

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

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命綱的に不可欠であり、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ってしま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、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極めて限定的であるうえ、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、胎児と母体を両輪で解析することは言うまでも無く、そのうえでさらに、「母体と胎児をつなぐ胎盤」に関する影響解析も集中的になされるべきであり、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必須と言える。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解析基盤を確立し、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) 胎盤バザード、(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、それら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の構築を試みた。

令和5年度における研究成果において、粒子径 10 nm の銀ナノ粒子 (nAg10) をモデルナノマテリアルとして供し、その胎盤毒性を探索 (スクリーニング) したところ、マウス胎盤形成期に静脈内投与することで、① nAg10 は胎盤に移行し得ることを示した。また、② 合胞体化の進行過程において、nAg10 はエンドサイトーシス経路からヒト妊娠性絨毛癌細胞株である BeWo 細胞内に取り込まれることを見出した。さらに、③ 銀ナノ粒子がヒストン脱アセチル化酵素の活性を抑制し、その作用は粒子径が小さくなるほど強い傾向を示すことが明らかとなった。これら知見は、未だ十分に理解されていないナノマテリアルの生殖発生毒性の理解に向けて、胎盤毒性の観点からのリスク解析の必要性を初めて示すものである。以上、ナノマテリアルを含む化学物質への曝露と胎盤毒性に関する科学的根拠を収集し、胎盤毒性機序を考慮した「新たな生殖発生毒性の評価手法」を構築につながる知見を多く見出した。本研究の成果が、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、リスク評価に係る新たな政策形成のための知見の提供に寄与することを期待する。

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) 胎盤バザード、(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、それら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の構築を試みた。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

銀ナノ粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が5、10、30、70 nm (nAg5、nAg10、nAg30、nAg70) のものを使用した。なお、以後の検討で銀ナノ粒子分散液を培地で希釈する際には、凝集を防ぐため、蛋白質によりコーティングした後に実験に供した。具体的には、原液の銀ナノ粒子と20 mg/mLウシ血清アルブミンを等量ずつ混合し、1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後に、銀ナノ粒子分散液を培地で各濃度に希釈した。金ナノ粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が10 nm (nAu10) のものを使用した。使用直前に1分間ボルテックスミキサーで攪拌した後、必要な濃度の粒子分散液を調製した。

2. 細胞培養

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるBeWoは、非働化处理をした10%ウシ胎児血清 (FBS)、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液を含むHam's F-12を用いて培養した。ヒト妊娠性絨毛癌細胞株であるJEG-3は、非働化处理をした10% FBS、1%ペニシリン-ストレプトマイシン-アムホテリシンB懸濁液を含むDMEMを用いて培養した。

3. HDACの活性変動評価

各濃度に調製した nAg10 と各 HDAC 酵素を混合し、37°Cで30分間インキュベートさせることで活性を測定した。HDACの活性は、Fluorogenic AssayKitのプロトコールに準じて測定した。

4. BeWoにおける nAg10の細胞内取り込み経路の解明

4°C条件における nAg10 の BeWo 細胞への取り込み評価については、細胞を4°C条件で1時間培養した後、nAg10 (0.156 µg/mL) を添加し、さらに4°Cで3時間培養した。BeWo細胞における nAg10 の細胞内取り込みとエンドサイトーシス経路との関連解析については、マクロピノサイトーシスに対する阻害実験では、細胞に5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) を終濃度100 µMにて3時間添加した後、終濃度50 µMのforskolinと0.156 µg/mLのnAg10を3時間処置して細胞を回収した。クラスリン依存性エンドサイトーシス、および、カベオラ依存性エンドサイトーシスに対する阻害実験では、細胞にChlorpromazine hydrochloride (CPZ) を終濃度10 µg/mL、および、Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を終濃度2.5 mMで1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度50 µMのforskolinと0.156 µg/mLのnAg10を3時間処置して細胞を回収した。銀量は誘導結合プラズマ質量分析 (Agilent 7700 Series ICP-MS) により測定した。

5. ICP-MSによる銀濃度測定

回収した細胞を超純水で懸濁した後超純水と同量の混酸で処理し、37°Cで1時間振盪した後ICP-MSに供した。また、PBSでホモジネートした胎仔、胎盤を超純水で希釈した混酸で処理し、37°Cで1時間振盪した。得られた試料、ならびに、血液を超純水で100倍希釈し、ICP-MSに供した。

6. 銀ナノ粒子の単層細胞膜透過性

ポアサイズ 3.0 µm、膜面積 0.3 cm² の Polyethylene terephthalate メンブレンを有する24ウェルのセルカルチャーインサートにJEG-3を播種し、24時間から48時間毎に培地を交換しながら、約20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、24時間から48時間毎に20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積算して細胞層のTEER値 (ohms × cm²) とした。TEER値がプラトーに達した後、DMEMを用いて目的の濃度とした被験物質をapical側に添加し、添加0、1、3、6、24、48時間後にサンプリングした。Apical側、Basal側の銀量はICP-MSによりそれぞれ測定した。

