

ナノマテリアルの健康影響の 評価手法に関する総合研究

平成 22 年度 厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

H20 - 化学 - 一般 - 008

平成 22 年度 総括・分担研究報告書

研究代表 武田 健

平成 23 年 5 月

目次

I. 総括研究報告

ナノマテリアルの健康影響の評価手法に関する総合研究…………… 1

武田 健

II. 分担研究報告

霊長類に対するナノマテリアルの影響評価 …………… 7

中村 伸

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 …………… 11

IV. 研究成果の刊行物・別刷 …………… 12

ナノマテリアルの健康影響の評価手法に関する総合研究

研究代表者:武田 健(東京理科大学薬学部教授)

研究要旨: 本プロジェクトではナノマテリアルを妊娠期曝露後、母獣、出生した子における体内挙動及び影響を長期間にわたって調べるとともに、生体影響評価手法を確立した。げっ歯類の他に胎盤特性（構造および薬物透過性）や化学物質応答性がヒトと高い共通性を持つ霊長類への影響を比較検討し、ヒトへの外挿可能な健康影響評価手法を確立した。

研究分担者（グループ B）

中村 伸
(NPO法人プライメイト・アゴラ バイオメディカル研究所、
所長)

A. 研究目的

ナノマテリアルはナノテクノロジー基盤素材として活用が期待されている。その物理化学的な特性により、肺や皮膚、腸管から体内に取り込まれ、生体に影響が及ぶことが報告されている。しかし、母親から子への移行と出生後の子への健康影響に関する報告はほとんどない。本研究ではナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法確立を目指し、げっ歯類及び霊長類の実験系において次世代を含め健康影響評価手法に関する研究を行った。

B. 研究方法

げっ歯類(マウス・ラット)を用いた研究

ナノマテリアル: 金属ナノ粒子として酸化チタン(アナターゼ型、ルチル型、及び

その表面加工体)、酸化亜鉛、非金属ナノ粒子としてカーボンブラック、フラーレン、カーボンナノチューブを使用した。粒径、形状の異なるものを用いた。

ナノマテリアルのサンプル溶液中での分散状態解析: 様々な溶媒中でナノマテリアルおよび水溶化させたものの分散状態を動的光散乱、 ξ -電位測定装置、電子顕微鏡等を用いて解析した。

ナノマテリアルの検出・同定: 細胞内、組織内ナノマテリアルの検出・同定は、TEM、STEM、FE-SEM、X線スペクトロ測定装置(EDS)を用いて解析した。

ナノマテリアルの動態解析: 妊娠マウス及びラットにナノマテリアルを経気曝露あるいは皮下投与し、主に出生仔の脳、生殖器への移行を上記検出法により検討した。

ナノマテリアルの生体影響解析: 妊娠マウス・ラットにナノマテリアルを投与後出生した仔の脳神経系への影響について、病理組織学的解析及び網羅的遺伝子発現変動解析を行った。雄性生殖系への影響については、主に精子産生機

能、精子運動脳、精子および精巣の超微形態を観察して影響を調べた。

霊長類を用いた評価試験

妊娠アカゲザルの妊娠中～後期に、ナノマテリアルを投与し、経胎盤的に胎仔に達したナノマテリアルの脳・神経系への影響をゲノミクス解析した。また、アカゲザル新生仔および成獣を用い、ナノマテリアルを投与し、免疫機能への影響を検討した。詳細は別紙参照(中村 伸報告)。

(倫理面への配慮)

げっ歯類動物実験は、東京理科大学倫理委員会での承認を得、文部科学省「研究機関等の動物実験等の実施に関する基本指針」、東京理科大学動物実験指針を遵守して行った。ナノ粒子の安全性が不明であることから、P2 プラスレベルの実験に準じた作業手順を実施した。

サルモデルでの実験(中村 伸)

別紙参照

C. 研究成果

H22 年度成果

ルチル型酸化チタンナノ粒子及び酸化亜鉛ナノ粒子の胎仔期曝露による雄性生殖系への影響検討

ルチル型酸化チタン及びその表面加工体及び酸化亜鉛ナノ粒子(30～40nm)を皮下投与した妊娠マウスからの出生仔について、6 及び12週齢時に精巣組織のTEM観察、およびFE-SEM/EDSによる解析を行ったところ、前者ではTi粒子が検出・同定された。曝露群の精巣組織では両粒子とも極めて低いドーズで1日精子産生数の有意な低下や組織学的な

異変が認められた。

ナノマテリアル胎仔期曝露の脳神経系への影響

ナノマテリアル胎仔期曝露の6週、12週の脳の電子顕微鏡による病理学的解析により、調べたすべてのナノマテリアルが末梢血管の微小梗塞を引き起こすことが示唆された。特に詳細に調べた酸化チタンの実験系では、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。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。脳の経時的・網羅的遺伝子発現解析からも様々な異常が認められた。この結果を得るため、新しいマイクロアレイ解析法を確立した(梅澤、田井中ら)。マイクロアレイにより解析できる遺伝子にGene Ontology (GO) 及び Medical Subject Headings (MeSH) term を付与し、マイクロアレイにより得たデータを機能的に解釈し、生命現象の変化として捉えようとする方法である。本法を用いて以下のことが明らかになった。酸化チタンナノ粒子を胎仔期に曝露させた結果、出生後の発達に伴い、約16000遺伝子中、数百の遺伝子の発現変動が認められた。GOを用いた機能的解析の結果から、脳の発達・成長、ストレス応答、アポトーシスに関連する用語が、発現変動した遺伝子群に共通の機能として抽出された。さらに、MeSH termを用いた解析により、アルツハイマー病、自閉症、統合失調症などの精神神経疾患に関連する用語が有意に抽出された。

霊長類を用いた検討(中村 伸)

