

Figure 32. 雄親を介した次世代影響評価(生育環境の違いによる評価). マウスに、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、未処置のマウスと4日間交配させた後に、雌マウスに自然分娩させた。産まれてきた仔を9週齢まで飼育し、(a) Y-mazeテスト、および (b) Elevated plus maze テストを実施した。Data are reported as means \pm SEMs.

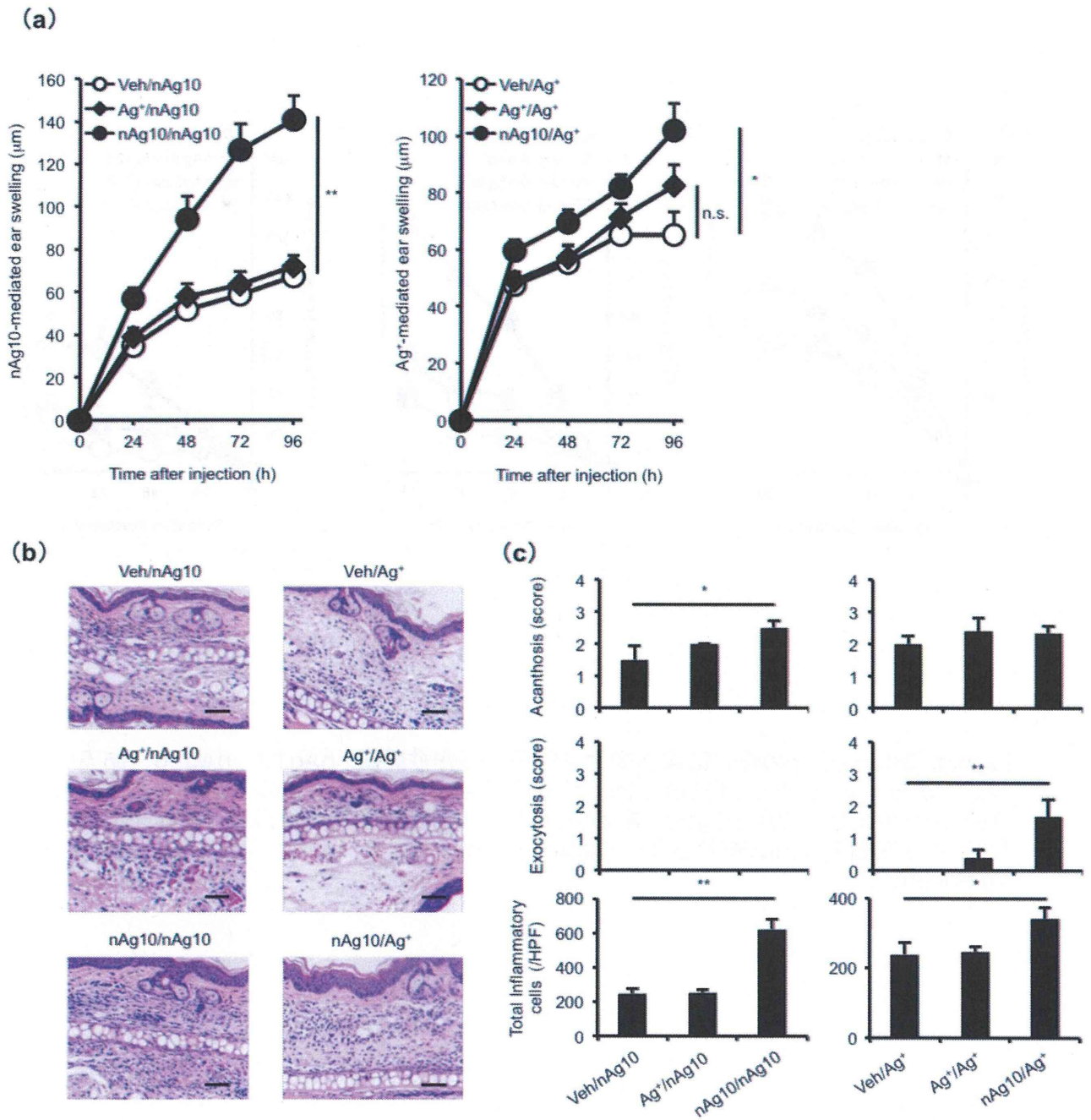


Figure 33. 銀ナノ粒子の感作性評価. nAg10、あるいはAg+を、マウスの足蹠に週1回、計4回投与した。最終投与の1週間後、今度は耳介にnAg10あるいはAg+を皮内投与した。(a) nAg10あるいはAg+による耳介の腫れを経時的に測定した。(b) チャレンジ投与から96時間後に耳介を回収し、HE染色による病理学的解析を実施し、所見による各項目のスコアをグラフ化した。Scale bars = 50 μ m, Data are means \pm SEMs (a; n=10-12, b; n=5-6).

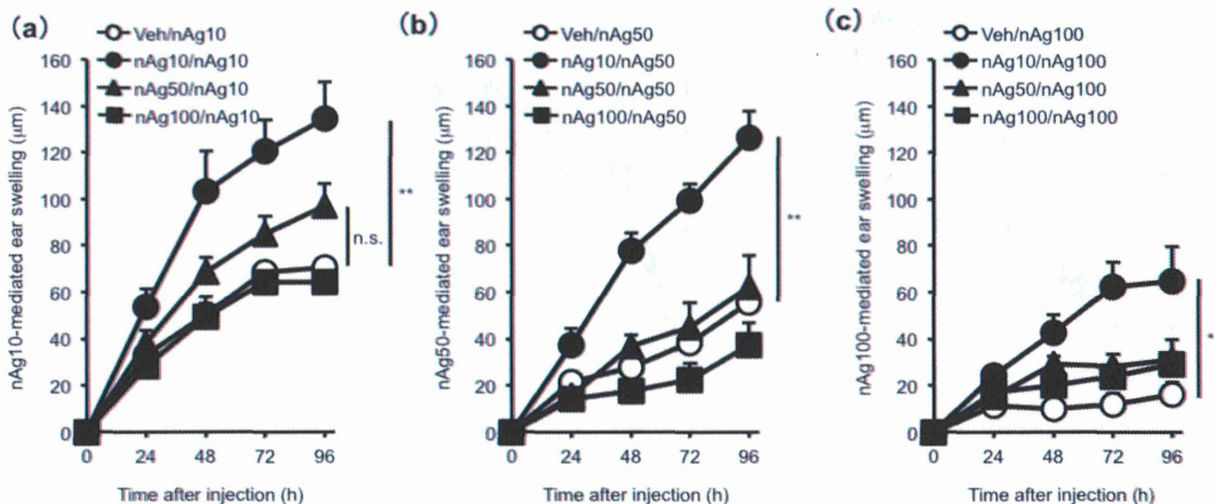


Figure 34. 粒子径の違いによる銀ナノ粒子の感作性評価. nAg10、nAg50、あるいはnAg100を、マウスの足蹠に週1回、計4回投与した。最終投与の1週間後、今度は耳介に (a) nAg10、(b) nAg50、あるいは (c) nAg100を皮内投与し、各粒子による耳介の腫れを経時的に測定した。Data are means \pm SEMs (n=4-6), n.s.; not significant.

