

ヒトへの外挿を目指したナノマテリアル の健康影響評価手法の開発

平成 24 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

H24 - 化学 - 一般 - 004

平成 24 年度 総括・分担研究報告書

研究代表 武田 健

平成 25 年 5 月

ヒトへの外挿を目指したナノマテリアルの健康影響評価手法の開発

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げっ歯類ならびに霊長類モデルを用いて、ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代の免疫系、中枢神経系、雄性生殖系に生じる影響の詳細を検証している。これにより、ナノマテリアル（低用量曝露を含む）の次世代影響に焦点を当てたリスク評価法を確立することを目指している。初年度は、①低用量のナノマテリアルによる次世代雄性生殖系への影響評価、②ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代免疫系・中枢神経系への影響評価指標探索、③ナノマテリアルによる霊長類リンパ節・中枢神経系への影響評価指標探索を目的として研究を進めた。

研究分担者

グループ 1

立花 研 東京理科大学 助教
梅澤雅和 東京理科大学 助教
新海雄介 東京理科大学 研究員
菅又昌雄 栃木臨床病理研究所 所長
井原智美 栃木臨床病理研究所 部長

グループ 2

中村 伸 NPO プライメイトアゴラ 所長
光永総子 NPO プライメイトアゴラ 部長

A. 研究目的

本研究課題は、ナノマテリアルの健康影響について特に、1) 低用量曝露による次世代雄性生殖系への影響、2) 次世代の免疫系・中枢神経系への影響、3) 霊長類免疫系・中枢神経系に対する影響を明らかにしようとするものである。1) では妊娠期におけるナノマテリアルの低用量曝露が次世代に及ぼす影響について、次世代の雄性生殖系機能をマーカーとしたげっ歯類の影響評価系

の確立を目指している。2) 3) を通して、ナノマテリアルが免疫系に及ぼす影響について、ヒトに外挿できる霊長類及びげっ歯類の評価系を確立することを目指している。

B. 研究方法

げっ歯類(マウス)を用いた研究

妊娠マウス(ICR 系、C57BL/6 系)にナノマテリアルを投与した。材料は、生産量が多く汎用されているもののうち、カーボンブラックおよび酸化チタンを用いた。とくに酸化チタンは、アルミナコーティングにより表面性状の異なるものの影響を比較検討した。酸化チタンナノ粒子は懸濁液を皮下、炭素(カーボンブラック)ナノ粒子は懸濁液を気道(点鼻)に投与した。なお、懸濁液中でのナノ粒子の存在状態は透過及び走査型電子顕微鏡、ならびに動的光散乱法(DLS)に

より解析した。その結果、とくに低濃度（低用量投与）のナノ粒子懸濁液については、マテリアルが二次粒子径も 100nm 未満というスケールに収まっていることを確認した。投与したナノ粒子の動態については、とくに胎仔への移行を透過型電子顕微鏡ならびに走査型電子顕微鏡－エネルギー分散型X線スペクトロ測定装置 (FE-SEM/EDS) により解析した。

次世代雄性生殖器への影響は、母体に投与したナノ粒子の移行・蓄積ならびに精子・精巣の超微小形態の観察により評価した。次世代免疫系への影響は、フローサイトメトリーを用いたリンパ球組成の解析と遺伝子発現解析（機能的トランスクリプトミクスならびに定量的 RT-PCR）により評価した。併せて、産仔の免疫系組織及び血液中 miRNA の網羅的解析を行った。

（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。

霊長類(サル)を用いた研究

アカゲザル新生仔の背部皮内に、ナノ材料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)、酸化金属ナノ粒子 (二酸化チタン:TiO₂)、蛍光ナノポリスチレン (PS) のいずれかをそれぞれ投与し、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た。試料から RNA を抽出し

た後、遺伝子の発現変動をマイクロアレイ及び定量的 RT-PCR により解析し、その機能的特徴を明らかにした。詳細は別紙参照 (中村 伸報告)。

C. 研究成果

H24 年度成果

1) 次世代雄性生殖系への影響

妊娠マウス 1 匹あたり 0.5µg (ヒト換算で約 0.5～1mg/人) という低用量 (高分散性) で、酸化チタンの仔への移行と影響が生じることを明らかにした。また、酸化チタンへのコーティング (アルミナ) の有無によって影響の程度に差異が生じることも示した。酸化チタンの次世代個体への移行は、電子顕微鏡だけでなく X 線スペクトルによる元素同定により厳密に検出することができた。

さらに、二酸化チタンを妊娠マウスに投与した際に生じる胎仔及び出生仔血液中の小分子 RNA (マイクロ RNA) の変動プロファイルを解析した。その結果、次世代免疫系及び雄性生殖器系への影響と相関すると考えられる変化が捉えられつつある。現在はこのデータに基づき、二酸化チタンの妊娠期曝露による次世代への影響発現メカニズムの検討を進めている。

2) 次世代免疫系・中枢神経系への影響

ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代免疫系への影響を、胸腺及び二次リンパ組織の変化に焦点を当てて進めた。とくに、炭素系ナノマテリアルの妊娠期投与 (経気道) が次世代新生児期の胸腺のリンパ球分化・選択に影響を及ぼし、二次リンパ組織の T 細胞比率を低下させるというデータを得た。また、二次リンパ組織のうち脾臓についてはトランスクリプトミクス解析を行い、T 細胞比率の

低下と一致した遺伝子発現低下を見出した。この遺伝子発現変動パターンの示す機能的特徴について、現在解析・精査を進めている。

また、酸化チタンによる次世代中枢神経系への影響について、ナノ粒子の標的となる発達期中枢神経系の脳領域を遺伝子発現パターンから明らかにする手法を開発した(Umezawa et al. *J Toxicol Sci* 37: 1247-1252, 2012)。本法は、免疫系を司る細胞種のうちナノマテリアルの標的となるものを探索する上でも活用できると期待される。さらに、胎仔及び新生仔試料中の小分子 RNA (マイクロRNA) の発現プロファイルを解析することにより、酸化チタンの妊娠期曝露による次世代への影響発現メカニズムの検討を進めている。

3) 霊長類を用いた検討(中村 伸)

皮内投与した各種ナノ材料が、近傍リンパ節のマクロファージにおけるアポトーシスとファゴサイトーシスを亢進し、免疫機能を顕著に変調することが示された。とくに、リンパ節での遺伝子発現の転写過程への影響が特徴的であり、スプライシング異常に伴う機能遺伝子の転写障害につながる可能性が示唆された。さらに、クエン酸代謝系の主要遺伝子の発現抑制を起因とするミトコンドリア機能障害ならびにエネルギーバランス失調の可能性が示唆された。(別紙参照)。

D. 考察

「次世代雄性生殖系への影響解析」では、妊娠期マウスに投与した極めて低用量の酸化チタンを次世代の精巣組織内に検出できることを示した。ここで用いた X 線解析の手法(EDS)を用いて、次世代へのナノ粒子の蓄積が他の臓器でも

