

図5. 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、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）、総移動距離（cm）（C）、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（D）を不安様行動として解析した。妊娠期snPt暴露による成長後の不安様行動の低下が認められた。

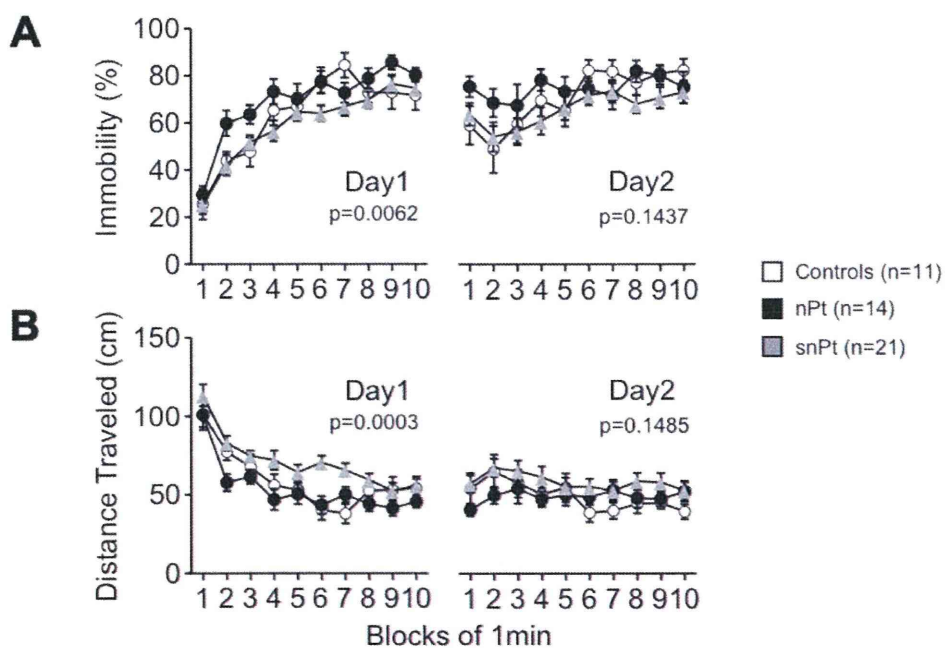


図6. 強制水泳場面におけるうつ様行動の低下。生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、水の入った円柱容器に10分間入れ、水中における不動時間の割合（%）（A）および移動距離（cm）（B）を記録した。不動状態をうつ様行動の指標とした。妊娠期snPt暴露によりうつ様行動の低下が認められた。

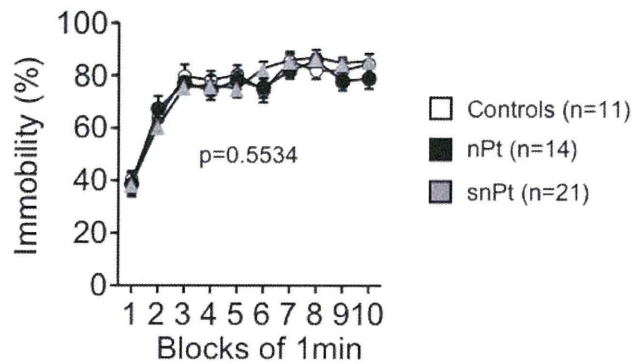


図7. 尾懸垂テストにおけるうつ様行動. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、尾をテープで固定し、尾を上に向けて宙ぶりの状態にした。不動時間の割合（%）をうつ様行動の指標とした。妊娠期nPtおよびsnPt暴露による影響は認められなかった。

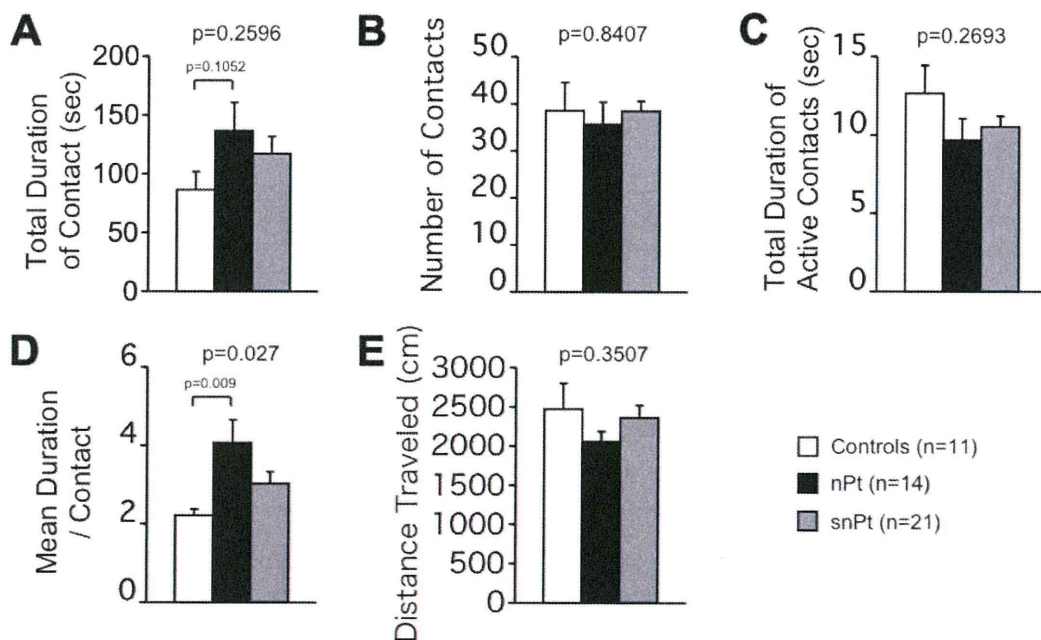
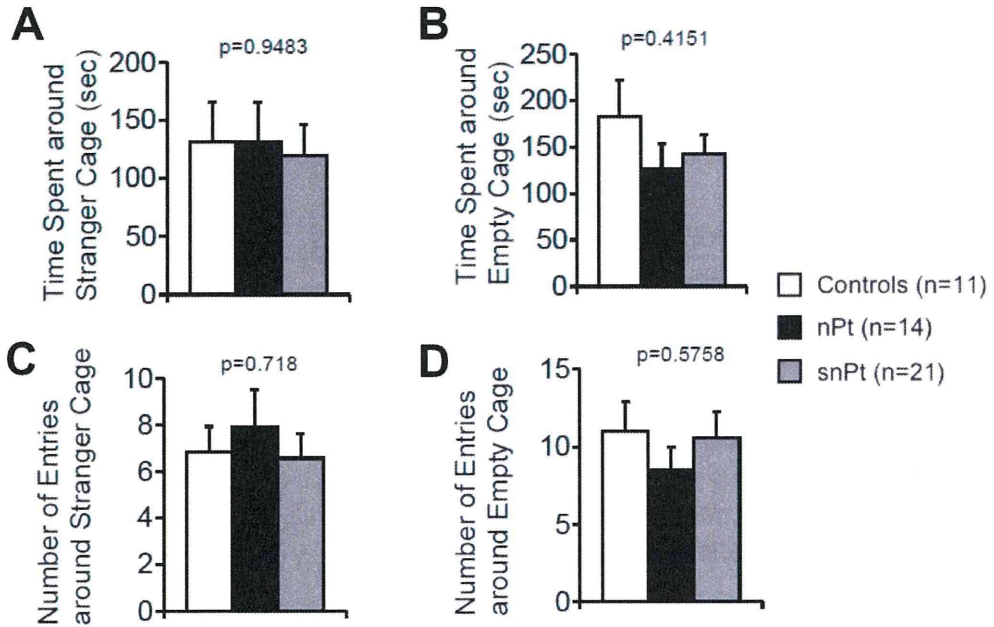


図8. 新奇環境場面における社会的行動の増加. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、別ケージで飼育され同一群に割り当てられ、かつ同程度の体重の他個体と新奇環境場面で出会わせ、その時に示した社会的行動（A：総接触時間（sec）、B：総接触頻度、C：1回の接触における平均接触時間（sec）、D：活発な活動に基づく総接触時間（sec）、E：総移動距離（cm））を10分間記録した。nPtに暴露された経験がある仔は、対照群に比べて成長後の新奇環境場面における社会的行動が多かった。

