

を確認した。抽出した RNA から cDNA の合成、cDNA のラベル化を行った後、マイクロアレイ解析を実施した。

4. マイクロアレイ解析

北海道システム・サイエンス株式会社に委託した。

C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

D. 考察

1. TJ binder の評価

bTJ binder である C-CPE と tTJ binder である Ib421-664 について TEER を低下させる効果があるか否かを検討した。Transwell で単層培養した EpH4 細胞に C-CPE184 (5 µg/mL)、Ib421-664 (50 µg/mL) それぞれ添加し、12 時間後、24 時間後に TEER を測定した (図 1)。その結果、それぞれの TJ binder 添加により有意に TEER 値が低下し、ネガティブコントロールとして用いた TJ のシール機能をつかさどる claudin-4 との結合能が著しく低い変異体 C-CPE_{Y/L} は TEER 値を低下させなかった。したがって C-CPE184、Ib421-664 共に TJ を開口する薬物として使用できることが確認された。12 時間後、24 時間後に TEER 値が低下した細胞を回収し、抽出した RNA から cDNA を作製しマイクロアレイ解析に供した。

2. 発現量が低下した遺伝子の抽出

マイクロアレイ解析で得られたシグナル値を基にデータマイニングを行い、遺伝子の絞り込みを行った。まず、薬剤添加前と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子の抽出を試みた (図 2)。

C-CPE184 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 1067 個あったが、この中には Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した偽陽性の遺伝子が 267 個存在した。そこで、Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した 267 個の遺伝子を除く 800 個

の遺伝子を抽出した。

同様に Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 763 個あり、その中に存在した Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した 338 個の遺伝子を除く 425 個の遺伝子を抽出した。

上記の方法で抽出した遺伝子には、C-CPE184 処理と Ib421-664 処理の両方で遺伝子発現が変動した遺伝子が含まれている。そこで、薬剤添加前の細胞と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで、単独または共通して 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子の抽出を試みた。

図 2 (C) のように C-CPE184 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は、Ib421-664 処理で 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子を差し引いた 681 個であった。また、Ib421-664 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は、C-CPE184 処理で 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子を差し引いた 377 個であった。なお、C-CPE184 と Ib421-664 処理の両方で共通して 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 193 個であった。

3. 発現量が上昇した遺伝子の抽出

続いて、薬剤添加前と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子の抽出を試みた (図 3)。

C-CPE184 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 588 個あったが、この中には Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が増加した偽陽性の遺伝子が 139 個存在した。そこで、Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が増加した 139 個の遺伝子を除く 449 個の遺伝子を抽出した。

同様に Ib421-664 で 12 時間処理することで 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 678 個あ

り、その中に存在した Negative control の C-CPE_{Y/L} 処理においても 2 倍以上遺伝子発現が減少した 176 個の遺伝子を除く 502 個の遺伝子を抽出した。

上記の方法で抽出した遺伝子には、C-CPE184 処理と Ib421-664 処理の両方で遺伝子発現が変動した遺伝子が含まれている。そこで、薬剤添加前の細胞と比較して C-CPE184 または Ib421-664 で 12 時間処理することで、単独または共通して 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子の抽出を試みた。

図 3 (C) のように C-CPE184 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は、Ib421-664 処理で 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子を差し引いた 422 個であった。また、Ib421-664 処理でのみ 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は、C-CPE184 処理で 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子を差し引いた 512 個であった。なお、C-CPE184 と Ib421-664 処理の両方で共通して 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 83 個であった。

E. 結論

哺乳類の上皮細胞株 EpH4 を用いて形成した単層膜に bTJ binder である C-CPE184 と tTJ binder である Ib421-664 を添加したところ有意な TEER の低下が観察された。したがって本研究では TJ 開口モデルとして EpH4 細胞層に C-CPE184 と Ib421-664 を添加する系を用い、TJ 開口時に変化する遺伝子発現を DNA マイクロアレイにより網羅的に解析した。12 時間後に 2 倍以上低下する遺伝子数を調査したところ、C-CPE184 処理のみで 681 個、Ib421-664 処理のみで 377 個、共通して変動するもの 193 遺伝子が抽出された。12 時間後に 2 倍以上上昇する遺伝子数を調査したところ、C-CPE184 処理のみで 422 個、Ib421-664 処理のみで 512 個、共通して変動するもの 83 遺伝子が抽出された。今後、2 4 時間処理後の結果によりクラスター分けを

行い更なる絞り込みを行う予定である。

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 1 件】

1. 早石 知浩、渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁：ウエルシュ菌イオタ毒素を用いた tricellular tight junction 制御法の開発，第 60 回毒素シンポジウム、兵庫県、宍粟市，2013 年 7 月。

【国内学会発表：合計 1 件】

1. 井口 大輔、早石 知浩、Sussnne M. Krug、Michael Fromm、渡利 彰浩、近藤 昌夫、八木 清仁：上皮を標的とした創薬基盤研究～Tricellular tight junction 制御法の開発～日本薬学会第 134 年会、熊本、2014 年 3 月。

