられる可能性がある」と話している。

中日新聞 習慣流産の遺伝子発見 愛知の藤田保健衛生大教授ら (CHUNICHI Web) - Windows Internet Explorer

http://www.chunichi.co.jp/s/article/2011020209015719.html

中日新聞 CHUNICHI Web

中日環境net

【地域のニュース】 愛知 ▶ 岐阜 ▶ 三重 ▶ 静岡 ▶ 長野 ▶ 福井 ▶ 滋賀 ▶ 石川 ▶ 富山

ホーム 社会 政治 経済 国際 スポーツ 特集・連載 社説・コラム

天気 ウーマン 環境 住まい 就職・転職 グルメ 教育 クルマ 旅行 囲碁・将棋 暮らし 医療 科学 イベント

トップ > 社会 > 速報ニュース > 記事

【社会】

習慣流産の遺伝子発見 愛知の藤田保健衛生大教授ら

2011年2月2日 02時09分

3回以上流産を繰り返す習慣流産の原因の一つとなる遺伝子を、藤田保健衛生大(愛知県豊明市)の倉橋浩樹教授、宮村浩徳助教、大阪府立母子保健総合医療センター研究所免疫部¹⁾の柳原裕部長らのグループが突き止めた。欧州の国際生殖学会誌「モレキュラー・ヒューマン・リプロダクション」電子版に近く発表する。

これまで習慣流産の原因の一部に、胎盤の中で過剰に血液が固まり、胎児の発育が阻害される数種類の病気があると知られていた。グループはこれらの病気以外にも、血液の凝固が原因となる習慣流産があると考え、母親の血液が固まるのを防ぐ働きを持つタンパク質「アネキシンA5」に注目した。

原因不明の習慣流産の患者243人と、健康者118人の血液を調べ、アネキシンA5を作る遺伝子のうち6カ所の塩基対について、異常の多さを比較。すると、患者の10～22%に遺伝子の異常があったが、健康者は6～13%しかなく、習慣流産の患者の方が健康者より平均2倍、異常の割合が多かった。

グループは、遺伝子に異常があると、アネキシンA5の作られる量が少なく、胎盤内で血液が固まることを防げずに、流産の回数が増えると推定した。

これまで、原因不明の患者に血液が固まらないよう溶かす薬を使うと、血液の凝固以外が原因だった場合に、出血などの副作用が出る恐れがあった。研究の中心となった宮村助教は「遺伝子を調べて、異常がある患者だけに血液が固まるのを溶かす薬を使うなど、オーダーメイドの治療につなげられる可能性がある」と話している。

(中日新聞)

この記事を印刷する

名古屋めしを代表する本場の味をご家庭で うなぎしら河の「ひつまぶし」 47 CLUB

新聞購読のご案内

アクセスランキング(直近1時間)

中日新聞 地方版記事

1【長野】御神渡り「出現」嬉しい 15日…
2【経済】米新車販売17.3%増 トヨタ…
3【自動車産業】11月新車販売2…
4【三重】県立高入試、全日割は平均2…
5【滋賀】家さんへの感染防ぎ 鳥インフ…

お知らせ

▶ 本社採用 2012年卒の会社説明会を開催
▶ 新入学を祝うよい子のついで 開催案内
▶ 五木寛之 親場激動篇 好評連載中

日本経済新聞 2月3日 木曜日 English

Web刊 ビジネスリーダー マネー テクノロジー ライフ スポーツ 朝刊・夕刊 My日経

トップ ニュース 特集 連載・コラム ランキング調査 社説・春秋 more ▼

トップ > ニュース > 記事

習慣流産特有の塩基配列を発見 藤田保健大

2011/2/2 11:55

小 中 大 印刷

流産を繰り返す女性に特徴的な遺伝子の塩基配列を突き止めた、藤田保健衛生大(愛知県豊明市)の倉橋浩樹教授(分子遺伝学)らが2日までに発表した。英医学誌「モレキュラー・ヒューマン・リプロダクション」電子版に近く掲載される。

流産を3回以上繰り返す「習慣流産」は約6割が原因不明だが、倉橋教授は「事前の遺伝子検査で流産を防ぐ新たな治療法につながるかもしれない」と話した。

「アネキシンA5遺伝子」が産出するタンパク質が、胎児と母胎をつなぐ胎盤で血液が凝固するのを防ぐことは分かっていた。

倉橋教授らは正常な妊婦と原因不明の習慣流産の患者で、この遺伝子の塩基配列を比較し、患者に特徴的な型があることを発見した。産出するタンパク質が少ないため、胎盤の血液が凝固し、胎児の発育が阻害されているとみられるという。

