

図 11 サブナノ銀を単回投与したマウスにおける急性肝障害および急性腎障害。

サブナノ銀を 0、0.5、1、2 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) ALT、(B) AST、(C) BUN を測定した。

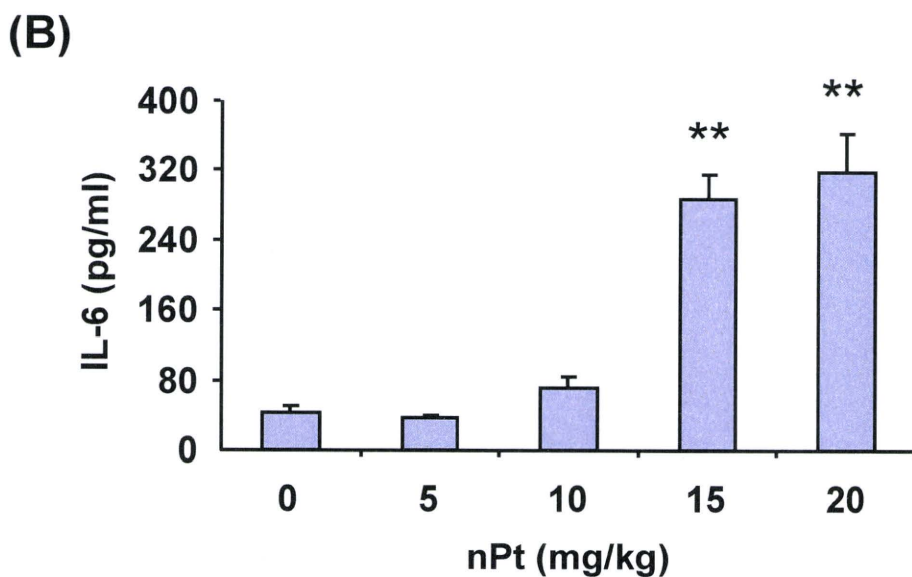
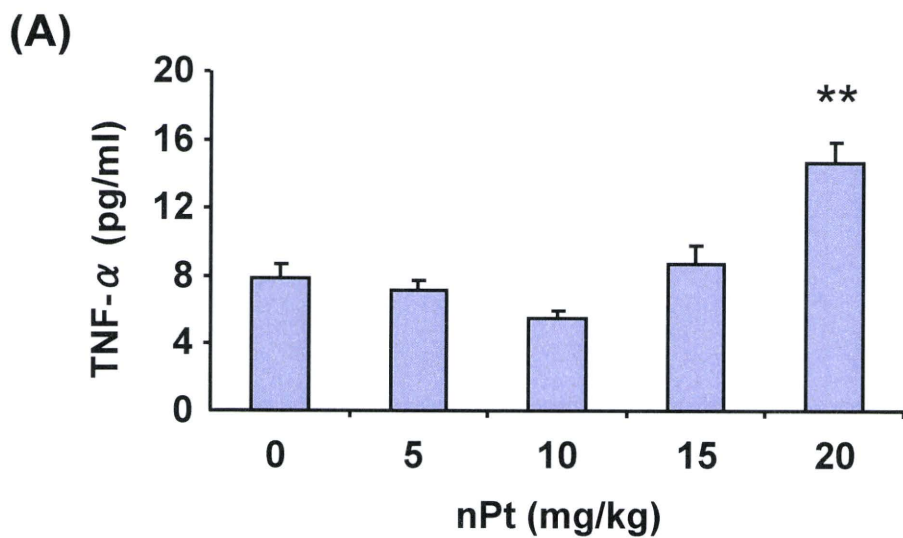
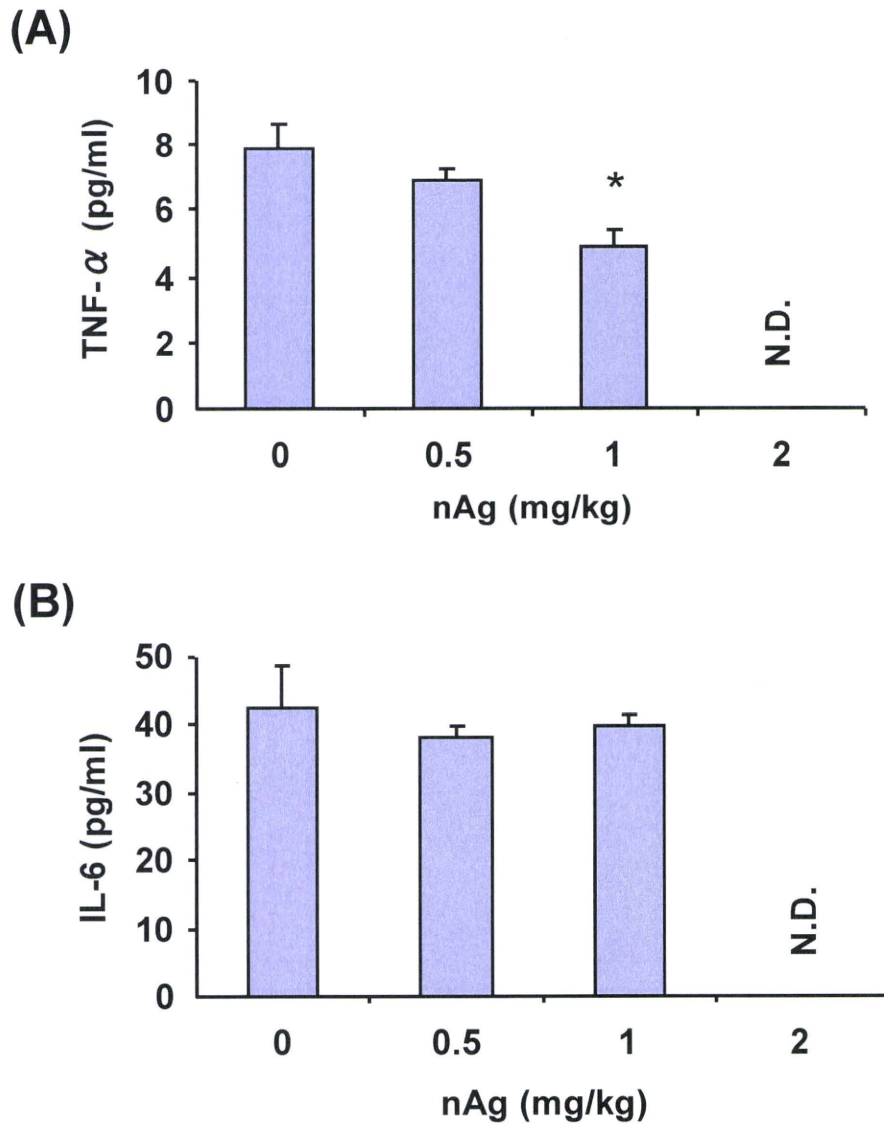


図 12 サブナノ白金を単回投与したマウスにおける炎症性サイトカインの変動。  
 サブナノ白金を 0、5、10、15、20 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。投与 24 時間  
 後に、血清中の (A) TNF - $\alpha$ 、(B) IL-6 を測定した。\*\* :  $p < 0.01$  vs. 0



**図 13 サブナノ銀を単回投与したマウスにおける炎症性サイトカインの変動。**  
 サブナノ銀を 0、0.5、1、2 mg/kg の用量で尾静脈内に投与した。投与 24 時間後に、血清中の (A) TNF - $\alpha$ 、(B) IL-6 を測定した。\* :  $p < 0.05$  vs. 0

