

ナノマテリアルの胎盤毒性解析とその評価基盤の構築

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 教授

研究要旨

化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、催奇形性試験に代表されるように、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきである。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的であるうえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤移行・蓄積<動態>、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が今、まさに必須となる。そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク（ハザードと曝露/動態の積算）解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1) 胎盤動態、(2) 胎盤ハザード、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、(1)～(3)の情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを目指す。

令和3年度研究では、(1) 胎盤動態に関して、①トランスウェルにおける胎盤関門単層モデルの作成において、化学物質の胎盤関門透過性を評価するうえでは、ヒト絨毛由来細胞株であるJEG-3細胞株が有用であることを示した。また、(2) 胎盤ハザードに関して、②胎児毒性を示す化学物質の一部は、BeWo細胞株におけるホルモン産生を攪乱し得るものの、その発現変動の程度は化学物質により異なることを示した。さらに、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムに関して、③合胞体化前のBeWo細胞株に対するヒストン脱アセチル化剤への曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることを見出した。加えて、パイロット的な検討ではあるものの、④医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子が、胎盤細胞における合胞体化の進行を抑制することなどを明らかとした。これら成果は、ガイドラインに基づいた標準的試験法（主として生殖発生毒性に係る動物実験）との関係性について現在検証中である。**以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初年次計画の予定通り達成できている。**また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、産学官・病院、ならびに、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している。

研究分担者

中島彰俊・富山大学・学術研究部医学系・教授

A. 研究目的

化学物質の生殖発生に対する影響については、

毒性評価手法の感度やコスト、簡便性の問題から、行政判断に活用できる情報が不足しているうえ、化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、催奇形性試験に代表されるように、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維

持と発達が不可欠であり、実際に多くの胎児発育不全は胎盤の異常や発育の障害を伴うことが産婦人科領域でも示されている。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、母体側の胎盤への毒性も考慮すべきである。しかし現状では、化学物質による胎盤毒性の評価は限定的である（剖検による肉眼的初見や病理解析のみ）うえ、胎盤に焦点をあてた、確立された代替試験法は無い。化学物質の生殖発生毒性の評価に際して、子と母体は両輪で解析されるべきであり、特に、受精卵/胎児の成長の基盤となる胎盤への毒性の理解が不可欠と言える。そのため、化学物質の胎盤毒性評価に向けて、胎盤移行・蓄積<動態>、構造的・機能的胎盤形成、ハザード発現メカニズムを統合的に理解するための解析基盤が今、まさに必須となる。

そこで本研究では、胎盤毒性発現メカニズムを考慮したリスク（ハザードと曝露/動態の積算）解析基盤を確立することで、化学物質による胎盤毒性を判断できるよう、(1) 胎盤動態、(2) 胎盤ハザード、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムなどの各段階への影響を各々解析し、(1) ~ (3) の情報を総合集積することで、統合的に評価できるスキームを構築することを目指す。また、本研究で構築した試験法で得られた結果とガイドラインに基づいた標準的試験法（主として動物実験）との関係性を検証すると共に、胎盤毒性が疑われる化学物質による当該スキームの検証を図る。そのうえで、近年のナノテクノロジーの進展に伴い、化粧品や食品領域をはじめ、既に様々な産業分野の製品に実用化されているナノマテリアルなどの毒性未知化学物質の胎盤毒性情報の収集を試みる。さらに、近未来的な出口として、OECDテストガイドラインや行政活用などを念頭に、協同する業界団体・学協会と連携し、本研究を実施することで、既存法の無い「統合的胎盤毒性評価スキーム」を新たに提案しようとするものである。

B. 研究方法

1. 被験化学物質

バルプロ酸、ベンゾピレン、エタノール、メトトレキサート、ワーファリン、フェニトインは Wako (Osaka, Japan) より購入した。バルプロ酸とエタノールは PBS に、ベンゾピレン、ワーファリン、フェニトインは DMSO に、メトトレキサートは水酸化ナトリウムに溶解させたのち、それぞれの溶液を細胞培地で細胞障害性が認めら

れない濃度に希釈し、実験に供した。

銀ナノ粒子および金ナノ粒子は、nano Compositix 社 (San Diego, CA) より購入し、表面をクエン酸修飾した、粒子径が 10 nm (nAg10、濃度 1.0 mg/mL および nAu10、濃度 1.0 mg/mL) のものを使用した。なお、以後の検討で nAg10 分散液を培地で希釈する際には、凝集を防ぐため、コーティングを行った後に実験に供した。具体的には、原液の nAg10 と 20 mg/mL ウシ血清アルブミン (BSA; Sigma-Aldrich, St Louis, MO) を等量ずつ混合し、1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に、nAg10 分散液を培地で各濃度に希釈した。

2. 細胞培養および合胞体化誘導

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株である BeWo 細胞株は、JCRB 細胞バンク (Japanese Collection of Research Bioresources; Osaka, Japan; JCRB9111) より購入した。BeWo 細胞株の維持には、56°C で 30 分間の非働化处理を行った 10% ウシ胎児血清 (FBS; Biosera, Nuaille, France)、1% ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシン B 懸濁液 (Wako) を含む Ham's F-12 (Wako) を用い、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。胎盤細胞の合胞体化に対する影響評価に際して、BeWo 細胞株に forskolin を処置し細胞内の cAMP 濃度を上昇させることで合胞体化を誘導する *in vitro* 系を活用した。合胞体化誘導に使用した forskolin は、Cayman chemical (Ann Arbor, MI) より購入し、DMSO で希釈したのち、培地で 50 μM に調製し実験に供した。

3. 胎盤細胞の単層モデルの形成

ポアサイズ 0.4 μm、膜面積 0.3 cm² の Polyethylene terephthalate メンブレンを有する 24 well のセルカルチャーインサート (Falcon, Corning, NY) に 3.3 × 10⁵ cells/well でヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株および BeWo 細胞株、また、コントロールとしてヒト血管内皮細胞 HUVEC を播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 48 時間毎に培地を交換しながら、12 日間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、48 時間毎に 12 日間抵抗値を測定した。抵抗値の測定には、ミリセル ERS 装置 (Millipore, Bedford, MA) を用いた。同時に、細胞層の無い培養膜の抵抗値 (ブランク) も測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を徐算して細胞層

の TEER 値 (ohms/cm²) とした。培養 12 日目に、終濃度 1 μM の Sodium fluorescein (Na-flu; Wako)、分子量 10 kDa の fluorescein isothiocyanate-labeled dextran (FITC-dextran) および分子量 70 kDa の FITC-dextran (Sigma-Aldrich) を添加し、0、24 時間後にサンプリングした。サンプルは蛍光光度計 (GloMax, Promega, Madison WI) により、excitation 475 nm、emission 500-550 nm の条件で蛍光強度を定量した。

4. Real-time RT-PCR によるタンパク質性ホルモン遺伝子の発現量評価

6 well プレートに 1.5×10^5 cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo 細胞株に添加し 24 時間培養することでシンシチオトロホプラストへの融合を誘導し、被験物質を各濃度に調製後、BeWo 細胞に 72 時間添加した。その後、FastGene RNA Basic Kit (Nippon Genetics; Tokyo, Japan) のプロトコールに準じて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) により cDNA に逆転写した。得られた cDNA を鋳型として、各種プライマー (Eurofins Genomics, Tokyo, Japan) とジーンエース SYBR qPCR ミックス α Low ROX (Nippon Gene, Tokyo, Japan) により反応溶液を調製し、CFX384 (BioRad, Hercules, CA) を用いて real-time RT-PCR を実施し、タンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB, CSH1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