別紙参照

D. 考察

ナノマテリアルは妊娠中に曝露を受け、体内に取り込まれると、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こと、産仔の脳神経系や生殖系が成長の過程で強く影響を受けることなどが示唆された。金属系及び非金属系ナノマテリアルはともに妊娠母体に取り込まれると、次世代の健康に影響を及ぼすことが考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの有害性が実験的に明らかになった。我々が得た結果は、ナノマテリアルが妊娠中の動物体内に入ると、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、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ことを示唆している。以上の研究を通してナノマテリアルの健康影響評価法を確立するとともに、予防法、治療法を考える上で貴重な情報が得られた。

F. 健康危機情報

健康危険情報について、下記のとおり通報する。

(1) 健康危険情報

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、酸化亜鉛など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、特に次世代への健康影響を中心に評価手法確立の研究に取り組んできた。この過程で、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

常が認められ、脳特定の部位に集中的にアポトーシス像が認められ、何らかの影響が及ぶことが示唆された。

化粧品に汎用されるルチル型酸化チタン及びその表面加工体、さらに酸化亜鉛ナノ粒子の胎仔期曝露による雄性生殖系への影響を解析した。両チタン粒子とも初年度の実験に用いていたドーズ（500 μ g/マウス；実験期間中に投与した総量）の1/100～1/1000量で一日精子産生量が有意に低下すること、アルミナ表面加工の酸化チタンナノ粒子がより強い活性を示すことが明らかになった（投稿準備中）。

以上の結果から、ナノマテリアルは微量で有害性を示す物質であり、取り扱いには注意が必要と思われた。皮膚の透過性及び作業中での吸入曝露について十分検討する必要がある。

(2) 情報源

研究者名：Miyoko Kubo-Irie, *et al.*

タイトル：Prenatal Exposure to Low Dose Rutile-Type Titanium Dioxide Impairs Mouse Spermatogenesis (in preparation)

研究者名：Yasuko Yoshida, *et al.*

タイトル：Effect of Maternal Exposure to Zinc Oxide on Male Reproductive System in Mice. (in preparation)

研究者名：武田 健 他

タイトル：「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」
雑誌名：YAKUGAKU ZASSHI, 131 (2): 229-236, 2011.

研究者名：Ken Takeda, *et al.*

タイトル：Nanoparticles Transferred from Pregnant Mice to Their Offspring Can

Damage the Genital and Cranial Nerve Systems.

雑誌名: Journal of Health Science,

55(1) 95-102, 2009

(JHS Best Paper Award 2009)

研究者名: Midori Shimizu, *et al.*

タイトル: Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the perinatal period alters gene expression related to brain development in the mice.

雑誌名: Particle and Fibre Toxicology, 6:20-28, 2009

(Candidate for Annual Research Award, BioMed Central, London)

(3) 情報に関する評価・コメント

グレード B 情報 (時間的緊急性ということから判断した場合)

G. 研究発表

1. 論文発表

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
- ### 2. 学会発表
1. 武田 健、ナノマテリアルの胎仔期発達期毒性、シンポジウム「胎児期・発達期毒性の新展開」日本薬学会第 131 年会、静岡(3月)2011年
 2. 梅澤雅和、武田 健、遺伝子アノテーションを用いたマイクロアレイ解析法の薬学研究への応用、日本薬学会第 131 年会、静岡(3月)2011年
 3. 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
 4. 吉田泰子、内田寛樹、入江美代子、鈴木健一郎、新海雄介、押尾 茂、武田 健、金属ナノ粒子の胎仔期曝露が雄性生殖系に及ぼす影響、日本薬学会第 131 年会、安全・安心な社会を支える薬学研究の新展開 ～若手の視点からの提言～、静岡 (3月) 2011年
 5. 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
 6. 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
7. 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)
 8. Uchida H, Yoshida Y, Suzuki K, Kubo-Irie M, Shinkai Y, Oshio S, and Takeda K. Prenatal exposure to rutile type and its surface-coated titanium dioxide impairs spermatogenesis in mice. Nanosafe 2010. Nov 17, 2010 (Grenoble, France)
 9. 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
 10. 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
 11. 大藪泰斗、梅澤雅和、久藤清香、内山真理子、井原智美、菅又昌雄、武田 健、酸化チタンナノ粒子の胎仔期曝露による腎臓での遺伝子発現変動、フォーラム2010：衛生薬学・環境トキシコロジー、東京(9月)2010年
 12. 吉田泰子、内田寛樹、入江美代子、鈴木健一郎、新海雄介、押尾 茂、武田 健、化粧品基材金属ナノ粒子の胎仔期曝露が雄性生殖系に及ぼす影響、フォーラム2010 衛生薬学・環境トキシコロジー 2010年9月9日(東京)
 13. 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
 14. 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
 15. 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
 16. 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
 17. Umezawa M, Kudo S, Yanagita S, Shinkai Y, Niki R, Oyabu T, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. Maternal exposure to carbon

- black increases collagen type VIII expression in kidney of offspring. *Nanotoxicology* 2010. Edinburgh, Scotland. (6月) 2010年
18. 石橋 伶、新海雄介、入江美代子、田畑真佐子、武田 健、化粧品素材酸化チタンナノ粒子のケラチノサイトへの取り込みに関する研究、日本薬学会 130 年会、岡山 (3月) 2010年
 19. 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、菅又昌雄、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
3. 招待講演 (武田 健)
1. 薬学会学術貢献賞記念講演 (2011年3月) 静岡 「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
 2. 知の市場 2011年1月13日「ナノ材料の次世代健康影響評価とその対策」
 3. RIST バイオ領域ワークショップ 2010年11月30日 (野田) 「ナノマテリアルの次世代健康影響」
 4. 2010TUS (東京理科大学総合研究機構主催) フォーラム 2010年11月2日 (秋葉原) 「ナノ粒子の健康科学 ～次世代健康影響」
 5. 第20回環境公害セミナー 2010年9月18日 (東京) 「ディーゼル排ガスに含まれるナノ粒子の健康影響～特に次世代への健康影響について」
6. 東京理科大学総合研究機構フォーラム 2010年8月30日 (東京) 「ナノ粒子の健康科学—特に次世代健康影響に関する研究」
 7. 機会学会イブニングセミナー(第127回) 2010年5月26日 (東京) 「ナノテクノロジーの光と陰～産業の健全な発展と安全安心な社会をつくるために」
 8. 薬理学連合特別講演2010年5月11日 (東京) 「ナノ素材の有用性と毒性・安全評価上の問題」
 9. 長寿・健康イノベーション研究会2010年4月2日 (東京) 「ナノマテリアルの次世代健康影響」
- H. 知的財産権の出願・登録状況
なし

