

日本医療研究開発機構 医薬品等規制調和・評価研究事業 事後評価報告書

公開

I 基本情報

研究開発課題名: (日本語) アドバンスドマテリアルを利用した医薬品・医療機器等の安全性評価に資する研究

(英語) Study contributing to safety evaluation of pharmaceuticals and medical devices using advanced materials

研究開発実施期間: 令和4年8月1日～令和7年3月31日

研究開発代表者 氏名: (日本語) 大野 彰子
(英語) Akiko Ohno

研究開発代表者 所属機関・部署・役職:

(日本語) 国立医薬品食品衛生研究所・ゲノム安全科学部・主任研究官

(英語) National Institute of Health Sciences, Division of Genome Safety Science, Senior Researcher

II 研究開発の概要

研究開発の成果およびその意義等

本研究では医薬品、医療機器への利用が期待されるアドバンスドマテリアル (AdMa) について、ヒトへの外挿が可能な発がん性、免疫毒性に関する *in vitro* 評価法の開発を行うことを目的とする。2022年12月にFDA近代化法2.0の成立をうけ動物実験代替法による安全性評価が益々必要となり、国際動向に対応するヒトへの外挿が可能な AdMa の安全性評価法の開発は急務の課題である。これらの手法を利用してアドバンスドマテリアルの発がん性・免疫毒性が明らかとなり、ヒトへの健康影響が評価可能と考える。

研究開発代表者は、AdMa の国際動向調査および被検物質である AdMa 物性測定を通じたデータ情報収集に取り組み、得られた知見を研究開発担当者2と3へのフィードバックをすることで、より精度の高い安全性評価データセットの構築に繋がり各研究開発項目の推進に貢献した。国際動向調査では、欧州の経済協力開発機構 (OECD) の AdMa の安全性評価に向けたステアリング・グループ (SG) 内で議論されたグラフェンの健康影響についてまとめた調査研究レビュー誌や、2023年5月に出席した Nanocarrier WS 内での米国 FDA によるナノ材料の毒性評価 (安全性評価) の有用性について議論した。2024年6月末にフランス・パリで開催された OECD の工業的ナノ材料作業部会国際会議 (WPMN24) において議論された、テストガイドラインやガイダンス策定に向けたプロジェクトの取り組み状況、および米国 EPA の国際動向について報告した。さらに、WPMN の日本代表団として、AMED-RS 本研究班の研究内容を「OECD WPMN Tour de table」に日本からのナノマテリアル研究として記載・提出し、各国のナノマテリアルの取り組みの状況と共に共有

された。被検物質の物理学的性状の進捗状況については、本研究班で扱う被検物質の一次粒子径に関して TEM/SEM による測定を実施し、二次粒子径は動的光散乱法 (DLS) を用いて測定した。国内の企業との共同研究で実施された細胞取込み試験に向けた内容では、酸化グラフェン (GO) と還元型酸化グラフェン (rGO) 単体による顕微ラマン測定によりグラフェン由来のピークを観察した。これを受けて、実際に細胞に曝露させた GDL1 細胞の切片作成と顕微ラマンにより、細胞に取り込まれた両グラフェンの観察に成功した。

