

ナノマテリアルの生殖発生毒性解析

研究代表者 東阪和馬 大阪大学高等共創研究院（兼任部局 薬学研究科） 准教授

研究要旨

昨今、従来素材と比較して、優れた有用機能を有するナノマテリアル（NM）が続々と開発され、既に食品分野を含めた多くの領域で活用されている。そのため、妊婦/胎児/乳幼児などの脆弱世代でも、NMのばく露を避け得ないものの、NMはその微小さ故に、予期せぬ毒性を誘発することが危惧されている。特に、化学物質に高感受性な脆弱世代に対する安全性評価の重要性が世界的にも指摘されているが、NMの安全性については、未だ理解が十分とはいえない。従って、NMのリスク評価に向けては、脆弱世代に対するNMの安全性評価に資する知見の集積と、食品分野におけるNMのばく露量の推計に係る基礎情報の収集が解決すべき喫緊の課題であり、得られた知見を踏まえ、将来的な規格基準策定の必要性の是非を検討することが不可欠である。そこで本研究では、胎児の成長の基盤となる胎盤での毒性発現という観点から、ナノマテリアルが生殖・発生に及ぼす影響を解析することで、ナノマテリアルの物性-動態-毒性の連関解明・閾値追求・毒性学的指標の設定を図ると共に、食品分野におけるナノマテリアルのばく露量分布の推定を試みる。

2025年度研究では、NMばく露による妊娠結果への影響を評価する目的で、マウスの妊娠後期にあたる妊娠15.5日目から17.5日目にマウスに対して、粒子径10 nmの銀ナノ粒子、ならびに、粒子径10 nm、100 nm、1000 nmの非晶質シリカを連日経口投与した。妊娠期間中、対照群と比較して、母体体重に有意な変動は認められなかった。一方で、妊娠18.5日目に解剖後、子宮、胎仔、胎盤の重量をそれぞれ測定したところ、胎仔/胎盤重量比が有意に増加することが明らかとなり、子宮内環境の異常や胎盤機能不全が引き起こされることが示唆された。さらに、胎児の成長の基盤となる胎盤での毒性発現という観点から、NMが生殖・発生におよぼす影響を解析する目的で、胎盤を構成する栄養膜細胞の機能への影響をin vitroにて評価した。その結果、これまでの報告通り、粒子径10 nmの銀ナノ粒子が栄養膜細胞の細胞融合を抑制することが確認でき、一方で、粒子径30 nm、75 nmの銀ナノ粒子では認められなかったことから、銀ナノ粒子の粒子径の違いが栄養膜細胞の細胞融合におよぼす影響を規定し得ることが示された。加えて、食事由来のNMばく露量を推定するため、serving-size試料を対象とした銀ナノ粒子の分析法を開発した。本研究の成果ならびに関連する研究の成果については、国内外の論文や学会で発表することで、成果公開や情報発信を積極的に進めており、他の研究者との意見交換を図るなど、当初計画通り進めている。このように本研究は、我が国のナノ産業の育成・発展に寄与するのみならず、食品全般に含有されるNMの社会受容や恩恵享受を促進し、新技術を活用した安全で豊かな食社会の構築に貢献するものである。

研究分担者

鈴木美成・国立医薬品食品衛生研究所・食品部・第四室長

A. 研究目的

昨今、従来素材と比較して、優れた有用機能を有するナノマテリアル（NM）が続々と開発され、既に食品分野を含めた多くの領域で活用されている。そのため、妊婦/胎児/乳幼児などの脆弱世

代でも、NM のばく露を避け得ないものの、NM はその微小さ故に、予期せぬ毒性を誘発することが危惧されている。特に、化学物質に高感受性な脆弱世代に対する安全性評価の重要性が世界的にも指摘されているが、NM の安全性については、未だ理解が十分とはいえない。従って、NM のリスク評価に向けては、脆弱世代に対する NM の安全性評価に資する知見の集積と、食品分野におけ

