

平成 27 年 6 月 22 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24590774

研究課題名(和文) ナノ材料による神経系発達障害の評価系の開発に関する研究

研究課題名(英文) Evaluation for neurodevelopmental deficit by nanomaterials

研究代表者

石堂 正美 (Ishido, Masami)

独立行政法人国立環境研究所・環境リスク研究センター・主任研究員

研究者番号：60211728

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：最初に、神経幹細胞を用いたニューロスフェア法で銀ナノ粒子の神経系発生毒性評価を行った。ニューロスフェアを培養系に静置すると、表面から細胞が外側に向かって移動した。この系に銀ナノ粒子を曝露し、細胞の移動距離を測定すると、銀ナノ粒子濃度との関係に直線関係を得た。50%阻害率は約400 ng/mlだった。また、銀ナノ粒子を曝露する前に予めニューロスフェアから神経幹細胞を十分に移動させておき、それから銀ナノ粒子を曝露すると、ある濃度以上の銀ナノ粒子は、移動した神経幹細胞のアポトーシスを誘導させることが明らかになった。次に、銀ナノ粒子を新生仔に経口投与すると、自発運動量が有意に亢進した。

研究成果の概要(英文)：We first analyzed the particle size of the AgNP used in this study by DLS. The maximum peak in DLS analysis was observed at 10 nm. We applied a neurosphere assay for neurodevelopmental effects of AgNPs. AgNPs inhibited cell migration in a dose-dependent manner. There was a linear correlation between the inhibition of migration and the logarithm of the particle concentration. Preceding migrated cells were retarded and/or collapsed by exposure to AgNPs: lower doses of AgNPs (0.31~1.25 µg/ml) caused a 42% retardation for 48 h, while higher doses of AgNPs (2.5~10 µg/ml) collapsed migrating cells. Furthermore, collapsed cells were TUNEL-positive and showed a defect in the mitochondrial membrane potential.

We also examined the effects of AgNPs on rat behavior. A single oral administration of bisphenol A into 5-day-old male Wistar rats caused significant hyperactivity. It was about 1.3~1.4 fold more active in the nocturnal phase than control rats.

研究分野：環境神経科学

キーワード：銀ナノ粒子 神経発生毒性

1. 研究開始当初の背景

ナノテクノロジーは、これまでの科学技術基本計画や新産業創造戦略において、推進すべき重要な政策として位置づけられており、産業発展のために必須の科学技術である。したがって、我が国が産業立国として21世紀の新たな産業技術をリードしていくためにもその基盤となるナノ材料の健康への影響、特に次世代への健康影響を明確にして、十分な対策を構築することが極めて重要な課題である。

しかしながら、ナノ材料の有害性に関する研究報告は混沌とした状況にある。それはナノ材料の特異的な物性にあるといわれている。ナノ材料では結晶のサイズが小さくなることにより、電子状態が変化し、通常のような物質にはないような性質が現れる。化学反応は、基本的に物質の表面で起こるが、物質がナノサイズになることにより単位質量当たりの表面積が大きくなる。この比表面積の増大が化学的反応性を高める。その他、小さくなることにより多くの物理化学的な変化が知られてきているが、身体の中での生物学的な作用は必ずしも明らかになっていない。このように、ナノ材料は評価困難物質とされ、その有害性評価は全く不明である。

こうした健康リスク評価の困難な物質を敢えて本研究において取り上げた理由は以下のような研究経緯があるためである。

過去に見られた「胎児性水俣病」のような環境に起因した重篤な疾病は姿を消したが、今日の環境に起因した物理化学的因子による胎児や新生児への影響は依然懸念されている。大人には無影響と思われる微量の環境因子も、生体防御系の未熟な胎児・新生児への影響は無視できなくなっているという指摘である。曝露条件により、それらの影響が直ぐ現れたり、大人になってから晩発性に現れたりする。この時期がリスク形成期と呼ばれる所以である。

今日のヒトの精神神経疾患の中で環境化学物質との因果関係が明白に特定された疾患はこれまで明らかにされていない。米国五大湖近辺の汚染魚類を大量に摂取した妊婦の子供の認知能の遅延や行動発達異常の報告はかなり因果関係に迫っているが、今日の曝露様式に見られる低濃度での慢性影響を実証することは困難になってきている。

しかしながら、内分泌攪乱化学物質のような低濃度で慢性曝露が懸念されている環境化学物質による発達期中枢神経系への影響の報告が動物実験で近年相次いでいる。たとえば、青班核の形態異常、大脳皮質の層構造異常、探索行動異

