

D. 考 察

1. nSP のサイズ依存的な影響 (体重についての検討)

nSP70 最終投与後にマウスの体重を測定したところ、RD、および HFD マウス共に nSP70 濃度依存的に体重が減少した。さらに、nSP70 40 mg/kg 投与群において著明な体重減少が認められた (Fig. 1A)。一方、粒子径 300 nm のナノシリカ (nSP300) を投与した際には有意な体重減少は認められなかった (Fig. 1B)。よって、HFD マウスにおいて、nSP はサイズの減少により顕著な体重減少を示すことが確認された。

2. nSP のサイズ依存的な影響 (脂肪重量についての検討)

nSP70 最終投与後にマウスの腎臓、および睾丸周囲の脂肪組織の重量を測定したところ、nSP70 40 mg/kg の条件で、RD マウスにおいて睾丸周囲の脂肪重量の有意な減少が認められた。さらに HFD マウスでは腎臓と睾丸の双方で有意な脂肪重量の減少が認められ、HFD マウスで nSP70 の影響が色濃く現れた。また、nSP300 においてはいずれもコントロールと比して変化は認められなかった (Fig. 2A, B)。よって、HFD マウスにおいて、nSP はサイズの減少により顕著な脂肪重量の減少を示すことが確認された。

3. snPt 投与時における肝障害マーカーの経時的変化についての検討 (intra lab)

snPt の肝臓における障害性マーカーの経時的な変化を確認するために、snPt1 20 mg/kg を投与後 0、3、6、12、24、48 時間後の血清を回収し、肝障害性マーカーとして ALT、および AST を測定した。

その結果、ALT、および AST は 12 時間後から 24 時間後に有意な上昇を示し、最高値を示すことが確認された (Fig. 3A, B)。

4. snPt 投与時における腎障害マーカーの経時的変化についての検討 (intra lab)

snPt の腎臓における障害性マーカーの経時的な変化を確認するために、snPt1 20 mg/kg を投

与後 0、3、6、12、24、48 時間後の血清を回収し、腎機能性マーカーとして BUN を測定した。

その結果、BUN は 12 時間後から 24 時間後に有意な上昇を示し、最高値を示すことが確認された (Fig. 4)。

5. snPt1 の投与量依存的な肝臓への障害 (intra lab)

snPt の投与量依存的な肝臓における障害性を確認するために、snPt1 を 0、5、10、15、20 mg/kg を投与後 24 時間後の血清を回収し ALT、および AST を測定した。

その結果、ALT、および AST は 15、および 20 mg/kg 群において有意な上昇を示しめた (Fig. 5A, B)。よって、snPt は投与量依存的に肝障害を示すことが確認された。

6. snPt1 の投与量依存的な腎臓への障害 (intra lab)

snPt の投与量依存的な腎臓における障害性を確認するために、snPt1 を 0、5、10、15、20 mg/kg を投与後 24 時間後の血清を回収し BUN を測定した。

その結果、BUN は 15、および 20 mg/kg 群において有意な上昇を示した (Fig. 6)。よって、snPt は投与量依存的に腎障害を示すことが確認された。

7. snPt のサイズ依存的な肝臓への障害についての検討 (intra lab)

snPt のサイズ依存的な障害性の差異を確認するために、snPt1、および snPt8 による肝臓への障害性を比較した。

その結果、snPt1 が 15、20 mg/kg においてコントロールに比して有意な障害性を示す一方、snPt8 ではいずれの条件においても ALT・AST 活性の上昇は認められなかった (Fig. 7A, B)。よって、snPt はサイズの減少により肝臓における障害性が増強されることが確認された。

8. snPt のサイズ依存的な腎臓への障害についての検討 (intra lab)

snPt のサイズ依存的な障害性の差異を確認するために、snPt1、および snPt8 による腎臓への障害性を比較した。

その結果、snPt1 が 15, 20 mg/kg においてコントロールに比して有意な障害性を示す一方、snPt8 ではいずれの条件においても BUN 値の上昇は認められなかった (**Fig. 8**)。よって、snPt はサイズの減少により腎臓における障害性が増強されることが確認された。

9. snPt1 による細胞への直接的な影響

snPt1 の細胞への直接的な影響を確認するために検討を行った。

まず、肝臓への影響を確認するために、マウスから初代培養肝細胞を採取し、snPt1 を 0、0.1、1、10、50、100 µg/ml を作用させ WST assay を行った。

その結果、snPt1 は 10-100 µg/ml で有意な細胞障害性を示した (**Fig. 9A**)。

また、腎臓への影響を確認するために、腎細胞株である MDCK 細胞にたいして snPt1 を 0、10、20、40、60 µg/ml で作用させ WST assay を行った。

その結果、snPt1 は 40、60 µg/ml で有意な細胞障害性を示した (**Fig. 9B**)。

以上より、snPt1 による肝臓、腎臓への障害性は、細胞への直接的な影響が関与していることが確認された。

10. snPt1 による炎症反応の誘導

細胞への直接的な影響以外にも、炎症反応の誘導による障害性発現の可能性も考えられることから、以下の検討を行った。

snPt1、および snPt8 を 0、5、10、15、20 mg/kg で尾静脈内投与して炎症性サイトカインである IL-6 の血中濃度を測定した。

その結果、snPt8 では IL-6 の誘導が認められなかったのに対し、snPt1 の 15、20 mg/kg においては有意な IL-6 の誘導が確認された (**Fig. 10A**)。

また、snPt1、および snPt8 を 0、10 mg/kg で週 2 回、4 週間腹腔内投与して腎臓を回収し、

HE 染色を行った。

その結果、snPt1 投与により炎症性細胞の浸潤が観察された (**Fig. 10B**)。

以上より、snPt1 による障害には、細胞への直接的な影響だけでなく、炎症反応の誘導が関与している可能性が考えられる。

11. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による肝臓への影響

HFD マウスにおける snPt の肝臓への影響を確認するため、snPt1、および snPt8 を 10 mg/kg RD、および HFD マウスに腹腔内投与して 24 時間後の血清を回収し、ALT、および AST 活性を測定した。

その結果、snPt1 投与により HFD マウスにおいて、ALT、および AST 活性が RD マウスと比較して有意に高値を示した (**Fig. 11A**)。

また、採取した肝臓の HE 染色を行ったところ、肝臓において RD マウスでは認められなかった組織病変である壊死細胞が、HFD マウスにおいてのみ観察された (**Fig. 11B**)。

以上より、HFD マウスにおいて、snPt1 による肝臓障害が増強されることが確認された。

12. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による腎臓への影響

HFD マウスにおける snPt の腎臓への影響を確認するため、snPt1、および snPt8 を 10 mg/kg RD、および HFD マウスに腹腔内投与して 24 時間後の血清を回収し、BUN 値を測定した。

その結果、snPt1 投与により HFD マウスと RD マウスにおいて、BUN 値に差は認められなかった (**Fig. 12A**)。

また、採取した腎臓の HE 染色を行ったところ、腎臓において尿細管円柱、尿細管上皮細胞壊死といった組織病変が観察された。しかし、RD マウスと HFD マウスで差は認められなかった (**Fig. 12B**)。

以上より、HFD マウスにおいて、snPt1 投与による腎臓障害の増強は認められなかった。

13. 高脂肪食摂取マウスへの snPt 投与による致

死的毒性

RD、および HFD マウスに対し、snPt1、および snPt8 を 0、7.5、10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に週 2 回、4 週間投与して、生存率を確認した。

その結果、HFD マウスの snPt1 7.5、10 mg/kg 投与群において致命的な毒性が認められた。さらに、10 mg/kg では 7 日以内に全てのマウスが死亡した (**Fig. 13A**)。一方、RD マウス、および snPt8 投与群では、全ての条件においてマウスの死亡例は認められなかった。

また、RD、および HFD マウスに対し、snPt1、および snPt8 を 10 mg/kg b.W.の用量で腹腔内に投与した。投与 24 時間後に心採血により血液サンプルを採取し、血清中の IL-6 値の測定を行った。