7. 妊娠マウスへの nAg10 単回投与後の胎盤、胎児移行性

妊娠 10.5 日目の BALB/cCrSlc マウスに、グルコース溶液または nAg10 (0.078、0.3125、1.25 mg/kg) を尾静脈内より単回投与し、妊娠 15.5 日目に解剖を行い、胎仔重量および胎盤重量を測定した。回収した血液、胎仔、胎盤における銀量を ICP-MS により測定した。本研究における動物実験は、大阪大学動物実験規程に準じた。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得ないが、動物愛護の精神を遵守しつつ行うものである。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針（文科省の指針）」に準拠し、大阪大学の各所属研究科の動物実験規程に則り行う。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属部署の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受ける（関連研究は既に承認を受けている）。

本研究では、ナノマテリアルを使用した、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、研究を推進するものである。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. nAg10 がヒストン脱アセチル化酵素におよぼす影響評価

胎盤の発達は胎盤栄養膜細胞が合胞体栄養膜細胞を形成すること（合胞体化）から始まり、合胞体栄養膜細胞は胎児と母体の栄養交換などに関与することで、継続的に妊娠の過程に貢献する。この合胞体化の過程は、エピジェネティックな変化の一つであるヒストンアセチル化による制御を受けることが明らかとされつつある。そこで本検討では、nAg10 曝露による胎盤合胞体化の抑制メカニズムの解明に向けて、ヒストンアセチル化へ

の影響の観点から評価することとした。

nAg10 そのものに対する HDAC（ヒト胎盤および BeWo 細胞で発現が認められ、合胞体化進行過程への関与が知られている HDAC1、HDAC2、HDAC3、HDAC4、HDAC5 を選択した）の活性変動を評価した。その結果、40 µg/ml において、HDAC1（図 1A）、HDAC2（図 1B）、HDAC3（図 1C）、HDAC4（図 1D）、HDAC5（図 1E）いずれの活性も有意に抑制され、処置濃度依存的にその活性が低下することが示された。一方で、昨年度までの検討で合胞体化への影響が認められなかった nAu10 を用い同様の解析を実施したところ、HDAC1 の活性に対する有意な変動は認められなかった（図 2）。さらに、銀ナノ粒子の粒子径の違いによる影響を評価した。なお、銀ナノ粒子はイオンを遊離することが知られていることから、硝酸銀を対照群として用いた。その結果、銀イオン、ならびに、nAg30、nAg70 のいずれも HDAC1（図 3A）、HDAC5（図 3B）の活性低下を示すことが明らかとなり、その程度は、銀ナノ粒子の粒子径が大きくなるにつれて減弱する傾向を示した。

今後、nAg10 による HDAC の活性変動が、胎盤の形成と機能維持に影響を与える可能性を追究するため、BeWo に nAg10 を曝露した際の HDAC 活性への影響と共に、ヒストンアセチル化の変動なども評価していく。さらに、ナノ粒子の素材の違いだけでなく、物性（粒子径など）の違いによる合胞体化への影響についても追究していく。これら検討を通じ、nAg10 の曝露が胎盤栄養膜細胞に及ぼす影響をエピジェネティックな観点からメカニズムを解析することで、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図る。

2. BeWo における nAg10 の細胞内取り込み経路の解明

合胞体化誘導時における nAg10 の細胞内取り込み経路について明らかとすることで、メカニズム解明に資する知見の集積を試みた。まず、nAg10 の細胞内取り込みがエネルギー依存的であるかどうかを検討するために BeWo を 4℃条件で 1 時間培養した後、nAg10 を添加し、さらに 4℃で 3 時間培養した。この時の細胞内銀量を ICP-MS により解析したところ、4℃条件では、37℃条件と比較し、nAg10 の細胞内取り込み量が有意に減少した（図 4A）。従って、nAg10 がエネルギー依存的に細胞内に取り込まれることが示

唆された。

エンドサイトーシス経路には、マクロピノサイトーシス、クラスリン依存性エンドサイトーシス、カベオラ依存性エンドサイトーシスといった経路が存在する。そこで、nAg10の細胞内取り込み経路を精査する目的で、各取り込み経路に対する阻害剤を処置した際のnAg10の細胞内取り込みを評価した。その結果、EIPA（マクロピノサイトーシス阻害剤）（図4B）、および、M β CD（カベオラ依存性エンドサイトーシス阻害剤）（図4C）を処置した際には、未処置群と比較し、nAg10の細胞内取り込み量に有意な変動は認められなかったものの、CPZ（クラスリン依存性エンドサイトーシス阻害剤）を処置することで、nAg10の細胞内取り込み量が有意に減少することが明らかとなった（図4D）。従って今後は、CPZを処置してクラスリン依存性エンドサイトーシスを阻害した際の、nAg10による合胞体化抑制への影響について追究することで、メカニズム解明に資する知見の集積を図る。