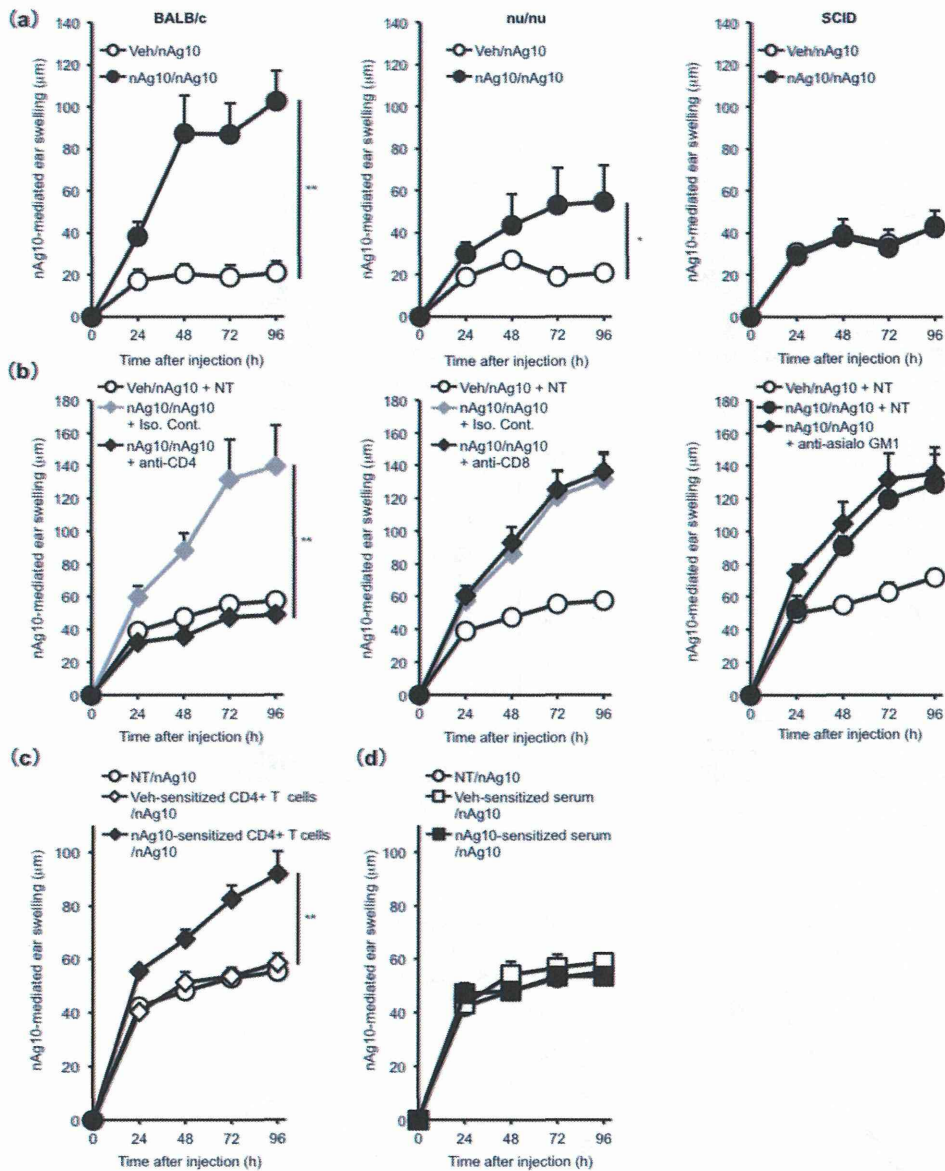


Figure 35. 銀ナノ粒子の前投与による影響と獲得免疫応答の関連. (a) nAg10、あるいは Ag+を、BALB/c、nu/nu、あるいは SCID マウスの足蹠に週 1 回、計 4 回投与した。最終投与の 1 週間後、今度は耳介に nAg10 あるいは Ag+を皮内投与した。nAg10 あるいは Ag+による耳介の腫れを経時的に測定した。(b) nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の一週間後、500 µg/mouse で抗 CD4 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2b)、あるいは抗 CD8 中和抗体、またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG2a) を PBS 溶媒で腹腔内投与した。抗 asialo GM1 ウサギ血清は 50 µl/mouse で静脈内より投与した。各試薬の投与は、惹起投与の 24 時間前に実施した。(c) 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。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 細胞は精製後、PBS に懸濁してすぐに、未処置の BALB/c マウスに、 2×10^7 cells/mouse で静脈内より投与した。CD4+T 細胞移入の 24 時間後、耳介皮内に nAg10 を 10 µL 投与 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。(d) 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、血清を回収した。血清は、2-3 匹分をプールし、未処置の BALB/c マウスに、直ちに 500 µL/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 (0.8 mg/mL) し、経時的に耳介の腫れを測定した。Data are means \pm SEMs (n=3-6).

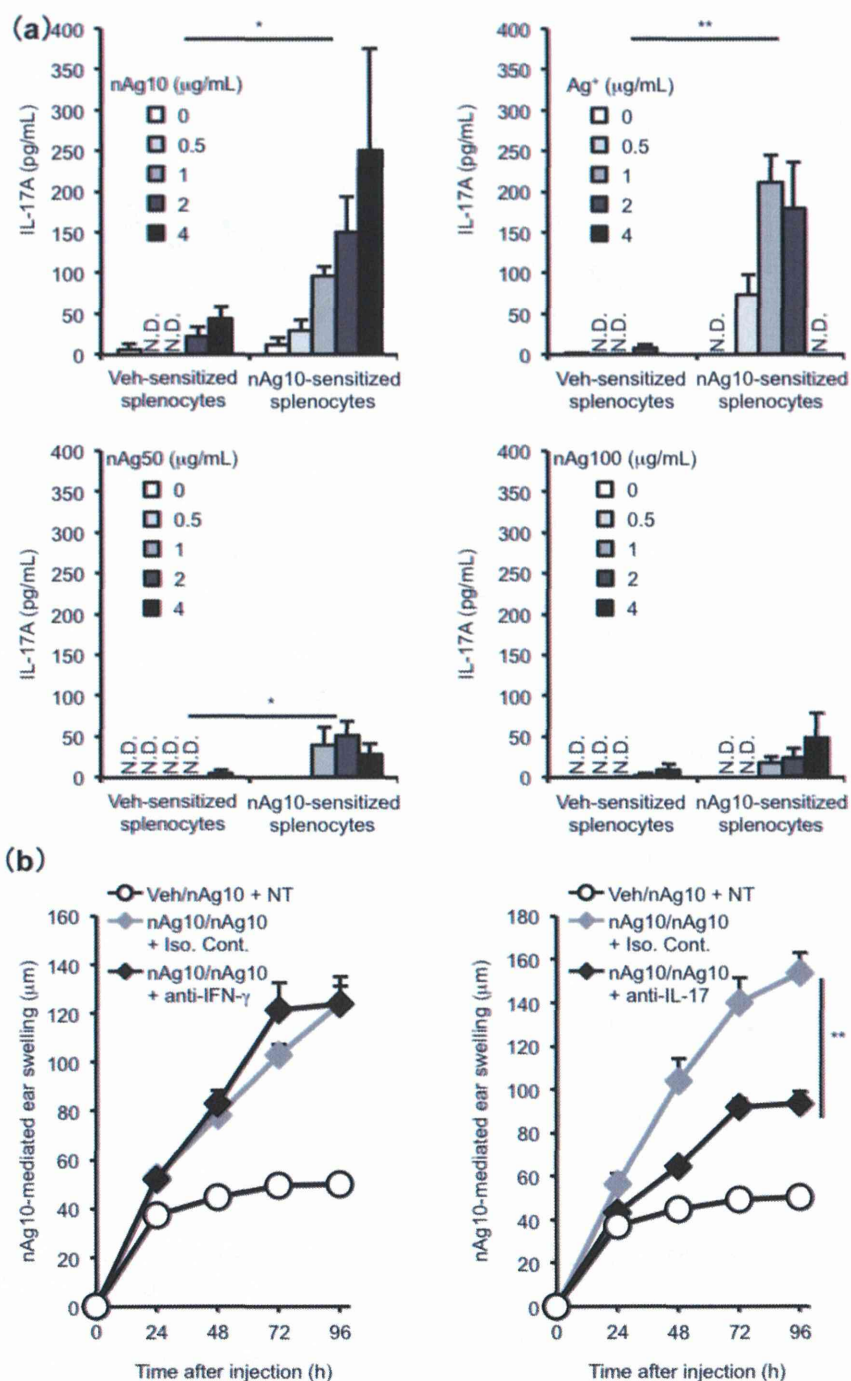


Figure 36. 銀ナノ粒子誘導性のアレルギー病態を担う免疫応答. nAg10、あるいは Ag+を、マウスの足蹠に週 1 回、計 4 回投与した。(a) これらマウスの脾細胞を単離し、nAg10、nAg50、nAg100 あるいは Ag+で再刺激し、その際に産生される IL-17A 産生を評価した。(b) nAg10 を 4 回感作投与したマウスに、最終投与の 1 週間後、耳介皮内に nAg10 を 10 mL 投与 (0.8 mg/mL) した。投与直後に、抗 IFN-g 中和抗体またはそのアイソタイプコントロール (rat IgG1) を 500 mg/mouse で腹腔内へ、あるいは、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。Data are means \pm SEMs (a; n=3-6, b; n=7-10)

