

E. 結論

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を低下させること、本情動行動変化の発現に視床下部・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考えられた。また、隔離飼育環境の影響が極めて軽微あるいは見られなかったことより、情動行動異常発現と密接に関わるストレス感受性に対して父親へのナノマテリアル曝露が及ぼす影響は小さいものと考えられた。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

① 論文発表

該当なし

【総説・その他】

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11件】

1. 森下裕貴，吉岡靖雄，高雄啓三，吾郷由希夫，佐藤宏祐，野尻奈央，田中智大，田熊一徹，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回日本神経回路学会大会 合同大会)，京都，2013年6月。
2. 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。

3. 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，田熊一徹，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。
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，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。
5. 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。
6. 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・バイオフィオーラム，富山，2014年9月。
7. 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。
8. 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.

該当なし.

9. 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.

その他

該当無し.

10. 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.

研究協力者

長谷部茂, 平松直樹, 前田優子, 田中辰典, 福山留以, 梅木孝弘, 岡 智史

11. 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, 田熊一敬, 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】

1. 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

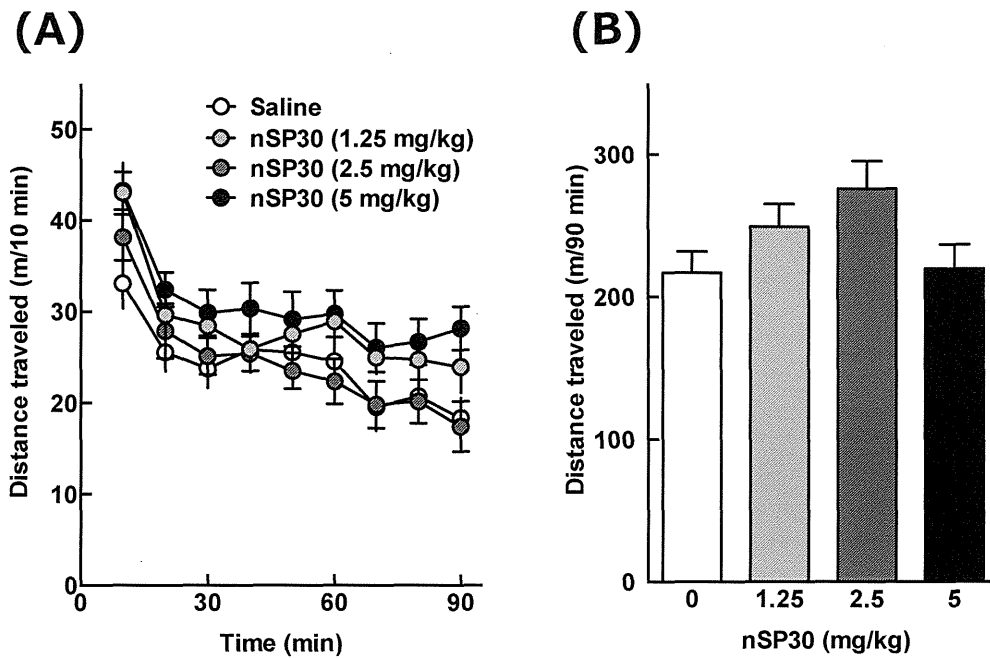


図1. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの自発運動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9週齢時にオープンフィールド試験(90分)を行った。(A) 10分ごとの移動距離の経時変化, (B) 90分間の総移動距離。データは, 平均±SEMで示した(n=9-12)。

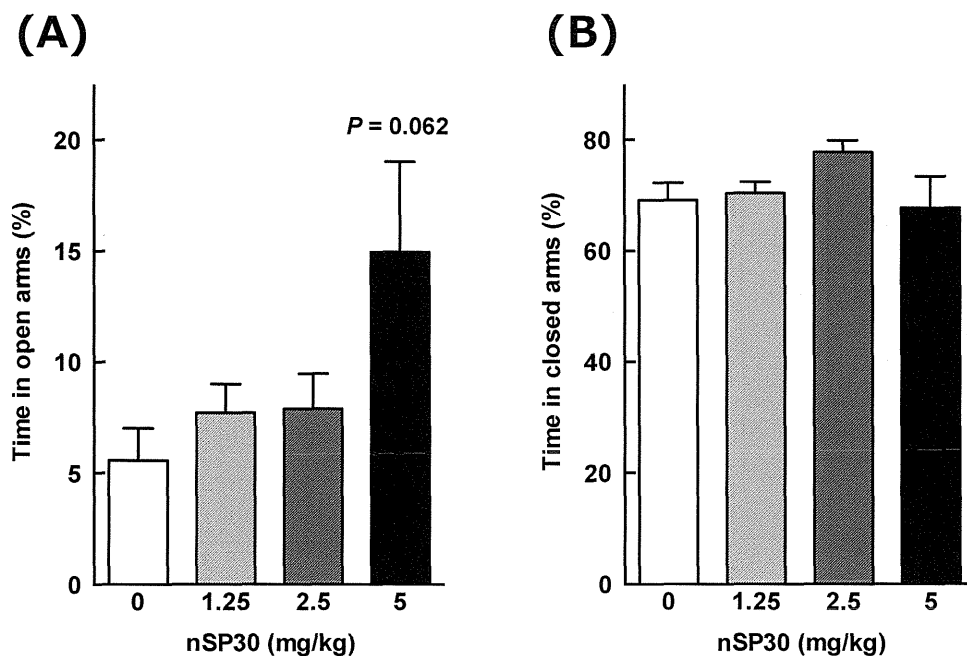


図2. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの不安様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, 粒径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9週齢時に高架式十字迷路試験(5分)を行った。(A) オープンアームでの滞在時間割合, (B) オープンアームでの滞在時間割合。データは, 平均±SEMで示した(n=9-12)。P value, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。

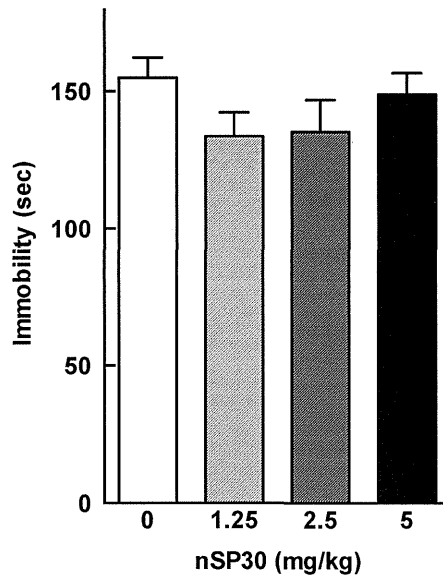


図3. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの抑うつ様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、10週齢時に尾懸垂試験(6分)を行い、不動時間を測定した。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

