

ファルマシア

別刷

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

武田 健

Ken TAKEDA

東京理科大学薬学部教授、
東京理科大学ナノ粒子健康科学研究センター長

菅又昌雄

Masao SUGAMATA

栃木臨床病理研究所長

1 はじめに

ナノマテリアルの健康影響に関する研究は、欧米諸国が先陣を切り、大きくリードしている。米国では、クリントン大統領時代に国策として国家ナノテクノロジー戦略を設定し、ナノテクノロジー産業の育成を図るとともに負の側面のリスクにも着目して一定の予算を割り、安全性に関する研究をスタートさせている。先進欧州諸国でも同様な政策がとられたことから、様々な研究機関から多数の研究結果が報告されるようになってきた。したがって既に多くの論文、総説があり、¹⁻⁴⁾ また、それらを紹介する優れた訳書が出版されている。⁵⁻⁷⁾ そこで、現在まで行われてきた研究の全体的な把握は成書に譲り、主に我々が行ってきた研究を紹介しながら、ナノマテリアルがもたらすであろう健康影響の本質について考えてみたい。

我々は最近、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、出生後脳の特定な細胞の特定なオルガネラに蓄積され周辺の細胞に影響を及ぼすこと、⁸⁾ さらに、化粧品や光触媒として汎用される酸化チタンナノ粒子も同様に母マウスから仔の脳や精巣に移行し、様々な異常を生じさせることを明らかにした。⁹⁾ 他のナノマテリアルに関しても研究を進めているが、本稿では次世代脳神経系及び生殖系への影響について我々の結果の一部を話題として紹介したい。なお、ナノマテリアルのリスク評価については今回は触れず、有害性とその予防策についてのみ言及したい。

2 非意図的に産生される微小粒子状物質の健康影響—浮遊粒子状物質及びディーゼル排ガスの健康影響

ナノマテリアルの健康影響を論ずるには、既に非意図的に産生され、大気中に浮遊する粒子状物質及びディーゼル排ガスの健康影響についての研究を無視することはできない。それらの結果を念頭において研究を進めることが重要と考える。浮遊粒子状物質やディーゼル排ガスにはナノサイズの超微小粒子が多量に含まれており、動物実験だけでなく多くの疫学調査並びにヒトにおけるボランティア介入実験の結果が報告されている。

初期において粒径 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質(PM 10)の健康影響が調べられていたが、近年では更に小さな粒子が問題視され、粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子状物質(PM 2.5)の健康影響の研究が行われてきた。その結果、主として欧米で行われた疫学研究から、以下のことが明らかになっている。

1) PM 2.5 あるいは PM 10 への短期曝露と死亡数との関係について、複数の都市の解析結果から、粒子濃度の上昇と1日以内(1日ラグ)に増加する死者数の間に関連性が認められている。

- 2) 短期曝露と外因死を除くすべての疾患による死亡(全死亡)、循環器系疾患による死亡、呼吸器系疾患による死亡との関連性が報告されている。さらに、心筋梗塞、COPD(慢性閉塞性肺疾患; chronic obstructive pulmonary disease)等、個別の疾患による死亡との関連性を報告しているものもある。
- 3) 循環器系疾患の死亡数増加に関する結果については、基本的には不整脈、急性心筋梗塞、冠動脈疾患、脳血管疾患等の病態を悪化させ、重篤な場合は死に至るという説明が可能である。
- 4) PM 2.5 あるいは PM 10 への短期曝露と医療機関への呼吸器系疾患や循環器系疾患で入院・受診する患者数との関連性が世界各国でみられている。

これらの疫学研究の結果は、動物実験及びヒト志願者による介入実験で明らかにされた呼吸器系への刺激や自律神経機能への影響等を介した作用、生理活性物質や過酸化物の増加等を介した作用、血液凝固系の活性化や血栓形成の誘導等を介した作用等で部分的に説明することが可能である。¹⁰⁾

大気汚染による曝露は、すべての人々に及ぼしうるものであり、地域により、また職業によっては、更に高濃度に曝露される危険性が考えられる。環境衛生の立場からも、ナノ粒子を多量に含む微小粒子の健康影響を軽視することは決してできない。

3 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 PM 10 及び PM 2.5 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 PM 0.1 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、当研究センター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ている(CREST 2000~2005年、代表武田)。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。⁸⁾ 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。

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。¹¹⁾ 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。

脳の病理所見

光学顕微鏡所見として、DE 曝露群では、血管周囲に浮腫及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。⁸⁾

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つながる事象である。

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。¹²⁾

モノアミン代謝の変動と行動異常

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常が認められたことから、¹³⁾ 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。

4 ディーゼル排ガス胎仔期曝露による生殖系への影響

我々は、ディーゼル排ガス胎仔期曝露の実験系において、雄性生殖、¹⁴⁻¹⁸⁾ 胎盤、¹⁹⁾ 子宮内膜症²⁰⁾などに影響が及ぶことを明らかにした。紙面の関係でそれらの紹介は割愛したい。

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傷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みいだされつつある。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。⁹⁾ 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。²¹⁾ 一方、我々は酸化チタンナノ粒子が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(図1~3)。⁹⁾

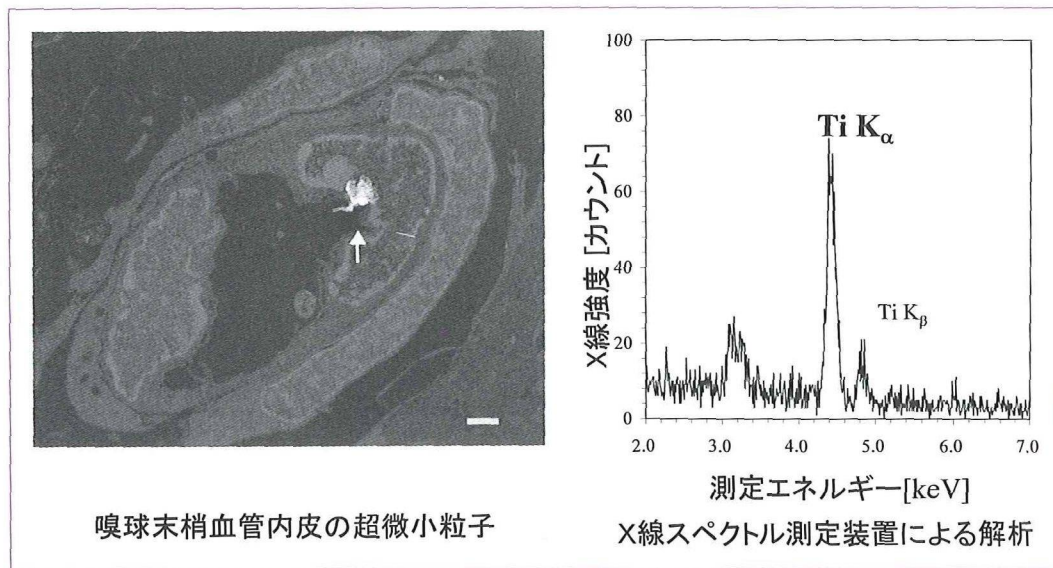


図1 胎仔期に酸化チタンナノ粒子の曝露を受け、成長した仔(6週)の脳の嗅球末梢血管内皮に取り込まれている粒子の解析
 X線スペクトル解析により、粒子が酸化チタンであることが同定された(解析は鈴木健一郎氏が行った。文献9参照)。