第1実験



第2実験

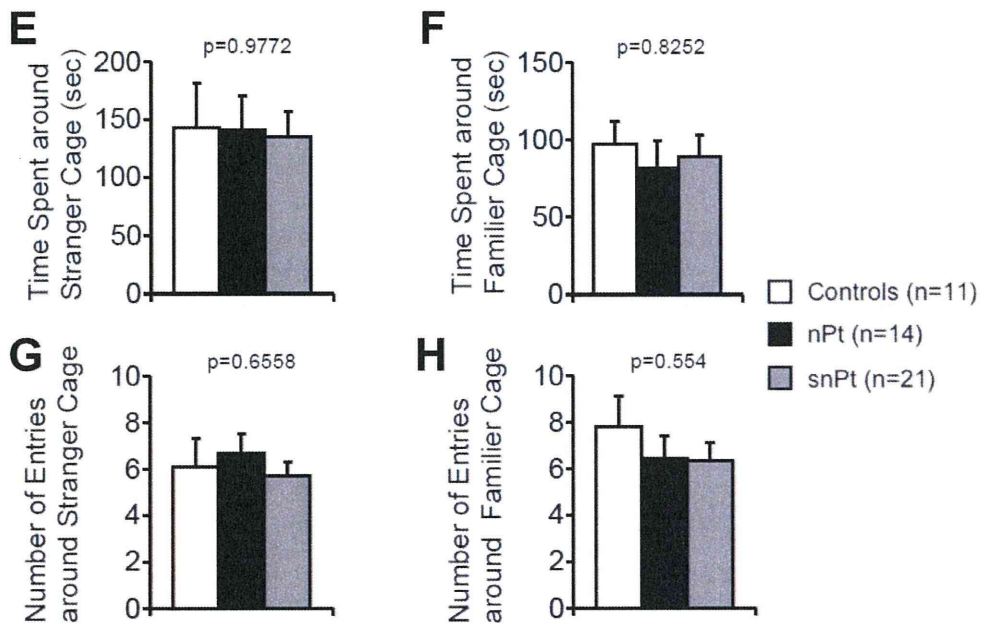


図9. 社会的新奇刺激に対する選好性. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体期に、縦に連なった3つの部屋から構成される装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した。この時、両側の部屋の一方には空のカゴを、もう一方にはC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴを置いた（第1実験）。終了後、被験体を装置から取り出し、空のカゴには新しいC57BL/6J系雄マウスを入れ、第1実験から置いていたC57BL/6J系雄マウスが入ったカゴはそのままにした。再び被験体を装置中央の部屋に入れ、10分間行動を記録した（第2実験）。第1および第2実験で新奇な個体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（sec）および進入した頻度を測定し、社会的新奇刺激に対する選好性を評価したが、妊娠期nPtおよびsnPt暴露による社会的行動への影響は認められなかった。

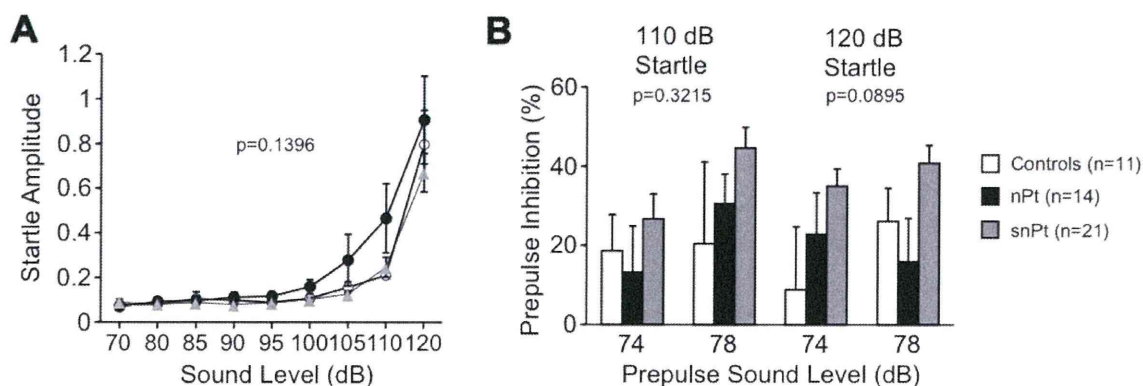


図10. 聴覚性驚愕反応の亢進. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔が成体期に、音刺激（70-120dB）に対して示す驚愕反応（A）を測定した。また、大きな音（110dBあるいは120dB）の前に少しだけ小さな音（74dBあるいは78dB）を呈示し、直前の小さな音によって大きな音に対する驚愕反応が抑制される現象であるブレパルス抑制の抑制率を調べた（B）。nPtに暴露された経験がある仔は、成長後の聴覚性驚愕反応が亢進している傾向が見られた。

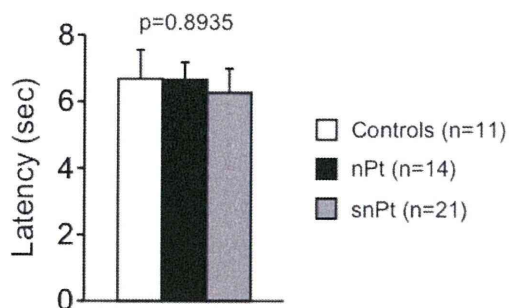


図11. 痛覚感受性. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体時に、55℃に熱したホットプレート装置に乗せ、熱さに対する逃避行動を示すまでの時間（sec）を痛覚感受性の指標として評価したが、妊娠期nPtおよびsnPt暴露による影響は認められなかった。

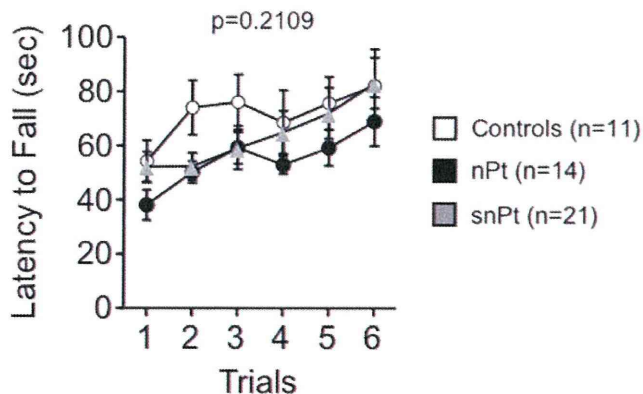


図12. 協調運動・運動学習能力. 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体時に、回転するロッド（棒）の上に乗せて、落ちるまでの時間（sec）を指標に協調運動・運動学習能力を評価したが、いずれの群間にも有意差はなく、妊娠期nPtおよびsnPt暴露による影響は認められなかった。

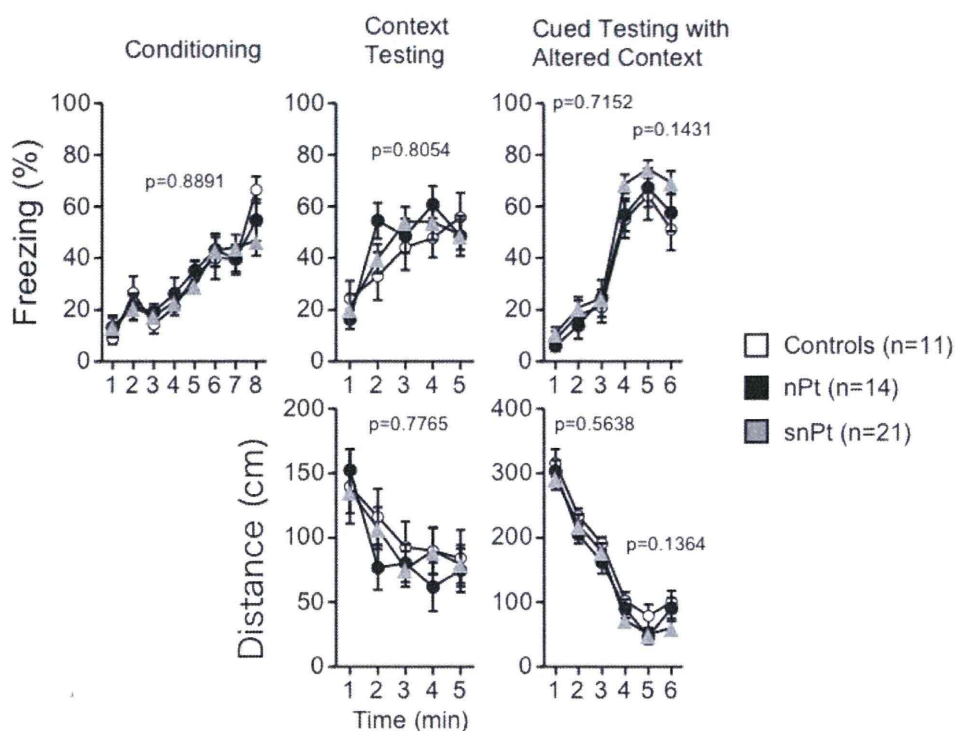


図13. 文脈記憶・恐怖記憶機能。 生理食塩水で懸濁したnPt溶液あるいはsnPt溶液（それぞれ10mg/kg）を妊娠16、17日目のBALB/c系雌マウスに尾静脈投与した。出生した仔は成体時に、長方形の箱に入れ自由に探索させた後、30秒間のホワイトノイズ（55dB）と2秒間の電気ショック（0.3mA）を合計3回、120秒間隔で対呈示した（Conditioning）。その24時間後に、マウスを同じ箱に5分間入れ、すくみ反応（freezing）を5分間にわたって測定した（Context Testing）。その後、三角柱の箱に入れてから3分後にホワイトノイズ（55dB）を3分間呈示し、すくみ反応を測定した（Cued Testing with Altered Context）。各テスト場面におけるすくみ反応の割合からマウスの文脈依存的な恐怖記憶を調べることが可能である。いずれの場面においても、各群間に有意な差はなく、妊娠期nPtおよびsnPt暴露による恐怖記憶への影響は認められなかった。