5. LC/MS/MS による Progesterone の評価

6 well プレートに 1.5×10^5 cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、BeWo 細胞株に添加し 24 時間培養して合胞体化を誘導した。合胞体化誘導後、被験物質を添加し、72 時間培養した。培養液 1 mL と酢酸エチル 1 mL を十分に混合させ、3 min、5000 rpm、25°C 条件下で遠心した上清 (酢酸エチル層) を回収した。酢酸

エチル上清を窒素乾固し、メタノール 100 μL に溶解させ濃縮したサンプルを LC-MS/MS により測定した。LC-MS/MS は、Waters Acquity UPLC (Waters, Milford, MA) と Waters Quattro Premier XE (Waters) が連結した装置を使用した。LC の使用カラムは C18 カラム (1.7 μm, 2.1 x 50 mm, Waters)、移動相に A : 40% 5 mM ギ酸アンモニウム超純水溶液、B : 60% 5 mM ギ酸アンモニウム アセトニトリル/メタノール混合溶液 (組成比 3:1) を用い、流速 0.4 mL/min、注入量 5 μL で測定した。MS はエレクトロスプレーイオン化法を用い、イオンモードはポジティブモードで測定した。

6. Real-time RT-PCR による合胞体化関連遺伝子の発現量評価

6 well プレートに 1.5×10^5 cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 および nAu10 を目的の濃度にそれぞれ希釈後、BeWo に添加し 48 時間培養した。前項と同様の方法でサンプルを調製し、CFX384 (BioRad) を用いて real-time RT-PCR を実施し、合胞体化関連遺伝子 (CGB, SDC1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

7. ヒストン脱アセチル化酵素阻害と合胞体化進行との関連解明

6 well プレートに 7.5×10^4 cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、2 mL/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。Ham's F-12 で目的の濃度に調製したトリコスタチン A (TSA, Sigma-Aldrich)、および H89 (Cayman chemical) 溶液を BeWo 細胞株に添加し、2 時間培養したのち、Ham's F-12 で終濃度 50 μM に調製した forskolin 溶液を BeWo に添加し 48 時間培養することでシンシチオトロホプラストへの融合を誘導した。この時、前項と同様の方法でサンプルを調製し、CFX384 (BioRad) を用いて real-time RT-PCR を実施し、タンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB, SDC1) の発現量を評価した。各群の mRNA の発現量の比較は、β-actin 量で補正した後、forskolin を添加していない群で除すことで解析した。

ヒストン脱アセチル化酵素の発現量の解析に際しては、細胞を PBS で洗浄し、RIPA バッファーにて溶解し、15 分氷上でインキュベートした後、16,000 x g、4°C で 30 分間遠心した。上清を回収し、BCA assay (Thermo Fisher scientific) によりタンパク質量を標準化した後に、6 x SDS sample buffer と混合し、95°C で 5 分処理した後、各試料を Sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) した。SDS-PAGE は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動後のゲルを immobilon-P Transfer membrane (PVDF 膜; MERCK MILLIPORE, Billerica, MA) にウェット式にて 1.5 時間転写し、5% Skim milk (Wako)/TBST (0.05% Tween 20 を含む TBS) を添加してブロッキングした。1 次抗体として β -actin (Sigma-Aldrich)、CGB (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX)、HDAC1、HDAC2 (Cell Signaling Technology, Danvers, MA) を 4°C で一晩反応させた。TBST で洗浄後、2 次抗体として、HRP/anti-rabbit IgG (Cell Signaling Technology)、HRP/anti-mouse IgG (Sigma-Aldrich) を室温で 1 時間反応させた。TBST で洗浄後、PVDF 膜をイムノスター LD (Wako) で処理し、発光像を LAS-4000 (FUJI Film, Tokyo, Japan) により撮影した。

8. 細胞免疫染色による合胞体化の評価

8 well チャンバースライド (Matsunami Glass, Osaka, Japan) に 1×10^4 cells/mL で調製した BeWo 細胞株懸濁液を、200 μ L/well で播種し、37°C、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で 24 時間培養した。その後、Ham's F-12 で終濃度 50 μ M に調製した forskolin 溶液を用いて、nAg10 を 0、0.039 μ g/mL に希釈後、200 μ L/well で添加した。48 時間培養後に、PBS で 1 回 wash し、4% パラホルムアルデヒド-リン酸緩衝液 (FUJIFILM Wako Pure Chemical Corporation, Osaka, Japan) を 200 μ L/well で加え、室温で 30 分間、細胞固定を行った。その後、終濃度 0.1% に調製した Triton X-100 (Nacalai Tesque, Kyoto, Japan) を 5 分間添加し、細胞膜の透過処理を行った。PBS で 3 回 wash した後、1% BSA/PBS を 200 μ L/well で添加し、室温で 1 時間ブロッキングを行った。その後 1 次抗体として anti-desmoplakin I / II (Santa Cruz

Biotechnology) を添加し、4°C で overnight させた。PBS で 3 回 wash 後、2 次抗体として Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 conjugate (Invitrogen, Carlsbad, CA) を 200 μ L/well で添加し、室温で 1 時間反応させた。PBS で 3 回 wash 後、ProLong Gold Antifade Mountant with DAPI (Invitrogen) で DAPI 染色及びサンプルの封入を行った。封入から 2 日後、共焦点顕微鏡 (SP5; Leica, Wetzlar, Germany) により蛍光画像を撮影した。撮影した蛍光画像をもとに、(合胞体栄養膜細胞内の核数/総核数) x 100 の計算式で合胞体化割合の算出を行うとともに、ImageJ (National Institutes of Health; Bethesda, MD) を用いて DAPI で染色された核の大きさを定量した。合胞体化割合の算出および核の大きさを定量は、各群それぞれ 5 視野を撮影し解析に用いた。

(倫理面への配慮)

本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月に厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止のための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号)が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ヒト絨毛癌細胞を用いた胎盤関門形成

化学物質の生殖発生毒性試験における評価の主体は、母体よりも胎児を重点とする傾向にある。一方で、妊娠維持、胎児の健やかな成長には、胎盤の正常な維持と発達が不可欠である。従って、化学物質の生殖発生毒性評価にあたっては、胎盤に対するリスク (曝露/動態とハザード) を考慮すべきである。この点、胎盤関門は母体血と胎児血間で物質輸送を制御する器官であることから、化学物質のリスクを評価するうえで *in vitro* モデルの構築が求められている。そこで本検討では、ヒト絨毛癌細胞を用いた *in vitro* 胎盤関門構築を試みた。トランスウェルセルカルチャーインサー

トにヒト絨毛由来 JEG-3 細胞株および BeWo 細胞株を播種し、播種後 48 時間ごとに TEER 値を測定したところ、12 日目時点において、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株においてより高い値を示した (図 1A)。この時、Sodium fluorescein (Na-flu) (図 1B)、および分子量 10 kDa の FITC-dextran (10 kDa FD) (図 1C)、分子量 70 kDa の FITC-dextran (70 kDa FD) (図 1D) を用い、胎盤関門の透過性を評価したところ、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株において、各分子の basolateral 側への移行量がより少なくなることが示された。このことから、BeWo 細胞株に比べ JEG-3 細胞株において、よりタイトな関門を形成することが示唆された。

