

平成 21 年 6 月 29 日現在

研究種目： 基盤研究(B)
 研究期間： 2007 年～2008 年
 課題番号： 19390036
 研究課題名（和文） ナノ粒子胎仔期曝露による微細脳障害の誘発とそれに伴う
 脳神経疾患発症に関する研究
 研究課題名（英文） Research on the induction of minimal brain dysfunction and symptoms of cranial
 nerve disease by prenatally exposure to nanoparticles in mice
 研究代表者
 武田 健 (TAKEDA KEN)
 東京理科大学・薬学部・教授
 研究者番号： 80054013

研究成果の概要：

ディーゼル排ガス中の超微小粒子が母体を介して血液関門未発達の子の脳に移行し、生後も脳血管周囲顆粒細胞の細胞内顆粒に蓄積し、核の断片化を引き起こすこと、血管内皮やアストロサイトなど周辺の細胞に影響を及ぼすことを明らかにした。脳内モノアミン濃度の変動、協調運動性の低下、記憶学習能力の低下などが認められた。さらに、化粧品基材の酸化チタンナノ粒子が、同様な動態と作用を持つことを明らかにした。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
19 年度	9,300,000	2,790,000	12,090,000
20 年度	5,500,000	1,650,000	7,150,000
年度			
年度			
年度			
総計	14,800,000	4,440,000	19,240,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：薬学・環境系薬学

キーワード：環境衛生学、環境化学、ナノ粒子、ナノマテリアル、ディーゼル排ガス、胎児期、脳神経系、次世代

1. 研究開始当初の背景

自閉症をはじめ、学習障害(LD)、注意欠陥多動性障害(ADHD)など軽度の発達障害と診断される学童の増加は著しく、大きな社会問題となっている。その

原因は不明である。脳や行動の発達は遺伝情報と胎児期を含む広い意味の環境要因の相互作用で決まるとされている。実際の自閉症児の脳で起こっている発症過程は発達期に特定のニューロン回

路の形成異常が、様々な原因によって起こり、その回路が支えている高次機能が発現する時期に異常が顕在化すると考えられている（黒田洋一郎、医学のあゆみ 217, 1007-1013, 2006）。睡眠薬サリドマイドを服用した妊婦から生まれた子に自閉症が発症したこと、ポリ塩化ビフェニール(PCB) 汚染でも、カネミ油症事件と同じ台湾での事故で被害者の母親から生まれた子供は知能指数が低下し、多動性を示したことが報告されている。これらは薬や環境由来の化学物質が脳の発達障害を起こす例を示している。しかし、いずれも現代の疾患増加の原因を説明できる根拠になっていない。

2. 研究の目的

妊娠中にディーゼル排ガスを吸入したとき、出生仔の脳に発生する微細障害と脳神経機能の変化を詳細に調べ、現在、急増しつつある子供の神経疾患発症との関連を明らかにする。

- (1) ディーゼル排ガス胎仔期曝露、あるいは胎仔期からの生涯曝露の実験系においてガス成分と微粒子成分に分け、脳組織及び機能への影響を明らかにする。微粒子成分のうち特にナノ粒子（1～100 nm）の脳への輸送経路、蓄積機構、毒性発現機構とその影響を明らかにする。
- (2) 脳神経系への影響は(1)電子顕微鏡下病理組織学的解析、(2)行動薬理学的解析、(3)モノアミン代謝解析、(4)遺伝子発現（マイクロアレイ法、in situ hybridization法）解析などを行い、それぞれの異変を明らかにする。それらが最近の幼児、児童など子供たちに増える傾向にある微細脳機能障害症候群（多動症候群、注意

欠陥障害、学習障害）とどのような関わりをもつかを明らかにする。

3. 研究の方法

実験方法

(1) ナノマテリアルの曝露

① ディーゼル排ガス (DE) 曝露

主に結核予防会結核研究所のチャンバーにて、DEを 0.17 mg DEP / m³の濃度で、胎齢 2 日目から 16 日目まで（4、5、11、12 日目は除く）1 日 8 時間曝露した。