検出できるのかを確認する必要がある。この蓄積が組織特異的であれば、ナノマテリアルの次世代影響自体が組織特異的である(少なくとも程度に偏りがある)可能性を示唆することになる。一方で、他の臓器にも次世代個体中での蓄積が認められれば、ナノマテリアルの次世代影響は全身性に生じる可能性が示唆されることになる。この点は今後の研究により検証する必要がある。

また、ナノ粒子による次世代影響は仔への移行・蓄積だけでなく、それに伴いどのような影響が生じるのかという機能的な解析が必須である。現在のところ、ナノ粒子の次世代影響としての機能的変化は不明な点が多いが、「次世代免疫系・中枢神経系への影響解析」で示した“機能的トランスクリプトミクス解析”(遺伝子アノテーションを活用)を駆使してこれが明らかになることにより、ナノマテリアルの次世代影響のリスク評価に利用できるエンドポイントの創出に迫ることができる期待される。すでに、げっ歯類を用いた研究で確率した本手法の、霊長類を用いた研究への応用を進めている。

本研究の大きな特色の一つは、ヒトに外挿可能なリスク評価系を確立するために、霊長類モデルを活用している点である。本プロジェクトの 2 年目以降も、げっ歯類モデルで得られる多くのデータ・知見の霊長類モデルでの検証を進め、ヒトへの外挿可能性を考察していくことが必要であると考えている。

E. 結論

本研究課題では、ナノマテリアルの健康影響について、1) 次世代雄性生殖系への影響解析、2) 次世代免疫系への影響解析を通して次世代影響の短期間(新生児マウス)での評価、ならびに、3)

霊長類免疫系に及ぼす影響解析を通して、ヒトへの外挿が可能な低用量ナノマテリアルによる影響の鋭敏かつ定量的な評価を実現しつつある。さらに、トランスクリプトミクス及びその機能的解析により、未知の毒性も含めて低コストで検出できる評価系を確立できると考えている。

以上の研究を2年度目以降にさらに進展させ、ヒトに外挿可能なナノマテリアルの健康影響評価系(胎児や新生児という高感受性集団への影響評価を含む)を確立することにより、国民の健康・安全を守ることとナノテクノロジー産業の健全な発展との両立に貢献できると期待している。

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

本研究の知見は、ナノ材料の職業・環境的曝露による健康リスクとして、とくに妊婦への曝露による胎児・次世代への影響の防止に注意を払う必要があることを示唆しているものであり、健康危険情報として報告する。

最近10年余りの間、培養細胞や動物モデルを用いた研究によりナノ材料の有害性が多数報告されている。ナノ材料の曝露による健康リスクについては不明な点も多いが、ナノ材料のリスクの予防的管理を目指した議論は、現在国際的に進んでいるところである。我々は、ナノ粒子を含む環境中微小粒子に対する高感受性集団として胎児に注目し、まず妊娠期のナノ材料曝露による胎児、さらには出生後の次世代に及び得る有害性の検証を進

めてきた。

その結果、二酸化チタンナノ材料を妊娠マウスに投与すると、総投与量が約10 µg/kg 体重という低用量であってもナノ材料の次世代雄性生殖系(精巣)に検出されることが明らかになった。低用量投与による雄性生殖器の機能的変化については未解明であるが、このナノ材料の移行・蓄積の検出は、その影響に注意が払われる必要性を示唆するものである。

また、次世代免疫系への影響についてもカーボンブラックナノ材料を用いた研究により明らかになりつつある。本研究の結果は、総投与量が約40 µg/kg 体重のカーボンブラックナノ材料の妊娠マウスへの投与により、次世代新生仔マウスのリンパ組織に影響が生じることを示している。発現する影響は、ナノ材料の投与時期に依存すると考えられるが、このデータは妊娠期のナノ材料曝露が新生児の免疫機能獲得(病原体との接触やワクチン接種による)能に影響を及ぼす恐れを示すものであると考えられる。

ナノ材料の妊娠期曝露が胎児及び次世代に及ぼす影響の用量依存性や材料間比較は、今後の検討課題である。しかし、本研究課題内外から今後得られる結果を活かしながら、次世代影響も踏まえたリスク評価法の構築ならびにリスク管理を実現する必要がある。ナノ材料のリスク管理は、リスク研究の結果を踏まえて社会が自主的に対応できる形で行われることが望ましいが、必要に応じては、労働基準法の「妊産婦等の危険有害業務の就業制限」(第64条の3)の適用によるリスク管理が求められる可能性が想定

される。

(2) 情報源

研究者名: Shimizu R, Umezawa M,
Takeda K, *et al.*

タイトル: Fetal exposure to carbon nanoparticle altered development of the neonatal immune system.

Shown in PPTOXIII meeting, Society of Toxicology (May 2012 @Paris, France)

研究者名: 武田 健

タイトル: 母子伝達されるナノ粒子 : 次世代健康影響を考える

『科学』(2012年10月号、岩波書店)、pp.1093-1098

研究者名: 梅澤雅和

タイトル: ナノ材料による次世代健康影響とリスク管理への課題

『科学』(2012年10月号、岩波書店)、pp.1093-1098

研究者名: 梅澤雅和

タイトル: 大気中の微小な粒子と子どもの健康

『子どものからだと心白書』(2012年12月発刊、子どものからだと心・連絡会議)、pp.38-40

(3) 情報に関する評価・コメント

グレードB情報(本邦において健康影響のある可能性があるが、時間的緊急性が高いとは言えない。他の研究により環境中のナノ材料濃度の計測・モニター方法を確立し、曝露評価が早急に実施されることにより、その上で実際的かつ効果的なリスク管理の方策を決定する必要がある。)

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. (2012) Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development – Brain region information. Journal of Toxicological Sciences, 37(6): 1247-1252.
2. 梅澤雅和、難波美帆、武田 健 (2012) ナノ粒子の次世代健康影響ーリスクコミュニケーション課題の事例として、日本科学教育学会年会論文集 36: 221-222.
3. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田 健 (2012) ナノ材料のリスクの情報提供に際する問題と対処法の抽出、日本リスク研究学会年次大会講演論文集 25: 257-259.
4. 武田 健 (2012) 母子伝達されるナノ粒子 : 次世代健康影響を考える (科学 2012年10月号)、岩波書店、1093-1098.
5. 梅澤雅和 (2012) ナノ材料による次世代健康影響とリスク管理への課題 (科学 2012年10月号)、岩波書店、1098-1103.