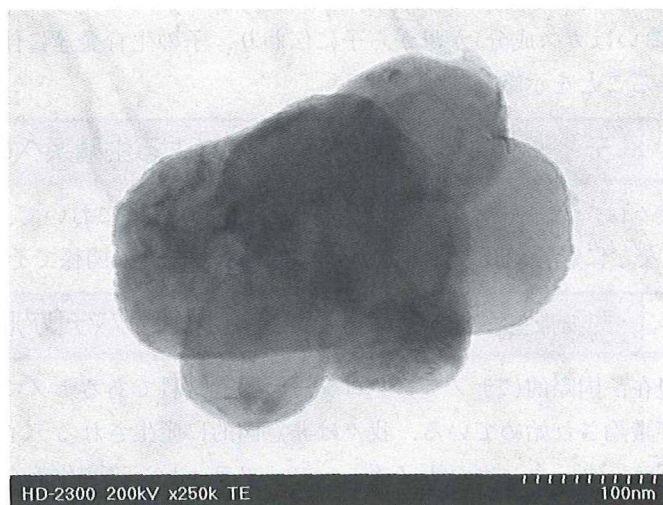


図2 脳の細胞に取り込まれた粒子の拡大電子顕微鏡写真⁹⁾
 複数の酸化チタンナノ粒子が凝集している。

6 ナノマテリアルの胎仔期曝露による雄性生殖系への影響

上記した脳で認められた現象は、酸化チタンナノ粒子を妊娠マウスの皮下に投与すると、生後6週齢の仔マウス精巣の細胞(ライディヒ、セルトリ、精子細胞など)でも認められ、これら組織への酸化チタンの移行が証明された。組織染色の観察で精細管の異常が認められ、また、セルトリ細胞の電子顕微鏡観察ではミトコンドリアの膨潤化、クリステの消失が認められ、1日精子産生数、セルトリ細胞数の有意な低下が認められた。⁹⁾ 酸化チタン以外の他のナノマテリアルにおいても、その程度に差はあるものの精巣に対する影響が認められた。一方、吉田らは成熟オスマウスの実験系において、気管内投与したカーボンブラックナノ粒子が生殖系に影響することを明らかにしている。²²⁾

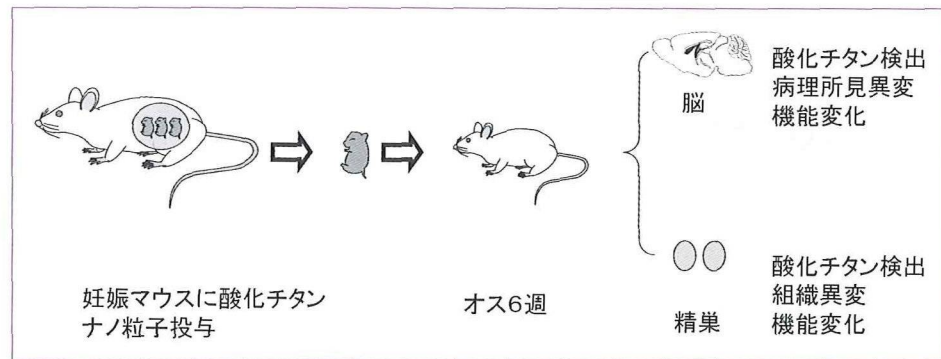


図3 酸化チタンナノ粒子を妊娠期のマウスに曝露すると、成長後の仔の脳や精巣に粒子が検出され、様々な影響が認められる

文献9の内容を要約した模式図。

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れ非意図的に産生されたものであれ、呼吸から動物体内に入ると血流に乗り、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しうる。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乗れば仔に移行し、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、増悪化につながる恐れがある。

8 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。ナノ粒子は細菌、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。²³⁾

9 成人病胎児期起源説との一致

英国の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。²⁴⁾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つな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。²⁵⁾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

といわれている幾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、現在更なる研究を進めている。

10 おわりに

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いえるであろう。DDS(drug delivery system)の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。したがって、我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。

我々の研究は多くの研究者の指導や協力のもとに行われてきた。研究に関わった院生・学生を含むすべての共同研究者に深謝申し上げます。

文 献

- 1) Oberdörster G. *et al.*, *Environ. Health Perspect.*, 113, 823-839 (2005).
- 2) Lam C. *et al.*, *Crit. Rev. Toxicol.*, 36, 189-217 (2006).
- 3) Nel. A. *et al.*, *Science*, 311, 622-627 (2006).
- 4) Donaldson K. *et al.*, *Toxicol. Sci.*, 92, 5-22 (2006).
- 5) 小林 剛, 構成・訳注, “ナノ物質のリスクアセスメント,” NTS, 東京, 2006.
- 6) 小林 剛, 構成・訳注, “ナノ素材の毒性・健康・環境問題,” NTS, 東京, 2006.
- 7) 小林 剛, 構成・訳注, “ナノ毒性学—ナノ製品の安全性評価,” NTS, 東京, 2007.
- 8) Sugamata M. *et al.*, 52, *J. Health Sci.*, 82-84 (2006).
- 9) Takeda K. *et al.*, *J. Health Sci.*, 55, 95-102 (2009).
- 10) 環境省, 微小粒子状物質健康影響評価検討会報告書, 2008.
<http://www.env.go.jp/air/report/h20-01/index.html>
- 11) Suzuki K. *et al.*, *Appl. Surf. Sci.*, 255, 1139-1142 (2008).
- 12) Sugamata M. *et al.*, *J. Health Sci.*, 52, 486-488 (2006).
- 13) Yokota S. *et al.*, *Neurosci. Lett.*, 449, 38-41 (2009).
- 14) Yoshida S. *et al.*, *Environ. Sci.*, 13, 117-123 (2006).
- 15) Yoshida S. *et al.*, *Environ. Sci.*, 13, 139-147 (2006).
- 16) Ono N. *et al.*, *Inhalat. Toxicol.*, 19, 275-281 (2007).
- 17) Ono N. *et al.*, *Arch. Toxicol.*, 82, 851-859 (2008).
- 18) 武田 健ほか, 科学(岩波), 76, 739-744 (2006).
- 19) Fujimoto A. *et al.*, *Environ. Toxicol.*, 20, 431-440 (2005).
- 20) Umezawa M. *et al.*, *J. Health Sci.*, 54, 503-507 (2008).
- 21) Oberdörster G. *et al.*, *Inhal. Toxicol.*, 16, 437-445 (2004).
- 22) Yoshida S. *et al.*, *Internat. J. Androl.*, 22, 307-315 (2008).
- 23) Komatsu T. *et al.*, *Toxicol. In Vitro.*, 22, 1825-1831 (2008).
- 24) Barker D. J., Osmond C., *Lancet*, 327, 1077-1081 (1986).
- 25) Xu G. *et al.*, *J. Health Sci.*, 55, 11-19 (2009).