5. nAg10 単回尾静脈内投与後のマウス胎盤・胎仔移行量の評価

昨年度までに、nAg10が*in vivo*レベルでも胎盤形成や妊娠結果に影響を及ぼすかについて、妊娠マウスを用いて解析したところ、nAg10が胎盤形成に対してハザードを呈することが示唆された。今後、本結果について多角的な視点から考察するうえで、胎盤や胎仔へのnAg10の移行量を追究していくことが重要である。そこで本検討では、nAg10の胎盤や胎仔への移行性を評価した。妊娠10.5日目の妊娠マウスにnAg10（0.078、0.3125、1.25 mg/kg）を尾静脈内より単回投与し、妊娠15.5日目に母体血液（図5A）、胎盤（図5B）、胎仔（図5C）を回収し、その銀量をICP-MSにより解析した。その結果、いずれの群においても胎仔中には銀が検出されなかったものの、0.3125 mg/kg投与群、1.25 mg/kg投与群において、母体血液、胎盤から銀が検出された。従って、高濃度投与群では銀ナノ粒子が胎盤へ移行する可能性が示された。今後、曝露実態を鑑み、経肺（吸入）、経皮、経口曝露後の胎盤・胎仔移行性のみならず、胎盤形成や妊娠結果におよぼす影響についても検討していく予定である。

6. 銀ナノ粒子の胎盤透過性評価

化学物質の胎児に対するリスクを把握するに

あたって、母親が曝露した化学物質は胎盤を透過し、胎児へ移行することから、胎盤における動態情報が求められる。そこで、物性の異なるNMが胎盤透過性、ならびに、胎児側への移行性に及ぼす影響を評価することで、NMのリスク解析に資する動態情報の集積を試みた。トランスウエルセルカルチャーインサートにヒト絨毛由来JEG-3細胞株を播種し、経時的にTEER値を測定した。TEER値がプラトーに達したことを確認できた時点で、nAg5（図6A）、nAg10（図6B）、nAg30（図6C）、nAg70（図6D）をそれぞれapical側に添加した。なお、各銀ナノ粒子の添加濃度は、細胞障害性が認められない0.0623 μ g/mlに設定した。添加0、1、3、6、24、48時間後にapical側、basal側から培地を回収し、各銀ナノ粒子の透過量を算出した。その結果、いずれの粒子径の銀ナノ粒子もapical側の銀量は減少していたものの、basal側には移行しないことが示された。従って、本条件では、銀ナノ粒子はJEG-3単層膜を透過しないものの、絨毛細胞内に取り込まれる可能性が考えられた。

E. 結論

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. Ikuno Y., Tsujino H., Haga Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Impact of degradation of polyethylene particles on their cytotoxicity., *Microplastics*, 2(2): 192-201, 2023.
2. Martin, Watanabe R., Hashimoto K., Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y., Mizuguchi K. : Evidence-based prediction of cellular toxicity for amorphous silica nanoparticles., *ACS Nano*, 17(11): 9987-99, 2023.
3. Kitahara G., Higashisaka K., Nakamoto Y., Yamamoto R, Okuno W., Serizawa M., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid induces HIF-1 α -mediated CGB expression elevation and glucose uptake suppression in BeWo cell., *J. Toxicol. Sci.*, 49(2): 69-77, 2024.
4. Ikuno Y., Tsujino H., Haga Y., Manabe S., Idehara W., Hokaku M., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Polyethylene, whose surface has been modified by UV irradiation, induces cytotoxicity: A comparison with microplastics found in beaches., *Ecotoxicol. Environ. Saf.*, 277: 116346, 2024.

【総説・その他】

1. 東阪和馬, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化粧品ナノマテリアルの安全性評価—獲得免疫系を介したハザード解析とその機序解明., *Fragrance Journal.*, 51(7): 25-29, 2023.
2. 堤 康央, 辻野博文 : マイクロ・ナノプラスチックのヒト健康影響の解明に向けて., *Yakugaku Zasshi.*, 144(2): 163-4, 2024.
3. 辻野博文, 生野雄大, 芳賀優弥, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央 : 環境中の表面性状を模倣した劣化マイクロプラスチックの作製., *Yakugaku Zasshi.*, 144(2): 171-5, 2024.