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

平成 22 年度分担研究報告書

霊長類に対するナノマテリアルの影響評価

分担研究者(グループ長):

中村 伸(NPO 法人プライメイト・アゴラ バイオメディカル研究所、所長)

研究要旨:本年度の研究では経皮浸透したナノマテリアルの生体影響を明らかにする目的で、サルモデルを駆使したゲノミクス評価試験を実施した。皮内投与したナノマテリアルはdendritic cell/macrophageに取り込まれ、macrophageをchitinaseおよびCCL18遺伝子高発現性のtype II化してその免疫機能を改変し、アレルギー、感染症およびガンなどの疾患感受性を高める事が示唆された。しかも、皮内投与したナノマテリアルは、近傍リンパ節に3年以上も残留してmacrophageの免疫機能に長期影響を与えることも明らかにされた。

分担研究者：光永総子（NPO プライメイト・アゴラ バイオメディカル研究所、部長

A.研究目的

本研究ではサルモデルを駆使してヒトに外挿可能なナノマテリアルの生体影響とその評価手法に関する研究を展開する。

本年度の研究では、ヒトモデルとしてマカクサル(カニクイザル、アカゲザル、ニホンザル)を用い、経皮吸収されたナノマテリアルが引き起こす免疫系への影響とその分子基盤について、RNA ゲノミクス解析、組織病理解析、電顕超微形態観察を駆使して検討した。

同時に本年度の研究を基に、ナノマテリアル生体影響評価法の開発を目指した。

B.研究方法

ゲノミクス解析:

主にアカゲザル新生仔および成獣を用

い、それらの背部皮内にナノマテリアルとしてディーゼル排気ナノ粒子 (DEP)、非金属ナノ粒子(カーボンブラック:CB)、金属ナノ粒子(酸化チタン:TiO₂)、および蛍光ナノサイズ Polystyrene (PS)を、7～10 日間隔で投与し、1ヶ月～3年後に投与部位、リンパ節、主要組織の試料を採取し、RNA 抽出後、機能遺伝子の発現変化を DNA チップおよび Real time PCR で解析した。その結果を基に、ナノマテリアルが及ぼす生体影響の特徴や分子機作を指標に、生体影響評価を検討した。

組織解析:

投与部位、近傍リンパ節などの固定標本を用い、光学顕微鏡での組織病理学・免疫組織学的解析、電子顕微鏡での超微形態学的観察を実施し、ナノマテリアルの組織・細胞局在性や組織障害性、細胞毒性等を検討した。加えて、分析電子顕微鏡を駆使して細胞内に取込まれたナノマテリアルの同定も試みた。

倫理面への配慮:

動物実験に伴う倫理・福祉については、機関の動物委員会の承認を得て実施した。

C. 研究成果

経皮浸透ナノマテリアルの体内動態、排出、組織・細胞局在、およびリンパ節集積と障害:

i) 全身分布、排出:

蛍光ナノサイズPolystyrene (PS)を用いた蛍光顕微鏡解析で皮内投与されたナノマテリアルの体内動態を調べると、一定部分は血流を介して全身に移行し、主要組織の細網内皮系（異物貪食・処理細胞系）に取り込まれ、分解・処理され、一部は肝細胞に取り込まれ胆汁を経由して糞中へ、さらに一部は腎髄質間質に分布し、同部尿細管の基底膜、上皮細胞質を通過し、尿中に排泄される可能性が示唆された。なお、脳（大脳・小脳）にはナノマテリアルが観察されず、脳関門（BBB）を越えて脳・神経細胞への移行は認められなかった。

ii) 組織・細胞局在およびリンパ節集積と障害:

サルの背部皮内投与されたナノマテリアル (DEP, CB, TiO₂, PS) は、4 種共通して投与部位に浸潤する食細胞に選択的に取り込まれた。この食細胞は、顕微鏡・電顕での細胞形態観察、免疫染色 CD14 陽性から、dendritic cell/macrophage (DC/MP) と判定した。分析電顕から DC/MP 内の集積沈着物が投与したナノマテリアルである事を、分析電顕で確認した。さらに、蛍光顕微鏡による免疫組織解析から、ナノマテリアルが細胞内顆粒のリソソームに特異的に集積している事が明らかになった。

皮内浸透したナノマテリアルは、投与

局所からリンパ流に乗って近傍リンパ節（背部皮内投与では腋下リンパ節）に集積し、そこでの DC/MP 浸潤と取り込み、リンパ球領域の増殖・肥大など、リンパ節の組織異常と機能障害が窺われた。

特に注目すべき点として、投与皮内局所および近傍リンパ節での上記イベントが 3 年以上も持続し、経皮浸透したナノマテリアルの影響が長期にわたる事が示唆された。

ナノマテリアルの生体影響の分子基盤解析:

皮内投与されたナノマテリアルが集積する皮膚局所および近傍リンパ節（腋下リンパ節）での機能遺伝子の発現性を DNA アレイおよび Real time PCR で調べると、CCL-18（霊長類のみに発現）や chitinase など機能変換した Type II macrophage で特異的に発現する遺伝子の発現亢進が見られた。加えて、apoptosis 阻害に関わる遺伝子群も強く発現誘導され、組織学的に観察したリンパ組織の増殖・肥大を裏付ける結果を得た。

これらの結果は、macrophage がナノマテリアルの取り込み並びにリソソーム蓄積によって細胞性状と機能を変化させ、いわゆる Type II 型 に phenotype 変換し、その細胞性免疫機能が低下している事を示唆している。

ナノマテリアルの長期影響:

