

23. 石塚大祐、境恵二郎、内田勝美、岩田展幸、矢島博文、山本寛、FEL 照射による半導体 SWNT のカイラリティ制御、第 35 回フラーレン・ナノチューブ総合シンポジウム、東京工業大学（東京）2008 年 8 月 28 日
24. Tajima,I. Tanemura,A. Luculescu,C.R. Uchida,K. Ishii,T. and Yajima,H. Selective Separation Methods for Metallic and Semiconducting Single-walled Carbon Nanotube in Aqueous Solution with High-fluence Pulsed OPO Laser NT08: Ninth International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Le Corum, Montpellier, France, 2008 年 6 月 29 日
25. Iwata,N. Ishidula,D. Sonomura,T. Sakai,K. Watanabe,N. Uchida,K. Yajima,H. and Yamamoto,H. Growth of single-walled carbon nanotubes with dipped (Fe,Co)Mo and (Fe,Co)Pt catalysts and the influence of the free electron laser irradiation. NT08: Ninth International Conference on the Science and Application of Nanotubes, Le Corum, Montpellier, France, 2008 年 6 月 29 日

盛口敬一

1. 盛口敬一、福田光男、前田初彦、野口俊英、大野紀和、エネルギーフィルター電子顕微鏡におけるセリウムとリンの元素分析と試料切片の厚さ 日本顕微鏡学会 第66回学術講演会(名古屋)2010年5月24日
2. 盛口敬一、福田光男、野口俊英、大野紀和、Alkaline phosphatase(ALPase)活性検出におけるクエン酸鉛とセリウム塩との違い 医学生物学電子顕微鏡技術学会第26回学術講演会および総会（別府大分）2010年5月16日
3. 盛口敬一、長谷川義明、樋口直也、村上幸孝、吉村文信、中村 洋、大野紀和、*Tannerella forsythensis* の表層蛋白質に関する免疫組織EF-TEMによるN観察における凍結置換法、化学固定法の違い 医学生物学電子顕微鏡技術学会第26回学術講演会および総会（別府、大分）2010年5月15日
4. 盛口敬一、前田初彦、大野紀和、ラット腹腔内細胞の食事に伴う過酸化水素生成に関するEDS, EELS観察、日本解剖学会第69回中部支部学術集会（浜松、静岡）2009年10月11日
5. 盛口敬一、高橋好文、河合達志、エネルギーフィルター電子顕微鏡によるバナジウムプレート上でのヒト多形核白血球の過酸化水素生成 平成21年度秋期第54回日本歯科理工学会学術講演会（鹿児島）2009年10月2日
6. 盛口敬一、三田村悠加、連 直子、重盛登世、前田初彦、河合達志、田中貴信、大野紀和、エネルギーフィルター電顕の元素分析マッピングと平均自由行程 第50回日本組織細胞化学会総会（滋賀）2009年9月26日
7. Moriguchi,K. Muraji,N. Shigemori,T. Maeda,H. Kawai,T. Tanaka,Y. and Ohno,N. Relationship between different relative thickness, mean free path and mapping exactitude in Ca element analysis by using EF-TEM. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009. 9. 18 (Kobe, Japan)
8. Moriguchi,K. and Ohno,N. Oxygen free radical production in human polymorphonuclear leukocyte when fixed with glutaraldehyde. 6th International Symposium on Electron Microscopy in Medicine and Biology 2009. 9. 18 (Kobe, Japan)
9. 盛口敬一、前田初彦、野口俊英、大野紀和、エネルギーフィルター電子顕微鏡によるセリウムーリン反応産物の分析 第51回歯科基礎医学会学術大会ならびに総会（新潟）2009年9月11日
10. 盛口敬一、三田村悠加、前田初彦、大野紀和、EF-TEM観察によるラット多形核白血球の食事に伴うフリーラジカル生成局在 日本顕微鏡学会 第65回学術講演会（仙台）2009年5月27日
11. Hasegawa,H. Iwami,J. Moriguchi,K. Murakami,Y. Ohno,N. Nakamura,H. Lamont,R,J. and Yoshimura,F. Role of mfa2 in *porphyromonas gingivalis* Mfa1 fimbriae. 第87回 IADR(国際歯科研究学会議) 2009.4.3 マイアミ（米国）
12. 盛口敬一、高橋好文、河合達志、大野紀和、チタン、アルミプレート上でのヒト多形核白血球の活性酸素生成経路の違い 第114回日本解剖学会総会・全国学術集会（岡山）2009年3月29日

13. 盛口敬一、三田村悠加、福田光男、前田初彦、野口俊英、大野紀和、EF-TEM cytochemical observation of elongated rete ridges in gingival hyperplasia. 国際歯科研究学会日本部会(JADR)第56回総会・学術集会(愛知、名古屋) 2008年11月29日
14. Moriguchi, K., Takahashi, Y., Mitamura, Y., Maeda, H., Kawai, T. and Ohno, N. H₂O₂ production of human polymorphonuclear leukocytes by allowing attachment to a titanium plate observed by cytochemical energy-filtering transmission electron microscopy. The 9th ASia-Pacific Microscopy Conference (APMC9) 2008. 11. 04 (Jeju, Korea)
15. 盛口敬一、城ヶ原貴通、三田村悠加、前田初彦、花村 肇、大野紀和、EF-TEM観察によるスunks多形核白血球の貪食に伴うフリーラジカル生成局在 日本解剖学会第68回中部支部学術集会(愛知、名古屋)2008年10月12日
16. 盛口敬一、高橋好文、河合達志、アルミニウムプレート上でのヒト多形核白血球の過酸化水素生成 平成20年度秋期第52回 日本歯科理工学会学術講演会(大阪) 2008年9月21日
17. 盛口敬一、白血球が生成するフリーラジカルの可視化 医学生物学電子顕微鏡技術学会第24回学術講演会および総会(神奈川、神奈川歯大) 2008年5月15日
18. 盛口敬一、高橋好文、河合達志、チタンプレート上でのヒト多形核白血球の過酸化水素生成 平成20年度春期第51回 日本歯科理工学会学術講演会(東京、鶴見) 2008年4月26日