4. 芳賀優弥, 真鍋颯太, 辻野博文, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央:劣化したマイクロプラスチックが示す細胞毒性機序の解明., *Yakugaku Zasshi.*, 144(2): 177-81, 2024.
5. 東阪和馬, 芳賀優弥, 堤 康央 : 化学物質の胎盤毒性解析とその評価手法の開発., *細胞.*, 56(3): 30-4, 2024.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬 : ナノマテリアルの社会受容に向けた安全性研究の現状と今後. ナノインク懇話会, 大阪 (大阪) , 2023年6月.
2. 東阪和馬 : 脆弱な世代に対する金属ナノ粒子の健康影響評価と安全性確保に向けて., *メタルバイオサイエンス研究会 2023*, 岐阜 (岐阜) , 2023年10月. (シンポジウム: 微小金属粒子のバイオサイエンス: 測定から生体応答まで)
3. 堤 康央: 微粒子との環境共生に向けて., *日本薬学会第144年会.*, 横浜 (神奈川) , 2024年3月. (シンポジウム: 微粒子との環境共生研究 up-to-date 2024)
4. 東阪和馬 : ヒトと微粒子との環境共生に向けたナノマテリアルの物性とハザード発現との関連解析., *日本薬学会第144年会.*, 横浜 (神奈川) , 2024年3月. (シンポジウム: 微粒子との環境共生研究 up-to-date 2024)
5. 東阪和馬 : 脆弱世代の健康確保に向けた化学物質の胎盤毒性解析., *日本薬学会第144年会.*, 横浜 (神奈川) , 2024年3月. (シンポジウム: 胎盤機能に関する基礎・臨床的研究と創薬研究への展開)
6. 芳賀優弥 : 多種多様なマイクロプラスチックによる毒性発現機序の理解., *日本薬学会第144年会.*, 横浜 (神奈川) , 2024年3月. (シンポジウム: マイクロ・ナノプラスチック研究の最前線-ヒトリスク評価に向けた取り組みと課題-)

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 食品関連製品に含まれるナノマテリアルの神経細胞分化への影響解析., *日本食品化学学会第29回総会・学術大会.*, 富山 (富山) , 2023年6月.
2. 泉谷里奈, 東阪和馬, 坂橋優治, Seo Jiwon,

- 宮地一輝, 芳賀優弥, 辻野博文, 堤 康央 : ナノマテリアル曝露が妊娠準備から着床期に及ぼす影響評価., 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023 年 6 月.
3. 山本怜奈, 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカ曝露による胎盤炎症応答の解析., 日本食品化学学会第 29 回総会・学術大会., 富山 (富山), 2023 年 6 月.
 4. 東阪和馬, 北原 剛, 仲本有里菜, 山本怜奈, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : バルブロ酸が胎盤機能へ及ぼす影響評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川県), 2023 年 6 月.
 5. 仲本有里菜, 東阪和馬, 北原 剛, 山本怜奈, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : バルブロ酸が胎盤のトリプトファン輸送トランスポーターに与える影響評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川県), 2023 年 6 月.
 6. 奥村 萌, 芳賀優弥, 辻野博文, 東阪和馬, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカ粒子の細胞内取り込みと経鼻投与後の動態評価., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川県), 2023 年 6 月.
 7. Seo Jiwon, 東阪和馬, 坂橋優治, 泉谷里奈, 宮地一輝, 辻野博文, 芳賀優弥, 堤 康央 : ナノマテリアル曝露による合胞体化抑制のエピジェネティックな観点からのメカニズム解析., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川県), 2023 年 6 月.
 8. 真鍋颯太, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央 : 紫外光により劣化したマイクロプラスチックはオートファジー依存的な細胞死を誘導する., 第 50 回日本毒性学会学術年会., 横浜 (神奈川県), 2023 年 6 月.
 9. 東阪和馬, 坂橋優治, 辻野博文, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央 : ナノマテリアルの安全性確保に向けた胎盤細胞合胞体化への影響解析., 第 48 回日本化粧品学会., 東京 (東京), 2023 年 6 月.
 10. 小林純大, 東阪和馬, 謝 燕坤, 奥野和香子, 村中瑞希, 芳賀優弥, 堤 康央 : 非晶質ナノシリカ粒子の胎盤透過性及び胎盤細胞取り込み評価., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫), 2023 年 10 月.
 11. 出原若葉, 芳賀優弥, 辻野博文, 生野雄大, 真鍋颯太, 浅原時泰, 東阪和馬, 堤 康央 : 劣化したマイクロプラスチックの細胞内取り込み機構の解明に向けた検討., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫), 2023 年 10 月.
 12. 奥野和香子, 東阪和馬, 小林純大, 謝 燕坤, 村中瑞希, 芳賀優弥, 堤 康央 : Forskolin 誘導性の BeWo 細胞合胞体化過程に対するバルブロ酸の影響評価., 第 73 回日本薬学会関西支部総会・大会., 神戸 (兵庫), 2023 年 10 月.
 13. 東阪和馬, 坂橋優治, 芳賀優弥, 中島彰俊, 堤 康央 : 胎盤細胞の合胞体化に着目したナノ粒子の安全性評価研究., 第 31 回日本胎盤学会学術集会., 福岡 (福岡), 2023 年 11 月.
 14. 佐伯悠真, 東阪和馬, 泉谷里奈, Seo Jiwon, 宮地一輝, 芳賀優弥, 堤 康央 : 銀ナノ粒子の雄親曝露が妊娠転帰に及ぼす影響の評価., 日本薬学会第 144 年会., 横浜 (神奈川県), 2024 年 3 月.
- 【国際学会発表】**
1. Higashisaka K., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Nakashima A., Tsutsumi Y. : Silver nanoparticles suppress forskolin-induced syncytialization in BeWo cells., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
 2. Haga Y., Okumura M., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : Cellular uptake and distribution after intranasal administration of amorphous silica nanoparticle., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
 3. Manabe S., Haga Y., Tsujino H., Asahara H., Ikuno Y., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The mechanisms of autophagy-dependent cell toxicity caused by degraded microplastics., The 10th International Congress of Asian Society of Toxicology, Taipei (Taiwan), 17-20 July, 2023.
 4. Higashisaka K., Kitahara G., Nakamoto Y.,

