

Fig. 8

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPtを5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snPtの肝臓への影響を評価するため、肝傷害の指標として血清中の (A) ALT及び (B) AST値の測定を行った。* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$ vs snPt 0

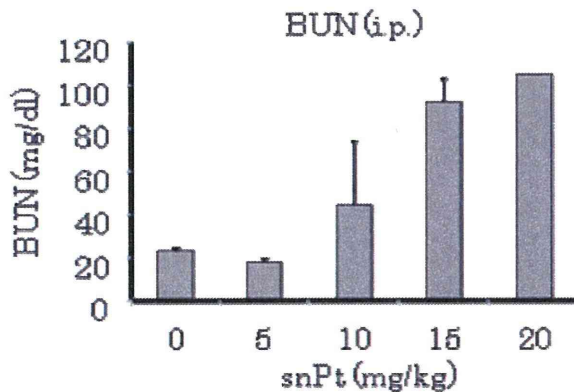


Fig. 9

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPtを5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snPtの腎臓への影響を評価するため、腎傷害の指標として血清中のBUN値の測定を行った。** $p < 0.01$ vs snPt 0

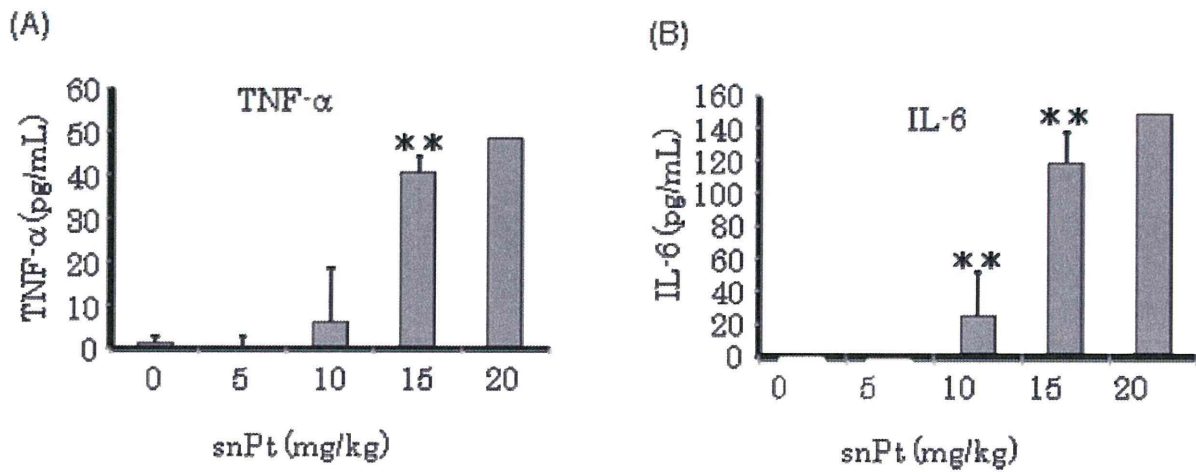


Fig. 10

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPtを5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に心採血により血液サンプルを採取し、40分間室温で放置後、4℃、6000 rpm、10 minで遠心分離を行い、上清を血清サンプルとして回収した。snPtの免疫系への影響を評価するため、(A) TNF-a、及び (B) IL-6値の測定を行った。** p < 0.01 vs snPt 0

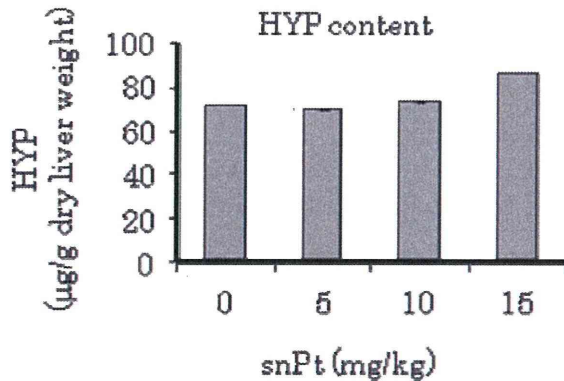


Fig. 11

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snPtを5、10、15、20 mg/kg b.w.の用量で腹腔内に単回投与した。投与24時間後に肝臓を採取し肝臓中のヒドロキシシプロリン (HYP) 量を測定することで肝線維化を評価した。

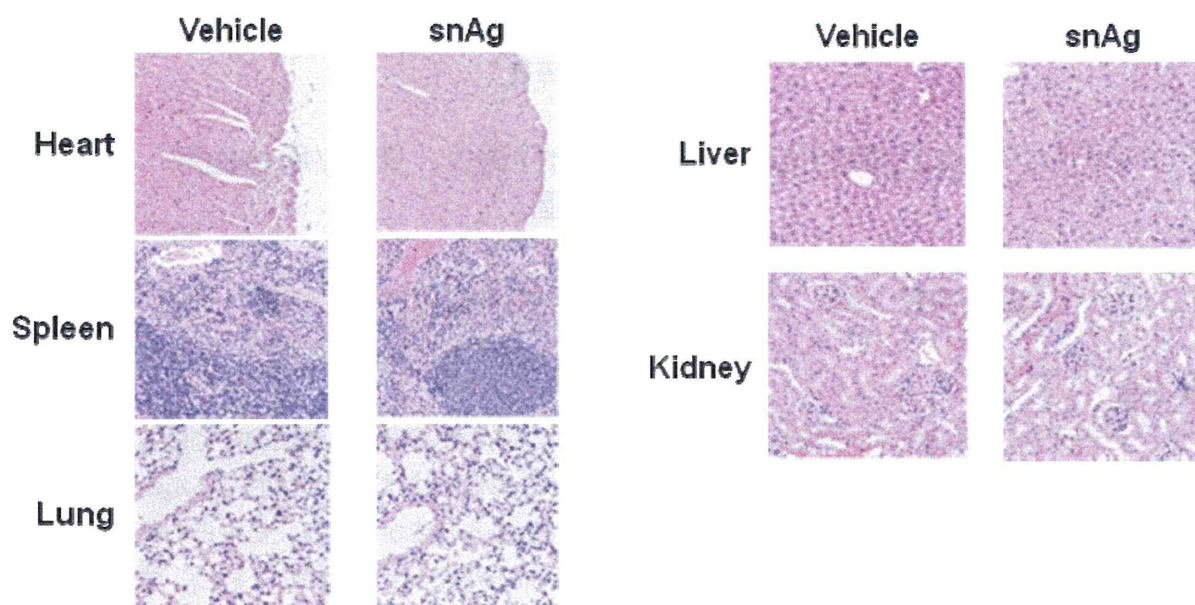


Fig. 12

8~9週齢の雄性BALB/cマウスに、snAg 1 mg/kg b.w.の用量で尾静脈内に単回投与した。投与24時間後に心臓、肺、脾臓、肝臓、腎臓を採取し、4%パラホルムアルデヒド (PFA) にて固定した。固定後、HE染色を行うことにより、各種臓器における障害性を評価した。