2. 学会発表

1. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田 健、現代のリスクに対処するためのリスクコミュニケーション、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28~31日
2. 清水隆平、梅澤雅和、岡本沙紀、小野田淳人、二木力夫、小川修平、渡辺志帆、安部良、武田 健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が新生児期の免疫系に及ぼす影響、日本薬学会第133年会、横浜、2013年3月28~31日
3. 梅澤雅和、ナノ粒子の健康リスク 私たちはいかにリスクを回避できるのか、市民科学研究室、特別シンポジウム「ナノ粒子の健康リスク ~母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に~」東京、2013年2月23日

4. Irie, M. Kosuge, K. Shida, K. Kubo-Irie, M. Takeda, K. Monitoring technique for the acute effect of TiO₂ nanoparticles from the behaviour of rice fish orizias latipes in vivo. NANOSAFE MINATEC Grenoble. November 13-15,2012.
5. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、武田健、ナノ材料のリスクの情報提供に際する問題の対処法の抽出、第 25 回日本リスク研究会年次大会、彦根、2012 年 11 月 9～11 日
6. 関田啓佑、梅澤雅和、鈴木健一郎、武田健、超音波式加湿器から放出される微粒子のキャラクタリゼーション、フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋、2012 年 10 月 25～26 日
7. 小野田淳人、梅澤雅和、二木力夫、武田健、井原智美、菅又昌雄、炭素ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲マクロファージに与える影響、フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー、名古屋、2012 年 10 月 25～26 日
8. 梅澤雅和、清水隆平、岡本沙紀、渡辺志帆、小川修平、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が新生児期の脾臓遺伝子発現に及ぼす影響、第 19 回日本免疫毒性学会学術大会、東京、2012 年 9 月 15～16 日
9. 清水隆平、梅澤雅和、岡本沙紀、二木力夫、小川修平、渡辺志帆、安部良、武田健、カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が免疫の発達に及ぼす影響、第 19 回日本免疫毒性学会学術大会、東京、2012 年 9 月 15～16 日
10. Umezawa, M. Suzuki, K. Kubo-Irie, M. Shimizu, M. Oyabu, T. Tainaka, H. Yanagita, S. Takeda, K. Effect of titanium dioxide nanoparticle transferred from pregnant mice to their offspring on urinary and cranial nerve systems. The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012) Beijing, China. September 4-7,2012.
11. Tachibana, K. Takahashi, Y. Kuroiwa, N. Oba, T. Umezawa, M. Takeda, K. Effects of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles on dopaminergic systems in mice. The 6th International Conference on Nanotoxicology (Nanotoxicology 2012) Beijing, China. September 4-7,2012.
12. 小平伊織、立花 研、卯月 諒、黒岩法子、新海雄介、武田 健、血中マイクロ RNA をバイオマーカーとする化学物質の新規安全性評価手法開発の試み、第 4 回日本 RNAi 研究会、広島、2012 年 8 月 30～9 月 1 日
13. 小島稔郁、立花 研、黒岩法子、新海雄介、武田 健、妊娠期の酸化チタンナノ粒子曝露による胎仔、胎盤のマイクロ RNA 発現量の変動の解析、第 4 回日本 RNAi 研究会、広島、2012 年 8 月 30～9 月 1 日
14. 梅澤雅和、難波美帆、武田 健、ナノ粒子の次世代健康影響 ーリスクコミュニケーション課題の事例として（課題研究 “情報提供者の懸念に応えるリスク・コミュニケーションの開発とそのプロセス”）日本科学教育学会第 36 回年会 東京大会、東京、2012 年 8 月 27～29 日

15. Umezawa M, Oyabu T, Suzuki K, Kubo-Irie M, Kudo S, Uchiyama M, Niki R, Tachibana K, Takeda K. Effect of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on collagen expression in the kidney of offspring. The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (AsiaTox VI). Sendai, Japan. July 17-20, 2012.
16. Umezawa M, Oyabu T, Kudo S, Yanagita S, Niki R, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Effect of prenatal exposure to carbon and titanium dioxide nanoparticle on gene expression in the kidney of offspring. 23rd European Congress on Perinatal Medicine (XXIII ECPM) .Paris, France. Jun 13-16, 2012.
17. Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development -- Brain region information. PPTOXIII (the 3rd International Conference on Prenatal Programming and Toxicology), CCT (Contemporary Concepts in Toxicology) Meeting, SOT (Society of Toxicology) .Paris, France. May 14-16, 2012.
18. Shimizu R, Umezawa M, Uchiyama M, Okamoto S, Niki R, Ogawa S, Watanabe S, Abe R, Takeda K. Fetal exposure to carbon nanoparticle altered development of the neonatal immune system. PPTOXIII (the 3rd International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity), CCT (Contemporary Concepts in Toxicology) Meeting, SOT (Society of Toxicology). Paris, France. May 14-16, 2012.
3. 招待講演
1. 武田 健、早稲田大学夏期集中ワークショップ「リスク評価」、平成 24 年 8 月 11 日、早稲田大学 「ナノ粒子の次世代健康影響」
 2. 武田 健、知の市場～アスベストとナノ材料のリスク管理の比較研究、平成 24 年 12 月 6 日、早稲田大学「ナノ材料の次世代健康影響—評価とその対策」
 3. 武田 健、第 51 回 市民科学講座 <特別シンポジウム> ナノ粒子の健康リスク～母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に～、平成 25 年 2 月 23 日、東京「ナノ粒子の健康リスク～母子伝達と次世代影響」
 4. Tachibana K, Prenatal exposure to diesel exhaust affects central nervous system of offspring in mice. Ken Tachibana, Kohei Takayanagi, Ayame Akimoto, Koji Ueda, Yusuke Shinkai, Ken Takeda. 1st International Postgraduate Conference 2012, Malaysia, Jun. 2012.
 5. 梅澤雅和、ナノ粒子の健康リスク 私たちはいかにリスクを回避できるのか、市民科学研究室：特別シンポジウム「ナノ粒子の健康リスク ～母子伝達と次世代影響、リスク管理を軸に～」、東京、2013
- 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 24 年度分担研究報告書

霊長類における影響評価手法の開発

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:今年（H24 年）度は生体影響・リスクの発現機序に関する研究を進め、DNA マイクロアレイ／トランスクリプトミクス解析し以下の成績を得た。i) 皮内投与されたナノマテリアルによって、近傍リンパ節のマクロファージにおけるアポトーシスとファゴサイトーシスを亢進し、免疫機能を顕著に変調することが示された。ii) リンパ節での遺伝子発現の転写過程に影響し、スプライシング異常に伴う機能遺伝子の転写障害がに繋がること示唆された。iii) クエン酸代系の主要遺伝子の発現抑制を起因とするミトコンドリア機能障害ならびにエネルギーバランス失調の可能性が示唆された。

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）

研究目的

本研究では、ヒトのモデルとしてヒトと医生物学的特性が近似するサル類（マカクサル）を駆使して、ナノマテリアルの生体影響・リスクの発現機序を遺伝子・分子レベルで明らかにし、その成果を基に、ナノマテリアルの生体影響評価系の開発を図る。

本年（H24）度の研究では、生体影響・リスク発現の分子機序を明らかにするために、生体影響の高感受性集団であるサル新生仔にナノマテリアル（CB、TiO₂ 等）を投与し、免疫・生体防御系への影響について、投与部位ならびに近傍リンパ節における機能遺伝子の発現変動を DNA マイクロアレイ／トランスクリプトミクスを用いて網羅的に解析した。

