

物質を種々の濃度で添加した。24 時間後、培養上清を回収し定量を行った。Positive control として 0.2% Tween-20 処理群、Negative control はナノ物質無添加群とした。

### C. 研究結果（次項 D にまとめて記載する）

#### D. 考察

##### 1. Real-time PCR による解析

昨年度の検討でマイクロアレイ解析により C-CPE、Ib 添加によりコレステロール生合成系遺伝子の発現が有意に低下することが示された。実際に Real-time PCR を行いコレステロール生合成系遺伝子群の発現が低下するかの検討を行った（図 1）。その結果、Hmgcs1、Fdft1、Fdps、Sqle、Cyp51、Sc4mol、Nsdhl、Pmvk、Idi1 の発現が顕著に低下することが示された。その他、細胞接着に関わる Dsg3 (デスモグレイン)、GPCR に結合する Arrdc4 (アレスチン)、癌転移や浸潤を阻害する内在性ペプチダーゼ阻害物質 Timp3 (tissue inhibitor of metalloproteinase 3)、上皮細胞のエンドサイトーシスに關与する Rin1 (Ras and Rab interactor) などの発現低下が確認された。またマイクロアレイ解析において発現上昇が示されていた遺伝子群についても Real-time PCR 解析を行った。膜の裏打ちタンパク質結合体 アンキリン遺伝子 Shank2 (SH3/ankyrin domain gene)、エンドソーム輸送に関わる分子ソーティングネクシン遺伝子 Snx21 (sorting nexin family member 21)、糖鎖修飾に関わるフコシルトランスフェラーゼ遺伝子 Fut7 (fucosyltransferase7) の発現上昇が確認された。

##### 2. SREBP2 の関与に関する検討

コレステロール生合成系遺伝子の発現低下がみられ、その程度がバリア機能低下と相関していたことからコレステロールと TJ バリア機能との関連性が示唆された。そこでコレステロール生合成系遺伝子を一括して制御することが報告され

ている SREBP2 に着目し、C-CPE 処理による影響を検討した。その結果、C-CPE 処理により SREBP2 の発現が低下することが明らかとなった（図 2）。次に SREBP2 のノックダウン実験を行った。siRNA SREBP2 処理により EpH4 細胞の SREBP2、Hmgcs1、Cyp51 の発現低下を確認した（図 3）。SREBP2 ノックダウン EpH4 細胞を Transwell に播種し、TEER を計測した。その結果、コントロールに比べ TEER の上昇が抑えられた（図 4）。コレステロールは、TJ の足場となる細胞膜上の特定ドメインの安定性に関わっていることから、SREBP2 ノックダウンにより、細胞膜上のコレステロールが不足することで TJ バリア形成が不安定になり TEER の上昇の抑制につながったと考えられる。

ナノ物質添加で SREBP2 の発現が低下することが確認されれば安全性評価のマーカーとして使用できることが期待される。

##### 3. ナノマテリアルの上皮バリア機能に与える影響

Eph4 細胞に 10nm ナノ銀を 1  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 10  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で処理し、経時的に TEER を計測した結果、処理後 24 時間でいずれの濃度においても TEER の変動は確認されなかった（図 5）。ナノ銀に関しては使用濃度範囲ではバリア機能に影響は与えないものと思われた。ナノ銀は高価でありさらに高濃度での検討は実施していない。

Eph4 細胞に 10nm, 50nm, 300nm ナノシリカをそれぞれ 200  $\mu\text{g}/\text{ml}$ , 500  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の濃度で処理し、TEER を計測した結果、処理後 12 時間後より 10nm ナノシリカ処理の細胞で TEER の低下が確認された（図 6）。したがってナノシリカはサイズ依存的にバリア機能を低下させることが示された。粒子径が小さいほど影響が大きいことは、以前、肝臓に対する毒性を検討した時の結果と同様であった。

#### 4. ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現変動

Eph4 細胞に 10nm, 50nm, 300nm ナノシリカをそれぞれ 500 µg/ml の濃度で 24 時間処理後の cDNA を用い、Real-time PCR を行った。その結果を図 7 に示す。10nm ナノシリカ処理の細胞でマーカー候補遺伝子(Timp3, Snx21, Hmgcs1, SREBP2, Dsg3, Arrdc4)の発現上昇が確認された。Snx21 は C-CPE 添加時発現上昇が見られた遺伝子でナノシリカによる影響と相関があった。しかしながら他の遺伝子は C-CPE 添加時に顕著に発現低下が見られたものであり、予想とは逆の結果であった。ナノシリカがバリア機能ではなく細胞毒性をもたらした結果、遺伝子発現が変化した可能性を考え、LDH assay による細胞障害性試験を実施した。その結果、10nm ナノシリカ添加では用量依存的な細胞毒性が観察された (図 8)。C-CPE は細胞毒性のない濃度条件で行っている。したがってナノシリカの場合、細胞毒性がバリア機能の評価に影響を与え、C-CPE と異なる結果をもたらしたと考えられる。図 7 の結果では Timp3、Snx21、HMGCS1、DSG が顕著に増加していることから細胞毒性のマーカー遺伝子として使用できる可能性が期待される。

#### 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、特異的に変動する遺伝子を抽出した。その結果、C-CPE によりコレステロール生合成系の遺伝子群が一斉に発現低下することを見出した。コレステロール生合成系の遺伝子発現を一括して制御する SREBP2 に着目し解析したところ、C-CPE 処理により SREBP2 の発現が低下し、バリア機能も同時に低下することを見出した。次にナノ粒子を用いてバリア機能に与える影響を観察したところナノシリカがサイズ依存的にバリア機能を低下させることが明らかと

なった。しかしながらナノシリカと C-CPE では抽出してきた遺伝子発現に与える影響が異なり、本研究期間内ではバリア機能に焦点をあてたナノ粒子の安全性評価マーカーの同定には至らなかった。今回、限られたナノ粒子を用いての検討であったことから今後、種々の粒子を用いて検討を続けることにより有効なマーカー遺伝子の同定につなげたいと考えている。

#### 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 2 件】

1. 関 昌孝、井口 大輔、早石 知浩、吉田 有裕美、渡利 彰浩、近藤昌夫、八木清仁：Tight junction binder による上皮バリア制御における遺伝子発現変動の解析.、日本薬学会第 136 年会、横浜、2016 年 3 月。
2. 井口 大輔、早石 知浩、Susanne M. Krug、竹田 浩之、Michael Fromm、渡利 彰浩、澤崎 達也、八木 清仁、近藤 昌夫：Tricellular tight junction binder, angubindin-1, の創製とバリア制御活性解析.、第 31 回日本 DDS 学会学術集会.、東京、2015 年 7 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