ナノマテリアルの生殖器動態評価および繁殖毒性 (精子・卵子・受精卵)・胚発生毒性評価

研究分担者 河合裕一 神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 発生分化研究室

研究要旨

本研究は、受精卵と精子を用いたナノマテリアルの安全性研究から、精子特有のナノ生殖毒性を昨年度までに見出している。すなわち、交配後の雌マウスから採取した受精卵へのナノマテリアルの過剰曝露は、受精卵の胚盤胞期までの発生には影響せず、一方、雄マウスから採取した精子へのナノマテリアルの過剰曝露は、精子の運動性を阻害することを明らかとしてきた。これら結果は、受精前から受精に至る期間と受精後から着床に至る期間とでナノ生殖毒性の感受性が異なることを示唆しており、特に精子の運動性阻害による受精過程への影響が懸念された。そこで本研究は、精子の運動性を阻害した粒子径 70 nm φ のナノシリカ (nSP70) について、精子運動解析装置を用い種々の運動性を定量的に評価した。精子の運動性は、WHO の基準に従い、生存率 (運動率)、直進速度、曲線速度、直進性、頭部振幅、頭部振幅回数を評価した。また nSP70 の処置は、30、100、300 μg/mL の濃度を用いた。その結果、30 μg/mL 以下であれば、受精に必要な精子の運動性は確保できることがあきらかとなった。次に nSP70 による精子の運動性阻害のメカニズムを解明するため、nSP70 が精子内へ取り込まれるか否かについて透過型電子顕微鏡を用い観察した。その結果、精子内部への nSP70 の取り込は観察されず、むしろ精子頭部膜表面を nSP70 が覆っていた。これら結果より、nSP70 の精子頭部膜表面への結合が、ナノ生殖毒性(精子の運動性阻害)の発現に関連すると示唆された。また、ナノシリカの使用量 (曝露量) を制限することで、安全性の確保につながる事が明らかとなった。昨年度までの研究では、精子におけるナノ毒性は、曝露から 5 分程度の間隔で観察された。すなわち、ナノ生殖毒性は、nSP70 の細胞膜への結合の直後から発現すると想定される。そこで本研究は、精子の運動性を制御する Ca^{2+} 調節および男性不妊の原因のひとつである酸化ストレスとの関連について培養細胞を用い解析した。その結果、ナノサイズのシリカ特異的な細胞内遊離 Ca^{2+} の上昇が、処置後数分以内に観察された。一方、細胞内酸化ストレスは、nSP70 特異的であるものの、酸化ストレスの増加まで 1 時間程度が必要であり、二次的な毒性産物であると考察された。また本研究では、ナノシリカの生殖器官への蓄積 (動態) を解析するため、血管の弛緩作用の観点から研究に取り組んだ。その結果、ナノサイズのシリカ特異的な血管の弛緩反応が観察された。以上の結果は、ナノマテリアルの安全性の基準となる最大使用量 (曝露量) の知見を呈しており、さらに、細胞膜との接触・結合からはじまるナノマテリアルの毒性メカニズムを示唆する研究成果であった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの体内動態は、未だ基本となる見解へとたどり着かないものの、血管バリアの透過による脳や精巣への移行が報告されている (Small, 4(12):21 08-11(2008)., J.Health Sci., 55(1), 95-102(2009)., Eur J Pharm Biopharm. 77(3):407-16(2011).). これら報告によると、金・酸化チタン・シリカを材料とするナノマテリアルは、少なくとも 10 nm 前後の粒子径であれば、血管バリアを透過すると考えられる。すなわち、従来サイズ (サブミクロンサイズ) の素材に適応されている安全性の基準は、ナノ素材の安全性において矛盾を生じている。昨年度までの本グループの研究では、ナノシリカ・ナノ銀・ナノ白金を用いた解析から、培養精子への過剰暴露が、精子の運動性を阻害するナノ特有の生殖毒性を見出し、ナノの安全性に疑問を呈する研究結果であった。そこで本研究は、ナノシリカによる精子の運動性阻害について、閾値 (安全な用量) の決定、および毒性メカニズムの探索、さらには精巣への移行メカニズム (動態) について安全性研究の観点から解析した。

B. 研究方法

1. 実験材料

ナノマテリアルは、粒子径 70 nm φ のナノシリカ (nano silica particle: nSP70)、粒子径 1 nm φ のサブナノ白金 (sub nano platinum: snPt)、粒子径 1 nm φ のサブナノ銀 (sub nano Argentum: snAg) を用いた。また、シリカは粒子径 300 nm · 1000 nm φ (nSP300、mSP1000) の従来サイズ、および表面をカルボキシル基 (nSP70-C)、アミノ基 (nSP70-N) で修飾された素材を用いた。さらに、一部の実験においては、蛍光 (ローダミン) 標識のシリカを用いた。

2. 精子運動解析装置を用いたナノ生殖毒性の閾値の決定

11 週齢の雄性 ICR マウス(日本エスエルシー)

から精巣上体尾部を摘出。精管とのつなぎ目付近から成熟精子 (精子塊) を採取。Brinster's BMOC-3 Medium (Invitrogen Co. Ltd.) で 30 分前培養。1×10⁶ sperms/mL の精子を調製し、ナノシリカ暴露前および暴露後の運動性を精子運動解析装置 SMAS (DITECT Co. Ltd.) を用い定量的に評価。運動性の評価は、WHO の基準に則し、運動率、直進速度、曲線速度、直進性、頭部振幅、頭部振動数を解析。

3. 透過型電子顕微鏡を用いた精子内への nSP70 の取り込に関する解析

11 週齢の雄性 ICR マウスから精巣上体尾部を摘出。精管とのつなぎ目付近から成熟精子 (精子塊) を採取。Brinster's BMOC-3 Medium (Invitrogen Co. Ltd.) で 30 分前培養。1×10⁶ sperms/mL の精子に、nSP70 (100 μg/mL) を暴露 (10 分)。精子懸濁液の 10~20 倍量の前固定液 (0.1 M カコジル酸バッファー、2.5% グルタルアルデヒド、2% ホルムアルデヒド) を用い、室温で固定 (2 時間)。1% アガロース (0.1 M カコジル酸バッファー) に精子を移し、アガロースブロックを作成。後固定液 (0.1 M カゴジル酸緩衝液、1% オスミウム酸水溶液) を用いアガロースブロックを室温で固定 (1 時間)。常法に従い、エポキシ樹脂で包埋し、ダイヤモンドナイフで超薄切片を作成。酢酸ウラン溶液で染色し、JEM 1010 透過型電子顕微鏡 (JEOL) で観察した。

4. 蛍光顕微鏡を用いた細胞内活性酸素種の観察

運動精子を対象とする解析は困難なため、本研究は培養細胞を用いた。細胞は、BALB/3T3 繊維芽細胞を用い、5% Fetal Calf Serum (FCS) を含む Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) 培地を用いて培養した。Glass Bottom dish (松浪硝子工業株式会社)、DAPI (同仁化学研究所 Co. Ltd.) および DCFH-DA (同仁化学研究所) を、それぞれ標準プロトコルに従い使用および処置し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D (OLYMPUS) を用い細胞内活性酸素種を経時的に観察した。

5. 蛍光顕微鏡を用いた細胞内遊離 Ca^{2+} の観察

運動精子を対象とする解析は困難なため、本研究は培養細胞を用いた。細胞は、BALB/3T3 繊維芽細胞を用い、5% FCS を含む E-MEM 培地で培養した。Glass Bottom dish、DAPI および Calcium kit Fluo-4(同仁化学研究所)を、添付の標準プロトコルに従い使用・処置し、共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000-D(OLYMPUS)を用い細胞内遊離 Ca^{2+} を経時的に観察した。

6. マグヌス法による血管弛緩の解析

11 週齢の Wistar 系雄性ラット(日本エスエルシー)から胸部大動脈を摘出。血管を幅約 3 mm にカットし、リング標本作製。マグヌス管内に 37 °C の Krebs-Henseleit solution を満たし、リング標本をマグヌス管内にセット。血管を Phenylephrine (処置濃度 1 μ M) で収縮させ、各種ナノマテリアル等を(処置濃度 300 μ g/mL)を暴露し、血管の弛緩反応を測定。血管の最大弛緩率は、Papaverine による弛緩反応を 100 % として算出。