ライフスパンの長いサルモデルを利用した事でナノマテリアルの長期影響が明らかになった。投与 3 年後の皮内局所および近傍リンパ節においても上記と同様な CCL-18 および chitinase などの発現亢進が認められた。これらの遺伝子発現特性は組織学的知見とも一致し、ナノマ

テリアルが macrophage の type II 化とその細胞機能改変(細胞性免疫機能低下)を惹起し、その影響が長期にわたり持続することが示された。

ナノマテリアルの生体影響評価系の検討:

ナノマテリアルを皮内投与部位では、CCL-18 や chitinase 遺伝子の発現亢進は微量(0.1mg/ml)でも認められ、一定の量まで用量依存的な発現亢進が見られた。CCL-18 はげっ歯類には発現せず霊長類特異的である事から、サルモデルでの背部皮内投与と CCL-18・chitinase 遺伝子発現解析を組み合わせた、新規なナノマテリアル生体影響評価法が構築出来た。

この評価系を利用して、化粧品に汎用されるナノサイズ酸化亜鉛(ZnO)の生体影響を調べると、ZnO は CCL-18 や chitinase 遺伝子の発現誘導作用を全く示さず apoptosis 惹起性で、DEP/CB/TiO 等とは異なる生体作用を示すナノマテリアルである事が明らかになった。

D. 考察

化粧品等に含まれるナノマテリアルが経皮浸透した際の生体影響については、これまで研究・調査の取り組みが遅れていた。本研究では、従来のラット・マウスを用いた評価試験とは異なり、ゲノム構造などの医生物学的特性がヒトに近縁なサルモデルを駆使したナノマテリアルの生体影響解析を進め、ヒトに外挿可能な知見・情報の蓄積を図った。

本年度の研究では、ヒトモデルとしてマカサルを用い、経皮吸収を想定した皮内投与ナノマテリアルが引き起こす生体影響とその分子基盤について、RNA ゲノミクス解析、組織病理解析、電顕超

微形態観察を駆使して検討した。また、皮内投与ナノマテリアルの体内動態や組織集積、排出についても検討した。

同時に本年度の研究を基に、ナノマテリアル生体影響評価法の開発を目指した。

従来から DEP 等が喘息・アレルギー等の免疫疾患に関わることが示唆されていたが、そのメカニズムに関しては明らかでなかった。本研究では、4 種のナノマテリアル(DEP, CB, TiO₂, PS)が共通して免疫担当細胞の dendritic cell/macrophage (DC/MP)に取り込まれ、MP を Type II 化し、その細胞性免疫機能を低下させる可能性が示唆された。ことに、今回の結果では、ナノマテリアルを取り込んだ MP は、そのライソソーム顆粒にナノマテリアルを集積し、先天性リソソーム疾患のゴーシェ病に見られる CCL-18 および chitinase 高発現性に細胞 phenotype が変化する分子機序も明らかにされた。

MP の細胞性免疫応答は、感染症、アレルギー・関連免疫疾患あるいはガン等種々の生体防御に関わることから、ナノマテリアルの生体影響として MP の細胞機能・性状に影響して Type II 化誘導することで、生体防御ポテンシャルの減弱に繋がるリスクが示唆される。しかも、このナノマテリアルの影響は投与後 3 年間も持続することが明らかになり、その長期影響が懸念される。

これらの知見は、ナノマテリアルのリスク評価として先行研究にも見られず、その重要性から今後の更なる検証が必要となる。

E. 結論

サルモデルを用いた皮内投与ナノマテリアルの生体影響として、MP において

選択的に取込まれ Type II 化への細胞機能・性状変換が誘起され、MP の担う細胞性免疫機能の低下が示唆された。しかも、この作用は投与後 3 年以上も持続し、ナノマテリアルの及ぼす長期影響が明らかにされた。

F.研究発表

1. Nakamura S, Mitsunaga F, Ueiwa F, Sugamata M, Takeda K: Effect of Nanomaterials to Immune System in Monkeys: Potent Induction of Alternatively Activated Macrophages, ICI 2010 (Kobe), Int. Immunol, 2:Suppl.pp136-137(2010).
2. Nakamura S, Mitsunaga F, Ueiwa F, Sugamata M, Takeda K: Genomics Assessment of Nanomaterials in Monkeys : Effect in Alteration of Macrophage Function and Immune System, 4th AFLAS Congress Meeting (Taipei), Abstract pp131 (2010).
3. Takenaka A, Nakamura S, Mitsunaga F, Inoue-Murayama M, Uono T, Suryobroto B: Human Speceific Energy-Consummption Type SNP of Obesty Genes Occurred after Divergence from Apes, XXIIIth IPS Congress 2010 (Kyoto),Primate Res. 26:Suppl.pp305 (2010).

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
武田健、鈴木健一郎、入江美代子、押尾茂、井原智美、菅又昌雄	「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—」	亙理文夫	ナノ材料のリスク評価と安全性対策	フロンティア出版	日本	2010	54-59

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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	「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	2011
Takahashi, Y., Mizuo, K., Shinkai, Y., Oshio, S., <u>Takeda, K.</u>	Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice.	J.Toxicol. Sci.	35(5)	749-756	2010
Suzuki, T., Oshio, S., Iwata, M., Saburi, H., Odagiri, T., Udagawa, T., Sugawara, I., Umezawa, M., <u>Takeda, K.</u>	In utero exposure to a low concentration of diesel exhaust affects spontaneous locomotor activity and monoaminergic system in male mice.	Part.Fibre Toxicol.	7	1-7	2010

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

武田 健,^{*,a,b} 新海雄介,^b 鈴木健一郎,^b 柳田信也,^b 梅澤雅和,^a
横田 理,^a 田井中 均,^b 押尾 茂,^{b,c} 井原智美,^d 菅又昌雄^d

Health Effects of Nanomaterials on Next Generation

Ken TAKEDA,^{*,a,b} Yusuke SHINKAI,^b Ken-ichiro SUZUKI,^b Shinya YANAGITA,^b
Masakazu UMEZAWA,^a Satoshi YOKOTA,^a Hitoshi TAINAKA,^b Shigeru OSHIO,^{b,c}
Tomomi IHARA,^d and Masao SUGAMATA^d