また、本年度の研究を基に、ヒトへの

外挿性の高い生体影響評価系の検討も進めた。

研究方法

トランスクリプトミクス解析:

アカゲザル新生仔を用い、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序を明らかにした。

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。

研究成果

ナノマテリアル生体影響の分子機序：

サル新生仔のリンパ節における結果が特徴的で、Gene Set Enrichment Analysis (GSEA) および Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) などを活用したトランスクリプトミクスから、ナノマテリアルの作用機序として以下の点が明らかとなった。

1) ubiquitin 関連のタンパク質分解系遺伝子が発現亢進し、ナノマテリアルによって、リンパ節マクロファージにおけるアポトーシスとファゴサイトーシスが促進され、免疫機能の変調要因となる事が示唆された。

2) 遺伝子発現の転写過程におけるスプライス関連遺伝子が発現亢進し、スプライシング反応の促進と多様化による転写異常に繋がる事が示唆された。

3) クエン酸代謝系において興味深い発現変動が見られ、ACO2 遺伝子の発現亢進ならびに SDHC 及び SUCLG2 遺伝子の発現抑制を起因とするミトコンドリア機能障害ならびにエネルギーバランス失調の可能性が示唆された。

結論

ナノマテリアルによる生体影響の高感受性モデルとして、アカゲザル新生仔を用い、ナノマテリアルの及ぼす生体影響の分子機序を DNA マイクロアレイを駆使したトランスクリプトミクス解析した。その結果を基に、ヒトへの外挿性のあるナノマテリアル生体影響評価手法を検討した。

研究発表

1) Takenaka A, Inoue-Murayama M, Uono T, Suryobroto B: Human-Specific SNP in Obesity Genes, Adrenergic Receptor Beta2 (ADRB2), Beta3 (ADRB3), and PPAR c2(PPARG), during Primate Evolution, PLOS ONE August 2012 | Volume 7 | Issue 8 | e4346.

2) Nakamura S, Mitsunaga F, Sugamata M, Isowa K, Takeda K: Induction of Allergic Chemokines, CCL18 and Chitinase 1, by Nanomaterials in a Monkey Model, Jpn. J. Allergol., 61 (9-10), 1427 (2012).

3) Mitsunaga F, Nakamura S, Matsuura K, Isowa K: Studies on Molecular Mechanism of Atopic Dermatitis in NC/Nga Mice Using Transcriptomics/ DNA Chip, Exp. Anim., 61(3), 337 (2012).

4) 中村 伸¹⁾、光永総子、代替医療の新たな評価系：腸内細菌叢の動態とそのゲノミクス解析、第 15 回日本代替医療学会、東京 (2012) .

Letter

Effect of fetal exposure to titanium dioxide nanoparticle on brain development – brain region information

Masakazu Umezawa^{1,2}, Hitoshi Tainaka¹, Natsuko Kawashima², Midori Shimizu²
and Ken Takeda^{1,2}

¹The Center for Environmental Health Science for the Next Generation, Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba 278-8510, Japan

²Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda, Chiba, Japan

(Received July 31, 2012; Accepted August 22, 2012)

ABSTRACT — The production of man-made nanoparticles is increasing in nanotechnology, and health effect of nanomaterials is of concern. We previously reported that fetal exposure to titanium dioxide (TiO₂) affects the brain of offspring during the perinatal period. The aim of this study was to extract candidate brain regions of interest using a specific group of Medical Subject Headings (MeSH) from a microarray dataset of the whole brain of mice prenatally exposed to TiO₂ nanoparticle. After subcutaneous injection of TiO₂ (total 0.4 mg) into pregnant mice on gestational days 6-15, brain tissues were collected from male fetuses on embryonic day 16 and from male pups on postnatal days 2, 7, 14 and 21. Gene expression changes were determined by microarray and analyzed with MeSH indicating brain regions. As a result, a total of twenty-one MeSH were significantly enriched from gene expression data. The results provide data to support the hypothesis that prenatal TiO₂ exposure results in alteration to the cerebral cortex, olfactory bulb and some regions intimately related to dopamine systems of offspring mice. The genes associated with the striatum were differentially expressed during the perinatal period, and those associated with the regions related to dopamine neuron system and the prefrontal region were dysregulated in the later infantile period. The anatomical information gave us clues as to the mechanisms that underlie alteration of cerebral gene expression and phenotypes induced by fetal TiO₂ exposure.

Key words: Titanium dioxide, Nanoparticle, Brain region, Medical Subject Headings, Microarray, Dopamine system

INTRODUCTION

Nanocrystalline titanium dioxide (nano-TiO₂) is an important material used in commerce and can be found in paints, cosmetics, food additives and implanted biomaterials. The activity level of nanoparticles is higher than that of fine or bulk-sized particles (Beydoun *et al.*, 1999; Jang *et al.*, 2001; Sager *et al.*, 2008), and its possibly detrimental health effects are of concern (Borm *et al.*, 2006). With the increase in large scale production of manufactured nanoparticles, the potential occupational and public exposure to manufactured nanoparticles has aroused concern because of their large surface areas and the ability to deposit in the body (Oberdorster *et al.*, 2005). Evaluating the mechanisms underlying the hazards associated with

TiO₂ nanoparticles is vital for risk assessments (Johnston *et al.*, 2009).

TiO₂ has three structural isoforms, anatase, rutile and brookite. Since the anatase form of TiO₂ was reported to be toxic than the rutile form (Sayes *et al.*, 2006), we previously examined the effects of fetal exposure to anatase-formed nano-TiO₂ on the central nervous system in a mouse model. Transfer of nano-TiO₂ from pregnant mother mice to fetal brains was determined using field emission-scanning electron microscope/energy dispersive X-ray spectroscopy in 2009 (Takeda *et al.*, 2009). A subsequent study showed that exposure of pregnant mice to nano-TiO₂ altered central dopaminergic system in offspring (Takahashi *et al.*, 2010). Transfer of nano-TiO₂ administered to pregnant mice to fetal brain as well

as fetal liver was also reported (Yamashita *et al.*, 2011). A previous study conducted microarray analysis of gene expression change the whole brain of neonatal mice (ED 16-PND 21) by fetal nano-TiO₂ exposure, and showed dysregulation of genes associated with apoptosis, brain development, oxidative stress and neurotransmitters (Shimizu *et al.*, 2009). However, since the data was provided from samples of whole brains, it was not possible to obtain information on the brain regions that were of importance.

Here, we propose that a method of analysis using a selected group of Medical Subject Headings (MeSH) vocabulary, a controlled vocabulary produced by the National Library of Medicine (Bethesda, MD, USA), which can provide anatomical information from dysregulated gene group. In the present study, the genes dysregulated in the brain by fetal TiO₂ exposure were categorized by MeSH that indicates brain regions. The aim of the present study was to show candidate brain regions of interest for the effects of maternal TiO₂ exposure on the development of central nervous system based on a microarray data.