【国際学会発表】

該当なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

該当なし

その他

該当なし

研究協力者

近藤昌夫、渡利彰浩、早石知浩、井口大輔

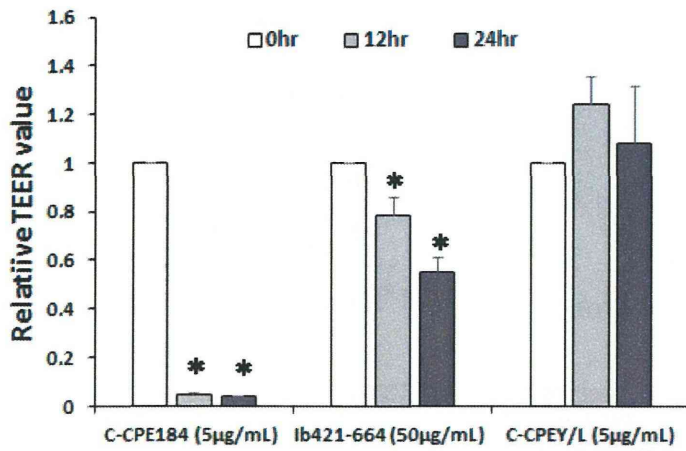


図1 TJ binderの膜電気抵抗値低下作用
TJ binder無添加の値を1.0とし相対値で示した。データは平均値±標準誤差 (n=3)。*p<0.05

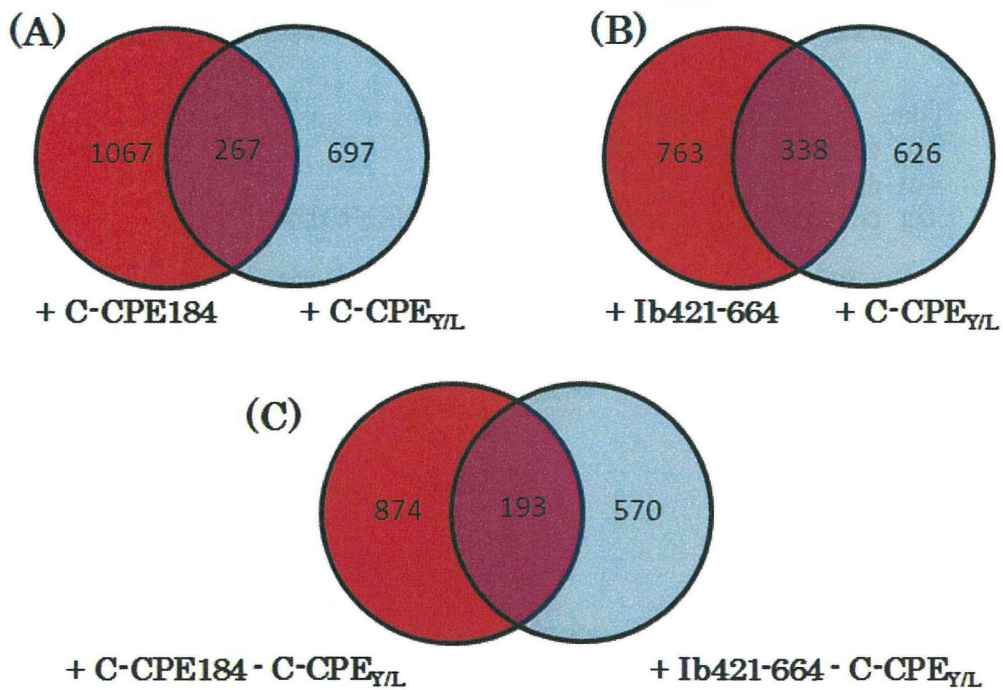


図2. 12時間後に発現が低下する遺伝子数.
(A) C-CPE184処理により低下する遺伝子
(B) Ib421-664処理により低下する遺伝子
(C) C-CPE184とIb421-664処理で低下する遺伝子の比較

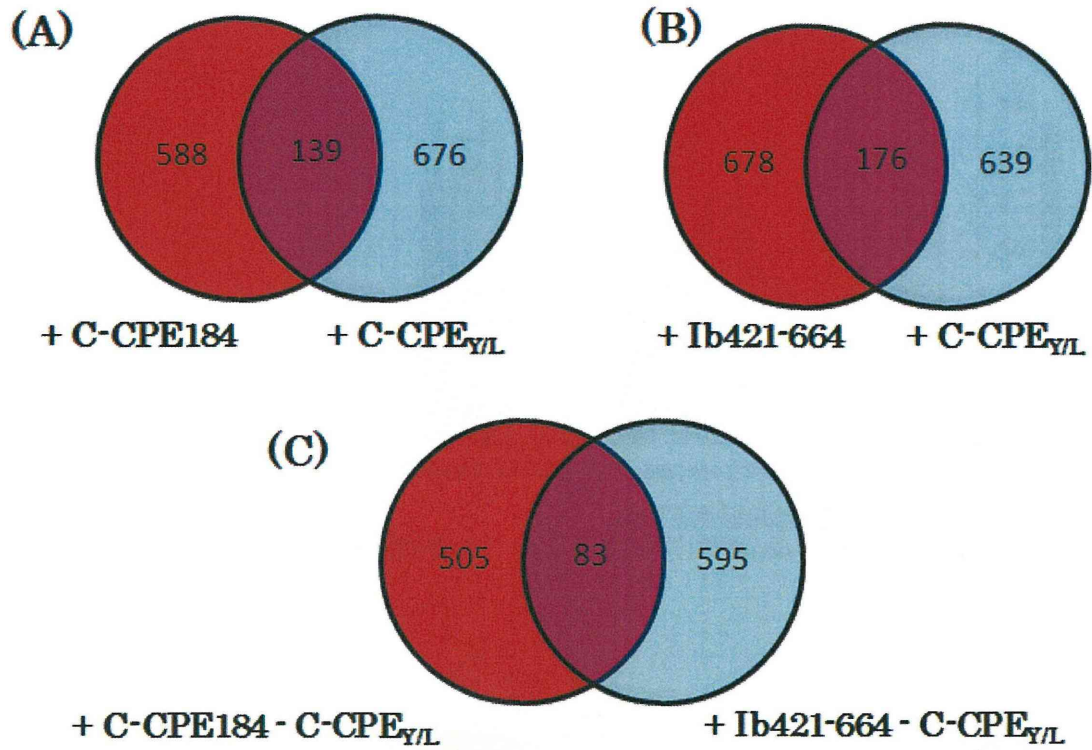


図3. 12時間後に発現が上昇する遺伝子数.
 (A) C-CPE184処理により上昇する遺伝子
 (B) Ib421-664処理により上昇する遺伝子
 (C) C-CPE184とIb421-664処理で上昇する遺伝子の比較

乳幼児・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の脳神経系動態解析と神経薬理学的毒性評価

研究分担者 松田 敏夫 大阪大学 大学院薬学研究科 薬物治療学分野

研究要旨

近年、母親のみならず、父親の環境要因についても次世代に影響することが示唆されるようになった。そこで本研究は、化学物質として、最近急速に利用が増大しているナノマテリアルの1つである非晶質ナノシリカ(nSP)に着目し、父親へのnSP曝露が次世代の情動行動に及ぼす影響について検討した。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30nmのnSP(nSP30)を1.25, 2.5および5mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与した。投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させ、雄性の出生子について9週齢時より行動解析を行った。オープンフィールド試験での自発運動量、尾懸垂試験での不動時間、社会性相互作用試験での嗅覚行動、ならびに恐怖条件付け文脈学習試験での文脈依存性すくみ時間は、4群に差異は認められなかった。したがって、父親へのnSP曝露が次世代の自発運動、抑うつ様行動、社会性行動ならびに文脈的空間記憶能へ及ぼす影響は小さいものと考えられた。一方、Y字迷路試験において、2.5mg/kg nSP30曝露父親由来の仔マウスの自発的交替行動変化率が、対照父親由来の仔マウスより有意に小さいことを認めた。すなわち、父親へのnSP曝露が次世代の短期作業記憶能を低下させることが示唆された。なお、不安様行動については、高架式十字迷路試験において4群間の差異は見られなかったが、オープンフィールド試験においては、2.5mg/kg nSP30曝露父親由来の仔マウスの中央区画横断回数は、対照父親由来の仔マウスより多く、不安が低下している可能性が考えられた。この点については今後の精査を要する。以上、雄親マウスへのnSP30曝露が仔マウスの短期作業記憶能を低下させたことから、父親へのナノマテリアル曝露が次世代の精神活動に影響を及ぼすことが考えられる。

A. 研究目的

近年の疫学研究により、化学物質曝露などの環境要因の効果が世代間を超えてもたらされることが示され、これまでに、母親の環境要因が次世代に及ぼす影響、特に妊娠期母体の内的・外的環境要因が次世代に及ぼす影響に関する研究が数多くなされてきた。一方で近年、母親のみならず、父親の環境要因についても次世代に影響することが示唆されるようになった。そこで本研究は、化学物質として、最近急速に利用が増大しているナノマテリアルの1つである非晶質ナノシリカ(nSP)に着目し、父親へのnSP曝露が次世代の情動行動に及ぼす影響について検討した。

B. 研究方法

1. 父親動物へのナノマテリアル曝露と次世代動物の作製

雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30nmのnSP(nSP30)を1.25, 2.5および5mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与した。投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。自然分娩により出生した仔を3週齢時に離乳し、9週齢時より雄性マウスの行動解析を行った。

2. 自発運動の評価

自発運動の評価は、オープンフィールド試験

(Kataoka et al., 2013)により行った。新奇環境においたマウスの移動距離、立ち上がり回数、中央区画横断回数を Acti-Track System (Panlab, Barcelona, Spain) を用いて、90 分間測定した。

3. 不安様行動の評価

不安様行動の評価は、高架式十字迷路試験 (Kataoka et al., 2013)により行った。マウスを装置中央に置き、5 分間の行動をビデオ録画した。オープンアームおよびクローズドアームにおける滞在時間および進入回数を計測した。また、総滞在時間におけるオープンアームへの滞在時間の割合を算出した。

