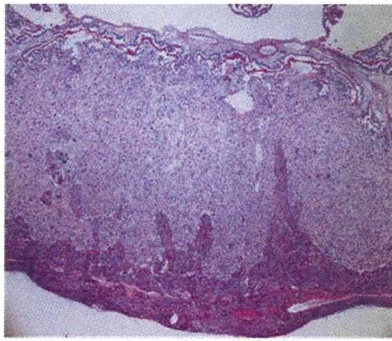
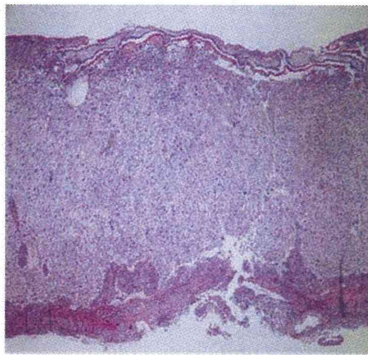


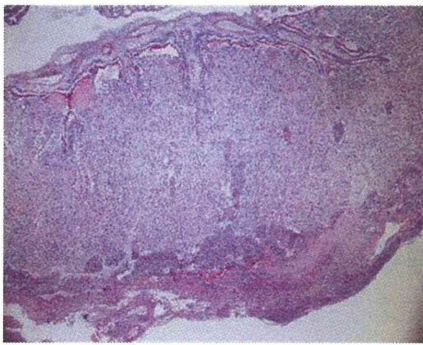
(sub) nano粒子投与による胎盤病理解析



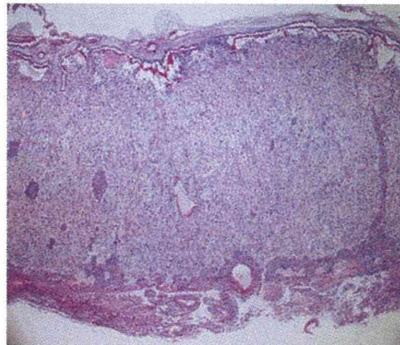
Saline



nPt : 10 mg/kg



snPt : 5 mg/kg



snPt : 10 mg/kg

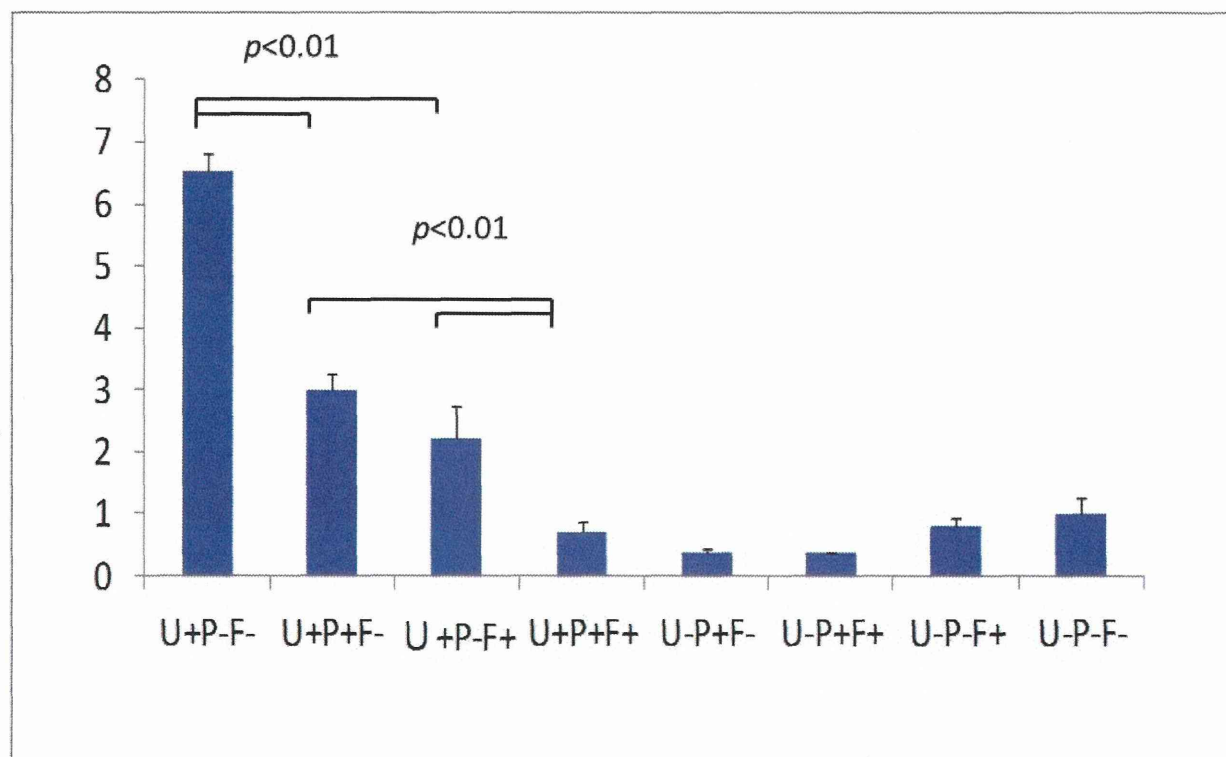
Labyrinth layer



Spongiosotrophoblast layer



水酸化フラレン(F)・プロゲステロン(P)併用によるin vitro抗炎症効果



乳幼仔・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ている。これらは、経皮・経粘膜吸収されて全身血中に移行し、血液-脳関門を通過して脳神経毒性を呈し得ることが報告されている。しかしながら、脳神経系が形成される胎生期におけるナノマテリアルへの曝露が、成長後の情動や認知機能などの脳機能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、我々は実験動物であるマウスを用い、妊娠中にナノマテリアルを尾静脈投与した雌マウスから生まれた仔マウスに対して、その成長後の脳機能を網羅的行動テストバッテリーにより評価した。実施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・記憶機能などの脳機能を評価するテストが含まれている。昨年度までに、我々は、妊娠中に直径 70nm の非晶質ナノシリカ (nSP70) を投与した雌マウスから生まれた仔マウスに対して、その成長後に網羅的行動テストバッテリーを実施し、行動特性を解析した。その結果、これらの仔マウスは成長後、体重や筋力の低下、聴覚性驚愕反応やうつ様行動の亢進、社会的行動の減少傾向を示すことを明らかにした。本年度は、サブナノサイズの粒子に着目し、妊娠中に粒子径 8nm、1nm のサブナノ白金 (snPt8, snPt1) を投与した雌マウスから生まれた仔マウスに対して、網羅的行動テストバッテリーを行った。その結果、snPt1 を投与した雌マウスから生まれてきた仔マウスは、成体時の体重が低下し、うつ様行動や不安様行動が低下していることが明らかになった。また snPt8 を投与した雌マウスから生まれてきた仔マウスでは、社会的行動が増加していることも見出された。これらの結果から、妊娠期のナノマテリアル曝露は、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仔の身体的発達及び情動行動をはじめとした脳機能に異常をもたらす可能性が示唆された。

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脳内に流入する物質は、脳神経系に作用し、その機能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情動や認知機能などの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

期マウスへのナノマテリアル曝露が次世代の仔マウスの脳機能に及ぼす影響について、網羅的行動テストバッテリーにより評価することを目的としている。本年度は、粒子径 8nm、1nm のサブナノ白金(snPt8, snPt1)による影響を検討した。

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マウスを被験体として使用した。妊娠 16、17 日目の雌マウスに、サブナノ白金である snPt8、snPt1