胎盤関門において、その機能の多くはトロホブラストが担っているとされ、トロホブラストは、サイトトロホブラストと、サイトトロホブラストが合胞体化することによって生じるシンシチオトロホブラストに大別されるものの、現在汎用されている胎盤関門モデルでは、サイトトロホブラストのみを考慮したものが大半である。そのため、ヒト胎盤関門を模するためには、シンシチオトロホブラストも考慮する必要がある。現在、化学物質の胎盤動態解析の推進を目指し、シンシチオトロホブラスト層の形成に不可欠な合胞体化誘導のための最適条件を検討している。

2. 化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価

胎盤は妊娠維持に必須の器官であり、胎児発育や子宮環境調節の役割を担う複数のホルモンを産生している。これらホルモンの産生量は妊娠の進行に伴い適切に変化するが、ホルモンレベルが異常値を示すと、流産や器官形成異常などにつながり得る。一方で、これら胎盤ホルモン産生の異常を指標とした生殖発生毒性の評価系は皆無である。そこで、化学物質が胎盤ホルモンへおよぼす影響を評価し、そのメカニズムの解明を試みることで、胎盤ホルモン産生の制御に係る分子群の同定を図る。得られた結果について、*in vivo* の結果との検証を進めながら、胎盤ホルモン産生の制御分子の発現変動を指標とした、アッセイ系の構築を目指す。

本年度は、胎盤ホルモン産生に対する化学物質の影響を評価するために、forskolin により BeWo 細胞株を合胞体化させた後、細胞に各化学物質を処置した際のタンパク質性ホルモン遺伝子 (CGB、

CSH1) の発現変動と、ステロイドホルモン (Progesterone) の産生量を解析した。実験に供した化学物質としては、胎児への毒性が知られていることから、胎盤への影響が生じうるものとして、バルプロ酸、ベンゾピレン、エタノール、メトトレキサート、ワーファリン、フェニトインを用いた。解析の結果、forskolin 処置群と比較して、それぞれの化学物質によって、異なる胎盤ホルモンバランス変動を示すことが明らかとなった (図 2)。このことから、本検討で用いた胎児毒性を示す化学物質は、胎盤におけるホルモン産生をそれぞれ異なる作用経路で攪乱することが示唆された。現在、これら化学物質を添加した際の胎盤における遺伝子発現変動を RNA-seq により評価し、胎盤ホルモン変動と遺伝子発現変動との連関を解析している。

3. 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化の関与

一般に、胎盤はシンシチオトロホブラストが中心となって機能している。このシンシチオトロホブラストは、単核のサイトトロホブラストが細胞融合し多核化 (合胞体化) することで形成される細胞であり、合胞体化の進行に伴い胎盤が構造、機能の両面において成熟する。従って、妊娠初期に合胞体化が正常に進行できない場合、胎盤の機能低下につながり、妊娠の成立・維持や健康な児の出産といった妊娠結果にも負の影響を生じることが示唆されている。胎盤の形成・成熟過程である、サイトトロホブラストからシンシチオトロホブラストへの合胞体化において、ヒストン脱アセチル化が起こり、それらを阻害することで、合胞体化が抑制されることが知られている。そこで、化学物質が合胞体化へおよぼす影響を評価するうえで、胎盤におけるヒストン脱アセチル化への作用を追究し、*in vivo* の結果との検証を進めながら、合胞体化の制御分子の発現変動を指標とした、アッセイ系の構築を目指す。

本年度は、胎盤におけるヒストン脱アセチル化への作用を追究するために、ヒストン脱アセチル化酵素阻害剤である TSA を用い、合胞体化へおよぼす影響を評価した。BeWo 細胞株に合胞体化において重要な cAMP 経路の阻害剤である H89、あるいは、TSA を 2 時間前処置した後、forskolin を 48 時間処置した際の各タンパク質発現量を解析した。その結果、TSA 添加によって、合胞体化が進行した細胞により盛んに産生されるヒト絨

毛性ゴナドトロピン β (CGB) と Syndecan-1 (SDC1) の発現量が減少し得ることが示された (図 3)。また、TSA 添加群において、HDAC2 の発現量に有意な変動は認められなかったものの、HDAC 1 の発現量が濃度依存的に減少する傾向が得られた (図 4)。この時、H89 添加群において、forskolin 単独添加群と比較し、CGB の発現量の減少傾向が認められ、TSA 処置群でも同程度に発現量が低下していたことから、合胞体化前の TSA 曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることが示された。現在、免疫染色により合胞体化割合や細胞形態を評価すると共に、化学物質の曝露実態を踏まえ、低濃度・長時間曝露した際の合胞体化に与える影響を検討している。また、TSA のみならず、他の HDAC 阻害剤を比較対象としながら化学物質の合胞体化進行に対する影響を評価することで、化学物質の合胞体化への影響とそのメカニズムに関する情報の蓄積を進めている。

4. ナノ粒子が合胞体化に与える影響評価

少なくとも一次元の大きさが 100 nm 以下の人工微粒子であるナノ粒子は、高い組織浸透性などの特徴的な機能を有することから利用分野が拡大している。従って、その汎用性の高さも踏まえると、老若男女が容易に曝露し得る物質である。一方で、サイズの微小さゆえに、従来素材とは異なる生体影響を誘発することが懸念されるなど、安全性情報の収集が課題となっている。本観点より我々は、妊娠期におけるナノ粒子曝露の生体影響評価にいち早く取り組み、これまでにナノ粒子が胎盤へ移行し得ることや胎仔発育不全を誘発すること、加えてナノ粒子の表面性状を改変することでハザード発現回避が可能であることを明らかとするなど、妊娠期におけるナノ粒子の安全性確保に資する情報を収集してきた。そこで本検討では、ナノ粒子の胎盤毒性の理解に向けたハザード情報の収集と将来的なナノ粒子の安全性確保に資するハザード発現機序の解明を目的に、胎盤形成・成熟過程における栄養膜細胞の合胞体化に着目しナノ粒子の生体影響評価を試みた。

ナノ粒子のモデルとしては、抗菌作用を有することから医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子、安定性の高さから化粧品などへの適用も盛んな金ナノ粒子を選択した。なお、比較検討のために粒子径をいずれも 10 nm に統一した nAg10、nAu10 を実験に供した。はじめに合胞体化に対するナノ粒子の影響を評価するために、BeWo 細胞

株に forskolin と各ナノ粒子を共処置した際の合胞体化マーカーの変動を解析した。その結果、CGB、SDC1 の発現が、forskolin 単独処置群と比較して nAg10 共処置により濃度依存的に低下することを示した (図 5A)。一方で、forskolin とともに nAu10 を処置した群においては、CGB、SDC1 の発現低下は認められなかった (図 5B)。さらに、合胞体化進行に関与する分子である *ERVW-1* および *ERVFRD-1* の mRNA 発現を評価したところ、nAg10 共処置群において、forskolin 添加群と比較して *ERVFRD-1* の mRNA の発現が有意に抑制されることを明らかとした (図 6A)。一方で、nAu10 共処置群においては、いずれも有意な発現変動は認められなかった (図 6B)。