表 題

著 者 名

週 刊

医学のあゆみ

別 刷

第 卷・第 号： 年 月 日号

- tively charged stearyl-polyoxyethylene derivatives for thermosensitive liposomes : reduced liposomal aggregation and avoidance of reticuloendothelial system uptake. *Drug Target*, **2** : 259-267, 1994.
- 3) Nishiyama, N. et al. : Novel cisplatin-incorporated polymeric micelles can eradicate solid tumors in mice. *Cancer Res.*, **63** : 8977-8983, 2003.
 - 4) Nakajima, M. et al. : Nano-sized fluorescent particle as a new tracer for sentinel node detection : An experimental model for decision of appropriate size and wavelength. *Cancer Sci.*, **96** : 353-356, 2005.
 - 5) Kobayashi, M. et al. : Fluorescence tomography in turbid media based on acousto-optic modulation imaging. *Appl. Phys. Lett.*, **89** : 181102, 2006.
 - 6) Maeda, H. and Matsumura, Y. : Tumortropic and lymphotropic principles of macromolecular drugs. *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, **6** : 193-210, 1989.
 - 7) Kobayashi, Y. et al. : Silica-coating of AgI semiconductor nanoparticles. *Colloids Surf. A.*, **251** : 197-201, 2004.
 - 8) Kobayashi, Y. et al. : Silica-coating of fluorescent polystyrene microspheres by a seeded polymerization technique and their photo-bleaching property. *Colloids Surf. A.*, **242** : 47-52, 2004.

* * *

ナノマテリアルの次世代健康影響

— 脆弱性集団への影響

Nanoparticles affect the health of next generation — Vulnerable populations to nanoparticles



新海雄介 梅澤雅和 武田 健(写真)

Yusuke SHINKAI, Masakazu UMEZAWA and Ken TAKEDA

東京理科大学ナノ粒子健康科学研究センター，同薬学部衛生化学研究室

◎ナノテクノロジーの基盤材料であるナノマテリアルは、産業発展のため飛躍的な応用が期待される一方で、健康への影響が懸念されている。小さいゆえの物理化学的な特性から、もし体に入ったらどのような作用をもたらすかという点で、未知な部分が多い。著者らは脆弱性集団であるマウスの胎仔期に焦点をあて、意図的に生産される酸化チタンやカーボンブラックナノ粒子、非意図的にナノ粒子が生産されるディーゼル排ガスなどを曝露し、発達の段階で脳神経系や生殖系などにどのような影響が現れるか検討した。ここ10年近くにわたる著者らの研究および国内外で蓄積されつつある研究報告を通し、ナノ粒子が潜在的にさまざまな疾患の原因や増悪化の要因になりうると考えられるようになった。



Key word : ナノマテリアル，ナノ粒子，次世代影響，脳神経系，生殖系

ナノテクノロジーはわが国の将来を担う重要な基盤技術として大きな期待が寄せられている。すでに、さまざまなナノマテリアルの開発・製造・応用が開始され、工業分野、医薬分野などにおいて革新的な素材として注目されている。しかし最近、ナノマテリアルの健康影響を懸念する研究結果があいついで報告されるようになってきた。ナノサイズの物質の生体影響評価というまったく新しい分野であるために、リスク評価手法の標準化ができていないなど、さまざまな問題が存在する。そこで、わが国のナノテクノロジー産業が世界をリードしていくためには、ナノマテリアルの健康への影響に関し十分な基礎研究を行い、安全性を確認したうえで円滑に社会に受け入れられることが求められている。

一方、大気中の浮遊粒子状物質(直径 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子状物質)の健康影響が危惧されてきたが、最近、浮遊粒子状物質のなかには無数のナノサイズの粒子が含まれていることが明らかになった。都

市圏の幹線道路沿道では浮遊するナノ粒子の大部分はディーゼル車由来といわれている。

著者らは脆弱性集団、とくに胎仔がナノマテリアルの曝露を受けたとき、出生後の成長の過程でどのような影響を受けるかについて研究を行ってきた。著者らの研究結果を中心に、意図的・非意図的に生産されるナノマテリアルの健康影響について紹介したい。

意図的に生産されるナノマテリアルの健康影響

1. ナノマテリアルの種類と性状

ナノマテリアルとしては炭素素材のカーボンブラック、カーボンナノチューブ、フラーレンなどがナノテクノロジー基盤材料のトップランナーとしてさらなる応用が期待されている。とくにカーボンブラックは、タイヤの高品質化や黒色顔料として使用量が多いため、カーボンナノチューブは導電性や強度が注目され、今後の利用拡大が期待されている。また、金属酸化物のナノマテリ

アルとして酸化チタンは化粧品や光触媒として、酸化亜鉛は化粧品としてすでに汎用されている。さらに、銀、アルミナ、白金などが日用品や食品に利用されるなど、多くの種類のナノマテリアルが実用化されている。

これらのナノマテリアルでは結晶のサイズが小さくなることにより電子の状態が変化し、通常の大きな物質にはないような性質が現れる。たとえば、化学的な反応性が高まる点があげられる。化学反応は基本的に物質の表面で起こるが、物質がナノサイズになることにより単位質量当りの表面積が大きくなり、この比表面積の増大が化学的反応性を高めることになる。その他、小さくなることで多くの物理化学的変化の起こることが知られているが、身体の中での生物学的な作用はかならずしも明らかになっていない。

2. ナノマテリアルの体内への侵入経路

ナノマテリアルが体内へ侵入する場合、その経路として吸入(経気道)、浸透(経皮)、摂取(経口)などが想定されている¹⁾。しかし、侵入経路に関する定量的な解析はまだほとんどされていない。実験動物を用いた研究により、さまざまな曝露法による各種組織への影響に関する報告がみられるようになってきた²⁾。しかし、物質の種類、サイズ、表面性状、曝露量、曝露方法など試験法が統一されていないことから、ナノマテリアルの体内への侵入経路についての全体像は得られていない。

3. ナノマテリアルの体内動態

ナノマテリアルが生体内に入ったときにどのような挙動を示すかについて、DDSや毒性評価を目的とした体内動態に関する研究が報告されている。しかし、統一された見解が得られているわけではない。

Semmler-Behnke らによるラットへの金ナノ粒子静脈投与試験によると、投与後 24 時間後において 18 nm の粒子は大半が肝(93.9%)に存在し、ごくわずかに脾(2.2%)に検出されたが、1.4 nm の粒子は肝(47.5%)腎(5.5%)血液(3.7%)など全身に検出された。いずれの粒子も脳には検出されなかった³⁾。一方、De Jong らによるラットへの金ナノ粒子静脈投与試験では 10, 50, 100, 250 nm 金ナノ粒子のすべてについて、24 時間後には大半が