常、恐怖・痛みへの反応異常、空間学習の異常や多動性障害などである。これらの報告は、微量な環境化学物質でも生体防御系の未熟な発達期の(長期)曝露は、個体レベルでの大きな影響として現れうることを如実に示している。

このような基礎研究が、環境省による「子供の健康と環境に関する全国調査(エコチル調査)」の実施につながっている。

こうした中で、私たちは内分泌攪乱化学物質が神経系の発達障害をもたらすことを実証してきた。多動性障害は、注意欠陥多動性障害や自閉症などにみられることからそのインパクトは実に大きなものであった。

一方、内分泌攪乱化学物質の影響評価においては「低用量問題」というカインेटックスが観察されてきている。私たちはこの問題に対して、新たな神経系発生毒性評価系を確立することにより「低用量問題」を克服し、内分泌攪乱化学物質や農薬の神経系発生毒性影響評価系を確立してきた。

以上のような経緯により、独自に開発してきた環境因子の神経系発生・発達毒性の評価系を今日健康リスク評価困難物質とされているナノ材料に応用するに至ったわけである。

2. 研究の目的

ディーゼル排気粒子に含まれているナノ粒子が、マウスの自発運動量に影響を及ぼし、モノアミン系の代謝産物量に変化するという報告がなされてきている[文献 Particle and Fibre Toxicology 2010)7:7]。そこで、第一に、本研究では銀ナノ粒子の影響をラットの自発運動量を指標とした行動試験で検出するための試験系の開発を行う。また、病理組織像の異常を検査するために、カテコールアミン合成酵素をはじめとするドーパミン情報伝達機構を構成するコンポーネント変動の有無を調べる。更に、こうした異常が、銀ナノ粒子による神経系の発達障害であるかどうかを調べる。

第2に、上記の行動試験で示される結果を更に神経系発生毒性学的に分子レベルで明らかにするために神経幹細胞を用いた In Vitro 系において調べる。これは神経系ネットワークの形成に必要な神経幹細胞の移動や増殖あるいは銀ナノ粒子による神経系細胞の死を指標とした極めて定量的な試験法であり、毒性評価において情報量に富む。

3. 研究の方法

初代培養ラット神経幹細胞を用いた

## neurosphere アッセイ法によるナノ材料の神経系発生毒性評価系の確立

今日の環境化学物質は微量でかつ慢性的に曝露しているという特徴を有し、その発達期中枢神経系への曝露影響を評価するとき、胎児の脳形成及び発達を司る神経幹細胞の研究が重要になってきている。神経幹細胞は未分化な細胞で、ニューロン、アストロサイト、オリゴデンドロサイトに分化しうる「多分化能」と自分と全く同じ細胞のコピーを作る「自己複製能」の基本的性質を有している。更に、損傷した脳部位に移動し修復する「修復能」の性質も明らかにされた。神経幹細胞は、胎生期から成熟期まで生涯にわたり存在するといわれ、神経幹細胞の機能に環境化学物質はどのように影響するかを調べることは極めて重要になってきている。

はじめにラット胎生 15~16 日の脳胞から神経幹細胞を単離し、その培養系を確立する。脳胞から取り出した神経幹細胞は、これまでの予備実験において培養 7 日ぐらいから塊を形成しはじめ、2~3 週間で直径 100~200 ミクロンの球状の塊を形成する(neurosphere の形成)。今回は、この neurosphere を用いて実験を行こう。neurosphere を培養系に静置すると、表面から細胞が飛び出してくるのを観察している。neurosphere が培養皿に接着していると、飛び出してくる細胞も底皿を外側に向かって移動していくことが観察された。脳内の神経幹細胞もその他の神経系細胞も胎生期から新生期にかけて盛んに移動し、機能的な神経回路網を形成することから神経系細胞の移動は、高次脳機能形成に重要な現象で、培養系でその細胞移動を模擬できると考えられる。

こうした神経幹細胞の移動に対して、ナノ材料、はじめに銀ナノ粒子がどのような影響を及ぼすかの評価を行う。銀ナノ粒子は、殺菌剤として古くから使われ、近年では脱臭剤や消毒剤として利用されている。

銀ナノ粒子が他の内分泌攪乱物質や農薬のように神経幹細胞の移動を阻害するならば、次に銀ナノ粒子が神経幹細胞の増殖をも抑制し、アポトーシスを誘導しているかを調べる。神経幹細胞の増殖は、細胞核抗原である ki-67 の免疫細胞染色法により定量化する。