7. 透過型電子顕微鏡を用いた血管内皮への nSP70 の取り込みに関する解析

11 週齢の Wistar 系雄性ラットから胸部大動脈を摘出。血管を幅約 3 mm にカットし、リング標本作製。マグヌス法による種々の影響を確認できた血管を、前固定液 (B-3 と同じ) を用い、室温で固定 (2 時間)。さらに、後固定液 (B-3 と同じ) を用い、室温で固定 (1 時間)。常法に従い、エポキシ樹脂で包埋し、ダイヤモンドナイフで超薄切片を作成。酢酸ウラン溶液で染色し、JEM 1010 透過型電子顕微鏡(JEOL)で観察。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

ナノマテリアルを原因とする健康被害に関する報告はないものの、その可能性を示唆する動物実験・培養細胞の研究結果が多数報告されている(参考文献)。本研究グループでは、ナノシリカ (nSP70) による培養精子の運動性阻害を見出し

ており、ナノ特有の生殖毒性の存在を明らかとしてきた。一方、これら実験条件は過剰量の暴露による現象であるため、閾値などの安全性を担保する科学的根拠が望まれる。そこで本研究は、WHO の基準に則した男性不妊の検査を、SMAS を用い実施した。

1. ナノシリカによる精子の運動性阻害を基準とする nSP70 の閾値

男性不妊は、不妊原因の半数近くを占めるといわれており、不妊患者の診察に際しては、まず精液を検査し男性不妊の可否からはじまる(べきである)。男性不妊と診断する項目は多数あり、数・形態・運動性などから総合的に評価される。本研究の対象となる項目は、生存率および運動性である。診断基準は、①生存率 75%以上、②前進運動精子 50%以上である。前進運動精子が基準値以下であれば、精子無力症 (asthenozoospermia) と診断される。昨年度までの研究結果から判断すると、少なくとも 300 μ g/mL の nSP70 処置条件は明らかに精子無力症に該当する。そこで本研究は、SMAS を用い運動率、直進速度、曲線速度、直進性、頭部振幅、頭部振動数を解析した。その結果、300 μ g/mL はすべての項目で正常値の 30%以下であった(図 1)。100 μ g/mL は直進速度・直進性が正常値の 50%以下、その他の項目は約 60%以上であった(図 1)。一方、30 μ g/mL は、すべての項目において正常値の約 60%~70%であった(図 1)。以上の結果は、受精能を基準とした nSP70 の安全性評価において、30 μ g/mL 以下の濃度であれば、安全性が担保されることが明らかとなった。

2. ナノシリカの精子内への取り込み

細胞膜を通しての物質の輸送は、「受動輸送 (passive transport) ・能動輸送 (active transport) によるイオンや親水性分子の取り込み」、および「膜動輸送 (endocytosis または exocytosis) ・食作用 (phagocytosis) ・飲作用 (pinocytosis) による輸送タンパクの取り込み」に大別される。ナノマテリアルの毒性は、後者によ

る取り込みと細胞内小器官への移行または蓄積等に基づく毒性発現メカニズムによる理解が一般的である。精子においても、同様の輸送経路が存在することから、精子内へのナノシリカの取り込みが原因であると想定される。一方、電子顕微鏡を用いた解析では、精子内への取り込みは観察されず、精子頭部膜表面への結合が観察された。また、精子の中部・尾部膜表面においてはナノシリカの結合は観察されなかった。以上の結果は、ナノシリカによる精子の運動性阻害は、精子頭部膜表面との結合からはじまる毒性メカニズムに基づくこと示唆された。

3.細胞内活性酸素種産生へのナノマテリアルの影響

男性不妊症患者の精液は、活性酸素の量が多く、精子の運動率・機能低下との関連が指摘されている(Hum Reprod. 14(3):243-58 (2008)., Hum Reprod.26(7):1628-40(2011)。ナノシリカにおいても、細胞内活性酸素種の増加を示す研究成果が複数報告されており、精子の運動性阻害との関連が想定される。そこで本研究は、精子の運動性阻害と細胞内活性酸素種との関連に着目した。しかし、培養液中を動き回る精子を対象に観察するのは技術的に困難である。そこで、培養細胞を用い酸化ストレスの増加にかかる時間や産生部位について検討した。その結果、nSP70 および snAg、snPt は、約 1 時間程度の処置により細胞内活性酸素種の増加が確認された(図 3)。また、nSP70 および snPt は、細胞全体での細胞内活性酸素種が観察されたが、snAg は細胞質と特定の部位に強い傾向が観察された(図 3)。しかし、ナノマテリアルによる細胞内活性酸素種の増加には、ある一定(本研究では 1 時間)の時間が必要である。精子の運動性阻害は、ナノマテリアルの処置後直ちに観察されたことから、細胞内活性酸素種は二次的な細胞毒性と考えられる。

4.細胞内遊離 Ca^{2+} へのナノマテリアルの影響

精子は、「運動の開始」・「運動の活性化」・「卵への誘引」などの運動性の変化を、適切な場所・

適切な時に受けることで受精を完了する。これら反応は、精巣や子宮の分泌液に含まれる成分によって活性化されると考えられている。これらメカニズムは、いまだ不明な点が多く、特にヒトやげっ歯類における知見は非常に乏しい。一方、細胞内遊離 Ca^{2+} の増加に伴う精子の超活性化は、ホヤやウニ、げっ歯類とヒトに至る種々のモデル動物において観察されており、精子の運動性獲得には、細胞内 Ca^{2+} の増加が必要である。シリカ素材は、2 価イオンとの親和性が高く、2 価金属イオンの吸着剤としても用いられており、 Ca^{2+} 調節への影響が想定される。そこで、ナノマテリアルによる細胞内遊離 Ca^{2+} 調節への影響について培養細胞を用い検討した。その結果、nSP70 は処置直後に一過性の細胞内遊離 Ca^{2+} を増加させた。一方、nSP300 や mSP1000 は、細胞内遊離 Ca^{2+} に影響しなかった。すなわち、ナノシリカの毒性は、細胞膜との接触直後から Ca^{2+} シグナル等を介する毒性発現を惹起すると示唆され、精子の運動性阻害が細胞内遊離 Ca^{2+} の攪乱によると考察された。

5.血管へのナノマテリアルの影響

精子は、精巣内で精原細胞から発生・分化し形態を形成する。精子のナノマテリアルに暴露する機会は、血液精巣関門の透過が候補として考えられる。少なくとも金・酸化チタン・シリカのナノ素材は、精巣へ移行することから、血管バリアを透過したと考えられる。そこで本研究は、ナノマテリアルの精巣への移行メカニズムについて、血管の弛緩作用に着目し追究した。その結果、nSP70 および snAg による血管の弛緩が観察された(図 5) nSP70 による血管の弛緩は、300 μ g /mL であれば最大弛緩の約 70%、100 μ g /mL で約 50%、30 μ g /mL で約 30%であり、10 μ g /mL では血管の弛緩作用は観察されなかった(図 5-G)。また、300 μ g /mL の nSP70 は、アセチルコリン(1 μ M) と同等の弛緩率であった(図 5-E)。さらに、nSP70 による血管弛緩作用は、粒子表面を NH_2 基もしくは $COOH$ 基

で修飾することで改善された (図 5-E)。一方、snAg は処置濃度に関わらず 100%の弛緩率を示した。snAg の最大弛緩までの時間は、処置濃度の低下に伴い延長した (図 5-H)。また、nSP70 による血管の弛緩反応は、血管内腔側の電子顕微鏡画像から、内皮細胞への取り込による影響が示唆された (図 6)。血管弛緩は、各種レセプターを介し PI3K-Akt-eNOS 経路により惹起される。また PI3K は、GEF をリン酸化し Rac 1-PAK を介するアクチン重合による血管内皮細胞の収縮を惹起し、内皮細胞のバリア機能を低下させる。以上の結果および知見は、ナノマテリアル自体が血管を弛緩させ・透過性の亢進を惹起することで精巣等へ移行すると考察された。

E. 結論

ナノマテリアルは、精子および血管においてナノサイズ特有の毒性を示した。一方、これら毒性は、使用量 (暴露量) の制限により回避可能であることが明らかとなった (図 1、図 5-G)。精子の運動性阻害や血管の弛緩反応は、その作用メカニズムを明らかにすることで有効利用への展開が期待できる。今後は、細胞膜との接触から始まるナノ生殖毒性、ナノ血管毒性のメカニズムを解明し、安全で有効なナノ材料の開発へと貢献する研究への発展が期待される。

F. 健康危険情報

該当無し

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

【国内学会発表：合計 12 件】

1. 小野寺章、諸澤瑛、久野秀太、田中敦士、吉岡靖雄、吉川友章、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカによる細胞内カルシウムイオンの動態変化., 第 38 回日本トキシコロジー学会学術年会., 横浜, 2011 年 7 月.
2. 小野寺章、屋山勝俊、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：生殖細胞および血管内皮細胞への非晶質ナノシリカの影響評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会., 神戸, 2011 年 11 月.
3. 久野秀太、小野寺章、諸澤瑛、田中敦士、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカ暴露による精子の運動性評価., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会., 神戸, 2011 年 11 月.
4. 田中敦士、小野寺章、屋山勝俊、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカ暴露による摘出ラット胸部大動脈の弛緩作用., 第 61 回日本薬学会近畿支部総会., 神戸, 2011 年 11 月.
5. 小野寺章、岩崎綾香、宝諸あい、田鍋奈巳、根津菜摘、田中敦士、久野秀太、諸澤瑛、米村重信、堤康央、河合裕