るNMのばく露量の推計に係る基礎情報の収集が解決すべき喫緊の課題であり、得られた知見を踏まえ、将来的な規格基準策定の必要性の是非を検討することが不可欠である。

その点、これまでに研究代表者は、NMの物性-動態-毒性の連関解明に取り組んでおり、*in vitro*での検討において、銀ナノ粒子や非晶質ナノシリカが胎盤の形成過程に負の影響を及ぼすこと、また、マウスに経口ばく露した銀ナノ粒子が血中に移行し、生殖組織へ蓄積し得ることを見出すなど、生殖・発生に着目したNMの安全性評価を推進してきた。さらに、研究分担者である鈴木は、食品に含有・付着している無機NMの実態解明に取り組んでおり、ヒトが食品としてNMをばく露する可能性があることを提示してきた。これら知見を踏まえると、さらなる生殖発生毒性の探索とその毒性発現機構の解明が不可欠であり、そのうえで、食品分野におけるNMの実態を踏まえた生殖・発生に対する負の影響の評価・結果の解釈が、NMのリスク解析に向けた課題解決につながるものと期待される。そこで本研究では、胎児の成長の基盤となる胎盤での毒性発現という観点から、NMが生殖・発生に及ぼす影響を解析することで、NMの物性-動態-毒性の連関解明・閾値追求・毒性学的指標の設定を図ると共に、食品分野におけるNMのばく露量分布を推定することを目的とする。本研究を通じて、NMのばく露実態を踏まえた、生殖・発生に対するリスク評価およびリスク管理への提言が期待される。

B. 研究方法

ナノマテリアル

非晶質シリカ（粒子径 10 nm、100 nm、1000 nm）は、micromod Partikeltechnologie より購入した。使用直前に ULTRA SONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY で 400 W で 20 分間超音波処理し、1 分間ボルテックスミキサーで撹拌した後、必要な濃度の粒子分散液を調製した。

銀ナノ粒子は、表面をクエン酸修飾した、粒子径が 10、30、75 nm（nAg10、nAg30、nAg75）のものを使用した。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撹拌した後に、銀ナノ粒子分散液を培地で各濃度に希釈した。

実験動物

雌性の BALB/c 交配日確認マウスは、清水実験材料（Kyoto, Japan）より購入し実験に供した。マウスは、25 ± 2℃、各 12 時間の明暗サイクル環境下で飼育し、飲料水と MF（Oriental Yeast Co., Ltd., Tokyo, Japan）を常時与えた。また、本研究における実験動物の飼育及び実験は、大阪大学薬学研究科 3 号館動物室にて実施し、大阪大学動物実験規定に準じた。

培養細胞

ヒト妊娠性絨毛癌細胞株である BeWo は、JCRB 細胞バンク（Osaka, Japan; JCRB9111）より購入した。また、ヒト妊娠性絨毛外細胞株である HTR-8/SVneo は、ATCC（Manassas, VA, USA）より購入した。HTR-8/SVneo および BeWo の維持には、56℃で 30 分間の非働化処理した 10% ウシ胎児血清（FBS, Lot: 015BS427; Biological Industry, Beit Haemek, Israel）、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（Fujifilm Wako Pure Chemical, Osaka, Japan）を含む RPMI 1640 もしくは Ham's F-12（Fujifilm Wako Pure Chemical）を用い、37℃、飽和蒸気圧、5% CO₂ 条件下で培養した。

妊娠マウスへのナノマテリアルの投与

銀ナノ粒子による影響評価の検討では、妊娠 15.5 日目から 17.5 日目にグルコース溶液または粒子径 10 nm の銀ナノ粒子（nAg10 : 2.5 mg/kg/day）を連日経口投与した。非晶質シリカによる影響評価の検討では、妊娠 15.5 日目から 17.5 日目に生理食塩水または粒子径 10 nm、100 nm、1000 nm の非晶質ナノシリカ（nSP10、nSP100、mSP1000 : 125 mg/kg/day）をそれぞれ連日経口投与した。その後、妊娠 18.5 日目にイソフルラン（Fujifilm Wako Pure Chemical）麻酔下で解剖し、摘出した子宮、胎仔、胎盤の重量を測定した。

HiBiT system を用いた細胞融合評価

mCherry-HiBiT あるいは GFP-LgBiT を発現する BeWo 細胞を共培養し、合胞体化の誘導試薬である forskolin（50 μM; Cayman chemical, Ann Arbor, MI, USA）と共に、0.156 μg/mL の銀ナノ粒子（nAg10、nAg30、nAg75）ならびに銀イオン（Ag⁺）、あるいは、合胞体化の阻害剤

である H-89 (10 μ M; Cayman chemical) を 48 時間処置した。その後、Nano-Glo luciferase assay reagent (Promega, Madison, WI, USA) を 3 分間処置し、GloMax Discover Microplate Reader (Promega) を用いて発光を定量的に測定した。なお、mCherry-HiBiT-BeWo、GFP-LgBiT-BeWo は、東京薬科大学 内分泌薬理学教室 教授の田村和広先生、准教授の吉江幹浩先生より分与いただいた。