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
「ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立
とヒト健康影響情報の集積」
分担研究報告書

ナノマテリアルの胎盤動態および胎盤/胎仔毒性、胎仔/母体血液・免疫・幹 毒性評価

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。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、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要があるが、それらの関係性を示す報告はないのが実情である。一方で、胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、胎児への直接的評価に比し胎盤への影響は検討しやすい。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、nAg は 0.25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 、nPt は 25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で EVT 細胞に有意な増殖抑制を示した。また、より低濃度の nAg、nPt が EVT 細胞にオートファジーを誘導すると共に、オートファジー欠損細胞においてより低濃度で増殖抑制を示すことが明らかとなった。EVT 機能への影響として、nPt には EVT の浸潤能を濃度依存的に有意に抑制し、25 $\mu\text{g}/\text{ml}$ で浸潤能がほぼ喪失する結果となった。オートファジーは nPt のもつ細胞毒性に対し、細胞保護的に作用する可能性があり、今後、胎盤形成を基盤とした病態との関与を検討する必要があると考えられた。

A. 研究目的

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、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要がある。また、胎児への評価が、ひいては昨今盛んに言われる少子化に関わってくる可能性も否めない。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。

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、妊娠初期から中期にかけての EVT 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等の胎児、母体に重篤な影響を与える合併症との関連が深いことが分かっている。胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、胎児への直接的評価に比し胎盤への影響は検討しやすい。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ので報告する。

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 を導入して不死化した HChEpC1b 細胞を実験に供した。また、HTR8/SV40neo 細胞にオートファジー誘導の必須分子 Atg4B に対し、機能阻害作用を有する mStrawberry-Atg4B^{C74A} を恒常的に発現した HTR8-Atg4BC74A 細胞、およびその Control ベクターのみを導入した HTR8-mSt 細胞を作成した。また、同様に HchEpC1b-Atg4BC74A, HchEpC1b-mSt も作成した。ナノマテリアルは nAg, nPt を用いて、培養細胞の培養液中に加えることで、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。nPt を上段 Chamber に 0, 6.25, 12.5, 25, 50・g/ml でそれぞれ投与を行い、24 時間後の浸潤細胞数を評価した。

4. ウェスタンブロット

HchEpC1b に対し nPt 50・g/ml, nAg 0.5・g/ml, HTR8 に対しては nPt 12.5・g/ml, nAg 0.125・g/ml で 4 時間培養を行い、LC3、p62 (MBL) タンパクの発現を解析した。

C. 研究結果

1. nAg および nPt は強い細胞毒性を示す

nAg, nPt を培養液中に投与し、24 時間後に細胞数を検討し、細胞増殖率を検討した。HTR8 では、PBS 処理群 (コントロール群) に比し、nPt 25 μg/ml で 65%細胞増殖が抑制され、50 μg/ml ではほとんど細胞増殖が認められなかった。また、HchEpC1b では nPt 100 μg/ml で 56%細胞増殖が抑制され、400 μg/ml でほとんど細胞増殖が認められなかった (図 1)。nAg においては、HTR8 に対し 0.25 μg/ml で 80%細胞増殖が抑制され、HchEpC1b では nPt 1.0 μg/ml 濃度で

57%細胞増殖が抑制された。以上より、nAgがnPtに比しより低濃度で細胞毒性を示すことが明らかとなった。また、nAg または nPt に対する細胞毒性に、HTR8 がより感受性が高いことが示唆された。

2. nPt は EVT 細胞にオートファジーを誘導するが、nAg は誘導しない

ナノマテリアルにはオートファジー活性化能があることは報告されていた。そこで、nPt および nAg の細胞毒性のメカニズムにオートファジーが関与するかを検討するため、HchEpC1b 細胞に対し、細胞増殖抑制を示さない nPt 50・g/ml, nAg 0.5・g/ml にて処理を行い、オートファジーの活性化を評価した。nPt は HTR8 および HchEpC1b 細胞に LC3- II 蓄積を誘導し、LC3- II 蓄積はオートファゴソームの分解抑制 (E64d+pepstatin 処理) により増強された。また、オートファジー選択的分解基質である p62 も、nPt 処理により減少した (図 2)。一方で、nAg 処理では LC3-II 蓄積および p62 減少は認めなかった。同様の現象は HTR8 細胞においても認められた。この結果は、nPt が EVT 細胞においてオートファゴソーム分解抑制ではなく、オートファジーの活性化作用を持つことを示す。一方で nAg にはその作用は認めなかった。

3. nPt に対して、オートファジーは細胞保護的に働く

nPt は、EVT 細胞にオートファジーを誘導することが明らかとなったため、オートファジー欠損細胞における増殖への影響を次に検討した。HchEpC1b 細胞コントロール株 (-mSt : 灰色) の増殖には影響を与えない nPt 25-50μg/ml は、オートファジー欠損株 (-Atg4BC74A:黒色) の有意な増殖抑制を示した (図 3-1)。コントロール株およびオートファジー欠損株共に濃度依存的に増殖抑制を示しており、EVT のオートファジー (細胞内恒常性維持機構) は、nPt の細胞毒性に対し防御機構として働いている可能性がある。一方、nAg 0.5μg/ml は、オートファジー欠損株

(-Atg4BC74A:黒色)に強力な増殖抑制を示した(図 3-2)。このことは、nAg の細胞毒性の閾値が非常に狭いことに関連している可能性がある。

4. nPt は EVT 浸潤を濃度依存性に抑制する

最後に nPt および nAg による EVT 機能解析として、浸潤能を評価した。浸潤細胞数は細胞増殖に全く影響のない nPt 6.25µg/ml で有意な低下を認め、12.5µg/ml で浸潤しなくなった。このことは、nPt は EVT の細胞増殖より細胞浸潤により低濃度で影響することを示している。

