

令和元年6月19日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K00577

研究課題名(和文) 環境汚染物質の発達神経毒性評価に関する新たな非侵襲的アプローチ

研究課題名(英文) A novel approach for evaluation of environmental pollutant-induced developmental neurotoxicity using non-invasive MRI technique

研究代表者

Tin・Tin Win・Shwe (Win-Shwe, Tin-Tin)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境リスク・健康研究センター・主任研究員

研究者番号：00391128

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：近年、発達障害と呼ばれる自閉症スペクトラム障害(ASD)およびアルツハイマー病などの罹患率が上昇しているが、原因はまだ不明である。このような原因は遺伝的要因のみではないため、環境中に存在する化学物質が発症に影響を与えている可能性が考えられる。大気中のエアロゾルに含まれるガス状成分が酸化し、二次有機エアロゾル(SOA)が生成される。本研究では、自閉症モデルラットおよび発達期に化学物質であるバルプロ酸あるいはディーゼル排ガス由来二次生成有機エアロゾル曝露されたラットの社会行動、遺伝子発現について調べ、また近年技術的に進歩した非侵襲的な画像化方法(MRI)で脳の変化を評価する。

研究成果の学術的意義や社会的意義

医学および生物学における動物の使用は不可欠ですが、研究者は使用される数を減らし、それらの使用方法を改善するために積極的に取り組んでいる。このMRI法は実験のために動物を減らし、再利用しそしてリサイクルするのに適している。動物との実験方法を改善すると、結果の信頼性が高まり、また実験がより人道的で効率的になる。イメージングを使用することにより、個々の動物の寿命を通して病気の進行を見ることができ、したがって使用される数を劇的に減らすことができる。イメージングはまた、一度にいくつかのバイオマーカーを見ることにより、単一の実験でより多くの質問に答える可能性を提供する。

研究成果の概要(英文)：In recent years, the prevalence of developmental disorders such as autism spectrum disorder (ASD) and Alzheimer's disease are increasing, but the cause is still unknown. Both genetic and environmental factors are considered for the etiology of ASD. The gaseous components contained in the atmosphere are oxidized to form a secondary organic aerosol (SOA). In this study, we investigated the social behavior and related gene expression of valproic acid-induced autism model rats and rats exposed to the SOA derived from diesel exhaust during developmental period. We also used technologically advanced non-invasiveness imaging MRI method to evaluate changes in the brain.

研究分野：環境神経毒性学

キーワード：環境汚染物質 発達神経毒性 ラット MRI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

我々はこれまで、*in vivo* 研究において、ナノ粒子を多く含んだディーゼル排気ガス (NRDE) 曝露が学習能力および脳内での記憶関連遺伝子発現に影響を及ぼすことを明らかにした(1-6)。初めに、二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) の健康影響に関する研究を行い、単回点鼻投与は肺に炎症を引き起こすが、脳では重度の影響は観察されないことを報告した(7)。更に、DE-SOA 吸入曝露がマウスの学習行動、母性行動に影響を及ぼす可能性があることを報告した(8)。そして、DE-SOA の発達期曝露が社会行動・空間学習能力に及ぼす影響を検討し、社会行動の一部に影響を及ぼすことが見だした (9)。さらに、胎仔期から乳仔期での DE もしくは DE-SOA の発達期吸入曝露が成熟後の雄マウスの性行動や不安・情動レベルにどのような影響を及ぼすのかを検討した。妊娠 14 日目から出生後 21 日目まで (5 時間/日、5 日/週) の DE もしくは DE-SOA を曝露し、成熟後の雄マウスの性行動や不安関連行動、およびうつ病症状様行動を観察した結果性行動や不安関連行動への影響は認められず、またうつ病症状様行動の発現も認められなかった(10)。発達期における環境汚染物質曝露は、小児、あるいは次世代の健康に対する主な危険要因となる可能性があることが報告されている。自閉症スペクトラム障害 (ASD) は、神経発達障害であり、障害のある社会的相互作用、言語/コミュニケーション、興味範囲および反復性を特徴としている。遺伝的要因と環境要因の両方が ASD に寄与している。しかし、自閉症の正確な病因と病態生理は不明である。我々は、出生前および幼少期の大気汚染物質曝露が神経炎症を誘導し、ASD の潜在的な要因であると仮定した。本研究では、DE-SOA を環境汚染物質のモデルとしてラットの発達期 DE-SOA 曝露による、神経毒性評価を社会行動、非侵襲的な画像化 (MRI) 方法を使用し評価する。

