

201428009A

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝
露後のナノ・サブナノ素材の挙動解析とハ
ザード情報集積
(ナノリスク解析基盤の構築)**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

**脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝露後のナノ・サブナノ素材の挙動解析とハザード情報集積
(ナノリスク解析基盤の構築)**

平成 26 年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 堤 康央

平成 27 (2015) 年 5 月

目 次

I. 研究報告	
1. ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性 -----	1
大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野	研究代表者 堤 康央
2. ナノ・サブナノ素材の臓器毒性における閾値追求 -----	63
大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野	研究分担者 八木清仁
3. 乳幼仔・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 -----	71
大阪大学大学院薬学研究科 薬物治療学分野	研究分担者 松田敏夫
4. ナノ・サブナノ素材の胎盤動態および胎盤/胎仔毒性評価 -----	79
富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学教室	研究分担者 齋藤 滋
5. 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 -----	85
藤田保健衛生大学総合医科学研究所	研究分担者 宮川 剛
6. ナノ・サブナノ素材の一般毒性・免疫毒性評価とインターラボ間バリデーション評価 -----	91
(財)食品薬品安全センター 秦野研究所 毒性部	研究分担者 桑形麻樹子
II. 研究成果の刊行に関する一覧表 -----	107
III. 研究成果の刊行物・別刷 -----	109

ナノ・サブナノ素材の経皮・吸入曝露実態の定量解析および一般毒性・ 免疫毒性・臓器毒性・生殖発生毒性

研究代表者 堤 康央 大阪大学大学院薬学研究科 毒性学分野

研究要旨

近年、ナノ素材 (ナノマテリアル [NM]: 粒子径 100 nm 以下) に加え、蛋白質と同等サイズ領域のサブナノ素材 (サブナノマテリアル [sNM]: 1~10 nm 範囲) が開発・実用化され、我々は、NM・sNM の意図的・非意図的な経皮・吸入曝露をもはや避け得ない。一方で未だ、NM・sNM の安全性については、ハザード情報でさえ不十分であり、リスク解析に必須の曝露実態 (動態 [ADME]: 吸収性、その後の分布、代謝、蓄積・排泄といった細胞内・体内挙動) 情報に至っては皆無に等しい。この点で申請者らは、種々NM・sNM の物性・品質を解析すると共に、リスク解析基盤となる細胞内・体内動態と一般毒性・特殊毒性を定性・定量解析し、物性-動態-安全性の連関評価に資するナノ安全科学 (Nano-Safety Science) 研究を推進してきた。特に、NM・sNM が流産や胎仔発育不全など、発生毒性を呈し得ることを先駆けて明らかとしており、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に対して脆弱な個体を対象として、個々の感受性や種々相互作用を考慮した安全性評価が必須であることを提示してきた。そこで当該申請研究では、申請者らの独自かつ唯一の知見を基盤として、化粧品・食品などに含有されている NM・sNM、中でも世界的に観ても手つかずの sNM に着目し、脆弱な個体をも対象とした、経皮・吸入曝露後の挙動解析とハザード情報の集積を図り、ナノリスク解析基盤の構築を図る。平成 26 年度研究では、ナノ・サブナノシリカ、ナノ・サブナノ銀を用い、①サブナノ銀が、経鼻投与後に嗅球を介して脳に移行し得ること、またサブナノ銀の曝露が嗅覚の調節機能をもつ神経細胞マーカーや神経伝達物質の変動を伴わない嗅覚過敏を誘発する可能性を見出した。②ナノ・サブナノシリカの急性毒性について、致死毒性や血小板数の減少、肝障害などは、サイズの減少に伴い作用が強くなる一方で、体温低下は、50 nm がピークとなることを見出した。③ナノシリカの反復投与により、その後の過剰量投与に伴う体温低下が悪化することを見出し、反復投与によりナノシリカに対する感受性が高まる可能性があり、新たな安全性評価の視点が必要と考えられた。④サブナノ銀を母体に静脈内・経口投与した場合、投与量の約 1% (静脈内投与の場合) が母乳に移行すること、⑤静脈内・経口投与といった母体への投与経路の違いや、授乳期の違いにより、サブナノ銀の母体血中から母乳への移行率が大きく異なり、曝露経路毎や曝露時期毎のハザード解析が必須であること、⑥母体のサブナノ銀曝露により、母乳を介して乳幼仔に移行すること、⑦乳幼仔の肝臓ではサブナノ銀が排泄されるものの、脳では排泄されにくく蓄積されること、⑧母乳を介したサブナノ銀の曝露により、乳幼仔の脳にサブナノ銀が蓄積されるものの、13 種類の網羅的行動テストバッテリーでは、情動認知行動には影響をおよぼさないことなど、脆弱な個体を対象とした動態・ハザードを明らかとし、次世代への閾値を明確にした。さらに、⑨ナノシリカの雄親曝露により、次世代の子の不安様行動が低下するなど、認知異常が誘発される可能性を先駆けて見出し、母親のみならず父親曝露における次世代影響評価の必要性を提唱した。また、⑩サブナノ銀の経皮曝露により、銀に対する Th17 性の獲得免疫が誘導されることを見出し、金属アレルギーの発症要因として、イオンではなく、sNM を考慮した検討が必須であることを先駆けて提唱した。特に、「こどものナノ安全科学」や「こころのナノ安全科学」における新規知見を多く見出し、平成 26 年 10 月 20 日(月)に厚労省で開催されたナノ研究者意見交換会でも話題になっ

たように、動物実験で NM・sNM の未知影響を追跡した点での貢献が極めて大であるなど、当初予定を上回った成果が得られている。

A. 研究目的

近年、本邦を始めとする多くの先進諸国で、流産・超早産・先天異常が飛躍的に増加すると共に、超未熟児として産まれた乳幼児の多くに、自閉症や多動症といった「こころ」の発達障害や、メタボリックシンドロームなどの代謝障害が後天的に頻発するなど、少子高齢化社会の大きな社会問題となっている。本観点から、妊婦・胎児・乳幼児といった化学物質に高感受性の集団に対する安全性評価の重要性が世界的に指摘されており、化学物質の次世代影響に関する疫学研究である、「子供の健康と環境に関する疫学調査」、所謂、エコチル調査と共に、化学物質の発生毒性が動物実験により多く検討されている。一方で、ナノ素材（ナノマテリアル [NM]：粒子径 100 nm 以下）、サブナノ素材（サブナノマテリアル [sNM]：1~10 nm 範囲）の発生毒性に関する知見は、ディーゼル粒子などを例外に、申請者らのグループが推進しているにすぎず、まさに世界を牽引している。即ち、感受性の違いを考慮したリスク管理を実現するためにも、「こどものナノ安全科学」とも言うべき、妊婦・胎児・乳幼児に焦点を絞った、NM・sNM の発生毒性・次世代影響に関する科学的根拠・情報の収集と、そのリスク評価はまさに緊急の課題と位置付けられている。さらに世界保健機構（WHO）は、上述した「こころ」の発達障害の増加も相俟って、2020 年には鬱病が罹患疾患の第 2 位になると予測している。近年の疫学調査からも、妊娠期・乳児期の化学物質曝露が、次世代の情動・認知機能異常を誘発することは明確であり、NM・sNM 曝露と情動・認知機能異常の因果関係の解明を目指した「こころのナノ安全科学」の推進が強く求められている。本観点から申請者はこれまでに、sNM にも先駆けて注目し、経皮・吸入（経鼻【経口腔・経気道を含む】）・経口曝露後の定性・定量的な動態情報を先駆けて

収集すると共に、脆弱な個体に対する影響を含め、他に類を見ないハザード情報の収集による閾値探求を図るなど、ナノ安全性研究において国内外を問わずパイオニアとなっている。以上の研究基盤を礎にして、当該申請研究では、化粧品などに含有されている NM・sNM（特に sNM）の、妊婦・胎児・乳幼児といった脆弱な個体をも対象としたナノリスク解析基盤の構築を目的に、物性・品質（粒子径・形状・表面性状・分散/凝集状態など）や、曝露経路毎の体内動態・ハザードの違いを考慮しつつ、①胎盤・胎仔・母乳・乳幼仔などへの分布・蓄積や、排泄・分解をも含めた、経皮・吸入曝露実態（動態）を定量解析すると共に、②一般毒性や免疫毒性（金属系 NM・sNM が金属アレルギーの発症要因になる可能性を我々が初めて観察）といった特殊毒性は勿論のこと、次世代影響評価や情動・認知行動解析による、「こどものナノ安全科学」・「こころのナノ安全科学」とも言うべきハザード情報集積基盤手法を開発し、NM・sNM の物性・品質-動態-生体影響との関連追求・閾値追求を図るものである。