小 中 大 印刷

関連キーワード 倉橋浩樹、習慣流産、塩基配列、藤田保健衛生大、分子遺伝学、アネキシン、流産

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Hamaguchi M, Hamada D, Suzuki KN, Sakata I, <u>Yanagihara I.</u>	Molecular basis of actin reorganization promoted by binding of enterohaemorrhagic <i>Escherichia coli</i> EspB to alpha-catenin.	The FEBS Journal	5(24)	pp6260-7	2008
Hamada D, Tsumoto K, Sawara M, Tanaka N, Nakahira K, Shiraki K, <u>Yanagihara I.</u>	Effect of an amyloidogenic sequence attached to yellow fluorescent protein. Proteins	The FEBS Journal	2(3)	pp811-21	2008
難波文彦、北島博之、中山雅弘、藤村正哲、 <u>柳原格.</u>	子宮内感染・炎症と抗アネキシンA2IgM抗体	小児科	49(7)	pp989-94	2008
<u>柳原格、</u> 下屋浩一郎.	「胎内感染と流早産・新生児合併症」	日本周産期・新生児医学会雑誌	44(4)	pp1032-3	2008
白石淳、北島博之、藤村正哲、難波文彦、 <u>柳原格、</u> 長谷川妙子、田端厚之、中山雅弘.	「当センターにおける超早産児からのウレアプラズマ属細菌の検出頻度とその臨床背景」	近畿新生児研究会会誌	17	pp31-5	2008
中山雅弘、 <u>柳原格、</u> 濱中拓郎、末原則之、白石淳、北島博之.	「FIRSの制御に向けた7年、胎盤病理と生殖・胎内環境整備」	日本周産期・新生児医学会雑誌	44(2)	P318	2008
<u>柳原格.</u>	「妊婦及び早産児からのウレアプラズマ属細菌の分離培養」	日本産婦人科感染症研究会会誌	24	Pp41-5	2008
野崎昌俊、 <u>柳原格.</u>	「V(D)J組換え—Accessibilityから病態解析まで—」	大阪府立母子医療センター雑誌	24(2)	Pp65-70	2008
<u>味村和哉、柳原格.</u>	「妊娠高血圧症候群」	大阪府立母子医療センター雑誌	25(2)	pp9-11	2009
西原正泰、南佐和子、八木重孝、米本直裕、 <u>柳原格、</u> 樋口隆造.	「和歌山県における後期死産の検討(2003-2007年)」	日本周産期・新生児医学会雑誌	45(4)	pp1350-3	2009

Yanagihara I*, Nakahira K, Yamane T, Kaieda S, Mayanagi K, Hamada D, Fukui T, Ohnishi K, Kajiyama S, Shimizu T, Sato M, Ikegami T, Ikeguchi M, Honda T, Hashimoto H.	Structure and functional characterization of <i>Vibrio parahaemolyticus</i> thermostable direct hemolysin.	The Journal of Biological Chemistry	285(21)	pp16267-74	2010
Nishihara M, Sonoda M, Matsunami K, Yanagihara K, Yonemoto N, Ida S, Namba F, Shimomura I, Yanagihara I*, Waguri M.	Birth length is a predictor of adiponectin levels in Japanese young children.	Journal of Pediatric Endocrinology & Metabolism	23	pp913-920	2010
Nishihara M, Yamada M, Nozaki M, Nakahira K, Yanagihara I*.	Transcriptional regulation of the human <i>establishment of cohesion 1 homolog 2</i> gene.	Biochemical and Biophysical Research Communications	393(1)	pp111-7	2010
Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, Mimura K, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, Yanagihara I*.	Placental features of chorioamnionitis colonized with <i>Ureaplasma</i> species in preterm delivery.	Pediatric Research	67(2)	pp166-72	2010
Mimura K, Tomimatsu T, Sharentuya N, Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T.	Nicotine restores endothelial dysfunction caused by excess sFlt1 and sEng in an in vitro model of preeclamptic vascular endothelium: a possible therapeutic role of nicotinic acetylcholine receptor (nAChR) agonists for preeclampsia.	The American Journal of Obstetrics and Gynecology	202(5)	pp464.e1-6	2010
Kinugasa-Taniguchi Y, Tomimatsu T, Mimura K, Kanagawa T, Shimoya K, Murata Y, Kimura T.	Human C-reactive protein enhances vulnerability of immature rats to hypoxic-ischemic brain damage: a preliminary study.	Reproductive Sciences	17(5)	pp419-25	2010

Sharentuya N, Tomimatsu T, Mimura K , Tskitishvili E, Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Kimura T.	Nicotine suppresses interleukin-6 production from vascular endothelial cells: a possible therapeutic role of nicotine for preeclampsia.	Reproductive Sciences	17(6)	pp556-63	2010
Tskitishvili E, Sharentuya N, Temma-Asano K, Mimura K , Kinugasa-Taniguchi Y, Kanagawa T, Fukuda H, Kimura T, Tomimatsu T, Shimoya K.	Oxidative stress-induced S100B protein from placenta and amnion affects soluble Endoglin release from endothelial cells.	Molecular Human Reproduction	16(3)	pp188-99	2010
Hamada D, Hamaguchi M, Suzuki KN, Sakata I, Yanagihara I .	Cytoskeleton-modulating effectors of enteropathogenic and enterohemorrhagic <i>Escherichia coli</i> : a case for EspB as an intrinsically less-ordered effector.	The FEBS Journal	277(11)	pp2409-15	2010
橋本博、山根努、池口満徳、中平久美子、柳原格。	「腸炎ビブリオが産生する耐熱性溶血毒TDHの構造と機能」	日本結晶学会誌	52	pp285-9	2010
中山聡一郎、中山雅弘、味村和哉、光田信明。	「妊娠高血圧症候群の病態解明—分子機構を中心に—胎盤からみた妊娠高血圧症候群」。	産婦人科の実際	59	1005-1011	2010
Miyamura H, Nishizawa H, Ota S, Suzuki M, Inagaki A, Egusa H, Nishiyama S, Kato T, Pryor-Loishi K, Nakanishi I, Fujita T, Ymayoshi Y, Markoff A, Yanagihara I , Udagawa Y, Kurahashi H.	Polymorphism in annexin A5 gene promoter in Japanese women with recurrent pregnancy loss.	Molecular Human Reproduction.			in press
Nozaki M, Wakae K, Tamaki N, Sakamoto S, Ohnishi K, Uejima T, Minato N, Yanagihara I* , Agata Y.	Regulation of T cell receptor V γ 2 gene rearrangement by the Helix-Loop-Helix protein, E2A.	International Immunology.			in press