## ナノマテリアルの胎盤絨毛細胞への影響に関する研究

研究分担者 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。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、昨今盛んに言われる少子化との関わりも無視できない問題である。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。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。In vitro レベルでは、snAg や snPt は低濃度(50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  程度)でも EVT 細胞に強い毒性を示すことがわかった。また、低濃度でのナノシリカは EVT 細胞増殖に影響を与えないが、高濃度(500  $\mu\text{g}/\text{mL}$ )では細胞に空胞変化を誘発し、それらが細胞機能に変化を与える可能性が初めて明らかになった。この特徴的変化の誘導機構は全くの不明であり、EVT 機能に如何に影響を与えるかが今後の大きな検討課題となった。

### A. 研究目的

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、EVTの浸潤不全が妊娠初期に起これば、胎盤形成不全となり流産原因の一つとなる。また、浸潤不全によって形成された胎盤は、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延といわれる妊娠中の大きな合併症との関連が深いことが分かっている。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に対してナノマテリアルの影響を検討した。

### 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E6/E7/hTERTを導入したHChEpC1b細胞を実験に供した。

ナノマテリアルはsnAg, snPt, nSP30, nSP50, nSP70, nSP70-C, nSP70-N, nSP100, nSP300, mSP1000を用いて、培養細胞上清に加えることで、実験に使用した

#### 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. 細胞浸潤能の評価

Growth factor reduced Matrigel invasion chamber (R&D)を用いて、浸潤実験を行った。各々のナノマテリアルは、上段 Chamber のみに50  $\mu\text{g}/\text{mL}$  または500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で投与した。

### C. 研究結果

**1. snAg および snPt は強い細胞傷害活性を有する** snAg, snPt, nSP30, nSP70, mSP1000のナノマテリアル投与し、24時間後に細胞生存率を検討した。500  $\mu\text{g}/\text{mL}$  においてもナノシリカ無処理と比較し、nSP30, nSP70, mSP1000では有意な変化は認めなかった。しかし、snAg は

50 µg/mL でもほとんど生存細胞を認めなかった。snPt は 500 µg/mL では生細胞は認めなかったが、50 µg/mL では 35%程度が生存し、snAg および snPt が細胞毒性を示すが、snAg がより強い毒性をもつことが分かった。

## 2. snAg および snPt は強い細胞傷害活性を有する

図 1 と同様の処理にて 24 時間後の Matrigel への浸潤細胞数を評価した。500 µg/mL 処理にて snAg, snPt では浸潤細胞を認めなかった。またナノシリカ無処理と比較し、nSP70, mSP1000 にて有意に浸潤細胞数が減少した(図 2 それぞれ  $p=0.02$ ,  $p=0.04$ )。この浸潤細胞数の減少は、細胞死の増加、あるいは細胞増殖抑制が影響を与えていることが考えられた。

## 3. ナノシリカは 100 µg/mL 濃度までは細胞増殖に影響を与えない

図 3 で示すがごとく、nSP70 0-125 µg/mL および 100 µg/mL にて nSP30, nSP50, nSP70, nSP100 を 24 時間共培養し細胞増殖を検討した。ナノシリカ無処理と比較し、ナノシリカ処理群での細胞数には有意差を認めなかった。この結果は HTR8/SV40neo だけでなく HChEpC1b においても同様であった。

## 4. ナノシリカ nSP30, nSP70 は細胞質に空胞変化を誘導する

ナノシリカ処理により細胞形態への影響を検討した。そのため、細胞質に赤色蛍光を恒常的に発現する HTR8/SV40neo-mStrawberry および HChEpC1b-mStrawberry を作成した。nSP30, nSP70 500 µg/mL 処理にて図 4 に示す空胞変化を細胞質に認めた。しかし、nSP300, mSP1000 等では空胞変化を認めなかった。

## D. 考察

### 1. snAg, snPt の EVT への影響

snAg, snPt は共に EVT セルラインに強い細胞毒性を示し、その結果 EVT 浸潤も強く抑制した。

### 2. ナノシリカの EVT への影響

ナノシリカは 100 µg/mL までの濃度では EVT の増殖に影響を与えないことが分かった。一

方で、ナノシリカの一部に EVT 浸潤抑制を示す可能性が示唆された。これらのことと、形態変化を考慮すると、細胞増殖および浸潤に影響を与えないナノシリカ濃度およびその時の形態変化を総合的に検討することが必要であると考えられた。

## E. 結論

In vitro レベルでは、低濃度(100 µg/mL 濃度)でのナノシリカは EVT 細胞に悪影響を与えないが、snAg や snPt は低濃度でも細胞毒性を示すことが示唆された。しかし、さらなる検討の余地が必要である。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

なし

#### 【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 0 件】

なし

## 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

研究協力者

なし

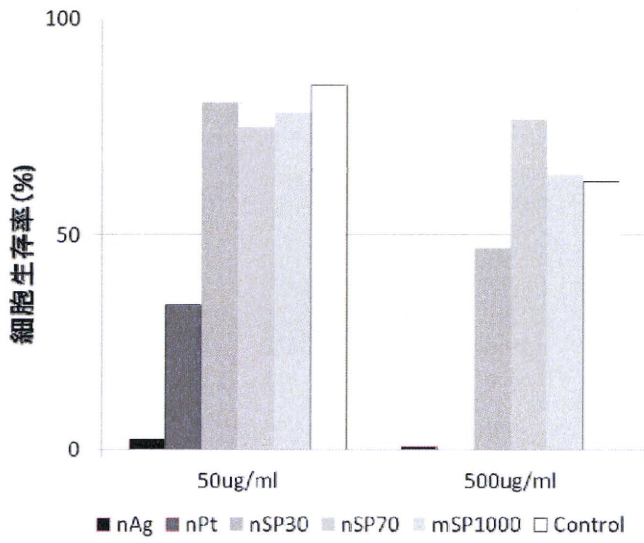


図1 ナノマテリアル 24 時間処理後の細胞生存率の図

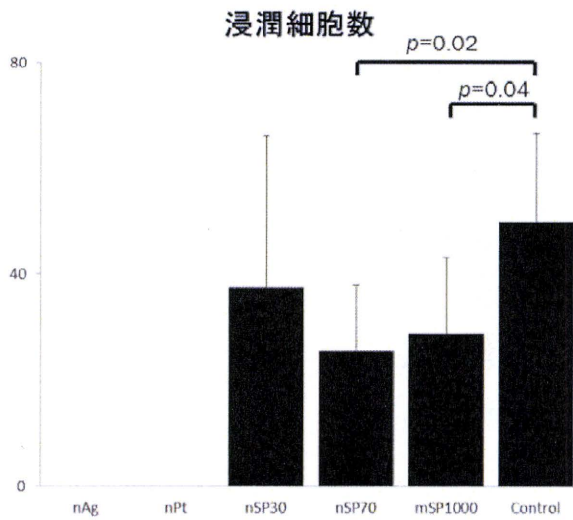


図2 ナノマテリアル(500 µg/mL)24 時間処理後の浸潤細胞数の図

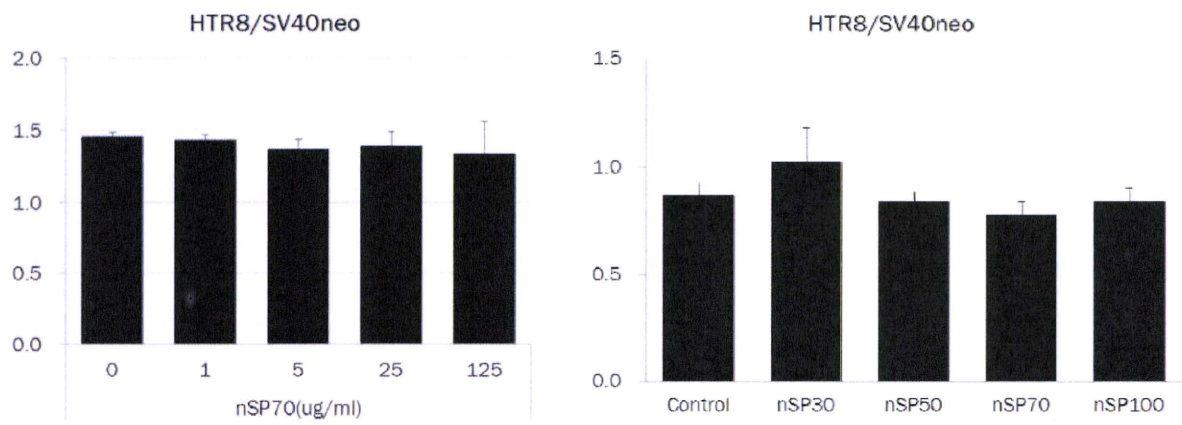


図3 ナノマテリアル 24 時間処理後の細胞数の図(WST-1)