D. 考 察

nPt 投与によって EVT 細胞の増殖は亢進せず、オートファジーの活性化が誘導された。また、nPt はオートファジー欠損細胞において、オートファジー正常細胞に比しより低濃度で毒性を示すことから、オートファジーは細胞内への nPt に対して防御的に働くことと考えられる。仮説段階ではあるが、オートファジー欠損細胞内により多くの nPt 蓄積が認められれば、オートファジーが nPt の細胞外への排除機構として働く可能性が示唆される。この可能性には、詳細な解析が必要である。

nPt が EVT 浸潤を抑制することは病態への影響を少なからず示唆している。EVT 浸潤は妊娠初期・中期までにおこり、その後の胎盤形成不全につながる。そのため、nPt、nAg の胎盤への蓄積の有無の検討を行う意義は高いと考えられる。

E. 結論

In vitro レベルでは、nPt、nAg とともに EVT 細胞の増殖抑制に働くことが分かった。さらに、nPt はより低濃度で EVT の浸潤を抑制した。また、nPt に対し、EVT 細胞のオートファジーが細胞保護的に働く可能性が示唆された。今後は in vitro での nPt 存在下での EVT 機能解析とともに、nPt の細胞内動態および病態への関与をを検討する必要があると考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Mimura K., Morishita Y., Nozaki M., Yoshida T., Ogura T., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Monobe Y., Imazawa T., Aoshima H., Shishido K., Kawai Y., Mayumi T., Tsunoda S., Itoh N., Yoshikawa T., Yanagihara I., Saito S., Tsutsumi Y. : Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice., Nature Nanotechnology (Nat. Nanotechnol.), 6(5):321-328, 2011.

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

該当無し

【国内学会発表 : 合計 5 件】

1. 山下浩平, 吉岡靖雄, 東阪和馬, 味村和哉, 藤村真穂, 森下裕貴, 潘 慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 柳原 格, 齋藤 滋, 吉川友章, 堤 康央 : 安全なナノマテリアルの開発に向けて—非晶質ナノシリカの生殖発生への影響評価と安全性情報の集積—, 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会, 横浜(神奈川), 2011 年 7 月.
2. 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 柳原 格, 齋藤 滋, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央 : 安全なナノマテリアルの創製に向けた次世代影響評価 : 妊娠後期曝

露の胎仔影響に焦点を絞って., 第 18 回日本免疫毒性学会学術大会., 千葉(千葉), 2011 年 9 月.

3. 吉岡靖雄, 山下浩平, 東阪和馬, 森下裕貴, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 柳原 格, 齋藤 滋, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: 食品中ナノマテリアルの安全性評価: 安全なナノマテリアルの創製に向けた次世代影響評価について., 第 102 回日本食品衛生学会学術講演会., 秋田(秋田), 2011 年 9 月.
4. 山下浩平, 吉岡靖雄, 鍋師裕美, 柳原格, 齋藤滋, 伊藤徳夫, 吉川友章, 堤 康央: 安全なナノマテリアルの開発に資する非晶質ナノシリカの生殖発生毒性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.
5. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Morishita Y., Huiyan P., Ogura T., Taira M., Aoyama M., Nabeshi H., Itoh N., Yanagihara I., Saito S., Yoshikawa T., Yoshioka Y., Tsutsumi Y. : Safety analysis of silica particle for development of nanomedicine ~Developmental toxicity on placenta~, 第 5 回次世代を担

う若手医療薬科学シンポジウム., 名古屋(愛知), 2011 年 11 月.

【国際学会発表: 合計 1 件】

1. Yamashita K., Yoshioka Y., Higashisaka K., Fujimura M., Morishita Y., Huiyan P., Ogura T., Mimura K., Nozaki M., Nabeshi H., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Itoh N., Yanagihara I., Saito S., Yoshikawa T., Tsutsumi Y. : The safety assessment of amorphous nanosilica on developmental and reproductive toxicity., SETAC Europe 21st Annual Meeting, Milan (Italy), 15-19 May, 2011.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

中島彰俊 (富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学)