<p>Ohnishi K, Nakahira K, Unzai S, Mayanagi K, Hashimoto H, Honda T, <u>Yanagihara I*</u></p>	<p>Relationship between heat-induced fibrillogenicity and hemolytic activity of thermostable direct hemolysin and a related hemolysin of <i>Vibrio parahaemolyticus</i>.</p>	<p>FEMS Microbiology letters.</p>			<p>in press</p>
---	--	---	--	--	-----------------

総合分担研究報告 35

分担課題: 流産のエピジェネティックな異常の解析

研究分担者 秦健一郎 国立成育医療センター研究所周産期病態研究部 部長

研究要旨

DNA メチル化やヒストンのメチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御は、哺乳類の発生と生存に必須の機構である。エピジェネティックな異常は、細胞分裂を通じて安定して伝搬する為、一見通常の遺伝子変異と変わらないが、実際には遺伝子配列の変異を伴わない為、従来の遺伝学的解析では同定することができない。ゲノムインプリンティングは、DNA メチル化によって制御されるエピジェネティックな生命現象であるが、インプリンティングが破綻すると、ヒトでもマウスでも、胎盤形成異常を伴った胎児発生発育異常が観察される。これらの状況証拠から、DNA メチル化による遺伝子発現制御は、初期の絨毛発生分化に特別な役割を担っていると推測されている。

流産には、明らかな成因が同定できない症例が多数含まれており、およそ半数は正常核型とされている。これらの症例には、未知の微細な染色体異常あるいはエピジェネティックな異常が含まれていると考えられるが、系統的な解析は行われていない。

本分担研究計画では、異なる染色体上に散在し、DNA メチル化によって周囲の遺伝子発現を制御し、胎児や胎盤の発生発育に関わることが示されている領域(既知のインプリンティング遺伝子関連メチル化領域全て)と、反復配列、X 染色体、胎盤特異的非メチル化遺伝子領域を含む合計 32 箇所を標的に、定量的かつ半網羅的なメチル化解析法を確立した。

現在までに流産症例合計 59 例の DNA メチル化スクリーニングを行い、7 症例で DNA メチル化異常候補領域を同定した。今後は、多数検体の解析から、さらに正確なエピジェネティックな多様性(標準値)を確定するとともに、検出された DNA メチル化異常候補領域の詳細な解析と、さらに網羅的な解析を行い、流産発症との関連を検証する。多領域の厳密な定量解析は、現在まで本研究の他に報告が無く、病態と直結した DNA メチル化異常を同定し、診断への応用へと結びつけるにとどまらず、ヒト疾患のエピゲノム診断の嚆矢とし今後の予防法や安全性確保の指針に、全く新しい観点から有用な知見をもたらす事が期待される。

A. 研究目的

ヒトゲノムシーケンスプロジェクトの完了により、ほぼ全ての遺伝子配列が明らかになり、遺伝学的な異常を同定する技術(ジェネティックな異常の解析技術)が飛躍的に進歩した。一方で、遺伝子配列の異常(ジェネティックな異常)だけでは説明できない疾患の存在も明らかになった。

DNA メチル化をはじめとするエピジェネティックな遺伝子発現制御機構は、記念特に疾患や発生異常との因果関係が明らかにされてきており、従

来の解析手法(ジェネティックな解析手法)を超えたポストゲノムシーケンス時代の重要な医学研究領域として注目が高まっている。

特にエピジェネティックな生命現象の一つであるゲノムインプリンティングの破綻は、ヒトの発生異常と密接な関わりを持つことが知られている。いくつかのヒト先天性奇形症候群では、ゲノムインプリンティングの破綻がその原因であることが知られている。また、モデル生物の詳細な解析から、エピジェネティックな異常やゲノムインプリ

イングの破綻は、胎盤の発生分化異常を引き起こすことが示された。さらに最近、生殖補助医療後の出生児で、インプリンティング異常症が高頻度に発生する可能性が示唆された。しかし、流産におけるエピジェネティックな異常は系統的網羅的に解析されておらず、そもそもヒト正常発生を参考とした正常値も定義されるに至っていない。

一方で、流産症例を細胞遺伝学的に解析した報告は多数存在するが、およそ半数の症例では明らかな染色体構造異常を認めない。本研究は、従来の解析技術では検出できないエピジェネティックな異常、特に絨毛の発生分化に深く関与しているインプリンティング遺伝子領域の DNA メチル化状態に注目し、1)ヒト絨毛組織の DNA メチル化状態を網羅的かつ定量的に解析する手法を独自に確立し、2)流産症例の DNA メチル化異常の有無を解析することで、流産の未知の病因病態を解明し、診断治療へと発展させる事を目的とする。

B. 研究方法

1. 解析標的領域の決定

現在までにヒトで報告されている DMR (Differentially Methylated Region: 父由来と母由来の対立遺伝子間で DNA メチル化の状態が異なり、片親性発現すなわちゲノムインプリンティング現象に必要な領域)全てを、文献的に検索した。また、ヒトでは報告されていないが、マウス DMR との配列相同性からヒトでも DMR であると予想される領域を決定し、これらが DMR である事を正常血液 (リンパ球) および正常胎盤由来のゲノム DNA を用いて検証した。また、胎盤特異的な DNA メチル化を受ける領域、X 染色体上の DNA メチル化領域も併せ、合計 32 ヶ所を解析対象領域とした。