B. 研究方法

1. ナノ・サブナノマテリアル

非晶質シリカは Micromod Partikeltechnologie 社（Germany）より購入した。ナノシリカは、一次粒子径が 100 nm（nSP100、濃度：50 mg/ mL）、70 nm（nSP70、濃度：25 mg/ mL）、50 nm（nSP50、濃度：25 mg/ mL）、30 nm（nSP30、濃度：25 mg/ mL）、10 nm（nSP10、濃度：25 mg/ mL）のものを使用した。また対照として、1000 nm（mSP1000、濃度：50 mg/ mL）、300 nm（nSP300、濃度：50 mg/ mL）のサブミクロンサイズ以上の従来型シリカを用いた。ナノ銀粒子は、nano Composix 社（San Diego, CA）より購入した。銀粒子は、表面をクエン酸修飾

した、粒子径が 10 nm (nAg10、濃度 1.0 mg/mL)、50 nm (nAg50、濃度 1.2 mg/mL)、100 nm (nAg100、濃度 1.0 mg/mL) のものを使用した。さらに、銀粒子分散液中に含まれる銀イオンの影響を加味するため、銀イオンとして、硝酸銀 (Sigma-Aldrich; St. Louis, MO) を用いた。なお、以後の検討では、使用直前に粒子分散液を 1 分間ボルテックスミキサーで攪拌した。非晶質ナノシリカについては、ULTRASONIC CLEANER SINGLE FREQUENCY (AS ONE) による 5 分間の超音波処理も実施した。

2. 実験動物

BALB/c マウス (6-8 週齢、雌性および雄性)、雌性 BALB/c マウス (11-13 週齢、妊娠 13-16 日)、C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性)、C3H/HeN マウス (6 週齢、雄性) は、日本 SLC より購入した。午前 8 時に点灯し午後 8 時に消灯、もしくは午前 7 時に点灯し午後 9 時に消灯の部屋で自由飲水、自由給餌の環境で飼育した。また、本節における動物実験の飼育および実験は、大阪大学大学院薬学研究科、医薬基盤研究所において行い、各機関の動物実験規定に準じた。

3. sNM の経鼻投与後の脳への移行性

C57BL6/J マウス (8 週齢、雄性) に nAg10 を最大 28 日まで連日経鼻投与した。最終投与 24 時間後に、各脳領域 (嗅球、黒質、線条体、小脳、その他) における銀量を誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) により定量解析した。

4. Western Blot による嗅球中の神経マーカーの発現評価

マウスに nAg10 または Ag+ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。摘出した嗅球サンプルは、lysis buffer (50 mM Tris-HCl、pH7.5、5mM EDTA-2Na、120 mM NaCl、1% Triton X-100、

Halt Protease and Phosphatase Inhibitor Cocktail (Thermo Fisher Scientific; Hudson, NH, USA) 含有) を添加した後、パワーホモジナイザー (AS ONE; Osaka, Japan) によりホモジネートし、10000 × g、5 分間の遠心操作を行うことでタンパク質を回収した。各サンプル 10 μg と 5% 2-mercaptoethanol (Nacal Tesque; Kyoto, Japan) 含有 Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad Laboratories; Hercules, CA, USA) を等量混合し、95°C で 5 分処理した後、各サンプルを 10-20% e-PAGEL (Atto; Tokyo, Japan) に添加した。Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) は、ゲル 1 枚当たり 14 mA で 10 分間電気泳動した後、40 mA の定電流で 1 時間電気泳動した。電気泳動後のゲルを PVDF 膜 (Millipore; Billerica, MA, USA) に、ゲル 1 枚当たり 50 mA の定電流で 1.5 時間転写し、1% BSA/PBST (0.1% Tween 20 を含む PBS) を添加して一晩ブロッキングした。1% BSA/PBST で 1000 倍希釈した anti-tyrosine hydroxylase antibody (Millipore) を添加し、緩やかに振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。PBST で洗浄後、1% BSA/PBST で 50000 倍希釈した anti-rabbit IgG antibody, peroxidase conjugated (Millipore) を添加し、振とうさせながら室温で 1 時間反応させた。洗浄後、PVDF 膜を SuperSignal West Femto Maximum Sensitivity Substrate (Thermo Fisher Scientific) で処理し、発光像を ImageQuant LAS 4000mini (GE Healthcare; Little Chalfont, Buckinghamshire, UK) により撮影した。さらに、Image J (National Institutes of Health; Bethesda, Maryland, USA) を用い、Tyrosine hydroxylase、および、β-Actin のバンド強度を解析し、Tyrosine hydroxylase のバンド強度を β-Actin のバンド強度で標準化することで、Tyrosine

hydroxylase の発現量を半定量化した。また、Olfactory marker protein の発現評価には、一次抗体として 10000 倍希釈した anti-olfactory marker protein (Wako; Osaka, Japan)、二次抗体として 20000 倍希釈した anti-goat IgG antibody, peroxidase conjugated (Abbiotec; San Diego, CA, USA)、Glutamate decarboxylase の発現評価には、一次抗体として 5000 倍希釈した anti-glutamate decarboxylase (Millipore)、二次抗体として 50000 倍希釈した anti-mice IgG antibody, peroxidase conjugated (Millipore) を使用し、同様の操作を実施した。

5. HPLC による神経伝達物質の測定

マウスに nAg10 または Ag+ を最大 28 日まで連日経鼻投与し、最終投与 24 時間後に、嗅球を摘出した。摘出した嗅球サンプルは、homogenize buffer (0.2 M 過塩素酸、0.1 mM EDTA-2Na、内標準 ; 0.2 µg/mL イソプロテレノール) 400 µL を添加した後、パワーホモジナイザー (AS ONE; Osaka, Japan) によりホモジネートし、氷上にて 30 分静置の後、15 分間の遠心操作 (15000 rpm, 0°C、) を行った。上清を 300 µL 回収後、1 M 酢酸ナトリウム 35 µL と混合し、PVDF シリンジフィルター (0.22 µm pores ; Millipore) で濾過した。濾過したサンプルを HPLC-ECD システム (HTEC-500; Eicom; Kyoto, Japan) によって測定した。なお、分析カラムは Eicompak SC-5 ODS (3.0 mm inner diameter, 150 mm long; Eicom) を用い、流速は 0.5 mL/min に設定した。移動相には、11.8% (vol/vol) メタノール、170 mg/L 1-オクタンスルホン酸ナトリウム、5 mg/L EDTA-2Na を含んだ 88 mM 酢酸-クエン酸溶液を使用した。

6. 嗅覚試験 (buried food test)

試験の 3 日前から、マウスを飼育しているケージ内にクッキー (エントリー; Nabisco; Fair Lawn, NJ, USA) を設置した。試験の 18-24 時間前の時点で、ケージから餌とクッキーを取り除いた。試験開始の 30 分前に飼育室から実験室に移し、20 分間馴化させた。20 分後、試験用のケージ (testing cage) にマウスを移し、5 分間ケージ内で馴化させた。5 分後に temporary holding cage にマウスを移した後に、クッキーを testing cage 内の床敷きの表面から 1.5 cm 程度のところに隠した。マウスを temporary holding cage から testing cage に再び戻し、マウスがクッキーを発見するまでの時間を最大 900 秒まで測定した。900 秒の間に餌を発見できなかったマウスがいた場合には、発見した時間を 900 秒として記録し、データを解析した。なお、マウスのクッキーへの馴化は、連続経鼻投与 25 日目から 27 日目までの 3 日間行い、連日投与 28 日目終了の 18-24 時間後の時点で buried food test を実施した。

7. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価

C3H/HeN マウス (雄性、6 週齢) に nSP50 を週 1 回、計 4 週に渡って耳介部皮内へ事前投与した。次に、最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した。投与直後から 15 分毎に直腸体温を測定すると共に、投与 4 時間後に血液を回収し、血球検査・血液生化学検査に供した。