そこで、nAg10 が BeWo 細胞株の合胞体化を抑制しているかを評価するため、BeWo 細胞株に 0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の nAg10 および forskolin を 48 時間添加し、細胞境界で発現する desmoplakin I / II の発現を細胞免疫染色により評価した。その結果、nAg10 非添加群と比較して forskolin 単独添加群において、desmoplakin I / II の発現減少が認められたものの、nAg10 と forskolin の共処置群では、依然として desmoplakin I / II の細胞境界での強い発現が認められた (図 6A)。また、撮影した蛍光画像をもとに、総核数に対する合胞体栄養膜細胞中の核数を計数し、合胞体化割合を算出したところ、nAg10 処置により合胞体化割合が低下することが示された (図 6B)。さらに、合胞体化により形成される合胞体栄養膜細胞の特徴の一つである核同士の凝集によるサイズの増大に関して、ImageJ を用いて DAPI で染色された核の大きさを定量することで評価した。解析の結果、非添加群と比較して、forskolin 添加群において合胞体化により平均で約 1.6 倍程度、核が大きくなっていることが確認された一方で、forskolin と nAg10 を共処置することで、核のサイズ増大が抑制されることが示された (図 6C)。以上の結果から、nAg10 は、合胞体化の進行を抑制している可能性が示された。現在、nAg10 による合胞体栄養膜細胞の形成抑制が、動物レベルにおいても認められるかについて検討を進めることで、ナノ粒子が胎盤形成・成熟過程に及ぼす影響について理解を進めている。

E. 結論

本年度は、(1) 胎盤動態に関して、①トランスウェルにおける胎盤関門単層モデルの作成に

において、化学物質の胎盤関門透過性を評価するうえで、ヒト絨毛由来細胞株である JEG-3 細胞株が有用であることを示した。また、(2) 胎盤バザードに関して、②胎児毒性を示す化学物質の一部は、BeWo 細胞株におけるホルモン産生を攪乱し得るものの、その発現変動の程度は化学物質により異なることを示した。さらに、(3) 胎盤毒性に係るメカニズムに関して、③合胞体化前の BeWo 細胞株に対するヒストン脱アセチル化剤への曝露は、合胞体化の進行を抑制し得ることを見出した。加えて、パイロット的な検討ではあるものの、④医療・食品分野での利用が多い銀ナノ粒子が、胎盤細胞における合胞体化の進行を抑制することなどを明らかにした。これら成果は、ガイドラインに基づいた標準的試験法（主として生殖発生毒性に係る動物実験）との関係性について現在検証中である。以上、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームの構築に向けて、化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明につながる点で、当初予定通り研究計画を実施している。また、研究の質的担保、検証過程の確保に加え、利害関係者からの意見聴取を目的として、産学官・病院、ならびに、種々業界関係者と連携し、研究成果に関する意見交換を実施すると共に、論文・学会での成果公表を推進している（G. 研究成果参照）。

近年、低出生体重児や早産の母体などが飛躍的に増加し、少子高齢社会の大きな問題となっている。本観点から、化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されている。一方で、化審法に基づくリスク評価において対象とされる評価項目の中でも、化学物質の生殖発生に対する影響については、毒性評価手法の感度やコスト、簡便性等の問題から、行政判断に活用できる十分な情報が世界的に観ても圧倒的に不足している。さらに化審法をはじめとする化学物質に係る厚生労働行政においては、基本的に、化学物質の構造式（物質名）で規制されており、化学物質の粒子サイズや形状といった物性の違いと毒性発現の連関は十分に考慮されていない。こうした観点から、本研究は化学物質曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠の収集と分子メカニズムの解明により、胎盤毒性メカニズムを考慮した統合的評価スキームを構築するものであり、生殖発生毒性学的観点からの化学物質のリスク解析基盤を構築し、リスク管理に係る新たな政策形成に資する知見の提供に大きく貢献するのみなら

ず、化審法における化学物質のリスク評価に資する毒性情報の創出や OECD テストガイドラインへの展開に資する知見の集積につながる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ogawa T., Okumura R., Nagano K., Minemura T., Izumi M., Motooka D., Nakamura S., Iida T., Maeda Y., Kumanogoh A., Tsutsumi Y., Takeda K. : Oral intake of silica nanoparticles exacerbates intestinal inflammation., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 534: 540-546, 2021.
2. Eto S., Higashisaka K., Koshida A., Sato K., Ogura M., Sakurai M., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y. : Amorphous silica nanoparticles exacerbate hepatic damage through the activation of acquired cell-mediated immunity., *Nano Ex.*, 3(1): 015002, 2022.
3. Eto S., Koshida A., Tsujino H., Nagano K., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Silica particles with human protein corona shows sensitization potential in the human cell line activation test., *BPB Reports*, 5(1): 1-4, 2022.

【総説・その他】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央 : 微粒子曝露と脆弱な世代への健康影響～胎盤毒性/動態解析を例に～., *BIO Clinica.*, 37 (1), 59-63, 2022.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 堤 康央 : ナノマテリアルの健康影響～未病とのかかわりは? ～., 富山大学大学院特別セミナー, オンライン, 2021年6月.
2. 東阪和馬 : ナノマテリアルと胎盤毒性., 第29回日本胎盤学会学術集会, オンライン, 2021年11月.
3. 東阪和馬 : 物性-動態-毒性の連関解析に基づく、脆弱な世代へのナノ粒子の健康影響評価

と安全性確保., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

4. 東阪和馬: ヒトの健康へのリスク解析に資するナノマテリアルの神経細胞分化におよぼす影響とその機序解明., 日本薬学会第 142 年会, 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月. (シンポジウム: 化学物質のヒト健康影響評価とリスク解析の今後 ~若手研究者目線で~)

【国内学会発表】

1. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, 井阪 亮, 山口慎太郎, 清本琴淑, 北原 剛, 小林純大, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: BeWo細胞合胞体化モデルを活用した胎盤形成過程に対するナノマテリアルの安全性評価., 第 46 回日本化粧品学会., オンライン, 2021 年 6 月.
2. 東阪和馬, 芳賀優弥, 辻野博文, 長野一也, 堤 康央: 非晶質ナノシリカによる胎盤毒性とその誘導機序解明., フォーラム 2021: 衛生薬学・環境トキシコロジー., オンライン, 2021 年 9 月.
3. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 東阪和馬, 堤 康央: 実環境中のマイクロプラスチックの生体影響評価の基盤構築., 第 18 回次世代を担う若手のためのフィジカル・ファーマフォーラム., オンライン, 2021 年 9 月.
4. 東阪和馬, 仲本 有里菜, 小林純大, 北原剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 化学物質の胎盤毒性解析に向けて-胎盤細胞のトランスporter発現に対するバルブロ酸の影響解析., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
5. 生野雄大, 辻野博文, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央: 実環境中を模したマイクロプラスチックの細胞毒性評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
6. 坂橋優治, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 北原 剛, 小林純大, 仲本 有里菜, 山本怜奈, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-銀ナノ粒子が誘導する胎盤細胞の合胞体化抑制における活性酸素種の関与., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

7. 小林純大, 東阪和馬, 仲本 有里菜, 北原剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: 化学物質の胎盤動態解析に向けて-胎盤栄養膜細胞における合胞体化の誘導条件に関する検討., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
8. 奥村 萌, 芳賀優弥, 小西弘登, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央: 神経細胞における非晶質ナノシリカの動態評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
9. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 浅原時泰, 生野雄大, 東阪和馬, 堤 康央: マイクロプラスチックの細胞毒性及び遺伝毒性評価., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.
10. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 小林純大, 仲本 有里菜, 坂橋優治, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央: ナノマテリアルの胎盤毒性解析に向けて-非晶質ナノシリカ曝露による胎盤ホルモン産生への影響., 日本薬学会第 142 年会., 名古屋 (愛知), 2022 年 3 月.

【国際学会発表】

1. Higashisaka K., Sato K., Eto S., Koshida A., Ogura M., Haga Y., Tsujino H., Nagano K., Tsutsumi Y. : The effect of silica nanoparticles on testis tissue., The 10th International Conference on Nanotoxicology, Virtual Event, 20-22 April, 2021.

