

令和元年6月17日現在

機関番号：82629

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H02829

研究課題名(和文) 二酸化チタンナノ粒子が誘発する精巣機能障害の分子機構解明

研究課題名(英文) Molecular mechanism of testicular dysfunction induced by titanium dioxide nanoparticles

研究代表者

三浦 伸彦 (Miura, Nobuhiko)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所・産業毒性・生体影響研究グループ・部長代理

研究者番号：20229644

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 11,600,000円

研究成果の概要(和文)：酸化チタンナノ粒子(TiNP)は亜急性の精巣機能障害に加え、TiNPの単回投与僅か1日後に精子運動能が半減することから急性の精巣機能障害も示すことを見出した。精子とTiNPのインキュベートにより精子運動能低下を確認し、またTiNPにより受精能が低下することもIVF法により観察した。以上の結果は、TiNPが精原細胞に加え、精巣上部尾部の成熟精子へ直接的にアタックする可能性を強く示す。TiNP投与によるホルモン(テストステロン、GnRH、FSH、LH)の量的変動は認められなかったが、マイクロアレイ解析から、TiNPがマイクロフィラメントや微小管に障害を与え、細胞骨格の崩壊を誘発する可能性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

我々はTiNPの反復曝露で精巣機能障害が生じることを報告してきたが、さらに急性障害も生じ得ること、これは成熟精子への直接的な障害であることを見出した。TiNPの工業的・商業的利用は多い。しかしTiNPのSDSには生殖障害について「情報が無いため判断できない」と記載されておりTiNPの生殖影響を把握する必要がある。我々が得た結果は、特にTiNPの原材料を取り扱う男性労働者への精巣機能低下の危険性を示す基盤材料となり、取り扱い時において防護の重要性を促す基礎的知見となる。

研究成果の概要(英文)：We found that titanium dioxide nanoparticles (TiNP) also possess acute testicular dysfunction in addition to subacute testicular dysfunction, since the sperm motility was reduced (by half) after only one day of single administration of TiNP. We also confirmed the decrease in sperm motility in ex vivo experiments in which sperm and TiNP were directly incubated, further, we observed the reduction of the fertility rate by TiNP administration by in vitro fertilization (IVF) assay. These results strongly indicate that TiNP directly attacks not only spermatogonia but also mature spermatozoa present in the cauda epididymis. Although quantitative changes in levels of hormones (testosterone, GnRH, FSH, LH) were not observed by TiNP administration, the results of microarray analysis indicated that TiNP might induce the cytoskeleton disruption by damaging microfilaments and microtubules.

研究分野：毒性学

キーワード：二酸化チタン ナノ粒子 精巣機能 精子運動能

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

1. 研究開始当初の背景

酸化チタンナノ粒子は化粧品や塗料をはじめ、食品添加物や医薬品などに広く利用されている。これは酸化チタンナノ粒子の人体への影響が小さいと考えられているためである。酸化チタンナノ粒子は2種類の結晶型(アナターゼ型およびルチル型)が用いられており、ルチル型は生物活性が低い(=安全)とされている。しかし安全性データシート(SDS)には、酸化チタンナノ粒子の両結晶型ともに、“生殖細胞変異原性”は陰性ではあるが、“生殖毒性”については「情報がないため分類できない」と記載されており、健康影響が不明瞭なまま取り扱い・利用されているのが現状である。

最近、酸化チタンナノ粒子(アナターゼ型)を成熟雄マウスに胃内投与(90日間)すると、明確な精子数減少・精子運動能低下が認められること⁽¹⁾、また妊娠マウスへの投与で、産仔の脳や精巣においてアポトーシスや精巣機能低下を引き起こすことが報告⁽²⁾されている。