更に、分子レベルのメカニズムを明らかにするために DNA アレイ法を実施する。

以上のように、培養神経幹細胞の neurosphere アッセイ系を用い、神経幹細胞の移動、増殖やアポトーシス誘導能を定量化し、銀ナノ粒子の神経系発生毒

性を評価する。曝露する銀ナノ粒子の粒径を変え(10~30 nm)、単位質量当たりの表面積を表す「比表面積」についての更なる検討を加える。

1. 銀ナノ粒子によるラット行動試験  
私たちはこれまでに内分泌攪乱化学物質や農薬がラット新生仔に曝露すると、多動性障害が惹起されることを自発運動量を指標とした行動科学的に実証してきている。その原因としてカテコールアミン系神経の発達障害であること示した。一方、東京理科大の武田グループは、ディーゼル排気粒子に含まれているナノ粒子が、私たちの報告と同じようにマウスの自発運動量に影響を及ぼし、しかもモノアミン系の代謝産物量が変化するという報告を行っている[文献 Particle and Fibre Toxicology (2010) 7:7]。

そこで、本研究ではこれまで確立してきた自発運動量を指標とした行動試験を次のように行う。

銀ナノ粒子(10nm~30nm)を生後 5 日の雄性 Wistar ラットに経口投与する。ヒトの学童期に対応する 4~5 週齢より自発運動量(Supermex システム・室町機械株式会社)を測定を始める。自発運動量測定器は、遠赤外線を利用した温度センサーが付着しており、これでラットを認識し、ラットの移所行動、身づくろい、立ち上がり測定する。8~11 週齢まで測定を継続する。

## 4. 研究成果

ナノ材料の生体影響はそのサイズに依存していると考えられていることから、2 種類のサイズの銀ナノ粒子を用いてラット自発運動量への影響を検討した。

2 種類の銀ナノ粒子のサイズを光散乱法を用いて測定した結果、10nm と 20~30nm のところにピークを持つことが明らかになった。

次に、これらの銀ナノ粒子を分散溶液中で分散した状態で生後 5 日の雄性ラット新生仔に経口投与した(30 µg/pup)。対照ラットには分散溶液のみを投与した。6 週齢より自発運動量(Supermex システム)の測定を開始した。本システムではラットをとらえるセンサーが付属しており、ラットの異所行動、身づくろい、立ち上がりなどを測定する。

その結果、生後 5 日に銀ナノ粒子(10nm あるいは 20~30nm)を投与したラット群(5~7 匹)の自発運動量は、対照ラットのそれに比較すると、それぞれ 1.4 倍、1.3 倍有意に亢進することが明らかになった。

また、その分子レベルでの影響を DNA アレイ法で解析した。解析には各中脳を供した。その結果、シナプトタグミ

ンや各種膜受容体や P450 などの遺伝子発現が 2 倍以上増加していることが明らかになった。これらの遺伝子のこれまで報告されてきた機能から銀ナノ粒子の影響ネットワークを推定することは困難であった。

また、neurosphere アッセイ法は以下のように実施した。ラット胎生 15~16 日の中脳胞から神経幹細胞を単離し、その培養系を確立した。中脳胞から取り出した神経幹細胞は、自己組織化により培養 7 日ぐらいから塊を形成しはじめ、2~3 週間で直径 100~200 ミクロンの球状の塊を形成する。ニューロスフェアを培養系に静置すると、表面から細胞が飛び出した。ニューロスフェアが培養皿に接着していると、飛び出してくる細胞も底皿を外側に向かって移動していくことが観察された。脳内の細胞移動と培養系の細胞移動が同義的とは考えにくい、現象的に模倣した。

次に、こうした系に銀ナノ粒子を曝露し、その影響を調べた。ある濃度以上の銀ナノ粒子を曝露すると、ニューロスフェアから移動してくる細胞が減少した。細胞の移動距離を測定し、銀ナノ粒子濃度との関係を調べてみると、直線関係を得られた。50%阻害率 ( $IC_{50}$ ) を見積もると、約 400 ng/ml だった。これは他の細胞を用いた研究報告よりも大変感度の良い評価系であることを示した。