を 10mg/kg 静脈内投与した snPt8 群、snPt1 群と生理食塩水を投与した統制群の 3 群を設け、各群の雌から生まれた仔マウスが 10 週齢以上になった後、次節に示す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）、マーブルプリンクテスト（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）、聴覚性驚愕反応テスト（聴覚性の驚愕反応の評価）、聴覚性驚愕馴化試験（聴覚性の驚愕反応の評価）、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）、尾懸垂テスト（うつ様行動の評価）、恐怖条件付けテスト（記憶の評価）、ホームケージ内社会的行動テスト（社会的行動の評価）が含まれる。

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を検査した結果、snPt1 群は 15 週齢時の体重が統制群より統計的に有意に減少していた（図 1）。一方 snPt8 群では、統制群と比較して体重に有意差は認められなかった（図 1）。また、握力測定テストでも同様に snPt1 群のみにおいて、統制群と比較して有意な低下が認められた。これらの結果は、妊娠期サブナノ白金曝露に

より、仔マウスの成長後の身体的発達への阻害及び筋力低下が引き起こされる可能性を示唆している。

2. 不安様行動及びうつ様行動の低下

高架式十字迷路テストの結果、snPt1 群は統制群と比べて迷路のオープンアームへの進入回数が増加しており、不安様行動が低下している可能性が示された（図 2 左）。一方 snPt8 群では、統制群と比較して不安様行動に有意な差は認められなかった。また強制水泳テストの結果、同様に snPt1 群のみにおいて、統制群と比べて有意に移動距離が増加しており、うつ様行動が低下している可能性が示された（図 2 右）。これらの結果から、妊娠期サブナノ白金 snPt1 曝露は、仔マウスの成長後の情動行動に対して影響を及ぼす可能性が示された。

3. 社会的行動の増加

新奇環境下社会的行動テストを行った結果、snPt8 群は統制群と比べて接触時間が増加しており、社会的行動が増加している可能性が示された（図 3）。しかしながら、snPt1 群では、統制群と比較して社会的行動に有意差は認められず、Crawley 版、ホームケージ内社会行動テストでは両群ともに統制群と比べて有意な差は認められなかった。これらの結果から、妊娠期サブナノ白金曝露による社会的行動の増加は限定的なものであることが考えられる。

4. 活動性、痛覚感受性、運動能力・運動学習能力、聴覚性驚愕反応、記憶機能の評価

活動性の測定としてオープンフィールドテスト、痛覚感受性の測定としてホットプレートテスト、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、歩行機能の測定として歩行解析、聴覚性驚愕反応の測定として聴覚性驚愕反応テスト、プレパルス抑制テスト、聴覚性驚愕馴化テスト、記憶機能の測定として恐怖条件付けテストを行ったが、いずれのテストにおいても 3 群間に有意差はなく、それらの行動に対する妊娠期サブナノ白金曝露の影響は認められなかった（図 4）。

5. 作用メカニズムの解明

そこで、分子レベルで脳に及ぶ影響を解析する目的で、行動解析が終了した 23 週齢時の脳を回収し、不安やうつに関与する、海馬、大脳皮質前頭前野、視床下部中の神経伝達物質濃度を測定した。その結果、snPt8 群、snPt1 群ともに、各組織中の 5-HT、5-HIAA、DA、DOPAC、HVA、NA、MHPG 量に、対照群と比較して有意な変化は認められなかった (図 5)。従って、神経伝達物質の含量には、snPt の妊娠期曝露は影響しない可能性が示された。次に、胎仔期の神経成長を評価するため、胎仔の各脳組織の BrdU 陽性細胞を計数した。その結果、嗅球の脳室下帯の BrdU 陽性細胞数が対照群と比較して有意に減少していた (図 6)。したがって、snPt の妊娠期曝露は胎仔の脳の神経成長異常を誘発する可能性が示された。脳室下帯は歯状回と並び、神経幹細胞からのニューロンの産生 (Neurogenesis) が成体になっても続く、数少ない部位である。成体での Neurogenesis は様々な精神・神経疾患との関連が示唆されており、Neurogenesis と抗うつ作用との関与も明らかとなっている。従って、脳室下帯の Neurogenesis を変動させることが、snPt1 の妊娠期曝露が仔の情動・認知機能異常を誘発する一因である可能性が考えられた。

E. 結論

妊娠期にサブナノ白金 snPt1 に曝露された雌マウスから生まれた仔マウスは、成体時の体重や筋力が低下し、かつ不安様行動やうつ様行動が顕著に低下していることが明らかになった。また、サブナノ白金 snPt8 に曝露された雌マウスから生まれた仔は、成体時の社会的行動が増加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サブナノ白金に曝露されて血中に拡散すると、胎盤を通して胎仔の体内に流入して脳神経系の発達に影響を及ぼし、結果として成長後に情動行動や社会的行動の異常を引き起こす可能性があることが考えられる。今後は、今回実施

していない空間学習・記憶やワーキングメモリーなどの認知機能に関する行動解析についても行い、妊娠期サブナノ白金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や授乳期の雌や成体期の個体にサブナノ白金を投与し、個体発達のどの時期の曝露が行動に影響を及ぼし得るのかを検討する必要があると考えられる。

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 1 件】

1. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吾郷由希夫, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 田中智大, 田熊一敬, 角田慎一, 鍋師裕美, 吉川友章, 松田敏夫, 宮川 剛, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの妊娠期曝露が次世代の脳機能に及ぼす影響評価—仔の記憶機能の検討—, 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会, 西宮(兵庫), 2012 年 10 月.

【国際学会発表：合計 2 件】

1. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Ago Y., Satoh H., Nojiri N., Takuma K., Tsunoda S., Nabeshi H., Yoshikawa T., Matsuda T., Miyakawa T., Tsutsumi Y. : Postnatal effects of prenatal exposure to

amorphous nanosilica particles on neonatal cognitive functions, SETAC Asia/Pacific 2012, Kumamoto (Japan), 24-27 September, 2012.

2. Morishita Y., Yoshioka Y., Takao K., Ago Y., Sato H., Nojiri N., Tanaka T., Takuma K., Yoshida T., Nabeshi H., Yoshikawa T., Tsunoda S., Matsuda T., Miyakawa T., Higashisaka K., Tsutsumi Y.: The effect of prenatal exposure to amorphous nanosilica particles on neonatal memory., SOT2013, San Antonio (USA), 10-14 March, 2013.