申請者らは、成熟雄マウスに酸化チタンを静脈内投与(週1回 x 4回)しただけで明らかな精巣機能障害(精子数減少、精子運動能低下)を認め報告した(Miura et al (2014) *Fund Toxicol Sci*, 1, 81)。またその後の検討で、酸化チタンを静脈注射した場合(肝臓への影響解析を目的)、および気管内投与した場合(肺への影響解析を目的)においても、肝臓および肺には発がん性や組織障害が認められないのに対し精巣毒性を認めている。このことは、雄性生殖機能が酸化チタンに対して感受性が高いことを示す(投稿中)。さらに申請者らは、酸化チタンを1回気管内投与してその3日後に既に精子運動能が半減することを掴んでいる。この時、精子数の減少は認められなかった。マウスでは精原細胞から成熟精子が形成されるまでの期間は約35日間であることから、申請者らが得ている結果は、酸化チタンの精巣機能障害は2段階、すなわち精原細胞へのアタックと、成熟精子へのアタックで生じる可能性を示す(投稿準備中)。

酸化チタンナノ粒子が示す精原細胞への影響については、上述のように若干の報告はあるものの未だ情報に乏しく、成熟精子への影響については未知である。以上の背景から、工業的・商業的に利用量・使用量の多い酸化チタンナノ粒子の生殖毒性について、特に精巣機能障害(成熟精子への影響および精原細胞への影響)の面から明確にする必要があり、また生物活性の低い(=安全である)とされてきたルチル型の酸化チタンナノ粒子についても生殖毒性をあらためて検討しておく必要がある。

⁽¹⁾Gao G (2013) *J Hazard Material*, 258-259, 133; ⁽²⁾Takeda K (2009) *J Health Sci*, 55, 95

2. 研究の目的

TiNPの生殖毒性に関する情報は明らかに乏しく、本物質の工業的・商業的利用が増え続けている現在、生体影響の実態把握は重要である。本研究では、酸化チタンナノ粒子により障害を受けた成熟精子への機能影響を多角的に検討するとともに、酸化チタンナノ粒子が引き起こす精巣機能障害の分子機構を、ナノ粒子投与後の経時的変化および病理学的観点(超微細形態解析を含む)から解析し、酸化チタンナノ粒子が示す雄性生殖障害を明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

<酸化チタンナノ粒子が誘発する精巣機能への影響解析>

雄性 C57BL/6J マウス(5週齢)に TiNP(10 mg/kg 又は 50 mg/kg)を単回静脈内投与し、精巣機能(精子数及び精子運動能を指標)の経時的変動(1, 3, 9日後)を調べた。それぞれのエンドポイ

ントにおける解剖で得た精巣・精巣上部頭部・精巣上部尾部について、精子分析装置(CASA)を用いて精巣精子数・精子運動能を測定した。

<性ホルモン値の変動>

上記の実験系で得た血漿サンプル中の性ホルモン値を、テストステロン(T)、黄体形成ホルモン(LH)、卵胞刺激ホルモン(FSH)、ゴナドトロピン放出ホルモン(GnRH)について ELISA 法で測定した。

<酸化チタンナノ粒子が成熟精子に与える影響解析>

無処理マウスの精巣上部尾部から浮遊精子を得て、一定量の精子を 96 穴プレートに播種して TiNP を添加した。一定時間後に CASA を用いて精子運動能を調べ、TiNP の影響を評価した。

<次世代への影響解析>

TiNP 投与後の精子の受精能を、体外受精法(in vitro fertilization 法)で確認した。C57BL/6J マウスに TiNP (10 mg/kg)を単回静脈内投与し、投与 3 日後に精子を単離した。一定量の精子を、強制排卵にて得た卵子と一晩インキュベートし、卵割細胞数を調べた。

<マイクロアレイ解析>

雄性 C57BL/6J マウス(5 週齢)に TiNP (10 mg/kg)を単回静脈内投与し、投与 3 日後に精巣上部尾部を得た。精巣上部尾部から total RNA を抽出し、マイクロアレイ解析(DNA チップ研究所)にて TiNP により変動する遺伝子群の解析を行った。