- Yamamoto R., Sakahashi Y., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid induces HIF-1 α -mediated CGB expression elevation and glucose uptake suppression in BeWo cell., 57th Congress of the European Societies of Toxicology, Ljubljana (Slovenia), 10-13 September, 2023.
5. Kobayashi J., Higashisaka K., Xie Y., Okuno W., Haga Y., Suzuki R., Utoguchi N., Tsutsumi Y. : Cellular uptake and permeability of silica particles with different size in placental cells, 2023 international joint meeting of the 23rd International Conference on Cytochrome P450 and the 38th Annual Meeting of the Japanese Society for the Study of Xenobiotics, Shizuoka (Shizuoka), 26-29 September, 2023.
 6. Higashisaka K., Kitahara G., Nakamoto Y., Yamamoto R., Tsujino H., Haga Y., Tsutsumi Y. : Valproic acid elevates HIF-1 α -mediated CGB expression and suppresses glucose uptake in BeWo cells., AAPS 2023 PharmSci 360, Orlando (USA), 22-25 October, 2023.
 7. Haga Y., Okumura M., Tsujino H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The effect and distribution of amorphous nanosilica particle in the brain and microglial cells., AAPS 2023 PharmSci 360, Orlando (USA), 22-25 October, 2023.
 8. Higashisaka K., Haga Y., Tsutsumi Y. : Cell-mediated immunity exacerbates amorphous silica nanoparticles-induced hepatic damage., American College of Toxicology 2023 Annual Meeting, Orlando (USA), 12-15 November, 2023.
 9. Haga Y., Manabe S., Tsujino H., Ikuno Y., Asahara H., Higashisaka K., Tsutsumi Y. : The Mechanisms of Degraded Microplastics-Induced Cell Toxicity., American College of Toxicology 2023 Annual Meeting, Orlando (USA), 12-15 November, 2023.
- 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