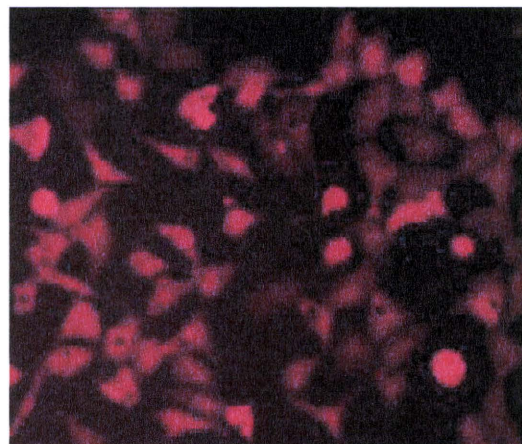


図4 nSP70 処理 24 時間後の HTR8/SV40neo 細胞の空胞変化

## 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。

今年度は堤班長のグループと共同で、ナノマテリアルの妊娠マウスへの静脈内投与による胎仔への影響について解析を行った。その結果、nSP70 の投与で子宮内胎児死亡（IUFD）、及び子宮内発育遅延（IUGR）が確認されたものの、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C の投与ではこれらの胎仔異常は認められなかった。これらの結果は、ナノマテリアルの物性及び粒子径が胎仔への障害をもたらしたことを示した。一方、この胎仔異常を起こす原因については、胎盤病理を詳細に解析した。その結果、マウス胎盤において nSP70 投与群では海綿状栄養膜細胞（spongiotrophoblast）の特異的な細胞死が認められた。このことは、さらに胎仔側に存在する迷路部（labyrinth）への栄養や血流の供給を減少させ、アウトカムとして胎仔の死亡や、発育に障害を起こしたと考えられた。

### A. 研究目的

1980 年代より、わが国の低出生体重児比率は上昇を続けている。加齢や、喫煙などその他の因子だけではこの現象は説明できない。我々のような周産期小児期専門医療施設においては、この傾向はさらに顕著で、およそ 40% の低出生体重児の産まれる原因は不明である。

今回、我々は堤班長らと共にナノマテリアルが子宮内胎児死亡（IUFD）あるいは子宮内発育遅延（IUGR）に関連するか、否かを調べる目的にて妊娠マウスに各種ナノマテリアルを投与した際の病態解明を目指した。

### B. 研究方法

#### 1. ナノマテリアルの影響の評価

妊娠 16 日目の BALB/c マウス尾静脈に各 0.8 mg の nSP70、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C、TiO<sub>2</sub>、fullerene C<sub>60</sub> を静脈内投与し、その後妊娠 18 日目の母獣体重、IUFD（胎仔吸収）

比率などの情報を得た。

### 2. 胎盤病理の評価

IUFD や IUGR の原因を特定するため、モデルマウス胎盤を取り出し固定した後、HE 染色、PAS 染色、TUNEL 染色を行い、胎盤組織における血管系の構造、病理組織的な血流の推定、各細胞層の面積、細胞浸潤の有無、細胞死の有無などを詳細に検討した。

### C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

#### D. 考察

##### 1. ナノマテリアルの影響の評価

nSP70 及び TiO<sub>2</sub> を投与した妊娠母獣の体重の減少が観察された。また、子宮重量が減少し、胎仔の吸収率が上昇した。これらの変化は、nSP300、mSP1000、nSP70-N、nSP70-C、fullerene C<sub>60</sub> では認められなかった。IUFD、IUGR は粒子径およびその物性に依存して観察された。一方でその

病態メカニズムについては不明であった。

## 2. 胎盤病理の評価

妊娠 16 日目のナノマテリアルの投与により血圧上昇や、心拍数の変化はなく、母体循環系への影響、妊娠高血圧の発症などはなかった。一方、血液学的所見では、末梢血中の白血球数の上昇が nSP70 投与群で認められたが、若干の炎症が観察されるにとどまった。一方、母体の肝機能、腎機能には、特に大きな変化は認められなかった。いずれも母体の生存そのものに影響するものではなかった。

さて、哺乳類において、胎児に栄養を供給する臓器として、初期発生においては卵黄嚢が重要であり、その後は発生段階にしたがって胎盤が主役となる。マウス妊娠 16 日目ではすでに胎盤は脱落膜、海綿状栄養膜細胞、迷路部の 3 つの層が形成されており、母体側からの螺旋動脈の形成も十分に行われ経胎盤的に栄養や、ガス交換が行われている時期である。一方、卵黄嚢の役割そのものは胎盤の発生に従いその役割が減少してきている時期である。そこで、ナノマテリアル投与マウスの胎盤病理について詳細に解析を行った。

nSP70 投与胎盤では、1) 螺旋動脈の構造が認められなかったこと、2) 胎盤に病理的虚血の所見が認められたこと、3) 逆に梗塞や血栓の形成といわれるような所見は認められなかったことなどが確認された。胎盤の総面積は nSP70 で若干の低下が認められたに過ぎなかった。一方、海綿状栄養膜細胞の破壊が著しく、疲弊化が起きていた。海綿状栄養膜細胞の細胞数は減少しており、その理由として TUNEL 染色を試みたところ、nSP70 投与群では海綿状栄養膜細胞にアポトーシスが認められた。さらに胎仔側の組織である迷路部の疲弊化は認められなかったが、絨毛の面積は低下していた。

ヒトの凝固異常による不育症では過凝固を防ぐためにヘパリン療法などが行われることがある。今回 nSP70 投与群においては特に凝固異常を疑わせる病理的な所見が得られたわけではないが、ヘパリン投与による若干の子宮重量の改善や、胎仔吸収率の改善などが見られた。この結果は、局所による凝固系異常の関与を示唆したが、ナノマテリアルの細胞障害機構の一つとしてヘ

パリン様物質の関与があるのかも知れない。詳細は今後の解析にゆだねる。

## E. 結論

モデル動物を用いた解析で、ナノマテリアルの物性あるいは、粒子径によって胎盤機能障害を起こすことにより IUFD あるいは IUGR を生じた。

## F. 健康危険情報

該当なし

## G. 研究発表

### ① 論文発表

1. Namba F, Hasegawa T, Nakayama M, Hamanaka T, Yamashita T, Nakahira K, Kimoto A, Nozaki M, Nishihara M, **Mimura K**, Yamada M, Kitajima H, Suehara N, **Yanagihara I\***. Placental features of chorioamnionitis colonized with *Ureaplasma* species in preterm delivery. *Pediatric Research*, 67(2), pp166-72, 2010
2. 中山聡一郎、中山雅弘、**味村和哉**、光田信明。「妊娠高血圧症候群の病態解明—分子機構を中心に—胎盤からみた妊娠高血圧症候群」。産婦人科の実際、59, 1005-1011, 2010