ヒトインターフェースに着目したナノリスク解析基盤 の構築に関する研究

研究分担者 八木 清仁 大阪大学大学院薬学研究科 生体機能分子化学分野

研究要旨

ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品など様々な分野で広範に利用されている。しかしナノサイズ化により物質に独自の物性を付与するため、生体や環境に対して今までに予想もしなかった未知なる影響が起こり得るのではないかと懸念されている。近年、酸化アルミニウムナノ粒子が脳微小血管内皮細胞層のタイトジャンクション (TJ) 機能を崩壊させる、また酸化鉄ナノ粒子がヒト胎盤上皮細胞層の TJ シール機能を破壊するといったナノマテリアルの上皮バリア機能に及ぼす悪影響が報告されている。ナノマテリアルは医薬品、食品、化粧品分野において優れた機能を発揮する素材として世界的に使用量が飛躍的に増大している。したがって生体に対する影響を正確に評価する方法の確立が急務とされ、本研究においては上皮バリア機能に対するナノマテリアルのリスク解析基盤の構築を目的として、危険性を評価するためのマーカー遺伝子の同定を試みる。

生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。TJ には 2 細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と 3 細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ) があり上皮バリアを構築している。bTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌下痢毒素の受容体結合分子 (C-CPE184)、tTJ を開口させる物質としてウェルシュ菌イオタ毒素受容体結合分子 (Ib421-664) を用い、C-CPE あるいは Ib421-664 を上皮細胞層に添加した時、発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ技術により網羅的に解析した。前年度は C-CPE184、Ib421-664 を 12 時間処理後に 2 倍以上発現量が変動する遺伝子を抽出した。平成 26 年度はさらに 24 時間後も大きく変動する遺伝子をクラスター分けにより絞り込み、パスウェイ解析などによりマーカー遺伝子候補となるものを絞り込んだ。

A. 研究目的

近年、ナノテクノロジーは、今世紀における重要案件である地球温暖化、生物多様性保持などの環境・エネルギー問題、また高齢化社会で必要とされる医薬品分野の他、食品分野、化粧品分野へ向けて技術革新に資する大きな期待が寄せられている。

このように、あらゆる分野で利用されているナノテクノロジーにおいて中核を成しているのがナノマテリアルである。ナノマテリアルは ISO (国際標準化委員会) により、「少なくとも 1 次元

の大きさが 100 nm 以下に人工的に制御された素材」として定義され、従来までのサブミクロンサイズの素材に比して、粒子径の微小化に伴う組織浸透性や表面積の劇的増加により、電気・磁気・光学的特性や組織浸透性などが飛躍的に向上する。そのため、これら特有の機能を活かし既に食品・医薬品・化粧品などの領域で様々な改善が施された製品が流通し、ナノマテリアルの使用量・利用範囲共に世界的に広がり続けている。

最近、ナノ粒子が上皮細胞層のタイトジャンクション (TJ) を破壊するという報告がなされ、生

体の上皮バリアに与える悪影響が懸念されている。生体内外・組織内外を隔てる上皮細胞層は TJ によってシールされており細胞間隙を介した物質の漏れが制限されている。

TJ には 2 細胞間をシールする bicellular TJ (bTJ) と 3 細胞間をシールする tricellular TJ (tTJ) があり上皮バリアを構築している。TJ が何らかの原因で崩壊すると異物や抗原となる物質が透過し炎症性疾患を引き起こすことになる。上述のように食品、医薬品、化粧品に使用されているナノ粒子が上皮バリアを破壊すれば重篤な疾病につながる可能性がある。したがって上皮バリアに対するリスクを解析することはナノマテリアルの安全な使用において重要であると考えられる。

本研究においてはナノマテリアルの安全性評価に使用できるマーカー遺伝子の同定を目的として、bTJ と tTJ に作用し TJ を開口させる物質を用い、TJ が開閉した時に発現が変動する遺伝子を網羅的に解析した。

B. 研究方法

1. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

C-CPE 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が減少した遺伝子は 681 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE184 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

2. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

Ib421-664 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 377 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれてい

た。そこで、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

3. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群

C-CPE、Ib421-664 の処理で 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 193 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が上昇したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。

4. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

C-CPE 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 422 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものなどが含まれていた。そこで、C-CPE184 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。

5. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

Ib421-664 処理でのみ 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 512 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものなどが含まれていた。そこで、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。

6. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が増加した遺伝子群

C-CPE、Ib421-664 処理で 12 時間後に 2 倍以上遺伝子発現が増加した遺伝子は 83 個存在していたが、この遺伝子群の中には 24 時間処理することで遺伝子発現が低下したものが含まれていた。そこで、C-CPE、Ib421-664 で 12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上増加した遺伝子に絞り込んだ。

C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

D. 考察

1. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果 Cluster3 に分類された 121 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 1)。Pathway 解析の結果、コレステロール生合成系の酵素が 8 個 (**Hmgcs1, Pmvk, Fdps, Fdft1, Sqle, Cyp51, Dc4mol, Nsdhl**) 含まれていた。細胞膜の合成に必須のコレステロールが長期にわたり低下することで上皮細胞のバリア機能が低下する可能性があり、マーカー遺伝子として有効かもしれない。また、水溶性有機物質の膜輸送を司る SLC family に属する遺伝子が 3 個 (**Slc1a5, Slc2a6, Slc36a4**) 含まれていた。1a5 は中性アミノ酸、2a6 はグルコースのトランスポーター、36a4 はプロトン/アミノ酸共輸送体として機能している。SLC family は 400 種類ほどの数多くのメンバーから構成され、TJ 開口との関連は現段階では不明である。またアドヘレンスジャンクションの機能を司るカドヘリン遺伝子 (**Pcdh7**) が含まれ、TJ 関連遺伝子発現低下との連関が示唆された。

2. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster2 に分類された 82 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 2)。抽出された遺伝子の中に細胞接着を担うデスモソーム構成タンパク質遺伝子が 4 個 (**Dsg3, Krt42, Krt6B, Krt14**) 含まれていた。**Dsg3** はカドヘリン family に属するデスモグレインであり同種結合で細胞間結合を構成し、細胞内で中間系フィラメントと結合している。Krt は上皮系の中間系フィラメントであるケラチンであり、t TJ を開口させる Ib421-664 処理によりデスモソームを構成するタンパク質遺伝子発現が低下することは興味深い。また b TJ を開口する C-CPE の場合と同様にコレステロール生合成系遺伝子、**Fdft1** の発現低下が見られた。

3. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上減少した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が約 2 倍以上減少した遺伝子に絞り込んだ。その結果、Cluster 1 に分類された 25 個の遺伝子に絞り込むことができた (図 3)。抽出された遺伝子の中にはコレステロール生合成系遺伝子 (**Idil**)、カドヘリン遺伝子 (**Pcdhgb1**) が含まれていた。C-CPE、Ib421-664 はそれぞれ bTJ, tTJ に結合し TJ を開口させる、すなわち作用点が異なる物質によって共通に発現変動する遺伝子はマーカーとして有用である可能性が高いと考えられる。未知遺伝子を除き既知の遺伝子は以下の 14 個である。**Rin1, Mst1r, Idi1, Calr3, Cyp3a13, Fgfbp1, Pcdhgb1, Arrdc4, Polr3h, Aacs, Mat2a, Timp3, Il33, Crct1**。

4. C-CPE 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster 2 に分類された 115 個の遺伝子に絞り込むことができた(図 4)。Pathway 解析では特に特徴的な遺伝子は見つからず、関連性の高い代謝経路は見いだせていない。また遺伝子発現が減少した遺伝子群に見られた細胞接着関連の因子などは含まれていない。

5. Ib421-664 処理により特異的に遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster3 に分類された 24 個の遺伝子に絞り込むことができた(図 5)。C-CPE と同様に Pathway 解析では特に特徴的な遺伝子は見つからず、関連性の高い代謝経路は見いだせていない。また遺伝子発現が減少した遺伝子群に見られた細胞接着関連の因子などは含まれていない。

