

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25340066

研究課題名(和文) 環境汚染物質曝露による学習障害の早期検出のための新生児動物モデルの確立

研究課題名(英文) Establishment of neonatal animal model for early detection of environmental pollutant induced-learning disability

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：まず、仔マウスに使用可能な早期検診を調べられる空間学習テストを確立することができた。DEおよびDE-SOAを曝露された群は対象群と比べ、嗅球に基づいた学習能力の低下が認められた。嗅球におけるAC3、GOLFのmRNA発現量の増加、海馬における記憶関連遺伝子、炎症性マーカーなどのmRNA発現量の増加がDE-SOA群で見だした。DE-SOAの発達期曝露は、嗅球と海馬における神経・免疫バイオマーカーを介して仔マウスの学習行動に影響を及ぼすことが示唆された。SOAの神経免疫毒性のメカニズムを明らかにするために、免疫細胞欠損マウスを用いて調べた結果、TLR4シグナル伝達が関わる可能性が認められた。

研究成果の概要(英文)：We have established a novel olfactory-based spatial learning test and examined the effects of exposure to nano-sized diesel exhaust-origin secondary organic aerosol (SOA) on the learning performance in preweaning mice. Pregnant BALB/c mice were exposed to clean air, diesel exhaust (DE), or DE-origin SOA (DE-SOA) from gestational day 14 to postnatal day (PND) 10 in exposure chambers. On PND 11, the mice were examined by the olfactory-based spatial learning test. The mice exposed to DE or DE-SOA took a longer time to reach the target as compared to the control mice. N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor subunits NR1 and NR2B, and immunological markers such as TNF- α , COX2, and Iba1 mRNAs were significantly increased in the hippocampi of the DE-SOA-exposed preweaning mice as compared to the control mice. Our results indicate that DE-SOA exposure during developmental period may affect the olfactory-based spatial learning behavior in preweaning mice.

研究分野：環境学

キーワード：神経毒性 学習行動 新生児モデル 環境汚染物質 マウス

1. 研究開始当初の背景

これまで、DEP の影響を検討した *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 (文献 1-6)。初めに、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 (文献 7)。次に、DE-SOA が繰り返し曝露されると、マウスの脳にどのような影響が現れるか検討するため、DE-SOA の 4 回点鼻投与および吸入曝露実験を行った。その結果、DE-SOA の 4 回点鼻投与が海馬における記憶関連遺伝子、炎症性サイトカイン、酸化ストレスマーカー等の発現変動を介して脳に影響を引き起こすことを明らかにした。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 (文献 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を見だした (文献 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。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。これまでに、環境汚染物質の発達期曝露が成人の脳神経系、特に、学習行動に及ぼす影響に関しては一部報告されているが、仔マウスの学習行動への影響についてはまだ不明である。小児や次世代の健康を維持す

るためには早期検診による評価が必要である。成人の学習、および記憶機能を調べる評価法は多く開発されているが、仔マウスにおける影響を評価できる試験方法はまだ少ない。そこで、本研究では嗅覚に基づいた空間学習テストを確立し、発達期 DE-SOA 曝露の影響を出生後 11 日目の仔マウスを用いて評価することを目的とした。

2. 研究の目的

大気中で一次粒子物質中のガス成分が酸化し、二次有機エアロゾル SOA が生成される。さらに、大気中だけではなくオフィスや家屋内でもプリンター、コピー機等がオゾンを発生し、そのオゾンは有機混合物 (VOCs) と反応し、SOA を生成することが示唆された (文献 1)。SOA の *in vivo*, *in vitro* 研究によると、SOA を含んだ石炭火力発電所排気が肺と心臓に酸化ストレスを引き起こすことが示唆されている。しかしながら、SOA の脳神経系に及ぼす影響はほとんど明らかになっていない。そこで我々は、DEP にオゾンを加えた DE-SOA モデルを用いて、ディーゼル排気ガス由来二次有機エアロゾル DE-SOA の生体に及ぼす影響に着目した。