ELISA による胎盤ホルモン hCG β 産生量の評価

BeWo に終濃度 50 μ M に調製した forskolin を単独、もしくは各濃度の銀ナノ粒子 (nAg10、nAg30、nAg75) ならびに銀イオン (Ag^+) を 48 時間処置した。培養上清中の hCG β 濃度を ELISA にて測定した。ELISA kit は、Human CG beta Duoset ELISA (R&D systems, Minneapolis, MN, USA) を用い、プロトコルはデータシートに従った。

Real-time RT-PCR による各種遺伝子の mRNA 発現量の評価

各条件下で培養した細胞を PBS で wash したのち、FastGene RNA Basic Kit (FastGene, Tokyo, Japan) のプロトコルに準じて total RNA を抽出し、High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) を用いて逆転写することで cDNA とした。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) を混合し反応溶液を調製し、CFX384 (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) を用いて real-time RT-PCR を実施した。各群間での mRNA 発現量の比較は、GAPDH 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。

Migration Assay による遊走能評価

FBS 不含の RPMI 培地を用いて作成した HTR-8/SVneo 懸濁液を plate に播種したのち、各銀ナノ粒子を 0.3125 μ g/mL になるように添加し、24 well セルカルチャーインサートの上部インサートに 200 μ L で播種した。ボトム側には 10% FBS を含む RPMI 培地を 700 μ L 加えた。24 時間の培養後、4% PFA により室温で 15 分間、細胞を固定し、つづけて、0.1% CrystalViolet で

10 分間染色した。インサートの内側に残存する細胞については、綿棒を用いて除去し、一晚乾燥させた。その後、光学顕微鏡にて染色された細胞を撮影し、ImageJ により染色面積を算出した。この時、well 側に同様の条件で播種していた細胞に関しても同じように染色面積を算出し、対応する群のインサート側の染色面積を割ることで標準化した。

(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、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「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、大阪大学および大阪大学薬学研究科等の各所属機関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、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けている。

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

妊娠後期における NM のばく露が妊娠結果におよぼす影響評価

NM のばく露が妊娠結果におよぼす影響について評価するため、マウスの妊娠後期にあたる妊娠 15.5 日目から 17.5 日目に粒子径 10 nm の銀ナノ粒子 (nAg10: 2.5 mg/kg/day)、ならびに、粒子径 10 nm、100 nm、1000 nm の非晶質ナノシリカ (nSP10、nSP100、mSP1000: 125 mg/kg/day) をそれぞれ連日経口投与した。その後、妊娠 18.5 日目に帝王切開し母体、胎盤、

胎仔への影響を評価した。まず、nAg10 の投与では、母体体重推移（図 1a）、子宮重量（図 1b）、胎仔重量（図 1c）、胎盤重量（図 1d）に有意な差は認められなかったものの、対照群と比較し、胎仔/胎盤重量比（F/P ratio）が有意に増加した（図 1e）。今後、銀ナノ粒子の粒子径の違いが妊娠結果におよぼす影響と共に、銀ナノ粒子の用量依存性について評価していく。また、非晶質ナノシリカの投与によっても、母体体重推移に顕著な変化は認められなかった（図 1f）。さらに、子宮重量（図 1g）ならびに胎仔重量（図 1h）に有意な差は認められなかったものの、nSP10、mSP1000 投与群で胎盤重量の有意な減少が認められ（図 1i）、nSP10 投与群では F/P ratio の有意な増加が認められた（図 1j）。F/P ratio の増加は、母体の血流障害や栄養不足、あるいは、胎盤の機能不全などが原因として考えられる。従って、銀ナノ粒子ならびに非晶質ナノシリカが胎盤の構造・機能におよぼす影響や母体におよぼす影響についてさらに精査していくことが重要である。さらに、妊娠期ばく露後の動態のみならず、妊娠後期以外の時期におけるばく露が妊娠結果に与える影響についても精査する必要がある。

銀ナノ粒子が合胞体栄養膜細胞の機能におよぼす影響評価

NM の生殖・発生に対する毒性機構の解明に向けて、胎児の成長の基盤となる胎盤に着目し、NM による影響評価を試みた。胎盤の中でも主要な機能を有する栄養膜細胞は、ホルモン産生などを担う絨毛栄養膜細胞と、母体と胎児をつなぐ螺旋動脈のリモデリングを担う絨毛外栄養膜細胞に大別される。そこで、これらのモデル細胞株である、BeWo 細胞、HTR-8/SVneo 細胞を用い、銀ナノ粒子による胎盤機能への影響を評価した。