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）

大平耕司（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・講師）

萩原英雄（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・助教）

梅森十三（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・助教）

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・CREST 研究員）

服部聡子（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・CREST 研究員）

高宮義博（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・研究補助員）

木瀬環（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・特定技術職員）

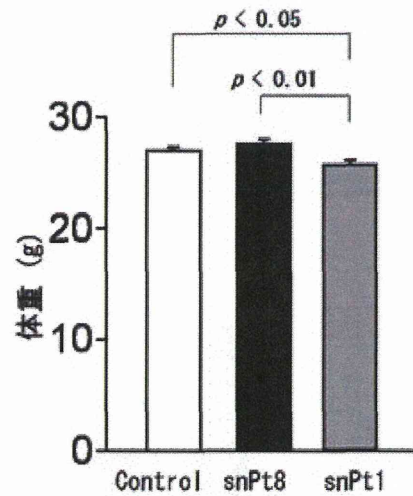


図1. サブナノ白金(snPt8, snPt1)投与雌マウスから生まれた仔マウスの成長後における体重の低下。妊娠16、17日目にサブナノ白金(snPt8, snPt1, 各10mg/kg)を尾静脈投与したBALB/c雌マウスから生まれた仔マウスの生後15週間における体重を評価した。

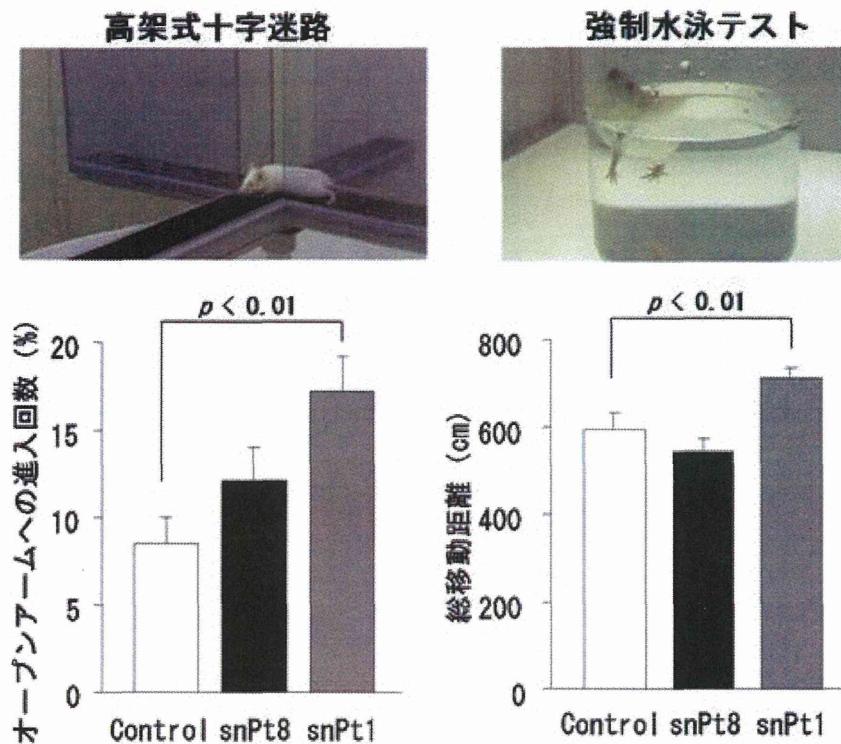


図2. サブナノ白金(snPt8, snPt1)投与雌マウスから生まれた仔マウスの成長後における情動行動の低下。(A) 高架式十字迷路テスト: 妊娠16、17日目にサブナノ白金(snPt8, snPt1, 各10mg/kg)を尾静脈投与したBALB/c雌マウスから生まれた仔マウスの不安様行動を高架式十字迷路テストを用いて評価した。(B) 強制水泳テスト: 妊娠16、17日目にサブナノ白金(snPt8, snPt1, 各10mg/kg)を尾静脈投与したBALB/c雌マウスから生まれた仔マウスのうつ様行動を強制水泳テストを用いて評価した。

社会的行動テスト

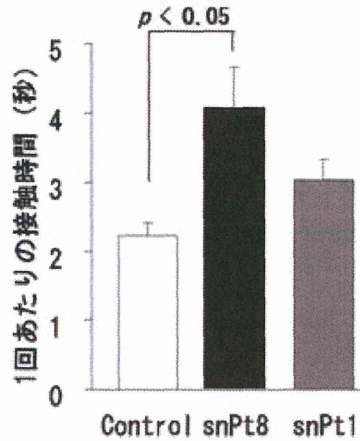
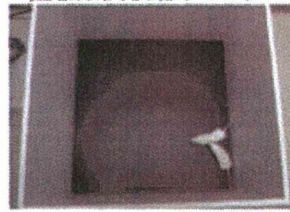


図3. サブナノ白金(snPt8, snPt1)投与雌マウスから生まれた仔マウスの成長後における社会的行動の増加。妊娠16、17日目にサブナノ白金(snPt8, snPt1, 各10mg/kg)を尾静脈投与したBALB/c雌マウスから生まれた仔マウスの新規環境下社会的行動を評価した。

測定項目	テスト	snPt8	snPt1
不安様行動 自発運動量	明暗移行選択テスト	=	=
	高架式十字迷宮	=	+++
	マーブルリングテスト	=	=
	オープンフィールドテスト	=	=
	ホームケージ解析	=	=
痛覚感受性	ホットプレートテスト	=	=
社会的行動 興味	社会的行動テスト	++	=
	社会的行動テスト (Crawley version)	=	=
協調運動 運動学習	ロータロッドテスト	=	=
	歩行解析	=	=
筋力 うつ様行動	握力測定	=	++
	ワイヤ・ハングテスト	=	=
	尾懸垂テスト	=	=
	ポーソルト強制水泳テスト	=	+++
聴覚性覚悟反応 感覚運動統合制御	聴覚性覚悟反応試験	=	=
	プレパルス抑制テスト	=	=
	聴覚性覚悟馴化試験	=	=
記憶	恐怖条件付け学習	=	=

+: $p < 0.1$, ++: $p < 0.05$, +++: $p < 0.01$ で評価

図4. サブナノ白金(snPt8, snPt1)投与雌マウスから生まれた仔マウスの成長後における情動・認知機能評価。妊娠16、17日目にサブナノ白金(snPt8, snPt1, 各10mg/kg)を尾静脈投与したBALB/c雌マウスから生まれた仔マウスに対し、網羅的行動テストバッテリーを実施した結果をまとめた。