8. ナノ銀を連日曝露した際の安全性評価

A549 細胞に、nAg10、nAg50、nAg100 を添加し、24、48、72 時間培養後、ELISA により上清中の IL-8 量を解析した。さらに、nAg10 を 48 時間まで曝露させた後、その後 24 時間 nAg10 を含まない培地で培養した際の IL-8 産生量を ELISA により測定した。また、細胞内への銀の移行量を、ICP-MS により定量した。

9. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価

C3H/HeN マウス（雄性、6 週齢）に nSP50 を週 1 回、計 4 週に渡って耳介部皮内へ事前投与した。次に、最終投与の 1 週間後、nSP50 を尾静脈より投与した。投与直後から 15 分毎に直腸体温を測定すると共に、投与 4 時間後に血液を回収し、血球検査・血液生化学検査に供した。

10. 母乳の回収

母マウスと乳幼仔を、別々のケージに互いの姿が見えるよう 5 時間以上隔離した。隔離時間は母乳の再吸収が始まる 16 時間までとした。母体に 1.8 U/mouse のオキシトシンを皮下投与した。投与後、直ちに実験動物用搾乳装置（Breast pump WAT-2006, Little Leonardo, Tokyo, Japan）を用いて、乳頭より搾乳した。100 μ L の母乳を 2000xg、4°C、15 分間遠心して得られた上清を、蒸留水で 10 倍希釈した後、フィルター（Acrodisc Versapor 5 μ m, Pall Corporation, NY, USA）にかかけ、乳清を回収した。遠心後に沈降した細胞に PBS を加えて再懸濁し、再度遠心して上清を破棄する洗浄操作を 2 回繰り返した後、PBS100 μ L に懸濁し母乳中細胞を回収した。

11. ICP-MS による測定

Ag 量は ICP-MS 装置（Agilent 7700 Series ICP-MS、Agilent Technologies、Tokyo、Japan）を用いて測定した。分析条件は、RF パワー：1500W、キャリアガス：アルゴン 1.05 L/min、とし、測定質量数は 107Ag、197Au、103Rh、205Tl とした。各検体には、内標準として 103Rh（107Ag に対する内標準）、205Tl（197Au に対する内標準）を 2 ng/mL となるように添加し、ICP-MS による測定に供した。また、6～10 点の既知濃度の Ag 溶液を作成し、

検量線溶液として用いた。定量下限以下の値となった検体は濃度を 0 ng/mL とした。母乳中細胞層の銀濃度については、細胞を 100 μ L の PBS で懸濁した液について銀濃度を測定すると共に、同懸濁液中の細胞数を Nucleocounter（ChemoMetec, Allerod, Denmark）にて測定し、細胞 1 つ当たりの銀量を算出した。

12. ICP-MS に供す検体の調製

粒子溶液は 10%硝酸で希釈したものを検体とした。銀投与群、もしくは銀添加群の母乳はまず、蒸留水で 50 倍希釈した。血液、乳清、母乳中細胞、もしくは 50 倍希釈された銀投与群の母乳は希釈液（70 mM アンモニア、1 μ M エチレンジアミン四酢酸、0.007 % Triton X-100）にて、さらに 100 倍以上希釈し、検体とした。上記の手順で調製した各検体について、0.02 ng/mL を定量下限値として Ag 濃度を ICP-MS により定量した。

13. 母体への連日経口投与による母乳を介した乳幼仔への影響評価

授乳期マウスに nAg10（0.1、0.5 mg/kg）、AgNO₃（0.1、0.5 mg/kg Ag⁺）、水を出産日 PND0 から離乳 PND20 まで 21 日間連日経口投与し、母乳育児させた。仔の重量を 42 週齢まで測定した。PND21 に離乳させると共に、一部の乳幼仔を解剖し、血液・血漿を回収した。回収した血液・血漿は、血球検査、生化学検査に供した。10 週齢になった時点で生理学研究所の行動実験施設に移し、1 週間の馴化の後、多種の行動試験により、脳機能を網羅的に解析した。全ての行動実験において、実験を行う順番や装置は、群間に偏りが生じないように実施した。

体温測定、ひげ・体毛の状態の確認

体温は、マウスの肛門から直腸へ、小動物用直腸温測定用温度プローブを入れて測定した。ま

た、ひげおよび体毛の状態を、有無、長さ、毛並み等に着目し観察した。

基礎的反射の検討

Righting Reflex (正立反射) は、マウスを仰向けにした際に元の姿勢に戻れば、反応有りとした。Reaching は、マウスの尾を持って逆さに吊るし、マウスの顔を机の角に近づけた際に、マウスが手を机に伸ばせば、反応有りとした。Key Jangling はマウスの近くで鍵束を振って音を立てた際、マウスが音に対して反応する(逃避する等) 一方で、痙攣反応が起こらなければ異常無しとした。

ホットプレートテスト (痛覚感受性の検討)

マウスを 55℃のプレート上を探索させ、熱に対する反応(前脚をこすり合わせる、足を舐める、後退りする、ジャンプする等) を示すまでの時間を記録した。

歩行機能の解析

DigiGait 小動物用歩行解析システム (DigiGait, Mouse Specifics, Quincy, MA, USA) を用いた。マウスをベルト部分が透明のトレッドミル上に乗せた後、ベルトを 24 cm/sec の速さに加速させ、マウスが歩行する様子をベルト下部に設置したカメラで撮影した。撮影像から各足底の位置及び面積の経時変化を解析し、歩幅 (Stride Length)、立脚位置間の幅 (Stance Width)、制動時間 (Brake Stride、かかとがベルトに着き始めてから、足底面積が最大になるまでの時間)、推進時間 (Propel Stride、ベルトからかかとが離れ始めた時から、つま先がベルトから離れるまでの時間)、遊脚時間 (Swing Stride、足がベルトから離れている時間)、つま先とかかとを結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Paw Angle)、対角線上の足を結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Step Angle) を算出した。

解析にはマウスが 3 秒間以上トレッドミルを走り続けた際の撮影像を使用した。

ローターロッドテスト (協調運動機能の検討)

加速型ローターロッド (UGO Basile Accelerating Rotarod, UGO Basile, Province of Varese, Italy) を使用した。マウスに回転するロッド (直径 3 cm) 上を歩行させ、ロッドから落下するまでの時間を測定した。ロッドの速度は初速 4 rpm で開始し、5 分間で 40 rpm まで徐々に加速させた。1 日に 3 試行ずつ、3 日に渡り試行した。

握力の測定

握力測定器 (O'Hara & Co., Tokyo, Japan) により前肢の握力を測定した。マウスの尾を持って持ち上げた状態で測定器の取手を握らせた。マウスにばねばかりを引かせ、取手を離れた際の目盛を、マウスの前肢の握力として記録した。各マウスにつき 3 回テストを実行し、測定された最大値を記録した。

オープンフィールドテスト (自発運動量の検討)

新奇環境下での自発運動量の測定には、オープンフィールド装置 (Accuscan Instrument, O'H, USA) を用いた。マウスをフィールド (40 × 40 × 30 cm) で 120 分間自由に行動させた。総移動距離、垂直運動の回数、フィールド中央部での滞在時間、及びステレオタイプ行動の回数を VersaMax system (Accuscan Instrument) により記録した。

ホームケージ解析

2 匹のマウスを解析用ケージ (29 × 18 × 12 cm) で 1 週間飼育した際の行動をカメラにより記録した。2 匹のマウスの接触頻度 (接触していれば 1、していなければ 2 と評価)、及び自発運動量を解析した。データの取得と解析には

Image HA ソフトウェアを使用した。解析ケージに入れる 2 匹のマウスは、1) 群が同じ、2) 同じケージにいたことがない、3) 体重の差が 10%以内、であることを満たしていることを条件とした。接触頻度と自発運動量は、解析 3 日目正午から 6 日目正午までの 3 日間分のデータについて、各時刻の平均値をプロットし、グラフ化した。