本検討では、nAg10 に加え、粒子径 30 nm、75 nm の銀ナノ粒子（nAg30、nAg75）を供し、各解析を実施した。研究代表者はこれまでに、nAg10 が絨毛栄養膜細胞同士の融合（合胞体化）を阻害し、胎盤ホルモンであるヒト絨毛性ゴナドトロピンβ（hCGβ、gene name; CGB）の産生低下を引き起こすことを報告している。そこで、銀ナノ粒子の粒子径の違いが胎盤合胞体化におよぼす影響を評価した。HiBiT あるいは LgBiT を搭載した BeWo 細胞を共培養し、合胞体化の誘導試薬である forskolin と共に、銀ナノ粒子（nAg10、nAg30、nAg75）ならびに銀イオン（Ag⁺）、あ

るいは、合胞体化の阻害剤である H-89 を 48 時間処置した。なお、作用濃度に対して細胞障害性が認められないことを確認している。その後、発光量を指標に細胞融合への影響を評価したところ、forskolin 単独処置群と比較して、nAg10 処置群で発光量が低下することが示されたものの、nAg30、nAg75 ならびに Ag⁺処置群では顕著な変動は認められなかった（図 2a）。また、同様の処置条件で培養した BeWo 細胞に対して、培養上清中の hCGβ産生量を ELISA にて解析したところ、これまでの報告通り、nAg10 処置群で hCGβ産生量が減少することが示され、一方で、nAg30、nAg75 ならびに Ag⁺処置群では顕著な変動は認められなかった（図 2b）。さらに、合胞体化マーカーである CGB（図 2c）、Syncytin-2（gene name; ERVFRD）（図 2d）の mRNA 発現量を real-time RT-PCR により解析したところ、これまでの結果と同様に、nAg10 の高用量群でのみ、forskolin 単独処置群と比較して、各 mRNA の発現が有意に抑制されることが示された。以上の結果から、形態学的な解析等が必要であるものの、nAg10 で認められた合胞体化の抑制は、銀ナノ粒子の粒子径の違いに規定される可能性が示された。今後は、nAg10 曝露により合胞体化の誘導が抑制される機序解明を進めると共に、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、並行して検討を進める。

銀ナノ粒子が絨毛外栄養膜細胞の遊走能におよぼす影響評価

絨毛外栄養膜細胞の特徴的機能である子宮螺旋動脈のリモデリング能に銀ナノ粒子が与える影響を評価するため、銀ナノ粒子処置による HTR-8/SVneo の細胞遊走能変化を Migration Assay を用いて観察した。その結果、いずれの銀ナノ粒子を処置した際にも、HTR-8/SVneo の遊走割合に有意な変動は認められず（図 3）、今回実験に供した銀ナノ粒子は HTR-8/SVneo 細胞の遊走能に影響を与えないことが示唆された。子宮螺旋動脈のリモデリングは、絨毛外栄養膜細胞の遊走・浸潤・置換のプロセスを経ることから、より多角的にリモデリング能への影響を評価することで、NM が絨毛外栄養膜細胞の機能におよぼす影響を精査していく。これら検討を通じて、銀ナノ粒子をはじめとした NM が胎盤の構造・機能形成におよぼす影響の理解を図る予定である。

E. 結論

国民の「食の安全・安心」に対する希求の高まりも相俟って、健康立国・技術立国である我が国から発信される食品関連製品については、高度に安全性が保障されたものでなければならない。しかし現状では、食品用途に使用される NM について、品質を評価・管理し、安全に製造・使用していくための規制は整備されていない。加えて、食品衛生法/化審法といった各種法令において、食品中の NM に言及した規制はなく、さらに、物性の違いによって、NM の動態・毒性発現が変動し得ることが理解されつつあるにも関わらず、NM を構成する化学物質の構造式（物質名）のみで議論されている。この点で、本研究の成果は、NM の物性の違いと胎盤毒性の発現、ならびに、ばく露実態情報との関連追求に基づいて、NM による健康影響の理解や毒性学的指標の設定だけでなく、ヒト健康に影響を及ぼしうる「定量値」の算出にも寄与する。そのうえで、今後のリスク評価の是非を議論するうえで不可欠な知見の提供や新たな政策形成にも貢献できる。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Yamamoto R., Higashisaka K., Sakai R., Nakamoto Y., Serizawa M., Haga Y., Tsutsumi Y. : Silica nanoparticles reduce fetal weight in mice and induce an inflammatory response in human extravillous trophoblast cells., *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 788: 152803, 2025.