② ディーゼル排ガス微粒子DEP 曝露

DEP は、曝露チャンバーで捕集したものをを用いた。この DEP を生理食塩水に分散させて、濃度を 1000 μg/mL に調整した。ICR 系妊娠マウスに胎齢 6、9、12、15、18 日に 0.1 mL ずつ DEP を投与した。また、対照群は同時期に同用量の生理食塩水を投与した。

③ TiO₂ ナノ粒子曝露

ICR 系妊娠マウスに妊娠 6、9、12、15、18 日目で酸化チタン（粒径 25-70 nm, アナターゼ型結晶系を皮下投与（100 μg/mouse）した。酸化チタンは 0.05 % Tween-80 を含む生理食塩水に 1000 μg/mL の濃度になるように分散させ、投与量は 0.1 mL とした。コントロール群には溶媒を皮下投与した。

(2) 行動試験

4 週齢時に本学ナノ粒子健康科学センターの動物舎に移送し、馴化期間を置いた後、7 週齢より対照群、曝露群共に雄性マウスを用いて、water maze test および passive avoidance test を用いて学習・記憶を評価した。

(3) 定量的 RT-PCR 法による遺伝子発現変動解析

出生仔の成長後、脳を摘出した。これを氷冷しつつ海馬を直ちに液体窒素で凍結し

て -80 °C で保存した。この凍結試料から total RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成した後、特異的プライマーを用いて定量的 RT-PCR 法により解析を行った。

(4) 免疫組織化学染色

4 %ホルムアルデヒド (2.5 %グルタルアルデヒドを含む) で出生仔マウスを灌流固定した後、包埋を行った。厚さ 20 μm の凍結切片を作製し、蛍光抗体法を用いて染色し、光学顕微鏡により観察を行った。

(5) 脳内モノアミン及び代謝物測定

6 週齢時に脳を摘出した。これを氷冷しつつ嗅球、前頭前野、線条体、側坐核、海馬、視床下部、扁桃核、中脳、脳幹、小脳の 10 部位に分画し、直ちに液体窒素で凍結して -80 °C で保存した。これらの凍結試料に、0.2 M 過塩素酸を加え、さらに内標準物質として isoproterenol を添加したホモジネートサンプルを調製した。このサンプルを電気化学検出器付き HPLC を用いて測定した。今回脳内モノアミンとして DA、noradrenaline (NA)、5-hydroxytryptamine (5-HT) の 3 種に加え、DA の代謝物である 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC)、3-methoxytyramine hydrochloride (3-MT)、homovanillic acid (HVA)、NA の代謝物である normetanephrine (NM)、3-methoxy 4-hydroxyphenyl glycolhemipiperazinium (MHPG)、5-HT の代謝物である 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA) の 6 種類について測定を行った。

4. 研究成果

ディーゼル排ガス中の超微小粒子が母体を介して血液関門未発達の子の脳に移行し、末梢血管微小梗塞を引き起こ

すこと、アストロサイトなど周辺の細胞に影響を及ぼすことを明らかにした。脳内モノアミン濃度の変動、協調運動性の低下、記憶学習能力の低下など脳機能に様々な異変が認められた。さらに、カーボンブラックや化粧品基材の酸化チタンナノ粒子が、同様な作用を持つことを明らかにした。

(1) ディーゼル排ガス (超微小粒子) の胎仔期曝露による脳神経系への影響

従来、浮遊粒子状物質の健康影響として粒子状物質 PM10 及び PM2.5 の健康影響の研究が行われてきたが、今後、粒径 0.1 μm (100 nm) 以下の粒子、すなわちナノ粒子の健康影響である PM0.1 の本格的な研究が必須である。都市圏では浮遊粒子状物質のうち、微小粒子あるいは超微小粒子の多くはディーゼル車由来といわれている。実際、我々が所有するディーゼルエンジン排ガス曝露装置内に浮遊する粒子の粒径分布を調べてみると、100 nm 前後の粒子が、数では最も多く占めていた。