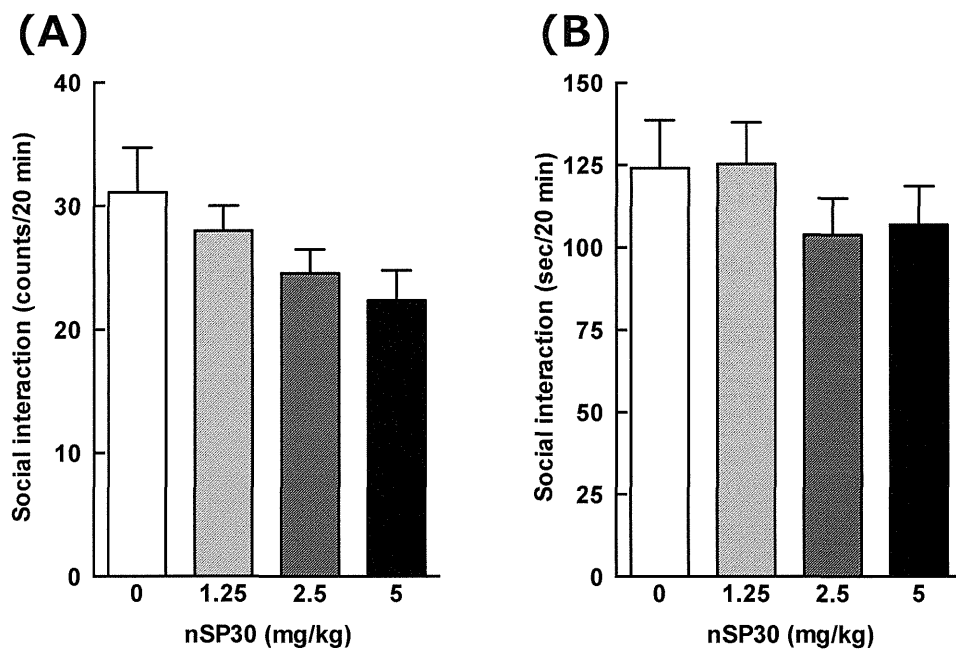


図4. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの社会性行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、9週齢時に社会性相互作用試験(20分)を行った。(A) 嗅覚行動回数、(B) 嗅覚行動時間。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

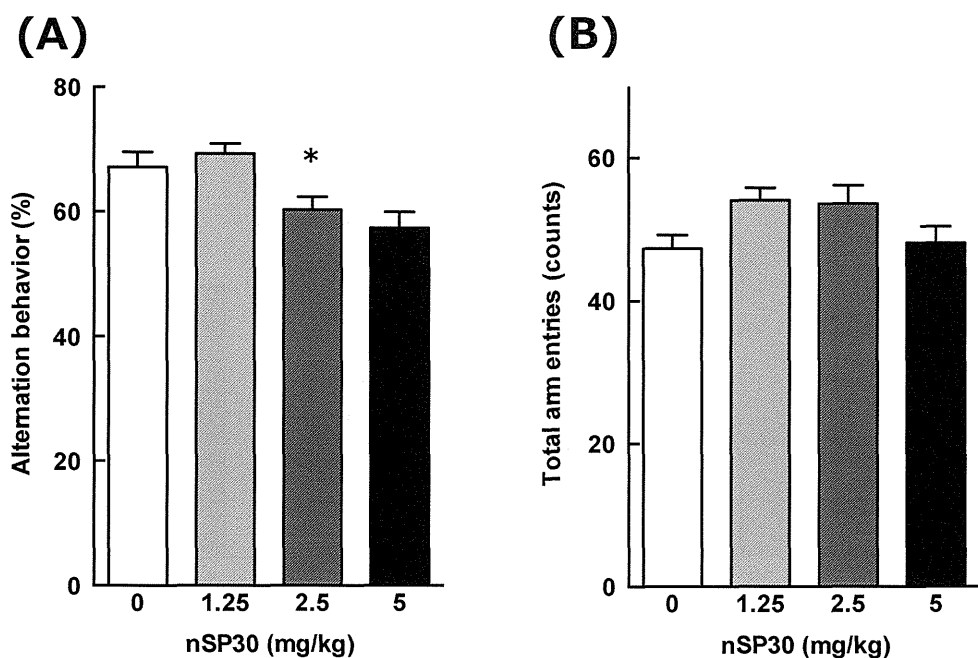


図5. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの短期作業記憶に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、10週齢時にY字迷路試験(8分)を行った。(A) 自発的交替行動変化率、(B) 各アームへの総進入回数。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。* $P < 0.05$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and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

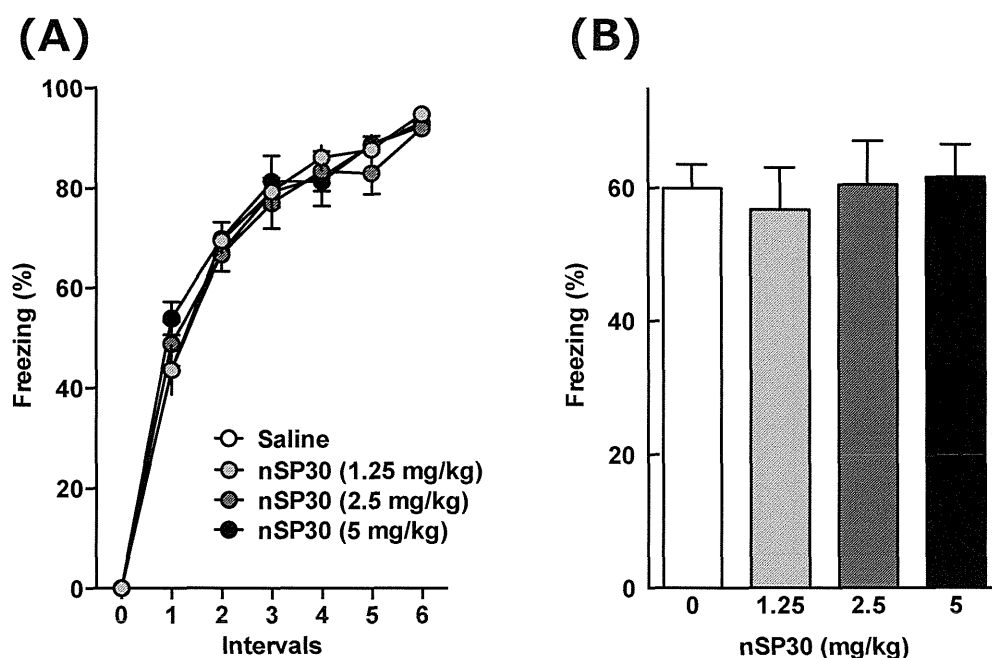


図6. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの文脈的記憶能に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に、粒子径30 nmのnSP (nSP30)を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回、尾静脈内に投与し、投与開始から35日後に、無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について、11週齢時に恐怖条件付け文脈学習試験を行った。文脈依存試験(3分)は、条件付けの24時間後に行った。(A) 条件付け時のすくみ行動時間割合の経過、(B) 文脈依存試験時の総すくみ行動時間割合。データは、平均±SEMで示した(n=9-12)。