4. 抑うつ様行動の評価

抑うつ様行動の評価は、尾懸垂試験(Ago et al., 2008) により行った。マウスの尾を固定して装置内に吊り下げ、6 分間の不動時間を MicroAct for Tail-Suspension (version 1.03; Neuroscience, Japan)を用いて自動計測した。

5. 社会性行動の評価

不安様行動の評価は、社会性相互作用試験 (Kataoka et al., 2013)により行った。被検マウスを測定ケージに 60 分馴化後、初遭遇となる同性同系統の侵入マウスを入れ、20 分間の行動をビデオ録画した。被検マウスが侵入マウスに対して示した嗅覚行動、毛づくろい行動ならびに攻撃行動の総時間を計測した。

6. 短期作業記憶の評価

短期作業記憶の評価は、Y 字迷路試験 (Sarnyai et al., 2000)により行った。マウスを装置中央に置き、8 分間の行動をビデオ録画した。各アームへの進入回数を計測し、3 回連続して異なるアームへ進入した回数を自発的交替行動数として求めた。これら計測値より、自発的交替行動変化率を次式「自発的交替行動変化率 = 自発的交替行動数 / (総進入回数 - 2) × 100」より算出した。

7. 文脈的空間記憶能の評価

文脈的空間記憶能の評価は、恐怖条件付け文脈学習試験(Takuma et al., 2012) により行った。マウスを装置内に置き、音および電気刺激を与

えない状況下で 125 秒間自由に行動させた。15 秒間の音刺激 (2800 Hz, 80 dB) とその最後の 5 秒間に電気刺激 (0.8 mA) を加える組み合わせ刺激を 1 セットとし、15 秒間隔で 6 回繰り返し、条件付けを行った。文脈依存試験では、条件付け 24 時間後に再び装置内にマウスを入れ、音および電気刺激を与えない状況下で 3 分間自由に行動させた。装置内でのマウスの行動をビデオ録画し、条件付けにおいては各電気刺激後 15 秒間に観察されたすみ行動時間の百分率(%)を、文脈依存試験においては 3 分間に観察されたすみ行動時間の百分率(%)をそれぞれ算出した。文脈依存試験で観察されたすみ行動率(%)を学習記憶の指標として評価した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. 自発運動の評価

オープンフィールド試験における 10 分ごとの移動距離ならびに 90 分間の総移動距離において、1.25, 2.5 および 5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの群間に差異は認められなかった(図 1)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代の自発運動に影響を及ぼさないことが考えられた。

2. 不安様行動の評価

高架式十字迷路試験において、1.25, 2.5 および 5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスのオープンアームおよびクローズドアームでの滞在時間割合に差異は認められなかった(図 2)。したがって、本試験で検出される不安様行動は、父親への nSP 曝露により影響を受けないことが考えられた。一方で、オープンフィールド試験において、2.5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスの中央区画横断回数は、対照父親由来の仔マウスより多く(図に示さず)、不安が低下している可能性が考えられた。これらのことより、父親への nSP 曝露が次世代の不安様行動に及ぼす影響についての結論を

導くには、さらなる検討を要すると思われる。

3. 抑うつ様行動の評価

尾懸垂試験において、1.25, 2.5 および 5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの不動時間に差異は認められなかった(図 3)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代の抑うつ様行動に影響を及ぼさないことが考えられた。

4. 社会性行動の評価

社会性相互試験において、1.25, 2.5 および 5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの嗅覚行動の回数および総時間に差異は認められなかった(図 4)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代の社会性行動に影響を及ぼさないことが考えられた。

5. 短期作業記憶の評価

Y 字迷路試験において、2.5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスの自発的交替行動変化率が、対照父親由来の仔マウスより有意に小さいことを認めた(図 5)。すなわち、父親への nSP 曝露が次世代の短期作業記憶能を低下させることが示唆された。

6. 文脈的空間記憶能の評価

恐怖条件付け文脈学習試験において、1.25, 2.5 および 5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の雄性仔マウスおよびその対照仔マウスの条件付け時のすくみ行動の変化、ならびに文脈依存試験でのすくみ行動時間に差異は認められなかった(図 6)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代の文脈的空間記憶能に影響を及ぼさないことが考えられた。

E. 結論

雄親マウスへの nSP30 曝露が仔マウスの短期作業記憶能を低下させたことより、父親へのナノマテリアル曝露が次世代の精神活動に影響を及ぼすことが考えられる。本現象が、nSP に限られるものか否かを明らかにする必要がある。

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】

【国内学会発表：合計 3 件】

1. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吉岡靖雄, 吾郷由希夫, 佐藤宏祐, 野尻奈央, 田中智大, 田熊一徹, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 非晶質ナノシリカの妊娠期曝露が仔の情動機能へ及ぼす影響探索., 第 40 回日本毒性学会学術年会., 千葉 (千葉), 2013 年 6 月.
2. 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, 田熊一徹, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川剛, 東阪和馬, 堤 康央: 妊娠期の非晶質ナノシリカ曝露が次世代の情動機能へ及ぼす影響探索., Neuro2013 (第 36 回日本神経科学大会・第 56 回日本神経化学会大会・第 23 回日本神経科学大会 合同大会)., 京都, 2013 年 6 月.
3. 難波佑貴, 東阪和馬, 森下裕貴, 國枝章義, 岩原有希, 田中康太, 西川雄樹, 前田優子, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫, 角田慎一, 吉岡靖雄, 堤 康央: 雄親曝露に着目したナノマテリアルの次世代影響評価., 日本薬学会第 134 年会., 熊本, 2014 年 3 月.

【国際学会発表：合計 0 件】

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

該当無し.

研究協力者

田熊一敬, 平松直樹, 前田優子, 田中辰典,
福山留以

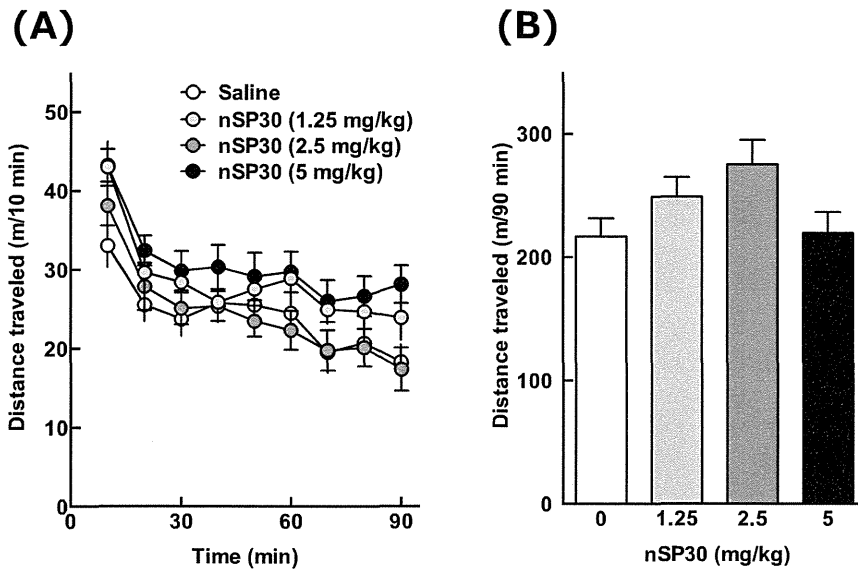


図1. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの自発運動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9週齢時にオープンフィールド試験(90分)を行った。(A) 10分ごとの移動距離の経時変化, (B) 90分間の総移動距離。データは, 平均±SEMで示した(n=9-12)。