4. 研究成果

酸化チタンナノ粒子(TiNP)の精巣機能障害に関する報告は増えつつあるが、何れも亜急性または慢性影響による精巣影響を調べている。労働衛生曝露を考慮した場合には慢性的影響解析は必然であるが、我々は成熟精子への影響に主眼を置いている。そこで、先ず TiNP (10 mg/kg 又は 50 mg/kg)を C57BL/6J マウスに単回静脈内投与し、精巣機能(精子数及び精子運動能を指標)の経時的変動(1, 3, 9 日後)を調べた。その結果、投与 9 日後までに精子数に有意差は認められなかったものの、精子運動能は投与 1 日後には 10 mg/kg 投与群で 50%程度、50 mg/kg 投与群で 70%程度減少した。投与 9 日後までに精子運動能は回復傾向にあったが、その程度は 10 mg/kg 投与群で低いことから、50 mg/kg 群では凝集が生じている可能性がある。またこの時、成熟精子内の ATP 量を測定したが明確な増減は認められなかった。また単離成熟精子に TiNP を直接添加して MTT 試薬を用いた生死判定を行ったが、非常にばらつきが大きく解析系の検討が必要と考えられた。一方、TiNP を経口投与して 3 日後の精子運動能は、静脈内投与と同様に有意に低下したことから、血中に取り込まれた TiNP が成熟精子に直接アタックしている可能性がより強く確認され、また日常的に食物から摂取する TiNP も精巣機能に影響する危険性が考えられた。

酸化チタンナノ粒子(TiNP)の投与により精子運動能は投与 1 日後には激減し、運動能低下は投与 9 日後まで持続して認められることから、TiNP による成熟精子への直接的なアタックを確認した。今年度は先ず、TiNP のリスクアセスメントを目的として、投与量を変えて LOAEL 又は NOAEL の算出を試みた。TiNP の結晶型混合物 P25(アナターゼ型:ルチル型 = 8:2)を C57BL/6J マウスに 4 回(1 回/週)静脈内投与し、投与 3 日後の精巣機能を調べた。P25 の投与量は 4 点(0.1, 1, 2, 10 mg/kg)とした。その結果、精巣上部尾部の精子数は 10 mg/kg 群で若干の減少を認めたと

のほとんど変化せず、しかし精子運動能は 1 mg/kg 群から投与量依存的に低下し、10 mg/kg 群では対照群の約 45%であった。この時、0.1 mg/kg 投与群による精子運動能は 10 mg/kg 群よりも低下し、実験系を通しての投与量依存性を得ることはできなかった。これは薄い濃度(0.1 mg/kg 群)ほど凝集が少なく微細な粒子が豊富のため血中に入り易い、あるいは成熟精子へアタックし易いなど、ナノ粒子独自の反応(生体影響)である可能性も考えられる。従って、今回の実験系からは 0.1 mg/kg が P25 の LOAEL と考えられるが、上記理由で単純に判定することは困難であった。なお P25 の慢性曝露により肝障害が報告されていることから、本実験系でも肝障害を幾つかの指標(ALT, AST 等)を用いて検討したが対照群との違いは認められなかった。このことから我々は、精巣は TiNP に対して感受性の高い臓器ではないかと考えている。精巣機能に関わるホルモン系(テストステロン、GnRH、FSH、LH)には変動が認められず、ホルモンを介した障害ではない可能性がある。また精子形成関連遺伝子の解析を行い、中途段階ではあるが、Sirt1 及び PHGPx の低下が確認されていることから、TiNP による精巣機能障害の一因である可能性もあり、解析を急いでいる。なお、アナターゼ型・ルチル型それぞれを単独投与した場合、ルチル型では精子運動能低下が認められなかったことから、TiNP の精巣機能障害はアナターゼ型に起因する可能性がある。