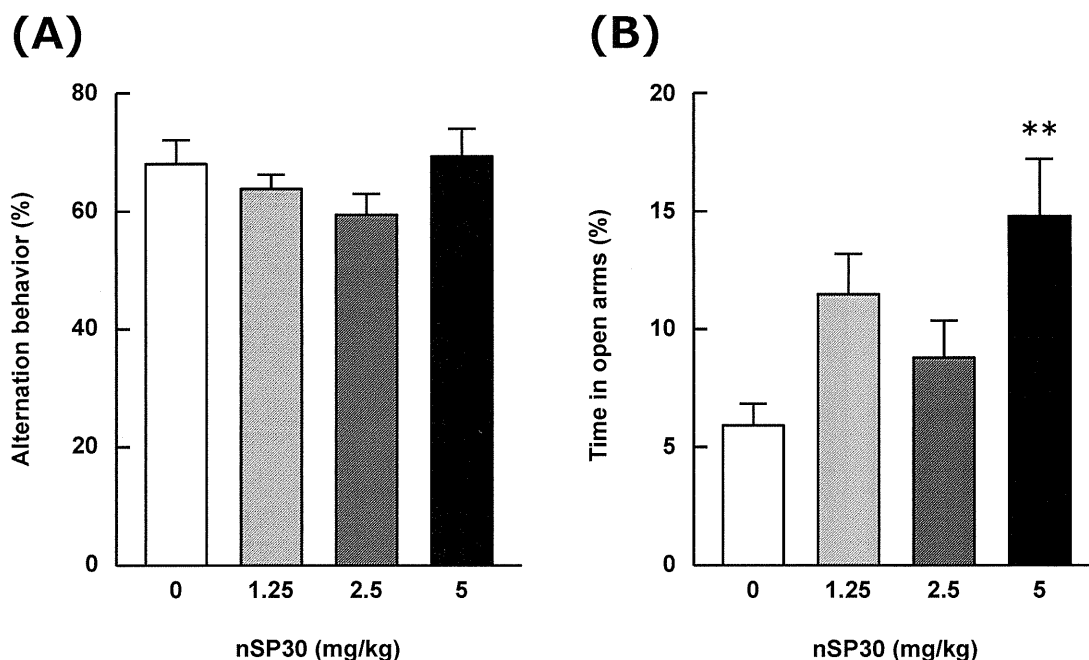


図7. 雄親マウスへのナノマテリアル曝露が仔マウスの短期作業記憶および不安様行動に及ぼす影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔について, 9-10週齢時にY字迷路試験(8分)(A)および高架式十字迷路試験(5分)(B)を行った。(A) 自発的交替行動変化率, (B) オープンアームでの滞在時間割合。データは, 平均±SEMで示した。** $P < 0.01$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。

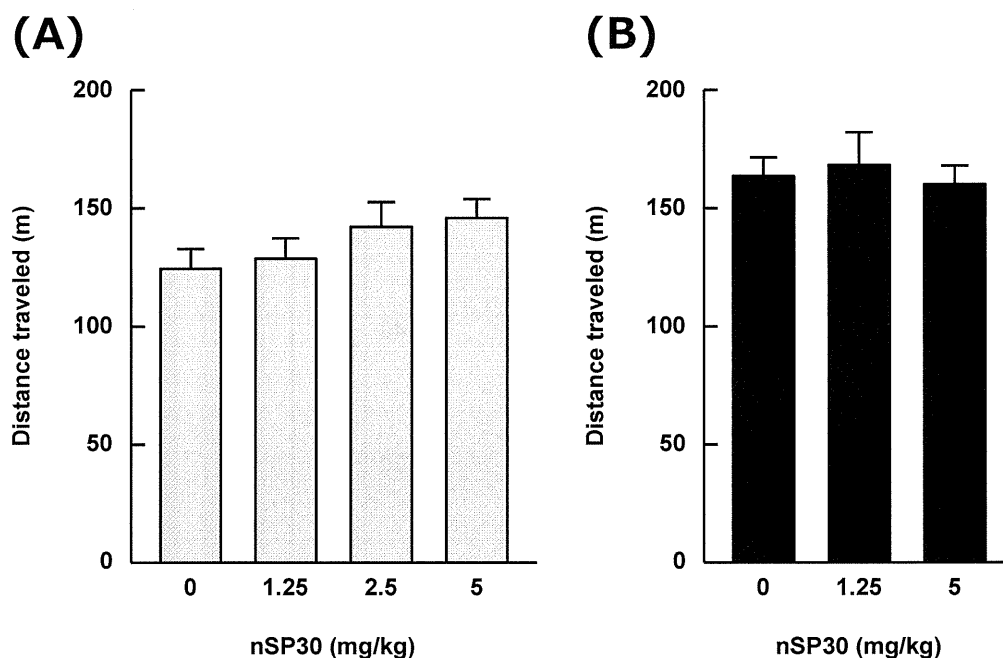


図8. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの自発運動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時にオープンフィールド試験(90分)を行った。データは90分間の総移動距離で, 平均±SEMで示した。

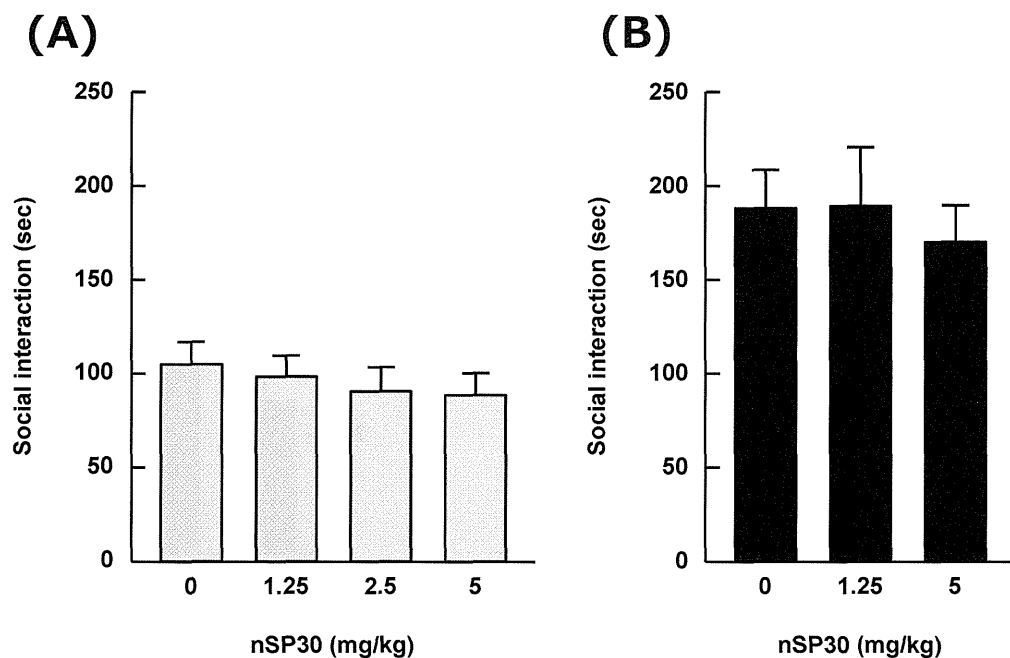


図9. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの社会性行動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時に社会性相互作用試験(20分)を行った。データは20分間の嗅覚行動時間で, 平均±SEMで示した。