我々はディーゼル車が排出するガス (Diesel Exhaust; DE) を妊娠中の母マウスに吸わせ、生まれてきた仔の生殖系、脳神経系などへの影響を検討してきた。この研究で排ガス由来と思われるナノサイズ (100 nm 以下) の黒い粒子状物質が仔の脳血管周囲顆粒細胞内の消化顆粒に蓄積していること、脳内に様々な異常が認められることを世界に先駆けて明らかにした。排ガス中のこのナノ粒子は、母体の胎盤を通過して胎仔に移行し、さらに血流に乗り、未発達の脳血液関門 (Blood Brain Barrier) を通過して脳内に移行し、脳血管周囲顆粒細胞に取り込まれたものと考えられる。

(2) ディーゼル排ガス中の粒子 (超微小粒子)

曝露装置内のディーゼル排ガス粒子 (Diesel Exhaust Particle ;DEP) の粒径分布は、走行状態で異なる。当研究センターの曝露装置ではアイドリング時は小さな (個数ピークは 60 nm 前後)、高速運転時に大きな (個数ピークは 110 nm 前後) 粒径分布を呈していた。炭素の球状物質がコアとなり、芳香族炭化水素や硫酸塩、金属など、様々な化学物質が付着して DEP が形成されると考えられている。実際、粒子表面を有機溶媒で洗浄すると、粒子表面の鉄イオンが多くなり、毒性が増すことが明らかになった。ディーゼル排ガス曝露装置の希釈トンネルから採取された粒子状物質の電子顕微鏡下での観察では、球状の粒子とともに繊維状 (カーボンナノチューブ様) 物質も多数認められた。

(3) 脳の病理所見

光学顕微鏡所見として、DE 曝露群では、血管周囲に浮腫および小血管の閉塞が認められた。この所見は、DE 曝露群のすべての脳の神経組織全体にび慢性に (ひろがって) 分布していた。さらに、電子顕微鏡下で、閉塞小血管の内皮細胞は欠損しているか、あるいはアポトーシス形成過程の内皮細胞が認められた。これら内皮細胞の変化は、大脳皮質、海馬すべてに認められ、平滑筋が存在しない微小血管ではつぶれて閉塞していた。これらは、病理学的にび慢性の多発性微小梗塞と判定される。また、光学顕微鏡下での血管周囲の浮腫様形態は、血管周囲に伸びたアストロサイト (神経膠星状細胞) のエンドフットが異常に膨化したことによる。この細胞質内にはしばしばミエリン様物質が認められた。

以上のことから次のような傷害が示唆される。① 末梢血管そのものの傷害、② 血管から栄養を得ているアストロサイトの機能

不全による神経細胞の傷害、③ 末梢血管閉塞による閉塞部位から先の細胞の傷害の 3 点である。これらは脳の萎縮に繋がる事象である。

さらに、大脳皮質にび慢性のアポトーシス像 (カスパーゼ 3 陽性細胞) や小脳プルキンエ細胞のアポトーシス像も観察された。

(4) モノアミン代謝の変動と行動異変

電子顕微鏡による観察とともに、神経伝達物質のモノアミンの代謝や行動試験にも異変が認められたことから、最近、増加している微細脳機能障害による脳神経疾患との関連性についても研究を進めている。ディーゼル排ガス由来の微粒子 (DEP) 画分を妊娠期に投与した研究においても、産仔の脳神経系への影響が認められた。以上の研究は大気に存在する超微小粒子 (あるいはガス成分) が母から子に伝わり、子の生育発達に伴って様々な疾患を引き起こす要因になることを示唆している。