該当なし

## その他

該当なし

## 研究協力者

渡利 彰浩、井口 大輔、関 昌孝、  
吉田 有祐美

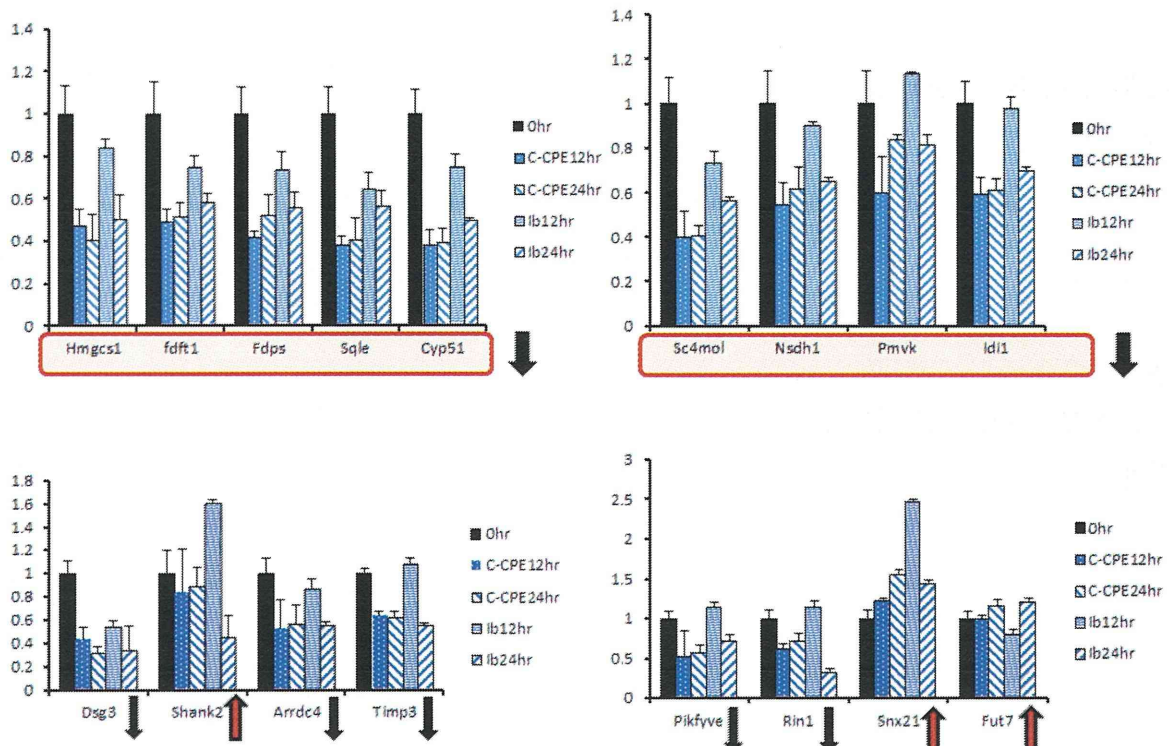


図1 Real-time PCR解析. 上段9遺伝子はコレステロール生合成系の遺伝子発現を示す。矢印は下向きが発現低下、上向きが発現上昇した遺伝子を示す。

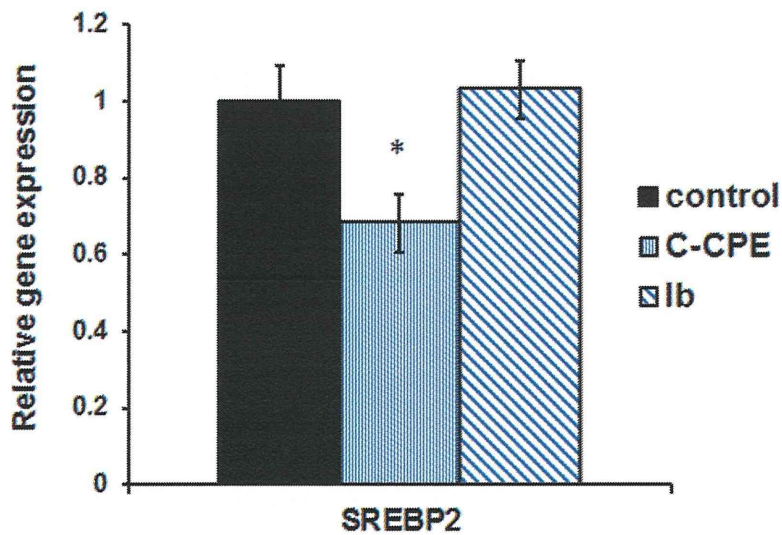


図2 TJBによるSREBP2の発現制御. Eph4細胞をC-CPEまたはIbで24時間処理後、Real-time PCR解析を行った。\*  $p < 0.05$  vs control.

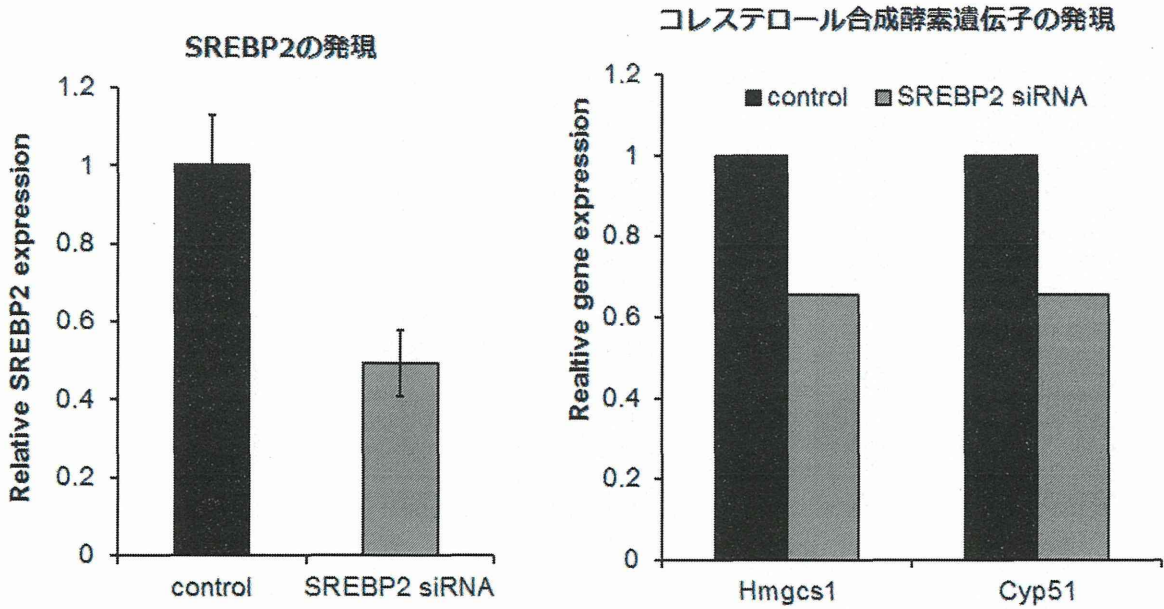


図3. SREBP2のノックダウン解析 Eph4細胞にSREBP2 siRNAを72時間処理しSREBP2、コレステロール生合成経路遺伝子 HMGS1、Cyp51の遺伝子発現をReal-time PCRで解析した。