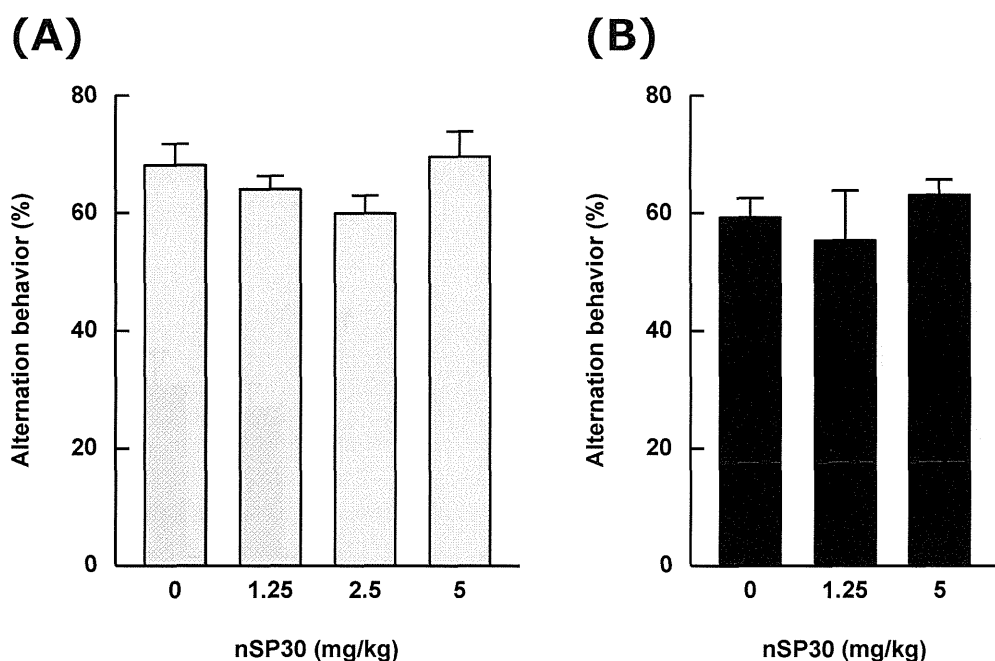


図10. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの短期作業記憶に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時にY字迷路試験(8分)を行った。データは自発的交替行動変化率で, 平均±SEMで示した。

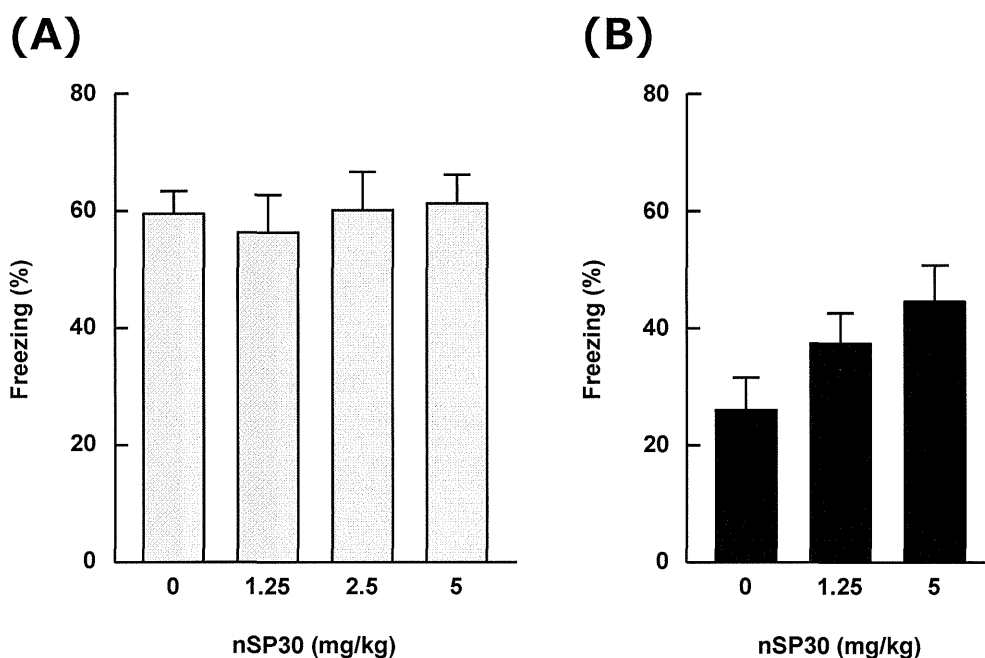


図11. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの文脈的記憶能に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群(A)と隔離飼育群(B)に分け, 10-11週齢時に恐怖条件付け文脈学習試験を行った。文脈依存試験(3分)は, 条件付けの24時間後に行った。データは文脈依存試験時の総すみ行動時間割合で, 平均±SEMで示した。

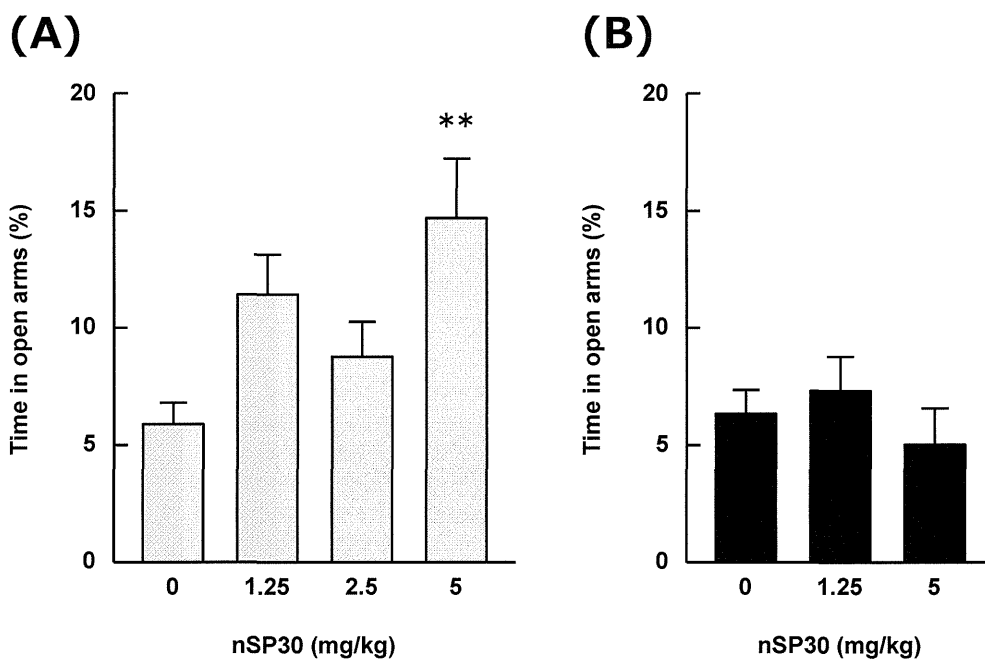


図12. ナノマテリアル曝露雄親由来仔マウスの不安様行動に対する長期隔離飼育の影響。雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を1.25, 2.5および5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与し, 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた。出生した雄性仔を離乳時に通常飼育群隔離飼育群(B)に分け, 9週齢時に高架式十字迷路試験(5分)を行った。データはオープンアームでの滞在時間割合で, 平均±SEMで示した。 ** $P < 0.01$, 対照群(0 mg/kg nSP30)に対して(One-way ANOVA and *post-hoc* Tukey test)。