nPtはEVT細胞の増殖抑制を誘導する

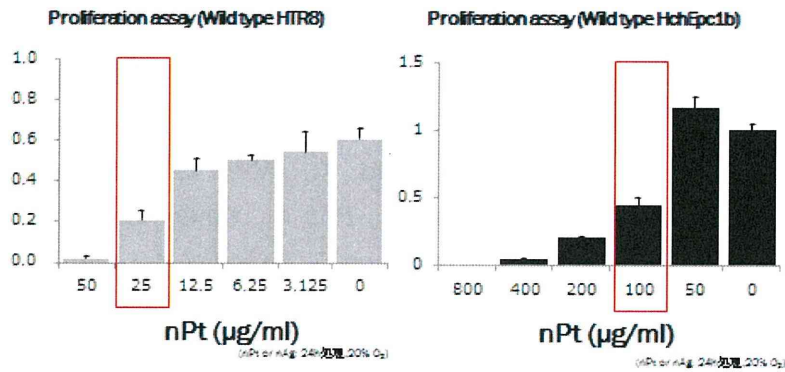


図1 nPt 24時間処理後の細胞数

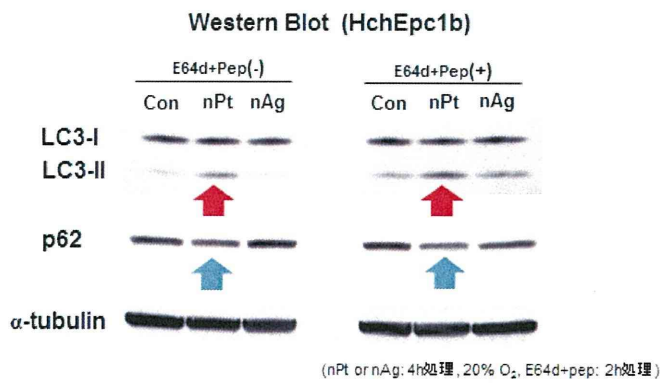


図2 nPtによるオートファジーの活性化

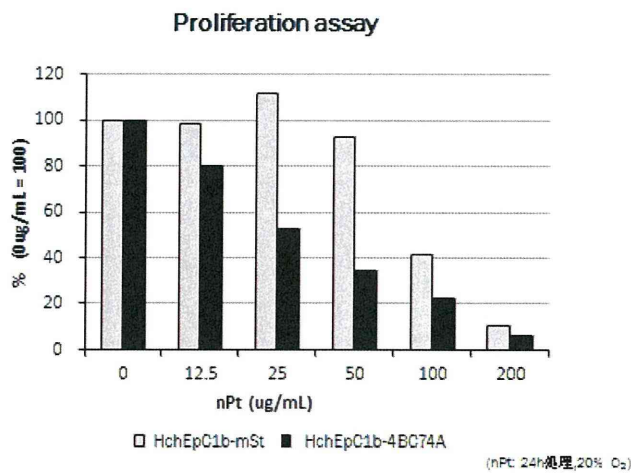
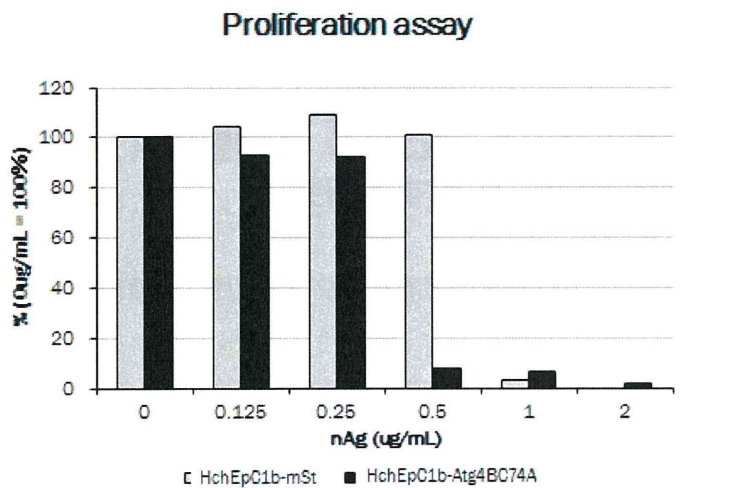
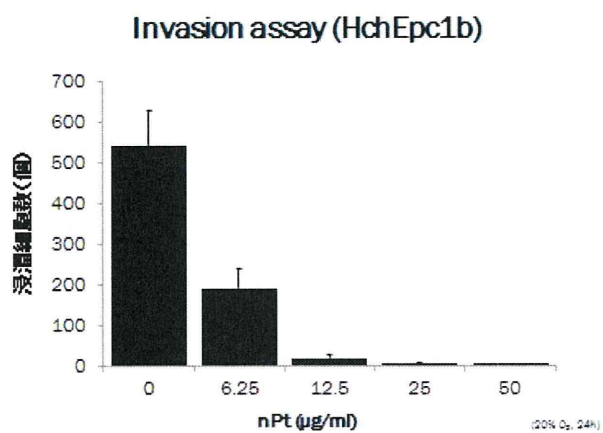


図3-1 オートファジー正常および欠損細胞におけるnPtによる細胞増殖への影響



(nAg 24h処理, 20% O₂)

図3-2 オートファジー正常および欠損細胞におけるnAgによる細胞増殖への影響



(20% O₂, 24h)

図4 nPtによるEVT細胞浸潤への影響

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 免役部門

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。低出生体重児は、早産およびその合併症である慢性肺疾患や神経系の障害とも密接に関連し周産期医療の大きな問題となっている。

昨年度は、ナノマテリアルの妊娠マウスへの影響について報告してきた。今年度は、わが国の主要な早産起因微生物の一つであるマイコプラズマ科のウレアプラズマ属細菌に対するナノマテリアル nAg の影響を解析した。その結果、nAg はウレアプラズマに対し、ある一定の濃度で殺菌効果があることを見出した。また、ナノシリカ nSP70 のマウス精子に結合する宿主側の分子の解析を行ったところ、細胞膜を構成するリン脂質との結合が確認された。

A. 研究目的

1. ウレアプラズマ属細菌の我々の施設における分離頻度はおよそ 4 割と早産起因微生物としては高い頻度であった(Ped Res, 2010)。本菌にはβラクタム系の抗菌薬は無効であり、閉鎖された子宮内で起こるサイトカインストームの為、臨床的には早産を抑止することは難しい。そこで、基礎研究としてウレアプラズマに対するナノマテリアルの殺菌効果について検証する。

2. 河合、小野寺らの報告によれば、ナノシリカ (nSP70) はマウス精子の運動性を著しく低下させる。そのメカニズムを明らかにする目的にてマウス精子に存在する nSP70 結合分子の同定を行う。

B. 研究方法

1. nAg のウレアプラズマに対する影響

ウレアプラズマは早産患者より単離した臨床分離株を用いた。培養は以前我々の開発した、ウレアプラズマ専用培地を用いて行った。ウレアプ

ラズマの液体培養液中に 1-50ppm の濃度で nAg を添加し、3 時間の培養後ウレアプラズマのコロニーを形成させた。2-3 日後、ウレアプラズマのコロニー数を顕微鏡下にて計測し nAg の殺菌効果について検証した。

2. 精子の形態変化、nSP70 が結合する精子分子の同定

マウス精子に nSP70 を添加し、形態変化を蛍光顕微鏡を用いて観察した。マウス精子の脂質分析を薄層クロマトグラフィーにより行った。TLC に展開した脂質に対して蛍光標識した nSP70 をオーバーレイし、蛍光イメージングシステムを用いて測光した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考 察

1. nAg のウレアプラズマに対する殺菌効果

添加した 1ppm の nAg は、ウレアプラズマの殺菌効果を示さなかった。一方、5ppm から 50ppm の濃度では、濃度依存性にコロニー数が

減少し、殺菌効果を認めた(図 1)。nAg は、βラクタム系抗菌薬の無効なウレアプラズマに殺菌効果を示した。このことは、泌尿器に生息し尿中にも排泄される本菌に対して、(n) Ag を用いた工業製品、トイレなどに対してはある程度の殺菌や除菌効果が望める結果といえる。

2. 精子の形態変化、nSP70 が結合する精子分子の同定

nSP70 の添加によってマウス精子同士は凝集し、尾部にループを作るような特徴的な形態変化を示した。この変化は遺伝的にリン脂質の異常を起こすマウスの精子形態異常に類似していた。

そこで TLC を用いた定性的なマウス精子リン脂質分析を行い、標準品を元に Rf 値から脂質の同定を行った。マウス精子中にはホスファチジルエタノールアミン(PE)、ホスファチジルセリン(PS)、ホスファチジルコリン(PC)、スフィンゴミエリン(SM)などのリン脂質が豊富に存在していた。また、DsRed で標識された nSP70 は PC、SM に結合することが示された。これらのことから、nSP70 は陽性に荷電したリン脂質と結合することが示された (図 2)。

E. 結論

1. nAg はウレアプラズマの殺菌効果を認めた。
2. nSP70 はマウス精子に存在する PC, SM と結合した。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Yamashita K, Yoshioka Y, Higashisaka K, Mimura K, Morishita Y, Nozaki M, Yoshida T, Ogura T, Nabeshi H, Nagano K, Abe Y, Kamada H, Monobe Y, Imazawa T, Aoshima H, Shishido K, Kawai Y, Mayumi T, Tsunoda

S, Itoh N, Yoshikawa T, Yanagihara I, Saito S, Tsutsumi Y. Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. *Nat Nanotechnol*, 6(5), 321-8, 2011.