その結果、snPt1 を投与した HFD マウスにおいて IL-6 の値が顕著に高い値を示した (**Fig. 13B**)。

以上より、snPt1 投与による HFD マウスにおける致命的な毒性には、強力な炎症反応が関与している可能性が考えられる。

E. 結論

1. ナノシリカ投与により引き起こされた高脂肪食摂取マウスでの体重減少、および脂肪組織重量の減少は、nSP のサイズの減少と共に増強されることが確認された。また、上記の現象は RD マウスと比較して、HFD マウスでより顕著に現れることが確認された。
2. サブナノ白金は、肝臓、および腎臓において障害性を示すことが確認された。また、障害の経時的変化、投与量依存性、サイズ依存性、炎症反応の誘導、以上の知見について intra-lab においてバリデーションが完了した。
3. サブナノ白金による障害は、細胞への直接的な障害性によるものであることが確認された。また、炎症反応の誘導による障害性発現の可能性が示された。

4. 高脂肪食摂取により、サブナノ白金による肝臓への障害性が増強されることが確認された。また、強力な炎症反応、および致命的な毒性が生じることが確認された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamagishi Y., Watari A., Hayata Y., Li X, Kondoh M., Tsutsumi Y., Yagi K.: Hepatotoxicity of sub-nanosized platinum particles in mice., Pharmazie, 68: 178-182, 2013.

【総説・その他】

該当なし

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

該当なし

【国内学会発表：合計 2 件】

1. 山岸 喜彰, 渡利 彰浩, 李 相儒, 吉岡 靖雄, 近藤 昌夫, 堤 康央, 八木 清仁 : ナノ・サブナノ白金のマウス肝臓における毒性評価., 日本薬学会第 133 年会., 横浜, 2013 年 3 月.
2. 山岸 喜彰, 渡利 彰浩, 李 相儒, 吉岡 靖雄, 近藤 昌夫, 堤 康央, 八木 清仁 : ナノ・サブナノ白金のマウス腎臓における毒性評価., 日本薬学会第 133 年会., 横浜, 2013 年 3 月.

【国際学会発表：合計 0 件】

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当なし

② 実用新案登録

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

近藤昌夫、渡利彰浩、山岸喜彰、
李 相儒

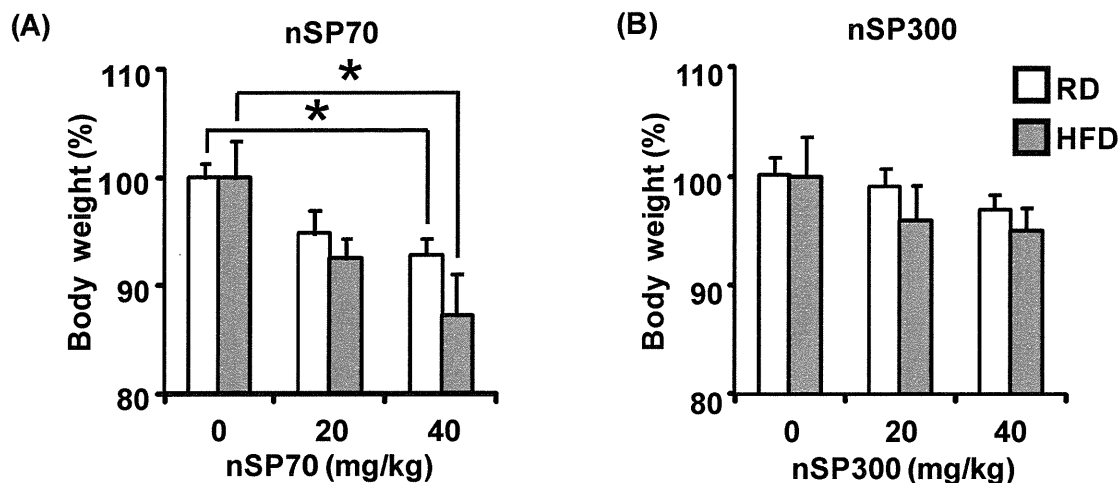


Figure 1. 8週齢の雄性のC57BL/6マウスに常食RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食HFD (45% of calories as fat) を8週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスにnSP70、またはnSp300を0、20、40 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に週2回、4週間 (計8回) 投与した。最終投与後に体重を測定した。(A) nSP70、(B) nSP300 * $P < 0.05$

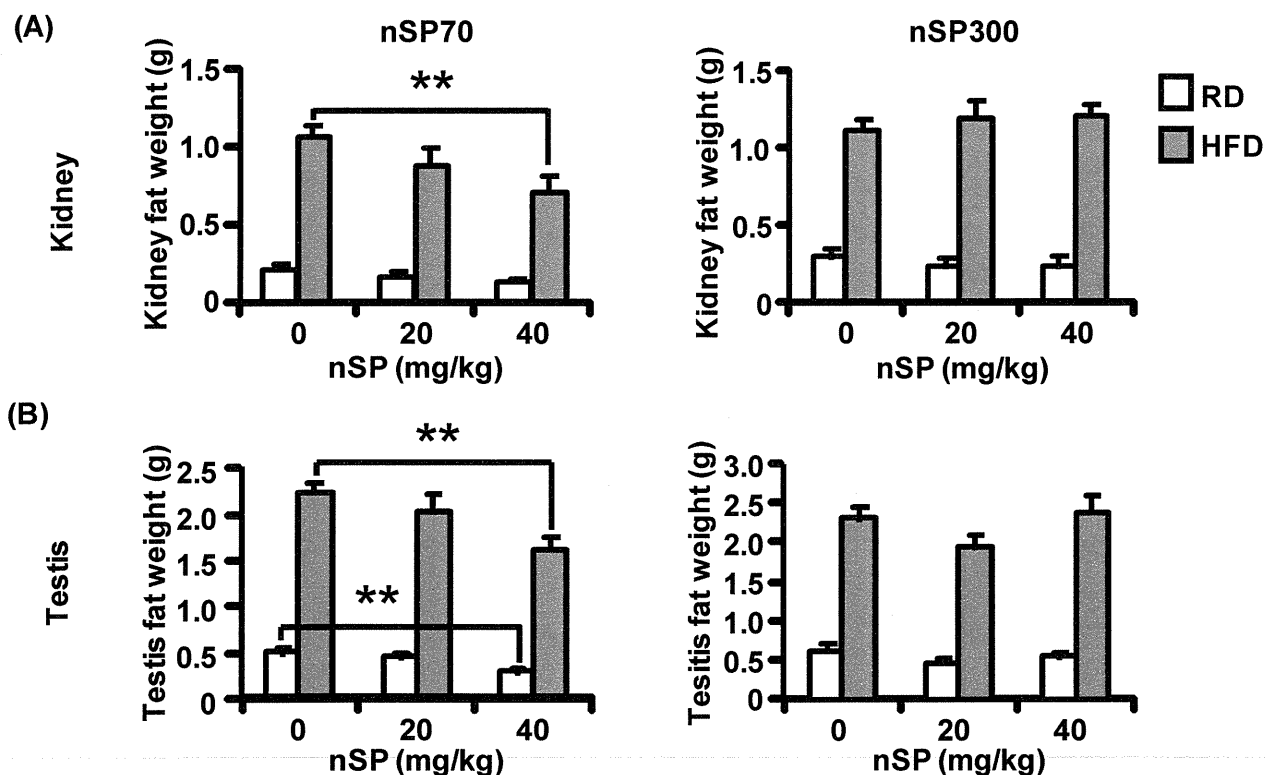


Figure 2. 8週齢の雄性のC57BL/6マウスに常食RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食HFD (45% of calories as fat) を8週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスにnSP70、またはnSP300を0、20、40 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に週2回、4週間 (計8回) 投与した。(A) 最終投与3日後に辜丸周囲脂肪組織を回収し、重量を測定した。(B) 最終投与3日後に腎臓周囲脂肪組織を回収し、重量を測定した。** $p < 0.01$