### 【総説・その他】

該当無し

### ② 学会発表

#### 【シンポジウム等：合計 5 件】

1. **柳原格**。「ウレアプラズマ感染 一流早産そして次世代への影響—」、第 37 回日本マイコプラズマ学会 2010.6.10-11、東京、シンポジスト
2. **柳原 格**。「LPS 誘導性早産モデルマウスに対するチオレドキシンの有効性」、京都大学ウイルス研究所ミニシンポジウムレドックス生命医科学の展望 (ATL Allergy TRX)、2010.3.15、京都、招待講演
3. **Itaru Yanagihara**, 「The pathological findings and molecular mechanisms of *Ureaplasma* spp. infection in preterm

delivery」 7<sup>th</sup> European Society for Infectious Diseases in Obstetrics and Gynaecology (ESIDOG), 2010.10.2-5, Trieste, Italy, Invited Speaker

**【国内学会発表：合計12件】**

1. 北島博之、柳原格.「ウレアプラズマ感染早産胎盤における絨毛膜羊膜炎の病理像」、近畿腸管微生物研究会、2010.6.5、大阪、口演
2. 内田薫、清水隆、柳原格.「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* 由来 multiple banded antigen (MBA) による胎内炎症惹起機構の解明」、第37回日本マイコプラズマ学会、2010.6.10-11、東京、オーラル
3. 内田薫、野崎昌俊、柳原格.「妊娠マウスを用いた *Ureaplasma parvum* による胎内炎症惹起機構の解明を目指して」、第46回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、オーラル&ポスター
4. 野崎昌俊、難波文彦、内田薫、西原正泰、柳原格.「Lipopolysaccharide(LPS)誘発早産モデルマウスにおけるチオレドキシシン (TRX) の早産抑制効果」、第46回日本周産期・新生児医学会総会、2010.7.11-13、神戸、ポスター

**【国際学会発表：合計2件】**

該当無し

**H. 知的財産権の出願・登録状況**

該当無し

**その他**

- (1)「習慣流産の遺伝子発見」2011.2.2.  
(新聞報道)  
毎日朝刊、中日朝刊、朝日朝刊  
(web page)  
日本経済、朝日、毎日、中日、47NEWS (共同通信)、東京、大阪日日、京都、その他