中村 伸

1. 光永 総子、中村 伸、上岩 美幸、釜中 慶朗、森本 真弓: Nest PCRによるマカクザル胎仔性別判定法の確立とその応用、第57回日本実験動物学会、京都、Exp. Anim. 59(3):369 (2010) .
2. Takenaka A, Nakamura S, Mitsunaga F, Inoue-Murayama M, Usono T, Suryobroto B: Human Specific Energy-Consumption Type SNP of Obesity Genes Occurred after Divergence from Apes, XXIIIth IPS Congress 2010 (Kyoto), Primate Res. 26:Suppl.pp305 (2010).
3. 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, 22:Suppl.pp136-137(2010).
4. 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), Abst pp131 (2010).
5. Nakamura S, Mitsunaga F, Goto H, Genomics Study on Action of an Oriental Medicine, TokiShakuyaku, Using Monkey Model: 2010, the 15th ICOM Congress, Abst. pp. 186, Chiba(2010).
6. 松浦司郎、田中英之、中村 伸 : Tissue factor (CD142) の高感度ELISAの構築と応用、32回日本血栓止血学会、北九州 (2009).
7. 光永総子、中村 伸、上岩美幸、林 隆志 : 細菌DNAリアルタイムPCR法を用いた霊長類腸内細菌叢プロファイリング、第56回日本実験動物学会、東京、Exp. Anim. 58(3):294 (2009) .
8. Nakamura S, Mitsunaga F, Goto H. : Genomics study on efficacy of an oriental medicine, Toki-Shakuyaku, using monkey model, 2008, September, the 3rd AFLAS Congress, Beijing.

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, Tohigi 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、これは肺胞に沈着するだけでなく血流にのるものがある。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んだけでなく、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 ($100\ \text{nm}$ 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。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 $240\ \text{nm}$ 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 $60\ \text{nm}$ 前後)、高速運転時に大きな (個数ピークは $110\ \text{nm}$ 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

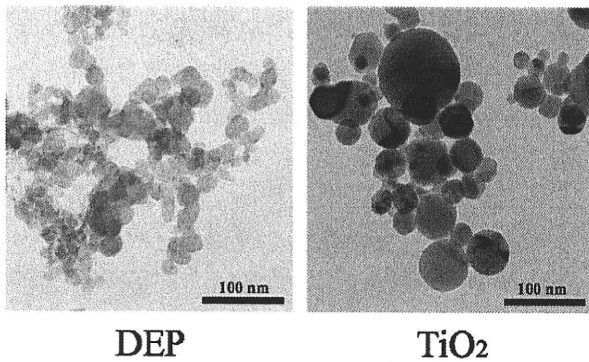


Fig. 1. Transmission Electron Microscopy Image of Diesel Exhaust Particle (DEP) and Titanium Dioxide (TiO₂) Particles
Scale bar, 100 nm.

付着して DEP が形成され则认为られている。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、元素状炭素を核に持ち、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、産子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。

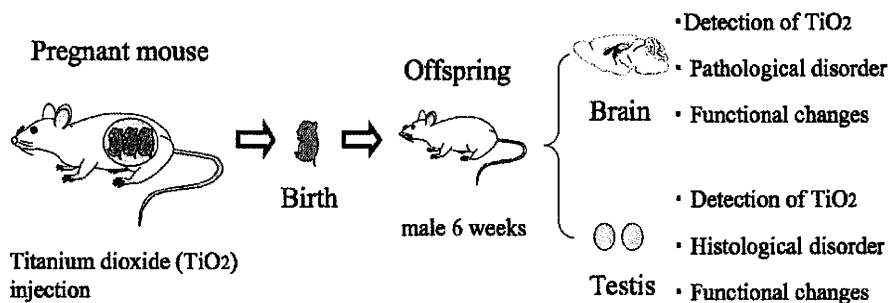


Fig. 2. Maternal Exposure to TiO_2 Nanoparticle Affects the Central Nervous System and Male Reproductive System

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、妊娠中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、ナノ粒子が胎盤を經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、TiO₂を妊娠マウスに投与するとTiO₂は胎盤を經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-Textier 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**,