2. 研究の目的

近年、発達障害と呼ばれる自閉症スペクトラム障害 (ASD) およびアルツハイマー病などの罹患率が上昇しているが、原因はまだ不明である。このような原因は遺伝的要因のみではないため、環境中に存在する化学物質が発症に影響を与えている可能性が考えられる。大気中のエアロゾルに含まれるガス状成分が酸化し、二次有機エアロゾル (SOA) が生成される。本研究では、自閉症モデルラットおよび発達期に化学物質であるバルプロ酸あるいはディーゼル排ガス由来二次生成有機エアロゾル曝露されたラットの社会行動、遺伝子発現について調べ、また近年技術的に進歩した非侵襲的な画像化方法 (MRI) で脳の変化を評価する。

具体的には

実験 (1) 発達期に化学物質であるバルプロ酸(VPA)を投与した自閉症モデルラットの社会行動、遺伝子発現、及び非侵襲的な画像化方法(MRI)で脳の変化を評価する。

実験 (2) 発達期に大気汚染物質二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) を投与したラットの社会行動、遺伝子発現、及び非侵襲的な画像化方法(MRI)で脳の変化を評価する。

実験 (3) 発達期に大気汚染物質二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) を投与したラットの social dominance behavior、遺伝子発現、及びマスト細胞およびミクログリアなどの活性化を評価する。

3. 研究の方法

実験 1

28年度ではSprague Dawleyラットを用いて、化学物質であるバルプロ酸(VPA)を発達期である妊娠12.5日に投与した自閉症モデルラットの社会行動、遺伝子発現、及び非侵襲的な画像化方法(MRI)で脳の変化を評価した。11~13週齢時に社会行動(社交性テスト (Sociability test)、社会斬新さ優先度テスト (Social novelty preference test))を行い、さらにVPA誘導自閉症モデル雄ラットの海馬における社会行動関連遺伝子(セロトニン、BDNF、ニューロリジン等)のmRNA発現をリアルタイム RT-PCR方法で調べた。

実験 2

29年度では、実験動物として妊娠8日のSprague Dawleyラットを購入し、妊娠13日目から出生後21日目まで全身吸入曝露チャンバーを用いて、清浄空気群 (Control, n=8)、ディーゼル排気ガス群 (DEP, n=8)、DEPにオゾンを加えたDE-SOA群 (n=8) の曝露 (5時間/日、5日/週) を行った。出生後11~13週齢の雄ラット (名群8匹) の社会行動を観察した。曝露後のラットの社会行動については社交性テスト (Sociability test)、社会斬新さ優先度テスト (Social novelty preference test) 等についてラット用ソーシャビリティテストシステムを用いて調べた。行動テスト終了24時間後に、深麻酔下で脱血後脳を採取し、海馬における社会行動と関連する遺伝子、炎症性サイトカイン及び酸化ストレスマーカー等のmRNA発現をリアルタイムRT-PCR法で調べた。

実験 3

30年度では、ラットモデルにおける環境汚染物質曝露による ASD 様の行動を検討することを目的とした。Charles River Laboratories から入手した Sprague Dawley ラット (n = 24) を、本研究所の全身曝露チャンバーで妊娠 14 日から出生後 21 日まで、清浄な空気、DE および DE-SOA に曝露した。11~13 週齢の時、Social dominance behavior を調べるためにチューブテストを行った。行動試験の完了後、免疫組織化学を用いて前頭前野におけるマスト細胞およびミクログリアを検出した。