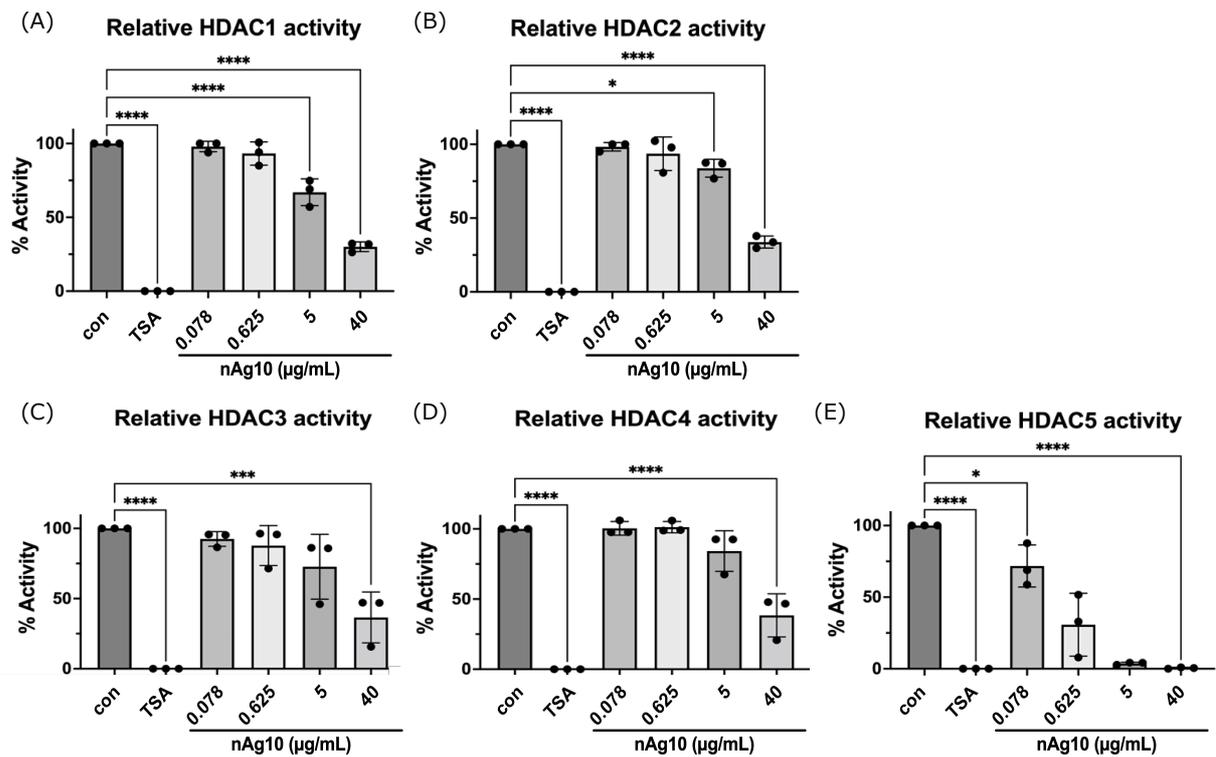


図1：nAg10がヒストン脱アセチル化酵素の活性におよぼす影響評価
nAg10による (A) HDAC1、(B) HDAC2、(C) HDAC3、(D) HDAC4、(E) HDAC5の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。各群のHDAC活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準して比較した。* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ by Dunnett's method.

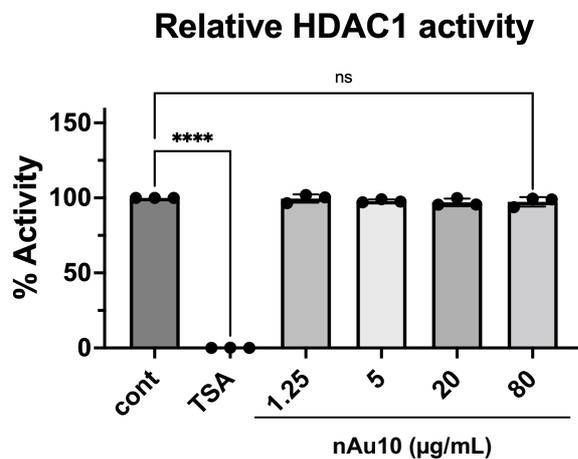


図2：nAu10がヒストン脱アセチル化酵素1の活性におよぼす影響評価
nAu10によるHDAC1の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。HDAC1活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準して比較した。ns: not significant, **** $P < 0.0001$ by Dunnett's method.

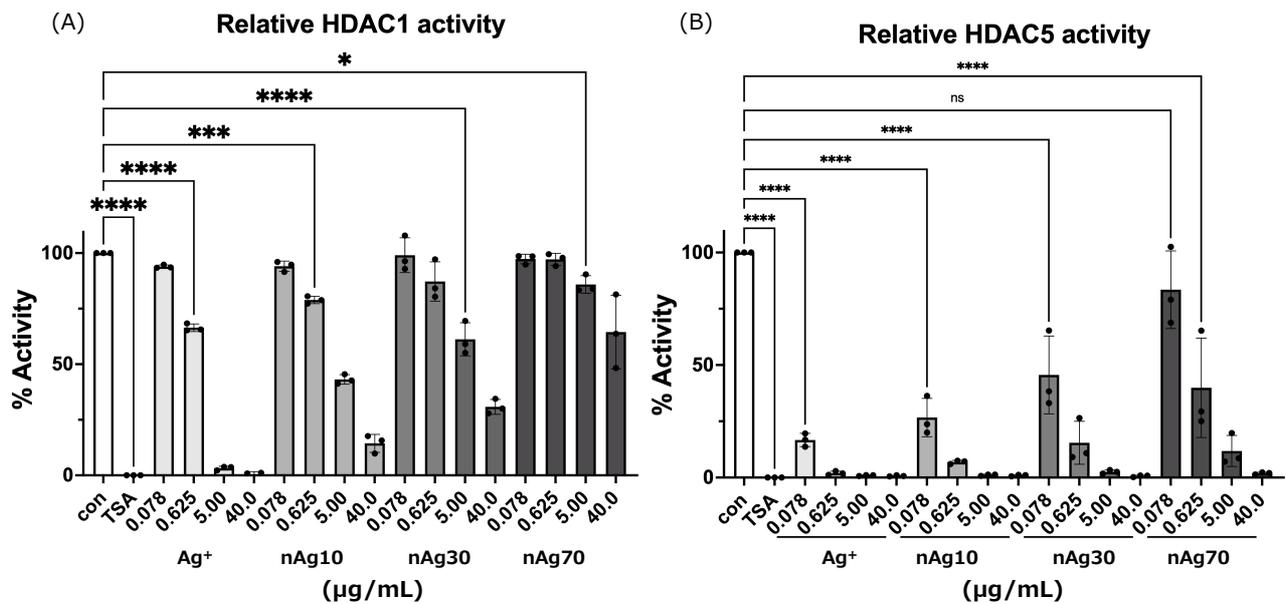


図3 : Ag⁺、nAg10、nAg30、nAg70がヒストン脱アセチル化酵素 (HDAC1、HDAC5) の活性におよぼす影響評価
 Ag⁺、nAg10、nAg30、nAg70による (A) HDAC1、(B) HDAC5の活性変動をHDAC fluorogenic assayを用いて評価した。各群のHDAC活性は、TSA曝露群を0、非曝露群を100として標準化して比較した。ns: not significant, **P* < 0.05, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001 by Dunnett's method.