- 38–41 (2009).
- 14) Suzuki T., Oshio S., Iwata M., Saburi H., Odagiri T., Udagawa T., Sugawara I., Umezawa M., Takeda K., *Part. Fibre Toxicol.*, **7**, 7 (2010).
 - 15) Yoshida S., Yoshida M., Sugawara I., Takeda K., *Environ. Sci.*, **13**, 117–123 (2006).
 - 16) Yoshida S., Ono N., Tsukue N., Oshio S., Umeda T., Takano H., Takeda K., *Environ. Sci.*, **13**, 139–147 (2006).
 - 17) Ono N., Oshio S., Niwata Y., Yoshida S., Tsukue N., Sugawara I., Takano H., Takeda K., *Inhal. Toxicol.*, **19**, 275–281 (2007).
 - 18) Ono N., Oshio S., Niwata Y., Yoshida S., Tsukue N., Sugawara I., Takano T., Takeda K., *Arch. Toxicol.*, **82**, 851–859 (2008).
 - 19) Tsukue N., Yoshida S., Sugawara I., Takeda K., *J. Health Sci.*, **50**, 174–180 (2004).
 - 20) Fujimoto A., Tsukue N., Watanabe M., Sugawara I., Yanagisawa R., Takano H., Yoshida S., Takeda K., *Environ. Toxicol.*, **20**, 431–440 (2005).
 - 21) Umezawa M., Sakata C., Tabata M., Tanaka N., Kudo S., Takeda K., Ihara T., Sugamata M., *J. Health Sci.*, **54**, 503–507 (2008).
 - 22) Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J., *Environ. Health Perspect.*, **113**, 823–839 (2005).
 - 23) Stern S. T., McNeil S. E., *Toxicol. Sci.*, **101**, 4–21 (2008).
 - 24) Semmler-Behnke M., Kreyling W. G., Lipka J., Fertsch S., Wenk A., Takenaka S., Schmid G., Brandau W., *Small*, **4**, 2108–2111 (2008).
 - 25) De Jong W. H., Hagens W. I., Krystek P., Burger M. C., Sips A. J., Geertsma R. E., *Biomaterials*, **29**, 1912–1919 (2008).
 - 26) Sugibayashi K., Todo H., Kimura E., *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 293–298 (2008).
 - 27) Yang R. S., Chang L. W., Wu J. P., Tsai M. H., Wang H. J., Kuo Y. C., Yeh T. K., Yang C. S., Lin P., *Environ. Health Perspect.*, **115**, 1339–1343 (2007).
 - 28) Sayes C. M., Wahi R., Kurian P. A., Liu Y., West J. L., Ausman K. D., Warheit D. B., Colvin V. L., *Toxicol. Sci.*, **92**, 174–185 (2006).
 - 29) Gurr J. R., Wang A. S., Chen C. H., Jan K. Y., *Toxicology*, **213**, 66–73 (2005).
 - 30) Lademann J., Weigmann H., Rickmeyer C., Barthelmes H., Schaefer H., Mueller G., Sterry W., *Skin Pharmacol. Appl. Skin Physiol.*, **12**, 247–256 (1999).
 - 31) Bennat C., Müller-Goymann C. C., *Int. J. Cosmet. Sci.*, **22**, 271–283 (2000).
 - 32) Nohynek G. J., Lademann J., Ribaud C., Roberts M. S., *Crit. Rev. Toxicol.*, **37**, 251–277 (2007).
 - 33) Yoshiike T., Aikawa Y., Sindhvananda J., Suto H., Nishimura K., Kawamoto T., Ogawa H., *J. Dermatol. Sci.*, **5**, 92–96 (1993).
 - 34) Mortensen L. J., Oberdörster G., Pentland A. P., Delouise L. A., *Nano Lett.*, **8**, 2779–2787 (2008).
 - 35) Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C., *Inhal. Toxicol.*, **16**, 437–445 (2004).
 - 36) Wang J., Liu Y., Jiao F., Lao F., Li W., Gu Y., Li Y., Ge C., Zhou G., Li B., Zhao Y., Chai Z., Chen C., *Toxicology*, **254**, 82–90 (2008).
 - 37) Fabian E., Landsiedel R., Ma-Hock L., Wiench K., Wohlleben W., van Ravenzwaay B., *Arch. Toxicol.*, **82**, 151–157 (2008).
 - 38) Takeda K., Suzuki K., Ishihara A., Kubo-Irie M., Fujimoto R., Tabata M., Oshio S., Nihei Y., Ihara T., Sugamata M., *J. Health Sci.*, **55**, 95–102 (2009).
 - 39) Takahashi Y., Mizuo K., Shinkai Y., Oshio S., Takeda K., *J. Toxicol. Sci.*, **35**, 749–756 (2010).
 - 40) Shimizu M., Tainaka H., Oba T., Mizuo K., Umezawa M., Takeda K., *Part. Fibre Toxicol.*, **6**, 20–28 (2009).
 - 41) Barker D. J., Osmond C., *Lancet*, **327**, 1077–1081 (1986).
 - 42) Xu G., Umezawa M., Takeda K., *J. Health Sci.*, **55**, 11–19 (2009).

4 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

武田 健*¹, 鈴木 健一郎*², 入江 美代子*³, 押尾 茂*⁴, 井原 智美*⁵, 菅又 昌雄*⁶

4.1 はじめに

筆者らは、ディーゼル排ガスの胎仔期曝露の系において、排ガス由来と思われる超微小粒子(ナノ粒子)が仔の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している像を得た¹⁾。母マウスから胎盤を介して胎仔脳に移行、取り込まれ、出生後も排出されず留まったものと予想した。しかし、それらが排ガス由来のナノ粒子であるという絶対的な証拠を得ることは困難であった。そこで、金属ナノ粒子に注目し、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妊娠期の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²⁾。移行した粒子状物質が酸化チタンであることの証拠を得た。他のナノマテリアルについても研究を進め、次世代に様々な健康影響を及ぼすことを明らかにしつつあるが、本稿では酸化チタンナノ粒子の健康影響を中心に、我々が得た次世代の脳神経系及び生殖系に及ぼす影響に関する結果を話題として紹介したい。

4.2 酸化チタン(TiO₂)ナノ粒子とは?