^aDepartment of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, ^bResearch Center for Health Sciences of Nanoparticles, Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan, ^cDepartment of Hygiene Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Ohu University, 31-1 Sankakudou, Tomita, Koriyama, Fukushima 963-8611, Japan, and ^dDepartment of Pathology, Tochigi Institute of Clinical Pathology, 2308-3 Minamiakatsuka, Nogi, Shimotsuga-gun, Tochigi 329-0112, Japan

(Received September 3, 2010)

In order to discuss the health effects of nanomaterials, we cannot disregard the research on the health effects of airborne particulates. It is said that many of the fine or ultrafine particles in airborne particulates originate from diesel vehicles in metropolitan areas. The results of not only animal experiments but many epidemiologic surveys and volunteer intervention experiments in humans are reported on the health effects of particles. Although the health effects of the particulate matter particle sizes below 10 μm (PM10) were investigated in the initial studies, recently even smaller particles have come to be regarded as questionable and research of the health effects of the minute particulate matter below 2.5 μm (PM2.5) has been done. However, our recent study about maternal exposure to diesel exhaust suggests that health effect study of PM0.1, particles below 0.1 μm (100 nm), namely nanoparticles, is necessary from now on. We are proceeding with the study of the health effects of various types of intentionally produced nanomaterials such as carbon black, carbon nanotube, fullerene and titanium dioxide, examining in particular their influence on next generation. Although there are differences in the sites affected and the seriousness of the damage, basically similar findings to DEPs mentioned above are being discovered in research on nanomaterials. Regardless of dosage and administration method, such as inhalation, endotracheal administration, nasal drip and subcutaneous administration, once nanomaterials enter the bloodstream of a pregnant mother mouse, they move to the offspring and have effects on them. The effects may appear as various symptoms in the process of growth after birth, and can sometimes lead to the onset and aggravation of serious diseases.

Key words—nanomaterial; prenatal exposure; diesel exhaust particle; titanium dioxide; next generation; health effect

1. はじめに

都市圏では、浮遊粒子状物質の半分近くがディーゼル車由来といわれている。われわれは、そのディーゼル車が排出するガス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。その結果、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することや、脳内に様々な異変が認められることを見出した。¹⁾

一方、ナノテクノロジーは産業の基盤技術として期待が寄せられており、フラーレン、カーボンナノチューブなど様々なナノ材料の開発と製造、その応用が進められている。ナノテクノロジーは極めて広い裾野を持った技術であり、それがもたらすメリッ

^a東京理科大学薬学部, ^b同ナノ粒子健康科学研究センター (〒278-8510 千葉県野田市山崎 2641), ^c奥羽大学薬学部 (〒963-8611 福島県郡山市富田町字三角堂 31-1), ^d栃木臨床病理研究所 (〒329-0112 栃木県下都賀郡野木町南赤塚篠山 2308-3)

*e-mail: takedak@rs.noda.tus.ac.jp

本総説は、日本薬学会第 130 年会シンポジウム S18 で発表したものを中心に記述したものである。

トは計りしれない。それだけに不確実な要素、特に健康に及ぼす影響という不安を取り除いておくことが重要な課題と思われる。われわれは、排ガス微粒子以外に炭素系ナノマテリアル（カーボンブラック、カーボンナノチューブ、フラーレン）や金属系ナノ粒子（酸化チタン、酸化亜鉛）など意図的、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についても研究してきた。われわれ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する。

2. 大気中に浮遊する微粒子の健康影響—PM10とPM2.5

浮遊粒子状物質 (Suspended Particle Matter; SPM) は、粒径が $10 \mu\text{m}$ 以下の粒子状物質であるが、これは肺泡に沈着するだけでなく血流にのりものがある。そのため、現在までに SPM の健康に及ぼす影響としては肺がだけでなく、喘息²⁾や花粉症³⁾などのアレルギー性疾患、不整脈の出現、血圧への影響といった循環器系疾患に係わる実験や調査結果が報告されている。アメリカの大都市圏及び首都圏の 20 地域における調査では、浮遊粒子状物質濃度が $10 \mu\text{g}/\text{m}^3$ 上昇する毎に呼吸器疾患及び心臓循環器疾患による死亡率が 0.5% 増加するという結果もある。⁴⁾ Kunzli らは種々の調査データを基に浮遊粒子状物質による健康影響の実態を調べ、慢性気管支炎や喘息発作など疾患別に浮遊粒子状物質のリスクを算出している。⁵⁾

近年ではさら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 (PM2.5) の健康影響の研究も行われた。その結果、主として欧米の疫学研究から、以下のことが明らかになっている。⁶⁾

1) PM2.5 あるいは PM10 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相関性が認められている。

2) 短期曝露により、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相関性が報告されている。さらに、心筋梗塞、慢性閉塞性肺疾患等、個別の疾患による死亡との相関性が認められている。

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

は死に至るということが想定されている。

4) PM2.5 あるいは PM10 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。しかし、真の因果関係は今のところ不明である。

3. 新たに登場した超微小粒子 (ナノ粒子) の健康影響—PM0.1 の研究の必要性

大気汚染による曝露は、すべての人々に及ぼし得るものであり、地域により、また、職業によってはさらに高濃度に曝露される危険性が考えられる。 $2.5 \mu\text{m}$ 以下の微小粒子には多量のナノ粒子が含まれていることから、新たにナノ粒子の健康影響が注目される。

われわれ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 (CREST 2000-2005 年, 武田)。この研究の過程で排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、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。¹⁾ 排ガス中のナノ粒子は、母体の胎盤を通過して胎仔に移行し、脳血管周囲顆粒細胞に取り込まれたものと考えられる。最近、Wick らはヒト胎盤の *ex vivo* 系で異なるサイズの蛍光ナノ粒子を用い、直径 240nm 以下のナノ粒子は胎盤を通過することを示した。これは私たちの結果を裏付けている。⁷⁾