6. C-CPE、Ib421-664 処理群のうち、共通して遺伝子発現が増加した遺伝子群

12 時間処理することで遺伝子発現が 2 倍以上増加した遺伝子を 5 つのクラスターに分類し、24 時間処理した後も遺伝子発現が増加した遺伝子に絞り込んだ。その結果、cluster1,4 に分類された 21 個の遺伝子に絞り込むことができた(図 6)。作用点が異なる物質によって共通に発現変動する遺伝子はマーカーとして有用である可能性が高いと考えられる。未知遺伝子を除き既知の遺伝子は以下の 11 個である。**Pla2g3, Abca1, Pikfyve, Duox2, Lyst, Sdccag3, Lce3b, Gbp1, Shank2, 4-Mar, Snx21。**

E. 結論

bTJ を開口させる C-CPE あるいは tTJ を開口させる Ib421-664 を上皮細胞層に添加した時、発現変動する遺伝子を DNA マイクロアレイ技術により網羅的に解析した。前年度は C-CPE184、Ib421-664 を 12 時間処理後に 2 倍以上発現量が変動する遺伝子を抽出したが、平成 26 年度はさらに 24 時間後も大きく変動する遺伝子をクラスター分けにより絞り込み、パスウェイ解析などによりマーカー遺伝子候補となるものを絞り込んだ。

その結果、C-CPE、Ib421-664 添加双方で遺伝子発現が低下する 14 遺伝子、双方で遺伝子発現が増加する 11 遺伝子が抽出された。加えて C-CPE 単独で発現が低下するコレステロール合成系遺伝子、Ib421-664 単独で発現が低下するデスモソーム関連遺伝子についてもマーカー候補として実際にナノマテリアル添加によって発現が変動するか否かを解析する必要があると思われる。

F. 健康危険情報 該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

1. Isoda, K., Kondoh, M., Yoshioka, Y., Tsutsumi, Y., Imazawa, T., Nishimura, T., Ishida, I. Yagi, K.: Silica nanoparticle-induced toxicity in mouse lung and liver imaged by electron microscopy., *Fundam. Toxcol. Sci.*, 2:49-54, 2015.

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

【国内学会発表：合計 0 件】

【国際学会発表：合計 2 件】

1. Iguchi D., Hayaishi T., Krug S., Watari A., Fromm M., Yagi K., Kondoh M. : Modulation of the epithelial barrier by a fragment of Clostridium perfringens iota-toxin, Experimental Biology 2014, SanDiego, 26-30 April, 2014.
2. Daisuke Iguchi D., Krug S., Hayaishi T., Watari A., Nagahama M., Fromm M., Yagi K., Kondoh M.: Development of an angulin binder and its tricellular tight junction-modulating activity, The 2014 ASCB / IFCB meeting, Philadelphia, 6-10 December, 2014.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科生体機能分子化学分野（職員
2名・大学院生/学生 1名）：近藤昌夫准教授、渡
利彰浩助教、井口大輔

Total 681 genes

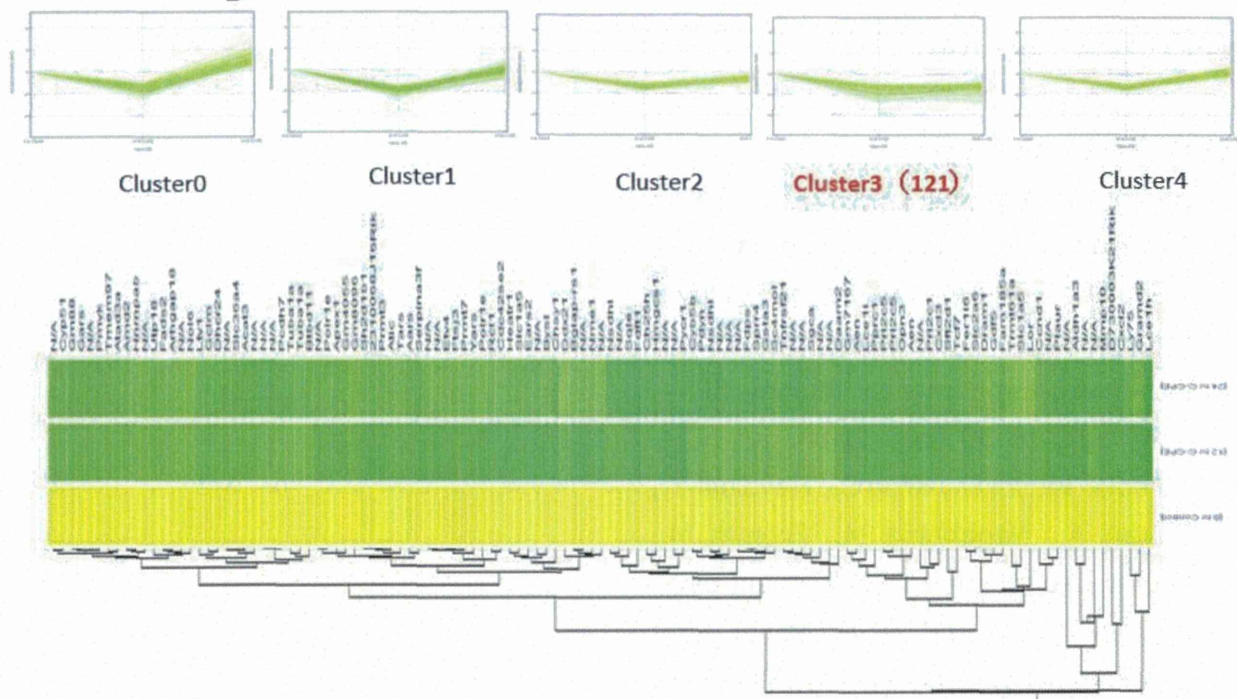


図1 C-CPE処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した681遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster3のヒートマップを示した。

Total 377 genes

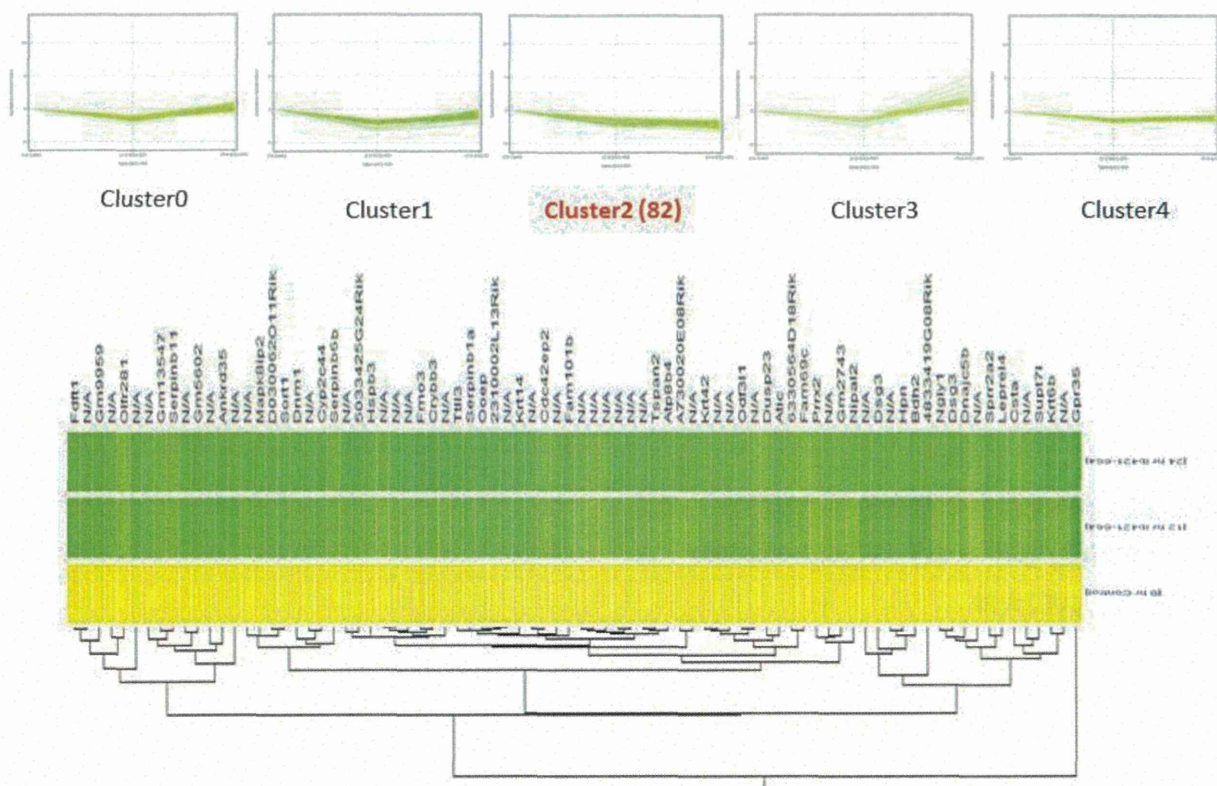


図2 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が減少した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した377遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster2のヒートマップを示した。