**研究協力者**

味村和哉、野崎昌俊、西海史子、中平久美子

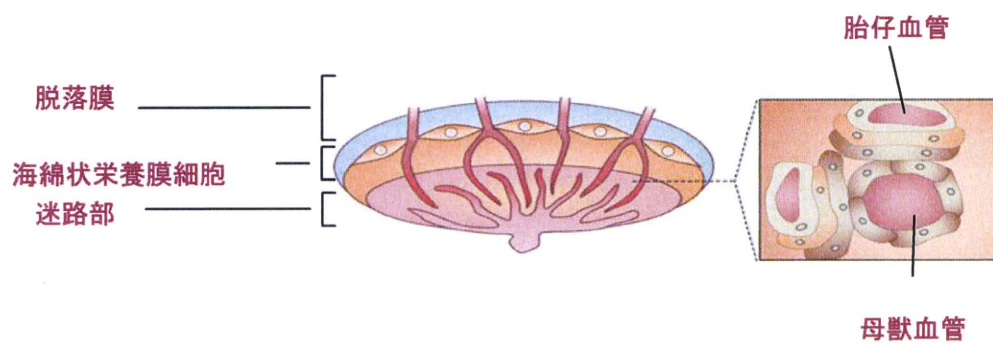


図 1 マウス胎盤組織

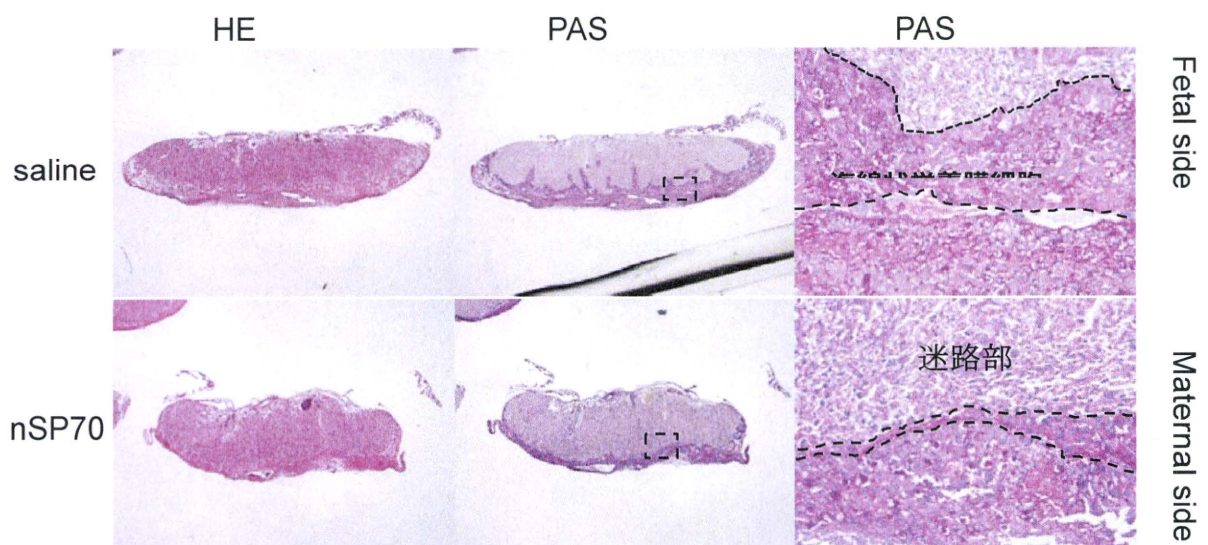


図 2 nSP70 投与群では優位に海綿状栄養膜細胞の障害が顕著

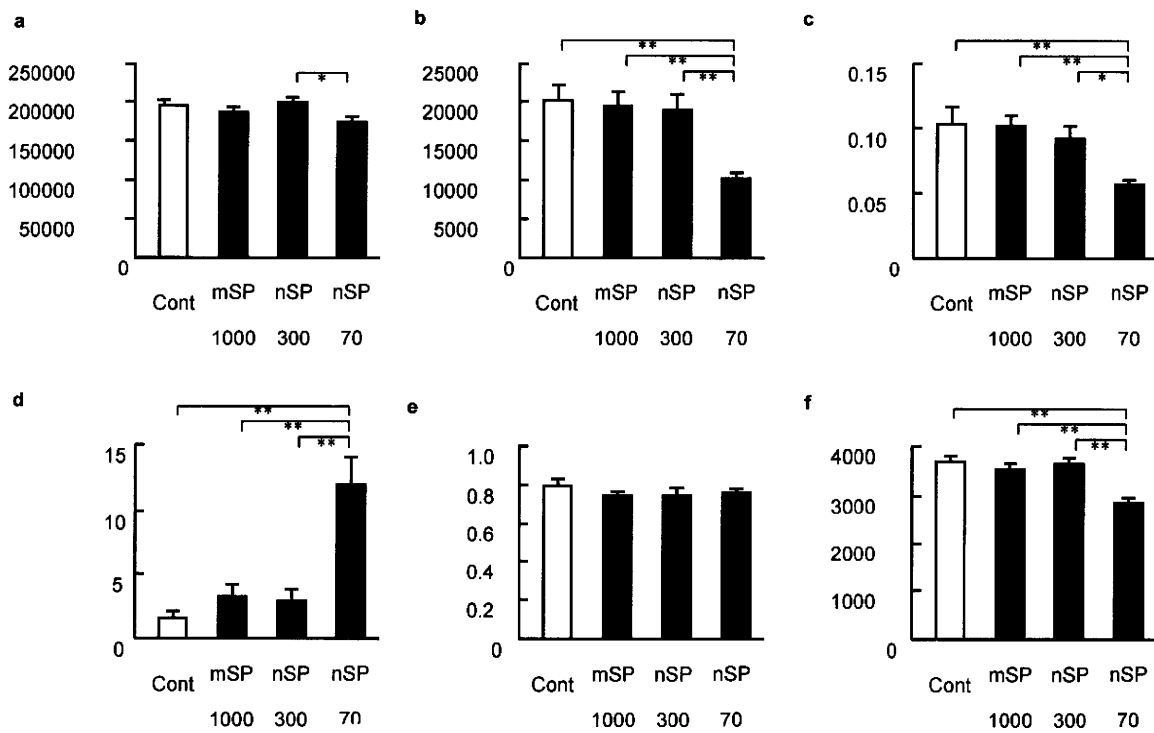


圖 3 (a) 胎盤全領域 (Pixel) (b) 海綿狀營養膜細胞領域 (Pixel) (c) 海綿狀營養膜細胞/胎盤 領域比  
 (d) 海綿狀營養膜細胞 TUNEL 陽性細胞 (%) (e) 迷路部/胎盤 領域比 (f) 絨毛長 (Pixel)

## 妊娠期ナノシリカ曝露の行動への影響の検討

研究分担者 宮川 剛 藤田保健衛生大学総合医科学研究所 宮川剛研究室

### 研究要旨

近年、様々なナノマテリアルが生産され、一般消費者向けの製品に使用されるようになったが、脳神経系が形成される胎生期にナノマテリアルに曝露されることが成長後の心理的発達にどのような影響を及ぼしているのかは不明であった。そこで、本研究では、実験動物であるマウスを用いて、妊娠中に直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) を尾静脈内投与し、生まれてきた仔の成長後の行動特性について網羅的行動テストバッテリーを用いて解析した。網羅的行動テストバッテリーには、マウスの一般的健康状態をはじめとして、不安様行動やうつ様行動、活動性、社会的行動、学習・記憶機能などを評価するテストが含まれていた。テストの結果、ナノシリカを投与した妊娠雌マウスから生まれてきた仔は、成体時の体重や筋力が低下し、聴覚性驚愕反応が顕著に亢進していること、またわずかではあるが社会的行動が減少していることも見出された。なお、妊娠期ナノシリカ曝露が不安様行動やうつ様行動、新奇環境場面での活動性、作業記憶に関連する行動特性に影響を与えていることは確認されなかった。これらの結果から、妊娠期ナノシリカ曝露は、母体を介して胎仔の脳神経系の発達に影響を及ぼし、結果として成長後の身体的発達のみならず一部の心理的発達にも影響し、行動異常を引き起こす可能性があることが示唆された。

### A. 研究目的

脳神経系は胎生期に形成されるが、この時期に外部環境から母体を通して間接的に体内に流入する物質は、脳神経系に作用し、心理的発達に対して長期的な影響を及ぼす可能性がある。近年、様々なナノマテリアルが生産され、一般消費者向けの製品に利用される機会が拡大しているが、胎生期にナノマテリアルに曝露されることが成長後の心理的発達にどのような影響を及ぼすのか検討した研究は見当たらない。本研究では、実験動物であるマウスを用

いて、妊娠雌マウスへのナノマテリアル曝露が次世代の心理的発達に及ぼす影響について、網羅的行動テストバッテリーを用いて明らかにすることを目的とした。なお、本研究で用いたナノマテリアルは、試薬グレードの直径 70 nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) である。

### B. 研究方法

#### 1. 被験体

BALB/c 系統の妊娠雌マウスおよびその仔を被験体として使用した。妊娠雌マウスが妊娠 16、

17日目の時にnSP70 (0.8 mg/mouse)を静脈内投与する nSP 群と生理食塩水を投与する統制群の2群を設け、各群の雌から出生した仔が10週齢以上になった後、以下の網羅的行動テストバッテリーを用いて行動を評価した。

## 2. 行動の評価

行動実験開始30分前までに被験体を飼育室から行動実験用防音室に移し、被験体を実験室環境に馴化させた後、各種行動テストを実施した。用いた網羅的行動テストバッテリーには、一般的健康状態および神経学的スクリーニング、明暗選択テスト（不安様行動の評価）、高架式十字迷路テスト（不安様行動の評価）、オープンフィールドテスト（活動性・情動性の評価）、ホットプレートテスト（痛覚感受性の評価）、新奇環境下社会的行動テスト（社会的行動の評価）、ローターロッドテスト（運動能力・運動学習能力の評価）、Crawley版社会的行動テスト（社会的行動の評価）、プレパルス抑制テスト（感覚・運動ゲーティング、注意力の評価）、強制水泳テスト（うつ様行動の評価）、歩行解析（歩行機能の評価）、8方向放射状迷路テスト（作業記憶機能の評価）が含まれていた。

## C. 研究結果（次項Dにまとめて記載する）

### D. 考察

#### 1. 一般的健康状態及び神経学的評価

本格的な行動テストを行う前に、マウスの一般的な健康状態及び筋力等を検査した結果、nSP群は10、12、16、20週齢時の体重が統制群より統計的に有意に低く（図1A）、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の身体的発達を阻害していることが明らかになった。また、握力測定テストでは有意な差が認められなかったが（図1C）、wire hangテストにおいてnSP群のスコアの方が低く（図1D）、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の成長後の筋力低下もしくはうつ様症状を引き起こす可能性が示唆された。

## 2. 社会的行動の低下

新奇環境下社会的行動テストの結果、統計的に有意ではなかったが、nSP群の社会的行動は統制群に比べて少ない傾向があった（図2）。この結果は、妊娠期ナノシリカ曝露が仔の社会性の発達に対して抑制的に作用している可能性を示唆する。しかしながら、Crawley版社会的行動テストにおいて他個体への選好性に基づく社会的行動の評価では、両群の間には差が認められず（図3）、妊娠期ナノシリカ曝露による抑制効果は限定的であることが考えられた。

## 3. 聴覚性驚愕反応の亢進

プレパルス抑制テストを行った結果、両群間のプレパルス抑制に有意な違いはなく、感覚運動ゲーティング・注意力に対する妊娠期ナノシリカ曝露の影響は認められなかった（図4）。しかしながら、本テストによってnSP群は大きな音に対する驚愕反応が統制群より有意に亢進していることが見出された。

## 4. 不安様行動、活動性・情動性、痛覚感受性、運動能力・運動学習能力、うつ様行動、歩行機能、作業記憶機能の評価

不安の測定として明暗選択テスト（図5）および高架式十字迷路テスト（図6）、活動性・情動性の測定としてオープンフィールドテスト（図7）、痛覚感受性の測定としてホットプレートテスト（図8）、運動能力・運動学習能力の測定としてローターロッドテスト（図9）、うつ様行動の測定として強制水泳テスト（図10）、歩行機能の測定として歩行解析（図11）、作業記憶機能の測定として8方向放射状迷路テスト（図12）を行ったが、いずれのテストにおいても両群間に有意差はなく、それらの行動発達に対する妊娠期ナノシリカ曝露の影響は認められなかった。