- 一：非晶質ナノシリカは胃潰瘍および創傷の治癒を阻害する., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
6. 根津菜摘、小野寺章、岩崎綾香、田鍋奈巳、宝諸あい、田中敦士、久野秀太、諸澤瑛、安池修之、中寛史、内山真伸、佐藤雅彦、鍛冶利幸、伊藤徳夫、河合裕一：Zn(bpy)Cl₂ によるマウス間葉系細胞株 ST2 の骨芽細胞への分化促進作用., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
7. 田中敦士、小野寺章、屋山勝俊、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカ暴露による摘出ラット胸部大動脈の弛緩作用., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
8. 田鍋奈巳、小野寺章、岩崎綾香、根津菜摘、宝諸あい、田中敦士、久野秀太、諸澤瑛、米村重信、堤康央、河合裕一：ナノマテリアル暴露による細胞内活性酸素種の生成機序に関する検討., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
9. 宝諸あい、小野寺章、岩崎綾香、田中敦士、田鍋奈巳、根津菜摘、久野秀太、諸澤瑛、米村重信、堤康央、河合裕一：創傷治癒における線維芽細胞への非晶質ナノシリカの影響., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
10. 諸澤瑛、小野寺章、屋山勝俊、田中敦士、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、岡本博、米村重信、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカによる細胞内カルシウムイオンの動態変化., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.
11. 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., 札幌, 2012 年 3 月.
12. 岩崎綾香、小野寺章、田鍋奈巳、根津菜摘、宝諸あい、田中敦士、久野秀太、諸澤瑛、河合裕一：マウスの胃潰瘍再生における非晶質ナノシリカの影響., 日本薬学会第 132 年会., 札幌, 2012 年 3 月.

知的財産権の出願・登録状況

該当無し

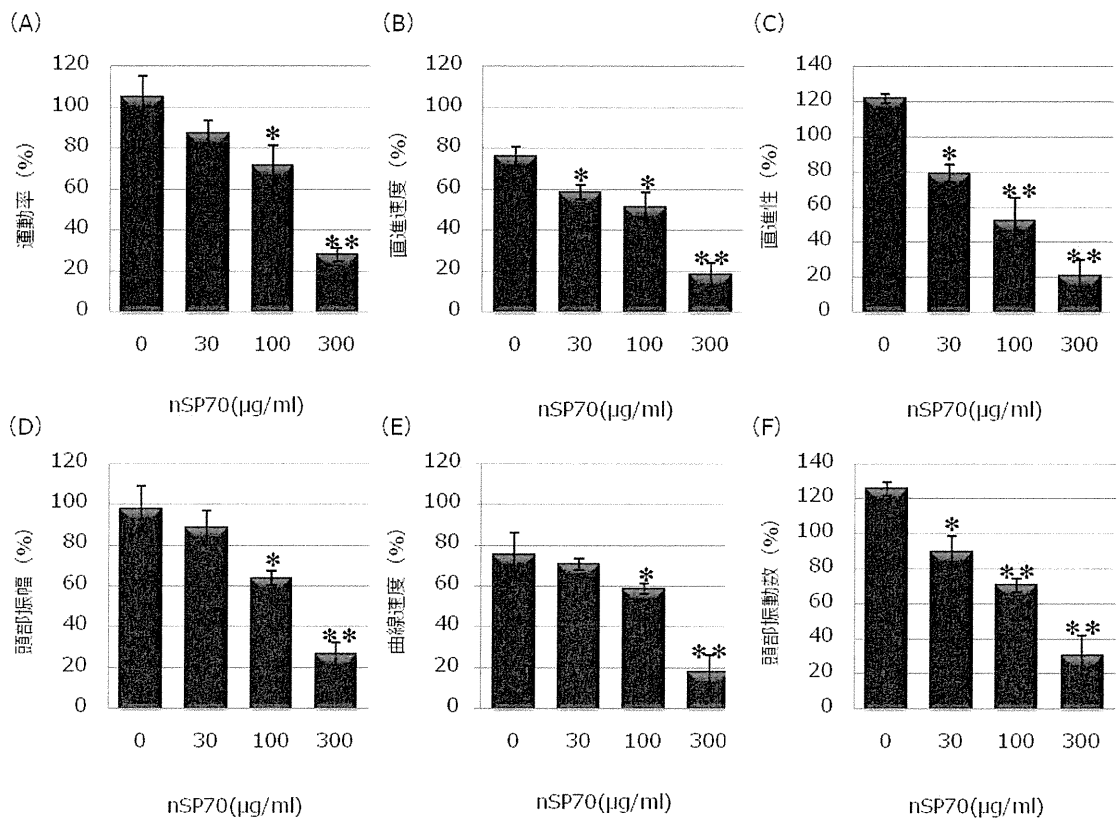
その他

該当無し

研究協力者

神戸学院大学薬学部（小野寺章、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、田中敦士、諸澤瑛、根津菜摘、宝諸あい）

理化学研究所、（米村重信）



*: P-value < 0.05 vs. 0 µg/ml **: P-value < 0.001 vs. 0 µg/ml

図1. ナノシリカによる精子の運動性低下. nSP70処置前の培養細胞および30・100・300 µg/mLのnSP70処置後の培養細胞をSEMEN ANALYSIS SLIDE (Cell Vision)へ移し、SMASを用いて測定。SMASによる測定は、WHOの基準に則した6項目 (A) 運動率、(B) 直進速度、(C) 直進性、(D) 頭部振幅、(E) 曲線速度、(F) 頭部振動数を評価。

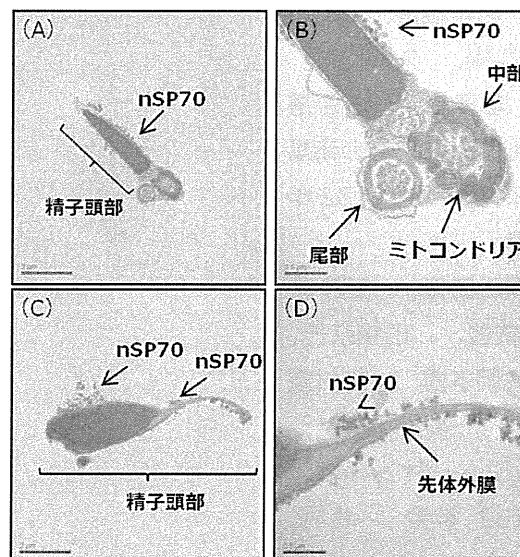
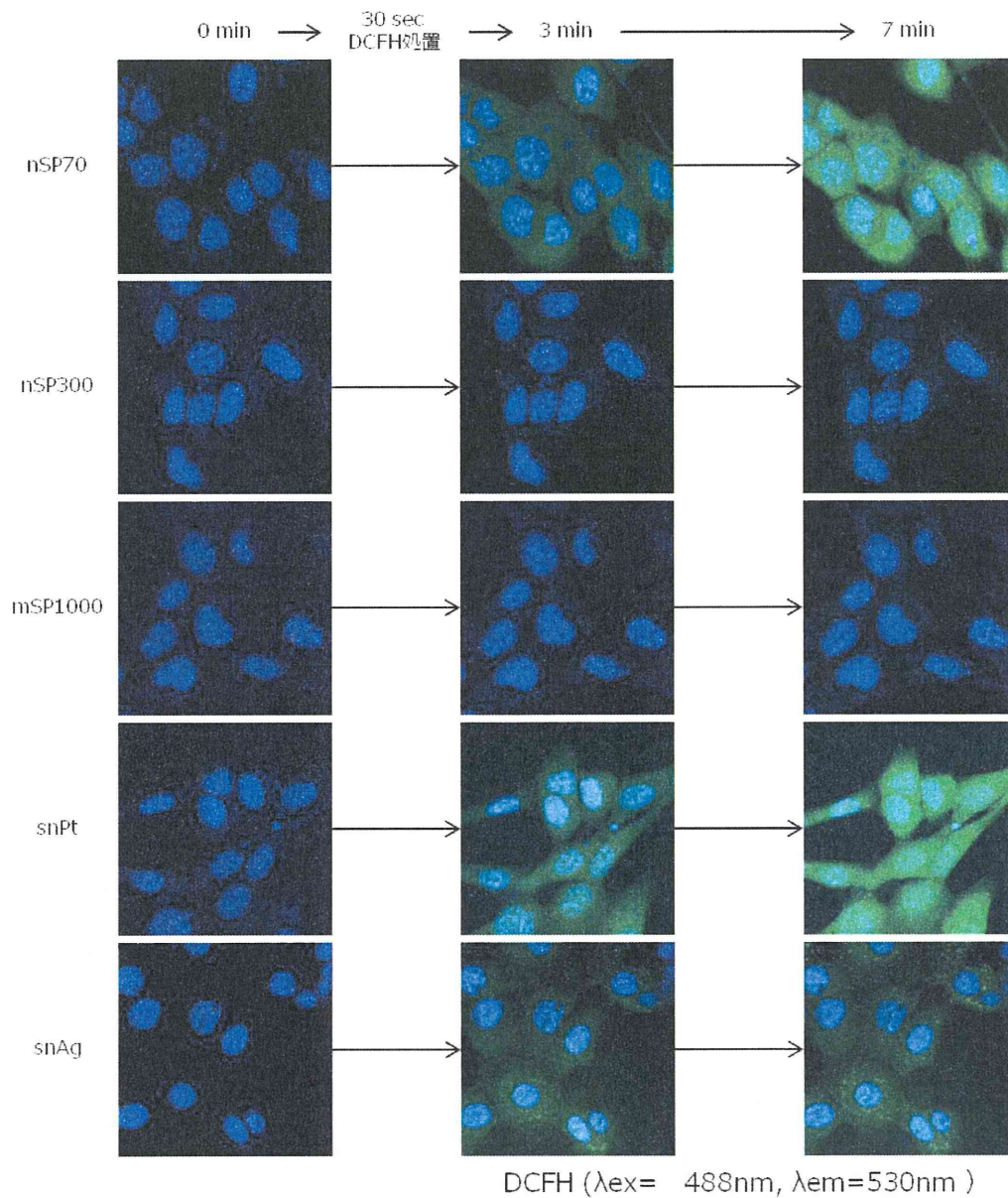