恐怖条件付け学習

まず、マウスに特定の刺激（条件刺激）と恐怖を関連付けさせた（条件付け）。これは、マウスをテストチャンバー（26×34×29 cm、O'Hara & Co.）に入れ、2 分間自由に探索させた後、55dB の白色雑音を条件刺激として 30 秒間提示し、最後の 2 秒間に床に電気刺激（0.3 mA）を無条件刺激（恐怖刺激）として与えることを行った。上記の条件刺激+無条件刺激は 2 分間隔で計 3 回提示した。文脈記憶能力が高いほど、後日、条件刺激を与えた際に、マウスがより大きな恐怖を感じると考えられる。条件付けでは、マウスのすくみ（Freezing）時間を指標に、マウスが恐怖状態にあることを確認した。文脈記憶の検討は、空間情報と恐怖の関連付けを指標とするもの（試行 1）と、音刺激と恐怖の関連付けを指標とするもの（試行 2）、2 つを実施した。試行 1 では条件付けから 24 時間後に、マウスを条件付けと同じテストチャンバーに 5 分間入れ自由行動させた際の、マウスのすくみ時間の割合、及び移動距離を測定した。試行 2 では、試行 1 終了後に、条件付けに用いたものとは異なるチャンバー（35×35×40 cm）を用いて実施した。マウスをチャンバーに入れ 3 分間自由に探索させた後、条件刺激として用いた 55 dB の白色雑音を 3 分間提示した際の、マウスのすくみ時間の割合、及び移動距離を測定した。また、条件付けから 32 日後に、試行 1、試行 2 を再度実施し、文脈記憶の保持能力を検討した。マウスの行動はカメラに

より記録し、データの取得と解析には Image FZ ソフトウェアを使用した。なお、すくみ反応の検出は画像解析により実施した。1 秒あたり 1 枚の割合で取得する画像に関して、マウスが動いた領域（画素）が、閾値より小さく、2 秒以上続いたとき、すくみ反応と判断した。すくみ反応を判断する閾値は、人間による観測と一致するように決定した。

ワイヤハングテスト

ワイヤハングテスト装置（O'Hara & Co.）を使用した。装置はチャンバー（21.5×22×23 cm）と天井についたワイヤの格子（10×10 cm）から構成される。マウスを格子の上に配置し、ワイヤを握らせた後、格子を逆さにし、落下するまでの時間を記録した。落下するまでの時間は 60 秒を上限とした。

尾懸垂テスト

マウスの尾の先端からおよそ 1 cm を粘着テープで留め、床から 30 cm の高さにぶら下げ、10 分間のマウスの不動率を測定した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image TS ソフトウェアを使用した。

ポーソルト強制水泳テスト

円柱の容器（高さ 20 cm×直径 10 cm）に次亜塩素酸水（23-25 °C）を 8 cm の高さまで満たした。この容器中にマウスを入れ、10 分間のマウスの不動率を測定した。試行は 2 日連続で実施した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image PS ソフトウェアを使用した。

高架式十字型迷路

高架式十字型迷路は、3 mm の高さの柵が有る 2 本のオープンアーム（25×5 cm）と高さ 15 cm の透明な壁で囲まれたクローズドアームから成る装置を用いた。アームは床の上から 55

cm の高さに設置した。マウスを迷路の中央 (5 × 5 cm) に配置し、10 分間の行動を記録した。オープンアームへ進入した割合、オープンアームでの滞在時間、総進入回数、および総移動距離を測定した。マウスの行動はカメラにより記録し、データの取得と解析には Image EP ソフトウェアを使用した。

社会的行動テスト

2 匹のマウスを新奇環境のチャンバー (40 × 40 × 30 cm) の対角線上に配置し、10 分間の行動をカメラにより記録した。総接触時間、総接触回数、接触 1 回あたりの平均時間、アクティブコンタクトの合計時間、総移動距離を測定した。データの取得と解析には Image SI ソフトウェアを使用した。アクティブコンタクトは、マウス同士の接触のうち、接触直前の速度が 10 cm/sec 以上のものと定義した。チャンバーに入れる 2 匹のマウスは、1) 群が同じ、2) 同じケージにいたことがない、3) 体重の差が 10% 以内、であることを満たしていることを条件とした。

聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制の検討

聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制の測定には、驚愕反応測定システム (O'Hara & Co.) を用いた。マウスをプレキシグラス製のシリンダーに入れ、10 分間馴化させた後、測定を開始した。測定中のチャンバー内のバックグラウンドノイズは 70 dB に設定した。驚愕反射を引き起こす刺激は白色雑音を用い、すべての試験において 40 ミリ秒間マウスに与え、600 ミリ秒間の驚愕反射を記録した。試行は 6 つのセッション (2 つの聴覚性驚愕反応と 4 つのプレパルス抑制) から構成された。驚愕刺激の強度は 110 および 120 dB を用いた。プレパルスの強度は 74 および 78 dB を用い、驚愕刺激の 100 ミリ秒前から提示した。プレパルスと驚愕刺激は、74 - 110、78 - 110、74 - 120、および 78 - 120

dB の 4 つの組み合わせを使用した。1 試行にこれら 6 つのセッションをランダムに提示した。また、各セッションの間隔は平均 15 秒 (10 - 20 秒の範囲) とした。驚愕刺激を与えた際のマウスの振幅を測定した。なお、プレパルスを与えた際の聴覚性驚愕反応の抑制率は、「100 × {(プレパルスが無い際の聴覚性驚愕反応) - (プレパルスが有る際の聴覚性驚愕反応)} / (プレパルスの無い際の聴覚性驚愕反応)」により算出した。

14. 雄親を介した次世代影響評価

BALB/c マウス (雄性、10 週齢) に、nSP30 を 1 日おきに 4 回、静脈内投与した。投与開始から 35 日後に、生殖器官の重量を測定すると共に、精巣上体中の精子の生存率を flow cytometry により評価した。また、無処置の BALB/c マウス (雌性、9 週齢) と 4 日間交配させた後に、雌マウスに自然分娩させ、生まれてきた仔を 9 週齢まで飼育し、各種行動試験を実施した。

15. 金属ナノ粒子の感作性評価

銀ナノ粒子 (nAg100、nAg50、nAg10)、あるいはイオン溶液 (0.8 mg metal/mL) を LPS (10 μg/mL) と共に 20 μl/footpad でマウスの足跡に週一回、4 週間皮内投与した (感作投与)。最終投与の一週間後、それぞれの金属溶液 (0.8 mg metal/mL、Ag+ のみ 0.09 mg/mL) 10 μl を右の耳介に、溶媒のみ 10 μl を左の耳介へ皮内投与した (惹起投与)。なお、各投与はペントバルビタールによる麻酔下で実施した。惹起投与直前の耳介の厚さと、惹起後、24、48、72、96 時間後の耳介の厚さは、ダイヤルシクネスゲージ (0.001-mm type; Ozaki Mfg. Co., Tokyo, Japan) により測定した。

16. 銀ナノ粒子の前投与による影響と獲得免

疫応答の関連

nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の一週間後、500 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ で抗 CD4 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2b)、あるいは抗 CD8 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2a) を PBS 溶媒で腹腔内投与した。抗 asialo GM1 ウサギ血清は 50 $\mu\text{l}/\text{mouse}$ で静脈内より投与した。それぞれの試薬は、惹起投与の 24 時間前に実施した。細胞の除去は、flow cytometry 解析 (FACS Fortessa) により確認し、それぞれ惹起 96 時間後の脾細胞中で、CD4⁺細胞あるいは CD8⁺細胞が 95%以上、NK 細胞 (CD3⁻, CD49b⁺ cells) が 約 80% 以上除去されていることを確認している。nAg10 を 4 回感作投与したマウスの心臓から未処理のシリンジを用いて血液を回収し、軽く凝固した時点で一度ゆっくりとよくかき混ぜてから 37°C で一時間静置した。その後、4°C で 5 時間さらに静置した。血液を 5000 g \times 15 min 4°C 条件下で遠心し、その上清を血清として回収した。血清は、2-3 匹分をプールし、未処置の BALB/c マウス(雌性)の 9-10 週齢に、直ちに 500 $\mu\text{L}/\text{mouse}$ で腹腔投与した。24 時間後、血清を移入されたマウスの耳介皮内へ、nAg10 を 10 μL 投与 (0.8mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。nAg10 を 4 回感作投与したマウスの脾臓と膝下リンパ節を回収し、3-4 匹分をプールして、単細胞浮遊液を調製した (単細胞浮遊液の調製は前章までの脾細胞の調製方法に準じた)。CD4⁺T 細胞は非 CD4⁺T 細胞を磁気標識後、磁気カラム内で除去することで精製した (CD4⁺T cell isolation kit; Miltenyi Biotech, Bergisch-Gladbach, Germany)。CD4⁺T 細胞は精製後、PBS に懸濁してすぐに、未処置の BALB/c マウス(雌性)の 9-10 週齢に、 2×10^7 cells/mouse で静脈内より投与した。CD4⁺T 細胞 (CD3⁺, CD4⁺ cells) の精製度は、Flow Cytometer により、95%以