研究開発担当者項目 2 の発がん性に関する研究では、従来の化学物質の安全性試験法として用いられる 2D-培養による *in vitro* 試験やマウスやラットを用いた *in vivo* 試験の代替法として、ヒトへの外挿が可能な評価系である三次元培養モデルによる試験法を構築し、AdMa の発がん性について明らかにすることを目的とし、検討を行った。2D-培養 (GDL1 cells) に関して AdMa の細胞毒性と遺伝毒性試験では、メソポーラスシリカと GO が細胞毒性と変異原性を示した。それぞれの被検物質で特異的なスポットがあり、変異パターンの解析から、細胞毒性には曝露による炎症や酸化ストレスが関与している可能性が示唆された。3D 培養を用いた曝露実験に向けて、マウス肝前駆細胞オルガノイド (C57BL/6 マウス肝臓由来) の最適な毒性試験法を検討した結果、ドーム型培養法が高い増殖性を示し、細胞毒性評価にはトリパンブルー色素排除法を採用した。評価系の標準化のため、2 施設で培養したマウス肝前駆細胞オルガノイドの遺伝子発現を解析したところ、肝臓の代表的な 4 種のマーカーの発現傾向は両施設でほぼ同じであり、形態学的な違いもなく、安定していることを確認した。また、ドーム型培養法における AdMa のオルガノイド内への取り込みを蛍光シリカ曝露後に解析した結果、蛍光強度の増加と取り込みが認められ、本研究の被検物質も取り込まれることが示唆された。オルガノイドを用いた細胞毒性評価では、メソポーラスシリカ、GO、2 種のナノシリカ曝露により細胞生存率の減少が認められ、これらの AdMa が 3D 培養モデルにおいても細胞毒性を有することが示唆された。遺伝毒性試験では、メソポーラスシリカおよび GO について単回および複数回曝露後、小核試験を実施した結果、コントロール群と比較して小核出現頻度が上昇し、特に複数回曝露で高頻度であったことから、被検物質による遺伝毒性が示唆された。

以上の結果から、動物臓器由来オルガノイドを用いた評価は、従来の哺乳動物を用いた *in vivo* 毒性試験 (安全性評価) の代替法として、より生体に近い条件で安全性評価が可能であることが示唆された。確立されたこの手法は、ヒト臓器由来オルガノイドへの応用も可能であり、最終的にヒトへの外挿性を評価するための有用なデータとなり得る。

研究開発担当者項目 3 の免疫毒性に関する研究では、従来の動物実験に代わる *in vitro* 免疫毒性評価系として、好中球細胞外トラップ (NETs) の形成を指標とする評価系の構築と標準化を目指した。HL 60 細胞を分化誘導した好中球様細胞 (dHL 60) を一次好中球の代替モデルとして採用した。モデルナノマテリアルとして、初代好中球で NET 誘発能が報告されている GO を選択した。GO 添加後、dHL 60 細胞では濃度依存的に細胞外 DNA の放出を伴う NETs 形成が認められ、蛍光染色および走査型電子顕微鏡 (SEM) でその網目状物質が可視化された。高濃度では粒子の凝集により NETs 産生が低下したが、試験系の再現性は非常に高いことが確認された。NETs 形成に伴う活性酸素種 (ROS) の生成を電子スピン共鳴 (ESR) 法で検討したところ、GO を添加した試料でヒドロキシラジカルの生成が検出されたことから、スーパーオキシドを介した典型的な NETosis が誘導されていることが示唆された。続いて、皮膚感作性試験 (h-CLAT 法) で陽性判定を示したナノシリカ (試料 A, B) とメソポーラスシリカを対象に同様の実験を実施した。ESR ではいずれもヒドロキシラジカル生成を検出し、その強度は「ナノシリカ B > A > メソポーラスシリカ」の順となり、h-CLAT 法による感作性強度と一致した。NETs 形成能も同様の順位を示し、粒子自身の ROS 生成や NADPH オキシダーゼ経路の活性化を介して起こる可能性が示唆された。

以上の結果から、dHL 60 細胞を用いた *in vitro* NETs 評価系は、GO やシリカなど物理化学的性状が毒性発現に寄与するナノマテリアルの免疫毒性スクリーニングに有用であることが示唆された。今後は、多様な AdMa や従来評価が困難な化合物についても同手法を適用し、NETs 誘導機構と免疫毒性の関連を検証することで、本系の妥当性と応用可能性をさらに拡大していく予定である。この取り組みは、安全性評価における非常に有用なデータを提供するものとなる。

本研究で得られた成果は、OECD 工業ナノ材料作業部会 (OECD WPMN) における今後の議論に貢献するものである。従って研究開発担当者項目 2 および 3 の研究内容 (遺伝毒性、免疫毒性、物性などの特異的な特性評価を含む) をまとめ、OECD と協議を進めることで、日本の知見を国際社会に発信していく。本研究班の成果は、将来のガイドラインやガイダンス策定に向けた貴重なフィードバックとなるとともに、新たなテストガイドラインへの道を拓く重要な貢献となると考える。

This research aims to develop *in vitro* carcinogenicity and immunotoxicity test methods for advanced materials (AdMa) that are extrapolatable to humans, particularly for those expected to be utilized in pharmaceuticals and medical devices.