本研究では、

- (1) 仔マウスに使用可能な早期検診を調べられる空間学習テストを確立する
- (2) SOA 発達期曝露による BALB/c 新生児マウスの学習行動と記憶関連遺伝子の発現を調べる
- (3) SOA 発達期曝露における免疫担当細胞 TLR4 の役割を検討することを目的とした。

3. 研究の方法

実験動物として妊娠 13 日の BALB/c マウスを日本クリーア (株) より購入し、妊娠 14 日目から出生後 10 日目まで全身吸入曝露チャンバーを用いて、ディーゼル排気 (DE)、DE にオゾンを加えた DE-SOA、または除粒子 (Gas) の曝露

(5時間/日、5日/週)を行った。出生後11日目にビデオ・トラッキング・システムを用いて、仔マウスの学習行動能力を観察した。仔マウスでの空間学習能力を調べられる嗅覚に基づいた空間学習テストでは4試みのトレーニング過程及び1試みのテスト過程を行った。トレーニング過程では、直径40cmの円型ケージに3つの出発点を決めて、一つの出発点からターゲットまでかかる時間を180秒間記憶した。ターゲットでは8 cm X 12 cmの小さい箱に母マウスと兄弟のマウスを入れ、目がまだ開かない仔マウスが臭いを感じて自分の兄弟がいるターゲットのところまでのかかる時間を記憶した。テスト過程では、ターゲットの場所を覚えるかどうか調べるため、母マウスと兄弟のマウスの箱をケージから外し、ターゲットまでかかる時間を180秒間まで記憶した。我々は別のグループに嗅覚や運動機能のテストを行った。簡単に言えば、同じサイズ(10 cm x 20 cm x 10 cm)の3つの領域に分割されたトレイの上にワイヤーメッシュケージ(30 cm x 20 cm x 10 cm)を置いた。トレイに、ホームケージの木材粉塵を試験ケージの一方の側に、メッシュの下に置かれた、きれいな木材粉塵は反対側のメッシュの下に配置し、中心は、ブランクに保持した。嗅覚や運動機能テストの日に、生後11日目に仔マウスをホームケージから取り出し、中央に配置した。三つの領域に存在する時間と領域の間の遷移の数を3分間記録した。最終試験24時間後に解剖を行い、麻酔下で嗅球と海馬を採取し、嗅球におけるcAMPシグナル経路に関わる嗅覚の感覚ニューロンに存在するバイオマーカー(AC3、GOLF)、海馬における記憶関連遺伝子(NMDA受容体サブユニットNR1、NR2A、NR2B、転写因子CaMKII)、または、嗅球と海馬における炎症性サイトカインIL-1 β 、TNF- α 、脳内炎症マーカーCOX2、免疫担当細胞ミクログリアマーカーIba1などのmRNA発現変化をリアルタイムRT-PCR方法で調べた。さら

