

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：32660

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21390037

研究課題名（和文）

ナノマテリアル曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響とその克服に関する研究

研究課題名（英文）

Effects of nanomaterial exposure on cranial nerve system of offspring

研究代表者

武田 健 (TAKEDA KEN)

東京理科大学・薬学部薬学科・教授

研究者番号：80054013

研究成果の概要（和文）：

本研究の成果は、ナノマテリアルの妊娠期曝露が次世代の脳神経系に及ぼす影響を、ナノマテリアルの胎児移行性、脳の組織学的解析、モノアミン解析、ならびに遺伝子発現解析から明らかにしたものである。とくに、ナノマテリアルとして汎用される材料の妊娠期曝露が、発達の脳微小形態やモノアミンに影響を与えることを明らかにした。さらに、網羅的遺伝子発現解析により、影響発現機序の手掛かりとなる知見が得られた。

研究成果の概要（英文）：

The present study showed the effects of maternal exposure to nanomaterials on the development of cranial nerve system of offspring, using electron microscopic analysis, histological analysis, neurochemical (monoamine) analysis as well as gene expression analysis. The results indicated that exposure of pregnant mice to nanomaterial frequently used in nanotechnology induced alterations of microstructures, monoamine and its metabolism in the brain of offspring during the developmental period. Gene expression analysis using microarray showed an important clue of the mechanisms underlying the effects of maternal exposure to nanomaterials on the brain development.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	8,300,000	2,490,000	10,790,000
2010年度	3,800,000	1,140,000	4,940,000
2011年度	2,200,000	660,000	2,860,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：医薬薬学

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

## 1. 研究開始当初の背景

ディーゼル排ガス (DE: diesel exhaust)

はディーゼル排気微粒子 (DEP: diesel exhaust particle) とガス状成分から構成されており、都市における大気汚染の主要因の

一つである。申請者らは以前に、妊娠マウスに吸入させた DE 中の粒子状成分 (DEP) が産児の脳組織内に移行・蓄積し、脳組織に損傷を与えている微小形態所見を得た (Sugamata et al. 2006)。この研究では、ディーゼル排ガス中の超微小粒子 (ナノ粒子) が母マウスから胎仔脳に移行し、出生後も仔の脳の特定の細胞の特定のオルガネラに蓄積されて周辺の細胞に影響を及ぼすことだけでなく、小脳プルキンエ細胞にアポトーシス像が認められる所見なども報告した。

さらに、研究開始当初から、DEP 以外にも超微小粒子が新しい産業 (ナノ産業。ナノ材料の応用を目指す研究が進められている。) の発展に伴い環境放出され得る場面が増えてきており、それによる健康影響についても懸念されていた。とくに我々は、健康影響のうち DEP の移行の認められた次世代脳神経系への影響に注目した。

## 2. 研究の目的

ナノ材料の健康影響の詳細を明らかにし、その影響発現機序を解明することは、ナノ材料の環境放出の規制やモニターの必要性を示しその実施を促すために必要である。本研究課題では、ナノ材料の健康影響のうち、とくに次世代脳神経系への影響について研究を進めることにより、ナノマテリアル曝露の次世代の脳神経系への影響発現機序を明らかにし、その影響を克服ならびに予防するための知見を得ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

妊娠マウスに DE (及び DEP) を曝露し、あるいはナノ材料懸濁液を投与し、出生した仔の微細脳障害、発達障害、脳機能障害に及ぼす影響を解析した。

研究計画・方法の特色：これまでの研究では、環境基準値に近い都市部重汚染地区の大気汚染粒子濃度に相当する曝露条件において影響発現が認められていた。本研究では、実際により広範囲において起こり得る汚染状況の条件で実験を行ったことが特色の一つである。さらに、生じた影響がナノ粒子によるものであることか否かを検討するために、ナノ粒子を除去する特殊なフィルターを使用したり合成ナノ粒子単体 (カーボンブラック、フラーレン、酸化チタンなど) を使用したりしたことも本研究の特色である。