【総説・その他】

1. 東阪和馬：ナノマテリアルの胎盤毒性解析と母子健康への影響評価. *Yakugaku Zasshi*, 164(4), 299-302, 2026.

2. 学会発表

【シンポジウム等】

1. 東阪和馬：ナノ粒子による生殖発生毒性の機構解明に資する胎盤毒性の解析. 第 52 回日本毒性学会, 沖縄（沖縄）, 2025 年 7 月.
2. 東阪和馬：ナノマテリアルの胎盤での動態解

析と、胎盤機能への影響評価., 日本動物学会第 96 回名古屋大会 2025, 名古屋（愛知）, 2025 年 9 月. (シンポジウム：イメージングで探る生命と環境との相互作用)

3. 東阪和馬：ナノサイズの粒子状物質が誘導する胎盤毒性影響., 第 103 回日本生理学会大会, 東京（東京）, 2026 年 3 月. (シンポジウム：次世代の化学物質評価を切り拓くバイオリソースとモデル系の最前線)

【国内学会発表】

1. 東阪和馬, 佐伯悠真, 謝 燕坤, 芳賀優弥, 堤 康央：サイズが異なる銀ナノ粒子の経口毒性解析., 日本食品化学学会第 31 回総会・学術大会., 草津（滋賀）, 2025 年 6 月.
2. 東阪和馬, 山本怜奈, 堺 梨紗, 芹澤杏萌, 芳賀優弥, 堤 康央：非晶質ナノシリカによる妊娠転帰への影響と胎盤細胞での起炎症性評価., フォーラム 2025：衛生薬学・環境トキシコロジー., 名古屋（愛知）, 2025 年 9 月.
3. 堺 梨紗, 東阪和馬, 山本怜奈, 芳賀優弥, 堤 康央：非晶質ナノシリカが胎盤におけるリモデリングに与える影響評価とその機序解明., フォーラム 2025：衛生薬学・環境トキシコロジー., 名古屋（愛知）, 2025 年 9 月.
4. Seo Jiwon, 東阪和馬, 宮地一輝, 佐伯悠真, 堺 梨紗, 三木理紗子, 芳賀優弥, 堤 康央：銀ナノ粒子の粒子サイズの違いが胎盤細胞合胞体化に及ぼす影響解析., 第 75 回日本薬学会関西支部総会・大会., 京田辺（京都）, 2025 年 10 月.
5. 佐伯悠真, 東阪和馬, Seo Jiwon, 宮地一輝, 堺 梨紗, 三木理紗子, 芳賀優弥, 堤 康央：粒子径の異なる銀ナノ粒子の経口投与後動態及び毒性評価., 第 75 回日本薬学会関西支部総会・大会., 京田辺（京都）, 2025 年 10 月.
6. 堺 梨紗, 東阪和馬, Seo jiwon, 宮地一輝, 佐伯悠真, 三木理紗子, 芳賀優弥, 堤 康央：非晶質ナノシリカの胎盤毒性の解明に向けた、リソソームの機能に与える影響評価., 日本薬学会第 146 年会., 吹田（大阪）, 2026 年 3 月.
7. 三木理紗子, 東阪和馬, Seo Jiwon, 宮地一輝, 佐伯悠真, 堺 梨紗, 芳賀優弥, 堤 康

央：非晶質ナノシリカが胎盤合胞体化に与える影響評価., 日本薬学会第 146 年会., 吹田（大阪）, 2026 年 3 月.

【国際学会発表】

1. Higashisaka K., Sakai R., Haga Y., Tsutsumi Y. : Cellular uptake and localization of silica nanoparticle in JEG-3 trophoblast cells., 59th Congress of the European Societies of Toxicology, Athens (Greece), 14-17 September, 2025.