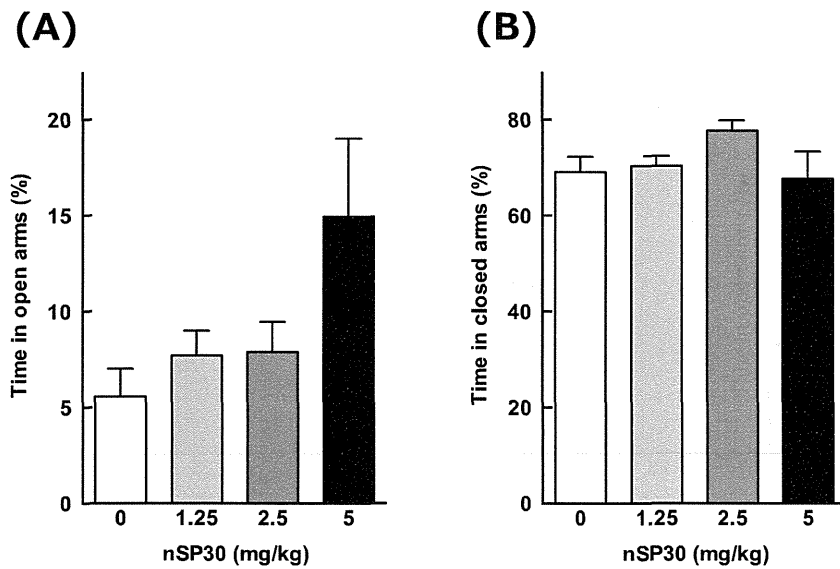


図2. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの不安様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, 粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9週齢時に高架式十字迷路試験(5分)を行った。(A) オープンアームでの滞在時間割合, (B) オープンアームでの滞在時間割合。データは, 平均±SEMで示した(n=9-12)。

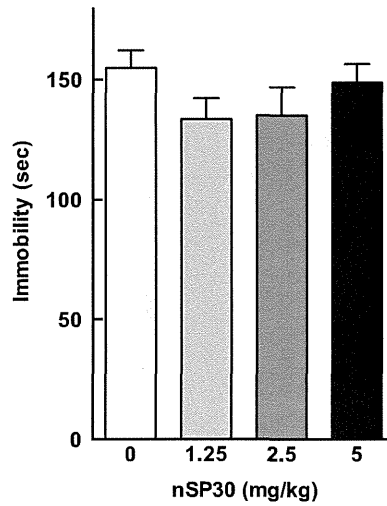


図3. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの抑うつ様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、10週齢時に尾懸垂試験(6分)を行い、不動時間を測定した。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

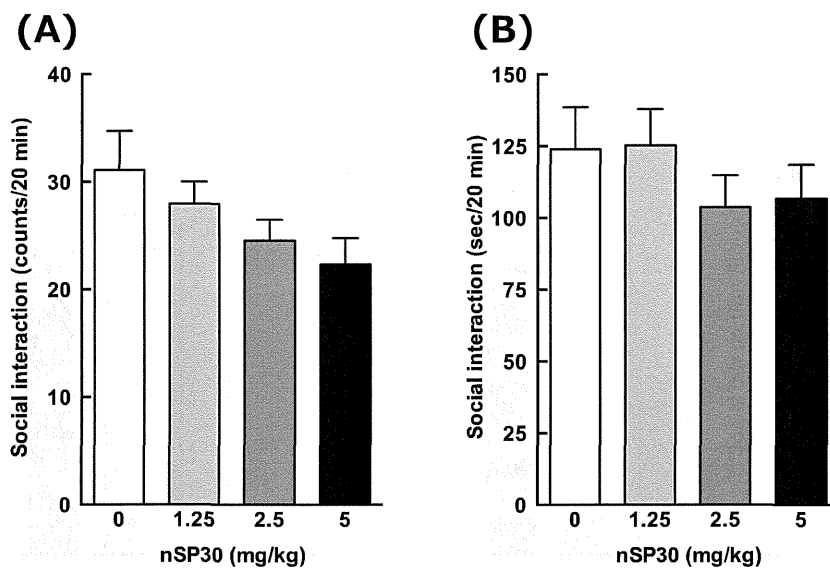


図4. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの社会性行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、9週齢時に社会性相互作用試験(20分)を行った。(A) 嗅覚行動回数、(B) 嗅覚行動時間。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

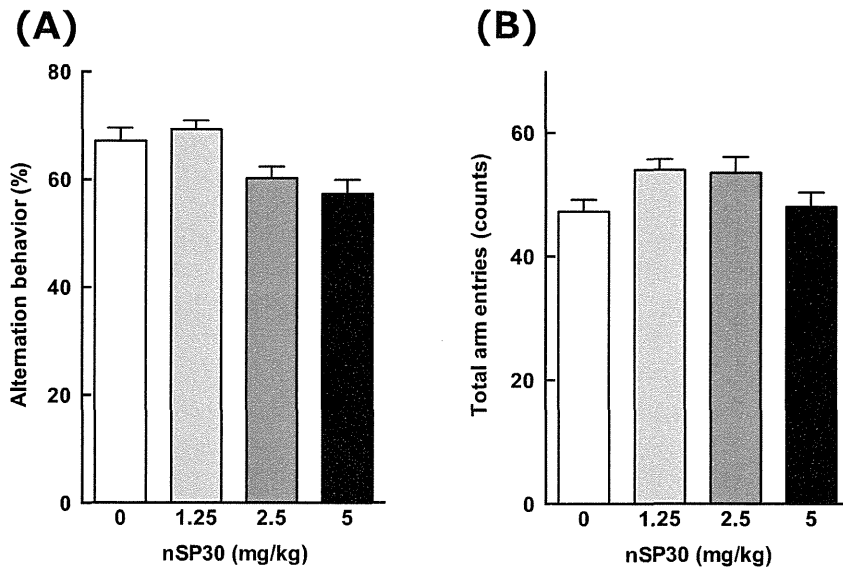


図5. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの短期作業記憶に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、10週齢時にY字迷路試験(8分)を行った。(A) 自発的交替行動変化率、(B) 各アームへの総進入回数。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。* $P < 0.05$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。

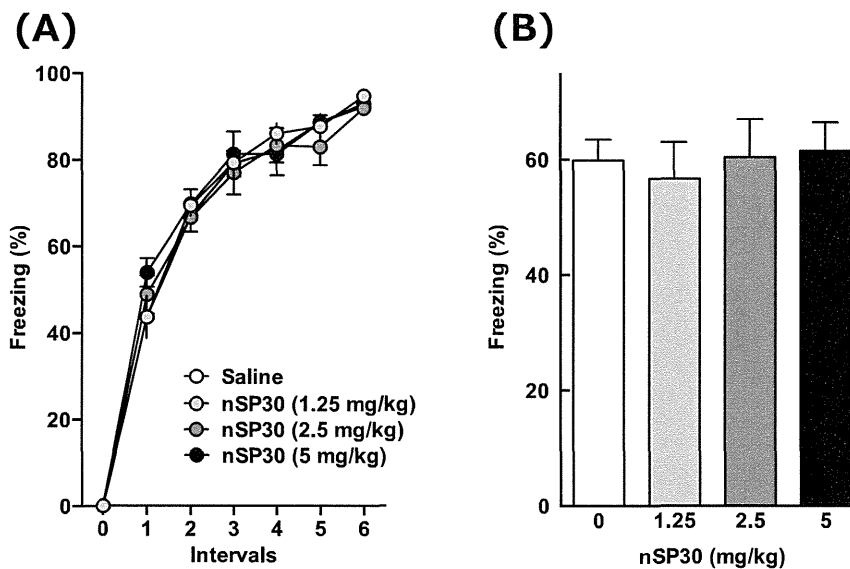


図6. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの文脈的記憶能に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、11週齢時に恐怖条件付け文脈学習試験を行った。文脈依存試験(3分)は、条件付けの24時間後に行った。(A) 条件付け時のすくみ行動時間割合の経過、(B) 文脈依存試験時の総すくみ行動時間割合。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