図2. ナノシリカの精子頭部への結合. 300 µg/mLのnSP70を培養精子へ処置 (10分)。透過型電子顕微鏡を用い、精子頭部、中部 (ミトコンドリア)、尾部への取り込みを観察。15万倍 (A、C) および50万倍、(B、D)の透過型電子顕微鏡画像。



DCFH ($\lambda_{ex}= 488\text{nm}$, $\lambda_{em}=530\text{nm}$)

図3. ナノシリカによる細胞内活性酸素種の増加とその局在. Glass bottom dishに、BALB/3T3細胞を接種。DAPI(核: Blue color)および200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP70またはnSP300、mSP1000、snPt、そしてsnAgを1時間前から添加処理。DCFH-DAは、共焦点走査型レーザー顕微鏡FV1000の連続撮影から30秒後に処置し、細胞内活性酸素種の動態を観察。

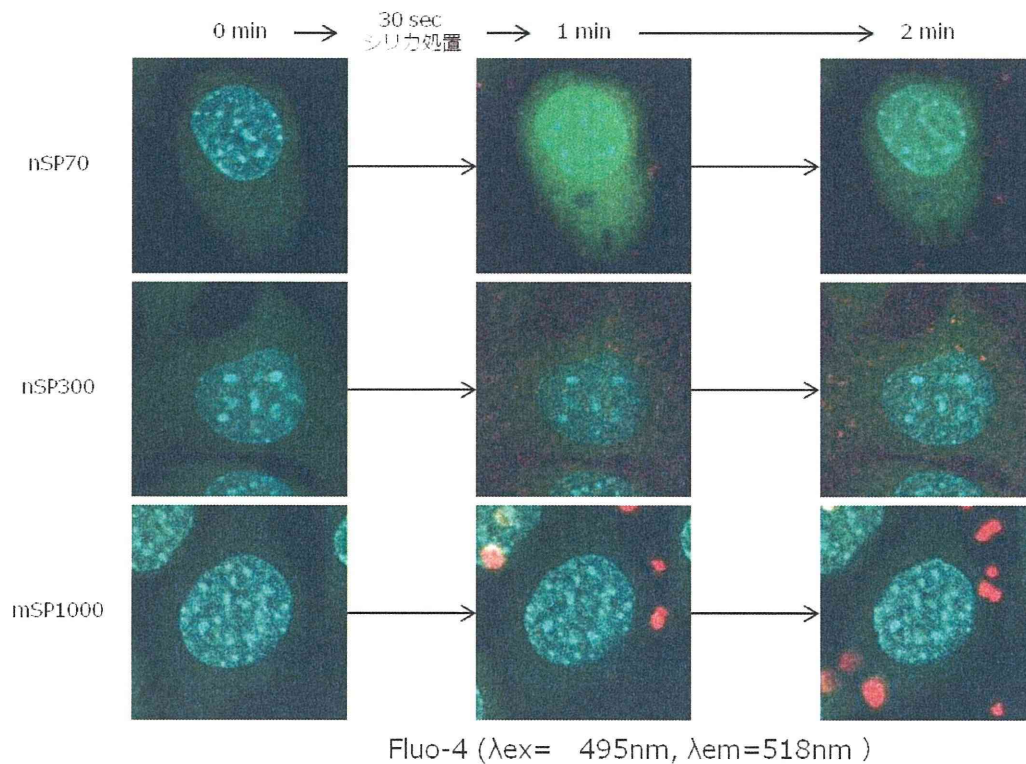
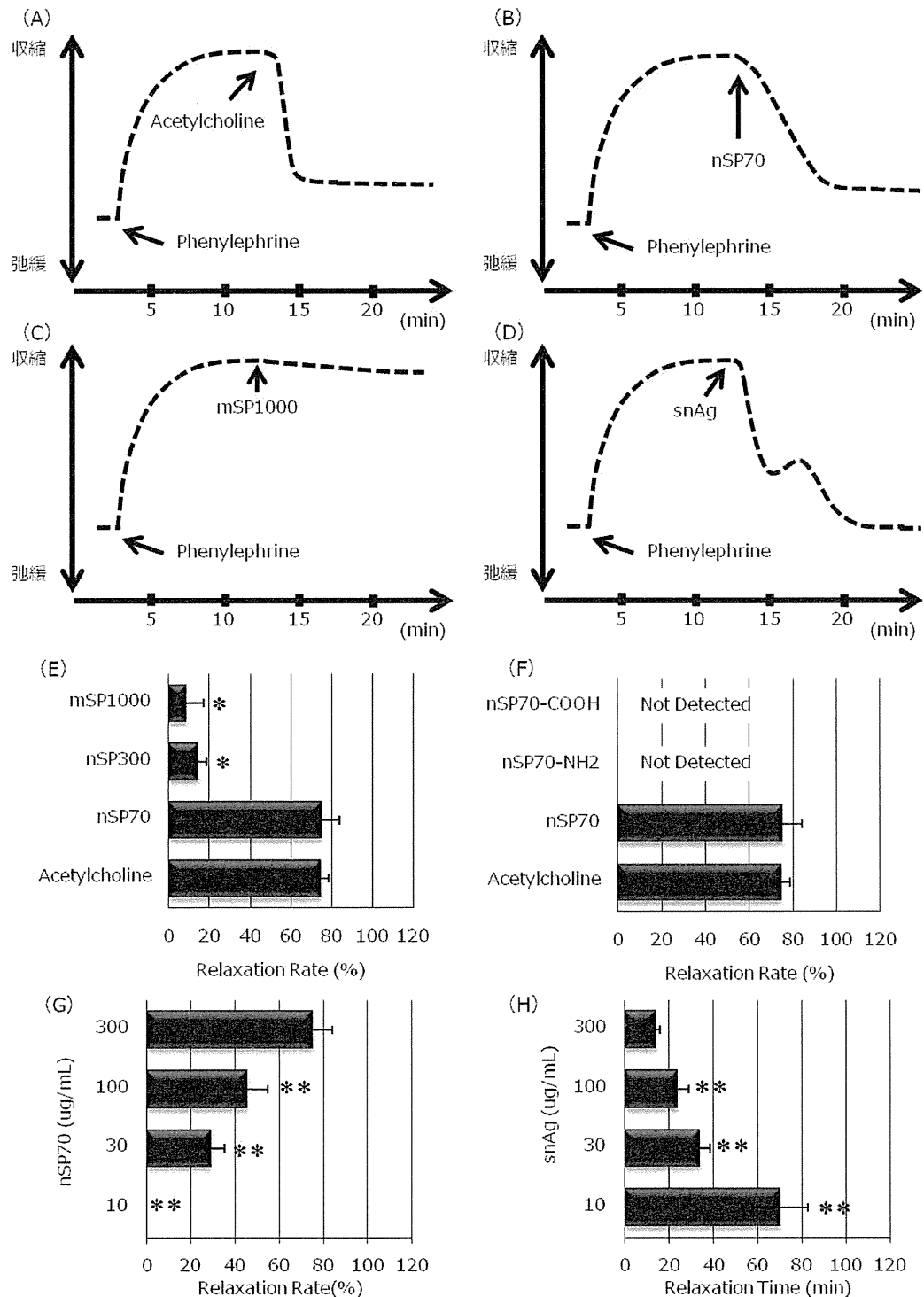