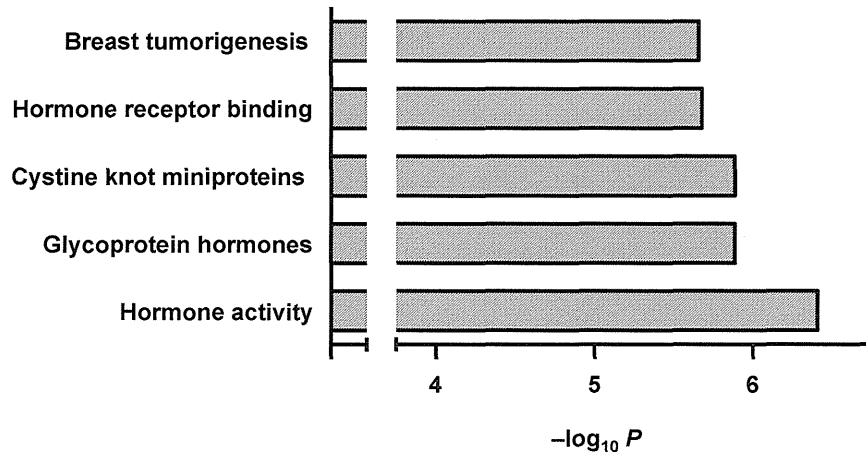


図13. ナノマテリアルを曝露した雄親マウス由来の仔における視床下部・下垂体での遺伝子セットエンリッチ分析. 雄性BALB/cマウス(10週齢)に, nSP30を5 mg/kgの用量で1日おきに計4回, 尾静脈内に投与した. 対照群には生理食塩水を投与した. 投与開始から35日後に, 無処置の雌性BALB/cマウス(10週齢)と交配させた. 出生した雄性仔について, 9週齢時に視床下部・下垂体よりcDNAを調製し, マイクロアレイ解析ならびに遺伝子セットエンリッチ分析を行った. データは大きな関連性が認められた遺伝子群を示す.

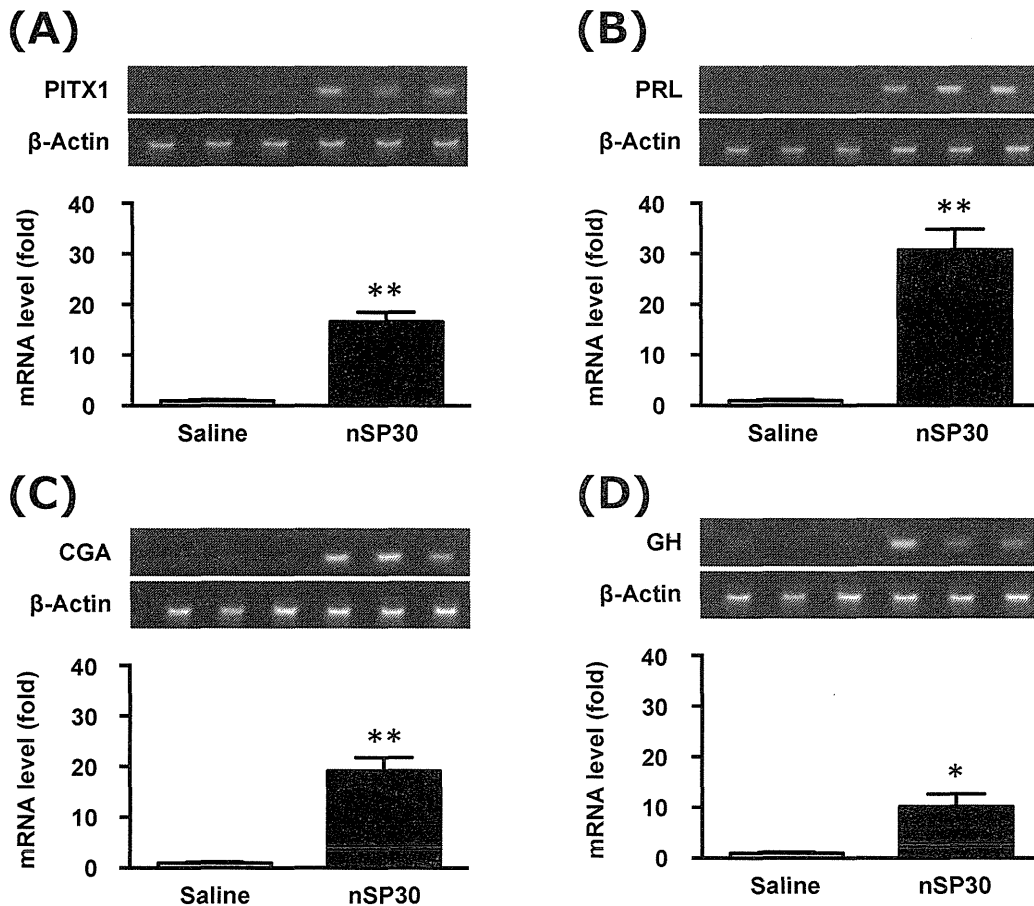


図14. ナノマテリアルを曝露した雄親マウス由来の仔における視床下部・下垂体での遺伝子発現変化. マイクロアレイ解析ならびに遺伝子セットエンリッチ分析により, 著明な発現変動と大きな関連性を認めた4つの分子 [pituitary homeobox 1 (PITX1), プロラクチン (PRL), クロモグラニンA (CGA), 成長ホルモン (GH)] を対象として半定量的PCRを行った. (A) PITX1, (B) PRL, (C) CGA, (D) GH. データは, β -アクチンを用いて補正し, 対照群 (生理食塩水を投与した雄親由来の仔) を1とする平均 \pm SEMで示した (n=3). * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, 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。これまでの 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認められ、nPt が細胞内に有意に蓄積していた。さらに、オートファジー欠損細胞では、nPt は時間経過と共に有意に蓄積すると共に、細胞外への排出が遅延することも示唆された。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、胎盤細胞の細胞死を誘導し、ER ストレス応答の破綻を誘導することが分かった。つまり、胎盤にはオートファジーというナノマテリアル排出を促進する機構と、母獣血中の好中球も胎盤へのナノマテリアル排除機構として働くことで細胞障害を軽減している可能性がある。逆説的には、ナノマテリアル蓄積およびオートファジーの破綻は、胎盤形成不全および胎児発育不全の増悪因子となり得ることが示された。