Total 193 genes

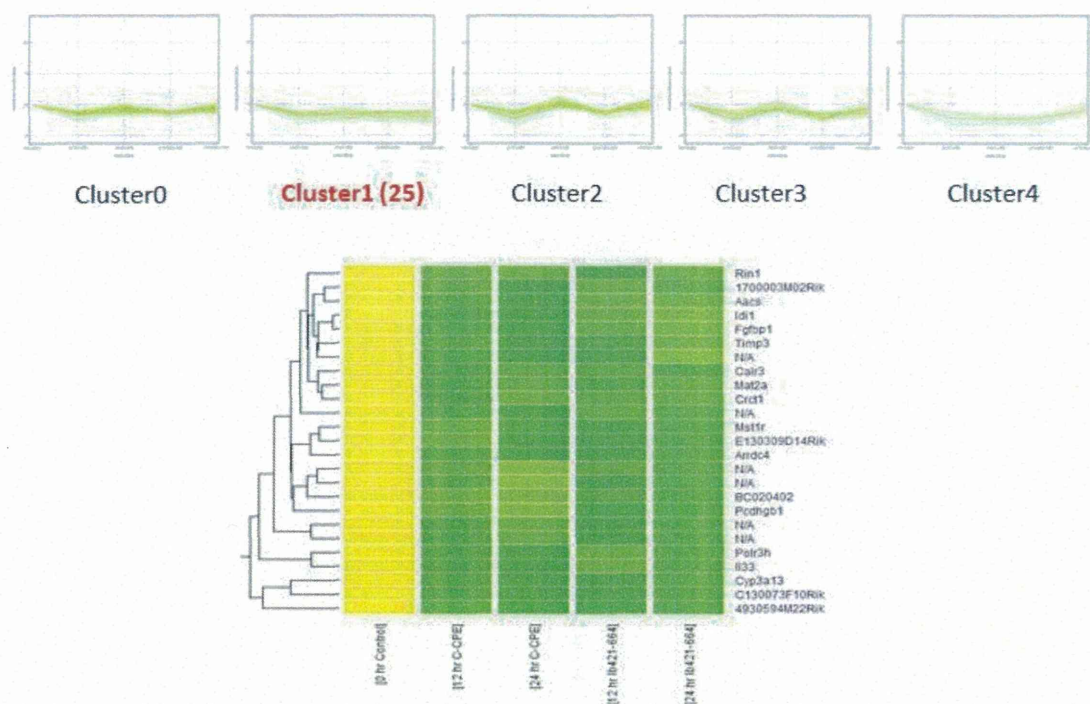


図3 C-CPE、Ib421-664処理群のうち、共通して遺伝子発現が減少した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した193遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も低下しているcluster1のヒートマップを示した。

Total 422 genes

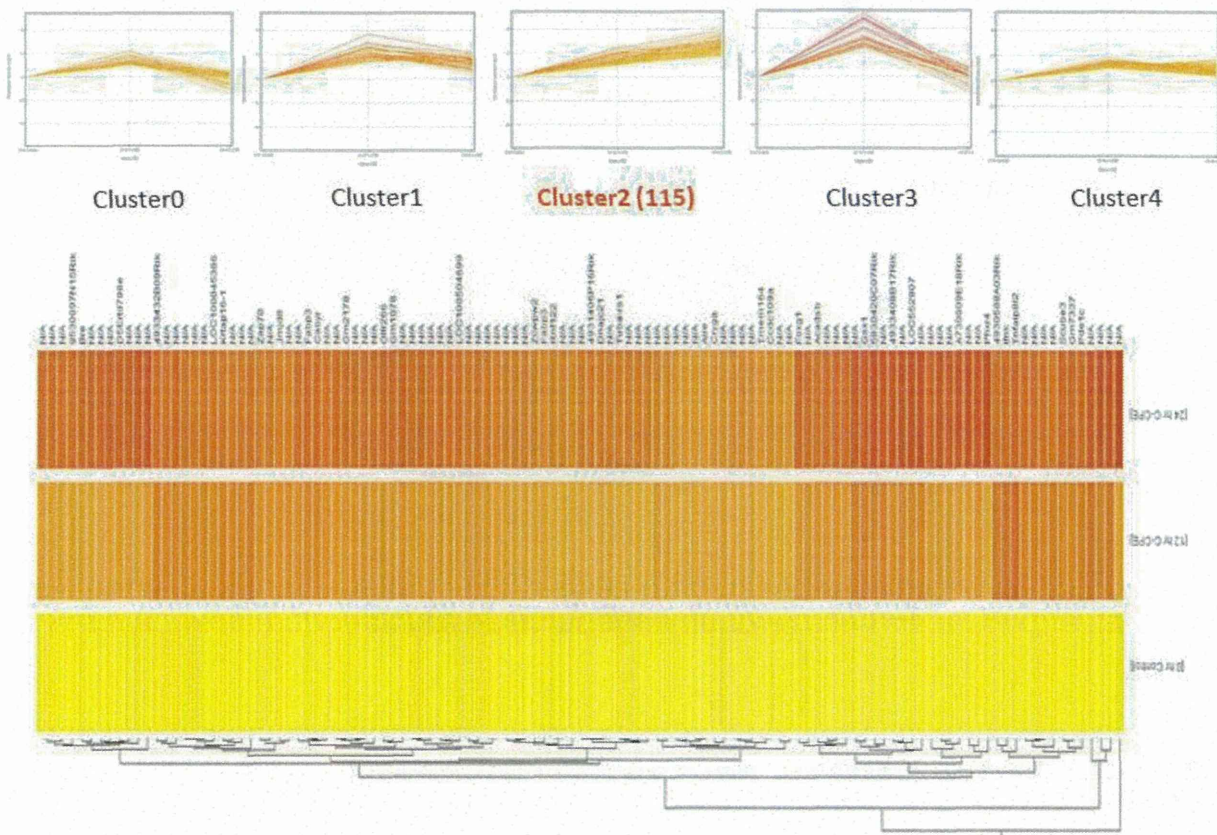


図4 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上低下した422遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster2のヒートマップを示した。