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^{3,4)}。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、化粧品の他に医薬品や食品添加物としても利用されている。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。

* 1 Ken TAKEDA 東京理科大学 薬学部 教授; 東京理科大学 総合研究機構 ナノ粒子健康科学研究センター センター長

* 2 Kenichiro SUZUKI 東京理科大学 理工学部; 東京理科大学 総合研究機構 ナノ粒子健康科学研究センター ポスドク研究員

* 3 Miyoko IRIE 東京理科大学 総合研究機構 ナノ粒子健康科学研究センター 客員研究員

* 4 Shigeru OSHIO 奥羽大学 薬学部 教授

* 5 Tomomi IHARA 栃木臨床病理研究所 部長

* 6 Masao SUGAMATA 栃木臨床病理研究所 所長

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。

4.3 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、TiO₂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⁵⁻⁷⁾。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、蓄積され、影響を及ぼす可能性が残る。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^{8,9)}。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、呼気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。

4.4 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¹⁰⁾。一方、Wang らは、マウス成獣の鼻腔に酸化チタン(粒径 80nm ルチル型、粒径 155nm 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すること、特に海馬に蓄積することを観察した¹¹⁾。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僅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こと、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¹²⁾。Sugibayashi らはマウスに酸化チタンナノ粒子(粒径 15 nm)を静脈投与し、投与後 5 分で血液や各種臓器において濃度が上昇したが、脳には検出されなかったと報告している。肝臓では、1 ヶ月後でも 30% しか減少していない¹³⁾。

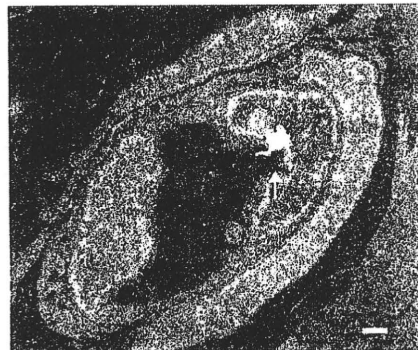
以上、成獣では脳血液関門があり、血液を介しては脳には検出できるほどの酸化チタンは移行しないものと考えられている。

4.5 酸化チタンナノ粒子の妊娠期母獣から仔への移行

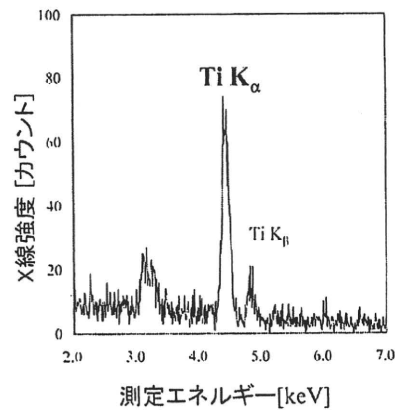
筆者らは、酸化チタンナノ粒子が妊娠期の母から仔に移行し、出生後の成長期にも脳内に取り込まれた状態で残り、病理学的に、また、機能的に様々な影響を及ぼすことを世界に先駆けて明らかにした²⁾。

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) 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。

酸化チタンの検出：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) 観察および走査型電子顕微鏡-X 線スペクトロ測定装置 (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 (図 1, 図 2, 図 3)。



嗅球末梢血管内皮の超微小粒子



X線スペクトロ測定装置による解析

図1 酸化チタンナノ粒子の産仔への移行

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 (スケールバーは 1 μm)。X 線スペクトロ解析により、粒子が酸化チタンであることが同定された。(解析は鈴木健一郎が行った。文献 2 参照)

4.6 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²⁾。

4.7 酸化チタンナノ粒子の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²⁾。さらに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に希釈しても認められた。

4.8 考察

筆者らは動物実験を通して以



HD-2300 200kV x250k TE 100nm

図2 大脳皮質神経細胞に取り込まれた酸化チタンナノ粒子の拡大電子顕微鏡写真(複数の粒子が凝集している²⁾)

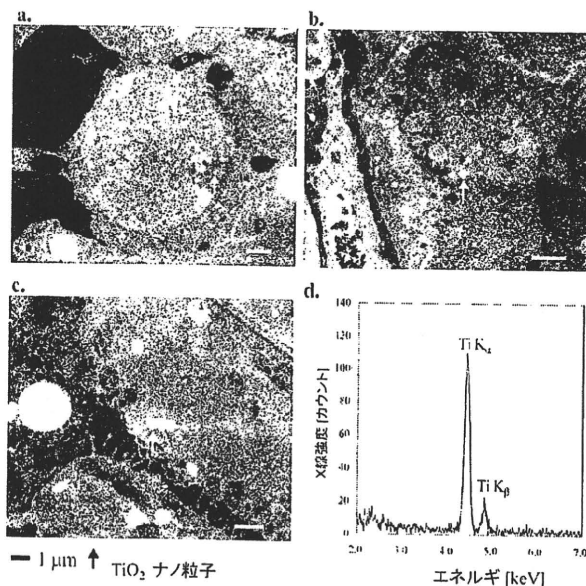


図3 精巣の細胞に取り込まれた粒子の酸化チタンナノ粒子の電子顕微鏡写真とX線スペクトロ解析
(a. ライディヒ細胞, b. セルトリ細胞, c. 精子細胞)