ナノ・サブナノ素材の胎盤動態および胎盤/胎仔毒性評価

研究分担者 齋藤 滋 富山大学大学院医学薬学研究部 教授

研究要旨

オートファジーは、ストレス下において自己消化することにより、新たなアミノ酸やエネルギーを得ることで生存を計る機構と考えられてきたが、その他の機構として細胞内に侵入した細菌やウイルスを排除することが判ってきた。これまで細胞内に取り込まれたナノ粒子の排泄機構は不明であった。我々は、オートファジーが細胞内に取り込まれたナノ粒子の排泄に関与しているとの仮説をたて、検討を加えた。胎児線維芽細胞のモデルとして MEF 細胞を、胎盤細胞のモデルとして HTR-8 細胞、胎児腎細胞として HEC293 細胞を用い、オートファジー誘導に必須の Atg4B に対する mutant 蛋白を恒常的に発現させたオートファジー欠損細胞を作製した。粒子径 10、50、100、1000nm の非晶質シリカを終濃度 11–900 μ g/ml で添加し、24h 培養後に WST-8 を添加し細胞生存率を測定した。同時に蛍光修飾シリカを用いて、細胞内への取り込みを評価した。MEF 細胞では、nSP10 ではシリカ添加終濃度が高濃度（900、300 μ g/ml）ではオートファジー欠損株の方が WT 株に比し生存率が低下していた。また、nSP50 では 900 μ g/ml でオートファジー欠損株で生存率が低下していた。細胞内のシリカ量を測定すると、オートファジー欠損株では WT 株に比し培養 6 h 後の nSP30、ならびに nSP1000 量が多かった。一方、これらの変化は HTR8 細胞や HEK 293 細胞では認められなかった。また、粒子径 10、50、90nm の金粒子や、粒子径 5、10、50、100nm の銀粒子は WT 株、オートファジー欠損株ともに生存率に影響を与えなかった。以上より、細胞の種類によりオートファジーを介したナノ粒子排泄機構に差があること、一部の細胞ではオートファジーを介したナノ粒子の排泄機構が存在する可能性が示された。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、食品や化粧品等に含まれ、妊娠マウスに静注すると胎盤に集積し、一部は胎児にも移行する。未来への影響を考慮すれば、胎児への影響を検討する必要がある。これまでナノ粒子径が小さくなるにつれ、細胞内に容易に取り込まれることは知られてきたが、排出機構については全く知られていない。オートファジーは飢餓等のストレス下の細胞に生じ、オートファゴソームを形成して細胞内小器官を含む自己を消化してエネルギー供給する働き以外に、細胞内に取り込まれた微生物等を消化し、細胞外へ排泄する働きもある。そこで胎児線維芽細胞である MEF 細胞、胎児腎細胞である HEK293 細胞、胎盤細胞である HTR-8 細胞からオートファジー欠損細胞を

作製し、オートファジーがナノ粒子の排泄に何らかの役割を果たしているかを検討した。

B. 研究方法

1. 細胞株

胎児・胎盤のモデルとして、胎児線維芽細胞由来の MEF 細胞、胎児腎細胞株 HEK293 細胞、トロホブラスト由来の HTR8 細胞を用い、オートファジー誘導に必須の Atg4B に対する mutant 蛋白を発現する遺伝子導入を行ない、オートファジー欠損株を得た。

2. 細胞障害の評価

粒子径 10、50、100、1000nm の非結晶シリカを終濃度 11–900 μ g/ml となるように添加し、24 時間培養後、WST-8 を添加し、吸光度測

定し細胞傷害性を評価した。同様に粒子径 10、50、90nm の金粒子を 0.625–10 μ g/ml、粒子径 5、10、100nm の銀粒子を添加し、24h 培養後の細胞傷害を同様に行なった。

3. 細胞内シリカならびに金濃度の評価

蛍光装飾シリカを 100 μ g/ml で培養液中に添加し、6 時間後に Flow cytometry にて細胞内蛍光強度を測定した。

粒子径 10、50、90nm の金粒子を終濃度 10 μ g/ml で添加培養 6 時間後に、PBS 溶液で 2 回洗浄後に回収した細胞を 60% HNO_3 に懸濁させ、ICP-MS にて金量を測定した。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. オートファジーの有無がシリカによる細胞傷害に影響を与えるか否かの検討

MEF 細胞において nSP10 では、300 μ g/ml で細胞生存率が約 50%、900 μ g/ml で 0%となった (図 1)。一方、オートファジー欠損 MEF 細胞では、300 μ g/ml の nSP10 添加により生存率は、10%にまで低下した (図 1)。nSP50 では 900 μ g/ml で細胞生存率が 40%に低下したが、オートファジー欠損株では 20%にまで低下した (図 1)。細胞内へのシリカの取り込み量を検討すると、nSP30 と nSP1000 では、いずれもオートファジー欠損 MEF 細胞内のシリカ量が WT の MEF 細胞より有意に高値 ($P < 0.01$ 、 $P < 0.05$) であった (図 2)。このことはオートファジーが欠損することでシリカの取り込みが増した結果か、排泄が障害されたかのいずれかによって説明できる。現在、培養液中に排泄されるシリカ量を計測することを計画している。

一方、胎児腎細胞由来 HEK293 細胞やトロホプラスト由来 HTR8 細胞に対しては、ナノシリカはいずれのサイズのものも、検討した濃度の範囲内では細胞傷害を示さず、オートファジー欠損株においても同様であった。このことは極めて重要なことで、細胞の種類によりナノシリカの取り込み

や排泄秩序が異なっていることを示している。しかし、一部の細胞においてはナノシリカの暴露というストレスが生じた際、オートファジーが誘導され、細胞生存に役立っていると考えられる。

2. オートファジーの有無がナノ金粒子やナノ銀粒子による細胞傷害に影響を与えるか否かの検討

ナノ金粒子は、いずれのサイズでも MEF 細胞、HEK293 細胞、HTR8 細胞の細胞傷害に差を与えず、細胞内の nAu10、nAu50、nAu90 は、ともにオートファジー欠損株と WT 株との間に差を認めなかった。

また、nAg5、nAg10、nAg50、nAg100 はこれらの 3 つの細胞株 (WT 株、オートファジー欠損株とも) の生存率に影響しなかった。

E. 結論

ナノマテリアルの種類やサイズの違いにより、細胞に与える傷害が異なるが、一部の細胞ではオートファジーにより細胞内のナノシリカが減少し、細胞生存率が向上することが判った。今後、オートファジーがどのような機序で細胞内のナノシリカ量を減少させたのかを検討する。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

1. 該当なし

【総説・その他】

1. Saito S, Nakashima A. A review of the mechanism for poor placentation in early-onset preeclampsia; the role of autophagy in trophoblast invasion and vascular remodeling. J Reprod Immunol. 2014; 101-102: 80-88.