2. COBRA 条件検討

上記の領域を、COBRA (Combined Bisulfite Restriction Analysis) 法により解析するための条件検討を行った。実際に解析を行う配列領域は、PCR 法による増幅の際に偏りが無く効率的な反応が起こるように、増幅産物長は約 500bp 以下になるよう設定した。また、増幅産物を特定の制限酵素で切断する必要があるため、領域内に適切な制限酵素認識配列を有する配列が存在する事も必須である。解析するゲノム DNA は、bisulfite 変換により非メチル化シトシンがウラシ

ルに変換されるため、本来 4 種類の DNA で構成されるゲノム配列が、ほぼ 3 種類で構成される配列に変換される。このため、PCR の為のプライマー設計の自由度が格段に狭められると共に、特異的な増幅を行う為には、徹底した事前の条件設定が必要である。一方で、解析をハイスループット化する為に、PCR の反応条件は可能な限り統一した。これらの条件を満たしつつ、非特異的増幅を起こさない PCR 条件を確立し、決定した。

3. 電気泳動

一般的に COBRA 法では、アガロースゲルやポリアクリルアミドゲルを用いた電気泳動を行い、得られる泳動像から半定量的な解析を行うが、我々の事前検討では、従来の解析法はダイナミックレンジが低く、定量性が劣る事が判明した。そこで我々は、測定値の定量性を厳密に担保するために、キャピラリー電気泳動法を採用した。

4. 倫理面への配慮

倫理面においてはヒトゲノム・遺伝子に関する倫理指針、疫学研究に関する倫理指針、臨床に関する指針を遵守する。また本研究内容は、報告者の所属する機関の倫理委員会の承認を受けている (国立成育医療センター倫理委員会承認番号 234)。

C. 研究結果

初年度は主に解析条件の検討を行い、初年度から本年度にかけて、正常検体 (正常成人末梢血、正常絨毛組織) を用いた網羅的 DNA メチル化解析を行った。これらのデータから、末梢血リンパ球と正常絨毛組織における DNA メチル化状態正常値を定義した。

次年度は、初年度に確立した解析手法を用い、すでに収集されていた習慣流産 30 症例の解析を行った。最終年度は、本研究班分担研究者である名古屋市立大学産婦人科杉浦真弓教授のご協力により収集した流産 29 検体を解析した。以下の D. 考察と E. 結論の中で、結果の詳細も併せて述べる。

D. 考察

DNA メチル化を初めとするエピジェネティックなゲノム機能の制御は、発生と生存に必須の機構

であると共に、様々な疾患との関連が指摘されている。我々は、特に胎盤(絨毛)の発生分化に関与することが知られている DNA メチル化領域(インプリンティング遺伝子の発現制御に関わる特殊な DNA メチル化領域)を網羅的に解析した。「B. 研究方法」の項でも触れたように、我々は、既に報告されているヒトの DMR を全て網羅すると共に、ヒトではまだ報告されていないが、マウス配列との相同性検索により、少なくとも4箇所の新規ヒト DMR を同定し、解析系に組み込んだ。同様の網羅的解析を行った報告は前例が無く、我々が独自に解析・定義した DNA メチル化状態の「正常値」を用い、習慣流産症例の解析を行った。昨年度も報告したように、この手法は、先天奇形症候群(これらの症例では、DNA メチル化異常を伴っている事が確認されている)を解析した例では、従来の定性的な解析法と矛盾の無い、正確な診断が可能であった。大変興味深い事に、今回我々が行った解析結果を元に、きわめてその正確性を検証済みである。またこの検証過程で、稀な発生異常である母ゲノムダイソミーモザイク症例と、父ゲノム代祖ミーモザイク症例を同定する事に成功した。すなわち、我々の分子診断系は、1)分子診断に実用可能であり、しかも、2)今まで見逃されていた未知の病態を同定できる。

これまでに行った合計 59 症例の解析からは、少なくとも 7 症例に、合計 20 箇所の DNA メチル化異常が同定された。そのうち遺伝的に独立した 2 症例では、*H19* 遺伝子と呼ばれる領域の DNA メチル化異常が認められた。*H19* 遺伝子の発現異常や DNA メチル化異常は、胎盤発生異常に関与することが動物実験等からも示されており、流産という症状との直接の因果関係が疑われる。その他の例では、異なる染色体上に存在する複数の領域で DNA メチル化異常が検出され、受精後に何らかの系統的な DNA メチル化維持の破綻が起こった事が推測される。

以上のように、これまでの解析結果から、1)一部の流産絨毛検体には DNA メチル化異常が確かに存在し、2)共通のエピジェネティックな病因もしくは病態を有する症例が存在する可能性が示唆された。3)また、複数領域を網羅的に解析することで、その発生起源や分子病態の推測が可能であることが期待された。

我々は現在この手技手法を他の疾患解析へも応用展開すべく、研究を進めている。具体的に

は、胎児発育不全症例および妊娠高血圧症候群症例、合計 130 症例の胎盤・臍帯血について 25 箇所の DMR のメチル化を定量解析した結果、27 症例(20%)の胎盤において、一箇所あるいは複数箇所の DMR における DNA メチル化異常が検出された。更に、胎盤と臍帯血におけるメチル化レベルの比較から、同定されたメチル化異常の大半は胎盤特異的であることが明らかになった。これらの結果は、胎盤における DMR のメチル化異常が一部の異常妊娠の病因となっている可能性を示唆している。

E. 結論

我々の DNA メチル化異常スクリーニング系は、分子診断法として実用性がある。また、網羅的なメチル化異常解析を行うことで、従来見逃されていた分子病態を同定することが可能である。流産絨毛組織合計 59 検体を用いた解析で、合計 7 症例の DNA メチル化異常を同定した。これらの症例は、従来の解析手法ではいずれも「原因不明の習慣流産」であるが、我々の解析から異なる DNA メチル化状態の破綻を呈しており、各々の症例に固有の分子病態が存在することが示唆された。今後さらに多数の症例をスクリーニングすると共に、ビーズアレイによるゲノム全域約 27,000 箇所のプロモーター領域メチル化解析、個別領域の詳細な解析を併せて行い、未知の分子病態の解明を行う。