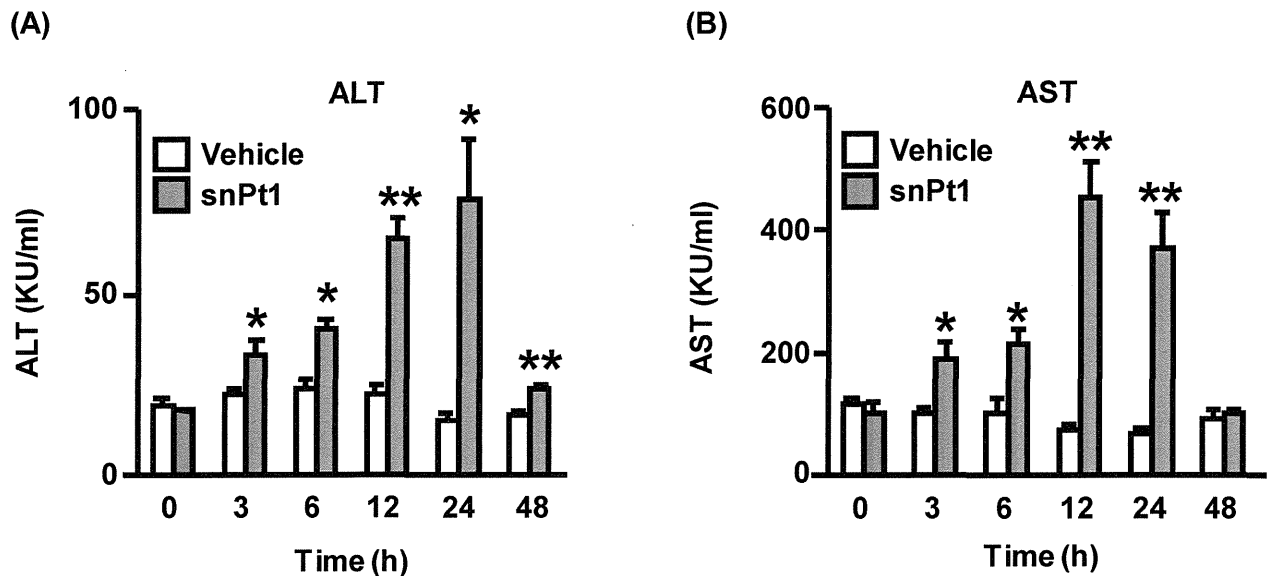


Figure 3.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1 20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与3、6、12、24、48時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、snPtの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Vehicle

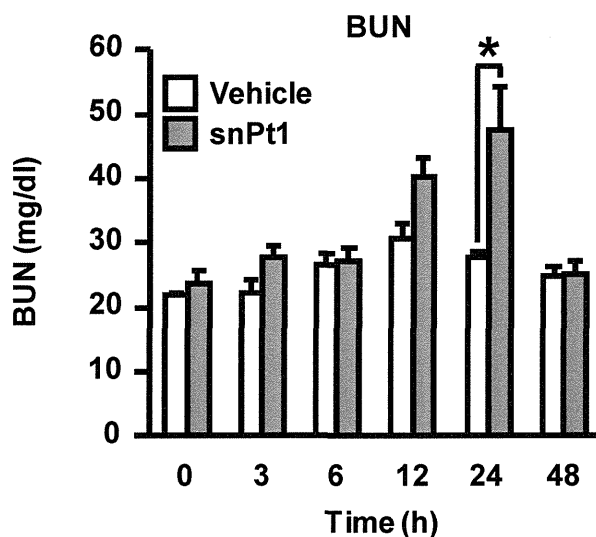
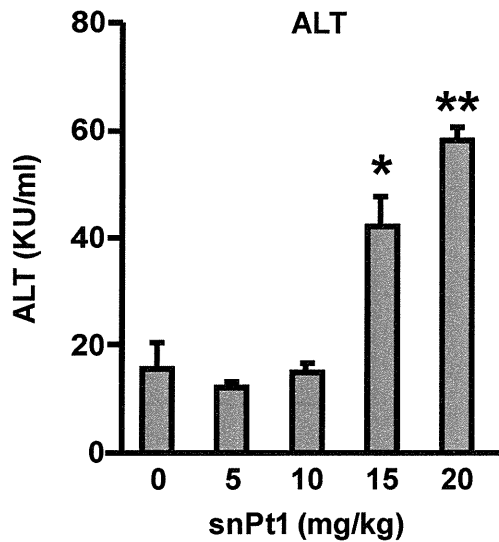


Figure 4.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1 20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与3、6、12、24、48時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、snPtの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中のBUN値の測定を行った。* $p < 0.05$ vs Vehicle

(A)



(B)

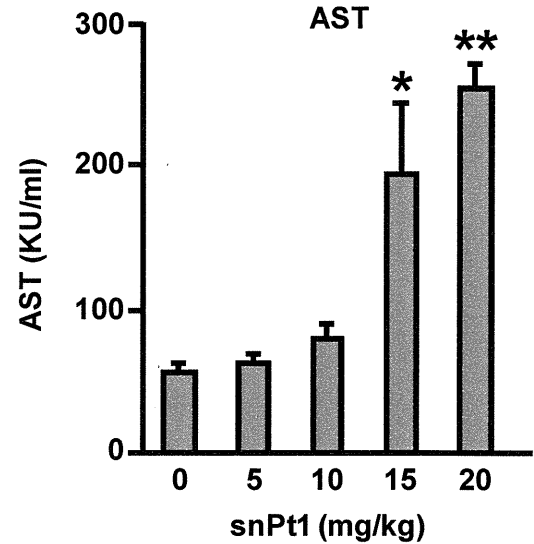


Figure 5.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Vehicle

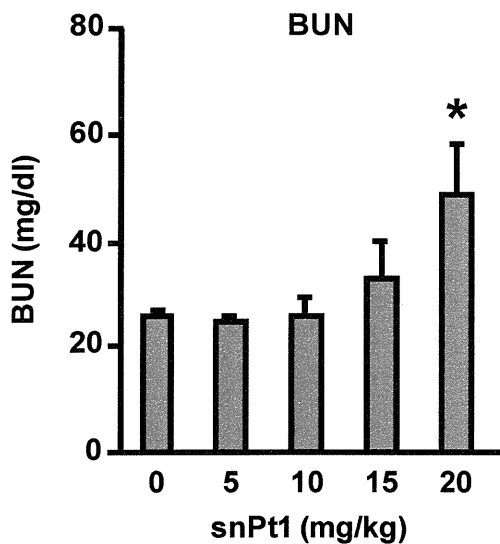


Figure 6.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの腎臓への影響を評価するため、腎傷害の指標として血清中のBUN値の測定を行った。* $p < 0.05$ vs Vehicle

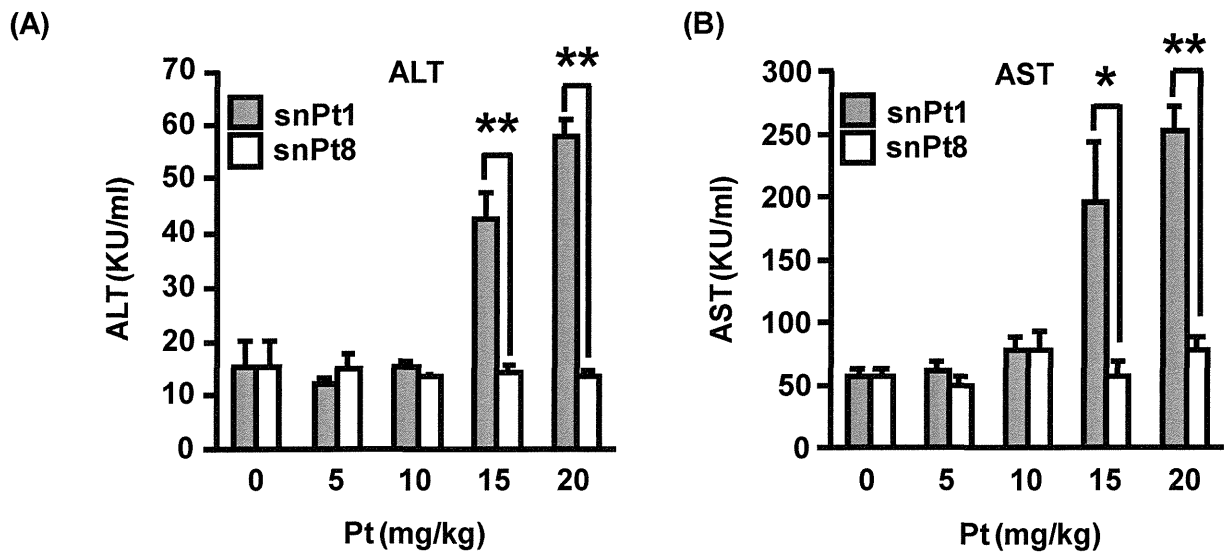


Figure 7.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1 及び、nPt8を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm, 10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ snPt1 vs snPt8