With the enactment of the FDA Modernization Act 2.0 in December 2022, there is an increasing need for safety evaluation using alternative animal testing methods. Therefore, developing AdMa safety evaluation methods that can be extrapolated to humans and align with international trends is an urgent task. We believe that by utilizing these developed methods, the carcinogenicity and immunotoxicity of advanced materials will be elucidated, enabling the assessment of their health effects on humans. The Research Project Leader collected data information through the AdMa international trend survey and physical property measurements, and fed back the knowledge to the Research and Development Staff 2 and 3, thereby contributing to the construction of a highly accurate safety evaluation data set and the promotion of research.

In the international trend survey, the health effects of graphene were discussed at the OECD AdMa Safety Assessment SG, and the usefulness of the US FDA's nanomaterial toxicity assessment at the Nanocarrier WS. In addition, the status of efforts regarding test guidelines and guidance at OECD WPMN24 and the trends of the US EPA were shared.

Regarding the physical properties of the test substances, primary particle size was measured using TEM/SEM, and secondary particle size was measured using DLS. In a joint research project with domestic companies, graphene peaks derived from GO and rGO were observed using a Raman microscope, and the uptake of the two graphenes into GDL1 cells was successfully observed. In the carcinogenicity evaluation by the Research and Development Staff 2, the aim was to construct a carcinogenicity evaluation system using a 3D culture model (organoid) of AdMa used in pharmaceuticals and medical devices that can be extrapolated to humans. Initial studies in 2D culture showed that mesoporous silica and graphene oxide showed cytotoxicity and mutagenicity, suggesting the involvement of inflammation and oxidative stress in the cytotoxicity. In 3D culture, the optimal toxicity test method using mouse hepatic progenitor cell organoids was examined, and a dome-shaped culture method and trypan blue dye exclusion method were adopted. Organoid stability was also confirmed at two facilities. AdMa was also taken up into the organoids by fluorescent silica, suggesting that the test substance was also taken up. In the cytotoxicity evaluation using organoids, mesoporous silica, graphene oxide, and two types of nanosilica reduced cell viability, suggesting cytotoxicity in the 3D culture model. In the genotoxicity test, mesoporous silica and graphene oxide increased the frequency of micronuclei, suggesting genotoxicity. These results suggest that animal organ-derived organoids can be used as an alternative to conventional *in vivo* toxicity tests to evaluate safety under conditions closer to the living body, and are useful for application to human organ-derived organoids and for evaluating human extrapolation. In the immunotoxicity evaluation study of the Research and Development Staff 3, we aimed to construct an *in vitro* immunotoxicity evaluation system using neutrophil extracellular traps (NETs) formation as an indicator to replace conventional animal experiments. dHL-60 cells were used as an alternative model, and when GO was added, concentration-dependent NETs formation was confirmed, and the reproducibility was shown to be very high.

Hydroxyl radical generation was detected by adding GO, suggesting the induction of typical NETosis. Furthermore, similar results were obtained with nanosilica (samples A and B) and mesoporous silica, which were positive for skin sensitization, and the hydroxyl radical generation intensity and NETs formation ability in ESR matched the sensitization intensity by the h-CLAT method. This suggests the possibility of NETs formation via ROS generation by the particles themselves and activation of the NADPH oxidase pathway. The above results suggest that the *in vitro* NETs evaluation system using dHL-60 cells is useful for screening the immunotoxicity of nanomaterials. In the future, we plan to expand the validity and applicability of this system through application to various AdMa and verification of the NETs induction mechanism, and provide data useful for safety evaluation. We think that the results of this research group will provide valuable feedback for the formulation of future guidelines and will be an important contribution in paving the way for new test guidelines.