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^{C74A} を恒常的に発現した HTR8-Atg4B^{C74A} 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^{C74A}, 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. 細胞内 nPt 含有量の評価

細胞内 snPt 量は ICP-MS によって測定した。

4. 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

1-1. nPt はオートファジー欠損 HchEpC1b 細胞内に蓄積し、強い細胞傷害性を示す

nPt を培養液に HchEpC1b:0-200 µg/ml HTR8/SVneo:0-50µg/ml で加え、24 時間培養後の細胞数を WST-1 アッセイにて評価した。オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞において、25

µg/ml で 50%の増殖抑制を示したが、コントロール細胞（オートファジー正常）では 100µg/ml において 59%の増殖抑制を認め、オートファジー欠損が nPt の細胞毒性を増強させた。さらに、nPt 0-50µg/ml を含有した培養液で 24 時間培養後の nPt 細胞内濃度を測定したところ、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞ではコントロール細胞に比し、濃度依存性に細胞内 nPt 蓄積量の増加を認めた。加えて、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を認めた。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。

1-2. nPt はオートファジー欠損 HchEpC1b 細胞内に時間依存性に蓄積し、その後の排出も遅延する

nPt を 25µg/ml で含む培養液で 12,24,48 時間培養後、細胞内 nPt 濃度を評価した。コントロール細胞では時間経過において細胞内 nPt 量は増加しなかったが、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では有意な蓄積を示した。一方、25µg/ml で nPt を含む培養液で 24 時間培養、細胞を洗浄後 12,24,48 時間後の細胞内遺残 nPt 濃度を評価した。コントロール細胞では細胞内 nPt 量は、12 時間の nPt 遺残量に比し、48 時間後で 19.7%であった。一方、オートファジー欠損 HchEpC1b 細胞では、48 時間後で 40.2%の nPt が細胞内に遺残していた。つまり、この結果はオートファジー欠損が nPt 取り込みの促進あるいは排出遅延に関わる可能性を示唆していた。

2-1. 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、胎仔の発育抑制に働く。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 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による胎盤血流の減少を示唆する結果が得られた。

D. 考 察

以上の結果をまとめると、nPt 実験は *in vitro* での検討であり、nSP70 は *in vivo* での結果である。しかし、これらの検討結果を総合的に考え合わせると、ナノマテリアルがもつ細胞障害性は、ナノマテリアルの細胞内蓄積による細胞内ストレスの誘導であり、シャペロン機構等のストレス応答能不全を誘導する可能性を示唆していた。つまり、オートファジー不全によるナノマテリアルの過剰蓄積が細胞内で起これば、ER ストレスも過剰となり細胞死が誘導される。一方で、*in vivo* での検討から、好中球がナノマテリアルを取り込むことで、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および胎盤の細胞内でナノマテリアルを排除する機構が存在する可能性がある。しかし、オートファジーによるナノマテリアル排出および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、それらの証明には新たな技術革新が必要な状況であることが、現在の課題である。

E. 結 論

正常な胎盤形成に必須である EVT 細胞は、オートファジーという細胞内機構を使用することで、nPt の毒性から自身を保護していることが予想された。加えて好中球は胎盤に流れ込むナノマテリアルを能動的に取り込むことで、胎盤へのナ

ノマテリアルを減少させる可能性がある。我々はこれまでにオートファジー抑制が妊娠高血圧症候群発症に関与することを報告してきたが、nPt はその増悪因子となり得ることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当なし

G. 研究発表

①論文発表

1. Nakashima A, Yamanaka-Tatematsu M, Fujita N, Koizumi K, Shima T, Yoshida T, Nikaido T, Okamoto A, Yoshimori T, Saito S. : Impaired autophagy by soluble endoglin, under physiological hypoxia in early pregnant period, is involved in poor placentation in preeclampsia. *Autophagy*, 9(3):303-316, 2013.
2. Saito S, Nakashima A.: Review: The role of autophagy in extravillous trophoblast function under hypoxia., *Placenta, Trophoblast Research*, 34(27):S79-S84 2013.
3. 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*. 97:101-102, 2014
4. Yamanaka-Tatematsu M, Nakashima A, Fujita N, Shima T, Yoshimori T, Saito S. "Autophagy induced by HIF1alpha overexpression supports trophoblasts invasion by supplying cellular energy" *Plos one*. 3:8 e76605, 2013

【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⁺））曝露が脳機能に及ぼす影響を網羅的行動テストバッテリーにより評価した。また、nAg10 あるいは Ag⁺ を 4 週間にわたって経鼻投与した成体マウスにおける行動解析結果と、母乳を介して乳幼仔期にナノ素材を曝露したマウスの行動解析結果との比較を行った。それらの結果、成体時に nAg10 あるいは Ag⁺ を経鼻投与したマウスにおいて、嗅覚が過敏になる可能性が示されたが、情動行動、社会的行動、学習・記憶機能などに関しては、母乳を介して乳幼仔期に曝露されたマウスにおいても、成体時に曝露されたマウスにおいても、統計的に有意な行動変化が認められなかった。今回の研究に使用したナノ素材あるいはその摂取量は、乳幼仔期または成体期といった曝露時期に関わらず、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。今後も、曝露量や曝露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慎重に検討していく必要があると考えられる。

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。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・乳幼児期をはじめ、成人期でのナノ・サブナノ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。しかしながら、ナノ銀（nAg10）あるいは銀イオン（Ag⁺）の曝露についてはこれまで十分な検討が行われてきていなかった。そこで、本研究では、母乳を介した乳幼仔期の nAg10 あるいは Ag⁺ 曝露が脳機能

に及ぼす影響を網羅的行動テストバッテリーにより評価した。また、nAg10 あるいは Ag⁺を 4 週間にわたって経鼻投与した成体マウスにおける行動解析結果を用い、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

BALB/c 系統の授乳中の母親マウスに nAg10、Ag⁺を投与し、生まれた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、nAg10 あるいは 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。雄の仔は 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。

成体マウスに対して、経鼻による nAg10、Ag⁺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. サブナノ素材への曝露

乳幼仔期の曝露実験では、曝露群の授乳中マウスに nAg10 あるいは Ag⁺溶解液を水瓶から自由に摂取させ、母乳を介して乳幼仔期のマウスに曝露した。授乳中マウスの摂取量は、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、産後 21 日目まで摂取させた。統制群の授乳中マウスには、通常の飲用水を与えた。雄の仔は、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。仔マウスは 10 週齢以降に、網羅的行動テストバッテリーによって行動特性を評価され、その後さらに恐怖条件づけテストとホームケージ内社会的行動テストによってそれぞれの行動を評価された。

成体雄マウスへの nAg10、Ag⁺曝露実験では、

曝露群のマウスの鼻粘膜に nAg10 あるいは Ag⁺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媒液を投与した。各群のマウスに対して、投与 29 日目以降に埋没餌探索テスト、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

乳幼仔期の曝露実験では、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、明暗選択箱テスト (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 [図の説明と合わせる] 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)、恐怖条件づけテスト (文脈記憶、手がかり記憶)、ホームケージ内社会的行動テストから構成されていた。