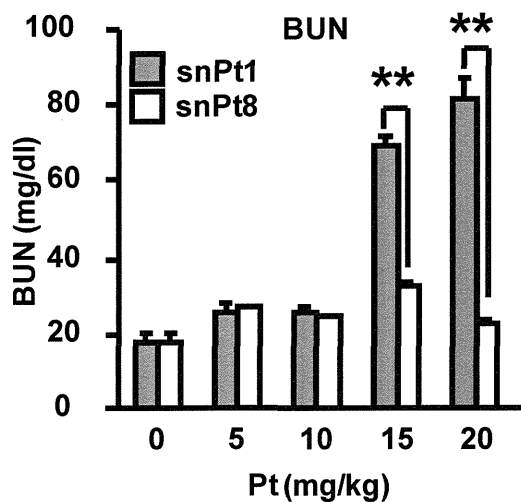
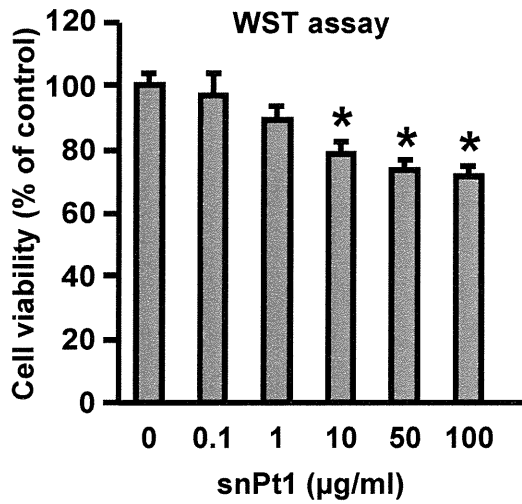


Figure 8.

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1 及び、snPt8を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm, 10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの腎臓への影響を評価するため、腎傷害の指標として血清中のBUN値の測定を行った。** $p < 0.01$ snPt1 vs snPt8

(A)



(B)

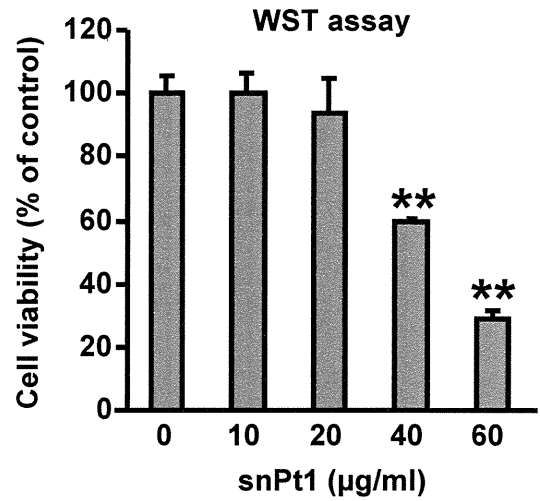


Figure 9.

(A) 8~9週齢の雄性BALB/cマウスから初代培養肝細胞を 1×10^4 cells/wellで96 well plateに播種後、24時間培養した。その後、snPt1を0、0.1、1、10、50、100 µg/mlを作用させて24時間後にWST assayを行った。

(B) 腎細胞株であるMDCK細胞を 2×10^4 cells/wellで96 well plateに播種して24時間後にsnPt1を0、10、20、40、60 µg/mlを作用させて24時間後にWST assayを行った。 * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ vs Vehicle