今後これらの基盤的知見は、流産の解析に止まらず、前述のように胎児発育遅延や妊娠高血圧症候群の病因病態解析、あるいは生殖補助医療の初期胚に対する影響の有無といった分野への応用展開も期待される。

F. 健康危険情報

該当せず。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H. Development. Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG

- methylation in oocytes. 2011 Jan 19. [Epub ahead of print]
- 2) Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T. *J Hum Genet*. Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes. 2010 Nov 11. [Epub ahead of print]
 - 3) 秦健一郎 (2010)「胎児発育とゲノムインプリンティング」*HORMONE FRONTIER IN GYNECOLOGY* 17, 43-48.
 - 4) Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., Hata, K., Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T. (2009) Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects. *Biol Reprod*. 81, 155-164.
 - 5) Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., Hata, K., Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S. (2009) The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline. *Dev Cell*. 17, 775-787.
 - 6) Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T. (2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics*. 93, 461-472.
 - 7) Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., Hata, K. and Arnaud, P. (2009) Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals. *Hum Mol Genet*. 18, 3375-3383.
 - 8) 秦健一郎 (2009)「DNA メチル化の網羅的解析」*医学のあゆみ* 230, 553-554.
 - 9) Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, Hata K, Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T. (2008). DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes. *Genes Dev* 22, 908-917.
 - 10) Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, Hata K, Li CL, Jin Y, Chen T, Li E, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Sasaki H, Xu GL (2008). Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development. *Hum Mol Genet* 17, 2654-2664.
 - 11) Kobayashi H, Yamada K, Morita S, Hiura H, Fukuda A, Kagami M, Ogata T, Hata K, Sotomaru Y, Kono T. (2009) Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene *Zdbf2* on chromosome 1 and its imprinted human homolog *ZDBF2* on chromosome 2. *Genomics* 93, 461-472.
 - 12) 久須美真紀、中林一彦、秦健一郎 (2008). 体外培養・長期培養の胚発生への影響: 動物実験と臨床データから. *J Mammal Ova Res* 25, 221-230.
 - 13) 秦健一郎 (2008). 死産の動物モデル. *産科と婦人科* 75, 419-425.
- ## 2. 学会発表
- 1) 秦健一郎「生殖に関わるエピジェネティクスとその異常」教育講演、日本生殖医学会、徳島、11月12日、2010.
 - 2) 秦健一郎「ヒト発生異常のエピジェネティクス」胎生期エピジェネティクス研究会、東京、6月17日、2009.
 - 3) 秦健一郎「胎児・胎盤分化発育異常のエピジェネティクス - 網羅的ゲノム・エピゲノム解析の試み -」日本周産期新生児学会ワークショップ不育症の新たな原因探索と治療、第45回日本周産期・新生児医学会学術集会、横浜、7月12日、2009.
 - 4) 秦健一郎「異常妊娠の epigenetics」第50回日本哺乳動物卵子学会ワークショップ、東京、5月9日、2009.
 - 5) Kenichiro Hata. " Roles of genomic imprinting in reproduction", The 7th Conference of the Pacific Rim Society for Fertility and Sterility, Taipei, August 22, 2009.
 - 6) Keichiro Hata. " Epigenetics in abnormal pregnancies", The 7th Conference of the

Pacific Rim Society for Fertility and Sterility,
Taipei, August 22, 2009. シンポジウム

- 7) 秦 健一郎「異常妊娠のエピジェネティクス」
日本人類遺伝学会第53回大会、周産期遺
伝学の現状と展望－生殖医療と遺伝をめぐ
って－、横浜、9月28日、2008.
- 8) 特別講演 秦 健一郎、「生殖機構のエピジェ
ネティクス」大阪大学蛋白質研究所セミナー
大阪、11月28日、2008.
- 9) Kenichiro Hata, “Characterization of DNA
methylation in abnormal pregnancies”, Inter-
national symposium Decoding Epigenetic
Code, Tokyo, December 15, 2008.
- 10) 秦 健一郎, 「異常妊娠のゲノム・エピゲノム
解析」日本生殖再生医学会第3回学術集
会、東京、3月30日、2008.