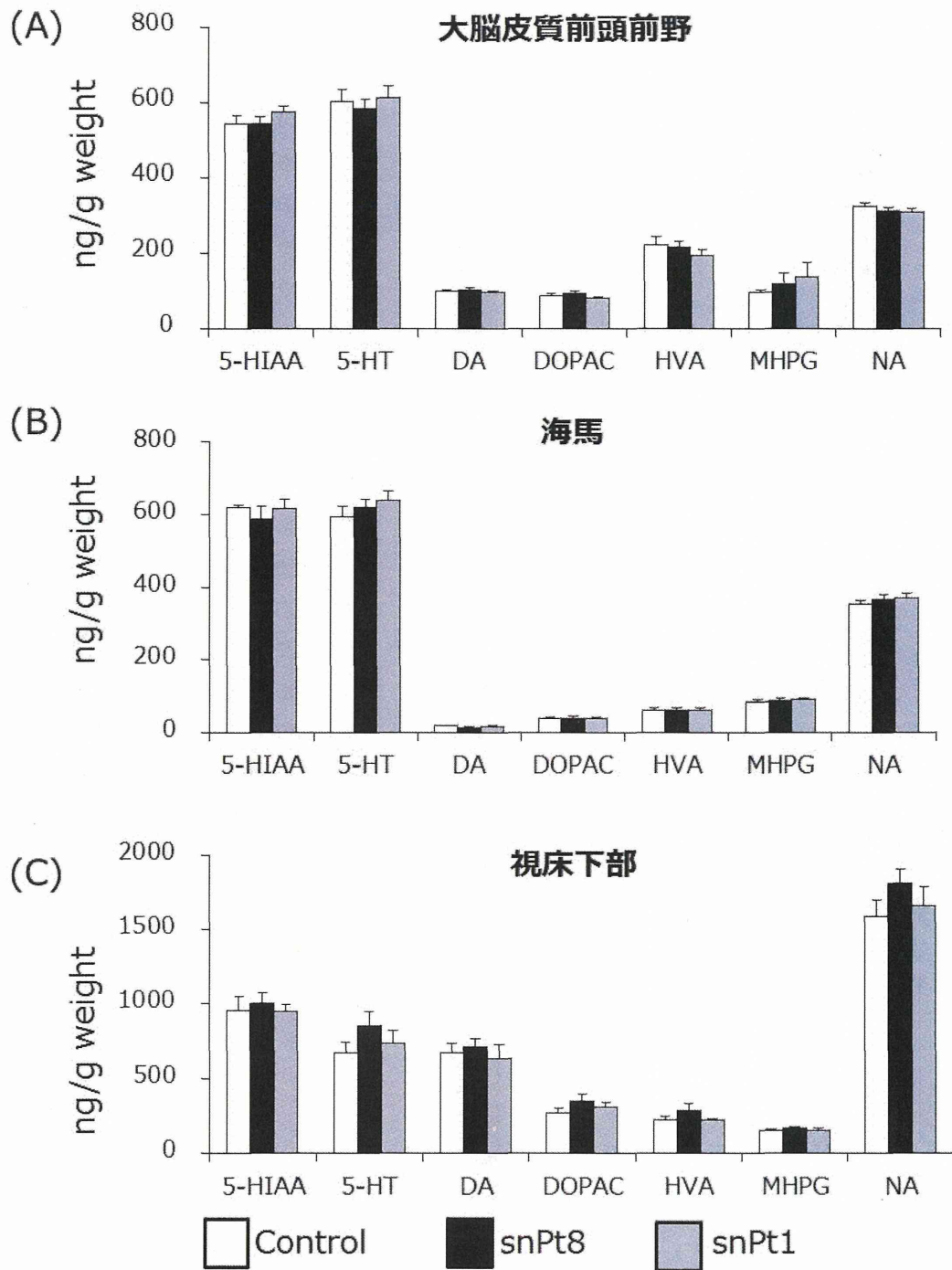


図5. snPt1を妊娠期曝露した仔の脳内モノアミンの定量。妊娠16日のBALB/cマウスにsnPt8、snPt1（それぞれ10mg/kg）を尾静脈内より2日間連続で投与した。出生仔を23週齢で解剖し、大脳皮質前頭前野（A）、海馬（B）、視床下部（C）中の神経伝達物質、及びその代謝物の濃度を評価した。Data are presented as mean \pm SE (n = 6-10)

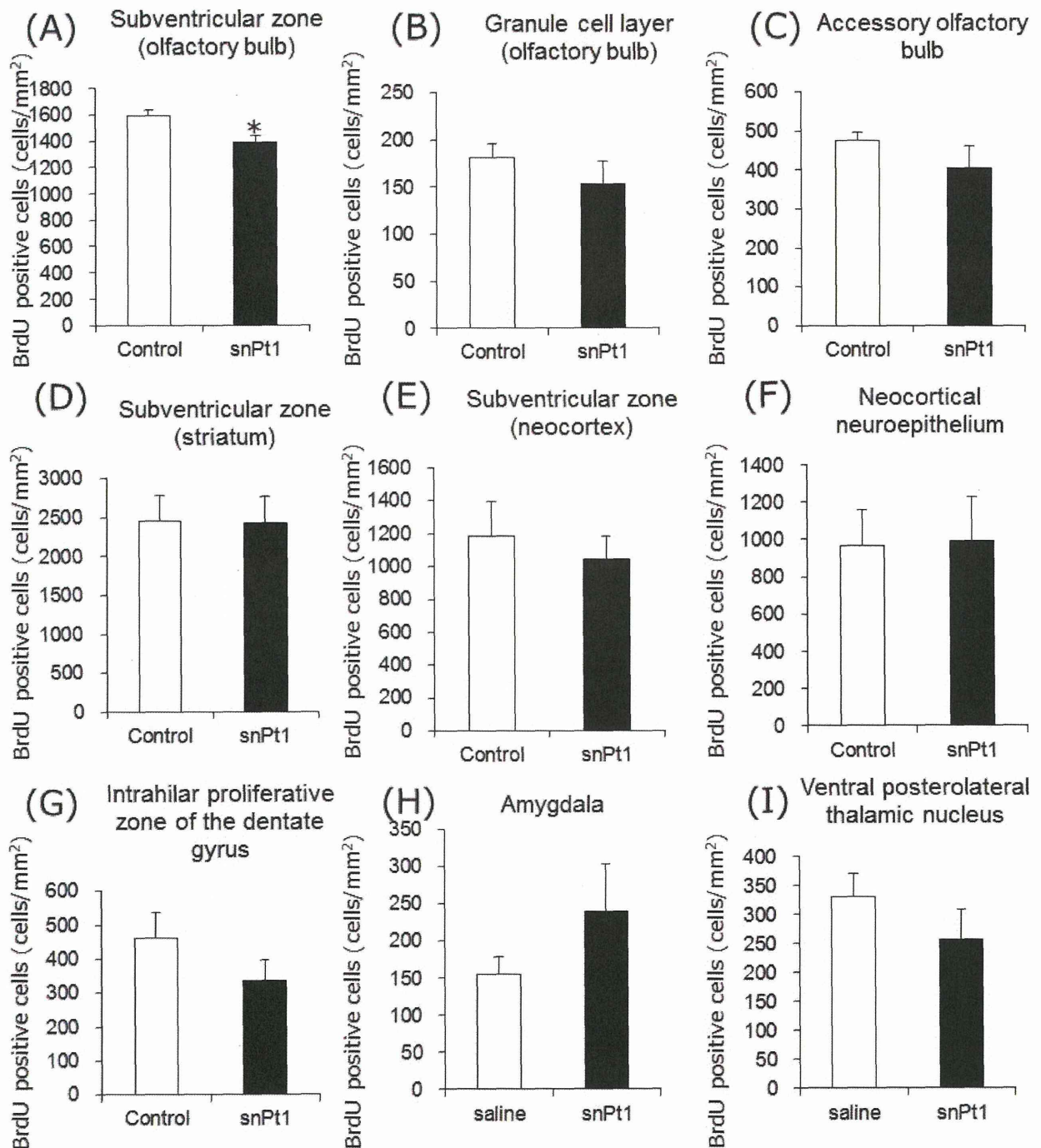


図6. snPt1を妊娠期曝露した胎仔の神経新生に及ぼす影響評価。妊娠16日のBALB/cマウスにsnPt1 (10mg/kg) を尾静脈内より2日間連続で投与すると共に、初回投与24時間後にBrdU (50 mg/kg) を腹腔内投与した。妊娠18日に胎仔の脳を回収した後、BrdUに対する抗体で免疫染色し、脳室下帯 {嗅球 (A)、線条体 (D)、新皮質 (E)}、顆粒層 (B)、副嗅球 (C)、神経上皮 {新皮質 (F)}、海馬歯状回 (G)、扁桃体 (H)、視床後外側腹側核 (I) におけるBrdU陽性細胞数を計数した。Data are presented as mean \pm SE (n = 3-5; **p < 0.01 versus value for control group by one-way ANOVA followed by Student's t-test)