2. Saito S, Nakashima A. Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia. *Placenta*,2013; 27:S79-S84.
3. 中島彰俊, 齋藤滋. 絨毛外栄養膜細胞のオートファジー抑制を介した妊娠高血圧症候群発症への関与. *産婦人科の実際*. 2013; 62: 1057-1063.
4. 齋藤 滋, 中島彰俊. 妊娠高血圧症候群の病態, 着床の適応不全説. *血圧*. 2013 ; 20:665-670.
5. 齋藤 滋. 2013,6,9, 新潟.
9. 齋藤 滋. 早産に関する最近の話題. 千葉県産科婦人科医学会平成 25 年度学術講演会; 2013,5,18, 千葉.
10. 齋藤 滋. 日本人における妊娠 34 週未満, 37 週未満の早産リスク因子の解析 ~厚生労働研究(多施設共同前方視的早産研究)からの解析~. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 高得点演題 14 <周産期医学 5>; 2013,5,8-12, 札幌.
11. 齋藤 滋. 感染/炎症と早産との関連についての最新知見. 第 65 回日本産科婦人科学会学術講演会 ランチョンセミナー; 2013, 5,8-12, 札幌.

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

【国内学会発表 : 合計 11 件】

1. 齋藤 滋: 子宮内炎症、感染の有無からみた早産予後と管理. 第 216 回三水会; 2014,2,19,鹿児島.(招待講演)
2. 齋藤 滋: 不育症の基礎知識~不育の現状と課題~. 母子保健指導者研修会; 2014,1,28, 大阪.
3. 齋藤 滋. フラジール錠の細菌性膣症適応追加を受けて. 日本性感染症学会第 26 回学術大会; 2013,11,16, 岐阜.
4. 齋藤 滋. 不育症治療 Up-To-Date. 第 20 回三重県生涯教育特別研修セミナー; 2013 ,11,15, 桑名.
5. 齋藤 滋. 免疫から見た妊娠維持機構とその破綻 .Expert Interactions in Clinical Intelligence (EICI); 2013,7,27, 名古屋.
6. 齋藤 滋. 早産の病態を考える! - 膣内細菌叢と腸内細菌叢の変化について. 第 65 回日本周産期・新生児医学会学術集会 ランチョンセミナー; 2013,7,15, 横浜.
7. 齋藤 滋. 不育症 Up-to-Date. 東部産婦人科医会講演会; 2013,6,28, 沼津.
8. 齋藤 滋. 不育症治療 Up-To-Date. 第 41 回北陸産科婦人科学会 ランチョンセミナー;

【国際学会発表 : 合計 0 件】

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

研究協力者

中島彰俊、島 友子、米澤理可、稲田貢三子、鮫島 梓

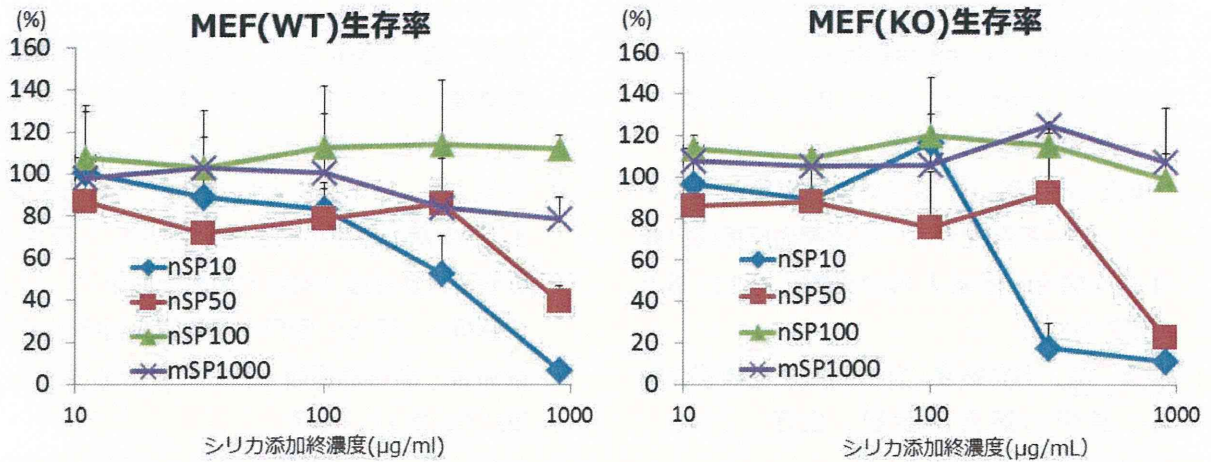


図 1. MEF 細胞を 96 穴プレートに播種した後、各粒子径のシリカ粒子を 24 時間添加した。その後、WST 法を用いて、細胞傷害性を検討した。

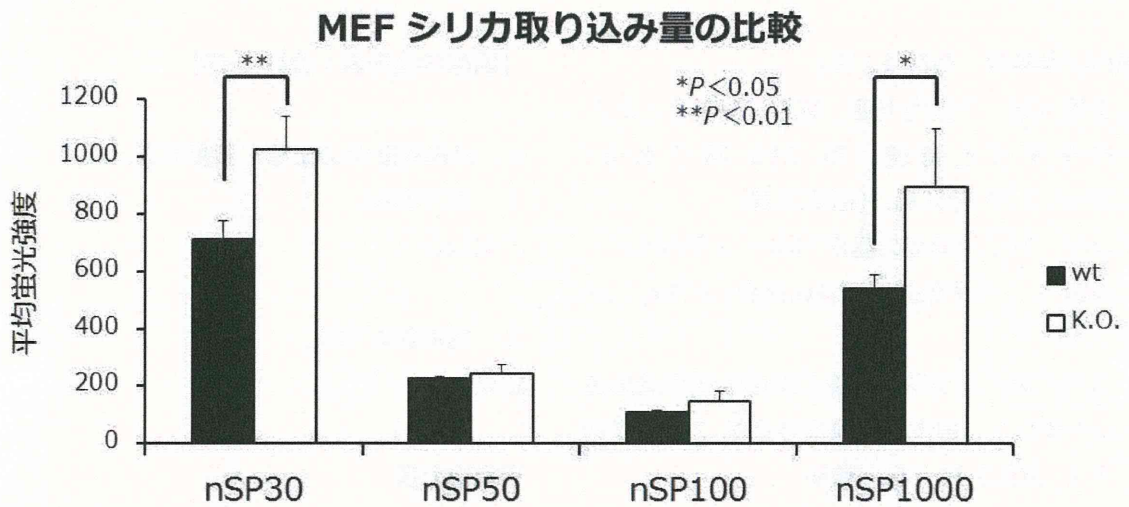


図 2. MEF 細胞を 96 穴プレートに播種した後、各粒子径の蛍光修飾シリカ粒子を 6 時間添加した。その後、フローサイトメトリーを用いて、細胞内シリカ量を算出した。