### 1) DE 微粒子曝露装置及び曝露条件

経気道的に曝露できる DE 曝露装置を使用した。また、高性能なフィルターユニット (K 社提供) を装着し、ナノ粒子を除去した排ガスの曝露の影響も検討した。装置は、学内の

ナノ粒子健康科学センター及び戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター (センター長、武田 健) 内に設置したものを用いた。酸化チタンを始めとする産業上汎用されるナノ材料の投与は、あらゆる曝露状況を考慮し、吸入、経鼻、皮下、経口投与による影響評価を行った。

### 2) 実験動物及び曝露法

実験動物としては ICR 系マウスを用いた。主な曝露時期は、最も反応性が高いと推定される妊娠期とした。他にも、曝露濃度、曝露時期を変えた影響も検討した。

### 3) 脳神経系への影響解析

脳神経系への影響を解析するために、行動試験ならびにモノアミンの定量を行った。他に、以下の(1)から(4)の方法を用いてさらなる解析を進めた。

#### (1) ナノ材料の溶液中での性状解析及びその制御

動的光散乱法および電子顕微鏡を用いて、溶液中でのナノ材料の凝集性を調べた。このナノ材料懸濁液を界面活性剤、生体成分 (脂質やタンパク質) 等を用いて凝集性や表面の性質を制御しながら実験動物に投与した。

#### (2) 顕微鏡によるナノ粒子の移行・分布の解析

各種電子顕微鏡、蛍光顕微鏡などを用いてナノ粒子の産仔脳への移行と分布を観察した。

#### (3) 遺伝子発現解析

脳内遺伝子発現の変動を部位ごとに検討した。DNA マイクロアレイを使用し、我々の研究グループが新しく考案した網羅的遺伝子発現解析手法を活用してデータマイニングを行った。一部の遺伝子については、PRISM 型 PCR 装置を用いて個体ごとの発現の定量解析を実施した。

#### (4) 病理学的解析

脳組織の超微形態観察、光学顕微鏡及び電子顕微鏡を用いた病理解析を行った。DE 及びナノ粒子の曝露条件を変え、出生した仔の小脳、扁桃、海馬、前頭前野などを中心に脳神経系への影響を検討し、脳神経疾患患者剖検例と符合する所見を解析した。組織 (細胞) 内に微粒子成分様の顆粒が見出された場合には、分析電子顕微鏡を用いて、その物質の特定を行った。さらに、組織内のタンパク質の発現局在を解析するために免疫組織化学法を用いた。

#### 4. 研究成果

はじめに、胎仔期 DEP 曝露による学習及び記憶への影響を評価するために、行動評価試験を行った。その結果、胎仔期 DEP 曝露による空間学習・記憶の低下が認められた。そこで、学習・記憶の形成に深く関与するグルタミン酸神経系とアセチルコリン神経系に着目し、グルタミン酸受容体とアセチルコリンの合成酵素を免疫組織化学染色により解析した。その結果、胎仔期 DEP 曝露マウスの海馬において、N-methyl-D-aspartate receptor と Glutamate receptor 1 の有意な発現低下が認められた。一方、両群においてアセチルコリンの律速酵素である choline acetyltransferase の発現に有意差は認められなかった。この結果から、胎仔期 DEP 曝露はマウスに対して海馬のグルタミン酸受容体の発現を低下させると共に、空間学習・記憶障害を引き起こす可能性が示唆された【学会発表 25, 28】。さらに、胎仔期 DE 曝露による次世代マウスの自発運動量および脳内ドパミン神経系への影響は、環境基準値の 10 倍以下の比較的濃度の DE によっても生じることが明らかになった【論文発表 4】。