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

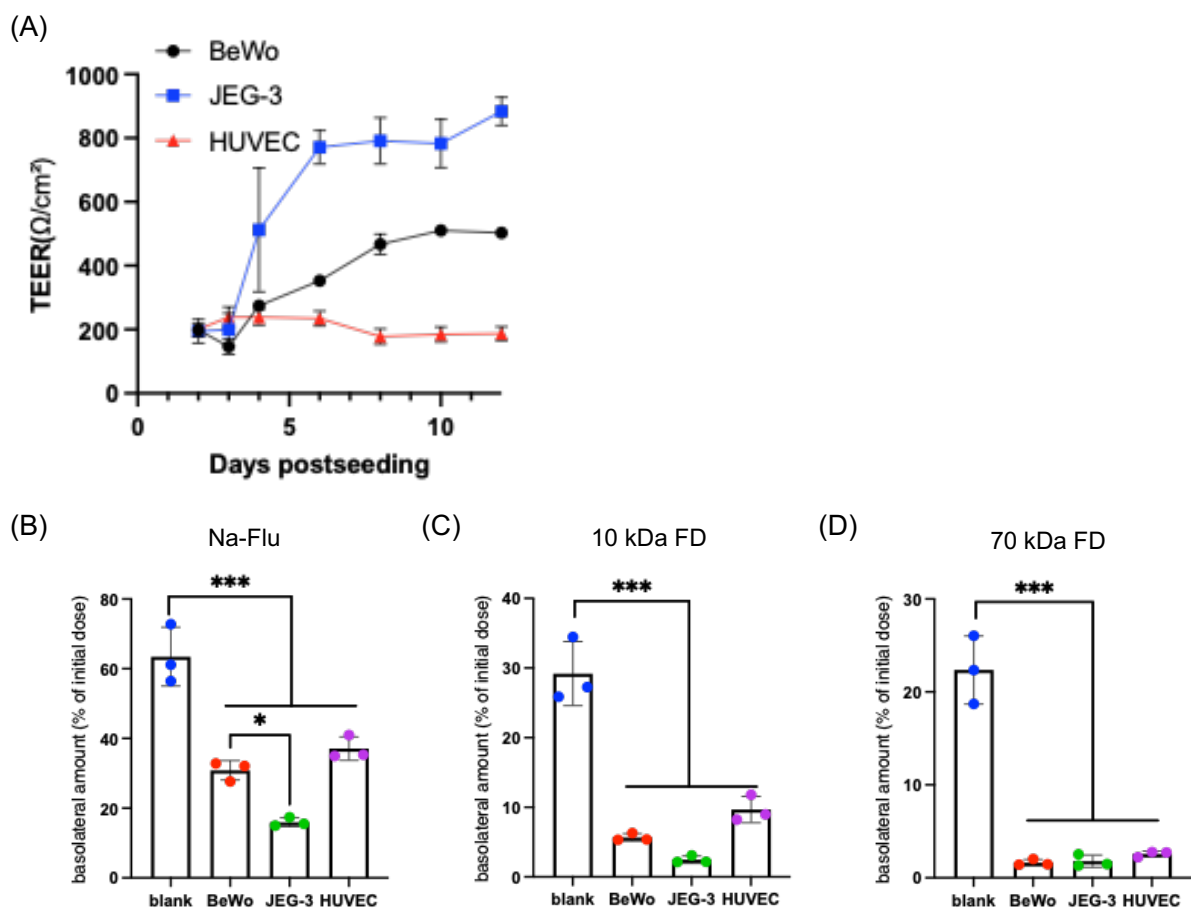


図1：ヒト絨毛癌細胞を用いた胎盤関門

(A) セルカルチャーインサートにヒト絨毛由来JEG-3細胞株およびBeWo細胞株、また、コントロールとしてヒト血管内皮細胞HUVECを播種し、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂条件下で48時間毎に培地を交換しながら、12日間培養した。細胞層を形成した培養膜の上層と下層に電極を浸し、48時間毎に12日間抵抗値を測定した。抵抗値の測定に際しては、細胞層の無い培養膜の抵抗値をブランク)を測定し、ブランクを差し引いた抵抗値に膜面積を徐算して細胞層のTEER値 (ohms/cm²) とした。培養12日目に、終濃度1 μMの (B) Sodium fluorescein (Na-Flu)、(C) 分子量10 kDaのFITC-dextran (10 kDa FD)、(D) 分子量70 kDaのFITC-dextran (70 kDa FD) を添加し、0、24時間後にサンプリングし、各層における蛍光強度を定量することで、その移行割合を算出した。Data are presented as mean ± SD (n = 3) . **P* < 0.05, ****P* < 0.001 by Tukey's method.