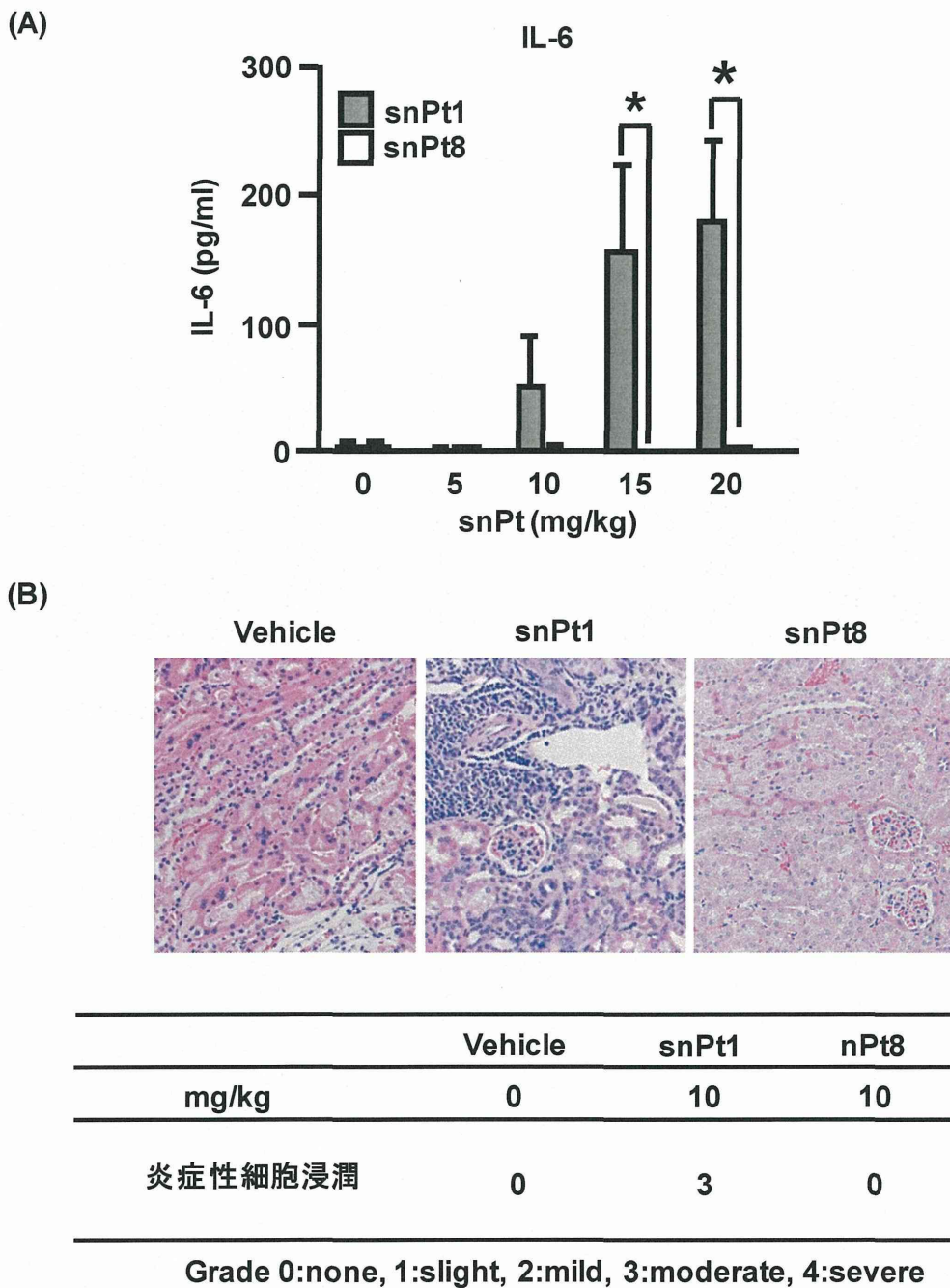
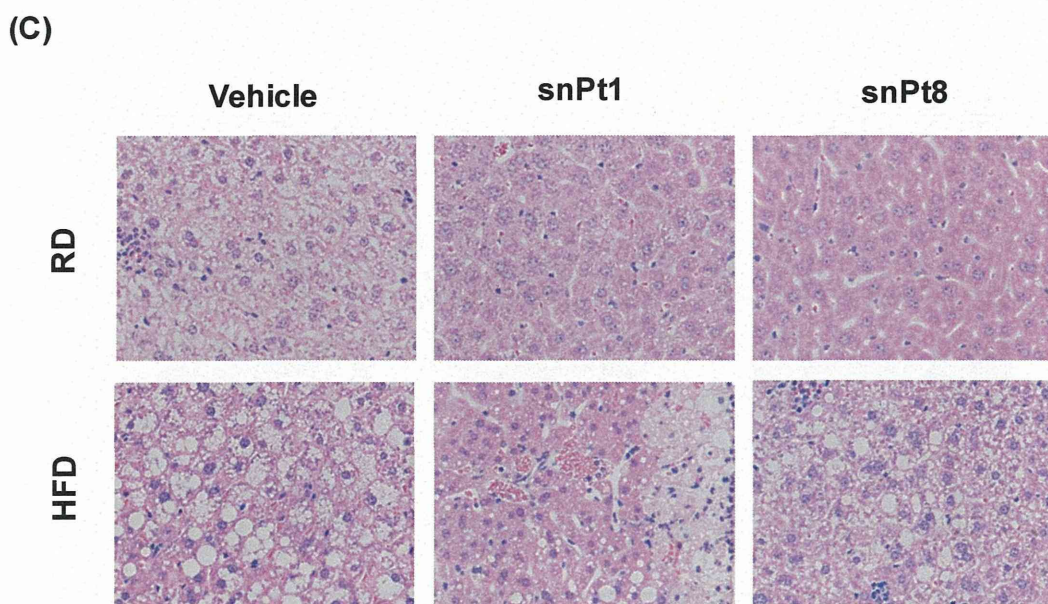
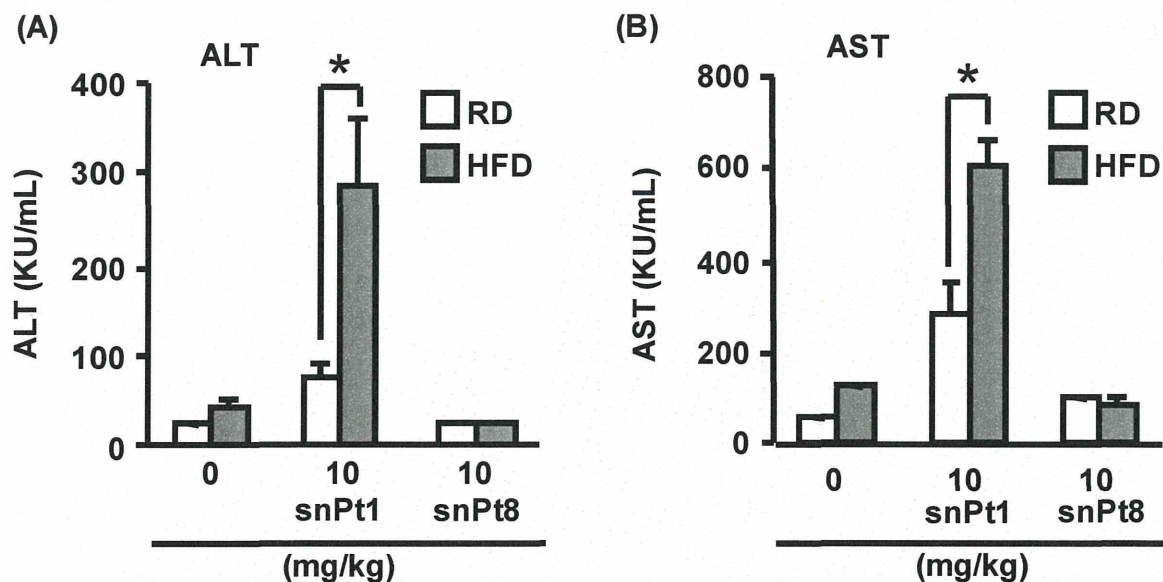


Figure 10.

(A) 8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPt1 及び、snPt8を5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptによる炎症反応誘導の指標として血清中の炎症性サイトカインであるIL-6値の測定を行った。* $p < 0.05$ snPt1 vs snPt8

(B) 8~9週齢の雄性C57BL/6マウスに、snPt1 及び、snPt8を10 mg/kg b.w.の用量で週2回、4週間、腹腔内した。投与72時間後に腎臓を採取し、HE染色を行った。

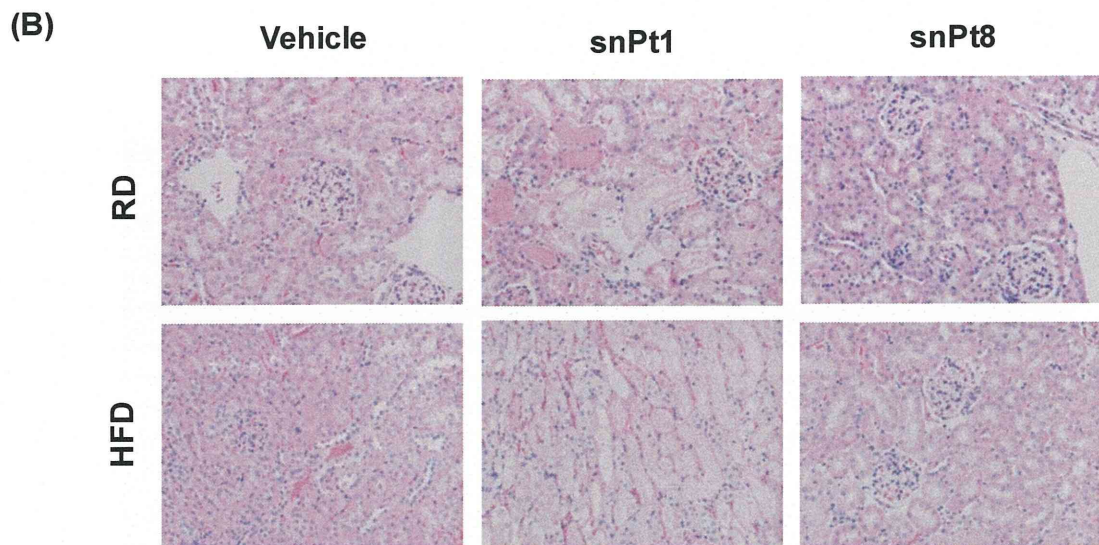
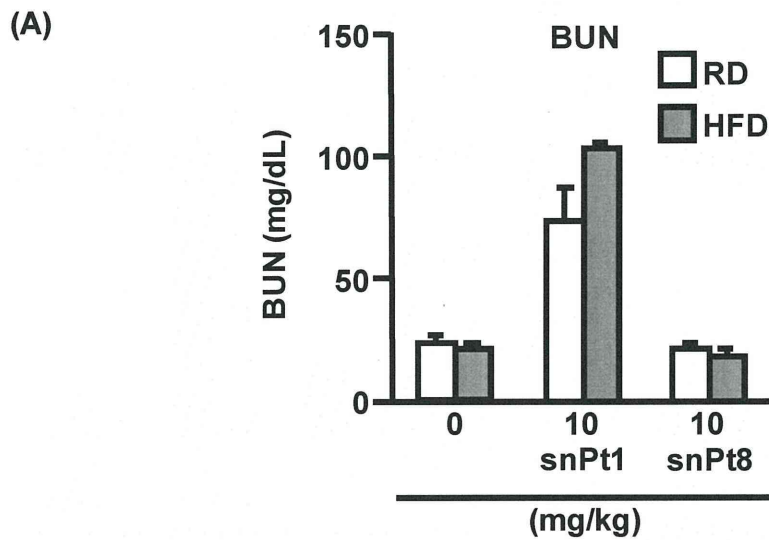


	Vehicle		snPt1		snPt8	
mg/kg	0		10		10	
Diet	RD	HFD	RD	HFD	RD	HFD
壊死細胞	0	0	0	3	0	0

Grade 0:none, 1:slight, 2:mild, 3:moderate, 4:severe

Figure 11.