次いで、本研究では化粧品や光触媒として汎用される酸化チタンナノ粒子が同様に母マウスから仔の脳に移行し、様々な病理学的異変を生じさせることを明らかにした。主に 6 週齢の次世代雄マウスの脳末梢血管周囲を詳細に解析した結果、多発性の微小梗塞の所見が認められ、嗅球の僧帽細胞がカスパーゼ（アポトーシスのマーカー）陽性細胞になっていることが認められた【論文発表 11】。この結果は、酸化チタンナノ粒子を妊娠マウスに投与すると酸化チタンが胎盤を通過して胎仔に移行し、未発達な血液脳関門を通過し、脳組織内に蓄積されることを示唆するものであった。さらに本研究では、意図的・非意図的に生産されるナノマテリアルの胎仔期曝露により引き起こされる脳の機能的変化を解析し、現代急増しつつある脳疾患との関連を明らかにすることを目指した。

一連の研究の中で、酸化チタンナノ粒子の妊娠期曝露が次世代の脳の発達に及ぼす影響を遺伝子発現パターンを指標にして解析した。この研究では、マイクロアレイを用いて発育や成長の盛んな時期のマウスの脳における遺伝子発現を網羅的に解析した。妊娠マウスに酸化チタンナノ粒子を投与し、出生した仔の脳神経系において網羅的遺伝子発現解析を行うことにより、脳への影響を特に微細脳障害、発達障害との関わりを明らかにすることを目的に解析した。この研究では、連携研究者の梅澤らが確立しつつある GO

(遺伝子オントロジー) および MeSH (医学主題見出し用語) を用いた遺伝子機能グループ (GSEA) 解析【学会発表 9】により、遺伝子発現パターンの変化の経時的変化が示す生物学的意義を抽出した。その結果、胎仔～乳仔期のマウスの脳において酸化チタンの妊娠期曝露により、アポトーシスや脳発達・成長、酸化ストレスに関連する遺伝子群の発現変動が生じる中で、とくに神経伝達物質や情動に関連する遺伝子群の発現変動は出生後時期が経ってから (離乳時期ごろ) 変動してくることが明らかになった【論文発表 7】。さらに、酸化チタンナノ粒子の妊娠期曝露により脳内のドパミン及びその代謝物の量が変化することも明らかになった【論文発表 3】。

一方、酸化亜鉛ナノ粒子も透明度が高く、紫外線を効率的に遮蔽することから化粧品に汎用されている。そこで、酸化チタンの他に酸化亜鉛ナノ粒子についても、妊娠期の曝露が出生仔の脳内モノアミン及びその代謝物量に及ぼす影響を調べた。その結果、酸化亜鉛ナノ粒子の妊娠期曝露を受けたマウスの複数の脳部位において、ドパミン、セロトニン及びそれらの代謝物量や代謝回転の有意な増加が認められた。

この結果は、酸化チタンナノ粒子とともに酸化亜鉛ナノ粒子についても、その胎児期曝露が次世代の脳のモノアミン量を変化させることを示したものである。酸化チタンおよび酸化亜鉛ナノ粒子はその有用性から化粧品に汎用されているが、曝露時期及びその量によっては次世代の脳神経系に影響を及ぼす可能性が示唆され、注意を払う必要があると考えられる。

以上のように、本研究では妊娠期の母獣への DE 微粒子曝露や酸化チタンナノ粒子の曝露が、胎仔期のみならず出生後の次世代個体の脳組織に変化を与え、中枢神経系の発達や成長後の機能に影響を及ぼす可能性があることが示唆された。酸化チタンおよび酸化亜鉛ナノ粒子の胎仔期曝露による中枢神経系への影響についての報告は他になく、本研究の成果はナノ粒子の健康影響を示す研究として大きな意味を持つと考えられる。

すなわち、ここで示した結果・成果は、ナノ材料の曝露が次世代脳組織に及ぼす影響を判定する際に必要な影響評価指標として新しい知見を示している。一連の研究成果は、著書や総説・解説として発表・出版もした他【論文発表 1, 2, 8, 10, 12, 図書 1】、招待講演での発表も行った【学会発表 1, 2, 5, 14】。