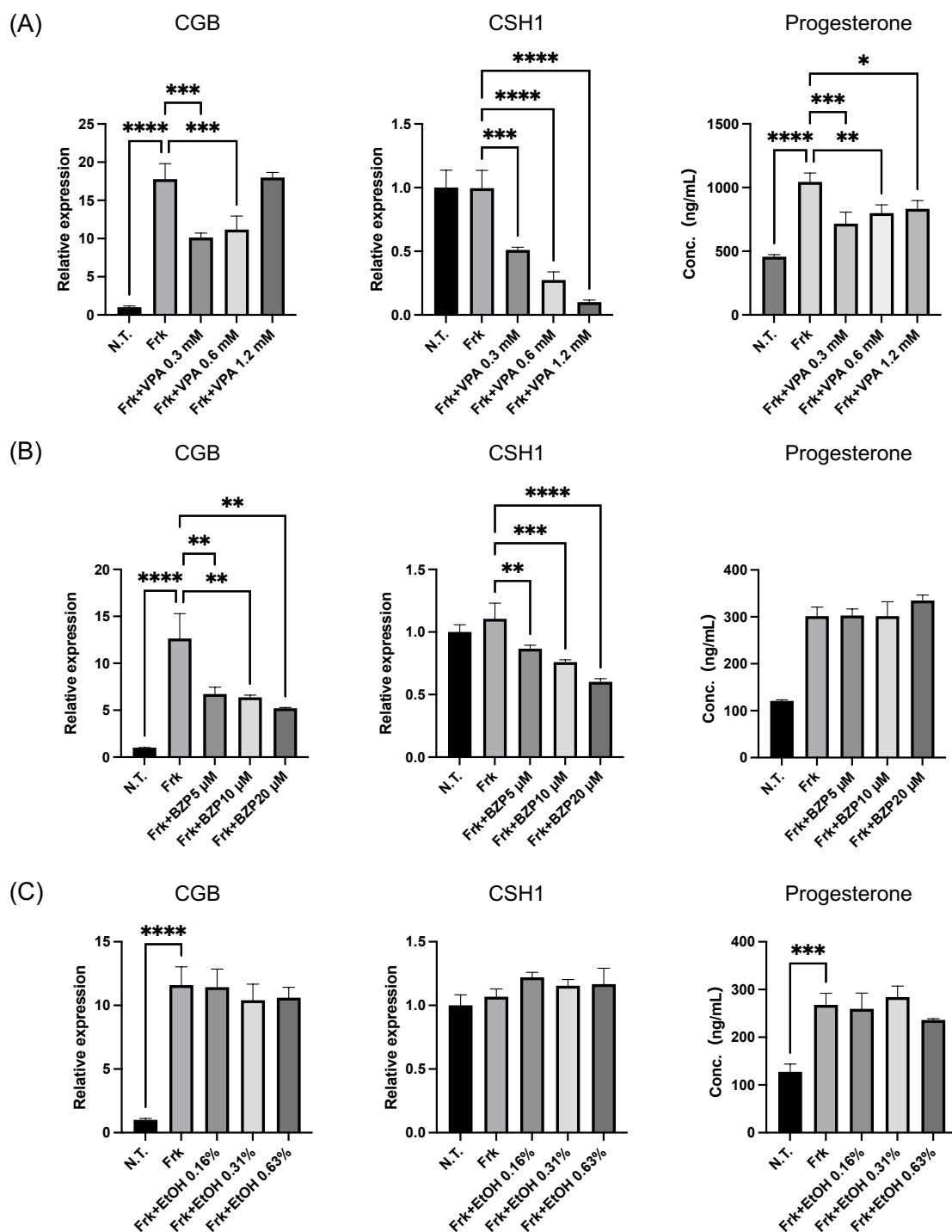


図2：化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価

BeWo細胞株に50 μM forskolin (Frk) を添加した24時間後に、(A) バルプロ酸 (VPA)、(B) ベンゾピレン (BZP)、(C) エタノール (EtOH)、(D) メトトレキサート (MTX)、(E) ワーファリン (WAF)、(F) フェニトイン (Pht) を添加して72時間培養した。培養後の細胞を回収してRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、β-Actinで標準化することで比較した。また、細胞培養液に含まれるProgesteroneの濃度をLC/MS/MSにより測定した。Data are presented as mean ± SD. * $P < 0.05$ by Tukey's method.

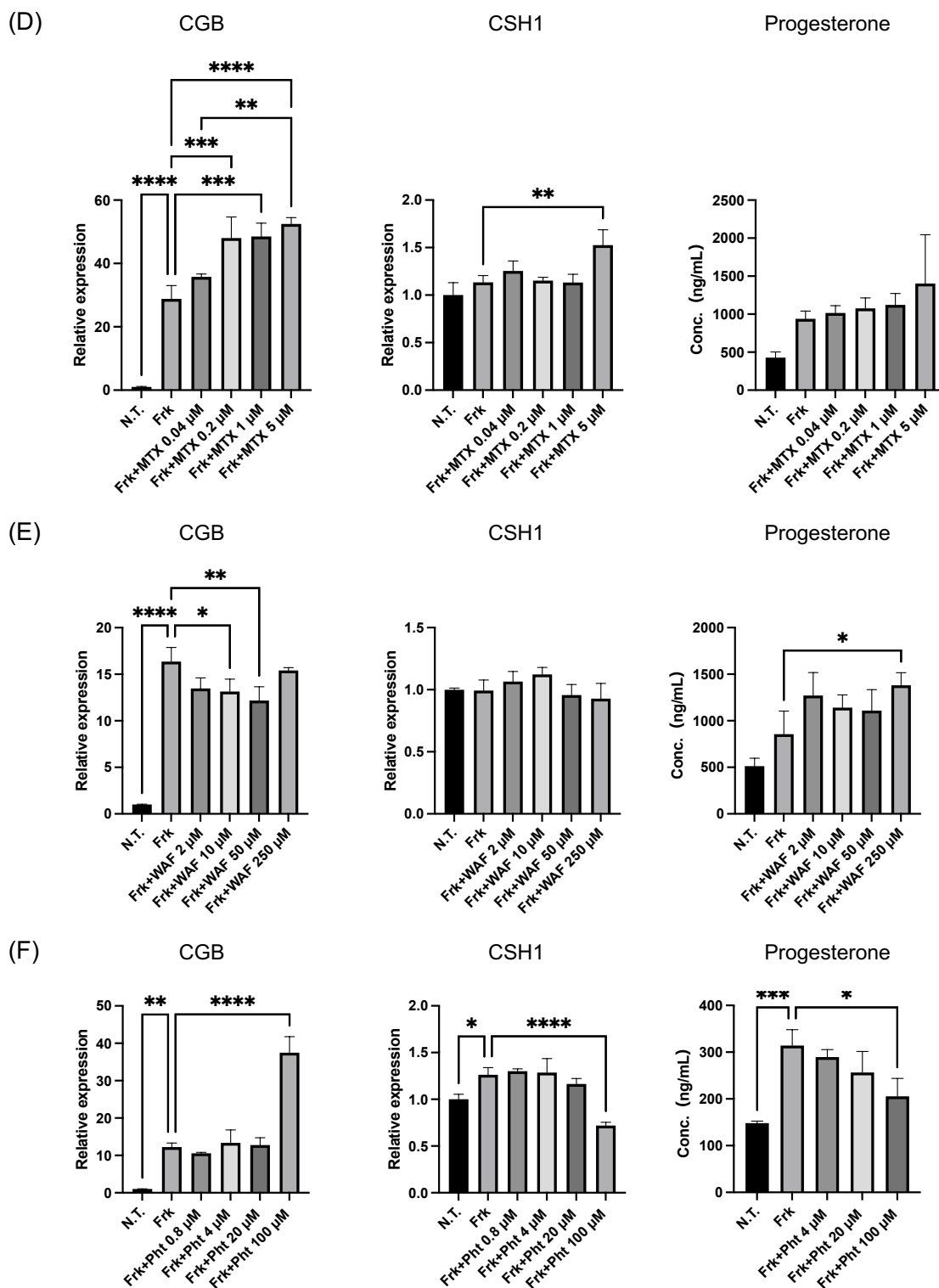


図2：化学物質が胎盤のホルモン産生に及ぼす影響評価（続き）

BeWo細胞株に50 μ M forskolin (Frk) を添加した24時間後に、(A) パルプロ酸 (VPA)、(B) ベンゾピレン (BZP)、(C) エタノール (EtOH)、(D) メトトレキサート (MTX)、(E) ワーファリン (WAF)、(F) フェニトイン (Pht) を添加して72時間培養した。培養後の細胞を回収してRNAを抽出、逆転写によりcDNAを作製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 β -Actinで標準化することで比較した。また、細胞培養液に含まれるProgesteroneの濃度をLC/MS/MSにより測定した。Data are presented as mean \pm SD. * P < 0.05 by Tukey's method.

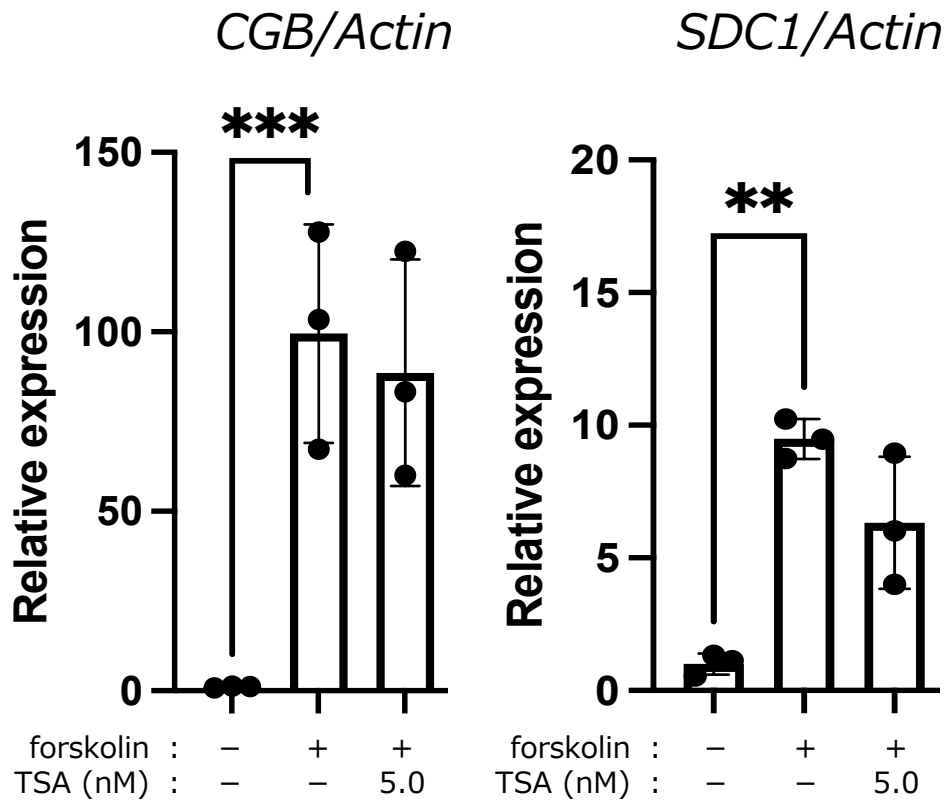


図3 : 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化の関与

BeWo細胞株に、TSAを5.0 nMの濃度で2時間処置した後、50 μ M forskolinを処置した。48時間後、細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 β -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD. * P < 0.05 by Dunnett's method.