## E. 結論

妊娠期にナノシリカに曝露された雌マウスから生まれた仔は、成体時の体重や筋力が低下

し、かつ聴覚性驚愕反応が顕著に亢進していることが明らかになった。また、統計的に有意ではなかったが、ナノシリカ曝露により成体時の社会的行動がわずかながら低下する可能性も示唆された。これらのことから、妊娠中の雌マウスが70 nmサイズのナノシリカに曝露され、ナノシリカが血中に拡散すると、胎盤を通して胎仔の体内にもナノシリカが流入し、脳神経系の発達に影響を及ぼし、結果として成長後の驚愕反応や社会的行動のような心理的発達の異常を引き起こす可能性があることが考えられた。今後は、顕著な影響が認められた聴覚性驚愕反応に着目し、聴覚脳幹誘発電位の測定による確認や、驚愕反応に関連する脳部位の特定および遺伝子発現解析、ならびに透過型電子顕微鏡による脳へのナノシリカ移行の確認を行う必要がある。また、今回実施していない学習・記憶機能や活動性などに関する行動解析についても行い、妊娠期ナノシリカ曝露による次世代への影響をより詳細に検討する必要があるだろう。さらに、妊娠後期のみならず妊娠初期の雌や成体期の個体にナノシリカを投与し、個体発達のどの時期にナノシリカに曝露されることが行動にどの程度悪影響を及ぼし得るのかを検討する必要もある。また、本研究では、70 nmサイズのナノシリカを使用したが、ナノ白金やナノ銀などのように日常生活で接する機会が多い他のナノマテリアルが行動発達にどのような影響を及ぼすのかも今後検討する必要があるだろう

#### **F. 健康危険情報**

該当なし

#### **G. 研究発表**

##### **①論文発表**

該当なし

#### **【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0件】**

該当なし

#### **【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**

高雄啓三（自然科学研究機構 生理学研究所 行動代謝分子解析センター 行動様式解析室・特任准教授）

昌子浩孝（藤田保健衛生大学 総合医科学研究 所 システム医科学研究部門・博士研究員）

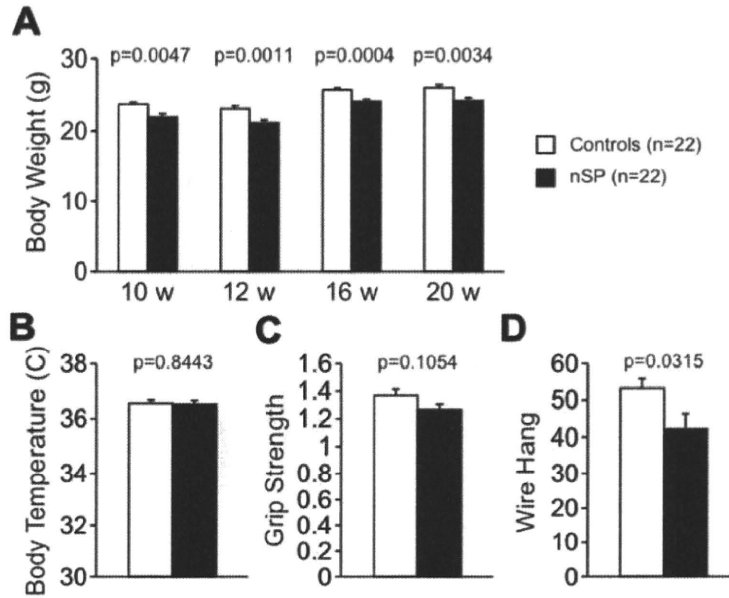


図1. 一般的健康状態および神経学的スクリーニング。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目BALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔が10、12、16、20週齢時に体重 (A) を、また10週齢時には直腸温 (B)、握力 (C)、筋力 (D) を測定した。nSPに暴露された経験がある仔は、成長後の体重が有意に減少し、筋力が有意に低下していた。

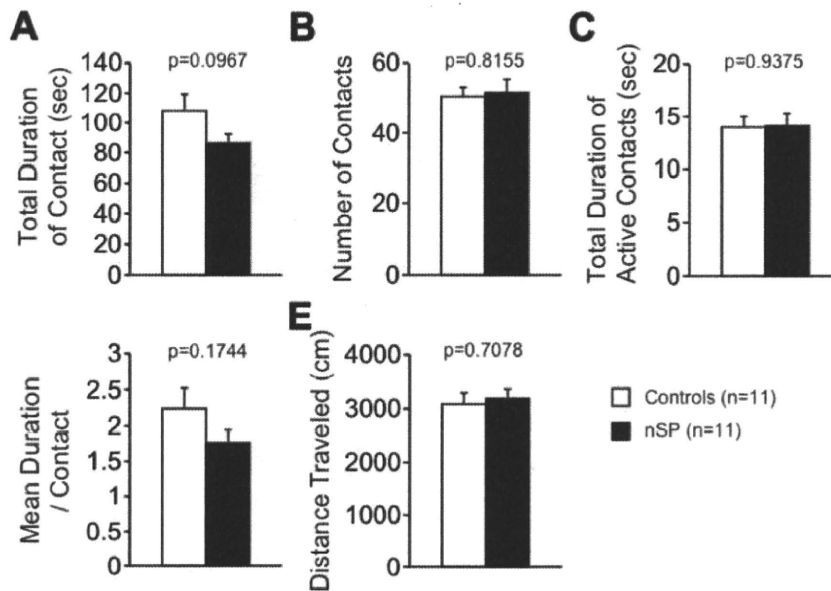
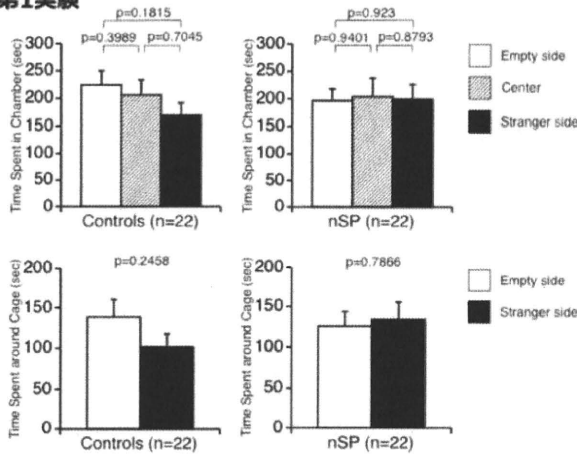
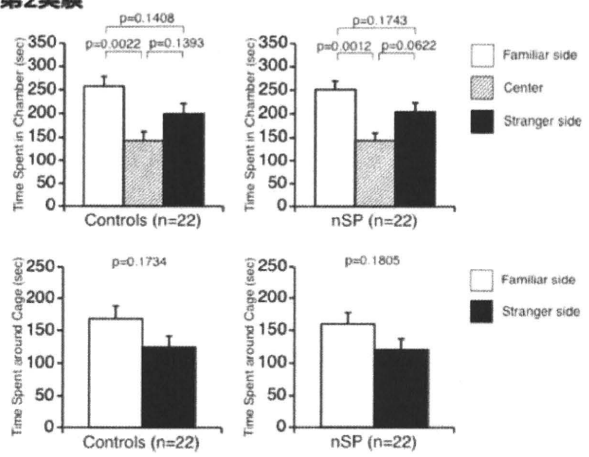


図2. 新奇環境場面における社会的行動の低下。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、別ケージで飼育され同群に割り当てられた同程度の体重の他個体と新奇環境場面で接触させ、その時に示した社会的行動 (A: 総接触時間 (秒)、B: 総接触頻度、C: 1回の接触における平均接触時間 (秒)、D: 活発な活動に基づく総接触時間 (秒)、E: 総移動距離 (cm)) を10分間記録した。nSPに暴露された経験がある仔は、統計的に有意ではなかったが、成長後の新奇環境場面における社会的行動が低下していた。