本研究課題で示した影響評価指標が、ナノ材料のリスク評価に基づく今後のリスク管理に生かされていくことが切に期待される。

#### 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 13 件)

1. 武田 健、新海雄介、鈴木健一郎、柳田信也、梅澤雅和、横田理、田井中均、押尾茂、井原智美、菅又昌雄 (2011) 「ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠期曝露の子に及ぼす影響」 YAKUGAKU ZASSHI, 131 (2): 229-236.
2. 武田 健、鈴木健一郎、入江美代子、押尾茂、井原智美、菅又昌雄 (2010) 「ナノマテリアルの次世代影響—脳神経系及び雄性生殖系を中心に」 『ナノ材料のリスク評価と安全性対策』、フロンティア出版、No.15.54-59.
3. Takahashi, Y., Mizuo, K., Shinkai, Y., Oshio, S., Takeda, K. (2010) Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. *J. Toxicol. Sci.*, 35 (5): 749-756.
4. Suzuki, T., Oshio, S., Iwata, M., Saburi, H., Odagiri, T., Udagawa, T., Sugawara, I., Umezawa, M., Takeda, K. (2010) In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part. Fibre Toxicol.*, 7: 7
5. Umezawa, M., Takeda, K., Ihara, T., Sugamata, M. (2010) Novel insights into the pathogenesis of endometriosis from a disease model induced by autotransplantation of endometrium. *Inflamm. Regen.* 30 (2): 115-119.
6. Tsukue, N., Watanabe, M., Kumamoto, T., Takano, H., Takeda, K. (2009) Perinatal exposure to diesel exhaust affects gene expression in mouse cerebrum. *Arch. Toxicol.*, 83: 985-1000.
7. Shimizu, M., Tainaka, H., Oba, T., Mizuo, K., Umezawa, M., Takeda, K. (2009) Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the perinatal period alters gene expression related to brain development in the mice. *Part. Fibre Toxicol.*, 6: 20.
8. 新海雄介、梅澤雅和、武田 健 (2009) 『ナノマテリアルの次世代健康影響—脆弱性集団への影響』 *医学のあゆみ* 230 (8)、8438-8442.
9. Sugamata, M., Ihara, T., Takeda, K. (2009) Prenatal diesel exhaust causes

neurodegenerative diseases in adults.

MEDIMOND: New Trends in Alzheimer and Parkinson Disorders., 21-24.

10. 武田 健、菅又昌雄 (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、*ファルマシア* 45 (3): 245-250.
11. 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.
12. Xu, G., Umezawa, M., Takeda, K. (2009) Early Development Origins of Adult Disease Caused by Malnutrition and Environmental Chemical Substances. *J. Health Sci.*, 55 (1): 11-19.
13. Yokota, S., Mizuo, K., Moriya, N., Oshio, S., Sugawara, I., Takeda, K. (2009) Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci. Lett.*, 449 (1): 38-41.

[学会発表] (計 30 件)