8週齢の雄性のC57BL/6マウスに常食RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食HFD (45% of calories as fat) を8週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスにsnPt1 及び、snPt8を10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃, 6000 rpm, 10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの肝臓への影響を評価するため、肝障害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST活性の測定を行った。* $p < 0.05$ RD vs HFD また、投与24時間後に肝臓を採取し、HE染色を行った (C)。



	Vehicle		snPt1		snPt8	
mg/kg	0		10		10	
Diet	RD	HFD	RD	HFD	RD	HFD
尿細管円柱	0	0	4	2	0	0
尿細管上皮細胞壊死	0	0	3	3	0	0

Grade 0:none, 1:slight, 2:mild, 3:moderate, 4:severe

Figure 12.

8週齢の雄性のC57BL/6マウスに常食RD (10% of calories as fat) 及び高脂肪食HFD (45% of calories as fat) を8週間摂取させ、肥満モデルマウスを作成した。このマウスにsnPt1 及び、snPt8を10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃, 6000 rpm, 10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptの腎臓への影響を評価するため、腎障害の指標として血清中の (A) BUN値の測定を行った。また、投与24時間後に肝臓を採取し、HE染色を行った (B)。

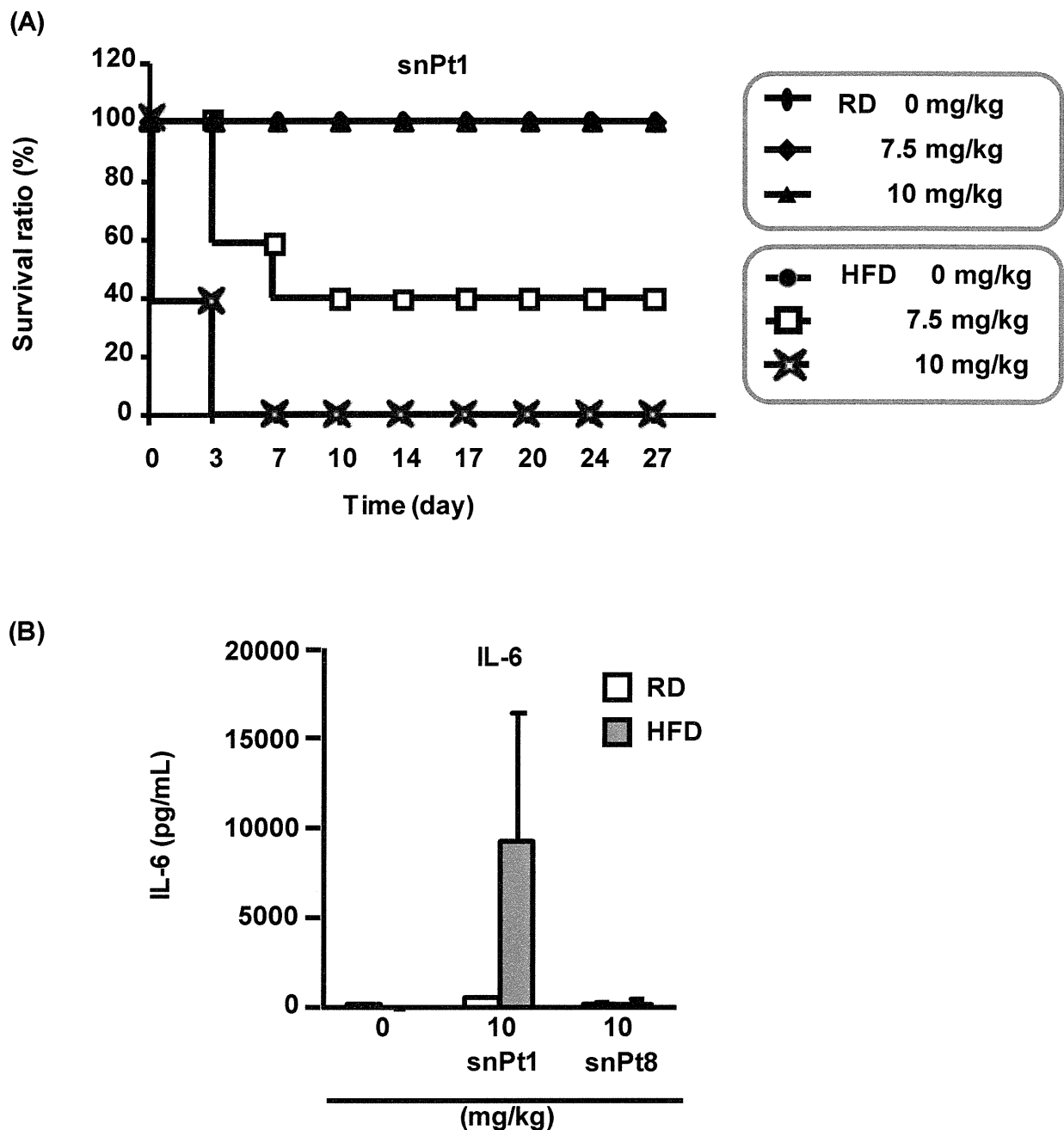


Figure 13.

(A) RD、およびHFDマウスに対し、snPt1、およびsnPt8を0、7.5、10 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に週2回、4週間投与して、生存率を確認した。

(B) RD、およびHFDマウスに対し、snPt1、およびsnPt8を10 mg/kg b.W.の用量で腹腔内に投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。その後、Ptによる炎症反応誘導の指標として血清中の炎症性サイトカインであるIL-6値の測定を行った。

ナノマテリアルの胎盤動態および 胎盤/胎仔毒性、胎仔/母体血液・免疫・幹毒性評価

研究分担者 中島 彰俊 齋藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学

研究要旨

ナノマテリアルは食品および化粧品にも多く用いられ、その使用量は急激に伸びている。ナノマテリアルの曝露は日常生活に深く根付いており、成人への影響を検討するのはもちろんのこと、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要があるが、それらの関係性を示す報告はないのが実情である。一方で、胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、胎児への直接的評価に比し胎盤への影響は検討しやすい。そこで今回、正常妊娠に重要な役割を持つ絨毛外栄養膜細胞(EVT)へのナノマテリアルの影響を評価し、妊娠への影響を検討した。これまで、snAg および snPt が EVT 細胞に有意な増殖抑制を示すこと、snPt が EVT 細胞にオートファジーを誘導することを報告してきた。そこで、今回 snPt による細胞傷害性を細胞増殖率で検討した。EVT セルラインである HchEpC1b 細胞において、オートファジー誘導に必須の Atg4B に対する mutant タンパクを恒常的に発現させオートファジー欠損細胞を作製した。オートファジー欠損細胞では Wild type の細胞に比し、snPt による細胞増殖抑制が有意に認められ、snPt が細胞内に有意に蓄積していた。さらに、オートファジー欠損細胞では、snPt は時間経過と共に有意に蓄積すると共に、細胞外への排出が遅延することも示唆された。同様に、Wild type 細胞において、3-Methyladenine を用いてオートファジーを抑制したところ、snPt による細胞増殖抑制が増強した。これらの結果は、オートファジーは snPt のもつ細胞傷害性に対し、保護的に作用することを示すと共に、オートファジーの破綻に伴い、snPt 胎盤形成不全への増悪因子となり得ることを示している。

A. 研究目的

ナノマテリアルは食品および化粧品にも多く用いられ、その使用量は急激に伸びている。そして、この研究班を中心にその安全性の評価を行っている。ナノマテリアルの曝露は日常生活に深く根付いており、成人への影響を検討するのはもちろんのこと、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要がある。しかし、それらの関係性を示す報告はないのが実情である。

妊娠期間は3半期と言われ、3つの期間に大別される。正常妊娠は絨毛外栄養膜細胞(EVT)が子宮筋層に浸潤することによって維持される。しかし、妊娠初期から中期にかけての EVT 浸潤

不全を伴った胎盤は、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延など、胎児および母体に重篤な影響を与える合併症に関連する。一方、胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、ナノマテリアルの胎盤への影響は間接的に胎児への影響の検討にも繋がる。