成体期の曝露実験でも、同様に動実験開始 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：埋没餌探索テスト (嗅覚反応性)、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

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仔は、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仔と比較して、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、図 13)、うつ様行動 (図 10)、作業記憶および固執傾向 (図 11)、文脈記憶ならびに手がかり記憶 (図 12) の全ての項目において、nAg10 あるいは Ag^+ 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 nAg10 あるいは Ag^+ への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。

一方、成体期にサブナノ銀あるいは銀イオンを経鼻暴露された C57BL/6J のマウスでは、埋没餌探索テストの結果、床敷きに埋められた餌を見つけるまでの時間が有意に短く、嗅覚機能がコントロール群に比べて敏感になっていることが示唆された。また、自発活動量、不安様行動、社会的行動に関しては、対照群との間に有意な差は認められなかった。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、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。これらの結果は、乳幼仔期に母乳を介して曝露されたマウスの動解析結果と、同様であった。

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、ナノ素材の 1 つである nAg10 あるいは Ag^+ 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。また、nAg10、 Ag^+ 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。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^+ 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。

今後も、曝露時期、曝露期間、曝露量、被験体の系統、実験手続きなどを慎重に検討し、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

専門員)

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(兼任))

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

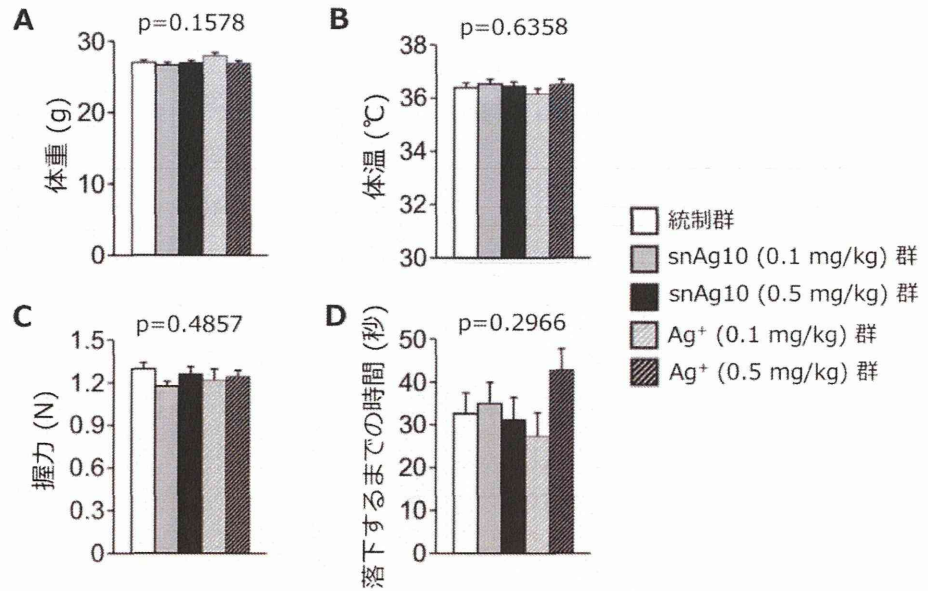


図1. 全般的健康状態および神経学的検査。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時の(A)体重、(B)体温、(C)握力、(D)金網から落下するまでの時間(筋力の指標)を測定した(各群、n=16-20)。

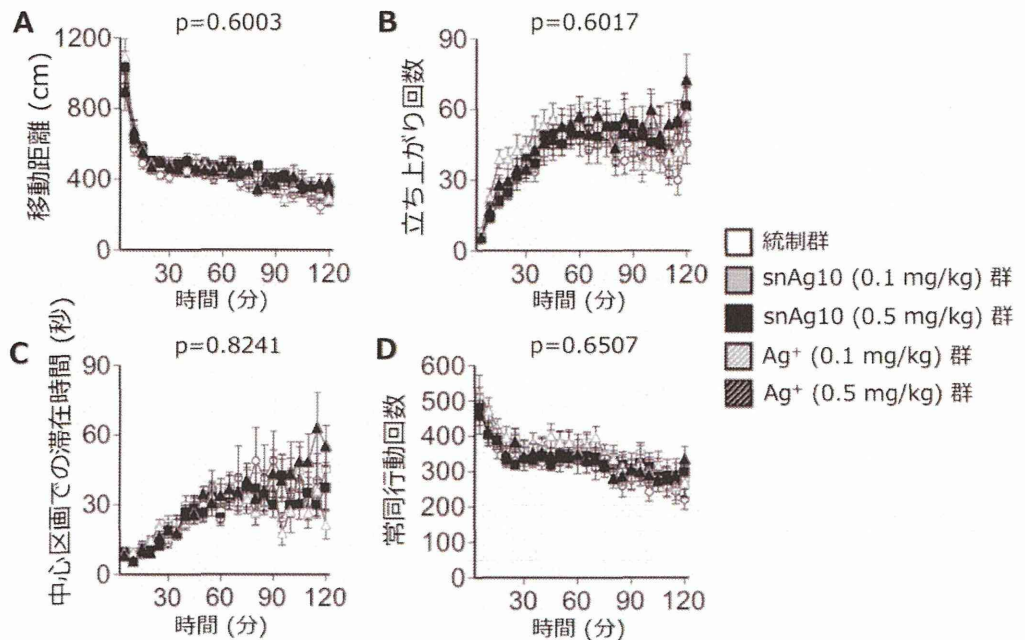


図2. オープンフィールドテストによる不安様行動および活動性の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時のオープンフィールドにおける(A)移動距離、(B)立ち上がり回数、(C)中心区画での滞在時間、(D)常同行動の回数を測定した(各群、n=16-20)。

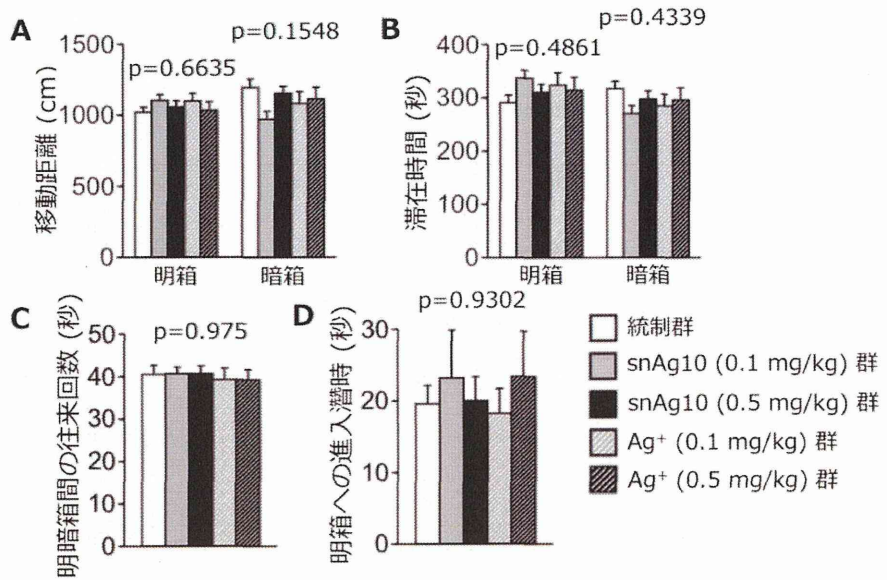


図3. 明暗選択箱テストによる不安様行動および活動性の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の仔の成体時の明暗選択箱テストにおける(A)移動距離、(B)明暗箱での滞在時間、(C)明暗箱間の往来回数、(D)明箱に入るまでの潜時を測定した(各群、n=16-20)。