1. 武田 健、トキシシンポジウム、平成 23 年 7 月 7 日「ナノマテリアルの次世代健康影響—胎仔期曝露の脳神経系及び生殖系への影響を中心に」
2. 武田 健、日本幼少児健康教育学会 第 30 回記念大会、平成 24 年 2 月 18 日「次世代健康科学・健康教育を考える」
3. 黒岩法子、立花 研、小平伊織、新海雄介、武田 健、第 3 回日本RNAi研究会、平成 23 年 8 月 26 日「血中miRNA を利用したナノ粒子の次世代健康影響評価系の検討」
4. 立花 研、高柳皓平、秋本純芽、新海雄介、武田 健、日本薬学会第 132 年会、平成 24 年 3 月 30 日
5. 武田 健、薬学会学術貢献賞受賞講演、ナノマテリアルの次世代健康科学—新しい衛生薬学研究領域の開拓、日本薬学会第 131 年会、静岡(3 月)2011 年
6. 川島奈津子、鈴木健一郎、横田 理、大嶋秀明、武田 健、脳発達期における脂肪酸を吸着したアルブミンナノ粒子の脳内移行、日本薬学会第 131 年会、静岡(3 月)2011 年
7. 横田 理、佐藤 央、杉戸雄四郎、柳田信也、武田 健、胎仔期ディーゼル排気微粒子曝露が不安情動性と認知機能に及ぼす影響、日本薬学会第 131 年会、静岡 (3 月) 2011 年
8. 高柳皓平、立花研、秋本純芽、新海雄介、武田 健、胎仔期にディーゼル排ガスに曝露されたマウスにおけるDNAメチル

- 化状態の網羅的解析、日本薬学会第 131 年会、静岡 (3 月) 2011 年
9. Umezawa M, Sera M, Takeda K. A novel analysis tool to interpret microarray results using multiple gene annotation. 第 3 回バイオインフォマティクス及びコンピュータ生物学学会 (BICoB-2011)、ニューオーリンズ・米国ルイジアナ(3 月)2011 年
  10. 梅澤雅和、世良実穂、武田 健、遺伝子アノテーションを用いた新しいマイクロアレイデータ解析法の確立、第 33 回日本分子生物学会年会・第 83 回日本生化学会大会合同大会、神戸(12 月)2010 年
  11. Shimizu M, Umezawa M, Tainaka H, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide alters gene expression related to brain development of offspring in the mouse. Nanosafe 2010. Nov 17, 2010 (Grenoble, France)
  12. Yokota S, Suzuki K, Ishibashi R, Shinotsuka T, Sugito Y, Takeda K. Novel approach to analysis brain plasticity by biomolecule-designed nanoparticles. Neuroscience 2010、(Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting), San-Diego (USA), 2010.11
  13. Yanagita S, Kanemaru J, Umezawa M, Yokota S, Takeda K. Effects of exposure to titanium dioxide nanoparticles on activation of corticotrophin-releasing hormone neurons in pregnant rats and its offspring. Neuroscience 2010 (Society for Neuroscience, 40th Annual Meeting), San-Diego (USA), 2010.11
  14. Umezawa M, Takeda K. Current research and prospect for health effects of nanoparticles on offspring. 第 3 回国際セラミックス学会、大阪(11 月)2010 年
  15. 柳田信也、金丸次郎、梅澤雅和、沼崎理英、武田 健、酸化チタンの胎児期曝露が視床下部室傍核 CRH 神経の活動に及ぼす影響、第 33 回日本神経科学大会、神戸(9 月)2010 年
  16. 横田 理、柳田信也、武田 健、ディーゼル排気微粒子胎児期曝露が老齢マウスのコリン神経系に影響を及ぼす、第 33 回日本神経科学大会、神戸(9 月)2010 年
  17. 杉戸雄四郎、篠塚崇徳、横田 理、鈴木健一郎、武田 健、りん脂質修飾ナノ粒子を用いたマウス脳神経の脂質代謝の分析、第 33 回日本神経科学大会、神戸(9 月)2010 年
  18. 篠塚崇徳、杉戸雄四郎、横田 理、鈴木健一郎、武田 健、りん脂質修飾ナノ粒子の制御とそのマウス脳内における特異的分布、第 33 回日本神経科学会、神戸(9 月)2010 年
  19. Okada Y, Shinotsuka T, Tachibana K, Takeda K. Effects of prenatal exposure to zinc oxide nanoparticles on monoaminergic systems in mice. Nanotoxicology 2010. Edinburgh, Scotland. (6 月) 2010 年
  20. 武田 健、新海雄介、鈴木健一郎、柳田信也、梅澤雅和、横田理、押尾茂、井原智美、萱又昌雄、ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠期曝露は子に重大な影響を及ぼす、日本薬学会第 130 年会、岡山(3 月)2010 年
  21. 大庭太郎、岡田悠佳、高橋雄大、黒岩法子、水尾圭祐、立花研、武田 健、酸化チタンナノ粒子胎児期曝露がドパミン神経系に及ぼす影響、日本薬学会第 130 年会、岡山(3 月)2010 年
  22. 岡田悠佳、篠塚崇徳、高橋雄大、武田 健、酸化亜鉛ナノ粒子胎児期曝露がドパミン神経系に及ぼす影響、日本薬学会第 130 年会、岡山(3 月)2010 年
  23. 清水碧、梅澤雅和、大庭太郎、水尾圭祐、田井中均、武田 健、酸化チタンナノ粒子の胎児期曝露が中枢神経系に及ぼす影響、日本薬学会第 130 年会、岡山(3 月)2010 年
  24. Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei N, Ihara T, Sugamata M. Titanium dioxide nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring affect the genital and cranial nerve systems. "PPTOXII, a CCT Meeting of Society of Toxicology", Miami Beach, Florida, USA (12 月) 2009 年
  25. Yokota S, Mizuo K, Oshio S, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust affects dopaminergic system. Neuroscience 2009. Chicago, Illinois, U.S.A. (Oct 2009)
  26. 清水碧、水尾圭祐、田井中均、梅澤雅和、武田 健、酸化チタンナノ粒子の胎児期投与が脳の遺伝子発現に及ぼす影響、第 32 回日本神経科学大会、名古屋(9 月)2009 年
  27. 横田 理、水尾圭祐、佐藤 央、杉戸雄四郎、武田 健、胎児期ディーゼル排気微粒子曝露により次世代の空間学習・記憶能が障害される、第 32 回日本神経科学大会、名古屋(9 月)2009 年
  28. Yokota S, Sato A, Mizuo K, Akiyama K, Sutoo D, Takeda K. Prenatal exposure to diesel exhaust particles produce