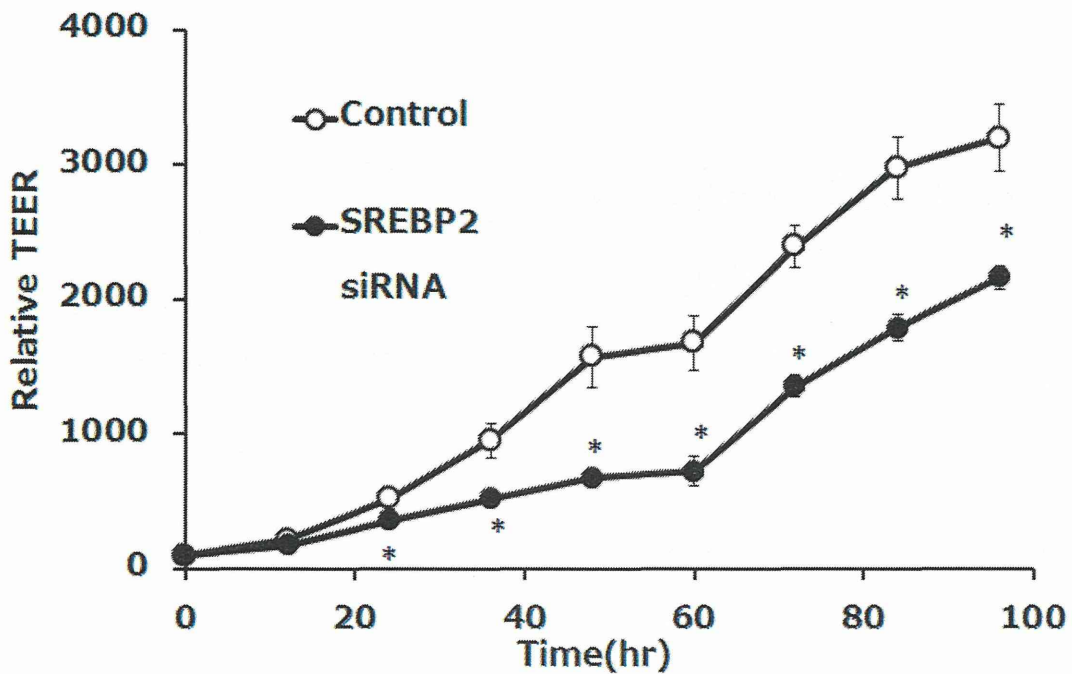


図4 SREBP2ノックダウンによるバリア機能低下. Eph4細胞にSREBP2 siRNA処理を33時間行い、細胞を Transwell播種後、膜電気抵抗値 (TEER)を測定した。\* p < 0.05 vs control.

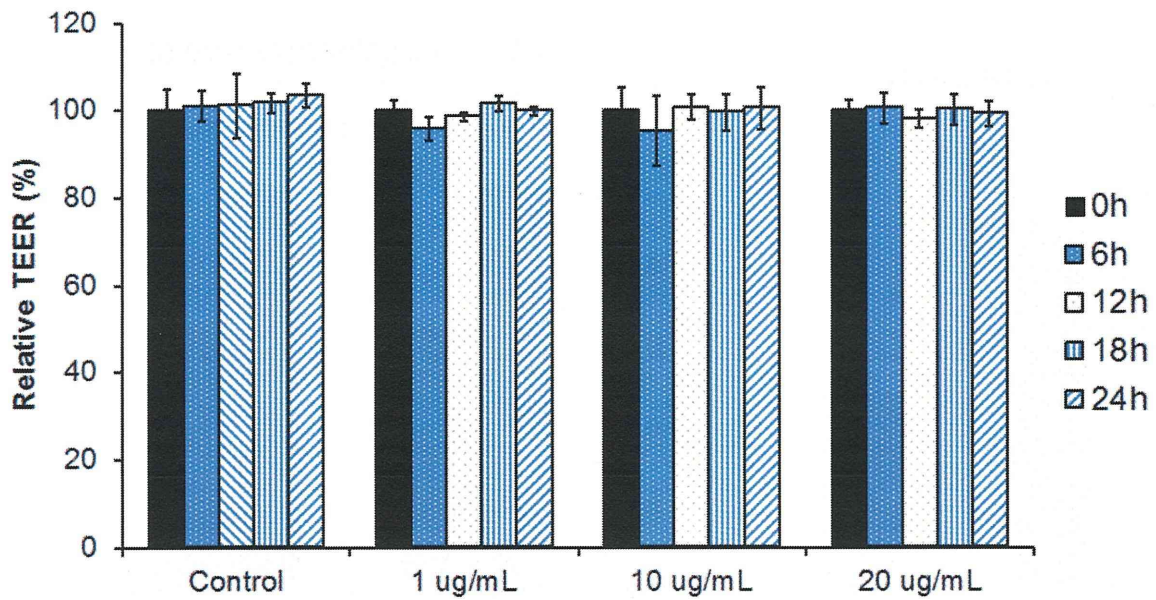


図5 ナノ銀の上皮バリア機能への影響. 粒子径10nmのナノ銀をEph4細胞に添加し、6時間おきにTEERを測定した。

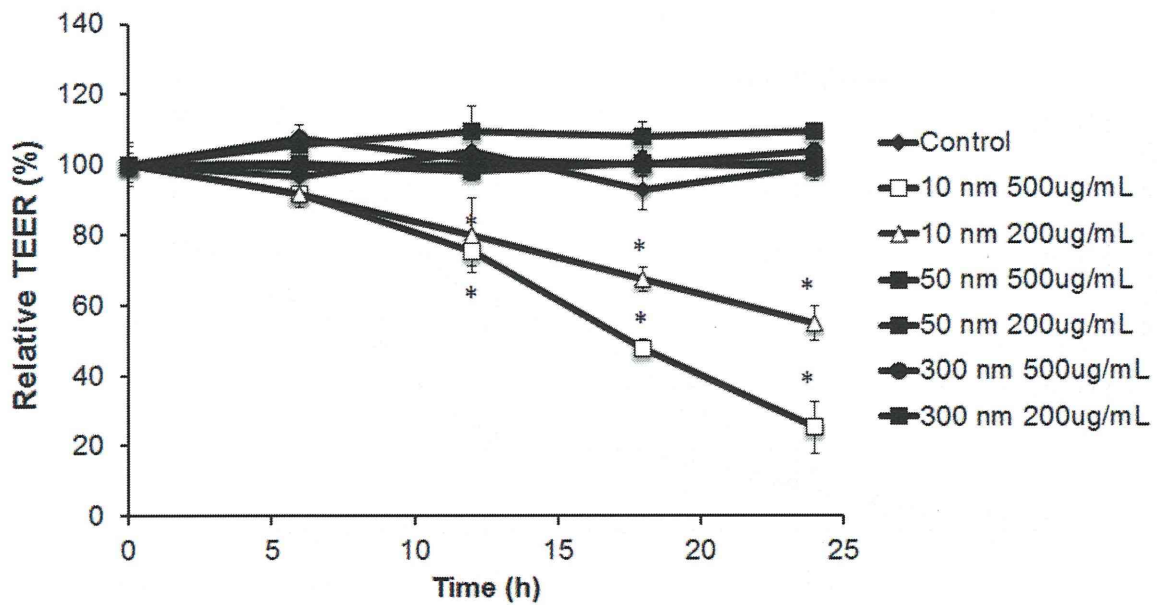


図6 ナノシリカの上皮バリア機能への影響. 粒子径10、50、300nmのナノシリカをEph4細胞に添加し、6時間おきにTEERを測定した。\* p < 0.05 vs control.

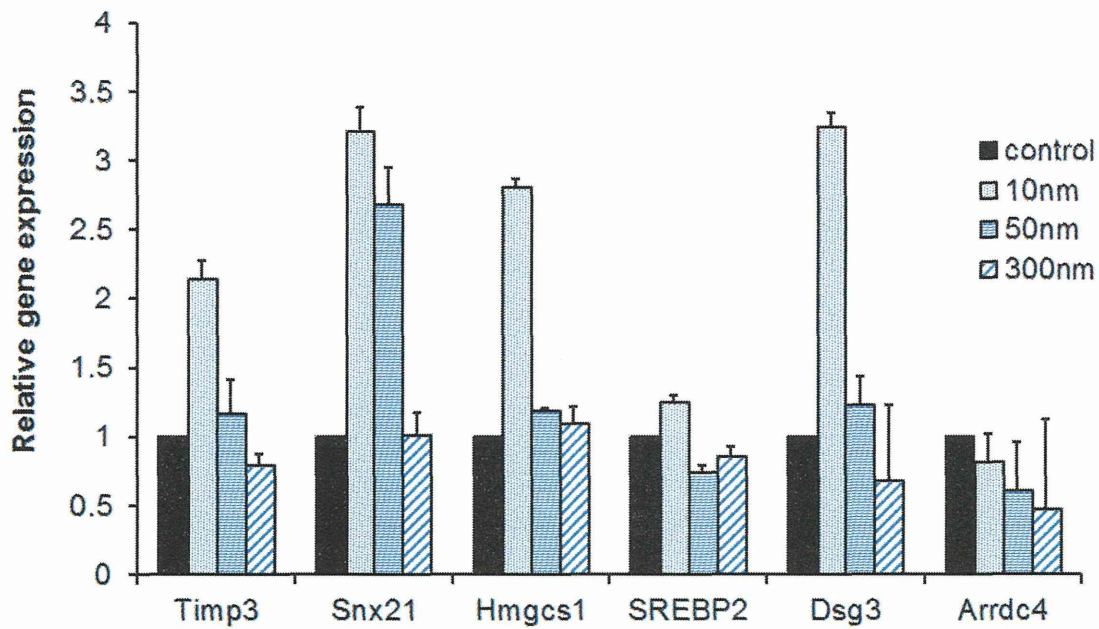


図7 ナノシリカ作用時のマーカー候補遺伝子の発現。Eph4細胞に粒子径10、50、300nmのナノシリカを500µg/mlの濃度で24時間処理し、Real-time PCR解析を行った。