forskolin :	-	+	+	+	+	+
TSA (nM) :	-	-	-	0.2	1.0	5.0
H89 (μ M) :	-	-	10	-	-	-

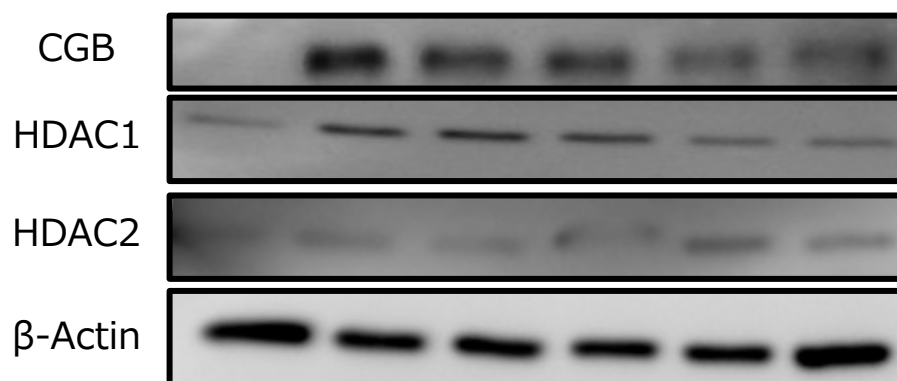


図4 : 胎盤栄養膜細胞の合胞体化におけるヒストン脱アセチル化酵素の発現変動

BeWo細胞株に、H89 (10 μ M) あるいはTSA (5.0 nM) を2時間処置した後、50 μ M forskolinを処置した。48時間後、細胞を回収しタンパク質を抽出し、BCA assayによりタンパク質量を標準化した後、Western Blottingにより、CGB、HDAC1、HDAC2の発現量を解析した。

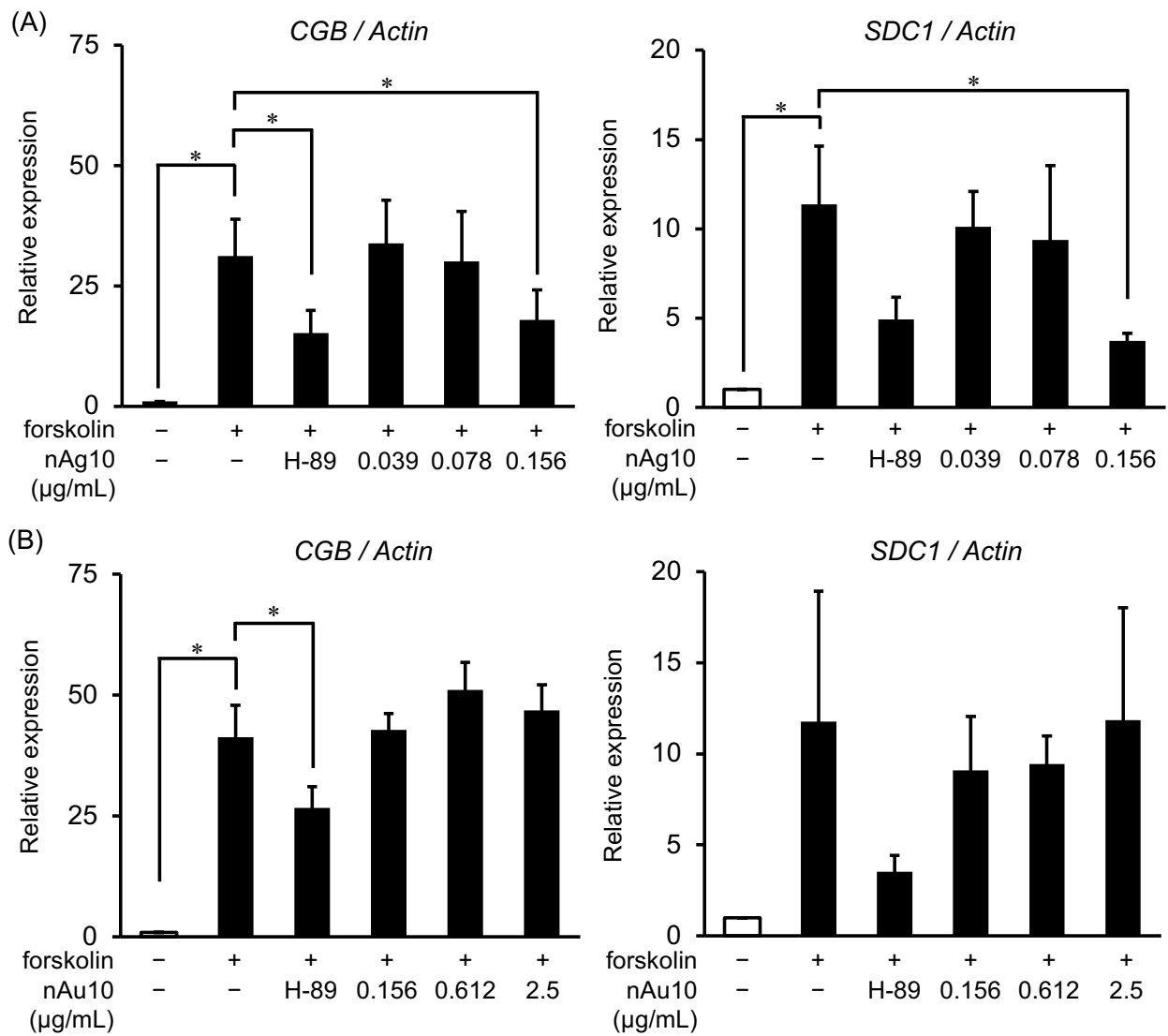


図5：ナノ粒子曝露による合胞体化マーカーの発現変動解析

BeWo細胞株に (A) nAg10 (0.039、0.078、0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、(B) nAu10 (0.156、0.612、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を50 μM forskolinと共に処置した。48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 β -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ by Tukey's method.