(5) 意図的に生産されるナノマテリアルの健康影響—ナノマテリアルの胎仔期曝露による脳神経系への影響

現在、国際的にナノテクノロジーの基盤材料であるナノマテリアルの毒性の有無と、その程度が議論され始めている。我々は非意図的に産生されるディーゼル排ガス微粒子以外に、カーボンブラック、カーボンナノチューブ、フラーレン、酸化チタンなど意図的に工業的に生産される様々なタイプのナノマテリアルの健康への影響、特に次世代を担う子供たちへの影響を中心に研究を進めてきている。影響を及ぼす部位やその障害の程度に差はあるものの、調べたナノマテリアルは、基本的には上記 DEP と同様な所見を示すことが見出されつつある。酸化チタンを妊娠マウス皮下に投与すると、酸化チタンナノ粒子が産仔の脳に移行し、脳末梢血管周囲に異常

を引き起こし、脳の特定の部位に限局してアポトーシス像が認められた。さらに神経伝達物質のモノアミン系の代謝異常も認められた。また、網羅的遺伝子発現解析並びに選択的遺伝子発現解析の結果からも様々な異常が明らかになってきた。

ナノマテリアルの脳への移行について Oberdörsterらは、ラットの吸入実験において、鼻部上皮に沈着した¹³Cナノ粒子が、嗅覚神経を介して、脳へアクセスすることを実証した。一方、我々は、妊娠期の母から仔に移行し、出生後の成長期にも脳内に取り込まれていること、病理学的に、また、機能的に様々な影響を及ぼすことを世界に先駆けて明らかにした。

(6) 考察

① ナノ粒子は第4の病原物質？！

ここ8年近くにわたる我々の研究と国内外で蓄積されつつある研究報告から、ナノマテリアルは潜在的に様々な疾患の発症並びに増悪化の重要な要因と考えられる。ナノ粒子はバクテリア、ウイルス、プリオンに続いて第4の病原体（正確には病原物質）と表現したくなるほど様々な病態を引き起こす。ナノ粒子は、呼吸器や消化管から、また極めて僅かであるが皮膚からも取り込まれ、血液を介して全身のあらゆる組織に運ばれる。病理学的な観察から、特に血管及び血管周囲の細胞に大きな影響を及ぼしている。ナノ粒子は重量あたりの表面積が大きく、粒子表面に分子が露出している割合が大きいため、活性酸素による酸化ストレスなどが生じやすい。さらに、蓄積され、排出されにくい特性を持っている。

②成人病胎児期起源説との一致

英国のDavid Barker博士は疫学調査の結果に基づいて1986年に「成人病胎児期起源

説」を唱えている。胎児期における栄養不足は、臓器の十分な発育を妨げる要因になっているが、それらを補う体内システムの形成が生活習慣病と呼ばれている成人病の発症に繋がるという仮説である。胎児期や乳幼児期にその素因が形成され、出生後の環境要因によって成人病などの疾病に罹りやすくなる。胎児期にディーゼル排ガスやナノ粒子の曝露を受けると、出生後の発達に応じて脳神経系をはじめ生殖系やその他の臓器で様々な症状が現れるという我々の研究結果は、彼の仮説を支持している。我々は、さらに、ナノマテリアルの胎児期曝露が生活習慣病といわれているいくつかの疾患群の増悪化にも関連があるという作業仮説に基づいて、現在、さらなる研究を進めている。

③今後の対策

医薬品の開発は安全性確認が前提としてある。開発の段階ではたえず副作用を考慮しながら創薬を目指している。メリットが大きければ、デメリットを極力減らし、利用できるよう工夫する。使用に踏み切った場合は、副作用情報を公開し、適切に使用してもらうことになる。ナノマテリアルの開発、製造、産業への応用にも同様なことが言えるのであろう。DDS (Drug Delivery System) として薬物輸送の手段として直接体内に投与したり、化粧品のように皮膚に塗布したりする以外に、電子材料や触媒・印刷塗料として開発するときなどでも、物によっては、体内に入り込む機会が当然あるはずであるという前提でそれらの毒性を明らかにし、その監視と防護策を講じることが求められる。また、ナノマテリアルが使われた製品の劣化の問題や産業廃棄物としての取り扱いにも十分な配慮が求められる。