4. ディーゼル排ガス中の超微小粒子 (ナノ粒子) の性状

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 60nm 前後)、高速運転時に大きな (個数ピークは 110nm 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、金属などの様々な化学物質が

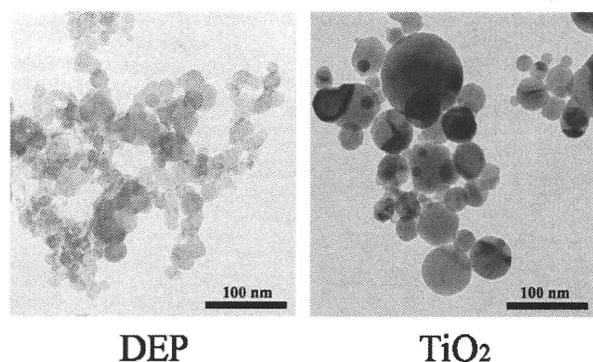


Fig. 1. Transmission Electron Microscopy Image of Diesel Exhaust Particle (DEP) and Titanium Dioxide (TiO₂) Particles

Scale bar, 100 nm.

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。^{8,9)} 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 (Fig. 1 参照) 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。特に、粒径 5-100 nm の粒子は、質量では全体のほんのわずかに過ぎないが個数では大部分を占める。¹⁰⁾ 化学成分としては、元素炭素を核に持ち、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。¹¹⁾ その由来は、未燃燃料や潤滑油の不完全燃焼又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、¹²⁾ 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。¹¹⁾

5. ディーゼル排ガス胎仔期曝露の脳神経系への影響

5-1. 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。

以上のことから、DE の胎仔期曝露の脳神経系への影響として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。¹⁾

5-2. 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、ドーパミンなど神経伝達物質として働くモノアミンの代謝に変化がみられ、自発運動量など行動試験にも異常が認められた。^{13,14)} 以上の結果を基に、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。以上の研究は大気中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影響を及ぼすことを示唆している。

6. ディーゼル排ガス胎仔期曝露の生殖系への影響

われわれは、ディーゼル排ガス胎仔期曝露の実験系において、環境基準値より高い濃度という条件ではあるが、雄性生殖、¹⁵⁻¹⁸⁾ 雌性生殖、¹⁹⁾ 胎盤、²⁰⁾ などに影響が及ぶこと、また、排ガス曝露はモデル実験系として開発した子宮内膜症を増悪化させることを明らかにした。²¹⁾

出生した雄マウスでは、血中テストステロン値が変動し、一日精子産生量の低下、精子運動量の低下、精子の正常形態率の低下、精巣組織像の悪化、精巣特異的遺伝子の変動などが認められた。また、減数分裂期における分裂異常によって生じるものと

考えられている多核巨細胞が認められた。動物種や曝露濃度により影響は異なるものの、DE曝露は雄性生殖系に有害な影響を及ぼすこと、また、その影響は次世代に及ぶことが示された。妊娠能についての試験はまだ行われていないが、曝露群では精子運動能、正常形態率も落ちていることから、影響が出る可能性が予想される。

7. 意図的に生産されるナノマテリアルの健康影響

7-1. 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。特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最も多い。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既に汎用されている。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等、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。例えば、化学的な反応性が高まる。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たりの表面積が大きくなる。この比表面積の増大が化学的反応性を高めることになっている。その他、小さくなることで多くの物理化学的変化が知られているが、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。

7-2. 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。²²⁾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、様々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。²³⁾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。

7-3. 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、統一の見解が得られている訳ではない。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の粒子は大半が肝臓（93.9%）に存在し、ごくわずかに脾臓（2.2%）に検出されたが、1.4 nmの粒子は肝臓（47.5%）腎臓（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。²⁴⁾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臓、脾臓に検出されたが、10 nmの粒子は様々な組織、血液、肝臓、脾臓、腎臓、精巣、胸腺、心臓、肺、脳にも検出された。²⁵⁾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、15 nmの粒子が投与後5分で血液や各種組織において濃度が上昇したが、脳には検出されることが示された。酸化チタンは肝臓に最も多く検出され、1ヵ月で30%しか減少しなかった。²⁶⁾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。²⁷⁾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。

8. 酸化チタンナノ粒子胎仔期曝露の健康影響

8-1. 酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子の汎用

TiO₂にはアナターゼ型、ルチル型、ブルッカイト型の主に3種類の結晶構造が存在する。最も広く用いられているアナターゼ型のTiO₂は光触媒作用が強く、このとき産生されるスーパーオキシドや過酸化水素、ヒドロキシラジカルなど活性酸素が細胞毒性を示すことが報告されている。^{28,29)}この作用を利用して環境浄化や殺菌、抗菌などの目的でナノ粒子が実用化されている。ルチル型TiO₂は、これまで安全だと考えられてきたため、化粧品のほかに医薬品や食品添加物としても利用されている。これは白色顔料、食品着色剤の成分であり、大きなサイズの粒子では細胞に不活性、あるいは人体にほとんど影響がないことが確認され、汎用されてきた。また、ナノサイズ化することにより紫外線分散作用を獲得し、

受けた光の反射の度合いを低下させるために仕上がりが白くならず透明度が増すこと、また粒子サイズが小さいためにさらっとした塗り心地になることなどから、日焼け止めやファンデーションに利用されている。

8-2. 酸化チタンナノ粒子の取り込み これまでの研究において、 TiO_2 が皮膚を透過することを明確に示す報告はなく、皮膚の表面や角質層に留まるとされている。³⁰⁻³²⁾ しかし、化粧品は長年にわたって人体に直接繰り返し塗布されること、粒子のサイズがナノスケールであること、表面の物理化学的性質により皮膚のバリア機構に対する透過性が変わることなどから、血液やリンパ液を介して全身を巡り、蓄積し、影響を及ぼす可能性などについてさらに検証されるべきである。また、基材や界面活性剤等の添加物との組み合わせにより粒子の挙動が変化する可能性もある。さらに、アトピー性皮膚炎や紫外線照射などにより皮膚が傷ついている場合や炎症を起こしている場合には角質層の透過性が増大していることが報告されている。^{33,34)} そこで、今後できるだけ多くの可能性を検証しておく必要がある。一方、酸化チタンナノ粒子が作業環境中あるいはその他の環境下において浮遊する場合は、呼吸から取り込まれる可能性があり、呼吸器からの取り込みの影響を確認することも重要である。