H. 知的財産権の出願・登録状況

(予定を含む。)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

研究成果の刊行に関する一覧表

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Kuramochi-Miyagawa S, Watanabe T, Gotoh K, Totoki Y, Toyoda A, Ikawa M, Asada N, Kojima K, Yamaguchi Y, Ijiri TW, <u>Hata K</u> , Li E, Matsuda Y, Kimura T, Okabe M, Sakaki Y, Sasaki H, Nakano T.	DNA methylation of retrotransposon genes is regulated by Piwi family members MILI and MIWI2 in murine fetal testes.	Genes Dev	22	908-917	2008
Hu YG, Hirasawa R, Hu JL, <u>Hata K</u> , Li CL, Jin Y, Chen T, Li E, Rigolet M, Viegas-Pequignot E, Sasaki H, Xu GL	Regulation of DNA methylation activity through Dnmt3L promoter methylation by Dnmt3 enzymes in embryonic development.	Hum Mol Genet	17	2654-2664	2008
久須美真紀、中林一彦、 <u>秦健一郎</u>	体外培養・長期培養の胚発生への影響：動物実験と臨床データから。	J Mammal Ova Res	25	221-230	2008
<u>秦健一郎</u>	死産の動物モデル	産科と婦人科	75	419-425	2008
Takashima, S., Takehashi, M., Lee, J., Chuma, S., Okano, M., <u>Hata, K.</u> , Suetake, I., Nakatsuji, N., Miyoshi, H., Tajima, S., Tanaka, Y., Toyokuni, S., Sasaki, H., Kanatsu-Shinohara, M. and Shinohara, T.	Abnormal DNA methyltransferase expression in mouse germline stem cells results in spermatogenic defects.	Biol Reprod.	81	155-164.	2009
Shoji, M., Tanaka, T., Hosokawa, M., Reuter, M., Stark, A., Kato, Y., Kondoh, G., Okawa, K., Chujo, T., Suzuki, T., <u>Hata, K.</u> , Martin, S. L., Noce, T., Kuramochi-Miyagawa, S., Nakano, T., Sasaki, H., Pillai, R. S., Nakatsuji, N. and Chuma, S.	The TDRD9-MIWI2 complex is essential for piRNA-mediated retrotransposon silencing in the mouse male germline.	Dev Cell.	17	775-787	2009

Kobayashi, H., Yamada, K., Morita, S., Hiura, H., Fukuda, A., Kagami, M., Ogata, T., Hata, K., Sotomaru, Y. and Kono, T.	Identification of the mouse paternally expressed imprinted gene Zdbf2 on chromosome 1 and its imprinted human homolog ZDBF2 on chromosome 2.	Genomics.	93	461-472.	2009
Henckel, A., Nakabayashi, K., Sanz, L. A., Feil, R., Hata, K. and Arnaud, P.	Histone methylation is mechanistically linked to DNA methylation at imprinting control regions in mammals.	Hum Mol Genet.	18	3375-3383	2009
秦健一郎	DNAメチル化の網羅的解析	医学のあゆみ	230	553-554	2009
秦健一郎	胎児発育とゲノムインプリンティング	HORMONE FRONTIER IN GY7NECOLOGY	17	43-48	2010
Tomizawa SI, Kobayashi H, Watanabe T, Andrews S, Hata K, Kelsey G, Sasaki H.	Dynamic stage-specific changes in imprinted differentially methylated regions during early mammalian development and prevalence of non-CpG methylation in oocytes.	Development		in press	2010
Yamazawa K, Nakabayashi K, Matsuoka K, Masubara K, Hata K, Horikawa R, Ogata T	Androgenetic/biparental mosaicism in a girl with Beckwith-Wiedemann syndrome-like and upd(14)pat-like phenotypes.	J Hum Genet.		in press	2010

総合分担研究報告 36

分担課題: ナノマテリアルと流産

研究分担者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野 教授

研究要旨

種々ナノマテリアルを配合した数多くの化粧品・食品が製造・実用化(上市)されており、我々は既に意図的・非意図的な曝露を避け得ない。一方で、ナノマテリアル特有の物性に起因した革新的機能が、二面性を呈してしまい、予期しにくい毒性を発現してしまうことが世界的に危惧されており、早急な安全性評価とその確保が求められている。特に、過去の多くの事例にも窺られるように、胎児は生体防御機構が未発達であるため、早産・流産・催奇形性など、予期せぬ重篤な障害を引き起こしかねない。そのため、ナノマテリアルの安全性評価にあたり、胎盤・胎児への移行性や胎盤機能に及ぼす影響、さらには、早産・流産・催奇形性誘発の可能性について精査することは最重要課題の一つと位置づけられるものの、その取組は国内外を問わず、遅れている。以上の観点から本研究では、ナノマテリアルの安全性確保や安全なナノマテリアルの創出に資するリスク情報の集積を目的として、化粧品・食品の成分として既に上市されている非晶質ナノシリカを用い、母体・胎仔への影響に関するハザード評価を推進した。本研究では、実用化の現状を踏まえ、粒子径 70 nm、300 nm、1000 nm の非晶質シリカ(nSP70、nSP300、mSP1000)を用いた。過剰量を静脈内投与するハザード評価であるものの、粒子径 70 nm の非晶質シリカ(nSP70)が妊娠マウスに対して、流産や胎仔発育障害を誘発する可能性を明らかにした。一方で、nSP300 および mSP1000 投与群では、流産や胎仔発育障害などは全く認められなかった。以上の事実は、ナノマテリアルの場合、従来素材とは異なり、その実用化に際しては安全性評価が重要となることを示唆するものである。即ち、ナノマテリアルとの豊かな共存社会を構築するためには、今後は、ナノマテリアルの動態解析やヒトにおける疫学調査など、曝露実態の解明によるリスク評価を推進することで、安全かつ有用なナノマテリアルの創出に資する基盤情報を収集する必要があることが示唆された。

A. 研究目的

近年、産業利用を目的として開発・製造されるナノマテリアルおよびナノマテリアル利用製品の実用化が多様化・加速化している。ナノマテリアルとは、少なくとも一次元の大きさが100 nm以下で製造された超微細材料と定義されている。このナノマテリアルは、従来までのサブミクロンサイズ以上(100 nm以上)の素材とは異なり、サイズ減少に伴う組織浸透性の増大や電子反応性の増大、重量あたりの表面積の増加などにより、抗酸化効果や紫外線遮蔽効果といった有用機能が格段に向上しており、我々の生活の質的向上に革命を起こすものと期待されている。例えば、医薬品・食品・化粧品領域では、非晶質