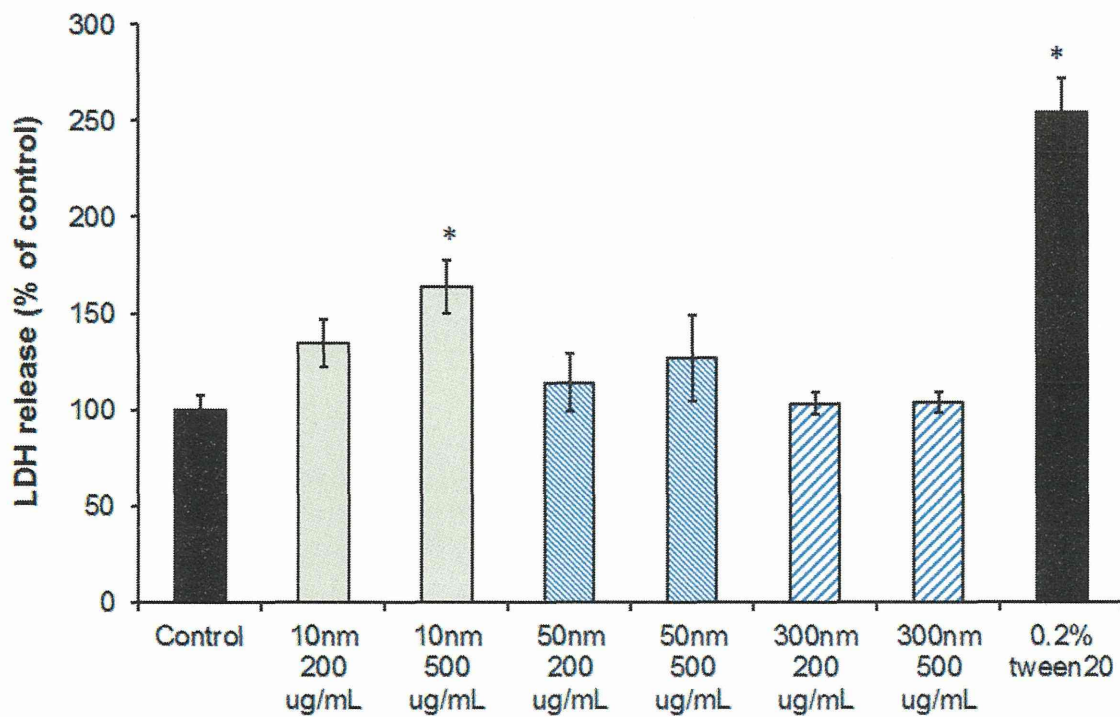


図8 ナノシリカ作用時の細胞障害性。Eph4細胞に粒子径10、50、300nmのナノシリカを作用させ、24時間後に培養上清中のLDH量を定量した。\* p < 0.05 vs control.

## 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 田熊 一敬 国立大阪大学 大学院歯学研究科 薬理学教室

### 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。これまでに、粒子径 30 nm の nSP (nSP30) を曝露した雄親由来の仔において、不安様行動の低下を認めた。今年度は、この不安様行動の減弱に関わる分子機序の解明を試みた。雄性 BALB/c マウス (10 週齢) に、nSP を 5 mg/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、雄性の子について 9 週齢時に遺伝子発現の変化を解析した。マイクロアレイ解析において、nSP30 群の視床下部/下垂体では対照群と比べて、732 個の遺伝子発現レベルが 2 倍以上となっていること、690 個の遺伝子発現レベルが 0.5 倍以下となっていることを認めた。また、本結果の遺伝子セットエンリッチ分析により、ホルモン活性に関係する因子群で高い関連性を認めた。マイクロアレイ解析で大きな発現増加が認められた pituitary homeobox 1 (PITX1)、プロラクチン (PRL)、クロモグラニン A (CGA) および成長ホルモン (GH) について半定量的 PCR を行い、nSP30 群の視床下部・下垂体でこれら分子の mRNA レベルが増大していることを確認した。以上より、nSP30 の雄親曝露により、仔の視床下部・下垂体における下垂体ホルモン PRL、CGA、GH およびその上流遺伝子である転写活性因子 PITX1 の遺伝子発現が亢進する可能性が示され、これら分子と不安様行動の減弱との関連性が考えられた。

### 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影響することが示され、これまでに、母親の環境要因が次世代に及ぼす影響に関する研究が数多くなされてきた。また近年、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ている。我々は昨年度までに、粒子径 30 nm 非晶質ナノシリカ (nSP30) を曝露した雄親由来の仔において、不安様行動の低下を認めた。今年度は、この不安様行動の減弱に関わる分子機序の解明を目的として、発現変動遺伝子の探索を行った。

### 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 30 nm の nSP (nSP30) を 5 mg/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、雄性マウスを F1 動物として用いた。

#### 2. 脳組織由来 cDNA の調製



9 週齢時の雄性マウスより摘出した全脳より視床下部および下垂体領域を分画し、cDNA 標品を調製した。

### 3. マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の解析

調製した視床および下垂体由来 cDNA を用いて、マイクロアレイ解析を行った。有意水準を  $P < 0.05$  として 2 群比較を行い、対照群と比べて 2 倍以上の発現上昇あるいは 0.5 倍以下の発現減少を示す遺伝子を抽出した。また、発現変動が認められた遺伝子群について、遺伝子セットエンリッチ分析 (GSEA) を行った。

### 4. mRNA 発現量変化の解析

マイクロアレイ解析および GSEA により選択した分子を標的として PCR を行い、反応産物をアガロースゲル電気泳動で分離後、 $\beta$ -actin を対象とするデンシトメトリー解析により定量した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. マイクロアレイ法による発現変動遺伝子の解析

nSP30 群の視床下部/下垂体では対照群と比べて、732 個の遺伝子発現レベルが 2 倍以上となっていること、690 個の遺伝子発現レベルが 0.5 倍以下となっていることを認めた。また、本結果の遺伝子セットエンリッチ分析により、ホルモン活性に関係する因子群で高い関連性を認めた (図 1)。

#### 2. mRNA 発現量変化の解析

ホルモン活性に関係する因子のうち発現増加の程度が高かった pituitary homeobox 1 (PITX1)、プロラクチン (PRL)、クロモグラニン A (CGA) および成長ホルモン (GH) について半定量的 PCR を行った (図 2)。nSP30 群の視床下部・下垂体では、対照群と比べて PITX1 mRNA が約 16.6 倍、PRL mRNA が約 30.7 倍、CGA mRNA が約 19.1 倍および GH mRNA が約 10.1 倍のレベルで発現上昇していることを認めた。す

なわち、nSP30 の雄親曝露により、仔の視床下部・下垂体における下垂体ホルモン PRL、CGA、GH およびその上流遺伝子である転写活性因子 PITX1 の遺伝子発現が亢進する可能性が示され、これら分子と不安行動発現との関連性が考えられた。

### 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】

- 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, 田熊一敬, 松田敏夫, 東阪和馬, 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 42 回日本毒性学会学術年会., 金沢, 2015 年 6 月.
- 難波佑貴, 吉岡靖雄, 森下裕貴, 清水雄貴, 吾郷由希夫, 田熊一敬, 松田敏夫 1, 長野一也, 東阪和馬, 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., 第 65 回日本薬学会近畿支部総会・大会.,

富田林, 2015年10月.