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)・胚発生毒性評価に関する研究に関する研究

研究分担者 河合裕一 私立神戸学院大学 薬学部 生命薬学部門 発生分化研究室 教授

研究要旨

現在までに、ナノマテリアル（NM）を原因とするヒト健康被害に関する報告は無いものの、培養細胞や種々動物実験において、NMを原因とする「精子幹細胞の成長阻害」、「胎児発育遅延」などの繁殖・発生毒性に関する研究成果が報告されている。本研究班においても、「受精卵の発生」・「精子の運動性」を指標としたNMによる繁殖・発生毒性を評価し、シリカ・銀を原料とするナノ・サブナノ粒子が、受精卵の発生（2細胞期から胚盤胞期まで）には影響しないものの、精子の運動性を阻害することを見出した。ナノシリカによる精子の運動性阻害は、培養液中を泳ぎ回る精子が凝集し、サブナノ銀は精子を完全に不動化した。電子顕微鏡による解析では、精子頭部へのナノシリカの結合が観察され、精子内部への移行は観察されなかった。またこれら現象は、ナノ・サブナノ粒子の曝露後5分程度の短い時間で観察され、培養細胞を用いた解析においてもナノ・サブナノ粒子の曝露直後から細胞内活性酸素種や細胞内遊離Ca²⁺の増加が観察された。これら昨年度までの研究成果に基づき、本研究班ではナノ・サブナノ粒子による毒性発現が、標的となる細胞・組織への接触直後からはじまると示唆した。しかしながら、これまでの実験条件は過剰量のナノ・サブナノ粒子を精子や細胞へ直接曝露しており、実際の曝露実態を想定したNMの繁殖・発生毒性のリスク評価に課題が残る。そこで平成24年度（最終年度）は、NMによる精子凝集・不動化メカニズムの解明と共に、実際の曝露実態を想定した口腔曝露による精子の運動性への影響を解析した。まず本研究班は、精子凝集・不動化のメカニズムを解明するため、電子顕微鏡による動態解析を進めた。その結果、サブナノ銀を曝露した精子は、頭部や中部・尾部および精子内へのサブナノ粒子の局在がほとんど確認できなかった。すなわち、昨年度までの結果と総合すると、NMの精子頭部との結合から始まる毒性発現は、ナノシリカ特有であると示唆された。そこで本研究班は、ナノシリカの精子頭部への結合について、その標的分子の同定を試みた。標的分子は、精子頭部の原形質膜を構成する4種のリン脂質に着目し、これらリン脂質へナノシリカが結合するか否かを検討した。その結果、ナノシリカはフォスファチジルコリンおよびスフィンゴミエリンとの結合が観察された。次に本研究班は、サブナノ銀による精子の不動化の原因を明らかにするため、活性酸素種産生との関連について解析した。その結果、サブナノ銀を曝露した精子内において、過剰量のROSの産生が観察された。では、このようなNMによる精子の運動性阻害は、実際の曝露経路においても観察されるのであろうか？そこで本研究班は、NMの口腔曝露による精子の運動性への影響を解析した。ナノシリカの曝露条件は、20 mg/kgを週に2回、3週間連続投与とした。これらマウスは最終投与から1日後に解剖し、精子の運動性を解析した。その結果、ナノシリカの口腔曝露は、精子の運動性に影響しなかった。以上の結果は、精子を含めた生殖器官・細胞への直接的なNMの曝露は、受精阻害などの繁殖毒性リスクを持つが、その一方で、口腔からナノシリカを取り込んでも、精子の運動性においては安全であると結論付けられた。

A. 研究目的

本分担研究の目的は、生命誕生の根源である「繁殖・発生」への医薬品・食品基材のナノマテリアル (NM) のハザード同定を実施することである。

革新的な触媒活性を有する NM は、化粧品や医薬品開発への利用が劇的に進んでいる (Singh, S. et al. *Cancer Res.* 2012, 72., Raj, S. J. *Pharm. Bioallied Sci.* 2012, 4.)。一方で、ヒト健康被害の報告はないものの、実験レベルでの NM 特有の毒性が多数報告されており、カーボンナノチューブによる中皮腫の発生や精巣毒性の誘発、非晶質ナノシリカによる胎児発育遅延の報告は、NM の利用において無視できない情報となっている (Yamashita, K. et al. *Nat. Nanotechnol.* 2010, 6., Bai, Y. et al. *Nat. Nanotechnol.* 2010, 5., Nagai, H. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 2010, 108.)。

精巣や子宮などの生殖器官は、血液精巣関門、血液胎盤関門により保護されている。生体異物は、これらバリアにより侵入を制限されるため、NM も同様の理論による安全性の確保が想定される。しかし、精巣や胎児への NM の毒性発現が多数報告されていることから、生殖毒性 (精子・卵子・受精卵)・胚発生毒性の観点から、NM の安全性を確保することが世界的に求められている。そこで本研究班では、卵子や精子の活動の場である卵管や子宮、さらには精巣等へ過剰量の NM が移行する場合を想定し、受精卵 (胚) の初期発生や精子の運動性への影響を解析した。平成 23 年度までの本研究班では、受精後の 2 細胞期胚から胚盤胞期までの発生過程において、NM を過剰に曝露しても影響は観察されず、正常に発生すること明らかとしている。一方、精子の運動性は、ナノサイズのシリカ粒子・銀粒子の曝露により、培養液中を激しく泳ぎ回る精子が凝集 (ナノシリカ)・不動化 (ナノ銀) した。

次に本研究班は、ナノシリカによる精子の凝集について解析を進めるため、精子運動解析装置

SMAS (DITECT Co. Ltd.) を用い、直進性やその速度など、WHO が示す男性不妊の診断基準に従い評価した。その結果、受精に必要な精子の運動性が、100・300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の過剰量曝露により低下した。一方、30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 以下であれば、受精に必要な運動性は確保できることが明らかとなった。次に、ナノシリカ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解析した。その結果、精子内部への nSP70 の取り込みは観察されず、むしろ精子頭部膜表面を覆っていた。以上の結果は、ナノシリカによる精子の不動化は、精子頭部膜表面への結合が関連すると示唆された。さらに本研究班では、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活性酸素種 (ROS) との関連について、培養細胞を用い解析した。その結果、ナノシリカ曝露直後から細胞内遊離 Ca^{2+} 及び ROS の増加が、処置後数分以内に観察された。以上の昨年度までの研究成果より、ナノ・サブナノ粒子による精子の毒性は、標的となる精子・細胞内へのナノマテリアルの移行は関連せず、細胞膜との接触からはじまると考えられた。そこで本研究班では、ナノシリカおよびナノ銀と精子頭部原形質膜との相互作用 (結合) および、精子内 ROS との関連について検討した。さらに、ナノ・サブナノ粒子の曝露実態を想定した NM の口腔曝露による、精子の運動性への影響を解析し、生殖・発生毒性のハザード同定を実施した。

B. 研究方法

1. 実験材料

NM 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) の従来型を用いた。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. 電子顕微鏡解析

①11 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。 1×10^6 sperms/mL の精子に、nSP70・snAg を暴露し、電顕用サンプルとして用いた。③11 週齢の雄性 ICR マウスを開腹し、膀胱へ nSP70 またはナノ銀を投与、強制放尿後に尿管を摘出し、電顕用サンプルとして用いた。③電顕用サンプルを、その体積の 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）。次に、後固定液（0.1 M カコジル酸緩衝液、1% オスミウム酸水溶液）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)で観察した。