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 2 件 (内国際 1 件)】

1. 柳原格、中平久美子、内田薫. 流早産起因微生物ウレアプラズマとその病原発揮機構, 第 58 回トキシシンポジウム、招待講演 2011.7.6-7, 東京.
2. Nakahira K, Uchida K, Nishiumi F, Yanagihara I. Virulence factors of *Ureaplasma parvum*. Joint Congress of The 5th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. The 38th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology, 2011.10.19-21, Nagasaki, Symposist.

【国内学会発表：合計 10 件】

1. 三戸部治郎、柳原格、大西真、石浜明、渡邊治雄. 桿菌の形態形成に関わる細胞骨格蛋白 RodZ の RNA 結合活性を介した赤痢菌 Type III 分泌装置発現への関与、2011 年日本農芸化学会、2011.3.28, 採択後震災のため中止
2. 内田薫、味村和哉、柳原格. 流早産関連細菌 *Ureaplasma parvum* の病原因子の同定. 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2011.7.10-12, 札幌.
3. 味村和哉、野崎昌俊、柳原格. ナノシリカの妊娠マウス投与が胎盤に与える影響, 第 47 回日本周産期・新生児医学会学術集会 2011.7.10-12, 札幌.
4. 柳原格、味村和哉、名倉由紀子、西海史子、

- 中平久美子. Nanoparticle can cross the placental barrier in pregnant mice. 日米コレラ 2011.8.3, 京都.
5. 吉岡靖雄、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、長野一也、阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、鍋師裕美、柳原格、齋藤滋、伊藤徳夫、吉川友章、堤康央. 安全なナノマテリアルの創製に向けた次世代影響評価：妊娠後期暴露の胎児影響に焦点を絞って, 第 18 回日本免疫毒性学会、2011.9.8-9, 千葉.
 6. 吉岡靖雄、山下浩平、東阪和馬、森下裕貴、長野一也、阿部康弘、鎌田春彦、角田慎一、鍋師裕美、柳原格、齋藤滋、伊藤徳夫、吉川友章、堤康央. 食品中ナノマテリアルの安全性評価：安全なナノマテリアルの創製に向けた次世代影響について. 第 102 回日本食品衛生学会、2011.9.29-30, 秋田.
 7. 山下浩平、吉岡靖雄、鍋師裕美、柳原格、齋藤滋、伊藤徳夫、吉川友章、堤康央. 安全なナノマテリアルの開発に資する非結晶ナノシリカの生殖発生毒性評価. 第 61 回日本薬学会近畿支部、2011.10.22, 神戸.
 8. 太田小百合、稲垣秀人、宮村浩徳、西澤春紀、柳原格、宇田川康博、倉橋浩樹. ANXA5 プロモーター領域のグアニン四重鎖構造と習慣流産. 第 56 回日本人類遺伝学会、2011.11.9-12, 千葉.
 9. 岩田みさ子、中平久美子、和栗雅子、光田信明、倉橋浩樹、柳原格、中西功. 不育症患者におけるアネキシン A5 遺伝子 SNP5 と生児獲得に関する研究. 第 56 回日本生殖医学会、2011.12.8-9, 横浜.
 10. 久野秀太、小野寺章、西海史子、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一. 非晶質ナノシリカの精子頭部への結合による精子運動性の低下, 日本薬学会 第 132 年会 2012.3.28-31, 札幌.

【国際学会発表：合計 1 件】

1. Uchida K, Nakahira K, Shimizu T, Yanagihara I. Inflammatory response and intrauterine fetal death in pregnant mice induced by MBA from clinical isolate of *Ureaplasma parvum*. Joint Congress of The 5th Meeting of Asian Organization for Mycoplasmaology. The 38th Meeting of the Japanese Society of Mycoplasmaology. 2011.10.19-21, Nagasaki

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

1. 「習慣流産の遺伝子発見」毎日新聞, 中日新聞, 朝日新聞, 日本経済新聞, 47NEWS, 東京新聞, 大阪日日新聞, 京都新聞, 大分共同新聞, その他 2011.2.2. 倉橋浩樹、柳原格他の論文紹介.
2. 「加熱しても壊れない、食中毒原因菌・腸炎ビブリオの毒素に迫れ!!」柳原格、橋本博 Spring-8 News, 55, 2-4, 2011.
3. 「ナノ粒子の胎児への影響, 大小・表面加工で変化」、日本経済新聞 2011.4.25. 堤康央、柳原格他の論文紹介.
4. “Nanoparticles impact pregnancy in mice.” Chemical and Engineering News (C & EN) ACS, April 11, 2011. 堤康央、柳原格他の論文紹介.
5. “Nanoparticles versus the placenta.” Jeffrey A. Keelan. Nat Nanotechnol, 6, p263-264, 2011. 堤康央、柳原格他の論文紹介.

6. 「ナノ材料 国が安全性調査」朝日新聞（夕刊）2012.2.6. 堤康央らとの共同研究成果を受けて厚生労働省が調査を開始

研究協力者

中平久美子、西海史子、内田薫

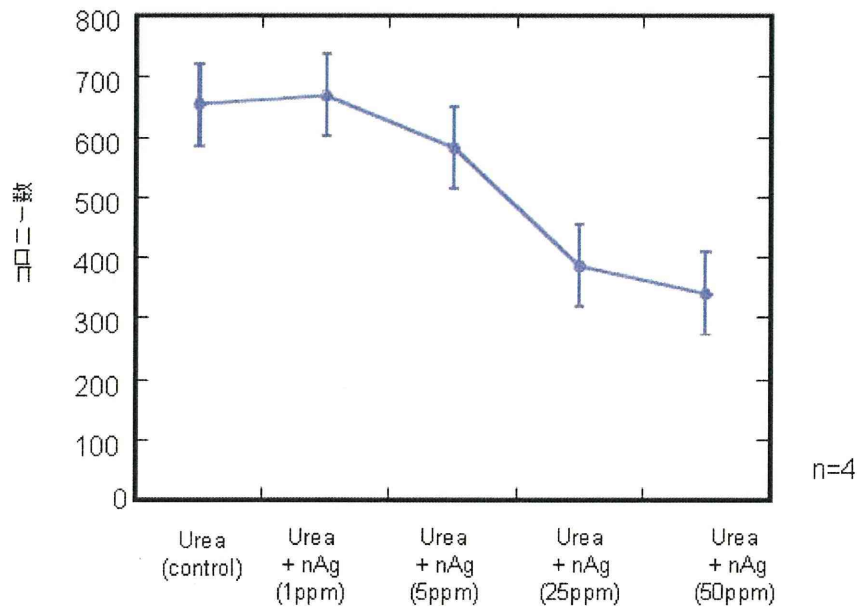


図1. nAgのウレアプラズマに対する殺菌効果. 早産患者から分離されたウレアプラズマ(*Ureaplasma parvum*)の培養液中に1~50ppmの濃度のnAgを入れて3時間の培養を行った後、ウレアプラズマのコロニーを形成させてコロニー数について比較した。