- 笠原淳平, 東阪和馬, 吉岡靖雄, 青山道彦, 田中康太, 西川雄樹, 真木彩花, 田熊一徹, 長野一也, 松田敏夫, 堤康央: ナノ銀粒子の28日間連日経鼻曝露による脳への影響評価., 日本薬学会第136年会, 横浜, 2016年3月.

**【国際学会発表: 合計1件】**

- Yuki Namba, Yasuo Yoshioka, Yuki Morishita, Yuya Takimura, Yuki Shimizu, Yukio Ago, Kazuhiro Takuma, Toshio Matsuda, Kazuma Higashisaka, Yasuo Tsutsumi: Transgenerational effects of silica nanoparticles focused on paternal exposure, The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology., Jeju City, South Korea, 2016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**

該当無し.

**研究協力者**

松田敏夫, 吾郷由希夫, 長谷部茂, 前田優子, 渡部雄二

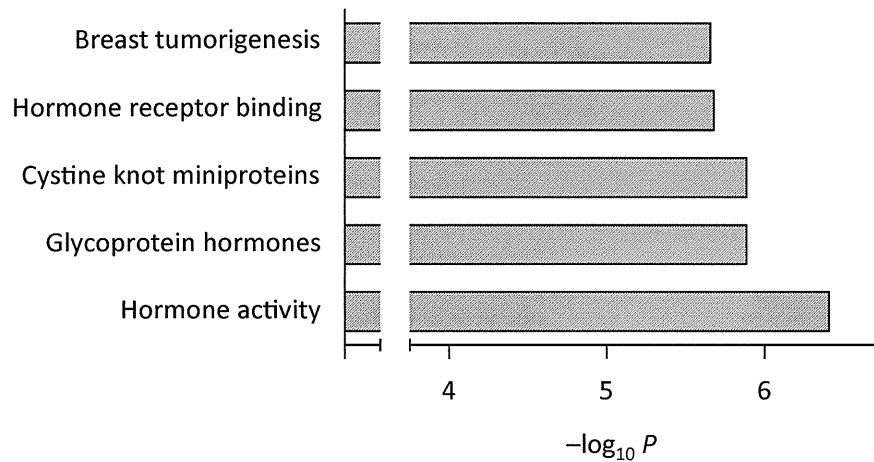


図1. ナノマテリアルを曝露した雄親マウス由来の仔における視床下部・下垂体での遺伝子セットエンリッチ分析. 雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与した. 対照群には生理食塩水を投与した. 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた. 出生した雄性仔について, 9週齢時に視床下部・下垂体よりcDNAを調製し, マイクロアレイ解析ならびに遺伝子セットエンリッチ分析を行った. データは大きな関連性が認められた遺伝子群を示す.

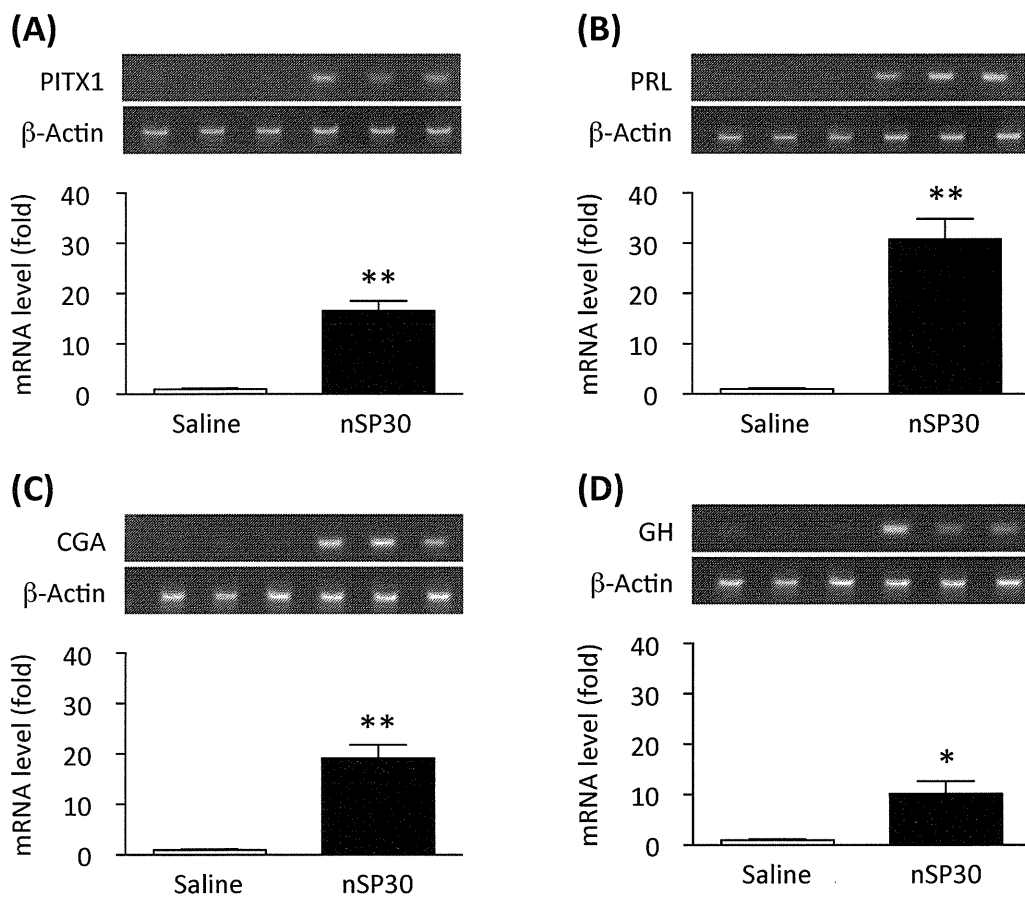


図2. ナノマテリアルを曝露した雄親マウス由来の仔における視床下部・下垂体での遺伝子発現変化. マイクロアレイ解析ならびに遺伝子セットエンリッチ分析により, 著明な発現変動と大きな関連性を認めた4つの分子 [pituitary homeobox 1 (PITX1), プロラクチン (PRL), クロモグラニンA (CGA), 成長ホルモン (GH)] を対象として半定量的PCRを行った. (A) PITX1, (B) PRL, (C) CGA, (D) GH. データは,  $\beta$ -アクチンを用いて補正し, 対照群 (生理食塩水を投与した雄親由来の仔) を1とする平均 $\pm$ SEMで示した ( $n=3$ ). \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , 対照群に対して (Student's  $t$ -test).