肝、脾に検出されたが、とくに 10 nm の粒子はさまざまな組織(血液、肝、脾、腎、精巣、胸腺、心臓、肺、脳)に検出された⁴⁾。また、Fabian らによるラットへの酸化チタンナノ粒子静脈投与試験では、20~30 nm の粒子が用いられ、血液、脳、リンパ液には検出されなかったが、肝、肺、脾、腎の順に高濃度に酸化チタンが検出された。肺と腎は 14 日でコントロールレベルに濃度が低下したが、肝は 28 日後も高レベルで、脾はわずかに減少していた⁵⁾。マウスにおいては Sugibayashi らによる酸化チタンナノ粒子静脈投与試験により、投与後 5 分で血液や各種組織における 15 nm の粒子濃度が上昇したが、脳には検出されないことが示された。酸化チタンは肝にもっとも多く検出され、1 カ月で 30% しか減少しなかった⁶⁾。また、Yang らによる 14 nm の Q-dot 静脈投与においては、28 日後においてほぼ 100% が体内に残存していた⁷⁾。以上の報告は、体内に侵入し血流に乗ったナノ粒子はクリアランスに非常に時間がかかることを示している。

4. 酸化チタンの胎仔期曝露による産仔の脳、精巣への移行と影響

上記の研究は成獣を用いたものであり、脳にはほとんど移行しないが、静脈投与によって、10 nm 以下のナノ粒子であれば、わずかながら血液脳関門を通過し、脳へ到達する可能性が示された⁴⁾。

著者らは、血液脳関門、精巣関門などバリアー機能の未完成な胎仔期に妊娠母体を經由してナノ粒子を曝露することにより血液胎盤関門の通過の可能性および胎仔の脳や精巣への移行と影響に関する研究を行った。酸化チタンナノ粒子を皮下投与した妊娠マウスからの出生仔について 6 週齢時に、精巣組織の透過電子顕微鏡(TEM)観察、および電界放出型走査電子顕微鏡(FE-SEM/EDS)による解析を行ったところ、酸化チタン粒子が検出・同定された。曝露群の精巣組織では Sertoli 細胞の減少やミトコンドリアの損傷が認められた。また、曝露群の 1 日精子産生数に有意な低下が認められた。脳組織についての同様の解析では嗅球、大脳皮質、海馬などの部位に酸化チタン粒子が検出・同定された。さらに組織学的検討を行ったところ、末梢血管に多発性の微小梗塞の所見が認め

られ、曝露群の組織で嗅球僧帽細胞のカスパーゼ3(アポトーシスのマーカー)の発現が亢進していることが明らかとなった⁸⁾。この結果、ナノ粒子の胎初期曝露により、胎盤を經由して胎仔に到達し、未完成な血液脳関門、精巣関門を通過し、脳や精巣に沈着し、さらに組織の機能に影響を及ぼすことが示された。

非意図的に生産されるナノマテリアルの健康影響

1. 浮遊粒子状物質(SPM)とPM0.1

微粒子の健康影響については、非意図的に産生され大気中に浮遊する粒子状物質(suspended particle matter: SPM)によるものが従来から研究されてきた。この知見はナノマテリアルの健康影響を考えるうえでおおいに参考になる。SPMは大気中を漂う粒径 $10\mu\text{m}$ 以下の粒子(PM10)と定義付けられるものであり、呼吸器や循環器系に影響することが明らかになった。近年、より小さな粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の粒子の健康影響が懸念され、PM2.5の健康影響の研究が行われてきた。さらに最近では、測定機器の発達に伴って粒径 $0.1\mu\text{m}$ 以下の粒子(ナノ粒子)の存在が明らかになり、個数的には大部分を占めることから、健康に大きく影響している可能性が注目されるようになった⁹⁾。

SPMの発生源は工場から排出される煤塵や粉塵、自動車排気ガスなどの人為的なもののほかに、土壌の飛散などの自然現象もある。量的にもっとも寄与が大きいのは自動車排気ガスであり、SPMの約半分を占めるといわれている¹⁰⁾。そのなかでもディーゼル車はガソリン車に比べて燃料の不完全燃焼が起こりやすく、粒子状物質(particle matter: PM)が発生しやすいため、平成16年(2004)に環境省が報告した調査結果¹¹⁾により自動車から排出されるPMのうちほぼ100%近くがディーゼル車由来であることが示されている。最近、ディーゼル排気ガス規制が施行された地域ではSPM汚染が大きく改善されつつある¹⁰⁾。しかし、ナノ粒子が大きな生体影響を及ぼしうると考えられている一方で、大気中のナノサイズの粒子(PM0.1を含む)についてはこれをモニターする方法さえ確立されておらず、注意が必要である。

環境省は微小粒子状物質は総体として人びとの健康に一定の影響を与えると結論づけ(平成20年4月、微小粒子状物質健康影響評価検討会報告)、現在、同省中央環境審議会大気環境部会が微小粒子状物質の測定法の検討を進めている。

2. ディーゼル排気ガス微粒子の組成

ディーゼル排気ガスはガス成分と微粒子成分とに大別され、後者はディーゼル排気微粒子(diesel exhaust particle: DEP)ともよばれる。DEPにはナノ粒子(粒径 100nm 以下)に相当する画分が非常に多い。とくに粒径 $5\sim 50\text{nm}$ の粒子は質量では全体のほんのわずかにすぎないが、個数では大部分を占める¹²⁾。化学成分としては元素状炭素を核にもち、その外側にカルシウムや鉄などの金属成分、さらに有機炭素が付着している¹³⁾。その由来は未燃燃料や潤滑油の不完全燃焼または熱分解生成物であり、有機炭素としてはベンゾ(a)ピレン、ニトロアレーン、ダイオキシンやフタル酸エステル類など、数百種類以上の物質が付着している。培養細胞を用いた研究によりDEPは細胞に酸化ストレスを誘導することが示されているが¹⁴⁾、DEPのうちでも表面に金属成分が多く存在するものがより強い酸化ストレスを与えることが明らかになっている¹³⁾。

3. ディーゼル排気ガス(微粒子)胎児期曝露の健康影響と“成人病胎児期起源説”

ディーゼル排気ガスの曝露により引き起こされる健康影響は、吸入により排気ガスと接触する気道を中心によく研究されてきた。一方で、著者らは曝露による影響を受けやすい時期に焦点をあて、気道・呼吸器以外の器官に生じる影響について研究を行ってきた。とくに注目して研究を行ってきたのは、胎児期に曝露を受けることによる健康影響である。

著者らは、環境基準値程度の微粒子を含むディーゼル排気ガスを妊娠中のマウスに吸わせ、生まれた仔に生じる影響を検討してきている。この研究で、排気ガス由来と思われるナノサイズ(100nm 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を世界に先がけて明らかにした¹⁵⁾。また、脳内の神経伝達物質のモノアミン代謝や行動試験にも異変が認めら

れた¹⁶⁾。母体の子宮内で発達する胎児は血液胎盤関門によって外界からの異物の侵入はある程度制限されている。しかし、器官の未発達な胎児では血液胎盤関門などの防御機能が不完全であるため、化学物質の曝露がわずかであっても影響を受けやすい一面ももつ。

器官形成段階である胎児期に受けた影響が不可逆的な変化として表れてしまう場合、一度受けた影響が出生後も生涯にわたって残り、疾病の発症につながってしまうことが考えられる。著者らは、ディーゼル排ガスの胎仔期曝露の実験系において、雄性生殖器¹⁷⁻¹⁹⁾、雌性生殖器²⁰⁾、胎盤²¹⁾、子宮内膜症病変²²⁾などにも影響が及ぶことを明らかにしている。類似した実験により、ディーゼル排ガス微粒子の胎仔期曝露が産仔の呼吸器に影響するという結果も報告されている^{23,24)}。