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・臓器を駆け巡る。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うる(図4)。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のれば仔に移行し、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、増悪化に繋がる恐れがある。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、詳細に検討する必要がある、今後の課題である。

英国の David 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¹⁴⁾。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よばれている成人病の発症に繋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^{15,16)}。次世代の仔には僅かなナノ粒子しか移行していないはずだが、何故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、謎である。その分子機構の解明が待たれる。

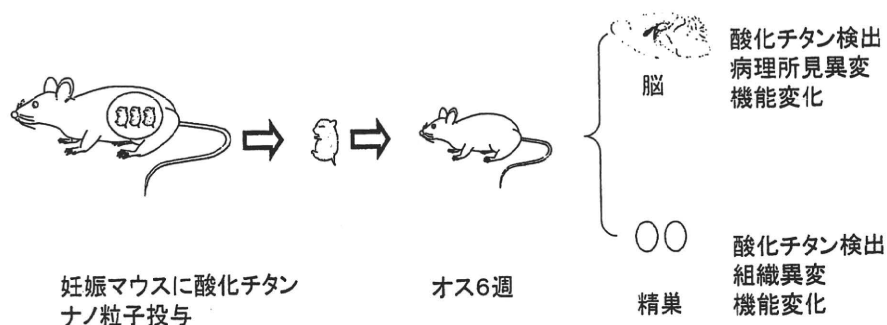


図4 酸化チタンナノ粒子の次世代への影響

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2の内容を要約した模式図)

4.9 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。従って、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である。

(本稿で紹介した我々の研究は二瓶好正東京理科大学教授、石原亜希、藤本梨絵、内田寛樹氏(大学院修士課程)をはじめ多くの研究者の指導や協力のもとに行われてきた。研究に関わったすべての共同研究者に深謝申し上げます)

文 献

- 1) M. Sugamata *et al.*, *J. Health Sci.*, **52**, 82(2006).
- 2) K. Takeda *et al.*, *J. Health Sci.*, **55**, 95(2009).
- 3) CM.Sayes *et al.* *Toxicol Sci.* **92**, 174(2006).
- 4) JR. Gurr *et al.*, *Toxicology.* **213**, 66(2005).
- 5) J. Lademann *et al.*, *Skin Pharmacol Appl Skin Physiol.* **12**, 247(1999).
- 6) C. Bennat and CC. Müller-Goymann, *Int J Cosmet Sci.* **22**, 271(2000).
- 7) GJ. Nohynek *et al.*, *Crit Rev Toxicol.*, **37**, 251(2007).
- 8) T. Yoshiike *et al.*, *J Dermatol Sci.*, **5**, 92(1993).
- 9) LJ. Mortensen *et al.*, *Nano Lett.*, **8**, 2779(2008).
- 10) G. Oberdörster *et al.*, *Inhal Toxicol.* **16**, 437(2004).
- 11) J. Wang *et al.*, *Toxicology* **254**, 82(2008).
- 12) E. Fabian *et al.*, *Arch Toxicol.*, **82**: 151(2008).
- 13) K. Sugibayashi *et al.*, *J. Toxicol. Sci.*, **33**: 293(2008).
- 14) DJ. Barker and C. Osmond, *Lancet.*, **327**: 1077(1986).
- 15) G. Xu, M. Umezawa and K. Takeda, *J. Health Sci.*, **55**: 11(2009).
- 16) 武田健, 菅又昌雄, *ファルマシア*, **45**, 245(2009).

Letter

Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice

Yuta Takahashi¹, Keisuke Mizuo^{2,3}, Yusuke Shinkai², Shigeru Oshio^{2,4} and Ken Takeda^{1,2}

¹Department of Hygiene Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Science, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510, Japan

²Research Center for Health Science of Nanoparticles, Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-shi, Chiba 278-8510, Japan

³Department of Legal Medicine and Molecular Alcoholology, Sapporo Medical University School of Medicine, S-1 W-17, Chuo-ku, Sapporo 060-8556, Japan

⁴Department of Hygiene Chemistry, Ohu University School of Pharmaceutical Sciences, 31-1 Misumido, Tomita-machi, Koriyama, Fukushima 963-8611, Japan

(Received March 16, 2010; Accepted May 13, 2010)

ABSTRACT — Titanium dioxide (TiO₂) nanoparticles are widely used in cosmetics, sunscreen and as a photocatalyst. However, little is known about the biological effect of TiO₂ nanoparticles in humans and other animals. Here, we investigated whether prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles impacted the central nervous system in mice. We measured the levels of dopamine (DA) and its metabolites in several regions of the brain in mice using high performance liquid chromatography (HPLC). HPLC analysis showed that DA and its metabolites were increased in the prefrontal cortex and the neostriatum following prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles. The present study highlights the possibility that maternal exposure to TiO₂ nanoparticles might influence the development of the central dopaminergic system in offspring.

Key words: Brain, Dopamine system, Nanoparticle, Prenatal exposure, Titanium dioxide (TiO₂)

INTRODUCTION

Nanocrystalline titanium dioxide (TiO₂), a noncombustible, odorless powder, is an important material used in commerce and can be found in paints, cosmetics, food additives and implanted biomaterials (Kaida *et al.*, 2004; Esterkin *et al.*, 2005).