ナノシリカやナノ酸化チタン、フラーレン、白金ナノコロイド、ナノシルバーなどが既に、必須素材として上市されており、次世代を担う新素材として期待されている。一方で、ナノマテリアルの物性(サイズ、形状など)に起因した革新的機能が逆に、二面性を呈してしまい、サブミクロンサイズ以上の従来型素材では観察されない、特徴的な毒性、所謂、ナノトックス(NanoTox)を発現してしまうことが世界的に懸念されている。特に胎児や乳幼児は、血液脳関門や免疫系といった生体防御機構が未発達であるため、成人では影響が見られない量の曝露であっても大きな影響が及ぶ可能性がある。従って今後は、過去のサリドマイドやメラミン問題等の惨劇を繰り返さない

ためにも、次世代影響を見据えた胎児に対する安全性、及び新生児の成長過程における影響を精査することが必要不可欠であり、無影響量や無毒性量を設定するなど、科学的根拠に基づいたリスク管理を推進する必要がある。しかしナノマテリアルの生殖組織への移行性やその生殖発生毒性を検討した例はほとんどない。

以上の観点から本研究では、ナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に次世代影響(生殖発生毒性)に焦点を絞り、ナノマテリアルの母体・胎児への影響に関するハザード評価を試みた。また当該分担研究においては、研究の重要性と緊急性を鑑み、厚生労働科学研究費補助金化学物質リスク研究事業とは全く異なった視点で研究を実施しつつ、相互に連携、情報交換しつつ、研究の効率化を図った。

B. 研究方法

1) ナノシリカ・従来型シリカ: Micromod 社より購入した表面未修飾の非晶質ナノシリカ(直径 70 nm; nSP70)とサブミクロンサイズ以上の従来型シリカ(直径 300、1000 nm; それぞれ nSP300、mSP1000)を実験に供した。

2) ナノシリカの生殖発生毒性評価: 非晶質ナノシリカ・従来型シリカを妊娠 BALB/c マウスに 0.8、0.4、0.2 mg/mouse で妊娠 16、17 日目に 2 日間連続で尾静脈内投与した。シリカ最終投与 24 時間後に、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量を測定した。

C. 研究結果

次項の考察にまとめて記載する。

D. 考察

本研究では、一次粒子径が 70 nm(nSP70)の非晶質ナノシリカを使用し、対照として、300 nm(nSP300)、1000 nm(mSP1000)のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを供した。非晶質ナノシリカ・従来型シリカの形状を透過型電子顕微鏡(TEM)で観察したところ、いずれもカタログ値と同等の一次粒子径を持った表面が滑らかな球状の粒子であり、分散性に優れていた。

非晶質ナノシリカの妊娠マウスに対するハザード評価を推進する目的で、本研究では、過剰量を静脈内投与することでハザード同定を試みた。各粒子径の非晶質ナノシリカ・従来型シリカを妊娠マウスに 0.8 mg/mouse で投与し、子宮重量、吸収胎仔数を

評価した。その結果、nSP300、mSP1000 投与群ではコントロール群と変化は認められなかった一方で、nSP70 投与群では、胎仔吸収率の増加が認められ、子宮重量も有意に低下していた(Fig. 1a-c)。本結果から、nSP70 投与により流産が誘発されることが示された。さらに、子宮を解剖し、胎仔を観察するとともに胎仔体重を比較した。その結果、nSP300、mSP1000 投与群ではコントロール群と比較して胎仔体重に変化は認められなかった(Fig. 1d,e)。一方で、nSP70 投与群では胎仔体重がコントロール群よりも 10%以上減少し、胎仔の発育不全を誘発していることが明らかとなった(Fig. 1d,e)。胎仔発育不全により、胎仔体重が平均体重より大きく減少する疾患は、子宮内胎児発育遅延(IUGR)と呼ばれており、近年増加傾向にある。IUGR は成長の遅延だけではなく、胎児の生命にも関わる疾患であり、IUGR 児のおおよそ 1/3 に分娩前の胎児仮死の兆候がみられ、場合によっては子宮内胎児死亡につながることもある。さらに IUGR は、ヒトにおいても出生後のアレルギー性疾患や生活習慣病のリスクファクターとなることが明らかとなっており、克服すべき重要疾患の一つである。前述した通り、本研究結果はあくまでも過剰量を静脈内投与した場合のハザード評価に過ぎない。従って今後は、経皮・経口投与など実際の曝露経路における検討や、曝露実態を考慮した投与量での評価など、より詳細な検討を進める必要があると考えられる。

次に、ハザード発現における閾値の設定を目的に、nSP70 を妊娠マウスに対して、妊娠 16、17 日目に 2 日間連続で 0.8、0.4、0.2 mg/mouse で投与し、子宮重量、吸収胎仔数、胎仔重量を評価した。その結果、0.4、0.2 mg/mouse 投与群においては、0.8 mg/mouse 投与群で認められた子宮重量・胎仔重量の減少および吸収胎仔数の増加が全く観察されなかった。以上の結果から、今後より詳細な検討が必須であるものの、nSP70 の流産・胎仔発育不全誘発などハザード発現には閾値が存在することが判明した。

E. 結論

本研究では、化粧品・食品などに含有されているナノマテリアルの安全性確保・リスク管理に資する情報の集積を目的として、特に流産・胎仔発育不全への影響を追求した。その結果、過剰量を静脈内投与するハザード評価であるものの、体内に侵入した非晶質ナノシリカは、流産・胎仔発育不全などのハ

ザードを発現し得ることなど、重要な知見を得た。今後は、ナノマテリアルの動態解析やヒトにおける疫学調査など曝露実態の解明によるリスク評価を推進することで、安全かつ有用なナノマテリアルの創製に資する基盤情報を収集する必要があることが示唆された。本研究成果は、ナノマテリアルの安全性評価、特に生殖発生毒性評価の重要性を世界に先駆け明らかとし、我が国の当該分野をリードする研究に発展している。また近未来的に環境省のエコチルプロジェクトとの連携を視野に入れている。