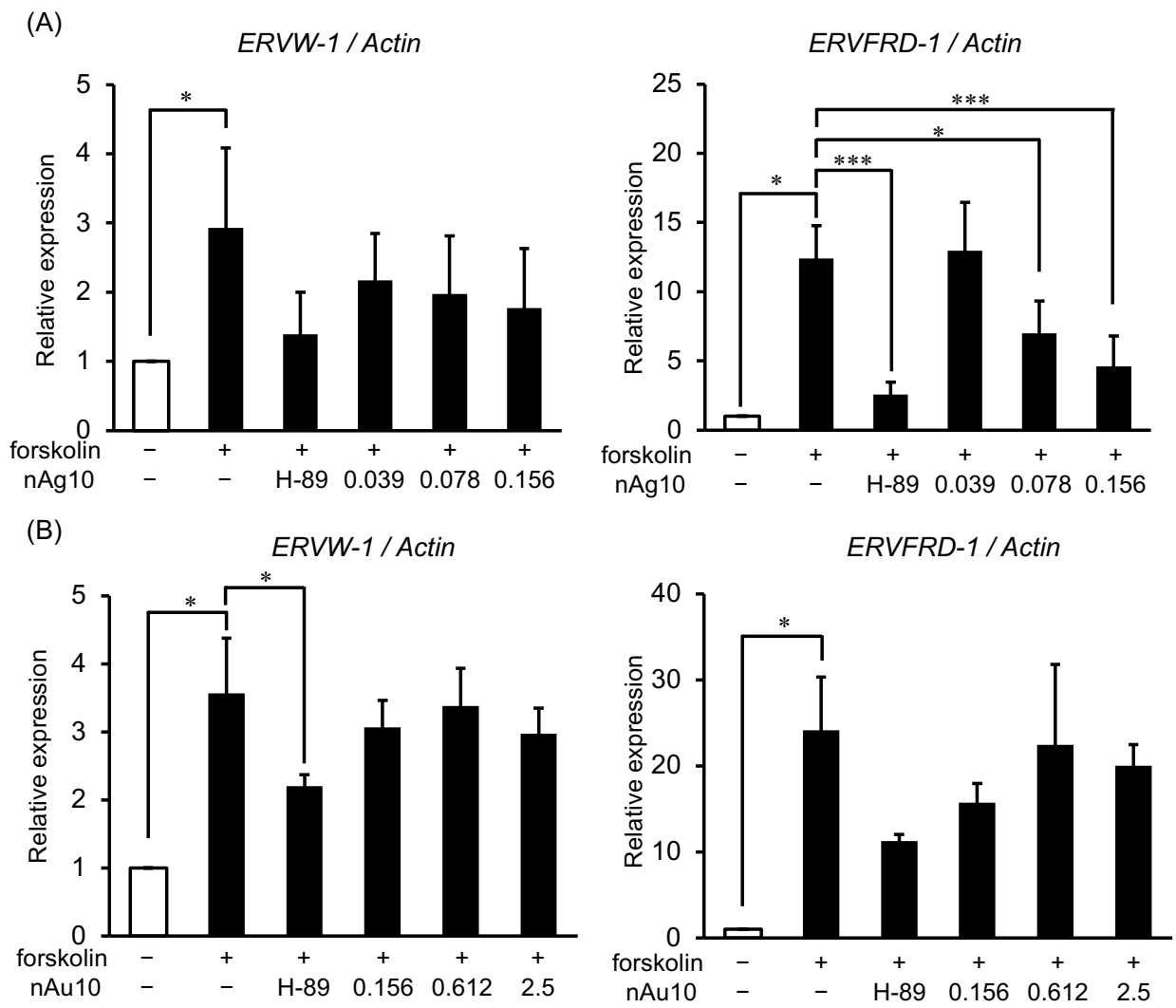


図6：ナノ粒子曝露による合胞体化マーカーの発現変動解析

BeWo細胞株に (A) nAg10 (0.039、0.078、0.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$)、(B) nAu10 (0.156、0.612、2.5 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を50 μM forskolinと共に処置した。48時間後に細胞を回収しRNAを抽出、逆転写によりcDNAを製後、real-time RT-PCRに供した。各群のmRNA発現量は、 β -Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean \pm SD. * $P < 0.05$ by Tukey's method.

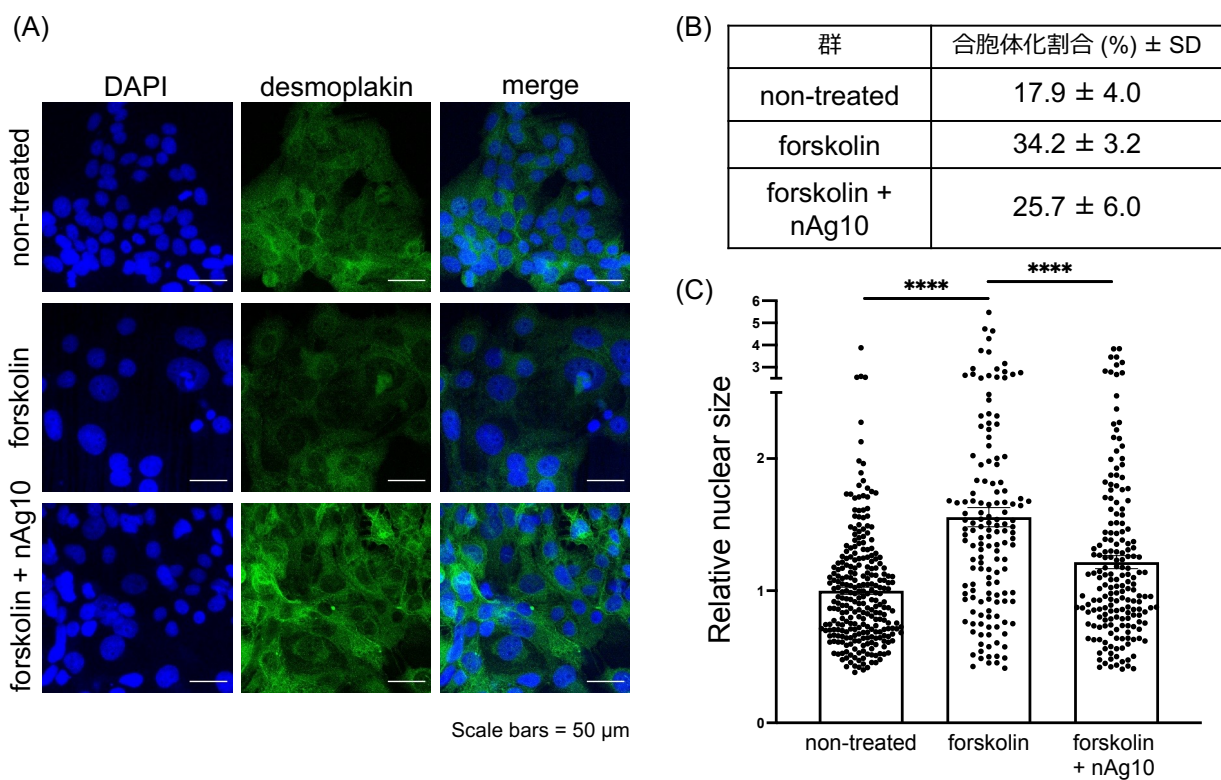


図7：合胞体栄養膜細胞の形態評価および合胞体化割合の算出

(A) BeWo細胞株に、nAg10を0、0.039 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で50 μM forskolinと共に処置し、48時間後に細胞を固定し、細胞免疫染色を実施した。共焦点顕微鏡 (SP5; Leica) により蛍光画像を撮影した。DAPI (blue)、desmoplakin I/II (green) を示している。各群5視野を撮影し以降の解析に用いた。Scale bars = 50 μm (B) 撮影した蛍光画像をもとに、(合胞体栄養膜細胞内の核数/総核数) \times 100の計算式で合胞体化割合の算出をした。(C) ImageJを用いてDAPIで染色された核の大きさを定量した。**** $P < 0.0001$ by Steel-Dwass test.