TiO₂ nanoparticles have three structural isoforms, anatase, rutile and brookite. Since the photocatalytic activity of the anatase form of TiO₂ is higher than the rutile form (Sayes *et al.*, 2006), anatase TiO₂ is currently used in products as diverse as sterilization materials and coatings for self-cleaning windows and walls (Fujishima *et al.*, 2008). Although TiO₂ was thought to be a non-toxic material, several studies have suggested that TiO₂ nanoparticles may be toxic to living systems.

Fabian *et al.* (2008) demonstrated that, following intravenous injection of TiO₂ nanoparticles into living animals, the particles enter the systemic circula-

tion and migrate to various organs and tissues. There may be a critical size beyond which movement of the nanoparticles within the body is restricted. Oberdörster *et al.* (2004) reported that inhaled nanoparticles could enter the brain *via* the olfactory nerves. Wang *et al.* (2008a) demonstrated that intranasally instilled TiO₂ nanoparticles could be translocated into the central nervous system of mice *via* the olfactory nerve tract, and accumulated in the olfactory nerve layer, cerebral cortex, thalamus and hippocampus. The oxidative damage expressed as lipid peroxidation increased significantly. Exposure to anatase TiO₂ particles also produced significant inflammation (Wang *et al.*, 2008b).

However, the potential toxicity of TiO₂ in the next generation has yet to be examined. We have already demonstrated that prenatal exposure to diesel exhaust (DE) affects the dopaminergic system resulting in a reduction in locomotion in mice (Yokota *et al.*, 2009). Moreover, Sugamata *et al.* (2006) found that granular perithe-

Correspondence: Ken Takeda (E-mail: takedak@rs.noda.tus.ac.jp)

lial cells, scavenger cells surrounding cerebral vessels, showed signs of apoptosis; the cytoplasmic granules had degenerated and showed evidence of what appeared to be ultrafine, DE particles in the brain of offspring exposed to DE during the fetal period. These results suggest that the nanoparticles in DE might enter the fetal circulation *via* the placenta and affect the central nervous system.

We have demonstrated that nano-sized TiO₂, administered subcutaneously to pregnant mice, was transferred to the offspring and affected the genital and cranial nerve systems of male offspring. Nanoparticles identified as TiO₂ by energy-dispersive X-ray spectroscopy were found in the testes and brain of exposed 6-week-old male mice. In the offspring of TiO₂-injected mice, various functional and pathologic disorders were observed (Takeda *et al.*, 2009). Recently, we have also reported that maternal exposure of mice to TiO₂ nanoparticles may affect the expression of genes related to the development and function of the central nervous system (Shimizu *et al.*, 2009).

In the present study, we investigated the impact of prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles on the dopaminergic system. We measured the levels of dopamine (DA) and its metabolites in several regions of the brain in mice using high performance liquid chromatography (HPLC).

MATERIALS AND METHODS

TiO₂ nanoparticles

TiO₂ nanoparticles (anatase form, particle size 25-70 nm, surface area 20-25 m²/g) were purchased from Sigma-Aldrich (St Louis, MO, USA) and diffused in saline containing 0.05% Tween 80. The sample solution was sonicated for more than 30 min immediately before administration (28 kHz, 60 w; Sonicator, Medical Aiwai Co., Ltd., Tokyo, Japan). The distribution of TiO₂ particles of different diameters was determined by field emission-type scanning electron microscopy (FE-SEM). Diameter of the particles was measured on a randomly selected area of the FE-SEM image. A wide distribution of single TiO₂ powder size was confirmed which ranged from 20 to 100 nm. The size distribution of the TiO₂ nanoparticles in the suspension was measured by dynamic light scattering (DLS) using FPAR-1000 (Otsuka Electronics Co., Ltd., Osaka, Japan), and the agglomeration state was assessed by transmission electron microscopy (TEM) (JEM-1200 EXII, JEOL, Ltd., Tokyo, Japan). The size distribution was determined with the algorithm CONTIN. For the TEM assessment, an aliquot of 5 μ l was placed on the copper grid coated with hydrophilized formbar and assessed with an accelerating voltage of 80 kV. Zeta potential of TiO₂ in this condition was negative (Bihari *et al.*, 2008).

Animals

Pregnant ICR mice were purchased from the SLC Co. (Shizuoka, Japan). TiO₂ nanoparticles were suspended at 1 mg/ml, and 0.1 ml was administered subcutaneously to the pregnant ICR mice at gestation days 6, 9, 12, 15 and 18. Control animals were treated with saline containing 0.05% Tween 80. In each group, pups were weaned on postnatal day 21. They were maintained in a temperature- and light-controlled environment with free access to standard rodent food and water. All experimental animals were handled in accordance with the institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals. All efforts were made to minimize the number of animals used and their suffering.

Neurochemical analysis

Brains were obtained from 6-week-old anesthetized male pups after decapitation and dissected into ten regions: olfactory bulb, prefrontal cortex, neostriatum, nucleus accumbens, hippocampus, amygdala, hypothalamus, midbrain (containing the ventral tegmental area and substantia nigra), brainstem (containing the raphe nucleus and locus coeruleus) and cerebellum. The dissected regions were immediately frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C until analysis.