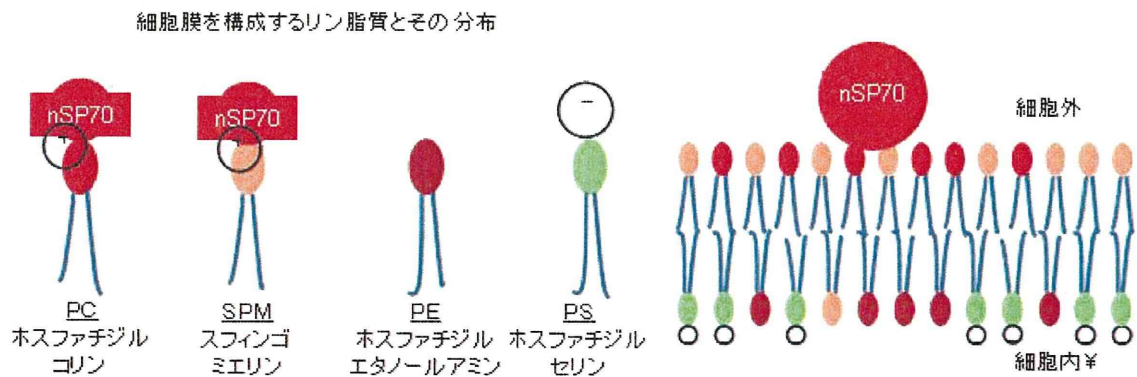


図2. nSP70の精子リン脂質との結合のまとめ. 細胞外に豊富に存在する陽性荷電を有するPC, SMとの結合が認められた。

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)

「ナノマテリアルの経皮・吸入曝露実態の解析基盤および経皮・吸入毒性評価基盤の確立
とヒト健康影響情報の集積」

分担研究報告書

乳幼児・小児・成熟個体におけるナノマテリアルの情動・認知行動毒性学的 評価基盤の新規確立とその評価

研究分担者 宮川 剛 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

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 20nm のナノ白金 (nPt) あるいは直径 1nm のサブナノ白金 (snPt) を尾静脈投与し、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、ナノ白金を投与した妊娠雌マウスから生まれてきた仔は、社会的行動の増加、聴覚性驚愕反応の亢進、うつ様行動の亢進傾向を示し、一方、サブナノ白金を投与した妊娠雌マウスから生まれてきた仔は、成長後の体重および筋力の低下、不安様行動やうつ様行動の低下が認められた。なお、妊娠期ナノ白金曝露による新奇環境場面での活動性、痛覚感受性、運動学習能力、恐怖記憶に関連する行動特性への影響は確認されなかった。これらの結果から、妊娠期ナノ白金曝露は、母体を介して胎仔の発達に影響を及ぼし、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を及ぼすことが明らかになった。また、ナノ白金の大きさの違いが行動発達に対して異なる影響を及ぼし、行動異常を引き起こす可能性があることも示唆された。

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について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

を用いた行動解析により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、化粧品や医薬品などで実用化されている直径 20nm のナノ白金 (nPt) と 1nm のサブナノ白金 (snPt) 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子どもを被験体として使用した。雌マウスが妊娠 16、17 日目の時に nPt または snPt (10mg/kg) を静脈内投与する nPt 群と snPt 群、ならびに生理食塩水を投与する対照群の 3 群を設け、各群の雌か

ら出生した仔が 10 週齢になった後、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）、オープンフィールドテスト（活動性・情動性の評価）、高架式十字迷路テスト（不安様行動の評価）、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）、尾懸垂テスト（うつ様行動の評価）、恐怖条件づけテスト（文脈記憶・恐怖記憶機能の評価）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スクリーニング

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、nPt 群と対照群の間に有意な差はなく、妊娠期ナノ白金暴露による仔の身体的発達への影響は認められなかった（図 1A-D）。一方、snPt 群は 10 週齢時の体重が対照群より統計的に有意に少なく（図 1A）、妊娠期サブナノ白金暴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。妊娠期サブナノ白金暴露を受けた仔の成長後の体温には異常は認められなかった（図 1B）。また、wire hang テストにおいて群間に有意な筋力の違いは認められなかったが（図 1C）、握力測定テストにおいて snPt 群の握力が対照群よりも有意に低く（図 1D）、妊娠期サブナノ白金暴露が握力低下を引き

起こす可能性が示唆された。

2. 不安様行動の増加

不安様行動を評価するために、明暗選択テスト、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、ガラス玉覆い隠しテストを行ったところ、明暗選択テスト（図 2）、オープンフィールドテスト（図 3）、ガラス玉覆い隠しテスト（図 4）においては、各群の不安様行動に有意な差はなかった。一方、高架式十字迷路テストでは、snPt 群が対照群と比較して不安様行動が低下していることが明らかになった（図 5）。但し、この変化は逃避行動の亢進を反映している可能性もあり、今後の検討が必要である。

3. うつ様行動の増加

うつ様行動を評価するために強制水泳テストおよび尾懸垂テストを行った。強制水泳テストでは、snPt 群が対照群に比べて不動時間の割合が有意に少なく、移動距離が多いことから、うつ様行動が低下していることが示唆された（図 6）。一方、nPt 群は、対照群と比較して、不動時間の割合が早い段階で増加し、うつ様行動の開始が早い傾向が認められた。しかしながら、尾懸垂テストでは、いずれの群間のうつ様行動にも有意な差は検出されず（図 7）、妊娠期ナノ白金およびサブナノ白金暴露が次世代のうつ様行動に与える影響については今後も検討する必要がある。