8-3. 成獣における酸化チタンの脳への移行 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。³⁵⁾ 一方、Wang らは、マウス成獣の鼻腔に酸化チタン（粒径 80 nm

ルチル型、粒径 155 nm アナターゼ型）を大量に添付すると嗅球を介して脳全体に移行し、特に海馬に蓄積することを観察した。³⁶⁾ いずれも、ナノ粒子は鼻腔から嗅覚神経の軸索輸送で脳内にわずかに移行したと考えられている。

Fabian らは、ラットに酸化チタンナノ粒子（粒径 20-30 nm）を静脈投与し、酸化チタンが肝臓、肺、脾臓、腎臓の順に高濃度に検出される一方で、脳、リンパ液には検出されないことを報告している。肺と腎臓は 14 日間でコントロールレベルに濃度が低下したが、肝臓は 28 日後も高レベルを維持し、脾臓はわずかに減少した。³⁷⁾

以上、成獣では脳血液関門があり、血液を介しては脳には検出できるほどの酸化チタンは移行しないものと考えられている。

8-4. 酸化チタンナノ粒子の妊娠期母獣から仔への移行 われわれは、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た状態で残ること、病理学的に、また、機能的に様々な影響が認められることを世界に先駆けて明らかにした (Fig. 2)。³⁸⁾

投与条件：妊娠 ICR 系マウスを使用した。アナターゼ型の TiO_2 (Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO, USA；粒子径 25-70 nm, (Fig. 1 参照)) を 1 mg/ml となるように調製し、ソニケーターで攪拌して分散させた。溶媒は、生理食塩水に分散媒として Tween-80 を 0.05% となるように加えて調製した。この原液を 10 分の 1 ずつ 1000 分の 1 まで段階希釈した。調製した TiO_2 分散液を妊娠 6, 9, 12, 15 日目に各々 0.1 ml (TiO_2 投与量 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) 皮下投与した。対照群には溶媒を同量皮下投与した。

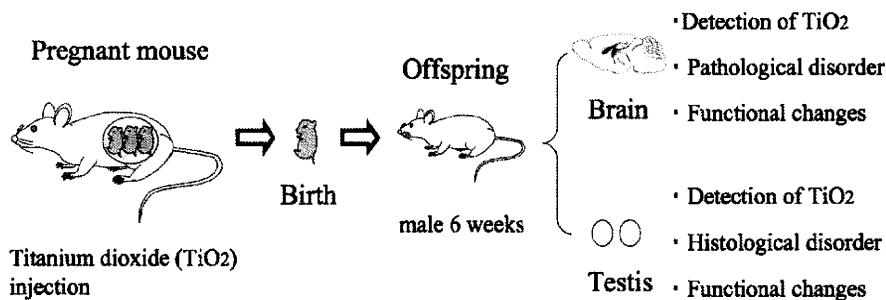


Fig. 2. Maternal Exposure to TiO_2 Nanoparticle Affects the Central Nervous System and Male Reproductive System

Mice were maternally exposed to TiO_2 nanoparticles during pregnancy. After birth, sampling of the testis, brain, and epididymis of offspring took place at 6 weeks after birth. The results showed that nanoparticles were detected in brain and testis, and that damaged cells and disrupted normal function of the brain and male genitals were observed.

酸化チタンの検出：われわれは、妊娠期に投与したナノ粒子が、産仔に移行するかを検討した。血液脳関門、精巣関門などバリア機能が未発達な胎仔期にナノ粒子を曝露すると、ナノ粒子が胎盤を経由して母獣から仔に移行し、さらに脳や精巣へ移行すること、それぞれの機能に影響を及ぼすことを示唆する結果を得た。妊娠期のマウスに酸化チタンナノ粒子を皮下投与し、産仔6週齢時に精巣組織の透過型電子顕微鏡 (TEM) 観察及び走査型電子顕微鏡-X線スペクトル測定装置 (FE-SEM/EDS) による解析を行ったところ、脳(大脳皮質、海馬、嗅球など)や精巣の細胞(ライディヒ、セルトリ、精子細胞など)に酸化チタン粒子が検出・同定された。

8-5. 酸化チタンナノ粒子の胎仔期曝露による脳神経系への影響 ナノ粒子曝露群の脳の各部位について病理組織学的検討を行ったところ、6週齢雄の脳末梢血管に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-3 (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。この結果、 TiO_2 を妊娠マウスに投与すると TiO_2 は胎盤を経由して胎仔に移行し、未発達な血液脳関門を通過し、脳各部位に残ること、脳の機能に影響を及ぼすことが示唆された。³⁸⁾

ドーパミンやセロトニンなど神経伝達物質のモノアミン系の代謝異常も認められた。³⁹⁾ さらに、網羅的・経時的遺伝子発現解析の結果においても様々な異常が認められた。⁴⁰⁾

8-6. 酸化チタンナノ粒子胎仔期曝露による雄性生殖系への影響 酸化チタンナノ粒子曝露群の産仔6週齢の精巣組織染色の観察では精細管を構成する細胞に異常が認められた。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。われわれのその後の研究において、酸化チタンはアナターゼ型以外にも化粧品素材として汎用されるルチル型及びその表面加工粒子においても雄性生殖系に対する影響が認められた。それらの影響の一部は1000分の1の希釈溶液を用いても認められた。³⁸⁾