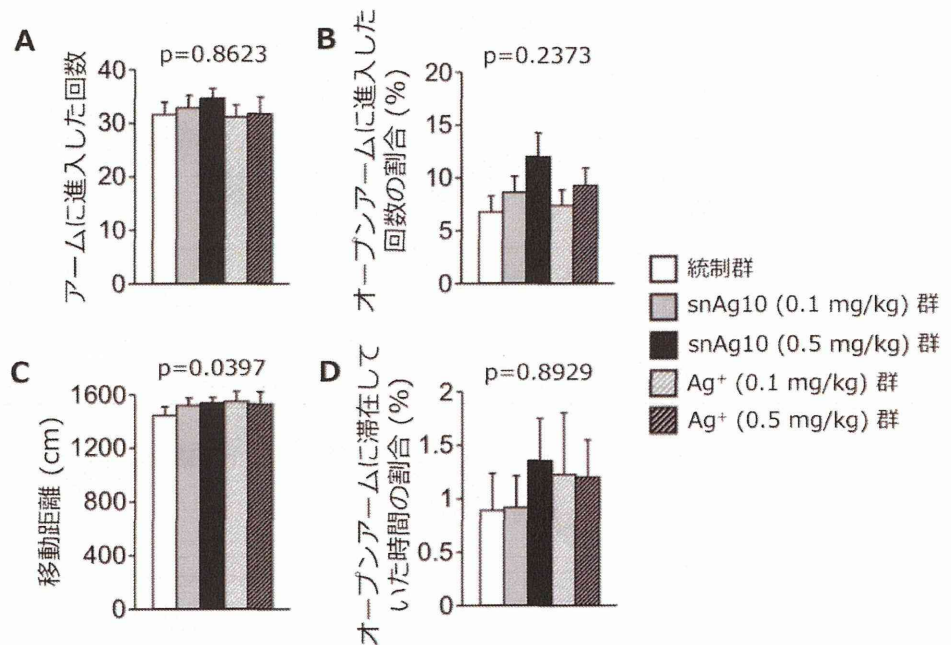


図4. 高架式十字迷路テストによる不安様行動および活動性の評価。 BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の仔の成体時の高架式十字迷路テストにおける(A)アームに進入した回数、(B)オープンアームに進入した回数の割合、(C)移動距離、(D)オープンアームに滞在していた時間の割合を測定した(各群、n=16-20)。

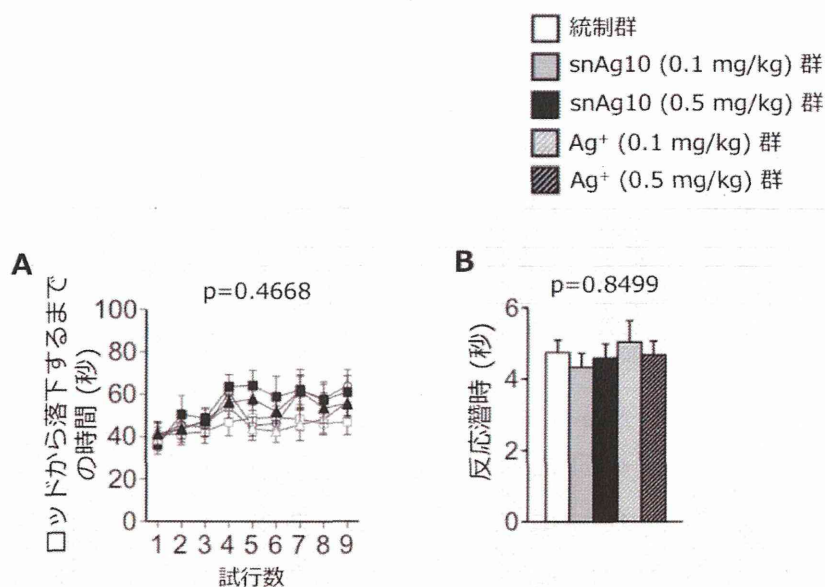


図5. ロータロッドテストによる協調運動機能の評価ならびにホットプレートテストによる痛覚感受性の評価.

BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時における(A)回転ロッドから落下するまでの時間、(B)熱に対する四肢の反応潜時を測定した。

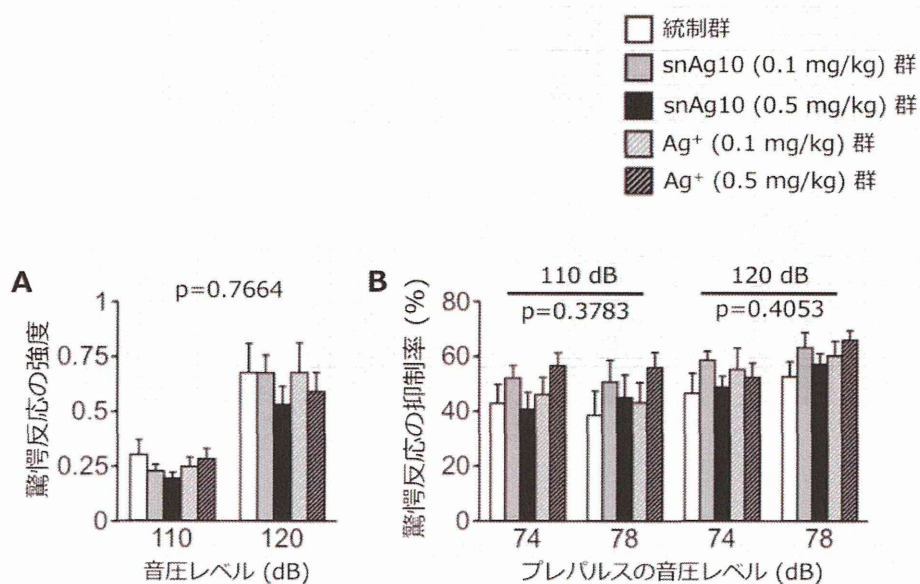


図6. 聴覚性驚愕反応およびプレパルス抑制の評価.

BALB/c系の授乳中マウスに産後3週間にわたってサブナノ銀あるいは銀イオンを経口摂取させた（1日あたりの摂取量、0.1 mg/kgあるいは0.5 mg/kg）。その母親マウスに養育された雄の子の成体時の(A)聴覚性驚愕反応の強度、(B)プレパルスによる驚愕反応の抑制率を測定した。