MATERIALS AND METHODS

Titanium dioxide nanoparticle

Anatase TiO₂ nanopowder (particle size 25-70 nm; surface area 20-25 m²/g; Sigma-Aldrich Japan Inc., Tokyo, Japan) was suspended at 1 mg/ml in saline (Otsuka Pharmaceutical Factory Inc., Tokushima, Japan) containing 0.05% (v/v) Tween 80. The suspension was sonicated for 30 minutes immediately before administration.

Animals and treatments

Twenty-nine pregnant ICR mice (Japan SLC Inc., Shizuoka, Japan) were housed in a room under controlled temperature (23 ± 1°C), humidity (55 ± 5%) and light (12 hr light/12 hr dark cycle with light on at 8:00 a.m.) with *ad libitum* access to food and water. All animals were handled in accordance with national guidelines for the care and use of laboratory animals and with the approval of Tokyo University of Science's Institutional Animal Care and Use Committee. They were randomly divided into fetal TiO₂ exposure group ($n = 15$) and control group ($n = 14$). TiO₂ (100 µg/time) suspension was injected subcutaneously into pregnant mice of the exposure group four times on gestational days 6, 9, 12 and 15 for exposure group, while vehicle alone (100 µl/time) was injected into those of the control group.

Preparation of microarray data

Brain tissues were collected from male fetuses on embryonic day (ED) 16 and from male pups on postnatal days (PNDs) 2, 7, 14 and 21. From the whole brain samples, total RNA was isolated and pooled for each group, purified and reverse-transcribed to yield complementary DNA and then labeled with the fluorescent dyes Cy3 and Cy5. The generated targets were hybridized to an NIA mouse 15 K Microarray v2.0 (AGC Techno Glass Co., Ltd., Chiba, Japan). The microarray scan output images were normalized and signal quantification was performed according to the MIAME guidelines (Brazma *et al.*, 2001). Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA); $P < 0.05$ was considered statistically significant.

Analysis of microarray data with Medical Subject Headings

A total of 87 MeSH associated with brain regions were selected (Supplementary Table 1) and these 83 MeSH were mapped to the 2,037 genes on the microarray using the gene reference database PubGene (Pub Gene AS, Oslo, Norway), which can determine the literature co-occurrences between genes and the medically functional terms (MeSH) (Jenssen *et al.*, 2001). The annotation was updated in October, 2009. The genes for which dysregulation was detected were categorized with MeSH. The enrichment factor for each category was defined as $(nf/n)/(Nf/N)$, where nf is the number of differentially expressed genes within the category; n is the total number of genes within that same category; Nf is the number of differentially expressed genes categorized by any categories on the entire microarray; and N is the total number of genes categorized by any categories on the microarray. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test with hypergeometric distribution and the level of statistical significance was set at $P < 0.05$. The method was based on a principle of gene set enrichment analysis to interpret complex microarray data (Subramanian *et al.*, 2005).

RESULTS

Microarray analysis

2,037 genes on the microarray were annotated by 83 MeSH related to brain regions by the PubGene. Significant expression changes were detected in 78 genes in fetal brains (23 upregulated genes; 55 downregulated genes) at ED 16, and 158 genes (31 upregulated; 127 downregulated), 70 genes (64 upregulated; 6 downregulated), 138 genes (70 upregulated; 68 downregulated) and 262 genes (181 upregulated; 81 downregulated) in the brains of off-

Target brain regions of prenatal nano-TiO₂ exposure**Table 1.** Significantly enriched MeSH categories of dysregulated genes in the maternal TiO₂-exposed group vs. control group

Age at specimen collection	MeSH category	Enrichment factor	<i>P</i> value
Embryonic day 16	Corpus Striatum	1.48	0.04
Postnatal day 2	Cerebral Aqueduct	6.45	0.03
	Olfactory Bulb	1.39	0.03
	Entorhinal Cortex	1.59	0.03
	Hippocampus	1.10	0.04
Postnatal day 7	Basal Ganglia	3.64	0.004
	Lateral Ventricles	2.97	0.02
	Frontal Lobe	2.39	0.03
	Neostriatum	2.39	0.03
	Hypothalamic Area, Lateral	2.60	0.03
	Substantia Nigra	1.77	0.04
Postnatal day 14	Olfactory Bulb	1.75	0.003
	Trigeminal Caudal Nucleus	5.54	0.01
	Caudate Nucleus	2.25	0.02
	Hippocampus	1.16	0.03
	Cerebrum	4.03	0.03
	Neostriatum	1.82	0.03
	Corpus Striatum	1.31	0.04
	Amygdala	1.64	0.04
Postnatal day 21	Prefrontal Cortex	1.86	0.02
	Entorhinal Cortex	1.52	0.02
	Trigeminal Nucleus, Spinal	1.13	0.03
	Cerebellar Cortex	1.44	0.03
	Hippocampus	1.06	0.04
	Olivary Nucleus	1.88	0.04
	Corpus Striatum	1.16	0.04
	Pyramidal Cells	1.27	0.04
	Hypothalamus, Anterior	1.16	0.05

The enrichment factor for each category was defined as $(nf/n)/(Nf/N)$, as described in the Materials and Methods. Statistical analysis was performed using Fisher's exact test with hypergeometric distribution.

spring at PNDs 2, 7, 14 and 21, respectively.

Categorization of microarray data using brain-region specific MeSH

Of the genes expressed differentially in the fetal TiO₂ exposure group, one MeSH category was significantly enriched in the brain at ED 16, whereas 4, 6, 8 and 9 MeSH categories were significantly enriched at PNDs 2, 7, 14 and 21, respectively (Table 1). "Corpus Striatum" was enriched on ED 16 and on PND 14 and 21. The largest group was "Hippocampus" on PND 2 (62 genes), 14 (57 genes) and 21 (99 genes). The second largest group was "Olfactory Bulb" on PND 2 (20 genes) and 14 (22

genes). "Basal Ganglia", "Frontal Lobe", "Neostriatum" (PND 7) and "Cerebrum" (PND 14) were strongly enriched (enrichment factor > 2) (Table 1, Fig. 1). The categories "Corpus Striatum" (ED 16), "Basal Ganglia", "Frontal Lobe", "Substantia Nigra" (PND 7) and "Neostriatum" (PND 14) were significantly enriched of upregulated genes in the fetal TiO₂-exposed group (Supplementary Table 2). "Olfactory Bulb" (PND 2 and 14), "Hippocampus" (PND 2, 14 and 21) and "Cerebrum" (PND 14) were significantly enriched of downregulated genes in the exposure group (Supplementary Table 3).