## ナノマテリアルの胎盤絨毛細胞への影響に関する研究

研究分担者 中島彰俊 吉野修 齋藤滋 富山大学大学院医学薬学研究部 産科婦人科学

### 研究要旨

ナノマテリアルは食品および化粧品にも多く用いられ、その使用量は急激に伸びている。ナノマテリアルの曝露は日常生活に深く根付いており、成人への影響を検討するのはもちろんのこと、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要があるが、それらの関係性を示す報告はないのが実情である。一方で、胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、胎児への直接的評価に比し胎盤への影響は検討しやすい。そこで今回、正常妊娠に重要な役割を持つ絨毛外栄養膜細胞(EVT)へのナノマテリアルの影響を評価し、妊娠への影響を検討した。これまで、nAg および nPt が EVT 細胞に有意な増殖抑制を示すこと、nPt が EVT 細胞にオートファジーを誘導することを報告してきた。EVT セルラインである HchEpC1b 細胞に加え HTR8 細胞においても、オートファジー欠損細胞では Wild type の細胞に比し、nPt による細胞増殖抑制が有意に増強されることを確認した。また、妊娠マウスの *in vivo* 実験において、nSP70 投与および母体内好中球除去は、好中球除去単独群に比し、有意に胎盤細胞の細胞死を誘導し、ER ストレス応答の破綻も誘導することが分かった。さらに、Spongiotrophoblast 層において、血管の狭小化も誘導し、胎盤血流不全に関与していることが分かった。つまり、母獣血中の好中球は胎盤へのナノマテリアル排除機構として働く可能性がある。これまでナノマテリアルの蓄積が胎盤形成不全に働くことを報告してきたが、好中球はナノマテリアルを取り込むことで、胎盤のガードマンとして働いている可能性がある。

### A. 研究目的

ナノマテリアルは食品および化粧品にも多く用いられ、その使用量は急激に伸びている。そして、この研究班を中心にその安全性の評価を行っている。ナノマテリアルの曝露は日常生活に深く根付いており、成人への影響を検討するのはもちろんのこと、未来への影響を考慮すれば胎児への影響の有無を早急に評価する必要がある。しかし、それらの関係性を示す報告はないのが実情である。

妊娠期間は3半期と言われ、3つの期間に大別される。正常妊娠は絨毛外栄養膜細胞(EVT)が子宮筋層に浸潤することによって維持される。

しかし、妊娠初期から中期にかけての EVT 浸潤不全を伴った胎盤は、妊娠高血圧症候群や子宮内胎児発育遅延など、胎児および母体に重篤な影響を与える合併症に関連する。一方、胎盤形成不全は胎児発育不全に直結しており、ナノマテリアルの胎盤への影響は間接的に胎児への影響の検討にも繋がる。

我々はこれまで、EVT 浸潤不全の原因として、オートファジー（細胞内恒常性維持機構）不全が関与することを報告してきた。さらに、この研究班での検討結果から、nPt は EVT セルラインにオートファジーを誘導するが、nAg はオートファジーを誘導しないことを報告してきた。今回我々は、

妊娠初期の胎盤形成に重要な役割を果たす EVT におけるナノマテリアルとオートファジーの関与を検討したので報告する。

## B. 研究方法

### 1. セルラインおよびマテリアル

絨毛外栄養膜細胞を SV40 にて Transformation したセルラインである HTR8/SV40neo 細胞およびヒトパピローマウイルス E6/E7 および hTERT を導入して不死化した HChEpC1b 細胞を実験に供した。また、HTR8/SV40neo 細胞にオートファジー誘導の必須分子 Atg4B に対し、機能阻害作用を有する mStrawberry-Atg4B<sup>C74A</sup> を恒常的に発現した HTR8-Atg4B<sup>C74A</sup> 細胞、およびその Control ベクターのみを導入した HTR8-mSt 細胞を作成した。また、同様に HchEpC1b-Atg4B<sup>C74A</sup>, HchEpC1b-mSt も作成した。ナノマテリアルは nPt を用いて、培養細胞の培養液中に加えることで、実験に使用した。

### 2. 細胞増殖の評価

WST-1 アッセイにて細胞増殖能を評価した。

### 3. 好中球除去および nSP70 投与マウスにおける免疫染色

上記マウスの胎盤は、共同研究者である大阪大学薬学研究学毒性学分野 堤康央先生より分与いただいた。免疫染色は BIP, PDI 抗体を使用し、TUNEL 染色は和光純薬のキットを使用した。また、血管腔面積は Image J software を使用した。

## C. 研究結果

### 1. nPt はオートファジー欠損 HTR8 細胞内に対し細胞障害性を示す

nPt は EVT セルラインである HchEpC1b 細胞の増殖を抑制する。さらに、同セルラインにおいてオートファジーを欠損させると、nPt の細胞増殖抑制が増強されることを報告してきた。今回、別の EVT セルラインである HTR8/SVneo 細胞においても、オートファジー欠損細胞において nPt による細胞増殖抑制が増強されることを確認し

た。そこで、これら胎盤細胞における nPt 取り込み・排出にオートファジーが如何に関与するかをさらに検討した。

### 2. nSP70 投与および好中球除去による胎盤障害メカニズムとオートファジーの関与: 小胞体 (ER) ストレスおよび細胞死

nSP70 はマウス胎盤の Spongiotrophoblast (Sp) 層を障害し、胎子の発育抑制に働く。さらに、母体血液中の好中球を除去すると、この障害性はさらに強まる。これまでにヒト妊娠高血圧症候群胎盤では、ER ストレスが観察されることが報告されてきた。そこで、胎盤の Sp 層における ER ストレスマーカーである BIP および PDI の発現を検討した。BIP および PDI は無処理群、好中球除去のみ群、nSP70 単独群において、発現量に差を認めなかった。一方で、(nSP70+好中球除去) 群では BIP、PDI 共に発現量が低下していた。また、(nSP70+好中球除去) 群においては Sp 層において、TUNEL 陽性の死細胞が増加していた。さらに (nSP70+好中球除去) 群では他群に比し、Labyrinth 層における血管腔の狭小化および、Sp 層直下の血管腔も狭小化することが分かった。さらに、血管の狭小化と共に血管内の赤血球数も減少していることが示唆された。

## D. 考察

以上より好中球除去下では、nSP70 の胎盤障害が増強されることが示唆された。nSP70 の過剰投与 (過剰蓄積?) は細胞内のストレス応答能を破綻させる可能性がある一方で、好中球はその過剰なナノマテリアルの攻撃を緩和する緩衝剤の役割を果たすことが推察された。つまり、胎盤に取り込まれる前の血中では好中球が働いて、胎盤へのナノマテリアルの到達を予防しているのかもしれない。しかし、好中球のナノマテリアル取り込みを直接証明はできておらず、それらの証明は現在の課題である。

## E. 結論

好中球は細菌など生体外微生物の除去に関わるが、それに加え胎盤に流れ込むナノマテリアル

をも取り込むことで、胎盤への障害を減少させている可能性がある。我々はこれまでにナノマテリアルが胎盤細胞の障害に働くことを報告してきたが、好中球も生体内でその役割の一旦を担っている可能性がある。

#### F. 健康危険情報

該当なし

#### G. 研究発表

【論文】

なし

【総説・その他】

なし

#### ② 学会発表

【シンポジウム等：合計 0 件】

なし

【国内学会発表：合計 0 件】

なし

【国際学会発表：合計 0 件】

なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況

##### ① 特許取得

なし

##### ② 実用新案登録

なし

#### その他

なし

#### 研究協力者

なし

## 乳幼仔期および成体期のナノ素材曝露による 行動への影響に関する研究

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の機能に何らかの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や、成人期において、こうした素材への曝露がその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すのかについてはこれまで不明であった。そこで、本研究ではこれまでに実験動物であるマウスを用いて、母乳を介した乳幼仔期のナノ素材（直径 10nm のナノ銀（nAg10）あるいは銀イオン（Ag<sup>+</sup>））曝露が脳機能に及ぼす影響を各種行動解析により評価してきた。また、昨年度は、nAg10 あるいは Ag<sup>+</sup> を 4 週間にわたって経鼻投与した成体マウスにおいて、嗅覚が過敏になっている可能性が示された。そこで本年度は、同様の投与を行った成体マウスに対する行動解析結果を用い、嗅覚以外の脳機能への影響について、母乳を介して乳幼仔期にナノ素材を曝露した群との比較を行った。その結果、nAg10 あるいは Ag<sup>+</sup> を 4 週間にわたって経鼻投与した成体マウスでは、自発活動量、不安様行動、社会的行動、認知機能に関して、対照群との間に有意な差は認められなかった。今回の研究に使用したナノ素材あるいはその摂取量は、乳幼仔期に曝露した場合と同様、成体期に投与した場合でも、嗅覚以外の脳機能に影響を与えるものではないことが示唆された。