イギリスの 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²⁵⁾。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、それが生活習慣病とよばれている成人病の発症につながるという説である。この説によると、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患にかかりやすくなるという。胎児期にディーゼル排ガスの曝露を受けると、出生後の発達によって脳神経系や生殖系、その他の臓器でさまざまな異常が表れるという著者らの研究結果は彼の説を支持している^{26,27)}。著者らは現在、生活習慣病といわれている疾患群の増悪化にも微粒子の胎児期曝露が寄与しているという作業仮説に基づいて、さらなる研究を進めている。

おわりに

胎仔期にナノマテリアルの曝露を受けると産仔の脳において病理学的に、また、神経伝達物質のモノアミン代謝や行動、遺伝子発現などにも異常が認められることから、著者らは最近増加している自閉症や多動症など微細脳機能障害が原因と考えられている脳神経疾患との関連性に注目して研究を進めている。雄の生殖系にも組織学的にまた機能的にさまざまな影響が及ぶことを観察している。

著者らのここ 10 年近くにわたる研究、また、国内外で蓄積されつつある研究報告を通してナノ粒子は潜在的にさまざまな疾患の原因や増悪化の要因になりうるようになるようになった。ナノ粒子の毒性からいかに身を守るか、粒子の除去、無毒化など健康予防対策も今後の課題である。

謝辞：本稿で紹介したナノマテリアルの脆弱性集団への影響の研究は、栃木臨床病理研究所・菅又昌雄所長、奥羽大学・押尾茂教授をはじめ多くの共同研究者の協力のもとに行われたもので、本研究にかかわったすべての共同研究者に深謝申し上げます。

文献

- 1) Oberdörster, G. et al. : Nanotoxicology : an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, **113** : 823-839, 2005.
- 2) Stern, S.T. and McNeil, S.E. : Nanotechnology safety concerns revisited. *Toxicol. Sci.*, **101** : 4-21, 2008.
- 3) Semmler-Behnke, M. et al. : Biodistribution of 1.4- and 18-nm gold particles in rats. *Small*, **4** : 2108-2011, 2008.
- 4) De Jong, W.H. et al. : Particle size-dependent organ distribution of gold nanoparticles after intravenous administration. *Biomaterials*, **29** : 1912-1919, 2008.
- 5) Fabian, E. et al. : Tissue distribution and toxicity of intravenously administered titanium dioxide nanoparticles in rats. *Arch. Toxicol.*, **82** : 151-157, 2008.
- 6) Sugibayashi, K. et al. : Safety evaluation of titanium dioxide nanoparticles by their absorption and elimination profiles. *J. Toxicol. Sci.*, **33** : 293-298, 2008.
- 7) Yang, R.S. et al. : Persistent tissue kinetics and redistribution of nanoparticles, quantum dot 705, in mice : ICP-MS quantitative assessment. *Environ. Health Perspect.*, **115** : 1339-1343, 2007.
- 8) Takeda, K. et al. : Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital cranial nerve systems. *J. Health Sci.*, **55** : 95-102, 2009.
- 9) 中央環境審議会大気環境部会微小粒子状物質リスク評価手法専門委員会報告：微小粒子状物質の定量的リスク評価手法について。平成 20 年 11 月。
- 10) 中島 徹, 溝畑 朗 : 環境大気粒子成分の粒径分布と自動車排ガス寄与率の推移。自動車研究, **31** : 151-154, 2009.
- 11) 環境省環境管理局 : 平成 16 年度結果報告書自動車排出ガス源単位及び総量算定検討調査。2004.
- 12) Kittelson, D.B. : Engines and nanoparticles : a review. *J. Aerosol. Sci.*, **29** : 575-588, 1998.
- 13) Suzuki, K. et al. : Interaction between diesel exhaust particles and cellular oxidative stress. *Appl.*

- Surf. Sci.*, **255** : 1139-1142, 2008.
- 14) Komatsu, T. et al. : The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells *in vitro*. *Toxicol. in Vitro*, **22** : 1825-1831, 2008.
 - 15) Sugamata, M. et al. : Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains. *J. Health Sci.*, **52** : 82-84, 2006.
 - 16) Yokota, S. et al. : Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci. Lett.*, **449** : 38-41, 2009.
 - 17) Yoshida, S. et al. : *In utero* exposure to diesel exhaust increased accessory reproductive gland weight and serum testosterone concentration in mice. *Environ. Sci.*, **13** : 139-147, 2006.
 - 18) Ono, N. et al. : Prenatal exposure to diesel exhaust impairs mouse spermatogenesis. *Inhal. Toxicol.*, **19** : 275-281, 2007.
 - 19) Ono, N. et al. : Detrimental effects of prenatal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch. Toxicol.*, **82** : 851-859, 2008.
 - 20) Tsukue, N. et al. : Effect of diesel exhaust on development of fetal reproductive function in ICR female mice. *J. Health Sci.*, **50** : 174-180, 2004.
 - 21) Fujimoto, A. et al. : Diesel exhaust affects immunological action in the placentas of mice. *Environ. Toxicol.*, **20** : 431-440, 2005.
 - 22) Umezawa, M. et al. : Diesel exhaust exposure enhances the persistence of endometriosis model in rats. *J. Health Sci.*, **54** : 503-507, 2008.
 - 23) Sugamata, M. et al. : Maternal diesel exhaust exposure causes dyspneic respiration to infants. *In* : 8th World Congress of Perinatal Medicine-WCPM (ed. by Bivilacqua, G.). Medimond, Bologna, 2007, pp.771-774.
 - 24) Fedulov, A. V. et al. : Pulmonary exposure to particles during pregnancy causes increased neonatal asthma susceptibility. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **38** : 57-67, 2008.
 - 25) Barker, D. J. and Osmond, C. : Infant mortality, childhood nutrition, and ischaemic heart disease in England and Wales. *Lancet*, **327** : 1077-1081, 1986.
 - 26) Xu, G. et al. : Early development origins of adult disease caused by malnutrition and environmental chemical substances. *J. Health Sci.*, **55** : 11-19, 2009.
 - 27) 武田 健, 菅又昌雄 : 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** : 245-250, 2009.

* * *

—Note—

Fetal Sex Determination of Macaque Monkeys by a Nested PCR Using Maternal Plasma

Fusako MITSUNAGA^{1,2)}, Miyuki UEIWA¹⁾, Yoshirou KAMANAKA¹⁾,
Mayumi MORIMOTO¹⁾, and Shin NAKAMURA¹⁾

¹⁾Department of Cellular and Molecular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 41–2 Kanrin, Inuyama, Aichi 484-8506 and ²⁾NPO Primate Agora, Kurisu, Inuyama, Aichi 484-0002, Japan

Abstract: Non-invasive fetal sex determination is required for biomedical studies, in which some sexual difference would be expected in fetal events, in order to make a choice of male or female fetus. To detect male fetal DNA of the sex-determining region Y gene (SRY) in maternal macaque plasma, nested real-time PCR using the SYBR Green system was developed. In all cases of pregnant macaques with male fetuses, a nested PCR product of SRY was amplified from the mother's plasma, while no amplicon was detected in any case of pregnancy with a female fetus. Interestingly, fetal SRY DNA appeared to be cleared rapidly from the maternal blood after parturition. The current method is sensitive and can be performed with a regular PCR machine.