3. ナノシリカとリン脂質の結合解析

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。運動精子を 4000 rpm、5 分間で回収し、上清を取り除き、PBS を加え洗浄した。上清を取り除き、クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4) を 500 μ L 加え、13500 rpm で 15 分間遠心した。遠心後、下層の有機層をガラス管に入れ、 N_2 ガスで試料を乾燥させた。乾燥後、クロロホルム:メタノール (2:1) を 300 μ L 加え、溶解した。TLC アルミプレートに抽出した脂質を 5 μ L、10 μ L スポットし、さらに 1 μ g のエタノールアミン (Sigma)、1 μ g のホスファチジルコリン (Sigma)、5 μ g のホスファチジルセリン(Sigma)、5 μ g のスフィンゴミエリン(Enzo Life Sciences) をスポットし、乾燥させた。展開曹にクロロホルム:メタノール:水 (65:25:4) を加え、約 10 分充填した。TLC アルミプレートを入れ、上から約 1 cm まで

展開した。展開した TLC プレートはドライヤーで乾かした。この TLC プレートは、①Aka "Magic" を吹きかけ、95°C で熱し写真撮影、②0.5 mg/ml の nSP70 に浸し、室温で 2 時間インキュベートし、PBS で 5 分×3 回洗浄後、INDIGO2 (BERTHOLD)を用いて蛍光を測定した。

4. 血液生化学検査

各種ナノマテリアルの最終投与から 24 時間後に、マウスをペントバルビタールで麻酔し、心臓より採血した。採血は、100 μ g 分のヘパリン溶液であらかじめ湿らせたシリンジおよび注射針を用いた。採血後ただちに、1750 rpm、15 分間遠心分離して上清の血漿を回収した。血漿は、オリエンタル酵母工業(株)バイオ事業部へ依頼し、肝障害・腎障害などの血液生化学マーカーを測定した。

5. 精子の運動性評価

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。 1×10^6 sperms/mL の精子を調製し、nSP70 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。

6. 細胞内活性酸素種の評価

①培養細胞を用いた解析。BALB/3T3 繊維芽細胞を、5% Fetal Calf Serum (FCS) を含む Eagle's Minimum Essential Medium (E-MEM) 培地で培養。Glass Bottom dish(松浪硝子工業株式会社)へ 1×10^4 cells/well の条件で播種し、24 時間後に Hoechst 33258 (同仁化学研究所 Co. Ltd.) で核を染色。DCFH-DA(同仁化学研究所)を、それぞれ標準プロトコルに従い処置。さらに、ナノマテリアルを処置し、処置後 5 分の細胞内活性酸素種の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の変化を

観察した。

②精子を用いた解析。11 週齢の雄性 ICR マウスから精巢上体尾部を摘出。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。定法に従い CellROX® Green Reagent (インビトロジェン Co. Ltd.) を精子に前処置。その後、ナノマテリアルを 5 分間曝露し、4%パラフォルムアルデヒドで固定。共焦点レーザー走査型顕微鏡 FV1000 -D(OLYMPUS)を用い精子内の活性酸素種の変化を観察した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考 察

1. ナノマテリアルの精子頭部での動態

昨年度までの研究により、nSP70 が精子頭部へ結合することを透過型電子顕微鏡観察により明らかとしている（図 1 - B）。そこで本研究班は、従来型のシリカ（mSP1000）においても、精子頭部へ結合するか否かを検討した。その結果、精子頭部付近でのナノ粒子の存在は観察されるものの、精子頭部への結合は観察されなかった（図 1 - C）。すなわち、nSP70 の精子頭部への結合は、シリカ原料の特性ではなく、ナノ粒子の大きさ、もしくは表面性状に起因すると示唆された。では、snAg においても、nSP70 と同様に精子頭部へ結合するのであろうか？しかしながら、snAg を曝露した精子頭部には、snAg の結合や精子内部への移行はほとんど観察されず、一部の粒子がその近傍に存在していた（図 1 - D）。すなわち、nSP70 の精子頭部への結合は、ナノシリカ特有の現象であることが明らかとなった。

2. ナノシリカは精子由来リン脂質と結合する

精子頭部は、最外殻を原形質膜で覆われており、その構造は他の組織・細胞と同様に 4 種のリン脂質による二重層が形成されている。リン脂質は、細胞外側にスフィンゴミエリン（SPM）、およびホスファチジルコリン（PC）が存在し、細胞内側にホスファチジルアミン（PE）、ホスファチジル

セリン（PS）が存在する。そこで、マウスの精子から脂質成分を抽出し、リン脂質の標準品と共に TLC プレートへ展開し、マウス由来の脂質成分の同定を実施した。その結果、精子由来の脂質には 4 種のバンドが観察された（図 2 - A）。また、これら 4 種のバンドは、リン脂質の標準品と RF 値が一致しており、大きい順に PE、PC、PS、SPM であった。またこれ成分の存在比率は、定性的な判断であるが、PC、PE、SPM=PS の順であった。次に、これらリン脂質に nSP70 が結合するか否かを明らかにするため、先ほどと同様にマウスの脂質とリン脂質の標準品を展開した TLC プレートを準備し、蛍光標識された nSP70 溶液と室温で 2 時間反応させた。その後、INDIGO2 による蛍光イメージングにより、脂質と nSP70 の結合を評価した。その結果、精子由来の PC と SPM および標準品の PC と SPM との結合が観察された。すなわち、nSP70 はリン脂質との親和性が高いため、精子頭部へ結合することが明らかとなった。

3. ナノマテリアルは精子内で ROS を増加させる

現在までに知られている NM の毒性発現メカニズムの一つに、酸化ストレスの産生が挙げられる。放射線や種々の化学物質においても、直接・間接的に ROS を誘発し、DNA 損傷・炎症性サイトカインの産生の原因となることが明らかとなっている（Klaunig, JE. et al. Toxicol. Appl. Pharmacol. 2011, 254）。本研究班においても、昨年度までの研究により、nSP70、snPt、および snAg が細胞内 ROS を処置後 5 分程度で増加させることを明らかとしてきた（図 3）。そこで、ナノマテリアルによる精子の運動性の阻害について、ROS の増加が関連するか否かを検討した。その結果、ROS の蛍光プローブ CellROX が、snAg、nSP70 の曝露により還元型の非蛍光型から酸化型の蛍光型へと変化したことによる緑色蛍光の増加が観察された（図 4）。特に、snAg の蛍光強度は劇的に増加していた。

4. ナノマテリアルの経口曝露は、精子の運動性に影響しない

昨年度および前述までの解析では、卵子や精子にナノマテリアルが直性曝露することを想定し、その影響評価に取り組できた。しかしながら、実際の曝露実態を含めたハザード同定において、前述までの視点では、毒性に重きを置き過ぎているため、通常の使用範囲であれば安全である NM も、安全でない物質へと区別してしまう。そこで、実際の曝露経路として想定される経口曝露に着目し、ナノシリカが精子の運動性を阻害するか否かを検討した。実験条件は、nSP70、nSP300、mSP1000 および陰性対象用の PBS を、8 週齢の雄性 I C R が 11 週齢になるまでの 3 週間、20 mg/kg の条件で週に 2 回投与した。そして最終投与 24 時間後に開腹し、採血および精巣上体を摘出、血液生化学検査および精子の運動性を評価した。血液生化学検査では、すべての投与群において、肝障害マーカーの AST、ALT、A/G、及び肝・腎障害マーカーのアルブミン、総蛋白に変化は確認されなかった（図 5）。一方、腎障害マーカーの無機リンが、nSP70 曝露で増加した。しかしながら、他の腎障害マーカーとの整合性、及び血中濃度の増加率からすると腎障害とは断定できない。その一方、無機リンはナノシリカの安全性バイオマーカーになり得ると示唆された。次に精子の運動性評価では、すべての投与群において運動率、直進速度、曲線速度、頭部振幅に影響は見られなかった。すなわち、過剰量のナノシリカを投与しても、精子の運動性には影響しないことが明らかとなった。