上であることを確認している。CD4⁺T 細胞移入の 24 時間後、耳介皮内に nAg10 を 10 μL 投与 (0.8mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。

17. 銀ナノ粒子誘導性のアレルギー病態を担う免疫応答.

nAg10、あるいは Ag+を、マウスの足蹠に週 1 回、計 4 回投与し、脾細胞を単離した後、nAg10、nAg50、nAg100 あるいは Ag+で再刺激し、その際に産生される IL-17A 産生を評価した。nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の 1 週間後、耳介皮内に nAg10 を 10 mL 投与 (0.8mg/mL) した。投与直後に、抗 IFN-g 中和抗体またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG1) を 500 mg/mouse で腹腔内へ、あるいは、抗 IL-17A 中和抗体、またはアイソタイプコントロール (rat IgG1) を 200 mg/mouse で静脈内より投与した。その後、経時的に耳介の腫れを測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は動物実験を避け得なかったが、動物愛護の精神を遵守しつつ実施した。また実験動物の取り扱い、および動物実験の手順等を含めた動物実験に関しては、「厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針」、「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針 (文科省の指針)」に準拠し、大阪大学および大阪大学薬学研究科、(独) 医薬基盤研究所等の各所属機関の動物実験規程に則り実施した。さらに本研究における実験動物の取り扱いおよび動物実験の手順は、所属機関の動物実験委員会等による倫理審査の承認を受けた。さらに本研究では、ナノマテリアルを活用したが、その安全性は未知であることを鑑み、平成 20 年 2 月、厚生労働省労働基準局より通達された「ナノマテリアル製造・取扱い作業現場における当面のばく露防止の

ための予防的対応について」(基発第 0207004 号)【その後、2009 年 3 月に厚生労働省労働基準局からの改訂版「ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について」(基発第 0331013 号) が通達】、2009 年 3 月に環境省から公表された工業用ナノ材料に関する環境影響防止ガイドラインに則って、研究を推進した。

C. 研究結果(次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. ナノ銀を経鼻曝露した際の脳への移行性

化学物質の吸入・経鼻曝露によるハザードに関しては、外来異物と接触する頻度の高い気管や肺などの呼吸器への影響を中心に研究が行われることが多い。実際に、ナノ粒子の吸入曝露による安全性研究も呼吸器系に関するものが多くを占めている。一方で、化学物質の職業曝露等を対象とした疫学研究によると、化学物質の吸入曝露が呼吸器系のみならず、脳神経系にも悪影響をおよぼし得ることが報告されている。これらの知見は、化学物質を鼻腔から曝露した場合に、血液と脳の間で物質輸送を厳密に制御する血液脳関門を突破しなくとも、嗅神経等を通して脳に直接移行する経路が存在することを示唆している。近年、このような鼻腔を介した脳への輸送経路は鼻腔-脳経路と呼ばれ、化学物質が脳神経系へ悪影響をおよぼすうえで、鼻腔-脳経路の関与が推察されている。即ち、これらの知見は、化学物質の吸入曝露による脳神経系への影響を評価するにあたり、鼻腔-脳経路に着目することの重要性を示すものである。そこで、ナノ粒子の中でも最も多くの用途で利用されている銀ナノ粒子(nAg10)を対象に、nAg10 を用いてマウスに経鼻曝露した場合に、脳に直接的に移行するか評価した。まず、マウスに nAg10 および Ag+ を単回経鼻投与し、様々な脳領域での動態を解析したところ、鼻腔に近い脳領域(嗅球)では銀が検出された

が、鼻腔から遠い脳領域では検出されなかった。この時、嗅球への移行率を算出した結果、nAg10 投与群で 0.0038%、Ag+ 投与群で 0.0086% が移行していることが明らかとなった。また、28 日間連日投与後の移行性を解析した結果、嗅球のみならず、他の脳領域にも到達することが明らかとなった。なお、嗅球中の銀の存在率を算出したところ、総投与量のうち nAg10 投与群で 0.0034%、Ag+ 投与群で 0.0037% が残留しており、ほぼ同量の銀が嗅球に残存していることが示された。一方で、他の部位における銀の存在率は、nAg10 投与群で、総投与量の 0.0002% (黒質)、0.0003% (線条体)、0.0009% (小脳)、0.0044% (その他)であった。また、Ag+ 投与群では、総投与量の 0.0007% (黒質)、0.0014% (線条体)、0.00039% (小脳)、0.00207% (その他)であったことから、nAg10 は、嗅球以外の部分には Ag+ の 1/3 以下しか到達していないことが判明した。嗅球中の銀濃度が他の脳領域と比較して非常に高いことから、少なくとも nAg10、Ag+ のいずれもが鼻腔-脳経路を介して脳の嗅球まで直接的に移行していることが示唆された。嗅球以外の他の脳領域中の銀量は嗅球からの距離に関わらず、ほぼ一定の濃度であり、脳領域で濃度勾配が認められない原因には、嗅球から他の脳領域へ銀が到達する経路以外にも血液から脳への経路が関与している可能性が考えられる。そこで、nAg10 および Ag+ の血液への移行性を評価するため、血液中の銀の濃度を ICP-MS により測定した。解析の結果、nAg10 投与群では、単回経鼻投与後には銀が検出されず、28 日間連日経鼻後に 5.5 ng/mL に増加していた一方で、Ag+ 投与群では、単回経鼻投与後には 9.5 ng/mL、28 日間連日経鼻後に 34.6 ng/mL となることが示された (Figure 1)。これらの結果から、nAg10 投与群の血液中には Ag+ 投与群の 1/6 以下しか存在しないことが示唆され、nAg10 は Ag+ と比較して血

液中に移行しにくい可能性が考えられた。以上の結果を加味すると、嗅球以外の他の脳領域への移行に関しては、nAg10 や Ag+が直接嗅球まで移行した後、他の脳領域に分布する経路以外に、血液を介して脳へ移行する経路の存在も否定できない。

2. ナノ銀粒子を経鼻曝露した際の脳への影響評価

銀の存在量の最も多かった嗅球に焦点を当て、脳神経への影響評価を実施した。nAg10、Ag+曝露による嗅球の脳神経系への影響を評価するために、H25年度に実施したドパミン細胞神経マーカーである Tyrosine hydroxylase (TH)に加え、嗅神経マーカーである Olfactory marker protein (OMP) および、GABA 神経細胞マーカーである Glutamate decarboxylase (GAD) の変動をウエスタンブロットにより評価した。28日間連日曝露の後、嗅球を回収し、嗅球中の3つの神経細胞のマーカーの発現を解析した。その結果、nAg10投与群では対照群と比較して、嗅球中の OMP 量 (Figure 2)、TH 量 (data not shown)、GAD 量 (Figure 3) に有意な変動は認められなかった。一方で、Ag+投与群では、嗅球中の GAD 量には変動はなかったものの、OMP 量が約 30%減少し、TH 量は約 50%の顕著な減少を示した。nAg10、Ag+を28日間、連日経鼻曝露した後、嗅球中の神経伝達物質の1つであるドパミン (DA) と、DA の代謝産物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC)、およびホモバニリン酸 (HVA) の変動を HPLC-ECD 法により測定した。解析の結果、nAg10投与群では、DA、DOPAC、HVA のいずれも対照群と比較して変動は認められないことが明らかとなった。また、Ag+投与群では、DA、DOPAC、HVA のいずれもが 40-60%程度減少しており、嗅球中の TH 量の減少率と相関性があることが確認された (Figure 4)。