乳幼仔・小児・成熟個体におけるナノ・サブナノ素材の情動・認知行動毒性学的 評価基盤の確立とその評価

研究分担者 宮川 剛 私立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・サブナノ素材が生産され、一般消費者向けの製品に使用されている。これらの素材は皮膚や粘膜などから体内に吸収されると血液-脳関門を通過して脳に移行・蓄積することから、ナノ・サブナノ素材への曝露は脳機能に何らかの悪影響を及ぼす可能性があることが指摘されてきた。しかしながら、脳神経系の発達に重要な乳幼児期におけるナノ・サブナノ素材への曝露が、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これまで不明であった。そこで、本研究では、実験動物であるマウスを用いて、乳幼仔期における母乳を介したサブナノ素材曝露が成長後の脳機能に及ぼす影響を評価した。具体的には、直径 10nm のサブナノ銀 (snAg10) あるいは銀イオン (Ag^+) を授乳中の母親マウスに経口から摂取させ (摂取量、0.1 mg/kg/day あるいは 0.5 mg/kg/day)、その母親に養育された仔マウスの成長後の行動を網羅的行動テストバッテリーにより解析した。網羅的行動テストバッテリーには、マウスの全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。行動解析の結果、乳幼仔期にサブナノ銀および銀イオンに曝露された仔マウスの行動には、統制群の行動と比較して、いずれの行動テストにおいても統計的に有意な違いが認められなかった。これらの結果は、今回検討を行ったサブナノ素材の種類および摂取量では仔の脳機能に影響を与えないことを示唆している。今後は、今回検討していなかった行動項目について解析を行うとともに、サブナノ素材の摂取量や摂取方法を比較検討しながら、ナノ・サブナノ素材が脳機能に及ぼす影響を明らかにする必要がある。

A. 研究目的

脳神経系は胎生期から乳幼児期にかけて急速に発達するが、この時期に母体を介して間接的に脳内に流入する物質は脳神経系に作用し、脳機能に長期的な影響を及ぼす可能性がある。近年、様々なナノ・サブナノ素材が生産され、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・乳幼児期にナノ・サブナノ素材に曝露されることが脳機能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。そこで、我々はこれまでに、実験動物のマウスを用いて、妊娠期のナノ・サブナノ素材曝露 (非晶質ナノシリカ (nSP70) あるいはサブナノ白金 (snPt1、snPt8)) が次世代の脳機能の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評価してきた。その結果、胎生期のナノ・サブナノ素材曝露が成長後の不安様行動やうつ様行動、社会的行動などに影響を及ぼすことを明らかにした。本研究では、曝露する素材の種類や曝露時期の違いの影響を明らかにすることを目的に、乳幼仔期のサブナノ素材 (サブナノ銀 (snAg10) あるいは銀イオン (Ag^+)) 曝露が成長後の行動にどのような影響を及ぼすのかについて解析した。

B. 研究方法

1. 被験体

BALB/c 系統の授乳中の母親マウスとその仔である雄マウスを被験体として使用した。授乳中の

母マウスには、出産日を0日目として、産後20日目までの21日間、直径10nmのサブナノ銀（snAg10）あるいは銀イオン（Ag⁺）が溶解した液を水瓶から自由飲水により摂取させた。摂取量は、1日あたり0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kgになるように調整した。統制群には、通常の飲用水を与えた。雄の子は21日齢で離乳した後、1ケージあたり4匹で集団飼育した。仔が10週齢になってから、以下の網羅的行動テストバッテリーにより行動を評価した。

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。網羅的行動テストバッテリーは、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）、聴覚性驚愕反応テスト（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）、ポーソルト強制水泳テスト（うつ様行動の評価）、尾懸垂テスト（うつ様行動の評価）、歩行解析（歩行機能の評価）、Y字迷路テスト（作業記憶、固執傾向の評価）から構成されていた。

C. 研究結果（次項Dにまとめて記載する）

D. 考察

乳幼仔期に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオンに曝露された雄の子は、通常の飲用水により飼育された母親マウスに授乳された統制群の子と比較して、成長後の身体的特徴ならびに行動的特徴に統計的に有意な違いは認められなかった。具体的には、体重、体温、握力、筋力（図

1）、不安様行動および活動性（図2、3、4）、痛覚感受性（図5）、運動能力・運動学習能力（図5）、聴覚性驚愕反応およびプレパルス抑制（図6）、歩行機能（図7）、社会的行動（図8、図9）、うつ様行動（図10）、作業記憶および固執傾向（図11）の全ての項目において、サブナノ銀あるいは銀イオン曝露群と統制群の間に有意差はなかった。これらの結果は、BALB/c系統の雄マウスにおいて、出生から生後3週齢までの乳幼仔期に1日あたり0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kgのサブナノ銀あるいは銀イオンへ曝露は成長後の脳機能に影響を及ぼすものではないことを示唆している。

E. 結論

本研究では、これまでナノ・サブナノ素材の安全性評価研究において手つかずであった乳幼仔期でのナノ・サブナノ素材曝露が次世代の情動・認知機能に及ぼす影響について評価した。今回、サブナノ素材の1つであるサブナノ銀あるいは銀イオンを乳幼仔期のマウスに曝露したが、そのマウスの成長後の行動はいずれの評価項目においても曝露による影響が認められず、乳汁を介して摂取したサブナノ素材は成長後の脳機能に影響しないことが示唆された。しかしながら、今回の結果は、サブナノ素材の摂取量が行動変化を引き起こすには十分ではなかった可能性や、元々不安傾向が高く、学習・記憶機能が低いBALB/c系統において情動・認知機能に対する毒性を評価することは困難であった可能性があるという点を考慮する必要があると考えられる。今後は、曝露時期、曝露期間、曝露量、被験体の系統、実験手続きなどを考慮し、どの発達時期にどの程度のナノ・サブナノ素材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だろう。また、近年、雄親に対する環境因子曝露が次世代に影響を与えることが報告されているが、雄親を介したナノ・サブナノ素材曝露が次世代の行動発達に及ぼす影響について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：合計1件】

1. 宮川 剛：網羅的行動テストバッテリーを用いた中枢神経系副作用の検出へのアプローチ., 第5回 日本安全性薬理研究会 学術年会「安全性薬理研究に有用な中枢神経関連研究」, 東京, 2014年2月.

【国内学会発表：合計2件】

1. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 高雄啓三, 吉岡靖雄, 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, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央：非晶質ナノシリカの妊娠期曝露が子の情動機能へ及ぼす影響探索., 第40回日本毒性学会学術年会., 千葉（千葉）, 2013年6月.
2. 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, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央：妊娠期の非晶質ナノシリカ曝露が次世代の情動機能へ及ぼす影響探索., 第36回日本神経科学大会., 京都（京都）, 2013年6月.

【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）

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・特任専門員）

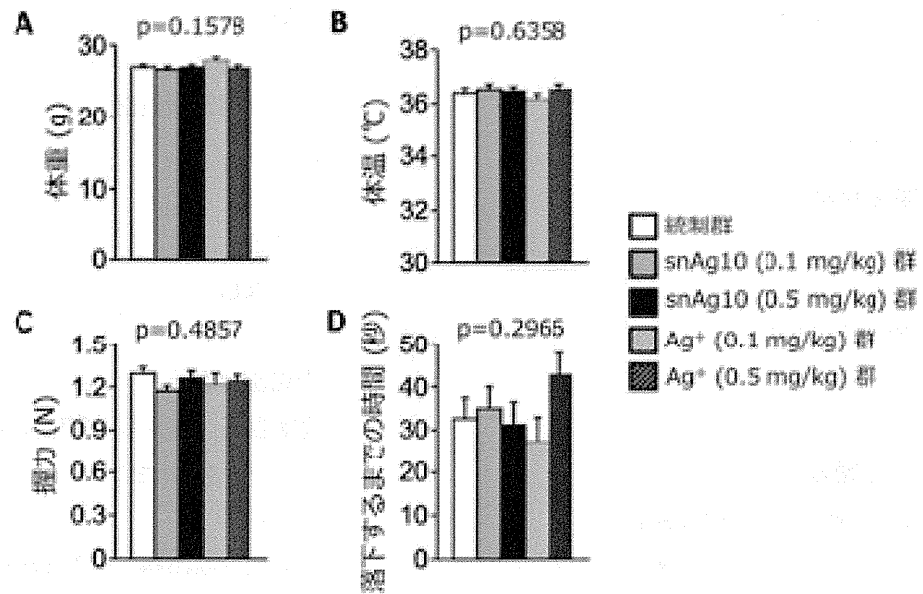


図1. 全般的健康状態および神経学的検査。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後の(A)体重、(B)体温、(C)握力、(D)金網から落下するまでの時間(筋力の指標)を測定した(各群、n=16-20)。