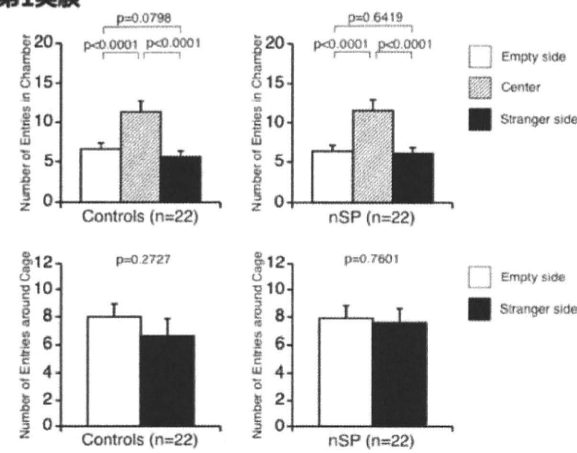
### 第1実験



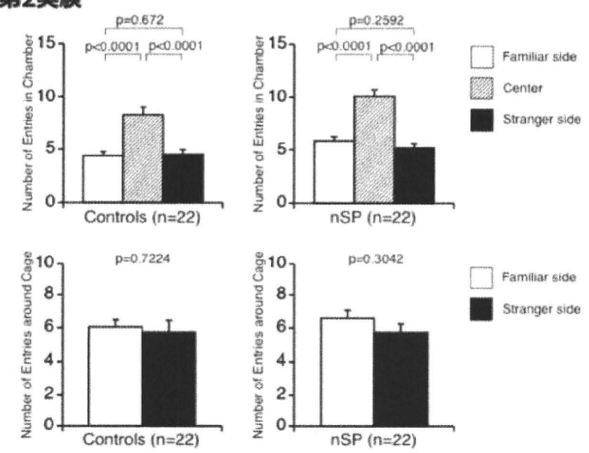
### 第2実験



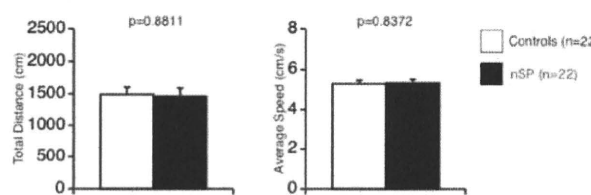
### 第1実験



### 第2実験



### 第1実験



### 第2実験

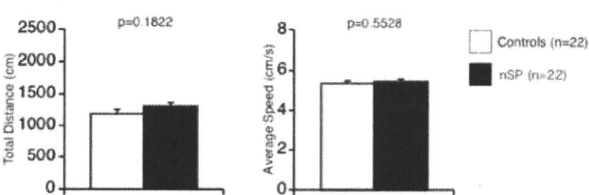
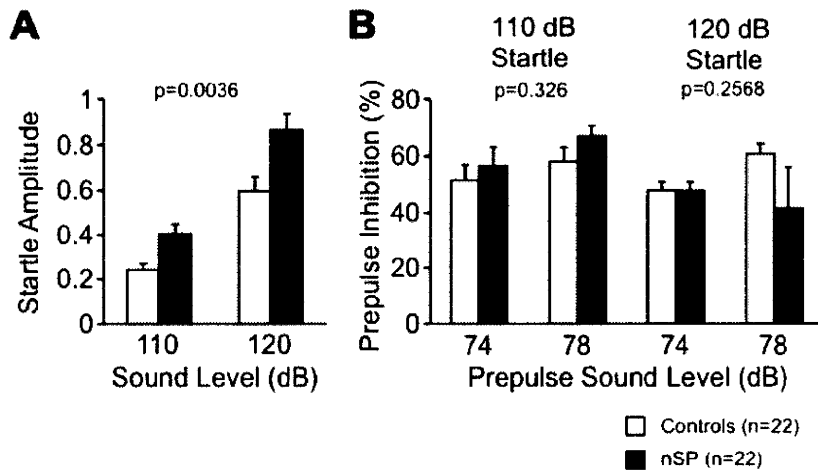
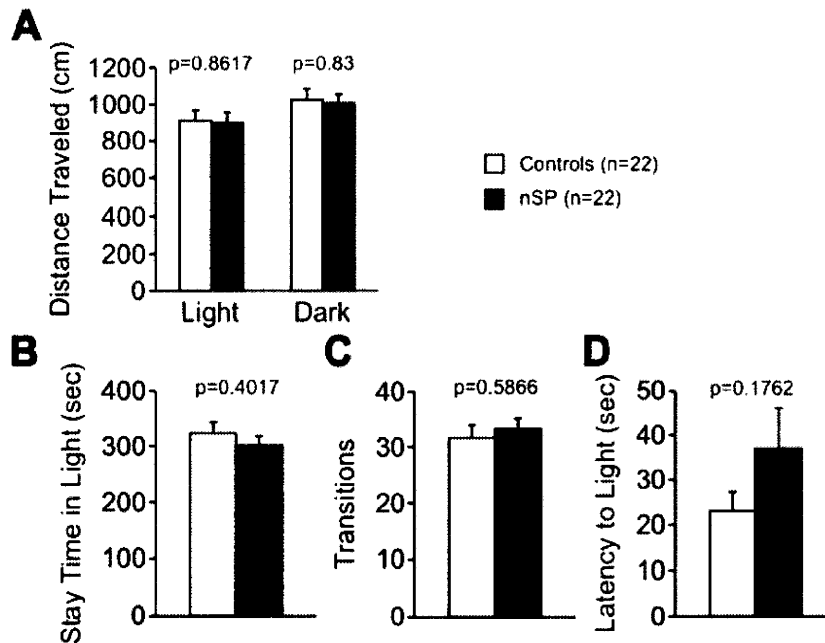


図3. 社会的新奇刺激に対する選好性。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、縦に連なった3つの部屋から構成される装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した。この時、両側の部屋の一方には空のカゴを、もう一方にはC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴを置いた（第1実験）。終了後、被験体を装置から取り出し、空のカゴには新しいC57BL/6J系雄マウスを入れ、先程から置いていたC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴはそのままにした。再び被験体を装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した（第2実験）。第1および第2実験で新奇なあるいは見慣れた個体がいる部屋あるいはカゴの近接領域に滞在した時間（秒）および進入した頻度、ならびに移動距離（cm）、平均移動速度（cm/秒）を測定し、社会的新奇刺激に対する選好性を評価したが、nSP暴露による影響は認められなかった。



**図4. 聴覚性驚愕反応の亢進。** 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔が成体期に、大きな音（110dBおよび120dB）に対して示す驚愕反応（A）を測定した。同時に、大きな音の前に少しだけ小さな音（74dBあるいは78dB）を提示し、直前の小さな音によって大きな音に対する驚愕反応が抑制される現象であるプレパルス抑制（率）を調べた（B）。nSPに暴露された経験がある仔は、成長後の聴覚性驚愕反応が有意に亢進していた。



**図5. 明暗選択箱における不安様行動。** 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、明るい箱と暗い箱から構成される装置のうち暗い方の箱に入れ、10分間行動を記録した。その際に示した総移動距離（cm）（A）、明るい箱での滞在時間（秒）（B）、2部屋間の往来回数（C）、暗い箱から明るい箱に入るまでの潜時（秒）（D）を不安様行動の指標として解析した。nSP暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。