5. ナノマテリアルは、尿道に蓄積しない

NM の排出経路はいまだ明らかとされていないが、SiO₂ で表面を修飾した量子ドットを用いた解析では、約 5.5 nm 以下であれば、尿中排泄されることが明らかとなっている（Hak, Soo, Choi. Nat biotechnol. 2007, 25.）。しかし、尿管内に NM が残存した場合、尿管を通り射精される精子は、高濃度の NM に暴露すると想定される。そこ

で、尿管内に NM が残存するか否かを電子顕微鏡により観察した。実験方法は、膀胱へ直接 nSP70 もしくは snAg を注入し、排尿後の尿管を用いた。その結果、すべての曝露群において尿道上皮細胞の障害やナノ粒子の蓄積は観察されなかった。

E. 結論

NM の安全性研究では、より小さな材料が、毒性発現の程度や重要度に関わるとされている。本研究班でも、精子の運動性を指標とする NM の安全性研究から、粒子径 1 nm のサブナノ銀と粒子径 70 nm のナノシリカが、精子の運動性を阻害する NM 特有の毒性(ナノ毒性)を新たに見出し、特に粒子径の小さいサブナノ銀では、精子の致死毒性が観察された。しかしながら、サブナノ銀は精子頭部への結合は観察されず、ナノシリカのみ精子頭部への結合が観察された（図 1、2）。その一方で、精子内 ROS の増加は、サブナノ銀で劇的な増加が観察され、nSP70 では弱い蛍光強度の増加が確認できる程度であった（図 3、4）。また一方で、snAg と同じ粒径のサブナノ白金は、精子内の ROS を増加させなかった（図 3、4）。以上の結果は、精子における NM の毒性発現が、特定の物性に依存するのではなく、複数の物性が相乗的に作用することで決定すると示唆された。

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】

② 学会発表

【国内学会発表：合計 17 件】

1. 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：非晶質ナノシリカは細胞内遊離カルシウムイオン依存的に

- 血管を弛緩する. 第 39 回 日本トキシコロジー学会学術年会., 仙台, 2012 年 7 月.
2. 小野寺章、西海史子、田中敦士、諸澤瑛、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈美、根津菜摘、宝諸あい、福井健太郎、米村重信、柳原格、堤康央、河合裕一：非晶質ナノシリカの細胞膜への結合とナノ生殖毒性との連関. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
3. 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. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
4. 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. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
5. 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. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
6. 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 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
7. 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. 第 62 回日本薬学会近畿支部総会・大会., 神戸, 2012 年 10 月.
8. Aki Honma, Akira Onodera, Nami Tanabe, Maiko Ohta, Yukina Ishii, Takuya Furuta, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : The examination on generation mechanism of intracellular reactive oxygen species by nanomaterial. フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー., 名古屋, 2012 年 11 月.
9. Maiko Ohta, Akira Onodera, Ai Housho, Aki Honma, Yukina Ishii, Takuya Furuta, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Inhibition of cell migration by amorphous nano silica : フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー., 名古屋, 2012 年 11 月.
10. Akira Onodera, Fumiko Nishiumi, Takuya Furuta, Kumiko Nakahira, Yukina Ishii, Aki Honma, Maiko Ohta, Hideto Morosawa, Kentaro Fukui, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Relationship between amorphous nano silica binding to the plasma membrane and Nano-reproductive toxicity. 第 85 回日本生化学会大会., 福岡, 2012 年 12 月.
11. Takuya Furuta, Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Hideto Morosawa, Atsushi Tanaka, Yukina Ishii, Maiko Ohta, Aki Honma, Hiroshi Okamoto, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Amorphous Nano-Silica evokes vascular relaxation through the PI3K signaling. 第 85 回日本生化学会大会., 福岡, 2012 年 12 月.
12. Yukina Ishii, Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Hideto Morosawa, Aki Honma, Maiko Ohta, Takuya Furuta, Hiroshi Okamoto, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : The increase in the intracellular Ca²⁺ concentration induced by Nano materials. 第 85 回日本生化学会大会., 福岡, 2012 年 12 月.
13. Maiko Ohta, Akira Onodera, Hideto

Morosawa , Takuya Furuta , Aki Honma , Yukina Ishii, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi , Yuichi Kawai : Amorphous Nano-Silica induces the depolarization of the plasma membrane. 第85回日本生化学会大会., 福岡, 2012年12月.

14. Takuya Furuta, Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Hideto Morosawa , Atsushi Tanaka, Yukina Ishii, Maiko Ohta, Aki Honma, Hiroshi Okamoto, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Amorphous nano-silica evokes the endothelium-dependent vascular relaxation regulated by the Ca²⁺/PI3K signaling. 日本薬学会第133年会., 横浜, 2013年3月.

15. Yukina Ishii, Akira Onodera, Katsutoshi Yayama, Hideto Morosawa, Aki Honma , Takuya Furuta, Maiko Ohta, Hiroshi Okamoto, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : The increase in the intracellular Ca²⁺ concentration induced by Amorphous nano materials is dependent on plasma membrane Ca²⁺ channels. 日本薬学会第133年会., 横浜, 2013年3月.

16. Maiko Ohta , Akira Onodera , Hideto Morosawa, Takuya Furuta, Aki Honma, Yukina Ishii , Shigenobu Yonemura , Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Sub-nano

silver induces the depolarization of the plasma membrane. 日本薬学会第133年会., 横浜, 2013年3月.

17. Aki Honma, Akira Onodera, Nami Tanabe, Maiko Ohta, Yukina Ishii, Takuya Furuta, Shigenobu Yonemura, Yasuo Tsutsumi, Yuichi Kawai : Induction of mitochondrial ROS production by snAg. 日本薬学会第133年会., 横浜, 2013年3月.

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

神戸学院大学薬学部（職員1名・学生11名）：
小野寺章、久野秀太、岩崎綾香、田鍋奈巳、田中敦士、諸澤英、根津菜摘、宝諸あい、太田舞子、本間安季、古田拓也、石井幸奈