ナノマテリアルの有害性と健康への影響の実態が明らかになれば、予防対策は立てや

すくなる。さらには治療法も考えられるようになる。一方では、ナノテクノロジーは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、産業発展のため必須の科学技術である。従って、わ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マテリアルの健康への影響を明確にして、十分な対策を構築し、足元を固めていくことが極めて重要な課題であると思われる。

(7) 結論

我々は動物実験を通して以下の結論を得た。ナノマテリアルは意図的に生産されたものであり、非意図的に産生されたものであり、呼吸から動物体内に入ると、血流にのり、全身の組織・臓器を駆け巡る。また、妊娠した母から仔に移行し、未発達な脳血液関門、精巣血液関門などを通過し、周辺の細胞に影響を及ぼす。吸入、気管内投与、点鼻投与、皮下投与など投与方法に関わらずナノマテリアルが妊娠した母マウスの血流にのれば仔に移行し、影響を及ぼす。生まれてから成長する過程で様々な症状として現れることがあり、それらは時として、重大な疾患の発症、増悪化に繋がる恐れがある。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 7 件)

- ① Takeda, K., Suzuki, K., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M., Oshio, S., Nihei, Y., Ihara, T., sugamata.M.(2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems..J. Health Sci., 55(1), 95-102, 2009. (査読有)
- ② Xu G, Umezawa M., and Takeda K. (2009) Early Development Origins of Adult Disease Caused by Malnutrition and Environmental Chemical Substances. J. Health Sci.55(1),11-19. (査読有)

- ③ Yokota, S., Mizuo, K., Moriya, N., Oshio, S., Sugawara, I., and Takeda, K. (2009) Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. Neurosci Let. 449,38-41. (査読有)
- ④ Komatsu,T., Tabata, M., Kubo-Irie, M., Shimizu, T., Suzuki, K., Nihei, Y., and Takeda, K. (2008)The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. Toxicol. In Vitro. 22,1825-1831. (査読有)
- ⑤ Satou, K., Nonaka, Y., Ohashi, N., Shimizu, M., Oshio, S., and Takeda, K. (2008) The effects of in uter exposure to a migrant, 4,4'-butylidenebis (6-t-butyl -m-cresol), from nitrile-butadiene rubber gloves on monoamine neurotransmitter in rats. Biol. Pharm. Bull. ;31(12):2211-5.(査読有)
- ⑥ K. Suzuki, T. Komatsu, M. Kubo-Irie, M. Tabata, K. Takeda, Y. Nihei.(2008) Interaction between Diesel Exhaust Particles and Cellular Oxidative Stress. Applied Surface Science, 255, 1139-1142. (査読有)
- ⑦ N.Fukuhara, K. Suzuki, K. Takeda, Y. Nihei.(2008) Characterization of Environmental Nanoparticles. Applied Surface Science, 255, 1538-1540. (査読有)

[学会発表] (計 13 件)

- ① 高橋雄大、水尾圭祐、岡田悠佳、篠塚崇徳、武田 健:酸化チタンナノ粒子胎仔期曝露が脳内モノアミン系に及ぼす影響: 日本薬学会第129年会、京都(3月)2009年
- ② 横田 理、佐藤 央、森家 望、水尾圭祐、菅原 勇、武田 健:行動評価試験に基づくディーゼル排気微粒子胎仔期曝露の脳神経系への影響解析、日本薬学会第129年会、京都(3月)2009年
- ③ M. Suagmata, T. Ihara, K. Takeda.21th European Congress of Perinatal Medicine.Istanbul, Turkey.September 10-13, 2008.MATERNAL EXPOSURE TO TITANIUM DIOXIDE NANO-PARTICLES DAMAGES NEWBORN MURINE BRAINS.
- ④ 横田 理、岩田麻里、森家 望、水尾圭祐、押尾 茂、菅原 勇、井原智美、菅又昌雄、武田 健:ディーゼル排ガス胎仔