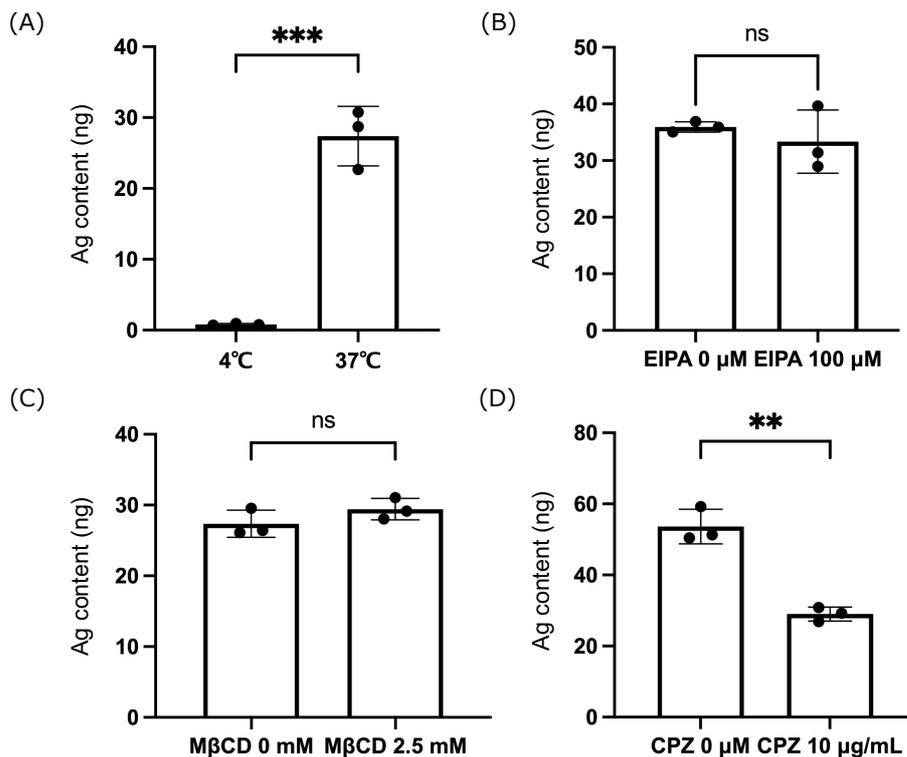


図4 : BeWoにおけるnAg10の細胞内取り込み経路の解明

(A) BeWoを4°C条件で1時間培養した後、nAg10 (0.156 μg/mL) を添加し、さらに4°Cで3時間培養した。(B) 5-(N-Ethyl-N-isopropyl)-Amiloride (EIPA) を終濃度100 μMにて3時間添加した後、終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。(C) Methyl-β-cyclodextrin (MβCD) を終濃度2.5 mMで1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。(D) Chlorpromazine hydrochloride (CPZ) を終濃度10 μg/mLで1時間処置した後、阻害剤存在下で終濃度50 μMのforskolinと0.156 μg/mLのnAg10を3時間処置した。その後、細胞を回収し、細胞内銀量をICP-MSにより測定した。Data are presented as mean ± SD (n = 3). ns, not significant, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001 by student's t-test.