我々はこれまで、EVT 浸潤不全の原因として、オートファジー（細胞内恒常性維持機構）不全が関与することを報告してきた。さらに、この研究班での検討結果から、snPt は EVT セルラインにオートファジーを誘導するが、snAg はオートファジーを誘導しないことを報告してきた。今回我々は、妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を果たす EVT におけるナノマテリアルとオートファジー

の関与を検討したので報告する。

B. 研究方法

1. セルラインおよびマテリアル

絨毛外栄養膜細胞を SV40 にて Transformation したセルラインである HTR8/SV40neo 細胞およびヒトパピローマウイルス E6/E7 および hTERT を導入して不死化した HChEpC1b 細胞を実験に供した。また、HTR8/SV40neo 細胞にオートファジー誘導の必須分子 Atg4B に対し、機能阻害作用を有する mStrawberry-Atg4B^{C74A} を恒常的に発現した HTR8-Atg4BC74A 細胞、およびその Control ベクターのみを導入した HTR8-mSt 細胞を作成した。また、同様に HchEpC1b-Atg4BC74A, HchEpC1b-mSt も作成した。ナノマテリアルは snPt を用いて、培養細胞の培養液中に加えることで、実験に使用した。オートファジー抑制剤、3-Methyladenine(Sigma-Aldrich) は 0-10mM にて使用した。

2. 細胞増殖の評価

WST-1 アッセイにて細胞増殖能を評価した。

3. 細胞内 snPt 含有量の評価

細胞内 snPt 量は ICP-MS によって測定した。

C. 研究結果

1. snPt はオートファジー欠損 HchEpC1b 細胞内に蓄積し、強い細胞傷害性を示す

snPt を培養液に HchEpC1b:0-200 µg/ml HTR8/SVneo:0-32µg/ml で加え、24 時間培養後の細胞数を WST-1 アッセイにて評価した。オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞において、25 µg/ml で 50%の増殖抑制を示したが、コントロール細胞（オートファジー正常）では 100µg/ml において 59%の増殖抑制を認め、オートファジー欠損が snPt の細胞毒性を増強させた。さらに、snPt 0-50µg/ml を含有した培養液で 24 時間培養後の snPt 細胞内濃度を測定したところ、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞ではコントロール細胞に比し、濃度依存性に細胞内 snPt 蓄積量

の増加を認めた。一方、別の EVT セルラインである HTR8/SVneo 細胞では、オートファジー欠損による細胞増殖への影響は見られなかった。しかし、オートファジー欠損細胞内の snPt 蓄積も認められなかった。この 2 種類の EVT セルラインによる snPt の影響の違いとして、セルライン化の方法が違う。HTR8/SVneo 細胞は SV40 による癌化である一方、HchEpC1b 細胞はヒトパピローマウイルスの E6/E7 および hTERT 導入による不死化である。また、HchEpC1b 細胞は染色体数も正常であることから、我々は HchEpC1b がより Primary 細胞に近い形質を維持していると考え、HchEpC1b 細胞における snPt 取り込み・排出にオートファジーが如何に関与するかをさらに検討した。

2. snPt はオートファジー欠損 HchEpC1b 細胞内に時間依存性に蓄積し、その後の排出も遅延する

snPt を 25µg/ml で含む培養液で 12,24,48 時間培養後、細胞内 snPt 濃度を評価した。コントロール細胞では時間経過において細胞内 snPt 量は増加しなかったが、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では有意な蓄積を示した。一方、25µg/ml で snPt を含む培養液で 24 時間培養、細胞を洗浄後 12,24,48 時間後の細胞内遺残 snPt 濃度を評価した。コントロール細胞では細胞内 snPt 量は、12 時間の snPt 遺残量に比し、48 時間後で 19.7%であった。一方、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では、48 時間後で 40.2%の snPt が細胞内に遺残していた。つまり、この結果はオートファジー欠損が snPt 取り込みの促進あるいは排出遅延に関わる可能性を示唆していた。

3. HchEpC1b 細胞（オートファジー正常）のオートファジー抑制により、snPt による細胞傷害性が増加する

オートファジーが正常な HchEpC1b 細胞にオートファジー抑制を行うと、オートファジー欠損細胞と同様の snPt 増殖抑制を呈すかを、WST-1

アッセイで検討した。snPt を非含有培養液および 25µg/ml 含有培養液に 3-MA を 0-10mM で加え、24 時間培養後に測定した。snPt 非含有では、3-MA 投与によって、2 種類の細胞の間の細胞増殖率に有意な影響を認めなかった。一方で、snPt 25µg/ml 存在下では、3-MA 0mM ではオートファジー欠損細胞の細胞数は、オートファジー正常細胞数に比し、有意に低下していた。一方、3-MA:2.5-5mM でオートファジーを抑制した場合、オートファジー欠損細胞の細胞数は低下しなかったが、Wild type 細胞の細胞数が低下し、2 種細胞間の細胞数に有意な差を認めなくなった。このことは、snPt の細胞増殖抑制にオートファジーが関与することを強く示唆する結果である。

D. 考察

以上の検討より、snPt は snAg と違い、EVT 細胞内でオートファジーを介して細胞内蓄積および細胞外排出に関わることが示唆された。一方 snAg は snPt より強く急激な細胞毒性を示し、オートファジー以外のメカニズムを介していることが示唆された。snPt 毒性の解明にはオートファジーとの関与を検討することが重要であることが示された。

E. 結論

正常な胎盤形成に必須である EVT 細胞は、オートファジーという細胞内機構を使用することで、snPt の毒性から自身を保護していることを意味していた。さらに、我々はこれまでにオートファジー抑制が妊娠高血圧症候群発症に関与することを報告してきたが、snPt はその増悪因子となり得ることを示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. : Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia., *Autophagy*, 9(3):303-316, 2013.
2. Saito S, Nakashima A.: Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia., *Placenta, Trophoblast Research*, 34(27):S79-S84 2013.

【総説・その他】

なし

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

なし

【国内学会発表：合計 0 件】

なし

【国際学会発表：合計 1 件】

1. Yoshioka Y, Yamashita K., Higashisaka K., Morishita Y, Yanagihara I., Saito S., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Histological analysis of placenta in silica nanoparticle-treated mice for the development of nanomaterials with safety., *PPTOX III, Paris (France)*, 14-16 May, 2012.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

なし

② 実用新案登録

なし

その他

なし

ナノマテリアルの乳幼仔動態解析と子ども（乳幼仔）健康影響（アトピーといった免疫毒性等）に関する研究

研究分担者 柳原 格 大阪府立母子保健総合医療センター研究所 免疫部門

研究要旨

わが国の低出生体重児（出生時体重 2500 g 未満）の産まれる頻度は上昇し、現在では OECD 加盟国の中で最も高く、およそ 10% となっている。低出生体重児は、早産およびその合併症である慢性肺疾患や神経系の障害とも密接に関連し周産期医療の大きな問題となっている。

これまでナノマテリアルの生殖への影響について報告してきた。今年度は、snPt の妊娠マウス胎盤への影響を解析した。その結果、snPt は nSP70 に認められた胎盤構造変化は起こさなかったが、投与量依存的に Spongiotrophoblast 層の疲弊化を起こした。一方、フラレン誘導体には抗炎症反応があることが知られている。そこで培養細胞における抗炎症作用について解析を行った。水酸化フラレンは TLR2、NF- κ B を介した炎症反応を抑制した。

A. 研究目的

1. snPt の生殖毒性評価を行うため、各種濃度で妊娠マウスに投与した後、胎盤病理的な評価を行い安全性基準の策定に役立てる。

2. フラレン誘導体には抗酸化作用、抗炎症作用が報告されている。自然免疫を司る分子の一つ TLR2 を介した炎症反応を抑制するか否かを検討し、早産の原因である炎症反応に対する制御の可能性について解析を行う。