そこで次に、nAg10、Ag+曝露による嗅球中の神経マーカーや神経伝達物質の変動が、嗅覚機能にもたらす影響を評価するために、嗅覚機能試験 (buried food test) を実施した。nAg10 および Ag+を28日間連日経鼻投与した時点で試験を実施した結果、Ag+投与群のみならず、nAg10投与群においても、対照群と比較して、ケージ内に隠したクッキーを発見するまでの時間が有意に短くなることが明らかとなった (Figure 5)。すなわち、nAg10、Ag+曝露により、嗅覚過敏が誘発されることが示唆された。嗅球中のドパミンは嗅覚機能を抑制することが報告されているため、Ag+は嗅球中のドパミンを減少させることで、嗅覚過敏を誘発していると考えられる。一方で、nAg10曝露による嗅覚過敏誘導のメカニズムは不明であり、更なる解析が必要と考えられる。

3. ナノ銀粒子を連日曝露した際の安全性評価

NM を曝露する際には、老若男女を問わず、多岐にわたる経路から曝露し続けていることが考えられる。そのため NM の安全性評価を推進するうえで、実際の曝露状況に則した「慢性曝露」に着目した検討が求められる。そこで本検討では、NM・sNM を細胞に連日曝露させ、細胞の起炎性を経時的に評価した。まず、ナノ銀粒子を細胞に連日曝露させた際の、培養上清中に含まれる IL-8 産生量の測定を行った。その結果、ナノ銀粒子の曝露により24時間では未処置群と比較して、変化が認められないものの、48、72時間後においては経時的に IL-8 産生量が上昇することが認められた (Figure 6a)。また、48時間までナノ銀粒子を曝露させ、その後24時間ナノ銀粒子を含まない培地で培養した際においてもナノ銀粒子曝露時と同程度の IL-8 産生が認められた。この時、粒子サイズが小さいほど IL-8 産生量は増加した。一方で、同様の条件で起炎性物質の LPS を曝露した

際には、曝露後 24 時間において L-8 産生が誘導され、LPS を含まない培地に置換したところ速やかに IL-8 産生が収束することが認められた (Figure 6b)。即ち、nAg10 の起炎性が一般の起炎性物質と比較し、遅発的、経時的、かつ、持続的な挙動を示す可能性が示された。次に、細胞内の銀取り込み量を ICP-MS により解析した。その結果、曝露時間の経過に伴い銀取り込み量が増加し、蓄積することが認められた (Figure 7)。以上の結果から、ナノ銀粒子が持続的な炎症応答を誘発すること、ナノ銀粒子が細胞内に移行、蓄積することが持続的な炎症誘発の引き金となる可能性が示された。

4. ナノシリカの急性毒性

ナノシリカの有効かつ安全な利用の促進に向け、より微小サイズの粒子も含めて、その急性毒性とサイズとの連関を精査した。その結果、nSP30~nSP300 の粒子において、およそ 45 分後をピークとする投与量依存的な体温低下が観察された一方で、nSP10 と mSP1000 では体温低下が観察されなかった。また、粒子径毎の体温低下誘導能は、50~1000 nm では粒子径の減少に伴って増強する一方で、30 nm 以下で減弱することが明らかとなった (Figure 8)。また、体温低下の結果とは異なり、過剰量投与による致死毒性は、粒子径の減少に伴って高くなる傾向が示された (Figure 9)。さらに、血球検査・血液生化学検査を行った結果、濃度依存的な血小板数の減少および肝障害マーカーである ALT の増加が観察された。また、これらに関しては生存率と同様に、粒子径の減少に伴って作用が増強されることを明らかとした (Figure 10)。即ち、ナノシリカを静脈内より過剰量投与することで誘導される急性毒性には、致死毒性や血小板数の減少、肝障害のように、サイズ依存的に作用が強くなる毒性がある一方で、体温低下のように、ある特定のサイズにおいてピークを有する毒性も存在すること

が示された。本知見は少なくとも一部のハザードに関し、ナノマテリアルの粒径を厳密に制御することで回避可能であることを示している。

5. ナノシリカの事前反復投与がナノシリカ誘導性の急性毒性に与える影響評価

ナノシリカは食品や化粧品などの製品にも汎用されており、我々が複数回に渡って繰り返し曝露する可能性が考えられる。一方で、ナノシリカを繰り返し曝露した場合の、慢性的な生体影響を加味した検討は進められていない。そこで、ナノシリカの有効かつ安全な利用の促進に向け、ナノシリカを事前に反復投与した際の影響を、ナノシリカ誘導性の体温低下を指標として評価した。その結果、対照群と nSP50 投与群との間で変化は観察されなかった (Figure 11)。次に、投与 4 時間後において解剖し、回収した血液に関して血球検査・血液生化学検査を行った。その結果、血球数に関しては事前投与による影響の変化は観察されなかった一方で (Figure 12)、肝障害マーカーである ALT に関しては、nSP50 の事前投与によって変化する傾向が観察され、ナノシリカ誘導性の肝障害が増悪する傾向を示した (Figure 13)。この結果は、ナノシリカの反復投与により、ナノシリカに対する感受性が高まる可能性を示しているものであり、新たな安全性評価の視点が必要であると考えられた。

6. ナノ粒子の母乳移行性評価

授乳による乳幼児の化学物質の曝露が懸念される一方で、母乳育児の有用性が認められ、世界的に授乳機会が増加し続けている現状からも、化学物質の安全性を評価するうえで、母乳を介した乳幼児への影響評価が必要不可欠であると考えられる。一方で微粒子については、母乳へ移行し得るかどうかについても、世界的にも情報が皆無に等しい現状である。さらに、ナノ粒子にとって重要な、粒子径と動態の関係

性は不明であると共に、母乳を介して乳幼児に吸収され得るか、どのような影響が及ぶかという点についても未知であり、乳幼児の安全性確保に向けて、全く情報が不足している状況と言える。本観点から、適用製品数の点で最も汎用されるナノ粒子の一つである、銀ナノ粒子を使用し、授乳期に着目した安全性情報を収集した。

授乳期のマウスに、出産日 (PND0) から離乳 (PND20) まで 21 日間、nAg10、Ag⁺を 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg で毎日経口投与し、その間母乳育児させた。なお、0.5 mg/kg はサプリメントとして経口摂取し得る量の数十～数百倍と考えられる²⁵。まず、母体への影響を評価する目的で、投与期間中の母体の体重推移・摂餌量を測定すると共に (Figure 14a,b)、PND21 において血液生化学試験 (Figure 14c)、および血球検査 (Figure 15) を実施した。その結果、いずれの測定値も nAg10、Ag⁺投与群と対照群とで同等の値を示し、本投与量において、nAg10、Ag⁺は母体の血液毒性や肝・腎障害等を誘発しないことが明らかとなった。次に、PND7、14、21 における仔の血中銀濃度を測定した結果、nAg10、Ag⁺投与群共に銀が同定された (Figure 16a)。PND0 から PND20 まで、母体に nAg10、Ag⁺を投与している一方で、仔の血中銀濃度は PND が増加するにつれて減少していく傾向が認められた。次に、nAg10、Ag⁺の 0.5 mg/kg 投与群について、仔の肝臓中・脳中銀濃度 (ng/g tissue)、および肝臓中・脳中銀量 (ng/tissue) を測定した。その結果、肝臓においては出産後 14 日以降において、銀濃度・量の減少が認められる一方で、脳においては 14 日から 21 日にかけても増加し、それ以降もほとんど減少しないことが明らかとなった (Figure 16b-e)。従って、母乳を介して曝露した nAg10、Ag⁺は肝臓と比較して脳では排泄されづらいことが明らかとなった。