Total 512 genes

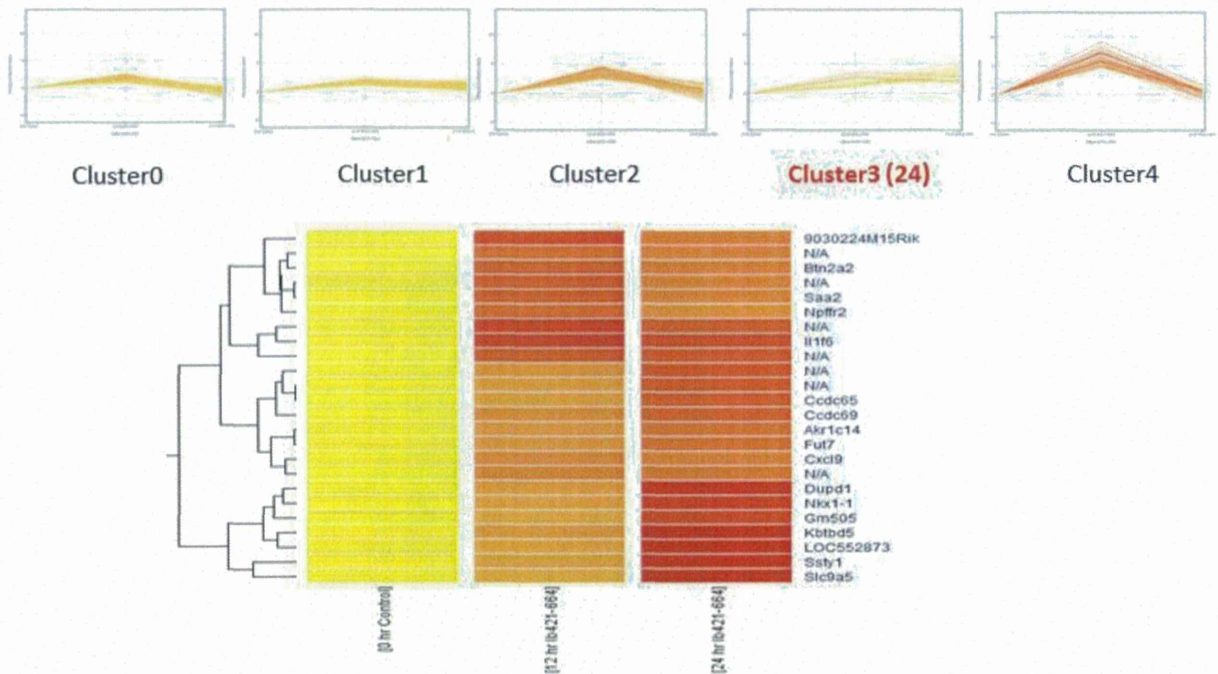


図5 Ib421-664処理により特異的に遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上上昇した377遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster3のヒートマップを示した。

Total 83 genes

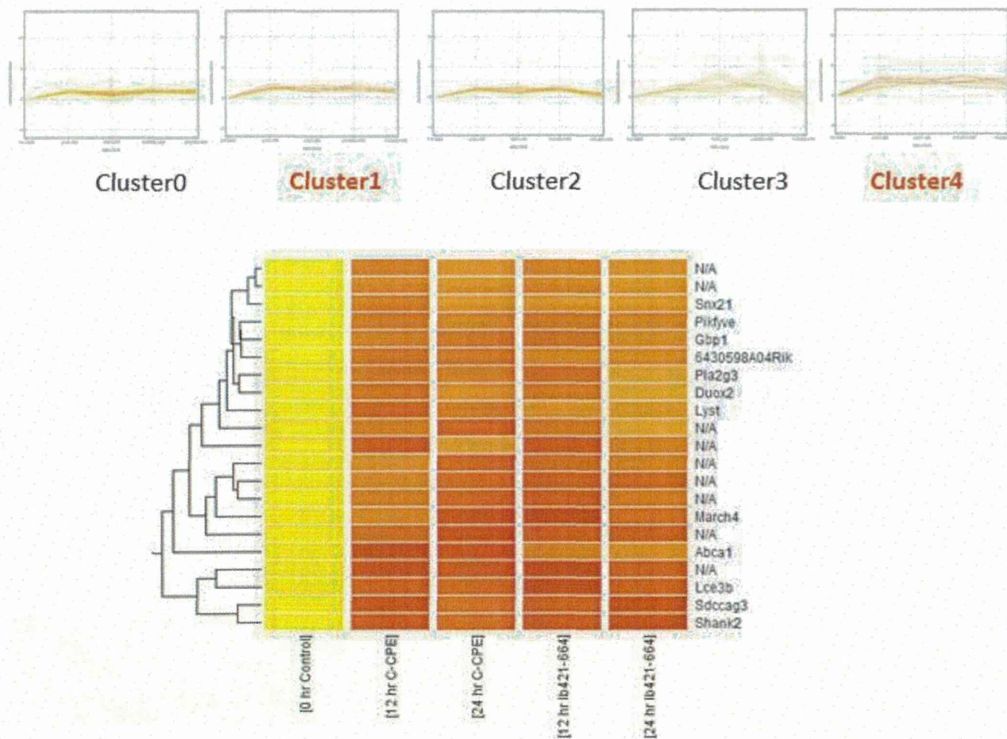


図6 C-CPE、Ib421-664処理群のうち、共通して遺伝子発現が上昇した遺伝子群。12時間後に2倍以上上昇した193遺伝子を5つのクラスターに分け24時間後も上昇しているcluster1、4のヒートマップを示した。

雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの 情動行動に及ぼす影響に関する研究

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。そこで本研究では、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追究している。昨年度、粒子径30nmのnSP(nSP30)を曝露した雄親由来の仔が空間作業記憶の低下ならびに不安様行動の低下を示す可能性を認めた。今年度は、これら情動行動変化の再現性の取得を試みるとともに、情動行動を指標として仔のストレス感受性変化について検討した。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、nSP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。ストレス負荷群は、3週齢時より6週間の隔離飼育を行った。Y字迷路試験における再現実験において、4群の自発的交替行動変化率に差異は見られなかったが、高架式十字迷路試験において、nSP30群において不安様行動の低下が認められた。一方、隔離飼育実験では、既報と同様に、対照群(nSP30非曝露群)における自発運動量の増加、攻撃性の発現、空間作業記憶の低下および文脈的恐怖記憶能力の低下が観察されたが、対照群とnSP30投与群間に有意な変化は認められなかった。すなわち、父親へのnSP曝露が次世代マウスにおいて、情動行動異常発現と密接に関わるストレス感受性変化をもたらす可能性は小さいものと考えられる。以上、雄親マウスへのnSP30曝露は仔マウスのストレス感受性に顕著な影響を示さなかったが、不安様行動の変化が認められたことより、改めて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示唆された。

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. 隔離飼育ストレスの負荷

離乳時に雄性の各投与群をランダムに二分し、集団飼育群と隔離飼育群とした。前者は透明ケージにて5~6匹で、後者は不透明ケージにて1匹で飼育した。隔離飼育6週間後に行動解析を行った。

3. 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。

4. 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。

5. 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。

6. 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。

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. 短期作業記憶の再現性評価

Y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群間で自発的交替行動変化率の差異は認められなかった (図 1A)。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という昨年度の現象は再現性が得られなかった。

2. 不安様行動の再現性評価

高架式十字迷路試験において、5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスのオープンアームの滞在時間割合が、対照父親由来の仔マウスより有意

に大きいことを認めた (図 1B)。すなわち、父親への nSP 曝露が次世代の不安様行動を低下させることが示唆された。

3. 自発運動に対する長期隔離飼育の影響

オープンフィールド試験における 90 分間の総移動距離において、隔離飼育による多動が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響は認められなかった (図 2)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代マウスにおいて長期隔離飼育による多動発現に影響を及ぼさないことが考えられた。

4. 社会性行動に対する長期隔離飼育の影響

社会性相互試験において、隔離飼育による攻撃行動を含む接触時間の増大が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響は認められなかった (図 3)。したがって、父親への nSP 曝露は次世代マウスにおいて長期隔離飼育による社会性行動変化に影響を及ぼさないことが考えられた。

5. 短期作業記憶に対する長期隔離飼育の影響

Y 字迷路試験において、隔離飼育による変化は認められず (0 mg/kg 群)、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による影響も認められなかった (図 4)。すなわち、父親への nSP 曝露は次世代の短期作業記憶能に影響を及ぼさないことが示唆された。

6. 文脈的空間記憶能に対する長期隔離飼育の影響

恐怖条件付け文脈学習試験において、隔離飼育による文脈依存試験でのすくみ行動時間の短縮が認められた (0 mg/kg 群) が、父親マウスへの 1.25 および 5 mg/kg nSP30 の曝露による統計学的に有意な影響は認められなかった (図 5)。し

かしながら、5 mg/kg nSP30 曝露父親由来の仔マウスでは、隔離飼育によるすくみ行動時間短縮の改善傾向が見られており、父親への nSP 曝露が次世代の学習・記憶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。

7. 不安様行動に対する長期隔離飼育の影響

高架式十字迷路試験において、隔離飼育による変化は認められなかった (0 mg/kg 群) (図 6)。一方、5 mg/kg nSP30 を曝露した父親由来の仔マウスで認められた不安様行動の低下 (図 6A) は、隔離飼育群では認められなかった (図 6B)。すなわち、父親への nSP 曝露が次世代の不安様行動に関わる分子基盤に影響を持つことが示唆される。

E. 結論

雄親マウスへの nSP30 曝露が仔マウスの不安様行動を低下させ、本現象が隔離飼育により減弱したことより、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。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

① 論文発表

該当無し

【総説・その他】

該当無し

② 学会発表

【シンポジウム等 : 合計 0 件】

【国内学会発表 : 合計 6 件】

1. 難波佑貴, 東阪和馬, 森下裕貴, 西川雄樹, 前田優子, 吾郷由希夫, 田熊一敬,

角田慎一, 松田敏夫, 吉岡靖雄, 堤 康央: ナノマテリアルの雄親曝露による次世代影響評価., 第41回日本毒性学会学術年会., 神戸, 2014年7月.

2. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 瀧村優也, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一徹, 吾郷由希夫, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 母乳を介したナノ銀曝露が仔の情動機能へ与える影響評価., 第41回日本毒性学会学術年会., 神戸, 2014年7月.
3. 瀧村優也, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一徹, 吾郷由希夫, 角田慎一, 松田敏夫, 宮川 剛, 東阪和馬, 堤 康央: 脆弱な個体の安全性確保に向けたナノ銀の母乳を介した乳仔への移行性評価., 第41回日本毒性学会学術年会., 神戸, 2014年7月.
4. 森下裕貴, 吉岡靖雄, 瀧村優也, 野尻奈央, 高雄啓三, 田熊一徹, 吾郷由希夫, 山下富義, 角田慎一, 橋田 充, 松田敏夫, 宮川剛, 東阪和馬, 堤 康央: ナノマテリアルの母乳移行性および母乳を介して仔に与える影響評価., 第13回次世代を担う若手ファーマ・バイオフォーラム., 富山, 2014年9月.
5. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 雄親曝露による非晶質ナノシリカの次世代影響評価., 第87回日本生化学会大会., 京都, 2014年10月.
6. 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 瀧村優也, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一徹, 松田敏夫, 角田慎一, 東阪和馬, 堤 康央: 雄親曝露に着目した非晶質ナノシリカの次世代影響評価., 日本薬学会第135年会., 神戸, 2015年3月.

H. 知的財産権の出願・登録状況

① 特許取得

該当無し

② 実用新案登録

該当無し

その他

該当無し

研究協力者

大阪大学薬学研究科薬物治療学分野(職員1名・大学院生/学生6名): 田熊一徹准教授、平松直樹、前田優子、田中辰典、長谷部茂、梅木孝弘、岡 智史

【国際学会発表：合計0件】

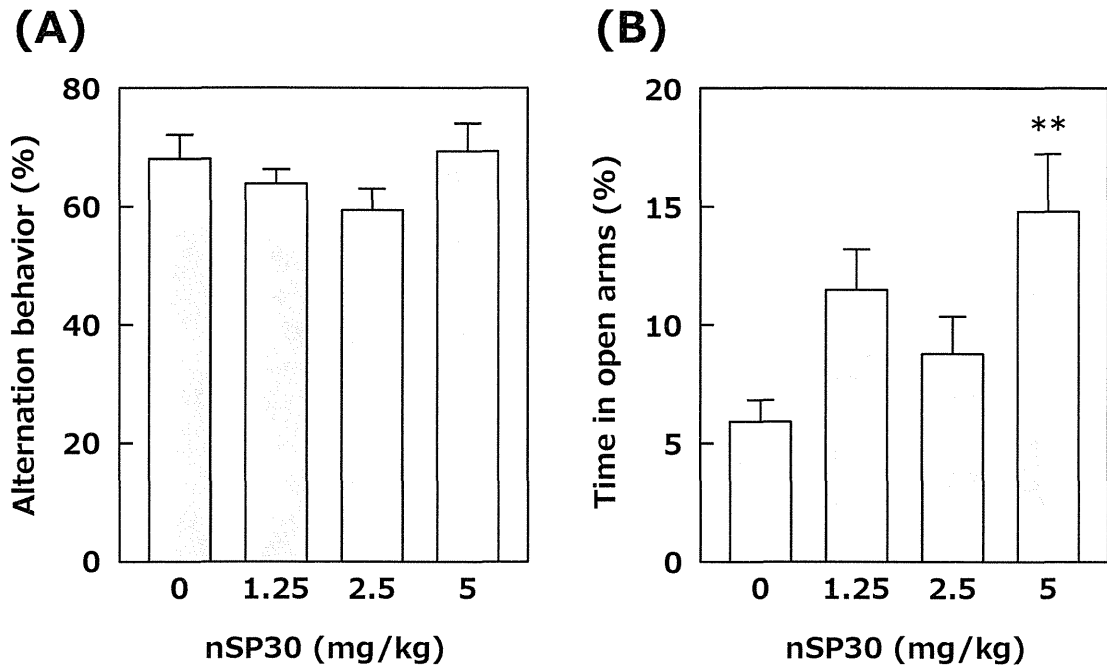


図1. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの短期作業記憶および不安様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9-10週齢時にY字迷路試験(8分)(A)および高架式十字迷路試験(5分)(B)を行った。(A) 自発的交替行動変化率, (B) オープンアームでの滞在時間割合。データは, 平均±SEMで示した。** $P < 0.01$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。

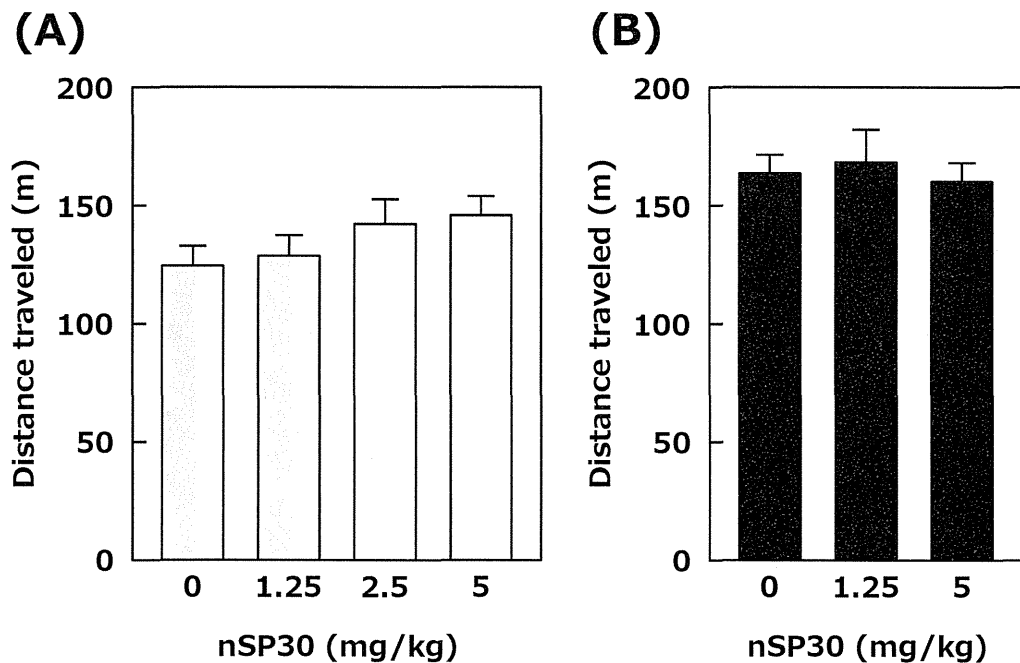


図2. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの自発運動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時にオープンフィールド試験(90分)を行った。データは90分間の総移動距離で, 平均±SEMで示した。