期曝露が中枢神経に及ぼす影響、第52回
日本薬学会関東支部大会、千葉(10月)2008
年

- ⑤ 横田 理、岩田麻里、森家 望、水尾圭
祐、押尾 茂、菅原 勇、武田 健:胎仔
期ディーゼル排ガス曝露がdopamine神経
系に及ぼす影響、フォーラム2007衛生薬
学・環境トキシコロジー、熊本(10月)2008
年
- ⑥ 武田 健:ナノ粒子の健康科学-意図的・非
意図的に生産されるナノ粒子の健康への
影響 ナノテクノロジーの医療への挑戦
異分野融合ナノテクノロジー横浜コロキ
ウム、横浜(2月)2008年
- ⑦ 岩田麻里、清水碧、高橋雄大、押尾茂、
菅原勇、武田 健:ディーゼル排ガス胎仔
期曝露がマウス脳内モノアミン系に及ぼ
す影響:日本薬学会第127年会、富山(3
月)2007年
- ⑧ 小松朋子、入江美代子、田畑真佐子、鈴
木健一郎、福原 渚、二瓶好正、武田 健:
ナノ粒子の細胞への取り組みとその影響
フォーラム2007 衛生薬学・環境トキシ
コロジー 大阪(11月)2007年
- ⑨ 横田 理・森家 望・岩田麻里・小田桐
隆志・高橋雄大・水尾圭祐・押尾 茂・
菅原 勇・井原智美・菅又美穂・菅又昌
雄・武田 健:胎仔期ディーゼル排ガス暴
露が運動機能に及ぼす影響 フォーラム
2007 衛生薬学・環境トキシコロジー
大阪(11月)2007年
- ⑩ 武田 健:大気中微粒子の健康影響・ナノ
粒子の毒性学 第12回静岡健康・長寿学
術フォーラム2007 静岡(10月)2007年
- ⑪ 鈴木健一郎、仲村聡一郎、武田 健、二瓶
好正:大気環境中ナノ微粒子の粒別分析評
価法の開発 第16回環境化学討論会 北
九州(6月)2007年
- ⑫ 武田 健:ディーゼル排ガスの健康影響-
特に次世代への影響を中心に 酸性雨調
査研究会 東京(5月)2007年
- ⑬ 武田 健:「ナノ粒子の健康科学」 徳島
文理大学 徳島(5月)2007年

[図書] (計 2件)

- ① 武田 健、菅又昌雄:ファルマシア45(3)

245-250 (2009)「未知なる遭遇—ナノマ
テリアルの健康影響次世代影響を中心
に」

- ② ナノ粒子の健康科学と産業の関わり，発
明と生活，2007年7月号 第507号

[産業財産権]

○出願状況
なし

○取得状況
なし

[その他]

- ① 科学新聞 2009年2月13日
「ナノ粒子は第4の病原物質か?」
- ② 読売新聞 2009年2月1日
「酸化チタン微粒子妊娠マウスに注射
子の脳などに異常も」
- ③ 日本薬学会第128年会講演ハイライト
2008年3月26日
環境科学部門「細胞の中にナノ粒子！～
ナノ粒子は有害か？～」
6. 研究組織
- (1) 研究代表者
武田 健(TAKEDA KEN)
東京理科大学・薬学部・教授
東京理科大学総合研究機構ナノ粒子健
康科学研究センター センター長
研究者番号:80054013
- (2) 研究分担者
なし
- (3) 連携研究者
菅又昌雄 (SUGAMATA MASAO)
栃木臨床病理研究所、所長
- 井原智美 (IHARA TOMOMI)
栃木臨床病理研究所、部長