7. ナノ粒子の母乳を介した曝露が仔へ与える影響評価

授乳期のマウスに、出産日 (PND0) から離乳 (PND20) までの 21 日間、nAg10、Ag⁺を 0.1 mg/kg、0.5 mg/kg (サプリメントとして経口摂取し得る量の数十～数百倍程度) で毎日経口投与し、その間、母乳育児させた。仔の体重推移を評価すると共に、PND21 に血液生化学検査を実施した。その結果、群間の体重推移と組織障害マーカー (肝障害マーカー: ALT・AST、腎障害マーカー: ALT・BUN) に有意な変化は認められなかった (Figure 17)。一方で、0.5 mg/kg の nAg10、Ag⁺を投与された母体の雌仔において、対照群と比較して血小板容積と血小板分布幅の有意な低下が認められた (Figure 18)。上記の血小板容積と血小板分布幅の低下は、雄仔においては認められなかった (Figure 19)。血小板容積と血小板分布幅の低下は血小板産生数の減少につながることから、血小板数を測定した結果、群間の血小板数には有意な変化は認められなかった (Figure 18)。従って、nAg10、Ag⁺の母乳を介した曝露は、仔の血小板容積と血小板分布幅を低下させるが、血小板産生に影響を与えるほど深刻なものではないと考えられる。以上により、nAg10、Ag⁺の授乳期曝露は、仔の成長抑制、臓器障害、顕著な血液毒性等は誘発しないことが明らかとなった。

仔を 11 週齢時まで生育させた後、行動試験により仔の脳機能を網羅的に解析した。まず、脳機能評価に先立ち、仔の体温、体毛の状態、反射、感覚機能等について基礎情報を収集した。なお、雌マウスの行動は性周期により変動してしまうことから、データのばらつきを抑え、行動試験の検出力を上げるために、以降の行動試験には雄仔を用いた。まず、直腸体温を測定すると共に、ひげ、および体毛の状態を、有無、長さ、毛並み等に注目し観察した。その結果、直腸体温 (Figure 20a)、ひげ及び体毛の状態

(data not shown) とともに、群間で変化は認められなかった。次に、基礎的な反射として、Righting Reflex (正立反射)、Reaching、Key Jangling を実施した。Righting Reflex は、マウスを仰向けにした際に元の姿勢に戻ろうとする反射であり、Righting Reflex を示さないマウスは、平衡機能等に異常があると考えられる。Reaching は、マウスを宙吊りにした際に崖に手を伸ばそうとする反応であり、Reaching を示さないマウスは視覚に異常があると考えられる。Key Jangling では、鍵束がこすれる音を聞いた際のマウスの反応、及び痙攣反応を観察することにより、マウスの聴覚・痙攣感受性を検討できる。上記を検討した結果、全てのマウスにおいて、Righting Reflex、Reaching が正常に認められると共に、Key Jangling で異常を示さなかった (data not shown)。次に、ホットプレートテストにより痛覚感受性を評価した (Figure 20b)。ホットプレートテストでは、マウスに 50℃のプレート上を探索させ、熱に対する逃避行動を示すまでの時間を測定した。その結果、熱に対する逃避行動を示すまでの時間に、群間で変化は認められなかった (Figure 20c)。以上の結果から、nAg10、Ag⁺の授乳期曝露は、仔の体温や体毛の状態、平衡機能・視覚・聴覚等を反映する基礎的な反射、及び痛覚感受性には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

仔の基礎的な運動機能を、歩行機能、協調運動機能、筋力の観点から精査した。まず、歩行機能について検討した。マウスがトレッドミル上を歩行する際の各足底の状態をカメラ撮影した後、撮影像から各足底の位置及び面積の経時変化を解析した (Figure 21a)。その結果、前足 (Figure 21b-f)、後足 (Figure 21g-k) とともに、遊脚時間 (Swing Stride、足がベルトから離れている時間) と制動時間 (Brake Stride、かかとがベルトに着き始めてから、足底面積が最大になるまでの時間) と推進時間 (Propel

Stride、ベルトからかかとが離れ始めた時から、つま先がベルトから離れるまでの時間) のそれぞれが、遊脚時間・制動時間・推進時間の和に占める割合 (Figure 21b,g)、立脚位置間の幅 (Stance Width) (Figure 21c, h)、歩幅 (Stride Length) (Figure 21d, i)、対角線上の足を結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Step Angle) (Figure 21e, j)、つま先とかかとを結ぶ直線と進行方向のなす角度 (Paw Angle) (Figure 21f, k) に、群間で変化は認められなかった。以上の結果から、nAg10、Ag⁺の授乳期曝露は、仔の歩行機能には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

ローターロッドテストにより、仔の協調運動機能を検討した (Figure 22a)。ローターロッドテストでは、マウスが回転式のロッドから落下するまでの時間を測定した。落下するまでの時間は、協調運動機能の低下により減少する。また、テストを繰り返すことにより、落下するまでの時間が延長するが、その推移を指標に、マウスの運動学習能力を評価できる。解析の結果、ロッドから落下するまでの時間、及びテストを繰り返した際の推移に群間で変化は認められず (Figure 22b)、nAg10、Ag⁺の授乳期曝露は、仔の協調運動機能、及び運動学習能力には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

また、マウスの握力を測定したところ (Figure 22c)、群間の握力に変化は認められなかった (Figure 22d)。

マウスの新奇環境下、及び通常飼育環境下での自発運動量を測定した。まず、オープンフィールドテストにより、新奇環境下での自発運動量を測定した (Figure 23a)。オープンフィールドテストでは、マウスに新奇環境を 120 分探索させた際の行動を解析した。その結果、総移動距離 (Figure 23b)、垂直運動の回数 (Figure 23c)、フィールド中央部での滞在時間 (Figure 23d)、及び掻き糞等々のステレオタイプ行動の回数 (Figure 23e) に群間で変化は認められな

かった。これらは新奇環境における自発運動量、不安様行動、ストレスの指標となることから、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、上記の項目には影響を及ぼさないことが明らかとなった。なお、仔の不安様行動に関しては、より詳細な検討結果について後述する。

ホームケージ解析により、通常飼育環境下での自発運動量を測定した (Figure 24a)。ホームケージ解析では、対面経験の無い同じ群のマウス 2 匹を解析用ケージに入れ、1 週間に渡り行動を観察した。2 匹のマウスの接触頻度 (接触していれば 1、していなければ 2 と評価) (Figure 24b)、自発運動量 (Figure 24c) について日内変動 (3 日間の平均として算出) を解析した結果、群間で変化は認められなかった。これらは自発運動量や、社会的行動 (接触行動等、他の個体との相互作用に関わる行動) の指標となることから、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の通常飼育環境における自発運動量、及び社会的行動には影響を及ぼさないことが明らかとなった。なお、仔の社会的行動に関しては、より詳細な検討結果について後述する。

恐怖条件付け学習により文脈記憶を検討した。恐怖条件付け学習は、マウスに特定の場所、音等の手がかり (条件刺激) と電気刺激 (恐怖刺激) を与え、条件刺激と恐怖を関連させて記憶させるものである。本検討では、マウスのすくみ反応を恐怖の指標として文脈記憶を検討した。まず、特定のチャンバー内 (Figure 25a) において、音刺激とそれに引き続く電気刺激を与え、チャンバー及び音刺激と恐怖を関連付けさせた (条件付け)。チャンバー内で音刺激と電気ショックを与えた際のすくみ時間の割合が増加したことから (Figure 25c)、条件付けの成立が確認された。一方で、これらすくみ時間、移動距離に群間で変化が認められなかったことから、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の恐怖の感受性には影響を及ぼさないことが明らかとなった。次に、条件付けから 24 時間後

に、マウスを条件付けと同じチャンバーで 5 分間自由行動させることにより、空間情報と恐怖の関連付けを指標として文脈記憶を検討した (試行 1)。その結果、両群共に、マウスのすくみ時間の割合 (Figure 25d) の上昇、及び移動距離 (Figure 25e) の低下が認められたことから、空間情報と恐怖の関連付けは成立していると考えられるが、群間の値に変化は認められなかった。次に、試行 1 の終了後に、条件付けに用いたチャンバーとは異なるチャンバー内 (Figure 25b) で、マウスに条件刺激として用いた音刺激を提示することにより、音刺激と恐怖の関連付けを指標として文脈記憶を検討した (試行 2)。その結果、音刺激を与えることで、両群共に、マウスのすくみ時間の割合 (Figure 25f) の上昇、及び移動距離 (Figure 25g) の低下が認められたことから、音刺激と恐怖の関連付けは成立していると考えられるが、群間の値に変化は認められなかった。試行 1、試行 2 の結果から、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の文脈記憶には影響を及ぼさないことが明らかとなった。また、文脈記憶の保持能力を評価する目的で、条件付けから 27 日後に試行 1、試行 2 を再度実施した (Figure 25h-k)。その結果、マウスのすくみ時間の割合、及び移動距離の値に群間で変化は認められず、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の条件記憶の保持能力には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