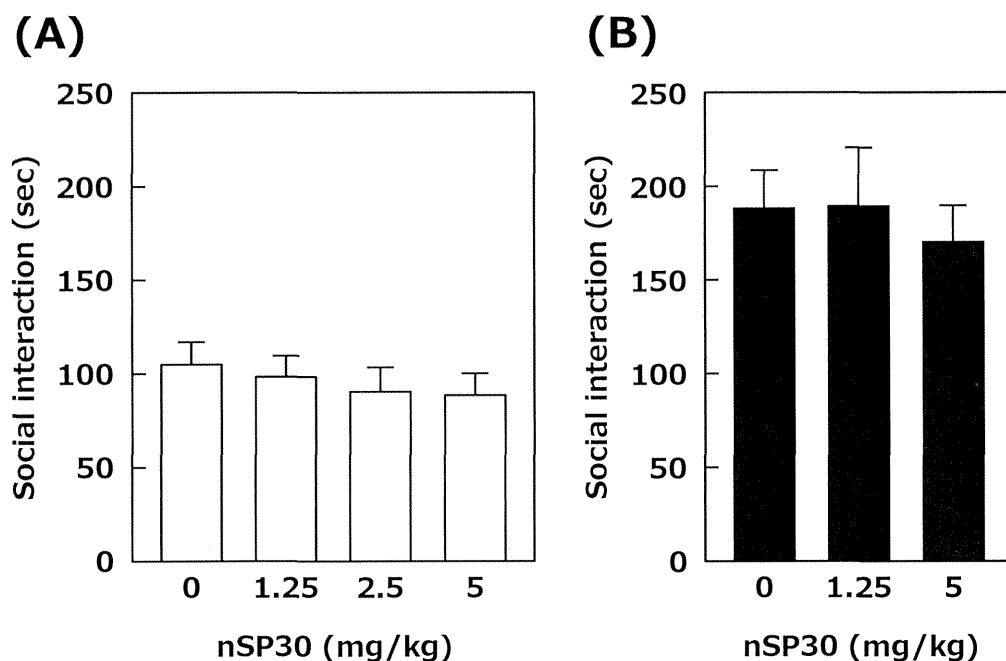


図3. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの社会性行動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時に社会性相互作用試験(20分)を行った。データは20分間の嗅覚行動時間で, 平均±SEMで示した。

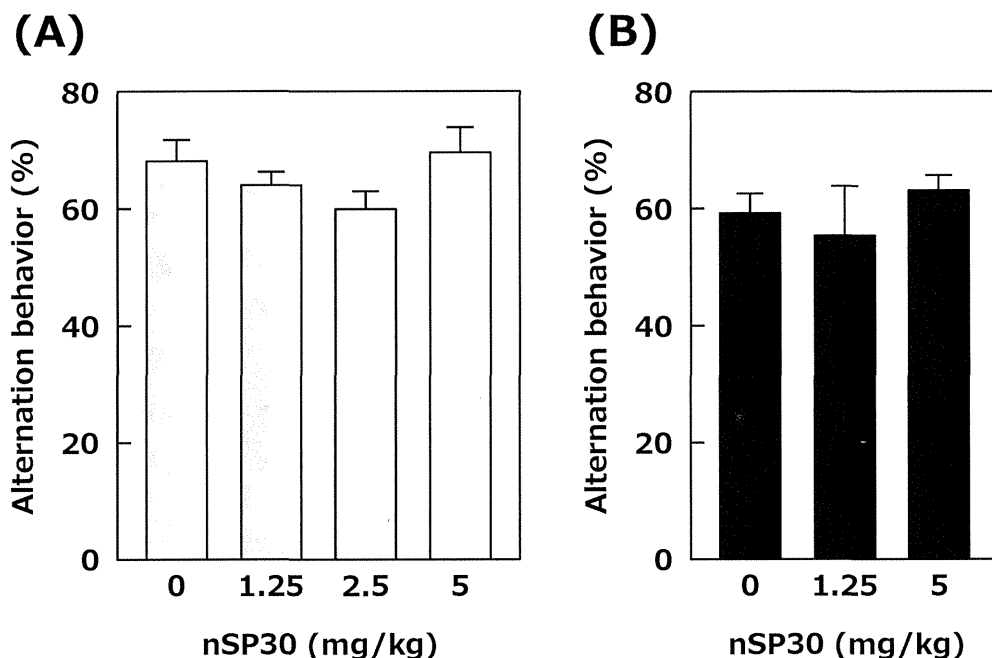


図4. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの短期作業記憶に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時にY字迷路試験(8分)を行った。データは自発的交替行動変化率で, 平均±SEMで示した。

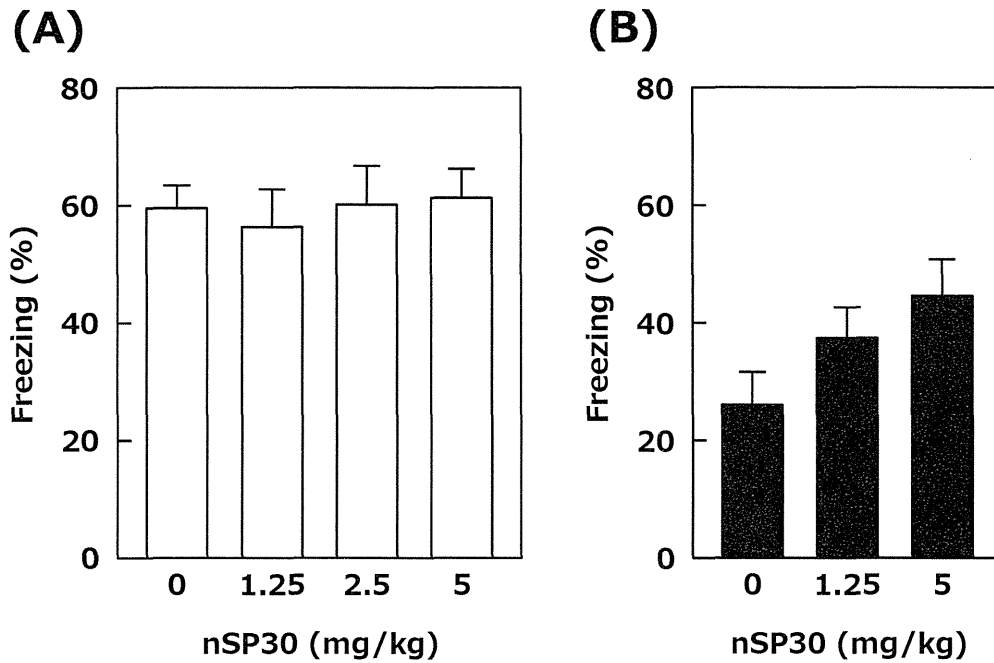


図5. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの文脈的記憶能に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 10-11週齢時に恐怖条件付け文脈学習試験を行った。文脈依存試験(3分)は, 条件付けの24時間後に行った。データは文脈依存試験時の総すみ行動時間割合で, 平均 \pm SEMで示した。

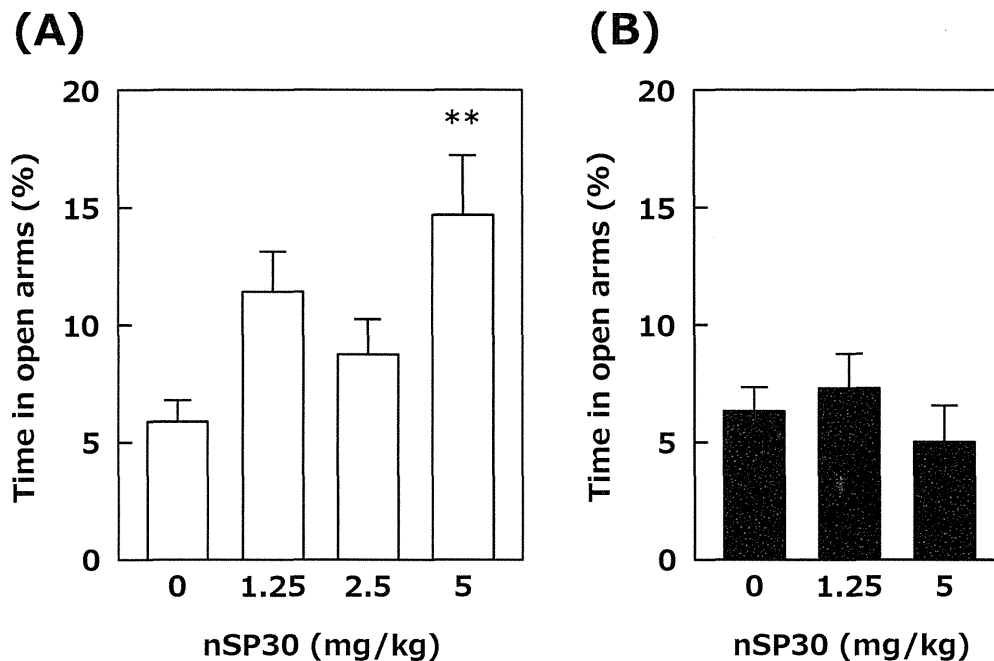


図6. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの不安様行動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時に高架式十字迷路試験(5分)を行った。データはオープンアームでの滞在時間割合で, 平均 \pm SEMで示した。** $P < 0.01$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。