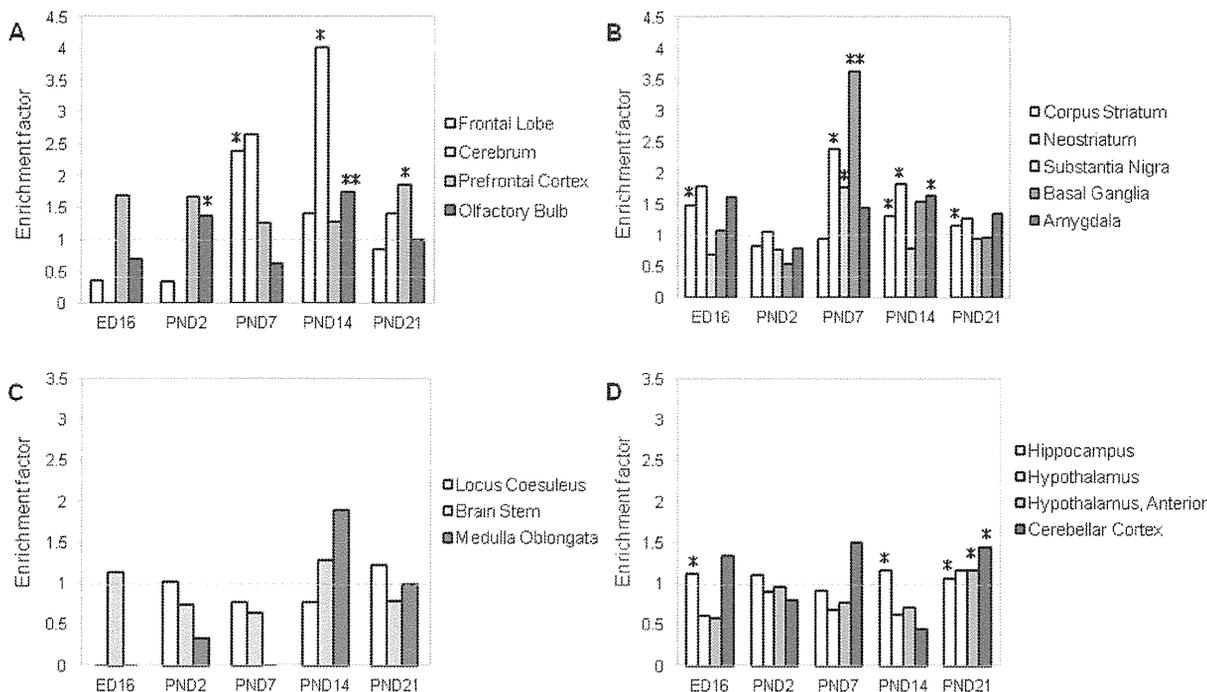


Fig. 1. Time-dependency of enrichment of each MeSH from genes dysregulated by maternal TiO₂ exposure. MeSH data indicating brain regions closely associated with (A) telencephalon, (B) dopamine neuron system, (C) noradrenaline and serotonin neuron system and (D) others of strong interest. The enrichment factor for each category was defined as $(n/n)/(N/N)$, as described in the Materials and Methods.

DISCUSSION

The developmental toxicity is one of the major emerging issues on the hazard of nanomaterials (Fujitani *et al.*, 2012). Previous animal experiments suggested that the administration of a suspension of nano-TiO₂ to pregnant mothers affects the various organs including central nervous system of offspring (Takeda *et al.*, 2009; Takahashi *et al.*, 2010; Yamashita *et al.*, 2011; Shimizu *et al.*, 2009; Hougaard *et al.*, 2010). The present study employed a method for determining which MeSH categories indicating brain regions were enriched of genes differentially expressed by fetal nano-TiO₂ exposure. As a result, the categories associated with the striatum (ED 16, PND 7 and 14), olfactory bulb (PND 2 and 14) and cerebral cortex (PND 7, 14 and 21) were enriched as expected (Figs. 1A, B). Pathological evaluation showed apoptosis of mitral cells in the olfactory bulb and an accumulation of TiO₂ particles in the olfactory bulb and the cerebral cortex in a previous study (Takeda *et al.*, 2009). A later study showed an increase in the levels of a neurotrans-

mitter, dopamine, and its metabolites in the striatum and the cerebral cortex (Takahashi *et al.*, 2010). The observation was consistent with the data of the present study which showed an association with the MeSH terms of the regions closely related to the dopamine system; the substantia nigra (PND 7), basal ganglia (PND 7) and amygdala (PND 14) (Fudge and Emiliano, 2003) (Fig. 1B). The results suggest that gene expression changes in the brains of developing offspring mice may precede the changes in pathology (Takeda *et al.*, 2009) and monoamine levels (Takahashi *et al.*, 2010) observed in 6-week-old offspring mice. Other terms related to the noradrenaline and serotonin neuron system such as the locus coeruleus, brainstem and medulla oblongata were not enriched at any point through ED16-PND21 (Fig. 1C). Additionally, an enrichment analysis was conducted using sets of upregulated and downregulated genes separately. The results showed that downregulated genes were enriched in the olfactory bulb (PND 2 and 14), whereas upregulated genes were enriched in the dopamine-related regions including corpus striatum, neostriatum, basal ganglia and

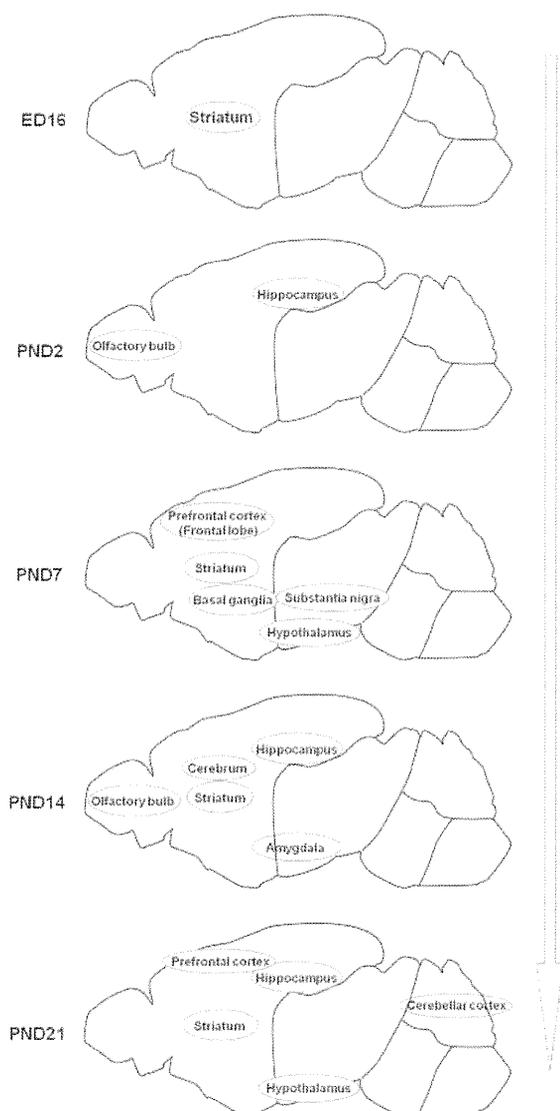
Target brain regions of prenatal nano-TiO₂ exposure

Fig. 2. Summary of the extracted MeSH terms indicative of brain regions among dysregulated genes in the maternal TiO₂ exposure group.

substantia nigra (ED 16, PND 7, 14 and 21). The analysis also revealed that the genes associated with the striatum were altered during the perinatal period, and those associated with regions related to the dopamine neuron system and the prefrontal region were dysregulated in the later infantile period (Fig. 2). These data gave us some clues as to the mechanisms that underlie cerebral gene expression changes by fetal TiO₂ exposure.