仔のうつ様行動を 3 つの行動試験により評価した。まず、ワイヤハングテストを実施した (Figure 26a)。ワイヤハングテストでは、マウスにワイヤを掴ませた後、逆さ釣りにし、ワイヤから落下するまでの時間を測定した。マウスのうつ様行動が亢進しているほど、もしくは筋力が低下しているほど、ワイヤから落下するまでの時間が減少すると考えられる。解析の結果、群間のワイヤから落下するまでの時間に有意な差は認められなかった (Figure 26b)。前述のように、群間の筋力には変化が認められな

ったことから (Figure 22d)、本結果は群間のうつ様行動にも変化がないことを示していると考えられる。

尾懸垂テスト (Figure 26c)、ポーソルト強制水泳テスト (Figure 26e) を実施した。尾懸垂テストでは、尻尾を固定しマウスを吊り下げた際の行動を解析した。解析直後、マウスは逃避行動を示すが、マウスのうつ様行動が亢進しているほど早期にあきらめ、不動率 (動かない時間の割合) が増加する。解析の結果、群間の不動率に有意な差は認められなかった (Figure 26d)。ポーソルト強制水泳テストでは、マウスを水中に入れた際の行動を解析した。本検討においても、解析直後にマウスは逃避行動を示すが、マウスのうつ様行動が亢進しているほど早期にあきらめ、不動率が増加する。解析の結果、群間の不動率に有意な差は認められなかった (Figure 26d)。従って、以上の3つのテストから、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔のうつ様行動には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

仔の不安様行動を高架式十字型迷路により評価した (Figure 27a)。南北方向に壁が有るアームを、東西方向に壁の無いアームを持つ十字迷路を、床の上から 55 cm の高さに設置し、マウスを探索させた。狭所を好むマウスは壁の有るアームを中心に探索する一方で、探索欲求を持つことから、壁の無いアームも探索する。不安様行動が亢進しているマウスほど、壁の無いアームの探索が少なくなる。解析の結果、アームへ侵入した総数 (Figure 27b)、アームへ侵入した総数のうち壁の無いアームへ侵入した割合 (Figure 27c)、総移動距離 (Figure 27d)、総探索時間のうち壁の無いアームを探索していた割合 (Figure 27e) に、群間で変化は認められなかった。従って、高架式十字迷路において、不安様行動の変化は検出されなかった。

次に、不安様行動と社会的行動を評価できる社会的行動テストを実施した (Figure 28a)。

社会的行動テストでは、マウスが探索経験の無いフィールド (40×40×30 cm) を用い、同じ群の初対面のマウス2匹が新奇環境下で接触する時間、回数を測定した。接触時間や接触回数が少ないマウスほど、不安様行動が亢進している、もしくは社会的行動が低下していると考えられる。解析の結果、総接触時間 (Figure 28b)、総接触回数 (Figure 28c)、アクティブコンタクト (社会的行動を反映する接触ではなく、ただぶつかってしまったと考えられる接触) の合計時間 (Figure 28d)、接触1回あたりの平均時間 (Figure 28e)、総移動距離 (Figure 28f) に、群間で変化は認められなかった。従って、仔の新奇環境下での不安様行動、社会的行動には変化は検出されなかった。前述の、不安様行動も評価できるオープンフィールドテスト、社会的行動も評価できるホームケージ解析においても群間のスコアに有意な差は認められなかったことから、以上により、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の不安様行動、社会的行動には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

聴覚性驚愕反応は、突発的な音刺激に対して、跳躍やうずくまり、前後肢の伸展等を示す反応である。心的外傷後ストレス障害や、びっくり病 (過剰驚愕症) の患者が聴覚性驚愕反応の亢進を示すことが知られている。また、プレパルス抑制 (Prepulse Inhibition) とは、聴覚性驚愕反応が生じる音刺激を与える直前に、弱い音刺激 (プレパルス) を与えることで、聴覚性驚愕反応が抑制される現象である。プレパルス抑制は感覚運動統合制御機能 (脳が外界との情報のやりとりを通じて、適応能力や学習能力を高めていく機能) を反映する指標と考えられており、統合失調症等の患者が、プレパルス抑制の低下を示すことが知られている。本検討では、マウスに音刺激を与えた際の、マウスの振幅を指標に、聴覚性驚愕反応とプレパルス抑制を評価した (Figure 29a)。その結果、音刺激を与えた際の群間の驚愕反応強度 (振幅の強度) に

有意な変化は認められなかった (Figure 29b)。また、プレパルスを与えた際の聴覚性驚愕反応の抑制率に、群間で変化は認められなかった (Figure 29c)。従って、nAg10、Ag+の授乳期曝露は、仔の聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制には影響を及ぼさないことが明らかとなった。

以上の行動試験の結果をまとめると、いずれの試験においても、群間のスコアに有意な変化は認められなかった (Figure 30)。従って、銀ナノ粒子は母乳を介して仔の脳に移行する一方で、本実験における母体の摂取量 (サプリメントとして経口摂取し得る量の数十～数百倍程度) においては、仔の基礎的な反射、痛覚感受性、歩行機能、協調運動機能、運動学習、筋力、自発運動量、記憶、うつ様行動、社会的行動、不安様行動、聴覚性驚愕反応、プレパルス抑制等には影響を与えないことが明らかとなった。

8. NM を雄親曝露した仔の行動への影響評価

近年、雄親の環境因子曝露が仔へ影響を与える可能性が報告され始めている。そこで、雄親曝露に着目し、NM の次世代影響を評価すべく、F0 世代の雄の nSP30 曝露が F1 世代へおよぼす影響を評価した。nSP30 を曝露した雄親への影響評価を目的に、雄マウスに nSP30 を 1 日おきに 4 回尾静脈内投与し、投与開始 35 日後に解剖した。体重を測定すると共に、精巣重量、精囊重量、精巣上体重量、精子生存率の観点から生殖関連組織への影響を評価した。H25 年度までに、いずれの生殖関連組織の重量にも、群間で有意な変化は認められず、また、精巣上体中の精子の生存率に有意な差は認められないことを明らかとしてきた。そこで本年度は、ナノシリカを雄親に曝露することによる、次世代影響を解析した。その結果、ナノシリカを雄親に曝露した雄仔で、短期記憶能力 (Figure 31a)

や不安様行動 (Figure 31b) の低下などが認められた。この結果を受けて、これらの再現性の取得と共に、性差や異なる環境下での飼育による影響を解析した。その結果、短期記憶能力低下の再現性は取得できなかったものの、ナノシリカの雄親曝露により、不安様行動が低下するという再現性が得られた (Figure 32)。また、この不安様行動の低下は、雌仔や異なる環境で飼育した仔にも認められたことから、性別や生育環境が異なっても誘発される可能性が示された。

9. 銀ナノ粒子の感作性評価

金属アレルギーでは、金属を曝露することで感作が成立した後、再度曝露した際に、金属が本来有する起炎性が獲得免疫依存的に増幅し、病態が発症する。本実験では、あらかじめ金属をナノ粒子あるいはイオンの状態で投与しておいたマウスに、再度同じ金属をナノ粒子あるいはイオンの状態で投与し (惹起投与)、それぞれに対する炎症応答の変化を指標として、ナノ粒子とイオンの感作における寄与を比較した。具体的には、nAg10、あるいは Ag+を、足跡に週 1 回、計 4 回投与した。なお近年、金属以外の接触過敏性皮膚炎における感作成立の条件として、自然免疫系の活性化が必須であることが明らかになっていることから、上記投与には、LPS を共投与した。最終投与の 1 週間後、今度は耳介に nAg10 あるいは Ag+を皮内投与した。この後、nAg10 あるいは Ag+による耳介の腫れを経時的に測定し、銀ナノ粒子あるいは銀イオンの前投与による銀への感作成立を評価した。溶媒のみを投与していた群において、nAg10、Ag+の投与により、前述の通り一定の耳介の腫れが観察された (Figure 33a)。この腫れは、Ag+を前投与していたマウスにおいては変動しなかった。従って、これまでの多くの報告と同様に、本実験系においても、イオンの前投与では感作を成立させることはでき