に、海馬でのH & E染色を用いた組織学的調査も行った。

4. 研究成果

我々はこれまで、DEPの影響を検討した *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(文献 1-6)。大気に加え、オフィスや家屋内でもプリンター、コピー機等がオゾンを発生し、そのオゾンは有機混合物(VOCs)と反応し、二次有機エアロゾル SOA を生成する(文献 10)。SOA に対する心血管・肺への影響はこれまで一部報告されているが、脳・神経系への影響について詳細は明らかではない。そこで我々は、DEPにオゾンを加えた DE-SOA モデルを用いて、ディーゼル排気ガス由来 DE-SOA の脳・神経系への影響を調べた。我々はこれまでに、ディーゼル排気ガス由来 DE-SOA の単回点鼻投与では肺に炎症を引き起こすものの、脳では重大な影響がないことを報告している(文献 7)。DE-SOA の単回・低濃度曝露では、成熟した脳機能には影響を与えないのかもしれない。そこで、我々は昨年度、DE-SOA への感受性が高いと考えられる5週齢マウスを用いて、DEあるいはDE-SOAの濃度を高濃度にし、週1回・計4回点鼻投与し、脳・神経系への影響を調べた。その結果、海馬内の炎症性サイトカイン、転写因子、酸化ストレスマーカー等のmRNA発現の変化が認められた。そこでより長期間曝露の影響を検出するため、国立環境研究所で設置された全身曝露チャンバーを用いてDE及びDE-SOAの吸入曝露実験を行った。具体的にはDE及びDE-SOAの吸入曝露を行い、マウスにおけるSOAの海馬依存的学習行動や母性行動等を調べた。DE-SOAの1カ月及び3カ月曝露の結果、新奇オブジェクト認知テストにおいて影響が検出できた。その原因として、DE-SOAが嗅神経あるいは血液から脳に入り、酸化ストレスを産生することで記

憶関連遺伝子 NMDA 受容体及びその発現に関わる因子の発現異常を誘導して学習能力に影響することが想定された。更に、DE-SOA 群の母性行動異常が認められ、その原因として視床下部における ER α 、オキシトシン受容体の発現異常を介している可能性が考えられた(文献 9)。

胎児期や幼児期では外界からの刺激に対する感受性・脆弱性が高く、この時期での環境汚染物質曝露はより大きな影響を及ぼす可能性があると考えられる。社会性の障害である発達障害は、疫学研究から遺伝要因のみならず、環境汚染物質曝露を含む環境要因が原因で発症する可能性が指摘されており、今後、環境汚染物質と発達障害発症との関連を解明することが求められている。ディーゼル排ガスについても、マウスやラットなどの動物モデルを用いた研究では胎児期での曝露が出生後の活動性やドーパミン神経系機能の低下を引き起こすことが報告されている(文献 11-13)。上述したように我々もこれまでに、成体マウスでのディーゼル排ガス由来 DE-SOA の単回点鼻投与は、脳では重大な影響がないものの、より感受性が高いと考えられる 5 週齢マウスへの、DE あるいは DE-SOA の高濃度曝露(週 1 回・計 4 回点鼻投与)は、海馬内の炎症性サイトカイン、転写因子、酸化ストレスマーカー等の mRNA 発現を変化させるという発達期曝露での脳・神経系への影響を見いだしている。そこで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。このことから、胎仔期から乳

仔期にかけての DE および DE-SOA の曝露は成熟後の雄マウスの性行動や不安・情動レベルを司る中枢神経系の発達には影響しないと考えられる。本研究の結果から、胎仔期から乳仔期での DE もしくは DE-SOA 曝露は少なくとも性行動や不安症・うつ病を司る中枢神経系の発達には影響しないと考えられる。しかし、遺伝子改変マウスなど脆弱性も考慮した動物モデルなどを用いて SOA の影響を調べる必要がある。

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。これまでに、環境汚染物質の発達期曝露が成人の脳神経系、特に、学習行動に及ぼす影響に関しては一部報告されているが、仔マウスの学習行動への影響についてはまだ不明である。小児や次世代の健康を維持するためには早期検診による評価が必要である。成人の学習、および記憶機能を調べる評価法は多く開発されているが、仔マウスにおける影響を評価できる試験方法はまだ少ない。そこで、本研究では嗅覚に基づいた空間学習テストを用いて、学習能力に対する影響を早期検出できる仔マウスモデルを確立し、発達期における DE-SOA の影響を評価した。その結果、DE および DE-SOA を曝露された群は対象群と比べ、嗅球に基づいた学習能力の低下が認められた(図 1)。嗅球における AC3、GOLF の mRNA 発現量の増加、海馬における記憶関連遺伝子、炎症性マーカーなどの mRNA 発現量の増加が DE-SOA 群で見いだされた。我々の結果から DE、DE-SOA などの発達期曝露は仔マウスの嗅覚に基づいた空間学習能力に影響を及ぼすことが認められ、さらに、炎症マーカーである TNF- α と NMDA 受容体サブユニット(NR1、NR2A、NR2B)との間の関連性が明らかになった(文献 14)。さらに、SOA の神経免疫毒性のメカニズムを明らかにするために、免疫細胞欠損マウスを用いて、空間学