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

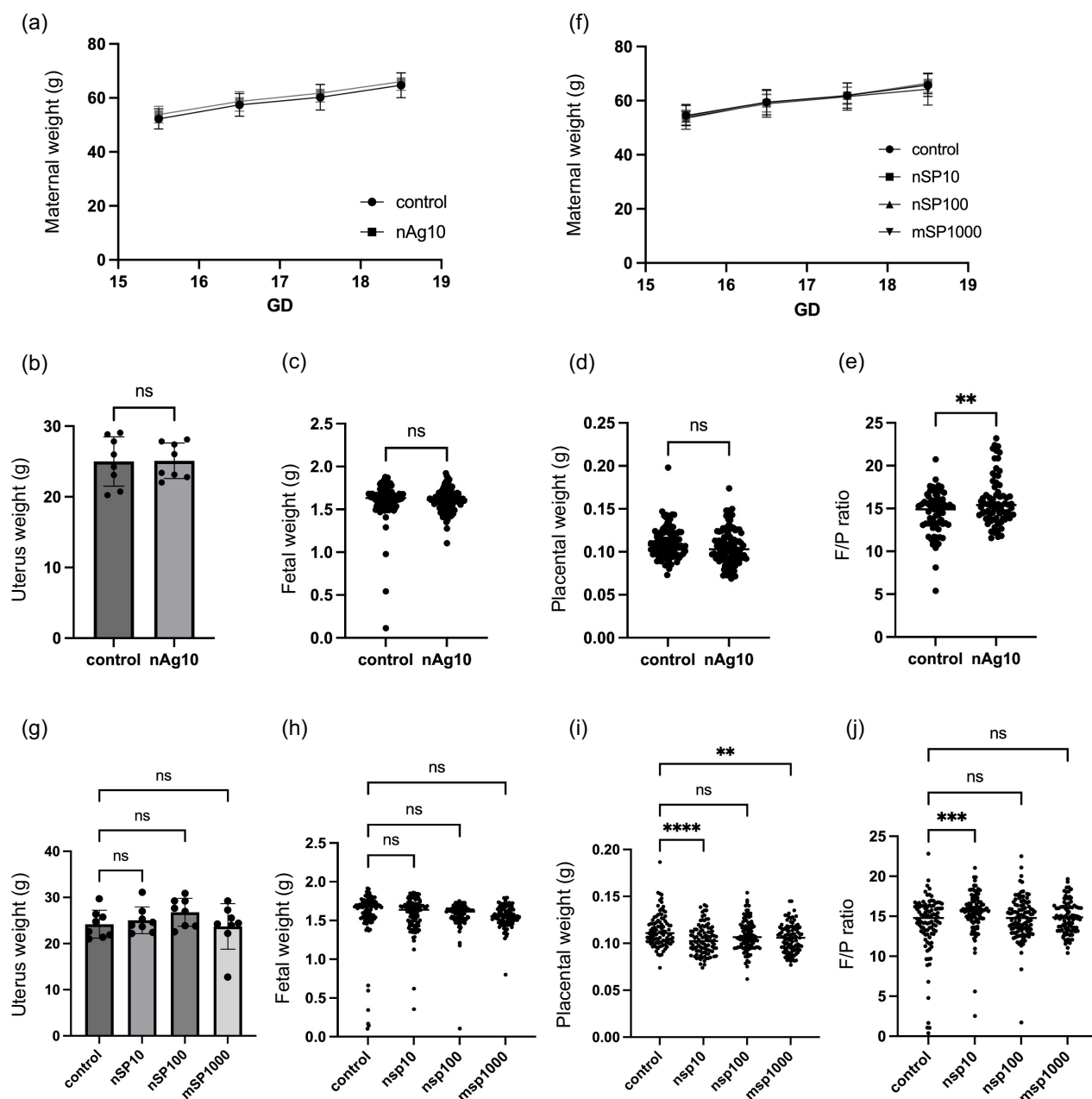


図1：妊娠後期におけるNMのばく露が妊娠結果におよぼす影響

ICRマウスに対し、グルコース溶液またはnAg10（2.5 mg/kg/day）を妊娠15.5日目から17.5日目に連日経口投与した。

(a) 投与期間中、母体体重を測定すると共に、妊娠18.5日目に麻酔下で解剖を実施し、(b) 子宮重量、(c) 胎仔重量、(d) 胎盤重量を測定し、(e) 胎仔/胎盤重量比（F/P ratio）を算出した。ICRマウスに対し、生理食塩水またはnSP10、nSP100、mSP1000（125 mg/kg/day）を妊娠15.5日目から17.5日目に連日経口投与した。(f) 投与期間中、母体体重を測定すると共に、妊娠18.5日目に麻酔下で解剖を実施し、(g) 子宮重量、(h) 胎仔重量、(i) 胎盤重量を測定し、(j) 胎仔/胎盤重量比（F/P ratio）を算出した。独立した施行を2回実施し（母獣、n = 4）、2回分の施行をまとめた結果をデータとして示している。Data are presented as mean ± S.E.M. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$. ns, not significant. (c-e) Control; n = 97, nAg10; n = 100. (h-j) Control; n = 98, nSP10; n = 102, nSP100; n = 108, mSP1000; n = 96.