理化学研究所 発生・再生科学総合研究センター
（職員2名）米村重信、垣口貴沙

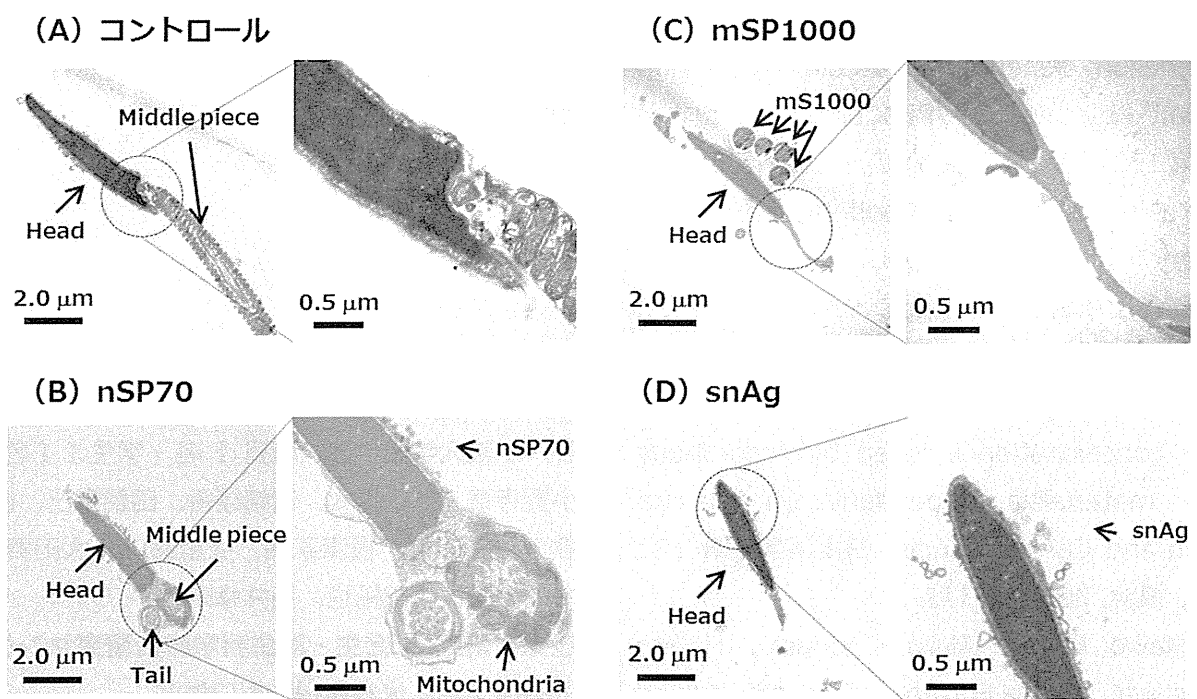


図1.精子頭部におけるナノマテリアルの局在. 11週齢の雄性ICRマウスから精子を採取。BMOC-3 Mediumで30分前培養し、nSP70・mSP1000もしくはsnAgを暴露し、電顕用サンプルとして用いた。透過型電子顕微鏡を用い、精子頭部、中部（ミトコンドリア）、尾部への取り込みを観察した。

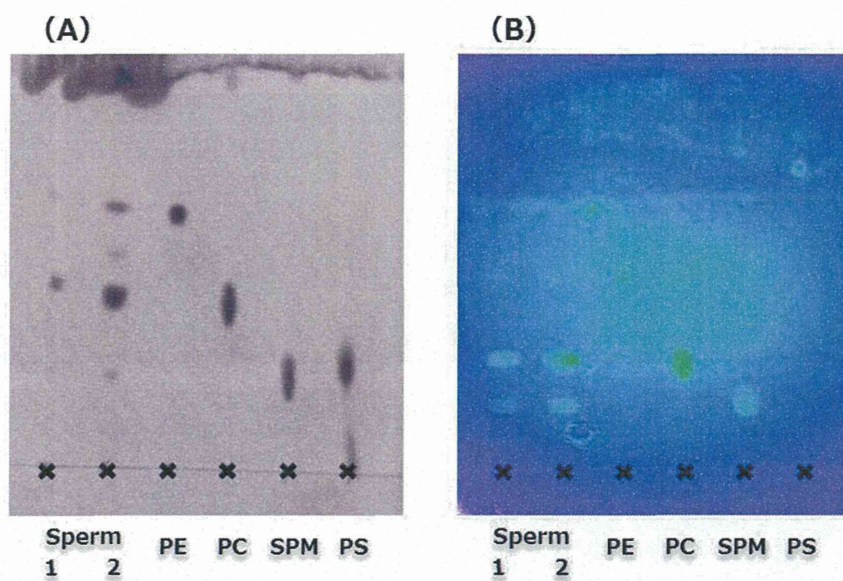


図2.精子由来リン脂質へのナノシリカの結合. 11週齢の雄性ICRマウスから精子を採取。BMOC-3 Mediumで30分前培養し、運動精子を回収した。クロロホルム:メタノール:水 (65:25:4) でリン脂質を抽出し、TLCアルミプレートへスポット及び展開した。また精子由来リン脂質と共に、標準品のエタノールアミン (Sigma)、フォスファチジルコリン (Sigma)、ホスファチジルセリン (Sigma)、スフィンゴミエリン(Enzo Life Sciences) をスポットし、展開した。展開したTLCプレートはドライヤーで乾かし、Aka "Magic"を吹きかけ、95℃で熱し写真撮影 (A)、もしくは、蛍光標識されたnSP70と反応させ、INDIGO2 (BERTHOLD) を用いて蛍光を測定した (B)。

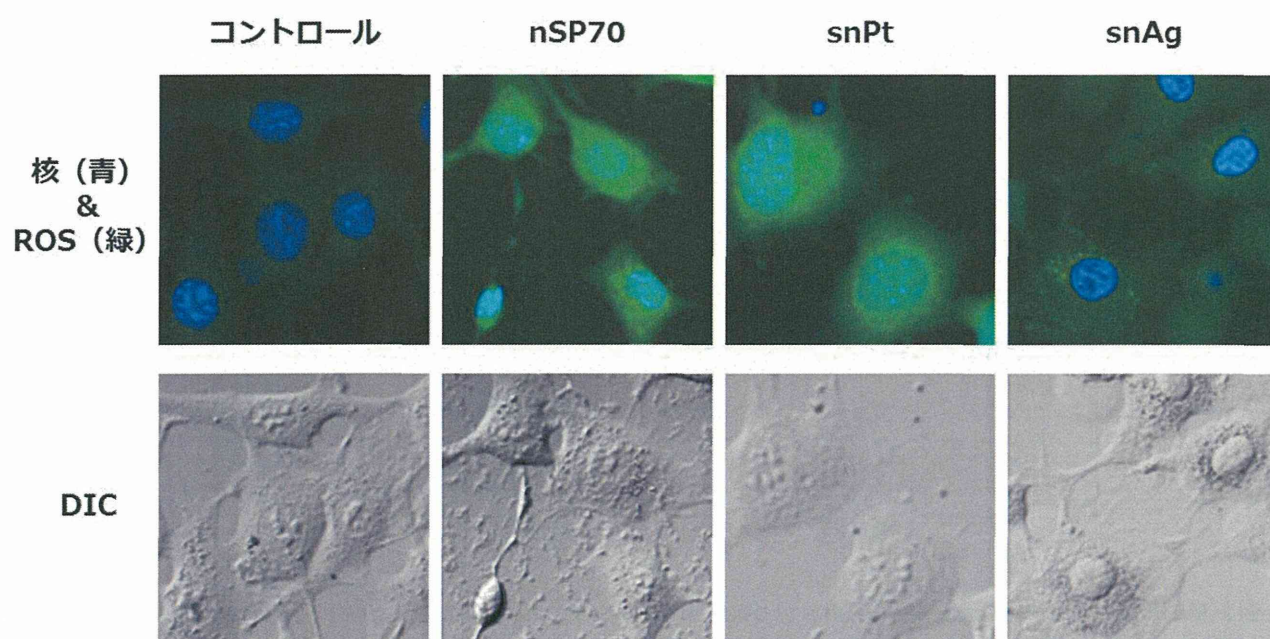


図3. ナノシリカによる細胞内活性酸素種の増加とその局在. Glass bottom dishに、BALB/3T3細胞を播種。Hoechst 33258(核: Blue color)および200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のnSP70または、10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ のsnPt、snAgを5分間処置。DCFH-DAは、共焦点走査型レーザー顕微鏡FV1000の連続撮影から30秒後に処置し、細胞内活性酸素種の動態を観察。