The method presented in this paper showed interesting novel categories that deserve further exploration including the hippocampus, hypothalamus and cerebellar cortex (Fig. 1D). There are reports that inhaled or injected particulate matter enters the systemic circulation (Takenaka *et al.*, 2001) and reaches various tissues including the brain (Kreyling *et al.*, 2002; Oberdorster *et al.*, 2002). The hippocampus has been reported as a target region of the effects of fetal exposure to environmental particulate matter (diesel exhaust particles) in a pathological study (Sugamata *et al.*, 2006a) and by the evaluation of monoamine levels (Suzuki *et al.*, 2010). The cerebellum is another target of particulate matter including inhaled diesel exhaust particles (Sugamata *et al.*, 2006b) and carbon nanoparticles (Oberdorster *et al.*, 2004). The hypothalamus lacks an effective blood-brain barrier and its fenestration allows for the easy passage of substances in the blood (Harre *et al.*, 2002). However, the enrichment factors of MeSH terms related to these brain regions were relatively low (< 2) and therefore the regions were less likely to be targets of fetal nano-TiO₂ exposure. The difference in the regions affected between both nanoparticles of diesel exhaust particles and TiO₂ may be caused by their difference in chemical composition.

In conclusion, the present study showed anatomical information extracted from a dataset of gene expression in the whole brain of mice prenatally exposed to nano-TiO₂ using a specific group of MeSH related to brain regions. The result showed that the principle of analysis using a selected group of MeSH can provide anatomical information in the interpretation of microarray results. The analysis provides data to support the hypothesis that maternal TiO₂ exposure results in alteration to the cerebral cortex, olfactory bulb and the regions intimately related to dopamine systems of offspring mice.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by a Grant-in-Aid for Health and Labour Science Research Grants, Research on Risk of Chemical Substances, from the Ministry of Health, Labour and Welfare, a Grant-in Aid from the Private University Science Research Upgrade Promotion Business Academic Frontier Project, and a Grant-in-Aid for Young Scientists (B) (Masakazu Umezawa, 24790130).

REFERENCES

- Beydoun, D., Amal, R., Low, G. and McEvoy, S. (1999): Role of nanoparticles in photocatalysis. *J. Nanopart. Res.*, **1**, 439-458.
 Borm, P.J., Robbins, D., Haubold, S., Kuhlbusch, T., Fissan, H., Donaldson, K., Schins, R., Stone, V., Kreyling, W., Lademann,

- J., Krutmann, J., Warheit, D. and Oberdorster, E. (2006): The potential risks of nanomaterials: a review carried out for ECE-TOC. Part. Fibre Toxicol., **3**, 11.
- Brazma, A., Hingamp, P., Quackenbush, J., Sherlock, G., Spellman, P., Stoeckert, C., Aach, J., Ansorge, W., Ball, C.A., Causton, H.C., Gaasterland, T., Glenisson, P., Holstege, F.C., Kim, I.F., Markowitz, V., Matese, J.C., Parkinson, H., Robinson, A., Sarkans, U., Schulze-Kremer, S., Stewart, J., Taylor, R., Vilo, J. and Vingron, M. (2001): Minimum information about a microarray experiment (MIAME)-toward standards for microarray data. Nat. Genet., **29**, 365-371.
- Fudge, J.L. and Emiliano, A.B. (2003): The extended amygdala and the dopamine system: another piece of the dopamine puzzle. J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci., **15**, 306-316.
- Fujitani, T., Ohyama, K., Hirose, A., Nishimura, T., Nakae, D. and Ogata, A. (2012): Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. J. Toxicol. Sci., **37**, 81-89.
- Harre, E.M., Roth, J., Pehl, U., Kueth, M., Gerstberger, R. and Hubschle, T. (2002): Selected contribution: role of IL-6 in LPS-induced nuclear STAT3 translocation in sensory circumventricular organs during fever in rats. J. Appl. Physiol., **92**, 2657-2666.
- Hougaard, K.S., Jackson, P., Jensen, K.A., Sloth, J.J., Loschner, K., Larsen, E.H., Birkedal, R.K., Vibenholt, A., Boisen, A.M., Wallin, H. and Vogel, U. (2010): Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. Part. Fibre Toxicol., **7**, 16.
- Jang, H.D., Kim, S.K. and Kim, S.J. (2001): Effect of particle size and phase composition of titanium dioxide nanoparticles on the photocatalytic properties. J. Nanopart. Res., **3**, 141-147.
- Jenssen, T.K., Laegreid, A., Komorowski, J. and Hovig, E. (2001): A literature network of human genes for high-throughput analysis of gene expression. Nat. Genet., **28**, 21-28.
- Johnston, H.J., Hutchison, G.R., Christensen, F.M., Peters, S., Hankin, S. and Stone, V. (2009): Identification of the mechanisms that drive the toxicity of TiO₂ particulates: the contribution of physicochemical characteristics. Part. Fibre Toxicol., **6**, 33.
- Kreyling, W.G., Semmler, M., Erbe, F., Mayer, P., Takenaka, S., Schulz, H., Oberdorster, G. and Ziesenis, A. (2002): Translocation of ultrafine insoluble iridium particles from lung epithelium to extrapulmonary organs is size dependent but very low. J. Toxicol. Environ. Health A, **65**, 1513-1530.
- Oberdorster, G., Oberdorster, E. and Oberdorster, J. (2005): Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. Environ. Health Perspect., **113**, 823-839.
- Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W. and Cox, C. (2004): Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. Inhal. Toxicol., **16**, 437-445.
- Oberdorster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Lunts, A., Kreyling, W. and Cox, C. (2002): Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. J. Toxicol. Environ. Health A, **65**, 1531-1543.
- Sager, T.M., Kommineni, C. and Castranova, V. (2008): Pulmonary response to intratracheal instillation of ultrafine versus fine titanium dioxide: role of particle surface area. Part. Fibre Toxicol., **5**, 17.
- Sayes, C.M., Wahi, R., Kurian, P.A., Liu, Y., West, J.L., Ausman, K.D., Warheit, D.B. and Colvin, V.L. (2006): Correlating nanoscale titania structure with toxicity: a cytotoxicity and inflammatory response study with human dermal fibroblasts and human lung epithelial cells. Toxicol. Sci., **92**, 174-185.
- Shimizu, M., Tainaka, H., Oba, T., Mizuo, K., Umezawa, M. and Takeda, K. (2009): Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. Part. Fibre Toxicol., **6**, 20.
- Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S. and Mesirov, J.P. (2005): Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **102**, 15545-15550.
- Sugamata, M., Ihara, T., Sugamata, M. and Takeda, K. (2006b): Maternal exposure to diesel exhaust leads to pathological similarity to autism in newborns. J. Health Sci., **52**, 486-488.
- Sugamata, M., Ihara, T., Takano, H., Oshio, S. and Takeda, K. (2006a): Maternal diesel exhaust exposure damages newborn murine brains. J. Health Sci., **52**, 82-84.
- Suzuki, T., Oshio, S., Iwata, M., Saburi, H., Odagiri, T., Udagawa, T., Sugawara, I., Umezawa, M. and 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.
- Takahashi, Y., Mizuo, K., Shinkai, Y., Oshio, S. and Takeda, K. (2010): Prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticles increases dopamine levels in the prefrontal cortex and neostriatum of mice. J. Toxicol. Sci., **35**, 749-756.
- Takeda, K., Suzuki, K., Ishihara, A., Kubo-Irie, M., Fujimoto, R., Tabata, M., Oshio, S., Nihei, Y., Ihara, T. and Sugamata, M. (2009): Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. J. Health Sci., **55**, 95-102.
- Takenaka, S., Karg, E., Roth, C., Schulz, H., Ziesenis, A., Heinzmann, U., Schramel, P. and Heyder, J. (2001): Pulmonary and systemic distribution of inhaled ultrafine silver particles in rats. Environ. Health Perspect., **109 Suppl. 4**, 547-551.
- Yamashita, K., Yoshioka, Y., Higashisaka, K., Mimura, K., Morishita, Y., Nozaki, M., Yoshida, T., Ogura, T., Nabeshi, H., Nagano, K., Abe, Y., Kamada, H., Monobe, Y., Imazawa, T., Aoshima, H., Shishido, K., Kawai, Y., Mayumi, T., Tsunoda, S., Itoh, N., Yoshikawa, T., Yanagihara, I., Saito, S. and Tsutsumi, Y. (2011): Silica and titanium dioxide nanoparticles cause pregnancy complications in mice. Nat. Nanotechnol., **6**, 321-328.