4. 社会的行動の増加

新奇環境下においてこれまでに会ったことがない 2 個体を出会わせる社会的行動テストを行った結果、nPt 群は対照群に比べて他個体に対する一回当たりの接触時間が有意に長かった（図 8）。この結果は、妊娠期ナノ白金暴露が仔の社会性の発達に対して促進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は、他個体への選好性に基づく社会的行動の増加は認められず（図 9）、妊娠期ナノ白金暴露による促進効果は限定的であり、再確認する必要があると考えられる。一方、snPt 群はいずれのテストにおいても対照群との間に有意な差

は認められなかった。

5. 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、各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白金およびサブナノ白金暴露の影響は認められなかった（図 10B）。しかしながら、本テストにおいて nPt 群は大きな音に対する驚愕反応が統制群より亢進している傾向があった（図 10A）。

6. 痛覚感受性及び協調運動・運動学習の評価

痛覚感受性の測定としてホットプレートテスト（図 11）、協調運動・運動学習能力の測定としてローターロッドテスト（図 12）を行ったが、いずれのテストにおいても各群間に有意差はなく、痛覚感受性や協調運動・運動学習能力の発達に対する妊娠期ナノ白金およびサブナノ白金暴露の影響は認められなかった。

7. 文脈記憶・恐怖記憶機能の評価

音刺激と電気ショック刺激の対呈示による連合記憶の形成、ならびに音刺激および電気ショック刺激を受けた環境下で想起される文脈記憶・恐怖記憶を評価した結果、いずれも各群間に有意な差はなく（図 13）、妊娠期ナノ白金・サブナノ白金暴露の影響は確認されなかった。

E. 結論

妊娠期にナノ白金を投与した雌マウスから生まれた仔は、社会的行動の増加、聴覚性驚愕反応の亢進、うつ様行動の亢進傾向を示した。また、同様に胎生期にサブナノ白金に暴露された仔は、成長後の体重および筋力が低く、不安様行動やうつ様行動の低下が認められた。なお、不安様行動やうつ様行動の低下は、ストレス場面からの逃避行動が亢進した結果を反映している可能性もある。これらの結果は、妊娠中の雌マウスが 20nm サイズ以下のナノ白金あるいはサブナノ白金に暴露されると、胎盤を通して胎仔の体内にもそれらの物質が流入し、脳神経系の発達に影響した結果として成長後の不安・うつ様行動や社会的行動、

聴覚性驚愕反応のような心理的発達に異常が生じる可能性を示唆している。今後は、今回実施していない別のうつ様行動や学習・記憶機能に関する行動解析についても行い、妊娠期ナノ白金・サブナノ白金暴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。また、前年度に実施した妊娠期ナノシリカ（nSP70）暴露は、聴覚性驚愕反応の顕著な亢進が生じることが明らかになったが、妊娠期ナノ白金でも同様の亢進傾向が認められた。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およびナノ白金移行の確認を行う必要があるだろう。さらに、他のナノマテリアルの影響や投与量・投与時期の違いの影響についても評価する必要がある。例えば、前年度は、nSP70 を妊娠マウスに静脈内投与した検討であったが、表面修飾した nSP70-C や nSP70-N を用いた検討（nSP70 は胎仔吸収や IUGR を誘発するが、nSP70-C や nSP70-N は誘発しない）、低投与量での検討、妊娠初期や授乳期投与の効果の検討を実施する必要がある。また、静脈内投与だけでなく、経皮投与など他の投与ルートや、雄マウスの精子を介した次世代への影響を評価する必要もあるだろう。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

①論文発表

該当無し

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

該当無し

【国内学会発表：合計 2 件】

1. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 山下浩平, 東阪和馬, 藤村真穂, 潘 慧燕, 小椋健正, 長野一也, 阿部康弘, 鎌田春彦, 角田慎一, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉川友章, 宮川 剛, 堤 康央：非晶質ナノシリカの胎仔期曝露による次世代影響の基礎的検討., 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会., 横浜(神奈川県), 2011 年 7 月.
2. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 鍋師裕美, 伊藤徳夫, 吉川友章, 宮川 剛, 堤 康央：胎仔期の非晶質ナノシリカ曝露が新生仔に及ぼす影響の評価—新生仔の免疫機能、神経機能の基礎的検討—., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸(兵庫), 2011 年 10 月.

【国際学会発表：合計 2 件】

1. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Yamashita K., Yoshikawa T., Itoh N., Miyakawa T., Tsutsumi Y. : Postnatal effects of prenatal treatment of amorphous nanosilica., EuroTox2011 (47th Congress), Paris (France), 28-31 Augst, 2011.
2. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Sato H., Nojiri N., Nagano K., Abe Y., Kamada H., Tsunoda S., Nabeshi H., Itoh N., Yoshikawa T., Miyakawa T., Tsutsumi Y. : The effect of in utero exposure to amorphous nanosilica particles on neonatal immune function and neurological function., SOT2012, San Francisco (USA), 11-15 March, 2012.

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況

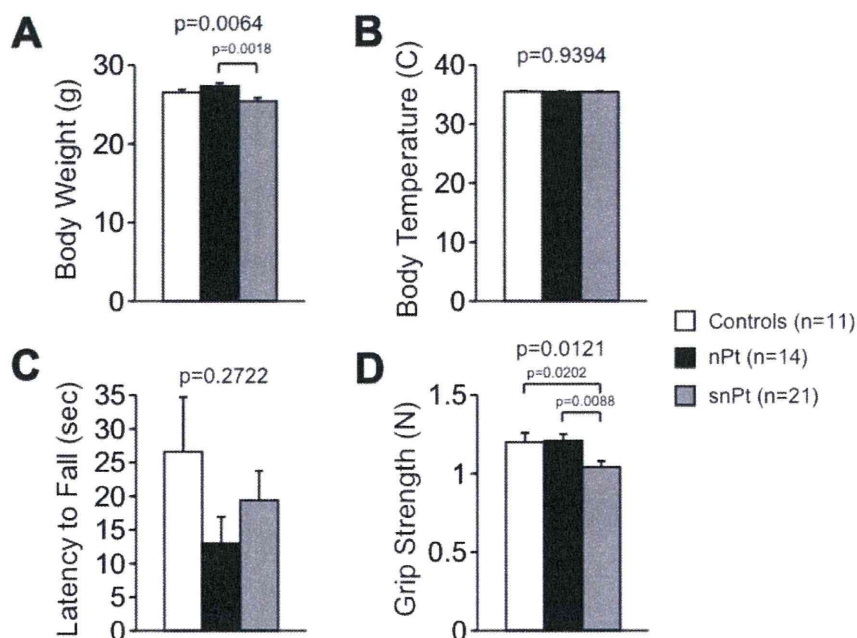


図1. 一般的健康状態及び神経学的スクリーニング. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔が10週齢の時に体重（A）、直腸温（B）、筋力（C）、握力（D）を測定した。snPtに暴露された経験がある仔は、成長後の体重および握力が有意に低下していた。