習テストで調べて結果、空間学習障害に神経免疫システムの活性化と TLR4 シグナル伝達応答が関わる可能性が認められた。

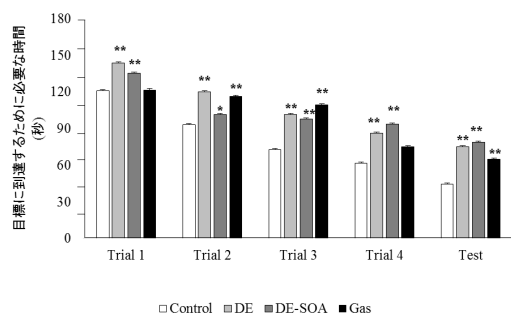


図 1. 嗅覚に基づいた空間学習テストの結果
N = 8~10, **P < 0.01, *P < 0.05

まず、我々は仔マウスに利用可能な早期検診を調べられる空間学習テストを確立した。そのマウスモデルを用いて、大気中の汚染物質である DE-SOA の学習行動に及ぼす影響を調べた結果、胎児期~乳児期における DE-SOA 曝露は嗅球の cAMP シグナル経路に関わる AC3, GOLF、さらに海馬における記憶と関連する遺伝子、嗅球と海馬における炎症性サイトカインなどを介して嗅覚に基づいた空間学習に影響を及ぼすことが考えられる。このような学習能力に影響を及ぼす DE-SOA 中の成分はまだ同定されていないが、有力候補である有機物等が、血液循環あるいは嗅神経を介して脳に入り、脳神経系に影響を引き起こす可能性が考えられる。このような影響を示す成分の同定およびその作用機序について、今後詳しく検討していく必要がある。

<引用文献>

- (1) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, and Fujimaki H. Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Neurotoxicology* 2008; 29, 940–947.
- (2) Win-Shwe TT, Mitsushima D, Yamamoto S, Fujitani Y, Funabashi T, Hirano S, Fujimaki H. Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure. *Inhal. Toxicol.* 2009; 21, 828–836.
- (3) Win-Shwe TT, Fujitani Y, Hirano S,

- Fujimaki H. Exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal functions in mice. *Nihon Eiseigaku Zasshi.* 2011; 66, 628–633.
- (4) Win-Shwe TT, Fujimaki H. Nanoparticles and neurotoxicity. *Int. J. Mol. Sci.* 2011; 12, 6267–6280.
- (5) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, Fujimaki H. Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice. *Nanotoxicology* 2012; 6, 543–553.
- (6) Win-Shwe TT, Fujimaki H, Fujitani Y, Hirano S. Novel object recognition ability in female mice following exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 2012; 262, 355–362.
- (7) Win-Shwe TT, Fujitani Y, Sone H, Furuyama A, Nitta H, Hirano S. Effects of acute single intranasal instillation of secondary organic aerosol on neurological and immunological biomarkers in the brain and lung of BALB/c mice. *J Toxicol Sci.* 2013; 38(1): 71–82.
- (8) Win-Shwe TT, Fujitani Y, Kyi-Tha-Thu C, Furuyama A, Michikawa T, Tsukahara S, Nitta H, Hirano S. Effects of diesel engine exhaust origin secondary organic aerosols on novel object recognition ability and maternal behavior in BALB/c mice. *Int J Environ Res Public Health.* 2014;11(11):11286–11307.
- (9) Win-Shwe TT, Kyi-Tha-Thu C, Moe Y, Fujitani Y, Tsukahara S, Hirano S. Exposure of BALB/c mice to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol (DE-SOA) during the developmental stages impairs the social behavior in adult life of the males. *Frontiers in Neuroscience* 2016 (9):542.
- (10) Wang H, He C, Morawska L, McGarry P, Johnson G. Ozone-Initiated Particle Formation, Particle Aging, and Precursors in a Laser Printer. *Environmental Science & Technology* 2012; 46: 704–712.
- (11) Yokota S, Mizuo K, Moriya N, Oshio S, Sugawara I, Takeda K. Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci Lett.* 2009;449(1):38–41.
- (12) Suzuki T, Oshio S, Iwata M, Saburi H, Odagiri T, Udagawa T, Sugawara I, Umezawa M, Takeda K. In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice. *Part Fibre Toxicol.* 2010;7:7.
- (13) Levesque S, Taetzsch T, Lull ME, Johnson JA, McGraw C, Block ML. The role of MAC1 in diesel exhaust particle-induced