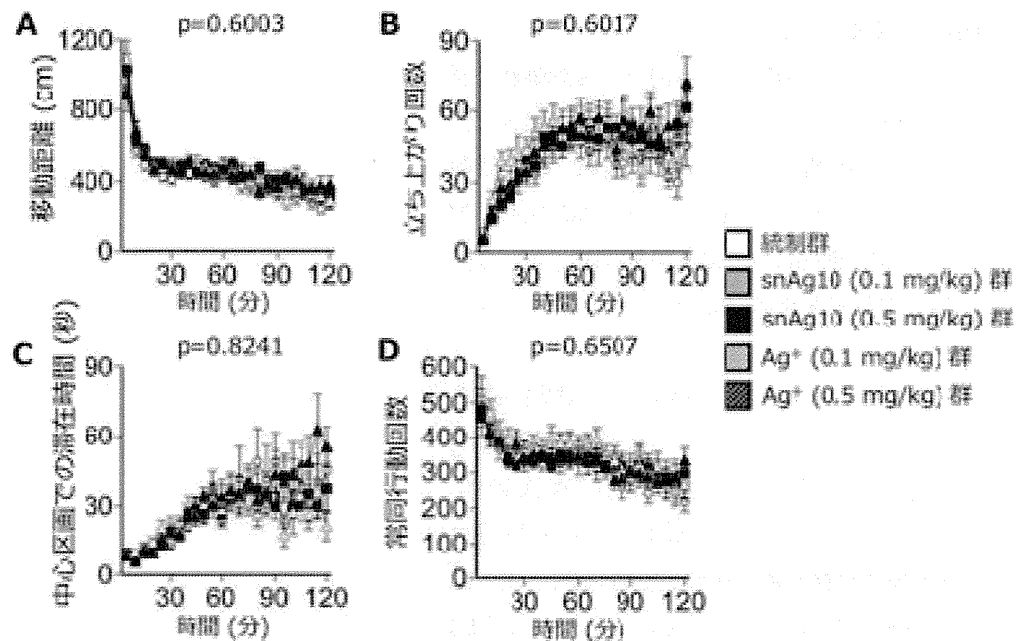


図2. オープンフィールドテストによる不安様行動および活動性の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後のオープンフィールドテストにおける(A)移動距離、(B)立ち上がり回数、(C)中心区画での滞在時間、(D)常同行動の回数を測定した(各群、n=16-20)。

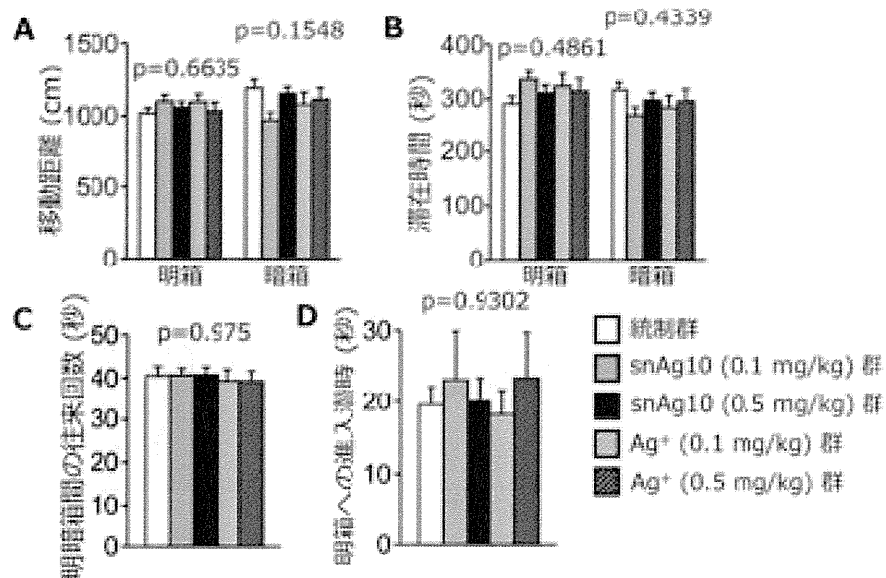


図3. 明暗選択テストによる不安様行動および活動性の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後の明暗選択テストにおける(A)移動距離、(B)明暗箱での滞在時間、(C)明暗箱間の往來回数、(D)明箱に入るまでの遅延を測定した(各群、n=16-20)。

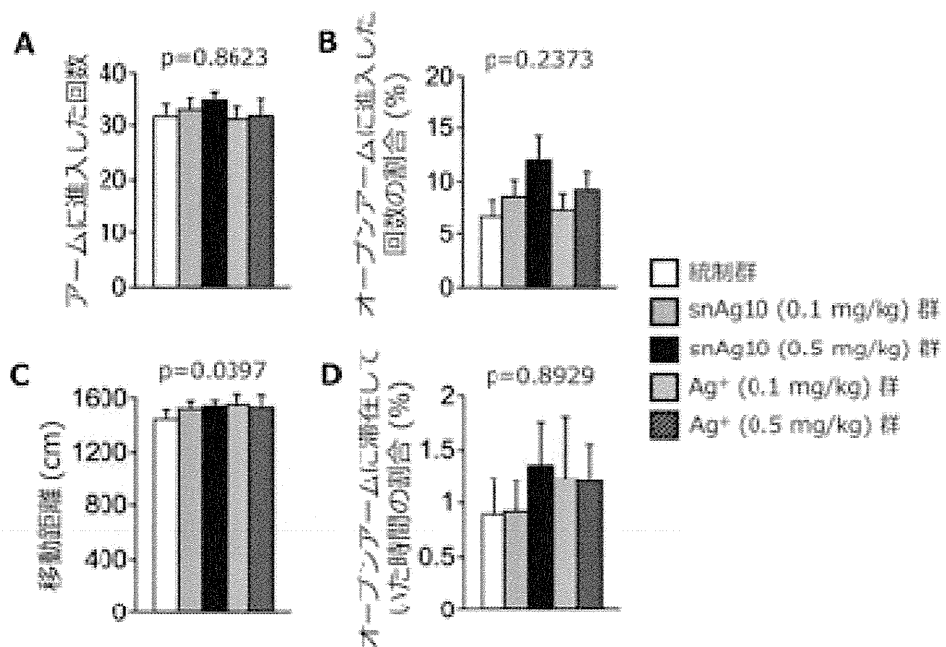


図4. 高架式十字迷宮テストによる不安様行動および活動性の評価。乳幼仔期（生後3週間）に母乳を介してサブナノ銀あるいは銀イオン（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）を摂取したBALB/c系の雄の成長後の高架式十字迷宮テストにおける(A)アームに進入した回数、(B)オープンアームに進入した回数の割合、(C)移動距離、(D)オープンアームに滞在していた時間の割合を測定した(各群、n=16-20)。