9. 新しい網羅的遺伝子発現解析法 (GO 法, MeSH 法) の確立とナノ粒子の健康影響研究への応用

われわれは、新しいマイクロアレイ解析法を確立

した (梅澤, 田井中ら),⁴⁰⁾ マイクロアレイにより解析できる遺伝子に Gene Ontology (GO) 及び Medical Subject Headings (MeSH) term を付与し、マイクロアレイにより得たデータを機能的に解釈し生命現象の変化として捉えようとする方法である。本法を用いて以下のことが明らかになった。酸化チタンナノ粒子を胎仔期に曝露させた結果、出生後の発達に伴い、約16000遺伝子中、数百の遺伝子の発現変動が認められた。GOを用いた機能的解析の結果から、脳の発達・成長、ストレス応答、アポトーシスに関連する用語が、発現変動した遺伝子群に共通の機能として抽出された。さらに、MeSH termを用いた解析により、アルツハイマー病、自閉症、統合失調症などの精神神経疾患に関連する用語が有意に抽出された。

この研究で用いたマイクロアレイ法は、非常に多くの遺伝子の発現変動を一度に解析することができ、生化学実験を伴う多くの研究分野において有効な解析手段である。しかし、膨大なデータが一度に得られる一方で、そこにどのような重要な意味が含まれているのかを読み取る手段は未確立であった。この研究により示した遺伝子発現データは、まだ直接的な健康影響と解釈することはできないが、解析した組織でどのような遺伝子発現変動が生じているか示せたことに意義があった。特に、MeSHを用いたことによりGOのみを用いた解析では得られない化合物 (生体高分子)、組織 (解剖学的情報) や疾患についての情報を得ることができた。今後、この手法が、マイクロアレイデータから機能的な意味を抽出する手法の幅を広げ、生理学及び病理学研究に大きく貢献することが期待される。

10. 考察

われわれは動物実験を通して以下の結論を得た。光触媒や化粧品に汎用される酸化チタンナノ粒子は、動物体内に入ると、血流にのり、全身の組織・臓器に到達する。また、妊娠した母から胎盤を介して仔に移行し、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得る。吸入、気管内投与、点鼻投与、皮下投与などの投与方法にかかわらず妊娠した母マウスの血流にナノマテリアルが入れば仔に移行し、次世代の個体に影響を及ぼす。この影響は生まれてから成長する過程で様々な形として現れ、それらの少なくとも一部は疾患の

発症や増悪化につながる恐れがあると考えられる。皮膚に塗布された化粧品中のナノ粒子や作業現場等で浮遊するナノ粒子がどのような機構でどの程度血中に移行するのかを詳細に検討する必要がある、これが今後の課題である。

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。⁴¹⁾ 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。これは、胎児期や乳幼児期に成人病発症の素因が形成され、出生後の環境要因によって疾病にかかり易くなるという例を示している。胎児期に酸化チタンなど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始め生殖系やその他の臓器で様々な症状が現れるというわれわれの研究結果は、彼の仮説を支持している。⁴²⁾ 次世代の仔にはわずかなナノ粒子しか移行していないはずであるが、なぜ極微量のナノマテリアルがこのような大きな影響を長期間にわたって及ぼすのかは現在のところ不明である。この影響発現の分子機構の解明が待たれる。

11. 結論

上記の結果及びその後の研究結果から以下のことが示唆される。ナノマテリアルは吸入、気管内、点鼻、皮下など投与方法にかか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、それらはときとして、ある種の疾患の発症、増悪化につながる恐れがある。

12. おわりに

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、予防対策は立て易くなる。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、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、特に次世代への健康影響を明確にして、十分な対策を構築することが極めて重要な課題と思われる。

本研究で行った動物実験は、東京理科大学倫理委

員会、動物実験委員会での承認を得て実施している。文部科学省「研究機関等の動物実験等の実施に関する基本指針」、東京理科大学動物実験指針を遵守して行った。

謝辞 本研究は標記著者以外に多くの研究者の協力の下に行われてきた。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。

REFERENCES

- 1) Sugamata M., Ihara T., Takano H., Oshio S., Takeda K., *J. Health Sci.*, **52**, 82–84 (2006).
- 2) Takano H., Yoshikawa T., Ichinose T., Miyabara Y., Imaoka K., Sagai M., *Am. J. Respir. Crit. Care Med.*, **156**, 36–42 (1997).
- 3) Fujieda S., Diaz-Sanchez D., Saxon A., *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, **19**, 507–512 (1998).
- 4) Samet J. M., Dominici F., Curriero F. C., Coursac I., Zeger S. L., *N. Engl. J. Med.*, **343**, 1742–1749 (2000).
- 5) Künzli N., Kaiser R., Medina S., Studnicka M., Chanel O., Filliger P., Herry M., Horak F. Jr., Puybonnieux-Texier V., Quénel P., Schneider J., Seethaler R., Vergnaud J. C., Sommer H., *Lancet*, **356**, 795–801 (2000).
- 6) Ministry of the Environment: <http://www.env.go.jp/council/07air/r077-01.pdf>, cited 11 December, 2010.
- 7) Wick P., Malek A., Manser P., Meili D., Maeder-Althaus X., Diener L., Diener P. A., Zisch A., Krug H. F., von Mandach U., *Environ. Health Perspect.*, **118**, 432–436 (2010).
- 8) Suzuki K., Komatsu T., Kubo-Irie M., Tabata M., Takeda K., Nihei Y., *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1139–1142 (2008).
- 9) Fukuhara N., Suzuki K., Takeda K., Nihei Y., *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1538–1540 (2008).
- 10) Nakajima T., Mizohata A., *Jidousha Kenkyu*, **31**, 151–154 (2009).
- 11) Suzuki K., Komatsu T., Kubo-Irie M., Tabata M., Takeda K., Nihei Y., *Appl. Surf. Sci.*, **255**, 1139–1142 (2008).
- 12) Komatsu T., Tabata M., Kubo-Irie M., Shimizu T., Suzuki K., Nihei Y., Takeda K., *Toxicol. in Vitro*, **22**, 1825–1831 (2008).
- 13) Yokota S., Mizuo K., Moriya N., Oshio S., Sugawara I., Takeda K., *Neurosci. Lett.*, **449**,