4. 研究成果

実験 1

VPA 誘導自閉症モデルラットでは社会行動(社交性テスト (Sociability test), 社会斬新さ優先度テスト (Social novelty preference test))の低下が認められた(図 1)。さらに VPA 誘導自閉症モデル雄ラットの海馬における社会行動関連遺伝子(セロトニン、BDNF、ニューロリジン等)の mRNA 発現減少が見られた。免疫染色方法でミクログリアマーカーである Iba1 の発現を調べたところ VPA 誘導自閉症モデル雄ラットの海馬で Iba1 の発現増加が認められた (11)。行動試験から自閉症様行動を示すラットを抽出し、MRI 測定を実施できた。この結果、白質体積に関してモデルラットで有意に小さいという結果が得られた。

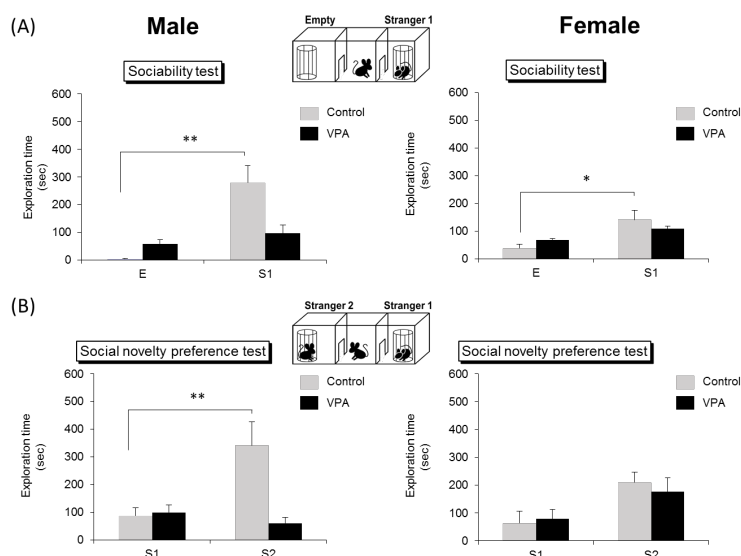


図 1. VPA 誘導自閉症モデルラットにおける社会行動:社交性テストと社会斬新さ優先度テストの結果 (N = 5, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$)

実験 2

社会行動への影響では、胎児期・乳児期に DE-SOA 曝露された成獣ラットでは、社交性テスト (Sociability test) で、対照群と比べ Stranger(1)ラットのカップの探査時間が有意に短かった。社会斬新さ優先度テスト (Social novelty preference test) では、対照群で Stranger(2)ラットのカップに探査時間が長く、逆に、DE-SOA 曝露された群では、Stranger(1)ラットの カップの探査時間が有意に短かった。社会的相互作用テスト (Social interaction test) では、対照群は他の群と比べ、社会的な相互作用の時間が有意に長かったことが認められた(図 2)。さらに、海馬における関連遺伝子発現を調べた結果、serotonin、BDNF などの発現はいずれも DE-SOA 群で減少が認められたが、neuroligin の発現変化は見られなかった。さらに、海馬における炎症性サイトカイン interleukin(IL)-1 β 、酸化ストレスマーカー heme-oxygenase (HO)1 の発現増加が DE-SOA 群で見られた。行動試験から自閉症様行動を示すラットを抽出し、MRI 測定を実施する計画である。