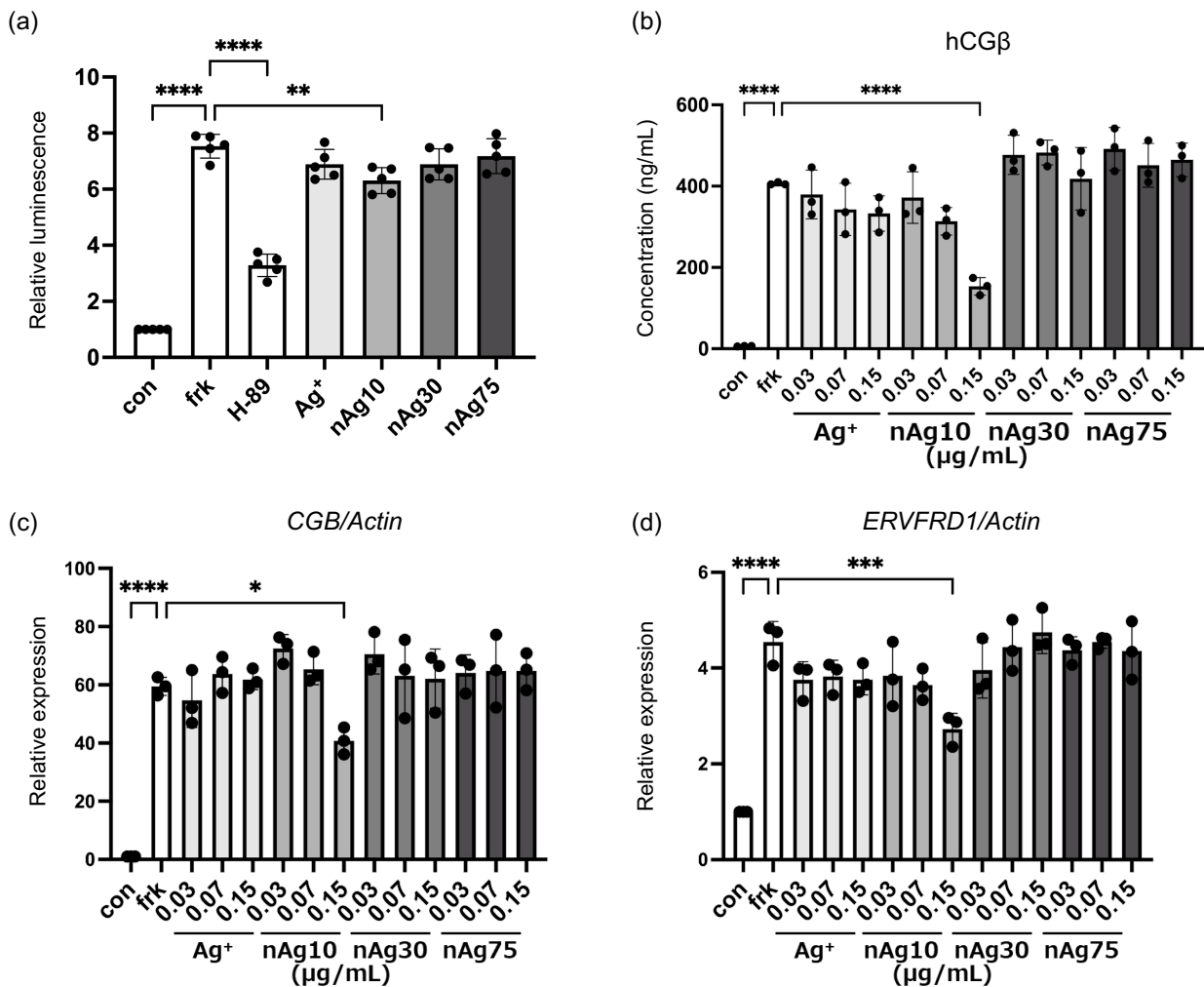


図2：粒子径の異なる銀ナノ粒子が合胞体栄養膜細胞の機能におよぼす影響評価

(a) HiBiTあるいはLgBiTを搭載したBeWo細胞を共培養し、合胞体化の誘導試薬であるforskolin (50 μM) と共に、0.156 μg/mLの銀ナノ粒子 (nAg10、nAg30、nAg75) ならびに銀イオン (Ag⁺)、あるいは、合胞体化の阻害剤であるH-89 (10 μM) を48時間処置した (n = 5)。その後、発光量を指標に細胞融合への影響を評価した。(b) BeWo細胞に合胞体化の誘導試薬であるforskolin (50 μM) と共に、各濃度の銀ナノ粒子 (nAg10、nAg30、nAg75) ならびに銀イオン (Ag⁺)、あるいは、合胞体化の阻害剤であるH-89 (10 μM) を48時間処置した (n = 3)。培養上清中のhCGβ産生量をELISAにて解析した。さらに、合胞体化マーカーである (c) CGB、(d) ERVFRD1のmRNA発現量をreal-time RT-PCRにより解析した。各群のmRNA発現量は、Actinで標準化することで比較した。Data are presented as mean ± S.D. *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001.