microglial activation and loss of dopaminergic neuron function. *J Neurochem.* 2013;125(5):756-65.

- (14) Win-Shwe TT, Kyi-Tha-Thu C, Moe Y, Maekawa F, Yanagisawa R, Furuyama A, Tsukahara S, Fujitani Y, Hirano S. Nano-sized secondary organic aerosol of diesel engine exhaust origin impairs olfactory-based spatial learning performance in preweaning mice. *Nanomaterials* 2015 (5): 1147-1162.

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 2 件)

- (1) Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Yadanar Moe, Fumihiko Maekawa, Rie Yanagisawa, Akiko Furuyama, Shinji Tsukahara, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano, Nano-Sized Secondary Organic Aerosol of Diesel Engine Exhaust Origin Impairs Olfactory-Based Spatial Learning Performance in Preweaning Mice, *Nanomaterials*, 査読有、5 巻、2015、1147-1162
doi:10.3390/nano5031147
- (2) Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Yadanar Moe, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Seishiro Hirano, Exposure of BALB/c mice to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol (DE-SOA) during the developmental stages impairs the social behavior in adult life of the males, *Front Neuroscience*, 査読有、9 巻、2016、524
doi: 10.3389/fnins.2015.00524

[学会発表](計 4 件)

- (1) Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Akiko Furuyama, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano (2015). Developmental exposure to diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol on olfactory-based spatial learning performance in preweaning mice. 39th Annual Meeting of Japanese Neuroscience Society. Kobe International Exhibition Center, Kobe. July 28-31. Abstracts 3P292, page 250.
- (2) Tin-Tin Win-Shwe, Yuji Fujitani, Keiko Nohara, Seishiro Hirano (2015). Diesel engine exhaust origin secondary organic aerosol affects olfactory-based spatial learning performance and related gene expressions in preweaning mice. 第4回日本 DOHaD 研究会. Showa University, Tokyo. August 1-2. Abstract No. P-28, page 115.
- (3) Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Yadanar Moe, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Hiroshi Nitta, Seishiro Hirano. (2015).

Establishment of an olfactory-based spatial learning test for preweaning mice and the effects of early exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol. 51st Congress of the European Societies of Toxicology. Porto, Portugal, September 13-16, Abstract P12-037, page 120.

- (4) Tin-Tin Win-Shwe, Chaw Kyi-Tha-Thu, Yadanar Moe, Yuji Fujitani, Shinji Tsukahara, Fumihiko Maekawa, Seishiro Hirano (2016). Novel approach to olfactory-based spatial learning ability for preweaning mice and the effects of early exposure to diesel exhaust origin secondary organic aerosol. 44th Myanmar Health Research Congress. January 5-9. Yangon, Myanmar, Abstract Poster-7, page 79.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

ティンティンウィンシュイ (Tin Tin Win Shwe)

国立研究開発法人国立環境研究所・環境健康

研究センター 主任研究員

研究者番号：00391128