これまでの結果から、酸化チタンナノ粒子(TiNP)を週 1 回、4 週間連続して投与することにより、最終投与 3 日後、9 日後、90 日後に精子運動能及び精子数が共に減少することを明らかにしている。しかし TiNP を単回投与し 3 日後の精子機能を調べたところ、精子運動能の低下は観察したものの精子数は減少しないことを見出した。そこで、C57BL/6J マウスに TiNP (10 mg/kg)を静脈内に単回投与し、投与 1 日後、3 日後、9 日後の精巣機能を経時的に調べたところ、精子運動能は投与 1 日後から有意に低下し 9 日後まで持続したものの、精子数に変動は認められなかった。マウスでは精子形成(精原細胞から成熟精子への分化)に約 35 日を要する。4 週間の投与後に観察された精子数・精子運動能の低下は、TiNP の精原細胞への作用であると考えられるが、単回投与で認められた精子運動能の低下は精巣上体尾部に存在する成熟精子への TiNP の直接的な作用であることが示唆され、TiNP は精巣のみならず精巣上体尾部をも標的組織とする可能性が考えられる(投稿中)。次に、TiNP が精子の質に与える影響を検討した。C57BL/6J マウスに TiNP (10 mg/kg)を単回静脈内投与し、投与 3 日後に単離した精子の受精能を *in vitro* fertilization (IVF)法にて調べたところ、卵分割数が有意に少なくなることを見出した。この結果は TiNP が精子の受精能を低下させることを示す(Fund Toxicol Sci (2019) 6, 113-116)。また、TiNP (10 mg/kg)投与後の精巣上体尾部を試料に、マイクロアレイ法による遺伝子発現解析を行ったところ、a-actin や b-tubulin などの変動が大きく、TiNP がマイクロフィラメントや微小管に障害を与え、細胞骨格の崩壊が TiNP の毒性発現機構である可能性が示された。

5. 主な発表論文等

(雑誌論文)(計 2 件)

Nobuhiko Miura, Katsumi Ohtani, Tatsuya Hasegawa, Gi-Wook Hwang, Hiroki Yoshioka, Impairment of fertilization efficiency in mice following nano-sized titanium exposure, Fund Toxicol Sci, 6, 113-116 (2019) 査読有

Nobuhiko Miura, Katsumi Ohtani, Tatsuya Hasegawa, Hiroki Yoshioka, Gi-Wook Hwang, High sensitivity of testicular function to titanium nanoparticles, J Toxicol Sci, 42, 359-366 (2017) 査読有

[学会発表] (計 8 件)

Nobuhiko Miura and Katsumi Ohtani, Titanium dioxide nanoparticle-induced testicular toxicity in mice, The 56th Annual Meeting of Society of Toxicology (国際学会), 2017 年

三浦伸彦, 北條理恵子, 大谷勝己 酸化チタンナノ粒子による精巣機能障害 - 肝障害との比較 - フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017 年

大谷勝己, 北條理恵子, 三浦伸彦 酸化チタンのマウス雄性生殖系への影響 フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー 2017 年

三浦伸彦, 北條理恵子, 吉岡弘毅, 大谷勝己 酸化チタンナノ粒子による精巣障害および肝障害の比較 生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

大谷勝己, 北條理恵子, 吉岡弘毅, 三浦伸彦 マウスにおける酸化チタンの雄性生殖系への影響 生命科学系学会合同年次大会(ConBio2017) 2017 年

三浦伸彦 労働衛生と精巣機能障害 フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー シンポジウム「生殖毒性の最前線」 2018 年

三浦伸彦, 田中廣輝, 北條理恵子, 大谷勝己, 吉岡弘毅 酸化チタンナノ粒子による急性精巣機能障害の誘発機構 第 45 回日本毒性学会学術年会 2019 年

Hiroki Yoshioka, Nobuhiko Miura Titanium dioxide nanoparticles-induced testicular dysfunction is mediated by anatase titanium dioxide フォーラム 2018 衛生薬学・環境トキシコロジー 日韓次世代シンポジウム(国際学会) 2019 年

6. 研究組織

(1) 研究代表者

三浦 伸彦 (MIURA NOBUHIKO)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所 産業毒性・生体影響研究グループ 部長代理

20229644

(2) 研究分担者

大谷 勝己 (OHTANI KATSUMI)

独立行政法人労働者健康安全機構労働安全衛生総合研究所 有害性評価研究グループ 統括研究員

50333373

吉岡 弘毅 (YOSHIOKA HIROKI)

金城学院大学 薬学部 助教

30756606