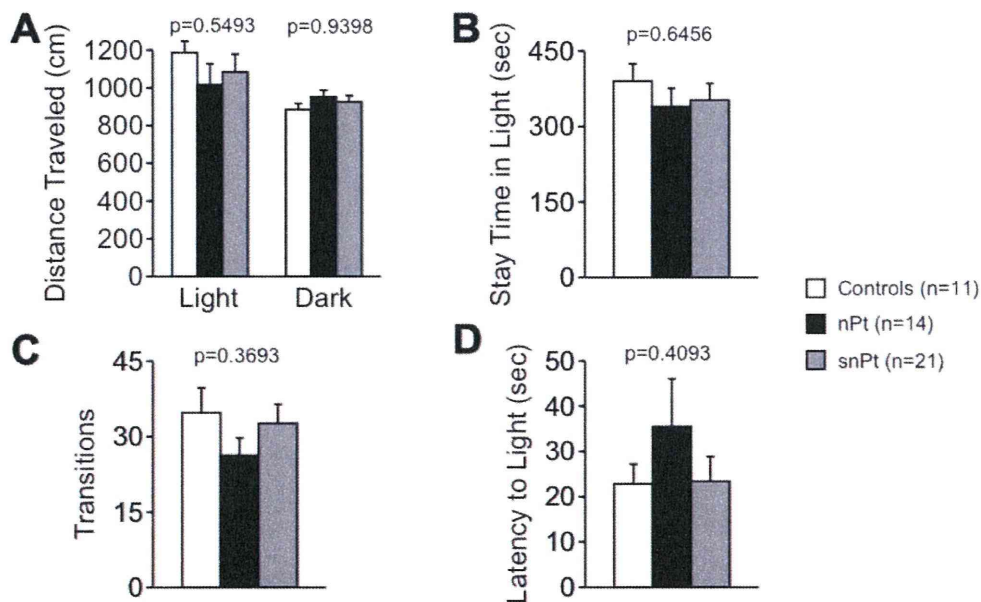


図2. 明暗選択箱における不安様行動. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体時に、隣接する2つの暗箱（3lux）と明箱（390lux）から構成される装置の暗箱に入れ、10分間自由に探索させた。2つの箱の間には往来することが可能な出入口が設けられていた。被験体が10分間に各箱で移動した距離（cm）（A）、明箱での滞在時間（sec）（B）、2つの箱を往来した回数（C）、暗箱からはじめて明箱に入るまでの時間（sec）（D）を不安様行動として解析した。妊娠期nPtおよびsnPt暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。

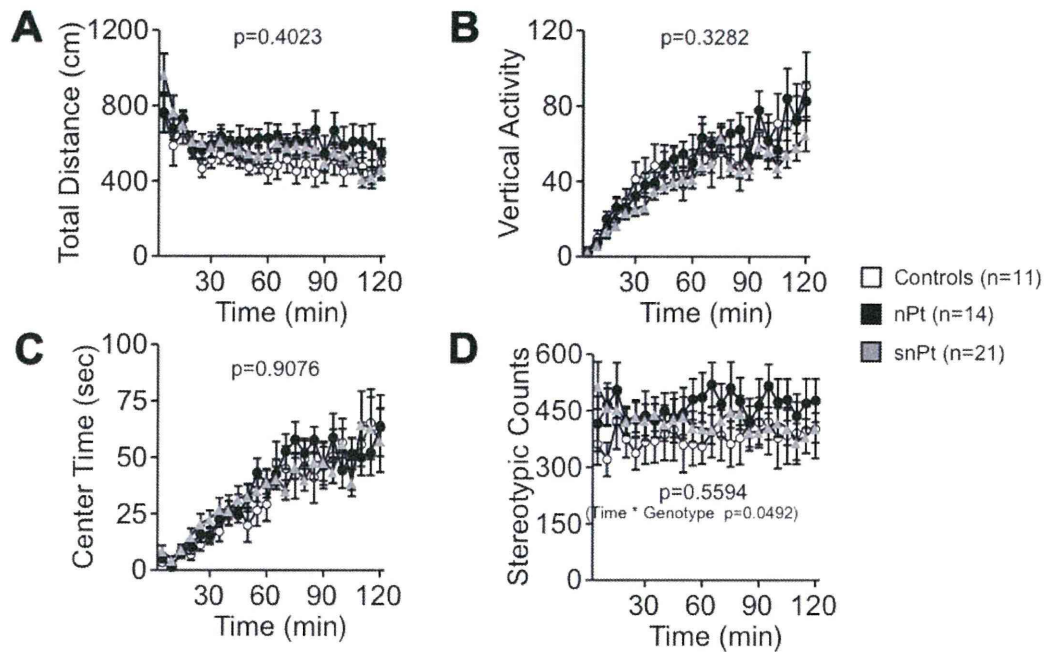


図3. オープンフィールドにおける活動量および不安様行動. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、オープンフィールド装置に2時間入れ、活動性および不安様行動の指標として総移動距離（cm）（A）、立ち上がり回数（B）、中央区画での滞在時間（sec）（C）、常同的行動の回数（D）を解析した。妊娠期nPtおよびsnPt暴露による成長後のオープンフィールド場面における活動量および不安様行動への影響は認められなかった。

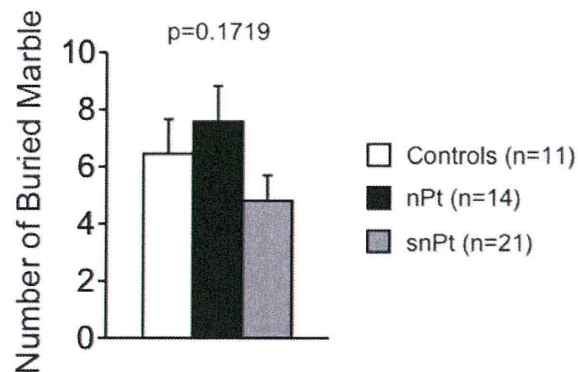


図4. ガラス玉覆い隠し場面における不安様行動. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、20粒のガラス玉が置かれたケージ内に30分間置いた。被験体が30分間に床敷きで覆い隠したガラス玉の数を不安様行動の指標として測定した。妊娠期nPtおよびsnPt暴露による成長後の不安様行動への影響は認められなかった。