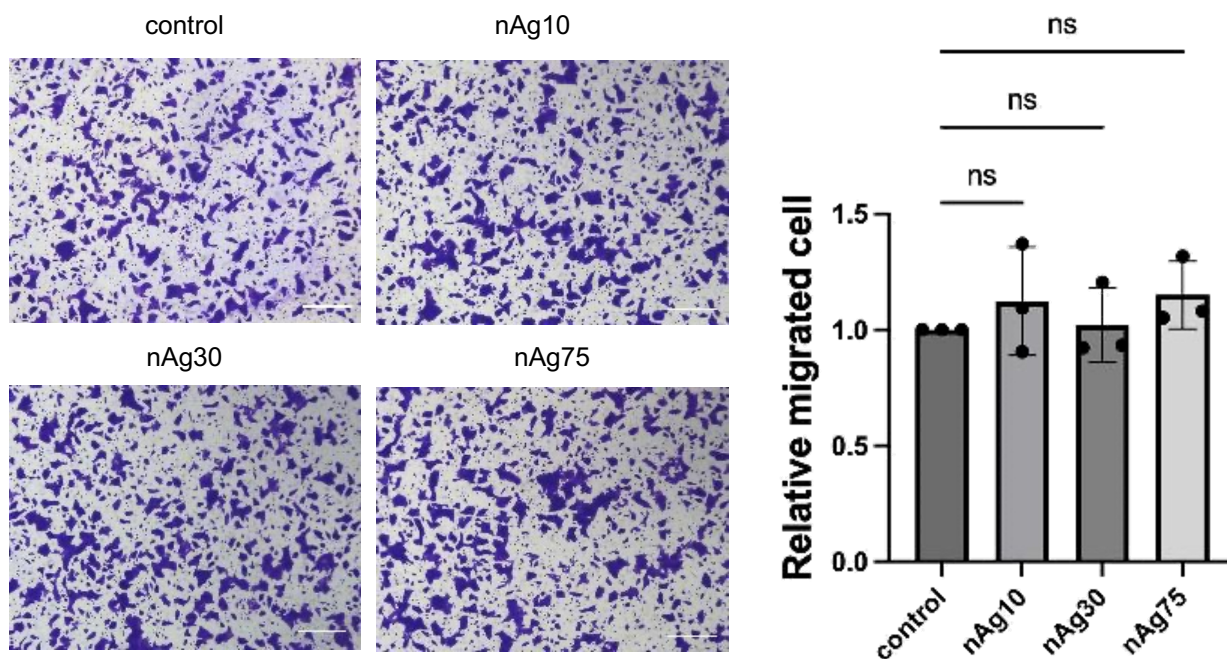


図3：粒子径の異なる銀ナノ粒子が絨毛外栄養膜細胞の遊走能におよぼす影響評価

FBS不含のRPMI培地を用いて作成したHTR-8/SVneo懸濁液に各粒子径の銀ナノ粒子（nAg10、nAg30、nAg75）を0.3125 μg/mLになるように添加し、24 well セルカルチャーインサートの上部インサートに200 μLで播種した。ボトム側には10%FBSを含むRPMI培地を700 μL加えた。24時間の培養後、4% PFAにより室温で15分間、細胞を固定し、つづけて、0.1% CrystalVioletで10分間染色した。インサートの内側に残存する細胞については、綿棒を用いて除去し、一晚乾燥させた。その後、光学顕微鏡にて染色された細胞を撮影し、ImageJにより染色面積を算出した。この時、well側に同様の条件で播種していた細胞に関しても同じように染色面積を算出し、対応する群のインサート側の染色面積を割ることで標準化した。n = 3. ns, not significant. Scale bar = 500 μm.