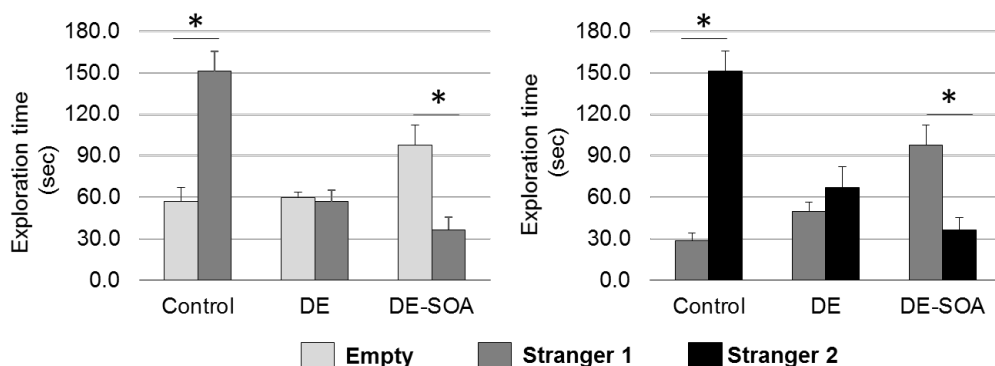


図 2. 発達期 DE-SOA 曝露されたラットにおける社会行動:社交性テストと社会斬新さ優先度テストの結果 (N = 8, * $P < 0.05$)

実験 3

DE-SOA の発達期曝露が Social dominance behavior に影響することが明らかになった(図 3)。さらに前頭前野におけるマスト細胞およびミクログリアなどの活性化を誘導したことが認められた。SOA の成分の中で、有機炭素は神経毒性を誘発することが考えられる。我々の研究は、発達期 DE-SOA 曝露がラットの前頭前野における神経免疫バイオマーカーを介して神経毒性を誘導し、社会的優位行動に影響を与える可能性があることを示唆している。

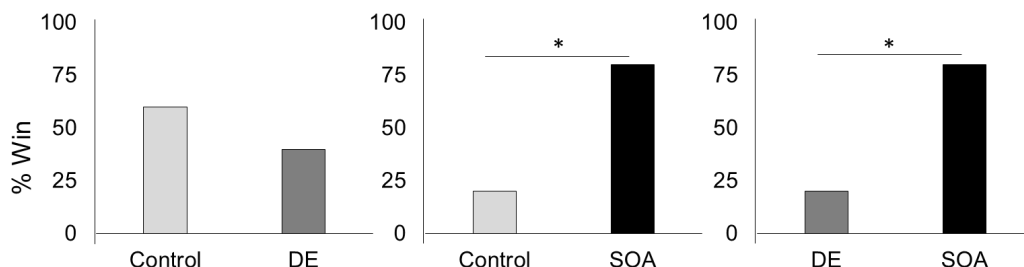


図 3. チューブテストの結果 (N = 6, *P < 0.05)

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

- (1) Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano. Effects of diesel exhaust derived secondary organic aerosol (DE-SOA) exposure during developmental period on anxiety and depression in mice. *Indoor Environment*, 査読有、22 巻、2019、23-32.
- (2) Tin-Tin Win-Shwe, Nay Chi Nway, Motoki Imai, Thet-Thet-Lwin, Ohn Mar, Hidehiro Watanabe. Social Behavior, Neuroimmune Markers and Glutamic Acid Decarboxylase Levels in a Rat Model of Valproic Acid-induced Autism, *J Toxicol. Sci.*, 査読有、43 巻、2018、631-643. doi: 10.2131/jts.43.631.
- (3) Tin-Tin Win-Shwe, Fujitani Y, Hirano S. Neurotoxicity assessment of secondary organic aerosols by intranasal and inhalation exposure in mice. *Eurozoru Kenkyu*, 査読有、32 巻、2017、169-175.

[学会発表](計 6 件)

- (1) Tin-Tin Win-Shwe. **Speaker in Joint Symposium** (2019) *Environment and Health: Clean Environment, Better Health*. "Air pollution and health risk: Running collaborative research between NIES and UM1 (1)". 47th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 7. Symposium Abstract booklet, page 11-15.
- (2) Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano (2019) Social dominance behavior and brain biomarkers after gestational and lactational exposure to secondary organic aerosol in male rats. 47th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 8. Abstract booklet, P6 (Poster), page 130.
- (3) Tin-Tin Win-Shwe. **Invited Lecture** (2018) :Lecture series for Retaining Internationalized Characters:[Global Issues and Global society: Environmental Pollution & Health Effects] Effects of chemical exposure on central nervous system in animal models. The University of Tsukuba, October 10.
- (4) Tin-Tin Win-Shwe. **Invited Speaker in Symposium** (2018) 「Environmental Factors and Biological Reaction」 Social behavior and neuroimmune responses in valproic acid exposed autistic rat model. The 41st Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. Pacifico Yokohama, Yokohama. November 28-30 Abstracts 2F4 page 64.
- (5) Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano (2018). Perinatal exposure to secondary organic aerosol influences neurobehavioral development and inflammatory markers in rats. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, Brussels, Belgium September 2-5. Abstract P23-01 (Poster), page 143.
- (6) Tin-Tin Win-Shwe, Nay Chi Nway, Ohn Mar, Hidehiro Watanabe, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano (2018). Developmental exposure to secondary organic aerosol alters social dominance behavior and expression of neuroimmune biomarkers in rats. 27th Symposium on Japan Environmental Chemistry. Naha, Okinawa, May 22 to 25. Abstract P-073 (Poster), page 536-537.
- (7) Tin-Tin Win-Shwe. **Invited Speaker in Symposium** (2018) ミクロ～マクロ(グローバル)な視