### 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。そのような微小な物質は、皮膚や粘膜などから吸収され、脳に移行することが知られている。しかし、脳神経系の発達に重要な胎生期・乳幼児期および、成人期において、こうした素材への曝露が脳の機能にどのような影響を及ぼしているのかを検討した研究はほとんどない。そこで、我々はこれまでに、実験動物のマウスを用いて、母胎を

介した胎生期のナノ・サブナノ素材（非晶質ナノシリカである nSP70、あるいはサブナノ白金である snPt1、snPt8）曝露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、胎生期の非晶質ナノシリカあるいはサブナノ白金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。また、母乳を介して乳幼仔期にナノ銀（nAg10）あるいは銀イオン（Ag<sup>+</sup>）への曝露を行ったマウスに対して、成体時に網羅的行動テストバッテリーで解析を行ったところ、感覚・知覚、運動機能、不安様行動やうつ様行動、社会的行動、痛覚感受性、認知機能などには曝露の影響は見られなかった。さ

らに、成体期における nAg10、Ag<sup>+</sup>への曝露がその後の行動にどのような影響を及ぼすのか検討するため、経鼻からの曝露を行った。その結果、成体マウスへの nAg10、Ag<sup>+</sup>の経鼻曝露は嗅覚機能に影響を及ぼす可能性が示された。そこで、本研究では、同様の経鼻曝露を行った成体マウスに対する行動解析結果を用い、嗅覚以外の脳機能への影響について、母乳を介して乳幼仔期にナノ素材を曝露した群との比較を行った。

## B. 研究方法

### 1. 被験体

成体マウスに対して、経鼻による nAg10、Ag<sup>+</sup>曝露を行う実験では、8 週齢の C57BL/6J 系統の雄マウスを使用した。

### 2. ナノ素材への曝露

成体雄マウスへの nAg10、Ag<sup>+</sup>曝露実験では、曝露群のマウスの鼻粘膜に nAg10 あるいは Ag<sup>+</sup>溶解液を 4 週間にわたって毎日投与した (5 μg/mouse/day)。統制群のマウスの鼻粘膜には溶解液を投与した。各群のマウスに対して、投与 29 日目以降に、オープンフィールドテスト、高架式十字迷路テスト、社会的行動テスト、Y-maze テスト、恐怖条件づけテストを行い、それらの結果を、母乳を介して乳幼仔期にナノ素材を曝露した群の結果と比較した。

### 3. 行動の評価

行動実験開始 30 分前までに被験体を実験室環境に馴化させた後、以下の各種行動テストを実施した：オープンフィールドテスト (活動性・情動性の評価)、高架式十字迷路テスト (不安様行動の評価)、新奇環境下社会的行動テスト (社会的行動の評価)、Y 字迷路テスト (作業記憶、固執傾向の評価)、恐怖条件づけテスト (記憶・学習機能の評価)

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

## D. 考察

成体期に、nAg10、Ag<sup>+</sup>を経鼻曝露された C57BL/6J のマウスでは、自発活動量 (図 1)、不安様行動、社会的行動に関して、対照群との間に有意な差は認められなかった。また、Y 字迷路テストにおいて、曝露群では、対照群と比較して、Alternation が低下している傾向が認められたが (図 2)、恐怖条件づけテストでは、曝露群と対照群との間に有意な差は認められなかった。また、これらの結果は、昨年度までに実施した、乳幼仔期に母乳を介して nAg10、Ag<sup>+</sup>に曝露されたマウスの行動解析結果と、同様であった。

これらの結果、今回の研究に使用したナノ素材あるいはその摂取量は、乳幼仔期に曝露した場合と同様、成体期に投与した場合でも、嗅覚以外の脳機能に影響を与えるものではないことが示唆された。

## 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および成体期でのナノ素材曝露が情動・認知機能・社会的行動などに及ぼす影響について評価した。今回は、nAg10、Ag<sup>+</sup>を成体マウスに経鼻曝露したが、同マウスの行動は、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なかった。また、これらの結果は、乳幼仔期のマウスへの曝露と同様の結果であり、曝露する時期に関わらず、nAg10、Ag<sup>+</sup>への曝露は、嗅覚以外の脳機能に影響を与えるものではないことが示唆された。

しかしながら、今回の結果は、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があるという点を考慮する必要がある。今後も、曝露量や被験体の系統、実験手続きなどを考慮し、ナノ・サブナノ素材曝露が行動に影響を及ぼす影響について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 0 件】**

該当なし

**【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（富山大学 研究推進機構 研究推進総合支援センター 教授/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・(教授)）

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・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・助教）

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）

腰高由美恵（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）

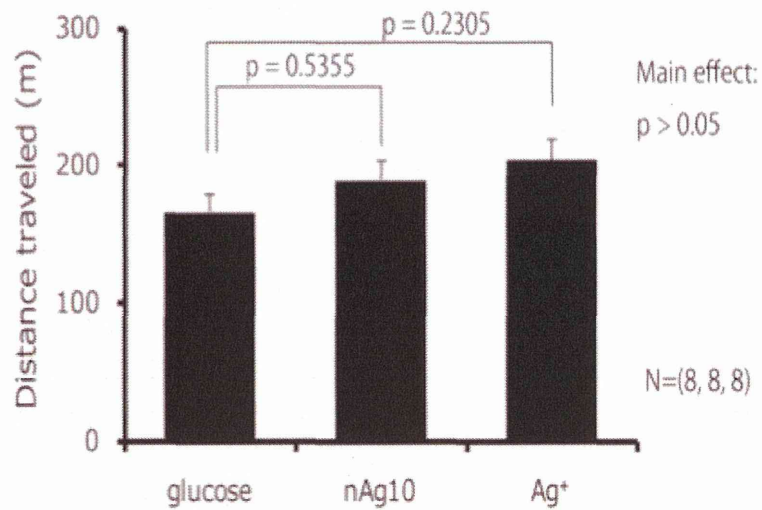


図1. 嗅覚以外の脳機能への影響評価-自発活動量。オープンフィールド内での60分間の移動距離を解析することで、成体期に、nAg10、Ag\*を経鼻曝露されたマウスの自発運動量を測定した（Open field test）。グルコースとnAg10、Ag+投与群間に有意な変化は認められなかった。

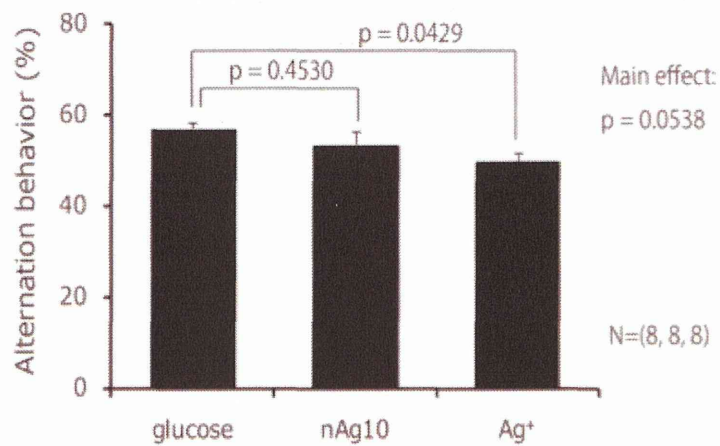


図2. 嗅覚以外の脳機能への影響評価-認知機能。成体期に、nAg10、Ag\*を経鼻曝露されたマウスに対して、Y字迷路テストを行った。アーム選択のうち、3回連続で異なるアームを選択した回数の割合を指標に、作業記憶を評価した（Y-maze test, Alternation behavior）。Ag+投与群はグルコース群に比較してAlternationが低下している傾向が認められた。