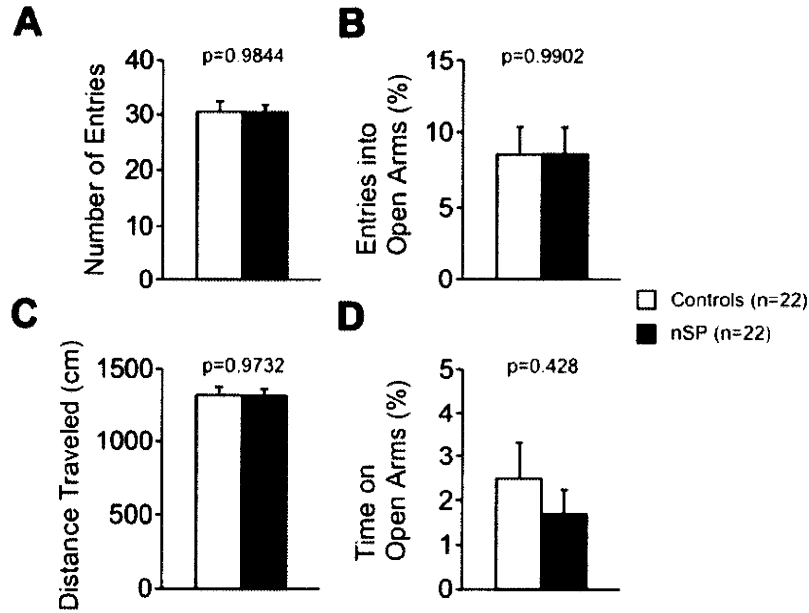


図6. 高架式十字迷路における不安様行動. 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、壁のある2本のクローズドアームと壁のない2本のオープンアームから構成される高架式十字迷路装置の中央に置いた。被験体が10分間に示したアームへの総進入回数 (A)、アームへの総進入回数におけるオープンアームへの進入回数の割合 (B)、アームでの全滞在時間におけるオープンアームに滞在した時間の割合 (C)、総移動距離 (cm) (D) を不安様行動として解析した。nSP暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。

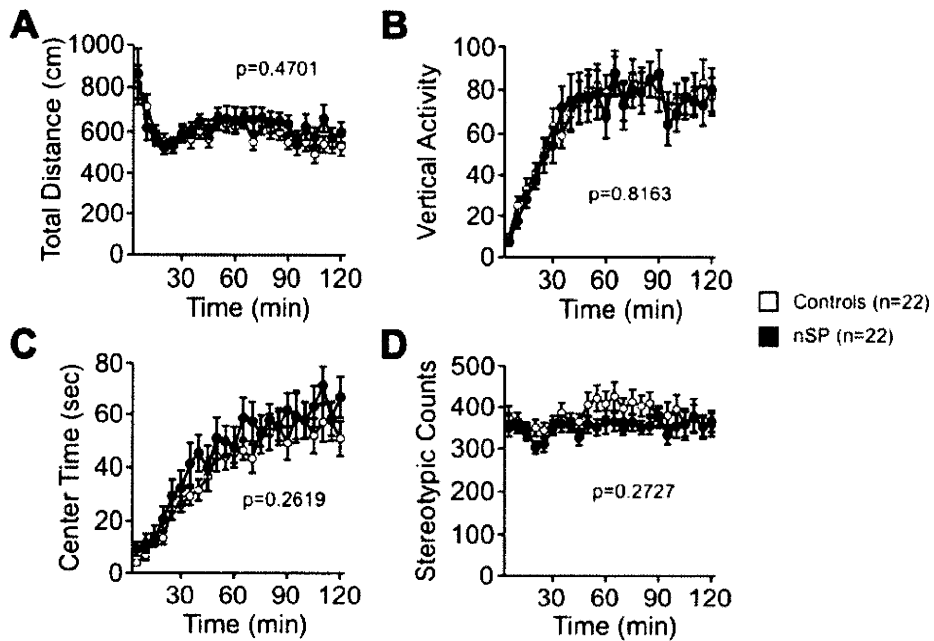


図7. オープンフィールド活動性および情動性. 生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、オープンフィールド装置に入れ、活動性・情動性の指標として2時間にわたる総移動距離 (cm) (A)、立ち上がり回数 (B)、中央区画での滞在時間 (秒) (C)、常同的行動の回数 (D) を解析した。nSP暴露による成長後の活動性および情動性への影響は認められなかった。

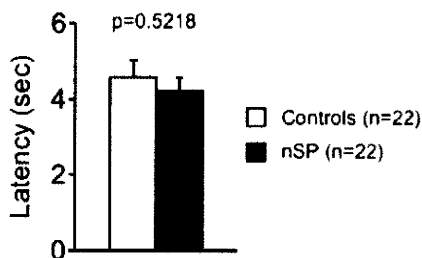


図8. 痛覚感受性。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、55℃に熱したホットプレート装置に乗せ、熱さに対する逃避行動を示すまでの潜時（秒）(A) から痛覚感受性を評価したが、nSP暴露による痛覚感受性への影響は認められなかった。

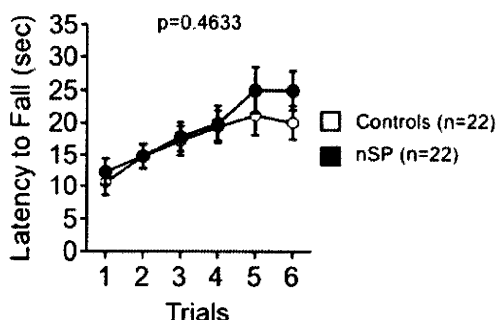


図9. 運動能力・運動学習能力。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、回転するロッド（棒）の上に乗せて、落ちるまでの時間（秒）を測定した。1日目および2日目にそれぞれ3試行実施し、運動能力ならびに上達の程度から運動学習能力を評価したが、nSP暴露による成長後の運動能力および運動学習能力への影響は認められなかった。

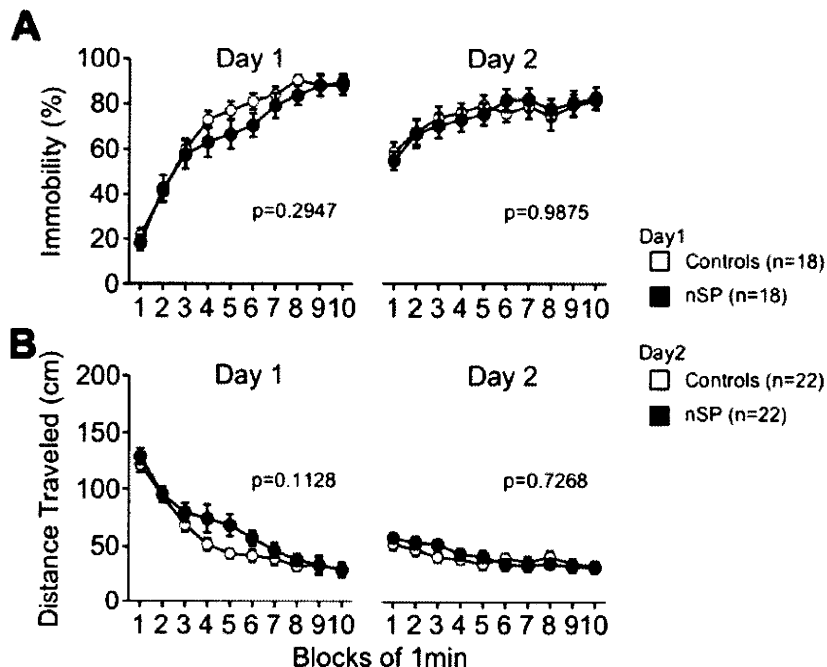


図10. 強制水泳場面におけるうつ様行動。生理食塩水で懸濁したnSP70溶液を0.8 mg/mouseの割合で妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈より投与した。出生した仔は成体期に、水の入った円柱容器に10分間入れ、水に浮かんで動かない状態の不動時間（秒）(A) および移動距離（cm）(B) を記録した。不動状態をうつ様行動の指標とするが、nSP暴露によるうつ様行動への影響は認められなかった。