更に、銀ナノ粒子を曝露する前に予めニューロスフェアから神経幹細胞を十分に移動させておき、それから銀ナノ粒子を曝露する実験を行った。ある濃度以上の銀ナノ粒子は、移動した神経幹細胞のアポトーシスを誘導させることが明らかになった。結果的に移動した神経幹細胞が反発し縮退したかのようになるので、「反発性アポトーシス」と名付けた。細胞骨格を調べてみますと細胞の形態が変化し、細胞内小器官の一つであるミトコンドリアの膜電位の異常も付随して観察された。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 6 件)

M.Ishido, E. Shimaya, R. Usu, Y. Kurokawa, S. Hirano (2015) Repulsive apoptosis during exposure of mesencephalic neural stem cells to silver nanoparticles in a neurosphere assay in vitro. *Curr. Drug Discov. Technol.* 査読有 12, (印刷中)

M. Ishido J. Suzuki (2014) Classification

of phthalates based on an in vitro neurosphere assay using rat mesencephalic neural stem cells. *J. Toxicol. Sci.* 査読有、39(1), 25-32

M.Ishido, Y. Masuo (2014) Temporal effects of bisphenol A on dopaminergic neurons: an experiment on adult rats. *Open Environ. Sci.* 査読有、8, 9-17

M.Ishido (2013) Interleukin-6 secretion during p-nitrotoluene-induced neurite outgrowth of human neuroblastom NB-1 cells. *Curr Topics Toxicol.* 査読有、9, 43-47

M.Ishido, H. Miyata, K. Ishizawa, T., M. Murase, T. Hondou (2012) Transcriptional effects of magnetic fields of 50 Hz at 1.2  $\mu$ T and 100  $\mu$ T on human breast cancer MCF-7 cells. *J. Physics* 査読有、344(1) 012007

H.Miyata, K.Ishizawa, M.Ishido, K. Sugawara, M. Murase, T. Hondou (2012) The effects of 50 Hz sinusoidal magnetic field on nitric oxide production by human umbilical vein endothelial cell. *J. Physics* 査読有、344(1) 012006

[学会発表](計 11 件)

M.Ishido (2014) Evaluation of effects of electromagnetic fields on neural stem cells in vitro, using a neurosphere assay. 第 73 回日本癌学会学術総会、2014 年 9 月 27 日パシフィコ横浜(神奈川県)

M.Ishido (2014) Vasodilatory properties of ghlerin in the rat International symposium on Regulatory Peptides、September,2014、Kyoto Garden Palace (Kyoto)

石堂正美 (2014) 環境化学物質によるパーキンソン病モデルにおけるサイトカインの変動 第 37 回日本神経科学会、2014 年 9 月 13 日パシフィコ横浜(神奈川県)

石堂正美(2014) 神経幹細胞移動における環境物理化学因子による縮退に起因する TUNEL 陽性細胞の出現 第 22 回日本 Cell death 学会、2014 年 7 月 18 日東京医科歯科大学(東京都)

M.Ishido and S.Hirano A new screening system for neurotoxicity produced by silver nanoparticles in vitro.

6th International Symposium on Nano-  
technology. 29 October, 2013, Nagoya

H. Sone, T-T. Win-Shwe, Y. Fujitani, M.  
Ishido, A. Furuyama, S. Hirano  
Gene expression profiling in the mouse  
lung exposed to secondary organic aerosol  
derived from diesel exhaust. 第72回日本  
癌学会学術総会、2013年10月5日、パシフ  
ィコ横浜(神奈川県)

石堂正美、増尾好則  
内分泌攪乱化学物質のラットドーパミン神  
経系への時系列的影響  
第36回日本神経科学会、2013年6月20日、  
京都国際会議場(京都府)

M. Ishido (2013)  
The neurosphere assay for environmental  
neurotoxicants.  
14th Meeting of International Neuro-  
toxicological Association, 10 June, 2013,  
Netherland.

石堂正美  
パーキンソン病のロテノンモデルによる  
DOHaD 仮説の検証  
第35回日本神経科学大会、2012年9月19日、  
名古屋国際会議場(愛知県)

石堂正美  
ヒト乳癌細胞 MCF-7 における電磁界感受性  
第71回日本癌学会、2012年9月19日、ホ  
ルロイトン札幌(北海道)

石堂正美  
環境化学物質のアポトーティックトランス  
クリプトームとパスウェイ解析  
第21回日本 Cell death 学会、2012年7月  
27日、名古屋大学(愛知県)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石堂正美 (ISHIDO MASAMI)  
独立行政法人国立環境研究所・環境リスク  
研究センター・主任研究員  
研究者番号: 60211728