- 点で PM2.5 の健康影響を評価する：動物モデルを用いた大気汚染物質曝露の脳神経系に及ぼす影響。第 88 回日本衛生学会学術総会 東京、3 月 22-24. Abstract S18-2, Page S182.
- (8) Tin-Tin Win-Shwe, Motoki Imai, Nay Chi Nway, Thet-Thet-Lwin, Ohn Mar, Hidehiro Watanabe (2018) Expression of inflammatory markers and glutamic acid decarboxylase level in a rat model of valproic acid induced autism. 46th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 8-12. Abstract Poster-19, page 117.
- (9) Tin-Tin-Win-Shwe, Hidehiro Watanabe (2017) Social behavior and related gene expressions in fragile X mental retardation 1 (Fmr1) gene knockout and valproic acid (VPA)-induced autism rat models. 45th Myanmar Health Research Congress. Yangon, Myanmar, January 9-13. Abstract Poster-3, page 88.
- (10) Tin-Tin Win-Shwe, 藤谷雄二, 平野靖史郎 (2017). ディーゼル排気ガス由来二次生成有機エアロゾル (DE-SOA) の発達期曝露がラットの脳神経系に及ぼす影響。第 58 回大気環境学会年会 神戸市 September 6-8. Abstract P-103 (Poster), page 423.
- (11) Tin-Tin Win-Shwe, Imai M, Nway NC, Lwin TT, Mar O, Maruyama H, Kawakami F, Watanabe H (2017). Alteration of social behavior and glutamic acid decarboxylase level in the valproic acid-induced autism rat model. 10th World Congress on Developmental Origins of Health and Disease, Rotterdam, the Netherlands October 15-18. Abstract PO2.07.15 (Poster), page 383.
- (12) Tin-Tin-Win-Shwe. **Invited Speaker in Symposium** (2017)「大気汚染物質に関する健康影響評価研究の最新動向：越境大気汚染から国内起源まで」Evaluation of Neurotoxicity by air pollutant exposure using animal model. 44th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicology. Pacifico Yokohama, Yokohama. July 10-12. Abstracts S14-4, page S90.
- (13) Tin-Tin-Win-Shwe (2016). **Invited Symposium** “Impact on the learning ability and neuro-immune biomarkers by diesel exhaust originated secondary organic aerosol exposure.” 39th Annual Meeting of the Molecular Biology Society of Japan. SYMPOSIUM: Effects of environmental air pollutants on systemic inflammation - Cause allergy or cancer? Pacifico Yokohama, Yokohama. December 2, Abstract 3PS2-6, page 137.
- (14) Tin-Tin-Win-Shwe, Yuji Fujitani, Hidehiro Watanabe, Seishiro Hirano (2016). Role of toll-like receptor 4 in diesel exhaust origin secondary organic aerosol-induced impaired spatial learning ability in neonatal mice. Society for Neuroscience 2016. San Diego, USA, November, Abstract Poster 740-02, page 61.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕
ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：渡邊 英宏

ローマ字氏名：Watanabe Hidehiro

所属研究機関名：国立研究開発法人国立環境研究所

部局名：環境計測研究センター

職名：室長

研究者番号 (8 桁)：60370269