Frozen brain tissues were homogenized in ice-cold 0.2 M perchloric acid containing 100 mM EDTA (2Na) and 100 ng isoproterenol, as an internal standard. The homogenates were centrifuged at 20,000 \times g for 15 min at 0°C. Supernatants were transferred to new tubes and the pellets were stored for protein assay. The pH of the supernatant was adjusted to 3.5 with 1 M sodium acetate, and stored at -80°C until analysis. For HPLC, 10 μ l of the pH-adjusted supernatant were injected into an HPLC system with electrochemical detection (EICOM Co., Kyoto, Japan). DA, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC), homovanillic acid (HVA) and 3-methoxytyramine hydrochloride (3-MT) were separated by a C18 reverse-phase column (EICOM, EICOMPAK SC-50DS, EICOM Co.) with a mobile phase containing 0.1 M sodium acetate, citric acid monohydrate, EDTA (2Na) (5 mg/l), sodium 1-octanesulfonate (190 mg/l), and 15% methanol.

Protein assay

Pellets were resuspended in 100 mM Tris-HCl for protein determination by the high-sensitivity Bradford method using a commercial reagent (ADV-01, Cytoskeleton, Inc., Denver, CO, USA). Measurements were performed according to the manufacturer's protocol.

Statistical analysis

Data are expressed as mean \pm S.E.M. Differences between groups were examined for statistical significance using a Mann-Whitney *U*-test and $p < 0.05$ indicated statistical significance.

RESULTS

Size distribution and agglomeration state in suspensions of TiO₂ nanomicroparticles

A TEM image of the state of TiO₂ nanoparticles dispersed in saline containing 0.05% Tween 80 is shown in Fig. 1a. TiO₂ nanoparticles were easily aggregated, and the majority of particles were agglomerated. The size distribution of TiO₂ nanoparticles in the suspension was analyzed by DLS. TiO₂ demonstrated a wide range in size distribution from 20 to 12,805 nm, and the most abundant sizes were two peaks at 27 ± 4 and $2,429 \pm 1,906$ nm, respectively (Fig. 1b).

Monoamine levels in 10 regions of the brain

Monoamine levels were determined in 10 regions of the brain: the olfactory bulb, prefrontal cortex, neostriatum, nucleus accumbens, hippocampus, amygdala, hypothalamus, midbrain, brainstem and cerebellum. In the prefrontal cortex, DA and its metabolites (DOPAC, HVA, 3-MT) were increased in TiO₂ nanoparticle-exposed mice (DA, + 109%; DOPAC, + 46%; HVA, + 48%; 3-MT, + 56%; Fig. 2a) over control levels. In the neostriatum, DA

and metabolites (DOPAC, HVA) were increased (DA, + 39%; DOPAC, + 43%, HVA, + 45%; Fig. 2b). In the other regions of the brain, the levels of DA and its metabolites were not altered significantly (Table 1).

DISCUSSION

The purpose of this study was to determine the effect of prenatal exposure to TiO₂ nanoparticles on the dopaminergic system of the developing mouse brain. The levels of DA and its metabolites were determined individually using HPLC. Significant increases in the amount of DA and DA metabolites were observed in the striatal and prefrontal area of the TiO₂-exposed group compared to the control animals (Fig. 3). We have already reported that exposure to DE during embryonic development altered the level of DA in the nucleus accumbens, leading to alterations in the spontaneous motor activity of the offspring (Yokota *et al.*, 2009). Several reports demonstrated that increase in the levels of DA metabolite indicate the increase in the DA neurotransmission (Saraswat *et al.*, 1981; Narita *et al.*, 1993). Taken together, our findings suggest that prenatal exposure to nanoparticles may influence the dopaminergic system in the brain.

There are two major dopaminergic systems in the brain: the nigrostriatal pathway and the mesolimbic pathway (Hornykiewicz, 1971). The former connects the substantia nigra pars compacta to the striata and plays a role in the control of motor function (Andén *et al.*, 1966). The mes-

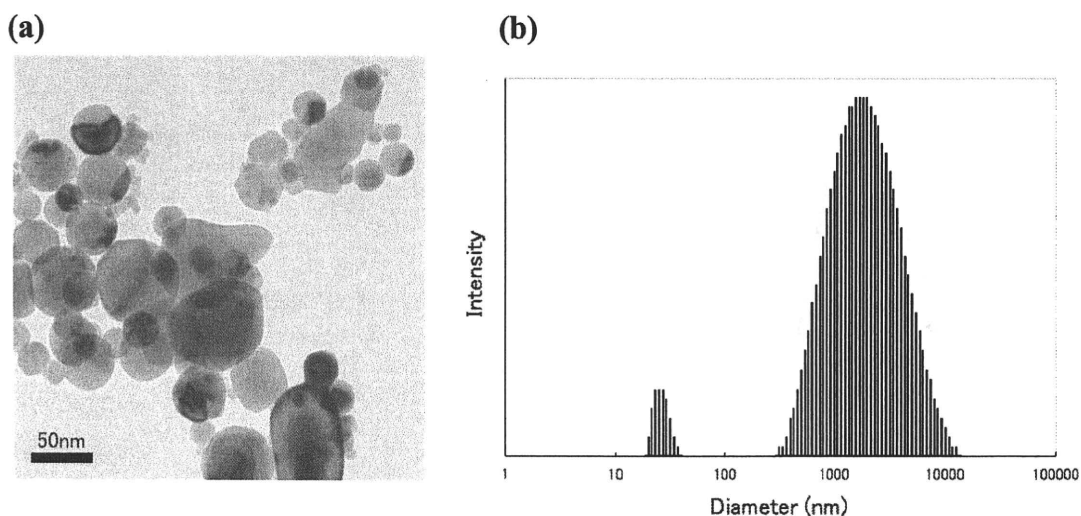


Fig. 1. TEM image of TiO₂ nanoparticles and their size distributions. TiO₂ nanopowder was suspended in saline with 0.05% (v/v) Tween 80 and sonicated for more than 30 min immediately before administration. (a) The agglomeration state was assessed by TEM and (b) the size distribution of the TiO₂ nanoparticles in the suspension was measured by DLS.