Key words: fetal DNA, maternal blood, SRY

Non-human primates, especially macaques, are invaluable experimental animals in biomedical studies because of the close relationship between their biological nature and that of humans [11]. It is well known that their reproductive characteristics, placental structure and developmental events are very similar to those of humans [6]. This is why macaques are widely used in studies of fetal development, and the fetal influence of drugs/substances transferred through the placenta [9]. Prenatal determination of the fetal sex is required in these studies when sex differences in the fetal response to administered drugs or substances are anticipated. Detection of male fetal DNA (fDNA) in maternal blood has been developed as a non-invasive method for fetal sex determination [7] instead of amniocentesis. Since the amount of fDNA circulating in maternal blood is very low [8], a much

more sensitive and accurate method is needed. Recently, real-time PCR with the TaqMan system was reported to detect male fDNA in the serum of pregnant macaques [5]. However, the TaqMan real-time PCR method requires a specific TaqMan probe and expensive real-time PCR apparatus.

In the present study, we established a nested PCR method to detect the fetal male DNA sequence of the sex determining region Y (SRY) gene in maternal plasma. This nested PCR method makes it possible to perform fetal sex determination not only with real-time PCR apparatus, but also with a regular PCR machine.

Animals: Pregnant rhesus macaques (*Macaca mulatta*, total number: 21, mean age: 10.8 ± 3.8 years) at the Primate Research Institute (PRI), Kyoto University, Japan were used in this study. The macaques were housed

(Received 2 September 2009 / Accepted 22 November 2009)

Address corresponding: S. Nakamura, Department of Molecular and Cellular Biology, Primate Research Institute, Kyoto University, 41–2 Kanrin, Inuyama, Aichi 484-8506, Japan

```

GATAAAGTGAAGCGACCCATG AACGCATTTCATTGTGTGGTC
TCGCGATCAGAGGCGCAAGATGGCTCTAGAGAATCCCAAAA
TGCGAAACTCAGAGATCAGCAAGCAGCTGGGATACCAGTGG
AAAATGCTTACCGAAGCCGATAAATGGCCATTCTTCCAGGA
GGCACAGAACTACAGGCCATGCATAGAGAGAAATACCCGA
ATTATAAGTATCGA CCTCGTCGGAAGGCGAAGATGCTG

```

Fig. 1. *SRY* gene sequence of *Macaca mulatta*. Nt344 to 583 of the published *SRY* gene sequence (Genbank accession number AF284310) is shown. Sequences within boxes indicate the primer binding sites for the first PCR. Underlined sequences indicate the primer binding sites of the second PCR. The amplicon of the nested PCR is 75 bp.

in individual cages or in group cages and were fed monkey chow supplemented with fresh fruits and vegetables. Experiments and animal husbandry were performed in accordance with the PRI's institutional guide for the care and use of laboratory primates, which is based on the 'Guide for the Care and Use of Laboratory Animals' by the US National Research Council, 1996 [1]. All experimental procedures were approved by the institutional animal care and use committee.

Gestational days (GD) were estimated using the date of timed mating and were confirmed by changes in the plasma levels of estradiol and progesterone by ELISA (Neogen Corp., Lexington, KY, USA) in early gestation [3]. Fetal age was also confirmed by measuring the biparietal diameter with ultrasonography from 6 weeks of gestation until term [10].

Blood sample collection and DNA extraction: Peripheral blood (2 ml) was collected into heparin-containing syringes from pregnant rhesus macaques during gestation of 42 to 183 days. Plasma samples were obtained by centrifugation of the blood at 1,000 g for 15 min and stored at -80°C until use. DNA was extracted from 800 μl of plasma using a QIAmp DNA Blood Kit (Qiagen, Tokyo, Japan) according to the manufacturer's instructions. DNA was eluted into a final volume of 40 μl and used as a PCR template.

Nested PCR with real-time apparatus using SYBR Green: Real-time PCR using SYBR Green as a product-reporting system was performed using an ABI Prism 7700 Sequence Detector (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) under the conditions described previ-

ously [4]. In brief, PCR was carried out in a 10- μl reaction mixture containing 1 μl of DNA template, 5 μl of 2 \times SYBR Premix Ex Taq (Takara Bio Inc., Otsu, Japan), 0.2 μl of 50 \times ROX Reference Dye (Takara Bio Inc.), and 2 pmol each of forward and reverse primers. The thermal conditions were 95°C for 10 s and 30 cycles of (95°C for 5 s, 63°C for 30 s) with generation of a dissociation curve at the end of the assay to verify the amplification of the target gene. The standard curves from GAPDH amplicons of known concentration were used to calculate the quantity of target genes in samples [4]. Figure 1 shows the sequence of the rhesus *SRY* gene (Genbank accession# AF284310) and the binding sites of specific primer pairs (SRY-1 and SRY-3, forward and reverse, respectively). The outer primer pair (SRY-1-forward, SRY-1-reverse) in this study was designed to amplify the sequence of the *SRY* gene in the first PCR. The inner primer pair (SRY-3-forward, SRY-3-reverse), which was described previously [2], was used to amplify a 75-bp fragment inside the amplicon of the first PCR. The sequences of these primers were as follows:

SRY-1-forward:

5'-GATAAAGTGAAGCGACCCATG -3';

SRY-1-reverse:

5'-CATCTTCGCCCTCCGACGAGG -3';

SRY-3-forward:

5'-CGATCAGAGGCGCAAGATG -3';

SRY-3-reverse:

5'-TGGTATCCCAGCTGCTTGCT -3';

GAPDH-forward:

5'-CCATGGAGAAGGCTGGGG -3';