図4. ナノシリカによる細胞内遊離Ca²⁺の増加. Glass bottom dishに、BALB/3T3細胞を播種。DAPI(核: Blue color)およびCa²⁺蛍光プローブ (Ca²⁺:Green color) を前処置し、共焦点走査型レーザー顕微鏡FV1000による連続撮影により細胞内遊離Ca²⁺の動態を観察。nSP70またはnSP300、mSP1000を200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の濃度で処置。また、シリカはロータミン標識の粒子を用いた。



*:P-value<0.001 vs. nSP70 **:P-value<0.001 vs. 300 µg/ml

図5. ナノシリカによる血管の弛緩作用。 ラット胸部大動脈を用い、マクス法により血管の弛緩反応を解析。300 µg/mLのnSP70またはnSP70-COOH、nSP70-NH2、nSP300、mSP1000、snPtそしてsnAgをそれぞれ処置し、最大弛緩率・最大弛緩に達するまでの時間を評価。(A-D) アセチルコリン、nSP70、nSP300、snAgによる典型的な弛緩曲線。およびその最大弛緩率 (E、F)。また、nSP70とsnAgは10~300 µg/mLの濃度について、最大弛緩率(G:nSP70)、および最大弛緩までの時間 (H : snAg) を評価。

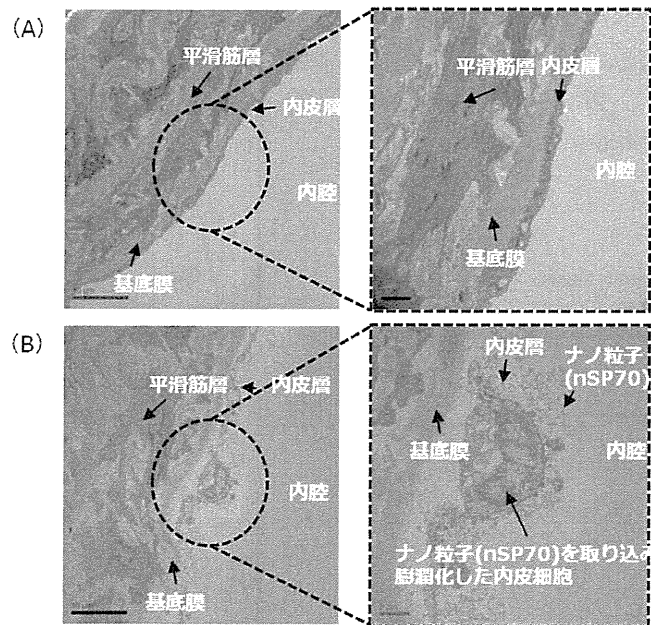


図6. ナノシリカの血管内皮細胞への取り込。ラット胸部大動脈を用い、300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP70(A)およびnSP300(B)を処置。透過型電子顕微鏡を用い、血管内皮細胞への取り込みを観察（左図：8万倍、右図：60万倍）。

ナノマテリアルの脳神経系動態の解析と神経毒性/神経発生毒性、 一般毒性評価

研究分担者 桑形麻樹子 (財)食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部

研究要旨

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD TG410 に準じてナノ白金(nPt)およびサブナノ白金(snPt)をラットに 28 日間反復経皮投与し生体への影響について評価した。雌雄の SD ラットに、溶媒(注射用水)、nPt あるいは snPt を 1 日 6 時間、4 週間にわたり経皮投与し、一般状態の変化、体重および摂餌量の推移を観察し、解剖前に尿検査を実施した。動物は投与 4 週に剖検し、血液学的検査、血液生化学的検査、器官重量、病理学検査(組織、電顕)を実施した。また、組織中の nPt あるいは snPt の含量を誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)にて解析した。

その結果、nPt、snPt 投与により、雌雄ともに投与第 2 週以降に一部潰瘍を伴う痂皮がみられた。体重、摂餌量には影響はみられなかったが、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度が減少傾向を示し、栄養状態が良好ではない徴候がみられた。血液生化学検査では、被験物質投与による影響はなかったが、血液学検査において雄にのみ白血球数が減少した。病理組織学検査では、真皮にまでおよぶ炎症組織像がみられ、snPt 群でのみ好酸球浸潤が観察された。

得られた変化に性差があったが、質的には差はなかった。また両被験物質で認められた一般毒性学的変化は類似していたが、snPt 群で認められた変化は nPt 群よりも顕著であった。雄組織で実施した ICP-MS 分析では、snPt は皮膚以外の各組織に分布していることが確認されたが、nPt は貼付部位である皮膚にのみで検出された。しかし、電顕観察では細胞内の高電子密度を示す顆粒状分子と被験物質と考えられる粒子の識別が大きな困難であったが、対照群と比較して、被験物質と考えられる粒子は確認できなかった。

以上の結果から、snPt、nPt 経皮投与により皮膚に障害をもたらす、粒子径の小さい snPt のみ各組織に残留していることが確認された。しかし、snPt が組織内に残留していることにより生体へ重篤な影響を及ぼすと考えられる変化は認められなかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの安全性に関する試験の一環として、OECD 化学物質毒性試験法ガイドライン 410 に準拠し、ナノマテリアルを雌雄ラットに 28 日間反復経皮投与した際の生体への影響について評価した。

B. 研究方法

1. 被験物質および投与方法

被験物質は大阪大学大学院薬学研究科毒性学分野から提供された被験物質懸濁液(5000 ppm、Polytech & Net GmbH 社)を用いた。使用した被験物質の電顕像、投与用量、群構成は図 1 および図 2 に示す。

投与前に、提供された被験物質懸濁液は、超音波ホモジナイザー US-600T(株式会社日本精機製作所)を用いて、氷冷下にて 200 μ A、5 分間攪拌させた後、ボルテックスミキサー KMC-1300V

(Vision Scientific.Co.LTD.) で 5 分間さらに攪拌させ、投与に用いた。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した(経皮投与)。3x3 cm のリント布に被験物質を滴下した後、皮膚にリント布を貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパット(伸縮性粘着包帯)を巻き、固定した。

投与回数は 1 日 6 時間、週 5 日(土、日は休薬)として、雄は投与 29 日(投与初日=投与 1 日)、雌は投与 30 日に解剖した。毎日、投与時間終了後には、貼付領域を被験物質の媒体(注射用水)を用いて清塗した。

なお、投与に先立ち、背部をバリカンにて剪毛した(剪毛から被験物質投与まで 24 時間以上あく様に考慮した。)

2. 動物および飼育条件

動物は 5 週齢の雌雄 SD 系ラットを購入し、温度(21.0~25.0℃)および湿度(40.0~75%)、換気回数(約 15 回/時間)、明暗サイクル(7 時~19 時まで点灯)が統御された飼育室に金属製金網床ケージにて個別に飼育し、固型飼料(CE-2、日本クレア株)および水道水を自由に摂取させた。1 週間の検疫・馴化期間の後、1 群雌雄各 5 匹になるように検疫終了時の体重を基に群分けした。投与開始時週齢は 6 週齢である。

3. 観察項目

全例について、投与期間中は毎日、投与前および投与後(除去後)に一般状態を観察した。体重は投与 1 日、8、15、22、28 日および解剖日(雄は 28 日、雌は 29 日)に、摂餌量は投与 1-2、8-9、15-16、22-23 日に測定した。投与 23 日(雄)、投与 24 日(雌)に動物を代謝ケージに移して新鮮尿を採取した。尿量を測定後、尿中ナトリウムイオン濃度(Na)、カリウムイオン濃度(K)、塩素イオン濃度(Cl)を測定した。また、尿検査試験紙を用いて、pH、蛋白、グルコース、ケトン体、ビリルビン、潜血、ウロビリノーゲンを検査した。

剖検前に 18-24 時間絶食させた後、ペントバルビタールナトリウム麻酔下にて、腹部下行大静脈から採血した。EDTA 2K を抗凝固剤として採取した血液を用いて、血液自動分析装置 XT-2000iV(シスメックス)にて、赤血球数(RBC)、白血球数(WBC)、白血球分類、網状赤血球比率、血小板数(PLT)、ヘマトクリット値(Ht)、血色素量(Hb)、平均赤血球容積(MCV; Ht×1000/RBC)、平均赤血球血色素量(MCH; Hb×1000/RBC)、平均赤血球血色素濃度(MCHC; Hb×100/Ht)を測定し、クエン酸ナトリウムを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿を用いて、活性化部分トロンボプラスチン時間(APTT)、プロトロンビン時間(PT)を測定した(血液学的検査)。

さらに、ヘパリンを抗凝固剤として採血した血液から得た血漿にて、自動分析装置 JCA-BM6010(日本電子)にて、総蛋白濃度(TP)、アルブミン濃度(ALB)、A/G 比; ALB/(TP-ALB)、グルコース濃度、総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度、クレアチニン濃度、尿素窒素濃度(BUN)、カルシウム濃度(Ca)、無機リン濃度、総ビリルビン濃度、アスパラギン酸アミノトランスフェラーゼ活性(AST)、アラニンアミノトランスフェラーゼ活性(ALT)、アルカリフォスファターゼ活性(ALP)、 γ グルタミルトランスぺプチターゼ(γ -GTP)、乳酸脱水素酵素(LDH)を、全自動電解質分析装置 EA05(エイアンドティー)にて、ナトリウムイオン濃度(Na)、カリウムイオン濃度(K)、塩素イオン濃度(Cl)を測定した(血液生化学的検査)。