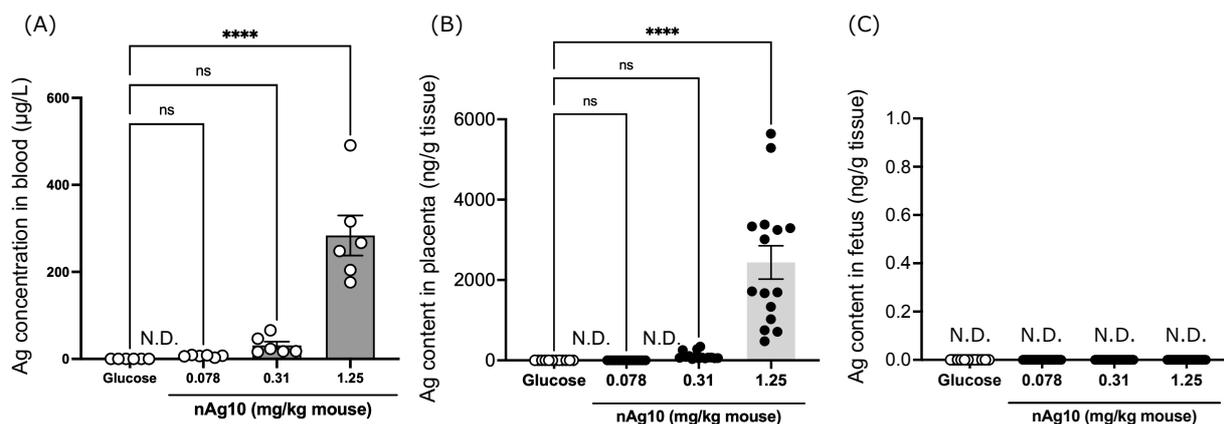


図5：妊娠マウスへのnAg10単回投与後の胎盤、胎児移行性

妊娠10.5日目のBALB/cCrSlcマウスに、グルコース溶液またはnAg10（0.078、0.3125、1.25 mg/kg）を尾静脈内より単回投与し、妊娠15.5日目に解剖を行い、(A) 血液、(B) 胎盤、(C) 胎仔における銀量をICP-MSにより測定した。Data are presented as mean ± SEM. N.D., not detect, **** $P < 0.0001$ by dunnett-test (N.D.を0として統計解析を実施)

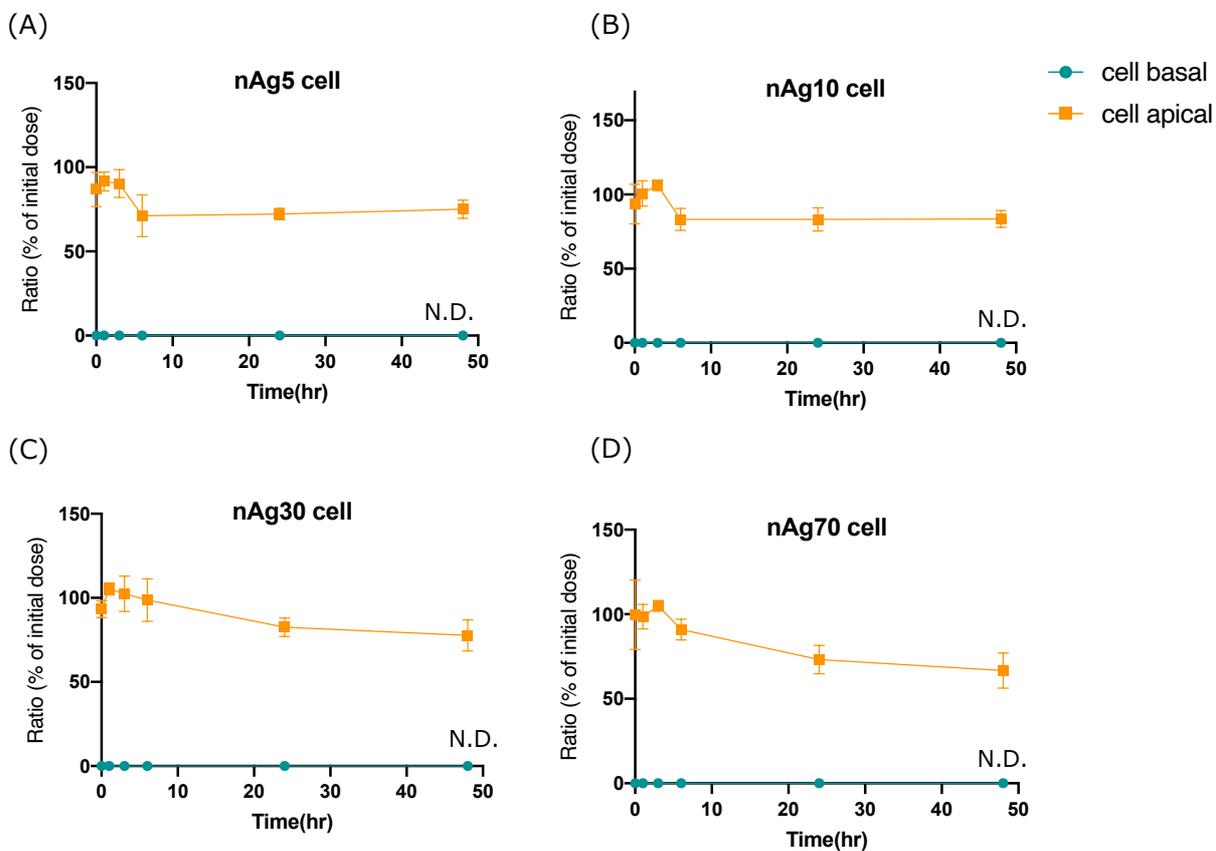


図6：銀ナノ粒子のJEG-3単層膜透過性の評価

JEG-3をセルカルチャーインサートに播種し、培養することで、単層膜を形成させた。TEER値がプラトーに達したことを確認できた時点で、細胞障害性の認められない0.0625µg/mlの濃度で、(A) nAg5、(B) nAg10、(C) nAg30、(D) nAg70をapical側に添加し、添加から0、1、3、6、24、48時間後にサンプリングした。Apical側、Basal側の銀量をICP-MSにより測定し、0時間におけるapical側の銀量を100%としてapical側、basal側の銀量の割合を算出した。Data are presented as mean ± SD (n=3).