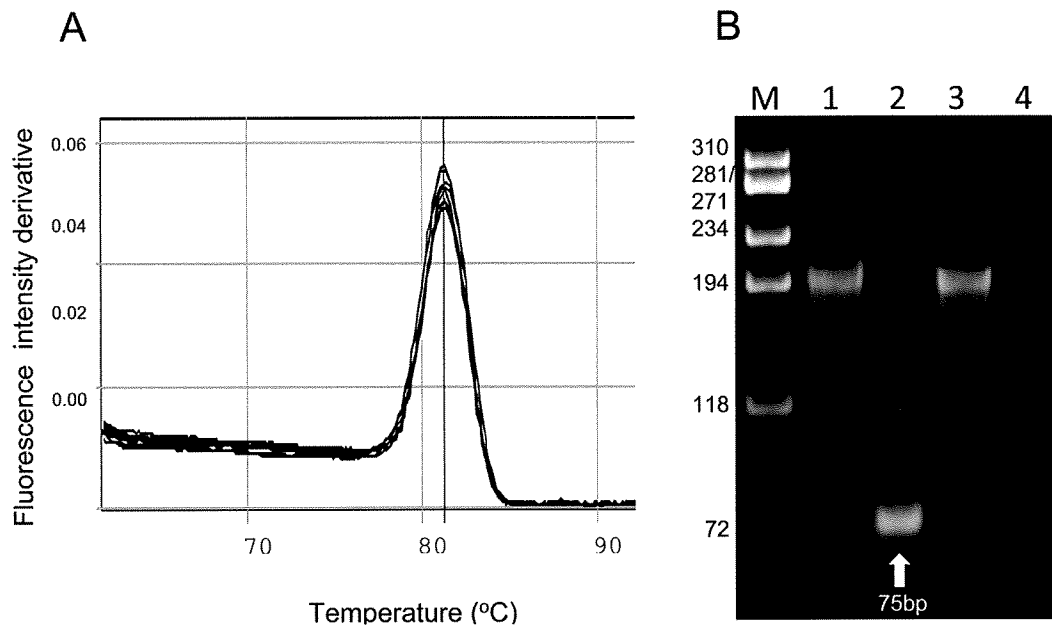


Fig. 2. Representative single PCR product obtained by nested PCR (SRY-3 primer set) of plasma DNA samples from pregnant macaques with male fetuses. **A:** Dissociation curves of SRY-3 fragment produced by real-time PCR. The temperature of its peak is 81.4°C. **B:** Polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) of GAPDH and SRY-3 amplicons. **M:** Marker (ϕ X174/HaeIII). DNA samples from maternal plasma with male fetus (lanes 1 & 2) and with female fetus (lanes 3 & 4). PCR amplicon of GAPDH (lanes 1 & 3) and of SRY (lanes 2 & 4).

GAPDH-reverse:

5'-CAAAGTTGTCATGGATGACC-3'.

All PCRs were performed in triplicate for *SRY* sequences and in duplicate for the reference gene (*GAPDH*).

First PCR: The DNA samples extracted from plasma were used as the template in the first PCR, in which *SRY* DNA was amplified using the primer set of SRY-1. In the same PCR run, the number of copies of *GAPDH* fragments in each sample was assayed to estimate the DNA level in the template sample.

Second PCR: The first PCR plate was centrifuged briefly, and the PCR product of SRY-1 was collected. This first PCR product was diluted 1:100 and used as the template for the second PCR. The primer pair of SRY-3 was employed to amplify the inner sequence of the SRY-1 amplicon (Fig. 1).

Conventional nested PCR with regular PCR machine: Conventional nested PCR was performed under the same conditions as described above except that a regular PCR machine (Perkin-Elmer Inc., Waltham, MA, USA) was used. After the nested second PCR, the SRY-3 amplicon

was subjected to polyacrylamide gel electrophoresis followed by staining with SYBR Green.

Sequence analysis of PCR product: PCR products were subjected to sequence analysis with an ABI Genetic Analyzer 310 (Applied Biosystems) to confirm their DNA sequences.

SRY DNA detection in pregnant macaques with male fetuses: After the first PCR using the SRY-1 primer set, all plasma DNA samples from pregnant macaques with male fetuses yielded an *SRY* DNA fragment by nested PCR using the SRY-3 primer set. The SRY-3 amplicon showed a symmetric dissociation curve with a peak of 81.4°C (Fig. 2A) and a single band of 75 bp in polyacrylamide gel electrophoresis (Fig. 2B). DNA sequence analysis of the nested PCR product revealed that the target sequence of *SRY* DNA was amplified using the nested PCR conditions (data not shown). However, plasma DNA samples from pregnant macaques with female fetuses yielded no SRY-3 amplicon by this nested PCR (Table 1). These findings indicate that the present nested PCR using primer sets SRY-1 for the first PCR

Table 1. Results of SRY-PCR and fetal sex

Gestation day ^{a)}	SRY ^{b)}	Fetal sex ^{c)}
42	+	male
52	+	male
91	+	male
115	+	male
130	+	male
135	+	male
137	+	male
150	+	male
156	+	male
160	+	male
160	+	male
172	+	male
64	-	female
65	-	female
74	-	female
94	-	female
123	-	female
129	-	female
138	-	female
160	-	female
161	-	female

^{a)}Gestation day at blood sampling. ^{b)}Detection of SRY by nested real-time PCR. +: positive, -: negative. ^{c)}Phenotype of the newborn.

and SRY-3 for the second PCR is a reliable method for fetal sex determination.

Moreover, the PCR detection of circulating SRY DNA was possible at an early stage of gestation. The SRY-3 amplicon was detected from plasma samples obtained at early gestation of 42, 52, 64, or 65 days (Table 1).

Limit of detection of SRY in plasma DNA samples: Since the concentration of DNA extracted from plasma samples is too low to measure photometrically, we do not know the amount of DNA in the template sample for the 1st PCR. To avoid false-negative results due to insufficient DNA, we employed GAPDH as a guide DNA for the 1st PCR. As shown in Fig. 3, there appears to be a threshold in the copy numbers of the GAPDH amplicon, in which the SRY amplicon of the second PCR was detected or undetected. The mean copy numbers of the GAPDH amplicon were calculated to be 22,513 for positive and 838 for false-negative samples, respectively. From these data, the critical point appears to depend on the efficiency of DNA extraction from the maternal plasma samples, and the DNA level of the template should be in a range corresponding to no less than

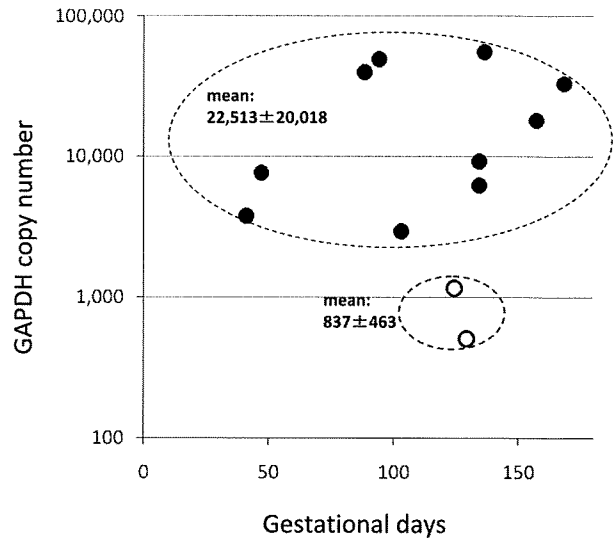


Fig. 3. The copy numbers of the GAPDH amplicon of SRY-positive (solid circles) and SRY-false-negative (open circles) samples.