我が国でもナノマテリアルの安全性評価研究が今、まさにスタートしたところであるが、知財技術立国を目指す我が国としては、ナノマテリアルの開発・実用化を闇雲に規制するのではなく、ナノテクノロジーの恩恵を社会が最大限に享受できるよう、ナノ産業の育成や発展を強力に支援しつつ、一方で責任ある先進国、そして健康立国として、ナノマテリアルの安全性を高度に保障し、ヒトの健康環境を確保していかなければならない。従って、本研究成果を基盤として、ナノマテリアルの毒性研究(NanoTox 研究)ではなく、安全・安心かつ有用なナノマテリアルの開発と実用化支援の観点から、ナノマテリアルの安全科学研究(Nano Safety Science)を推進することが重要と考えている。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) 吉川友章, 吉岡靖雄, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの経皮吸収性/生体内動態と安全性との関連追求, ナノ材料のリスク評価と安全性対策, フロンティア出版, 44-53, 2010.
- 2) Morishige T., Yoshioka Y., Inakura H., Tanabe A., Yao X., Tsunoda S., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S. Cytotoxicity of amorphous silica particles against macrophage-like THP-1 cells depends on particle-size and surface properties. *Pharmazie*. 65(8):596-9, 2010.
- 3) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Arimori A., Isobe M., Tochigi S., Kondoh S., Hirai T., Akase T., Yamashita T., Yamashita K., Yoshida T., Nagano K., Abe Y., Yoshioka Y., Kamada H., Imazawa T., Itoh N.,

Tsunoda S., Tsutsumi Y. Size-dependent cytotoxic effects of amorphous silica nanoparticles on Langerhans cells. *Pharmazie*. 65(3):199-201, 2010.

- 4) Higashisaka K., Yoshioka Y., Yamashita K., Morishita Y., Fujimura M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Yoshikawa T., Itoh N., Tsutsumi Y. Acute phase proteins as biomarkers for predicting the exposure and toxicity of nanomaterials. *Biomaterials*. 32(1):3-9, 2010.
- 5) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y.: Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., *Nature Nanotechnology*, in press.

2. 学会発表

- 1) 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保を目指して. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会, 岩手, 2009 年 7 月.
- 2) 堤 康央: ナノマテリアルの安全確保に向けた NanoTox 研究の最前線(Overview). 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- 3) 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 河合裕一, 眞弓忠範, 吉川友章, 鎌田春彦, 伊藤徳夫, 角田慎一, 堤 康央: 安全確保に向けた非晶質ナノシリカの生殖発生毒性に関する検討. 日本薬学会第 130 年会, 岡山, 2010 年 3 月.
- 4) 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保を目指して. 第 80 回日本衛生学会学術総会, 仙台, 2010 年 5 月.
- 5) 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発支援に向けた NanoTox 研究への取組み. 平成 22 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム, 東京, 2010 年 5 月.
- 6) 堤 康央: ナノテクノロジーを活用した医療・化粧品・食品の安全性と今後の課題. 第 42 回大阪大学中之島講座「いまを読み解く-医療・都市-」『先端医療とその課題』, 大阪,

2010年10月。

- 7) 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 森下裕貴, 吉田徳幸, 藤村真穂, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 今澤孝喜, 味村和哉, 柳原 格, 齋藤 滋, 河合裕一, 眞弓忠範, 伊藤徳夫, 吉川友章, 角田慎一, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて: 非晶質ナノシリカの生殖発生への影響に関する基礎評価。第37回日本トキシコロジー学会学術年会, 沖縄, 2010年6月。
- 8) 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: ナノマテリアルの安全性確保に向けて~非晶質ナノシリカの次世代への影響評価~。第9回次世代を担う若手ファーマ・フォーラム2010, 京都, 2010年10月。
- 9) 山下浩平, 吉岡靖雄, 伊藤徳夫, 堤 康央: 安全性確保を目指したナノマテリアルの生殖発生影響評価。日本薬学会 第131年会, 静岡, 2011年3月。
- 4) Nakazato Y., Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Differential acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas: The role of surface physicochemical properties. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 5) Yoshioka Y., Morishige T., Tanabe A., Tsutsumi Y., Mukai Y., Okada N., Nakagawa S.: Nanosilicas with different sizes and surface charges induce different profiles of cytokine production on macrophages. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 6) Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Fujimura M., Morishita Y., Huiyan P., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Tsutsumi Y.: Biodistribution and reproductive toxicity of nanosilica for ensuring the safety of nanomaterials. Society of Toxicology (SOT) 2011, Washington DC (USA), 6-10 March, 2010.

国際学会発表

- 1) Yoshikawa T., Nabeshi H., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: In vitro nanotoxicological study of silica nanoparticles using dermal cell lines. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 2) Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuyama K., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Evaluation of size-dependent acute toxicity and toxicokinetics of amorphous nanosilicas. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany), 13-16 September, 2009.
- 3) Matsuyama K., Yoshikawa T., Nabeshi H., Nakazato Y., Imazawa T., Yoshioka Y., Abe Y., Kawai Y., Mayumi T., Itoh N., Tsunoda S., Tsutsumi Y.: Evaluation of size-dependent intracellular distribution and genotoxicity of amorphous nanosilicas in human keratinocytes. The 46th Congress of the European Societies of Toxicology (EuroTox), Dresden (Germany),

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当無し。
2. 実用新案登録
該当無し。
3. その他
該当無し。