B. 研究方法

1. snPt 投与妊娠マウスへの胎盤病理変化

snPt (5mg/Kg, 10mg/Kg), nPt(10mg/Kg), 対照群として生理食塩水を投与後の胎盤を HE 染色、PAS 染色、iNOS 免疫組織化学染色を行った。Spongiotrophoblast 層、Labyrinth 層は取得画像から面積を算出し比 (S/L 比) を計算した。

2. フラレン誘導体の抗炎症作用評価

培養細胞 (HeLa, 293T) に TLR2 (pFLAG-TLR2) 遺伝子を導入、同時にレポーター遺伝子として pNF- κ B-Luc, pRL-TK プラスミドを導入。その後、TLR2 のリガンドであるリポペプチドを反応させ、さらに各種水酸化フラレン 50 μ M (平均水酸基数 12, 24, 40, 44) を添加し、ルシフェラーゼ活性を指標に NF- κ B の抑制効果を調べた。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. snPt の胎盤機能に対する安全域

nPt, snPt (5mg/kg) 投与群においては、対照コントロール群 (生理食塩水投与群) と S/L 比に有意差は無く、明らかな胎盤病理所見の変化は認めなかった。一方、snPt (10mg/kg) 投与群では S/L 比の有意な低下を認め Spongiotrophoblast 層の異常が確認された。しかしながら、以前解析した

nSP70 投与群で観察された胎盤構造の変化(血管系の障害や、細胞壊死像)は無かった。これらのことから snPt の妊娠マウスにおける胎盤における安全性域は～5 mg/kg と考えられる。

2. フラーレン誘導体の抗炎症作用

各種水酸化フラレンは TLR2 を介した NF- κ B の活性化を抑制した。また、水酸基数 40、44 のフラレン誘導体は、水への溶解性が高く培養液中への添加が容易であった。さらに、FITC を付加した水酸化フラレンは、効率的に細胞内に取り込まれた。一方で、これらの水酸化フラレンがリガンドと TLR2 との結合を阻害したのか、あるいは、細胞内のシグナル分子の活性化を抑制したのかといった点については結論が出ておらず、今後の課題である。

E. 結論

1. 妊娠マウスにおける snPt の胎盤病理解析上の安全性域は～5 mg/kg と考えられた。

2. 水酸化フラレンは TLR2 を介した NF- κ B の活性化を抑制し、効果的な治療法のない早産における胎内炎症を制御する効果が期待される。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. Shigeta N, Ozaki K, Hori K, Ito K, Nakayama M, Nakahira K, Yanagihara I. An *Arthrobacter* spp. Bacteremia Leading to Fetal Death and Maternal Disseminated Intravascular Coagulation. *Fetal Pediatr Pathol*, 31(1) 25-31, 2013.

2. Namba F, Ina S, Kitajima H, Yoshio H, Mimura K, Saito S, Yanagihara I. Annexin A2 in amniotic fluid: Correlation with histological chorioamnionitis, preterm premature rupture of membranes, and subsequent preterm delivery. *The J Obstet Gynaecol Res*, 38(1), 137-44, 2012.

3. Sakamoto S, Wakae K, Anzai Y, Murai K, Tamaki N, Miyazaki M, Miyazaki K, Romanow WJ, Ikawa T, Kitamura D, Yanagihara I, Minato N, Murre C, Agata Y. E2A and CBP/p300 Act in Synergy To Promote Chromatin Accessibility of the Immunoglobulin κ Locus. *J Immunol*, 188(11), 5547-60, 2012.

4. Morita A, Nakahira K, Hasegawa T, Uchida K, Taniguchi Y, Takeda S, Toyoda A, Sakaki Y, Shimada A, Takeda H, Yanagihara I. Establishment and characterization of Roberts Syndrome and SC phocomelia model medaka, (*Oryzias latipes*). *Dev Growth Differ*, 54(5), 588-604, 2012.

② 学会発表

【シンポジウム等・国際会議：合計 2 件】

1. Yanagihara I, Nakahira K. The aggregative property of thermostable direct hemolysin, United States-Japan Cooperative Medical Science Program (日

米医学研究協力会、コレラ部会), Chiba, December 12-14, 2012.

2. Jiro Mitobe, Shouji Yamamoto, Itaru Yanagihara, Makoto Ohonishi, Haruo Watanabe, Multimer Formation of Bacterial Cytoskeletal Protein RodZ, United States-Japan Cooperative Medical Science Program (日米医学研究協力会、コレラ部会), Chiba, December 12-14, 2012.

【国内学会発表：合計9件】

1. 西海史子、柳原格:Ureaplasma parvum の細胞内取り込み機構・細胞内動態解析., 日本マイコプラズマ学会., 盛岡, 2012年5月
2. 柳原格、中平久美子:腸炎ビブリオの耐熱性溶血毒(TDH)の膜障害機構の解明., 近畿腸管微生物研究会., 吹田, 2012年6月
3. 木下大介、玉置祥子、斉藤広幸、川村彬子、酒井絵美子、井石倫弘、甲斐明彦、前川周、隅清彰、中山雅弘、柳原格:出生直後の新生児胃液中顆粒球エラスターゼ、サイトカインは組織学的絨毛膜羊膜炎を反映する., 周産期新生児学会., 大宮, 2012年7月
4. 名倉由起子、内田薫、柳原格:早産における臨床分離マイコプラズマ科の血清型診断のまとめ., 周産期新生児学会., 大宮, 2012年7月
5. 柳原格、中平久美子:The aggregative property of thermostable direct hemolysin., 日米医学協力研究会コレラ・細菌性腸管感染症専門部会日本側総会., 京都, 2012年8月
6. 小野寺章、西海史子、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈美、根津菜摘、宝

諸あい、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一:非結晶ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連., 日本薬学会近畿支部., 武庫川, 2012年10月

7. 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈已、根津菜摘、宝諸あい、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一:非結晶ナノシリカの精子頭部への結合による精子運動性の低下., 日本薬学会近畿支部., 武庫川, 2012年10月
8. 太田小百合、稲垣秀人、宮村浩徳、西澤春紀、中平久美子、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹:習慣流産をおこすANXA5上流のグアニン四重鎖構造多型., 人類遺伝学会., 東京, 2012年10月
9. 小野寺章、西海史子、古田拓也、中平久美子、石井幸奈、本間安季、太田舞子、諸澤瑛、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一:非晶質ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との関連., 生化学会., 福岡, 2012年12月

【国際学会発表：合計4件】

1. Daisuke Kinoshita, Kiyooki Sumi, Hiroaki Tubouchi, Kensi Wasada, Kumiko Nakahira, Itaru Yanagihara. Gastric fluid cytokines in preterm infants: a useful test for evaluating antenatal inflammation. 17th Congress of the Federation of Asian and Oceania Perinatal Societies (FAOPS) and the 16th Annual Congress of the Perinatal Society of Australia and New Zealand (PSANZ) - FAOPS & PSANZ, Sydney, 18-21 March, 2012.

2. Misako Iwata, Msahiro Nakayama, Masako Waguri, Nobuaki Mitsuda, Itaru Yanagihara, Tomio Fujita, Isao Nakanishi. Massive intervillous fibrin deposition in women with recurrent pregnancy loss. International Federation of Placenta Associations, Hiroshima, 18-21 September, 2012.
3. Hideto Inagaki, Sayuri Ota, Haruki Nishizawa, Hironori Miyamura, Kumiko Nakahira, Machiko Suzuki, Sachie Nishiyama, Yasuhiro Udagawa, Itaru Yanagihara, Hiroki Kurahashi. Obstetric complication-associated ANXA5 promoter polymorphisms affect gene expression via DNA secondary structures, American Society of Human Genetics, San Francisco, 6-10 November, 2012.
4. Yoshioka Y., Yamashita K., Higashisaka K., Morishita Y., Yanagihara I., Saito S., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : Histological analysis of placenta in silica nanoparticle-treated mice for the development of nanomaterials with safety., PPTOX III, Paris (France), 14-16 May, 2012.

研究協力者

中平久美子、西海史子、呉恒寧、名倉由起子、内田薫、脇本哲（大阪大学医学部産婦人科）、赤井一樹（大阪大学医学部産婦人科）、上野竜也（近畿大学生物理工学部）

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

なし

② 実用新案登録

なし