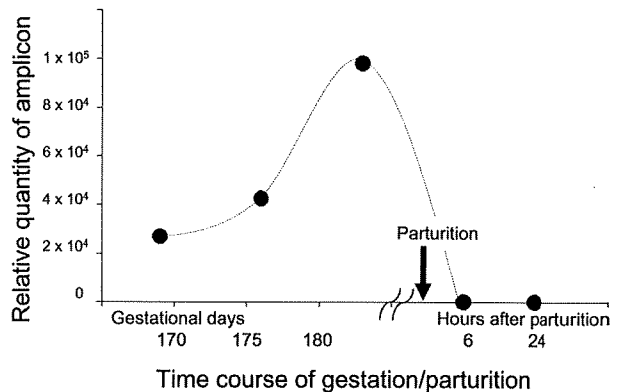


Fig. 4. Rapid clearance of fetal DNA after parturition. The relative quantity of SRY-3 amplicon obtained by the nested PCR was plotted against the time course of gestation and parturition. Fetal SRY fragment was detected in plasma DNA samples of the pregnant macaque with a male fetus. However, it was not detected in plasma samples obtained 6 or 24 h after parturition.

20,000 copies of the GAPDH amplicon.

Rapid clearance of SRY DNA from maternal plasma after delivery: To examine the clearance of fetal SRY DNA circulating in maternal blood, blood samples were obtained at term, on the day of delivery and after delivery, and subjected to SRY DNA detection. Typical results regarding the time course of circulating SRY DNA detected in maternal blood are shown in Fig. 4. No SRY

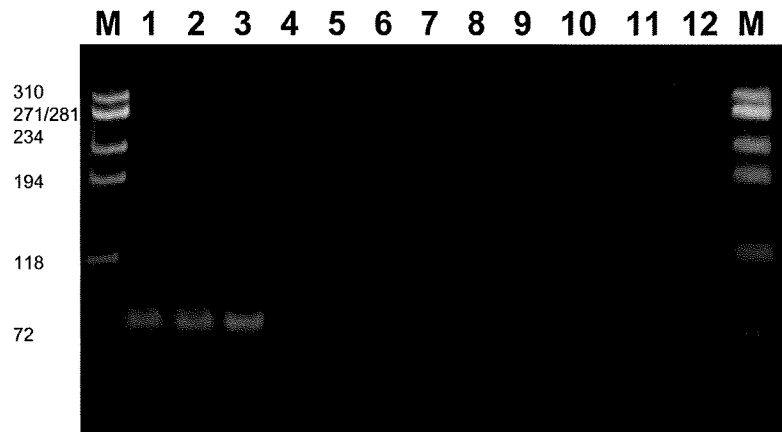


Fig. 5. SRY detection by nested PCR with a regular PCR machine. 1–9; samples of male fetus, 10–12; samples of female fetus, M; marker. Annealing for the first PCR; 1–3 and 10–11 at 63°C; 4–6 at 61°C; 7–9 at 59°C. Annealing for the second PCR; 1, 4, 7, and 10 at 63°C; 2, 5, 8, and 11 at 61°C; 3, 6, 9, and 12 at 59°C.

DNA was detected in maternal blood 6 or 24 h after delivery, indicating rapid clearance of the fetal SRY DNA from maternal circulation within 6 h after delivery.

SRY DNA detection with regular PCR machine: The present method enabled fetal sex determination by a nested PCR using a regular PCR machine. Among three annealing conditions, 63, 61, and 59°C, annealing at 63°C was effective for the first PCR, while there was no difference among the three annealing conditions for the second PCR (Fig. 5). The resulting nested PCR product gave a single band of 75 bp in PAGE, indicating that the specific SRY-3 amplicon was also amplified by this conventional nested PCR with a regular PCR machine.

Since Lo *et al.* reported the presence of fetal DNA (fdNA) in maternal plasma and serum [7], it has been used for sex determination and/or diagnosis of several fetal disorders in humans [2]. In non-human primates, fdNA in maternal plasma/serum is also an invaluable tool for determining fetal sex by non-invasive analysis coupled with PCR. Fetal sex determination is required for some biomedical studies using monkey fetuses, in which sex differences in the response to administered drug(s) or material(s) are anticipated. In a previous study, prenatal sex determination was performed to detect fetal male SRY DNA in macaque maternal serum/plasma by means of real-time PCR using the TaqMan

system [5]. That method, however, needs a specific TaqMan probe and expensive apparatus to perform real-time PCR. Here we have described a method for SRY DNA detection in macaque maternal plasma by the nested PCR method, which can be performed by either real-time PCR using the SYBR Green system or conventional PCR with a regular PCR machine.

In the present study of 21 pregnant macaques, SRY DNA circulating in maternal blood was detected in all females pregnant with male fetuses, but not in any case of pregnancy with a female fetus. Moreover, PCR detection of the circulating SRY DNA was possible at an early stage (42 days of gestation). These results indicate that the current nested PCR method is highly reliable and sensitive for determining fetal sex even in the early stage of pregnancy. We employed this nested PCR method to determine fetal sex in studies of nanomaterial effects upon male or female fetus.

As the fdNA circulating in maternal blood has mostly been of concern to applied science researchers for various prenatal diagnoses, only a few studies have addressed the biological nature and tissue origin [12]. In our macaques, circulating fetal SRY DNA decreased to an undetectable level just 6 h after parturition, indicating rapid clearance from maternal blood. This observation may also indicate placental origin of the cell-free fdNA circulating in maternal plasma.

In conclusion, a nested PCR method was established for sensitive fetal sex determination in macaque monkeys. This method can be applied not only to real-time PCR using the SYBR Green system but also to conventional PCR with a regular PCR machine.

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Ken Takeda for invaluable discussions, Dr. Kanichiro Nagatomo for technical assistance, and Dr. Elizabeth Nakajima for English correction. This work was supported in part by a Special Grant for Primate Research (820004420008 to S.N.) and Health Labour Sciences Research Grant (H20-Kagaku-Ippann-0088 to K.T).

References

1. Bayne, K. 1998. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 862: 105–110.
2. Chiu, R.W. and Lo, Y.M. 2002. *Expert. Rev. Mol. Diagn.* 2: 32–40.
3. Ellinwood, W.E., Stanczyk, F.Z., Lazur, J.J., and Novy, M.J. 1989. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 69: 348–355.
4. Jeong, A., Nakamura, S., and Mitsunaga, F. 2008. *J. Med. Primatol.* 37: 290–296.
5. Jimenez, D.F. and Tarantal, A.F. 2003. *Pediatr. Res.* 53: 18–23.
6. King, B.F. 1991. *Placenta* 12: 7–14.
7. Lo, Y.M., Corbetta, N., Chamberlain, P.F., Rai, V., Sargent, I.L., Redman, C.W., and Wainscoat, J.S. 1997. *Lancet* 350: 485–487.
8. Lo, Y.M., Tein, M.S., Lau, T.K., Haines, C.J., Leung, T.N., Poon, P.M., Wainscoat, J.S., Johnson, P.J., Chang, A.M., and Hjelm, N.M. 1998. *Am. J. Hum. Genet.* 62: 768–775.
9. Patterson, T.A., Binienda, Z.K., Newport, G.D., Lipe, G.W., Gillam, M.P., Slikker, W. Jr., and Sandberg, J.A. 2000. *Teratology* 62: 93–99.
10. Tarantal, A.F. and Hendrickx, A.G. 1988. *J. Med. Primatol.* 17: 105–112.
11. Wang, C. and Slikker, W. Jr. 2008. *Anesth. Analg.* 106: 1643–1658.
12. Wataganara, T. and Bianchi, D.W. 2004. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1022: 90–99.