## ナノ白金を用いた角質バリア除去後のラットにおける 24 時間経皮投与毒性に関する研究

研究分担者 桑形 麻樹子 一財 食品薬品安全センター秦野研究所 病理学研究室

### 研究要旨

これまでに粒子径が異なる 2 種類のナノ白金 (1 および 20 nm、表面未修飾) を 28 日間 SD ラットに経皮投与 (6 時間/日) して生体への影響を検討した結果、雌雄ともに投与第 2 週以降に皮膚に潰瘍を伴う痂皮がみられ、病理組織学検査では真皮にまでおよぶ炎症組織像を確認した。また、ナノ白金の生体内分布を ICP-MS 解析により調べた結果、粒子径の小さいナノ Pt 投与群のみ皮膚および各組織に白金粒子が確認された。

そこで今年度は、ナノ白金の皮膚透過性を再検討するために皮膚表面バリアを破壊させて後にナノ白金を 24 時間経皮曝露した。ラット背部皮下をテープストリッピング (TP) により皮膚バリアを変化させた後に、粒子径 5 nm の表面がクエン酸修飾されたナノ白金 (1 mg/mL) を 24 時間連続貼付した後、ナノ白金の生体内動態 (皮膚、肝臓、血液) を ICP-MS 分析により検討した。その結果、TP 処理により皮膚バリアを破壊しても、ナノ白金は皮膚にのみ検出され、血液および肝臓中は検出限界以下であった。一般状態、体重推移、器官重量、病理組織学検査にはナノ白金投与に起因したと考えられる変化は認められなかった。透過型電子顕微鏡による貼付部位皮膚の観察から、白金粒子は皮膚の角質最上層に限局していた。さらに、樹状細胞の活性化を示唆する微細形態像が白金投与群で確認された。

以上の結果から、クエン酸修飾した粒径 5 nm のナノ素材の白金を 24 時間ラット背部に経皮投与した結果、皮膚バリアを破壊してもナノ白金は生体内には移行せず、急性毒性を示唆する結果は認められなかった。なお、なお白金と皮膚免疫応答との関連についてはさらなる検討が必要と考えられた。

### A. 研究目的

ナノ白金を用いた 28 日反復経皮毒性試験の結果、皮膚に潰瘍がみられ、さらに、ナノ白金への生体内への移行 (ICP-MS 分析を行ったすべての組織: 皮膚、下顎リンパ節、腸間膜リンパ節、胸腺、心臓、脾臓、肝臓、胚、腎臓、副腎、精巣および精巣上体) が確認された。

そこで、皮膚バリアが破壊された時の経皮投与によるナノ白金の皮膚透過性を再検討するために、テープストリッピング手法により皮膚バリアを破壊後、粒径 5 nm のナノ白金を 24 時間ラット背部皮膚に貼付し、皮膚、肝臓および血液内の

ナノ白金の分布および皮膚の形態学的変化、さらに生体への影響を調べた。

### B. 研究方法

#### 1. 被験物質および投与方法

被験物質は nanoComposix 社から購入した 5 nm 径のクエン酸表面修飾したナノ素材の白金 (Citrate BioPure™ Platinum, 1 mg/mL, Lot no. DAG2419,  $4.6 \pm 0.8$  nm) を用いた (図 1)。また、対照群として被験物質の溶媒である 2 mM クエン酸溶液を設定した。

ナノ白金の投与量は、入手検体をそのまま用い

て 1 mg/mL とした。ナノ白金は投与直前まで 4℃にて保管し、ボルテックスミキサー (KMC-1300V、Vision Scientific.Co.LTD.) で 30 秒攪拌した後、直ちに投与に用いた。

## 2. 皮膚バリアの破壊

皮膚バリアの破壊にはテープストリッピング (TP)法を用いた。即ち、バリカンおよびシェイバーにて背部皮膚を剃毛し、セロハンテープにて 20 回、背部皮膚表面を剥離させる処理を投与直前に 1 回実施 (TP 処理群) した。

## 3. 投与方法

ナノ白金投与群には、TP 処理群および未処理群を設定した。なお、溶媒投与群(2 mM クエン酸溶液、対照群)は TP 処理群のみ設けた。

投与は、化粧品、塗装、剥離した物質として経皮的に吸収された場合の毒性を検討するために背部に閉塞貼付した (経皮投与)。テガダーム (非吸収性フィルム) に 3x3 cm のリント布を置き、リント布上に被験物質を滴下 (2 mL/kg 体重) した後、皮膚にリント布およびテガダームを貼付し、プラスチックラップを巻いて被覆固定した。その上に粘着フォームパットおよび伸縮性粘着帯巻を巻き、固定した。

投与時間は 24 時間とした。投与液量は、投与日の朝に前処理を実施した前に体重を測定し、体重値を基に算出して午後から投与した。

群構成は図 2 に示す。

## 4. 動物および飼育条件

動物は 6 週齢の雄 SD 系ラット (CrI:CD(SD)SPF)を購入し、温度 (21.0~25.0℃) および湿度 (40.0~75%)、換気回数 (約 15 回/時間)、明暗サイクル (7 時~19 時まで点灯) が統御された飼育室に金属製金網床ケージにて個別に飼育し、固型飼料 (CE-2、日本クレア) および水道水を自由に摂取させた。約 1 週間の検疫・馴化期間の後、検疫終了時の体重を基に 3 群に群分けした。投与開始時週齢は 7 週齢である。

## 5. 観察

ナノ白金暴露後、24 時間後に解剖をして、皮膚、肝臓、血液を採取し、組織中白金測定、病理組織学検査を実施した。また、皮膚の一部を透過型電子顕微鏡にて精査した。組織中の白金測定は ICP-MS 分析にて検出限界 0.05 ppm で行った (日本食品分析センターにて実施)。

また、体重および主要臓器の器官重量も測定した。

## C. 研究結果 (次項 D にまとめて記載する)

### D. 考察

#### 1. TP 処理による皮膚の変化

昨年度までの検討により、TP 処理直後の皮膚の病理組織学変化では、角質層はほぼ除去され、角化細胞の変性が確認されている。

#### 2. TP 処理によるナノ白金の皮膚への影響

TP 処理後にナノ白金を 24 時間貼付後(投与 2 日)の背部皮膚肉眼写真 (各群代表例) を図 3 に示した。投与 2 日のナノ白金投与群では皮膚の黒色化が観察され、TP 処理群でより顕著であった。それ以外にいずれの群の貼付皮膚部位に肉眼的変化は認められなかった。

TP 処理後のナノ白金投与皮膚病理組織学検査および組織写真 (各群代表例) を図 4 および図 5 に示した。

ナノ白金投与により、表皮表面に黒色色素の付着がみられ、TP 処理群ではその程度および頻度が増強した。TP 処理をした対照群およびナノ白金投与群では、表皮にケラトヒアリン顆粒の減少を伴う錯角化、痂皮、表皮の肥厚、細胞間浮腫および炎症細胞浸潤が観察された。真皮では炎症細胞浸潤、線維芽細胞の増生、出血が観察された。しかし、これらの所見の程度および頻度には両群間に差はなかった。

TP 未処理のナノ白金投与群では、表皮表面に黒色色素の付着以外に表皮および真皮に病理組織学的変化はみられなかった。