剖検時には器官、組織の肉眼的観察を実施するとともに、脳、胸腺、心臓、肝臓、腎臓、脾臓、副腎、精巣(雄)、卵巣(雌)の組織重量を測定した。各群雌雄 2 例を選択し、皮膚投与部位、肝臓および腎臓を、透過型電子顕微鏡を用いて nPT および snPT の局在を観察した。また、誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)用に胸腺、心臓、肺/気管支、肝臓、下顎リンパ節、腎臓、脾臓、副腎、腸間膜リンパ節、精巣、精巣上体、卵巣、子宮、皮

膚(貼付部)をサンプリングした(大阪大学へ送付)。これらのうち、電顕検査を実施した各群雄 2 例について、ICP-MS 分析を実施し組織中の被験物質の存在を確認した。

また、皮膚(貼付部)、胸腺、心臓、肺・気管支、肝臓、下顎リンパ節、腎臓、脾臓、腸間膜リンパ節、精巣および精巣上体(雄)、卵巣、子宮および膈(雌)について、ヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的に観察した。

4. データの解析法

データは各被験物質投与群について、それぞれの溶媒対照群との間で有意差検定を行った。体重、摂餌量、器官重量、血液学的検査、血液生化学的検査値は、まず、各群について F 検定を行い、等分散の場合は Student の t 検定を、不等分散の場合は Aspen-Welch の t 検定を実施した。病理組織学検査については、グレード分けしたデータは Mann-Whitney の U 検定を、陽性グレードの合計値は Fisher の直接確率の片側検定を行った。なお、有意水準は対照群を繰り返し用いることによる第 1 種の過誤を防ぐためにボンフェルヌイの補正を加え、有意水準は 3%とした。

C. 研究結果(次項 D にまとめて記載する)

D. 考 察

一般状態の変化として、snPt 群で雄は投与 9 日から、雌は投与 12 日から、nPt 群で雄は投与 14 日、雌は投与 14 日から、貼付部皮膚に痂皮形成(一部潰瘍を伴う)が観察された。病変の程度および頻度は snPt 群の方が強く、snPt 群および nPt 群ともに雌の皮膚変化は雄よりも重篤であった。しかし、投与終了時には回復傾向にあった(表 1、表 2、図 3、図 4)。皮膚病変がやや重篤であった snPt 群の雄 2 例の体重および摂餌量が低値に推移したが、統計学的には対照群と snPt 群、nPt 群との間に差はなかった(表 3、表 5)。雌の snPt 群および nPt 群の体重は対照群と同様に推移したが、nPt 群の投与 22 日の摂餌量が対照群と比較して有意に高値を示した。しかし、体

重推移に差がないこと、摂餌量の変動も僅かであることから毒性影響ではないと判断した(表 4、表 6)。

血液学的検査の結果(表 7、表 8)、雄では赤血球系の指標(RBC、Hb、Ht、MCV、MCH、MCHC、PLT、PT、APTT)には対照群と snPt 群および nPt 群との間に差はなかった。白血球系の指標(WBC、好中球・好酸球・好塩基球・単球・リンパ球比率)および網状赤血球系比率では、白血球数が snPt 群および nPt 群で有意に低値を示し、白血球分類では nPt 群の好中球比率が有意に高値を、リンパ球比率が有意に低値を示した。

雌の血液学検査の赤血球系の指標では、nPt 群の赤血球数が増加し、ヘモグロビン、ヘマトクリット値が対照群と比較して有意に高値を示したが、いずれもわずかな変化であったこと、脾臓の病理組織学検査には、造血系の異常を示唆する変化は認められていないことから、毒性影響ではないと判断した。白血球系の指標では、白血球数に差はなかったが、白血球分類比では nPt 群の好酸球の比率に統計学的有意差が認められたが、その変動はわずかであることから毒性ではないと判断した。

血液生化学検査の結果(表 9、表 10)、雄では TP、ALB、A/G 比、グルコース濃度に対照群と両 NM 群との間に差はなかった。総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度が snPt 群および nPt 群ともに対照群と比較して低値を示し、nPt 群のトリグリセライド濃度は有意差が認められた。snPt 群および nPt 群ともに栄養状態が良好ではない徴候が認められたが、体重には影響がない程度であった。貼付ストレスに加え、皮膚病変に起因したストレスが一因と考えられる。同じ傾向は雌でも認められている。

snPt 群では、肝機能指標 (AST、ALT、 γ -GTP、LDH、ALP) および腎機能指標 (BUN、クレアチニン、総ビリルビン濃度) には対照群と差はなかった。nPt 群では腎機能指標には異常はなかったが、ALP 値が有意に高値を示した。しかし、他の

肝臓機能の指標には対照群と差はなく、肝臓の病理組織学検査においても投与の影響と考えられる変化は認められていない。電解質濃度 (Na、K、Cl、Ca、無機リン) には、対照群と被験物質群との間に差はなかった。

雌では、snPt 群の A/G 比が対照群と比較して有意に低値を示したが、TP および ALB には差は認められていない。snPt 群および nPt 群の総コレステロール濃度、トリグリセライド濃度、リン脂質濃度は、わずかであるが対照群よりも低値を示し、nPt 群のリン脂質濃度には有意差がみられた。雌でも軽度であるが栄養状態が不良である徴候が認められた。nPt 群の BUN 濃度は対照群と比較して有意に高値、総ビリルビン濃度は有意に低値を示したが、いずれもわずかな変化であり、病理組織学検査においても肝臓機能あるいは腎臓機能異常を示唆する変化は認められていない。電解質には被験物質投与による影響は認められていない。

尿検査の結果、雄には対照群と snPt 群、nPt 群の間に差はなかったが(表 11)、雌の snPt 群の pH がややアルカリ性を示した (表 12)。

器官重量(表 13、表 14)では、雄では snPt 群、nPt 群ともに肝臓重量が有意に低値を示したが、血液生化学検査および病理学検査では異常は認められていない。雌の器官重量には snPt あるいは nPt 投与による影響は認められなかった。

解剖の肉眼所見として(表 15、表 16)、雌雄ともに皮膚の貼付部位に一部潰瘍を伴った痂皮が snPt 群の雌雄全例(5 例)に、nPt 群の雄の 3 例、雌の 2 例に認められた。その他、雄の nPt 群で腎臓にシスト(片側)が 1 例、同群雌の下顎リンパ節に赤色領域が 1 例、snPt 群の肝臓に白色点が 1 例認められたが、病理組織学検査の結果から、snPt あるいは nPt 投与によると考えられたリンパ節あるいは肝臓の変化は認められなかった。

病理組織学検査の結果(表 17、表 18)、皮膚を除き、雌雄ともに観察した組織には対照群を含めて組織学的変化が観察された。しかし、その所見

には、被験物質投与により頻度や程度が強くなる傾向は認められなかった。

皮膚の病理組織学変化として(図 5、図 6)、snPt 群では扁平上皮過形成が雌雄ともに全例にみられ、真皮では線維芽細胞の増殖、リンパ球およびマクロファージ浸潤も認められた。また、痂皮が付着し、びらんあるいは潰瘍に炎症が及んでいた例も認められた。さらに、表皮および真皮の浮腫、好酸球浸潤、出血が認められた。これらの所見は雌のほうで強く認められた。

nPt 群でも、snPt 群と同様の所見がみられたが、好酸球浸潤は認められなかった。また、観察された動物数および程度ともに snPt 群よりも弱い傾向がみられた。性差は認められなかった。

皮膚、肝臓、腎臓で実施した電顕観察の結果(図 7、図 8、図 9)、細胞内の高電子密度を示す顆粒状分子と被験物質との識別が困難であった。対照群と比較して、被験物質と考えられる粒子は確認できなかった。

ICP-MS の結果(図 10)、snPt 群および nPt 群ともに貼付部位である皮膚に snPt あるいは nPt が検出された。その他の組織では nPt 群は検出限界(0.05ppm 以下)であったが、snPt 群では分析を行ったすべての組織(下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、胸腺、心臓、脾臓、肝臓、胚、腎臓、副腎、精巣および精巣上体)に snPt が検出された。

E. 結論

以上の結果から、snPt あるいは nPt の経皮投与により、皮膚に障害をもたらす、粒子径の小さい snPt のみ各組織に残留していることが確認された。一般毒性学的変化には性差はあったが、snPt、nPt ともに類似しており、snPt のほうがやや強い変化がみられた。しかし、snPt が組織内に残留していることにより生体へ重篤な影響を及ぼすと考えられる変化は認められなかった。

F. 健康危険情報

該当なし。