learning deficits associated with impairment of NMDA receptor.36th International Congress of Physiological Sciences.Kyoto, Japan, (July 2009)

29. 横田 理、佐藤 央、杉戸雄四郎、水尾圭祐、武田 健、ディーゼル排気微粒子曝露が次世代の脳機能に及ぼす影響—行動評価試験法を組み合わせた毒性学的アプローチ—、第36回日本トキシコロジー学会学術年会、岩手(7月)2009年

[図書] (計2件)

1. Umezawa,M.,Takeda,K. Encyclopedia on Environmental Health. (2011) Automobile exhaust: Detrimental effects of exposure to automobile exhaust on pulmonary and extrapulmonary tissues and offspring.
2. Umezawa,M.,Takeda,K.,Ihara,T.,Sugamata,M. Endometriosis:Symptoms, Diagnosis and Treatments.(2011) Advantages and disadvantages of each animal model of endometriosis.

[産業財産権]

なし

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武田 健 (TAKEDA KEN)  
東京理科大学・薬学部薬学科・教授  
研究者番号：80054013

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

立花 研 (TACHIBANA KEN)  
東京理科大学・薬学部薬学科・助教  
研究者番号：10400540

柳田 信也 (YANAGITA SHINYA)  
東京理科大学・理工学部教養・助教  
研究者番号：80461755

新海 雄介 (SHINKAI YUSUKE)  
東京理科大学・薬学部・PD  
研究者番号：80459734

鈴木 健一郎 (SUZUKI KENICHIRO)  
東京理科大学・総合研究機構・PD  
研究者番号：30548384

梅澤 雅和 (UMEZAWA MASAKAZU)  
東京理科大学・総合研究機構・PD  
研究者番号：60615277

菅又 昌雄 (SUGAMATA MASAO)  
栃木臨床病理研究所・所長  
研究者番号: 50049863

以上