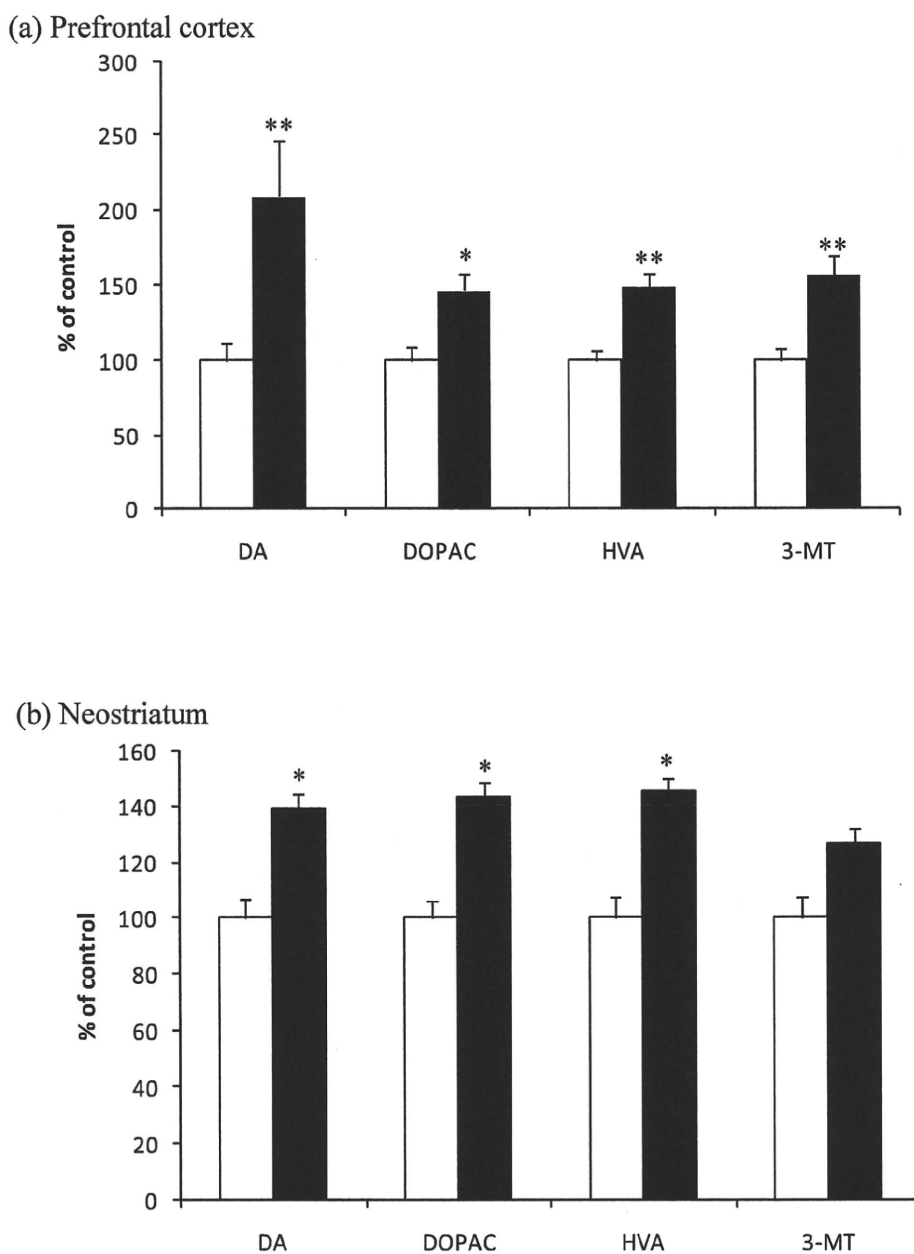


Fig. 2. Changes in the levels of DA and its metabolites (DOPAC, HVA, 3-MT) in the (a) prefrontal cortex and (b) neostriatum obtained from 6-week-old male mice exposed, prenatally, to TiO₂ nanoparticles or from control animals. The data are expressed as a percentage of the value in control mice. Each column represents the mean \pm S.E.M. (n = 8). * p < 0.05, ** p < 0.01 vs. each control group.

olimbic pathway extends from the ventral tegmental area to the nucleus accumbens, amygdala and prefrontal cortex. It plays a critical role in the control of cognitive and emotional function (Tzschentke, 2001; Alcaro *et al.*, 2007). It has been reported that abnormalities in the monoam-

nergic systems are associated with psychiatric diseases such as schizophrenia, depression, anxiety and attention-deficit hyperactivity disorder (ADHD) (Tammimga, 2006; Ressler and Nemeroff, 2000). Additionally, defects in the dopaminergic system are associated with psychiat-