ナノ粒子の次世代健康影響 –リスクコミュニケーション課題の事例として
 Health Effects of Nanoparticle on the Next Generation
 – An Emerging Issue of Risk Communication

○梅澤 雅和*, 難波 美帆**, 武田 健*
 UMEZAWA Masakazu*, NAMBA Miho**, TAKEDA Ken*
 *東京理科大学, **早稲田大学
 *Tokyo University of Science, **Waseda University

[要約] ナノ粒子のリスクは、分析技術の不十分さや不確実性の存在から評価・管理の実施が容易でない問題の一つである。我々は、ナノ粒子の実際的かつ効率的なリスク管理を早期に実現させる上でリスクコミュニケーションの担う役割に期待を寄せ、リスクコミュニケーションの検討事例としてナノ粒子のリスク評価について話題提供を行う。

[キーワード] ナノテクノロジー, リスクコミュニケーション, リスク管理, 有害性評価, 不確実性

1. 研究の背景と目的

ナノテクノロジーの発展に伴い、様々なナノマテリアルが応用されようとしている。その一方で、ナノマテリアルの持つ新規な性質が生体に意図しない有害影響を及ぼす可能性が指摘され、そのリスク管理を実施するための研究や議論が国際的に活発になっている。

ナノマテリアル(ナノ粒子)のリスク管理を実施するためには、ナノ粒子の有害性評価だけでなく、体内動態を明らかにしたり、曝露評価(実際に人が生活の中でどれだけの量のナノ粒子に曝露される可能性があるかを推算すること)を行ったりすることが必要とされる。ここで、ナノ(10⁻⁹ 乗)メートルオーダーの大きさを持つナノ粒子について曝露量や体内動態を明らかにするためには、種々の試料中のナノ粒子を定量的に分析する方法が必要である。しかし、その分析法は不十分であるのが現状である。また、ナノ粒子の有害性を評価する上では、それに必要な評価指標自体が未確立であり、リスク評価に活用可能な指標の探索研究が進められているのも現状である。

あるリスクを評価するための技術や知見が十分ではない中で、その有害性の情報が蓄積され議論が進められることは、感情的な議論などを引き起こす一因となり得る。そのような状況は、効率的なリスク評価やその結果に基づくリスク管理の実施を妨げることを生み出しかねないことを、過去のリスクコミュニケーション事例は示唆している。しかし、リスク管理の目的は人が害を被ることを予防するための措置であるということを考慮に入れると、たとえリスクとなり得る物質の分析技術が不十分であるという状況でも、その有害性の議論の放棄が許されるわけではないと考えられる。元来、有害性(ハザード)評価やリスク評価は実験により結果

の得られるものであり、その結果は常に不確実性を内包している。

以上に挙げた技術の不十分さや不確実性の存在は、その情報が議論の基となるデータに付随していない場合にリスクコミュニケーションの妨げになる恐れがあると我々は考えた。我々は、リスク管理を早期に実現させる上でリスクコミュニケーションの担う役割に期待を寄せ、リスクコミュニケーションの検討事例としてナノ粒子のリスク評価について話題提供を行った。

2. 話題提供の方法

ナノ粒子の有害性評価およびリスク評価に関する話題提供を、2012年8月10日~12日に早稲田大学において開催されたサイエンス・メディア・センター夏期集中ワークショップ 2012(本課題研究の難波、石村の稿を参照)において実施した。その内容は以下の通りである。

近年発達著しいナノテクノロジーの中で、ナノ粒子の生産量が増加している。ナノ粒子は、ナノ(10⁻⁹ 乗)メートルオーダーのサイズを持つ超微小粒子で、サイズの持つ特徴が独特の反応性をもたらすために産業応用への期待が高い。

一方で、ナノ粒子により引き起こされる健康影響が懸念されており、大気中の浮遊粒子状物質(SPM)を対象として健康影響の研究が進められてきた。はじめに、大気中のSPM濃度と呼吸器疾患の発生率や心血管疾患による死亡者数との間に正の相関があることが明らかになった。次いで、健康影響に大きく寄与するものが特にサイズの小さな粒子であることが明らかとなり、2000年頃からナノ粒子の健康影響が指摘され始めた。

それ以降、動物モデルを用いた研究では、ナノ粒子が呼吸器系や心血管系に留まらず、様々な生体組織に影響を与える可能性が報告された。東京理科大学・武田健らの研究グループは、マウスを用いた実験により、ナノ粒子が子宮内の胎児発達にも影響を与え、出生後の個体の脳や雄性生殖器などの様々な組織に異常を生じさせることを明らかにした。まず、妊娠マウスの皮下に投与した酸化チタンナノ粒子が胎児に移行し、出生後の脳や精巣組織に検出されることを、2009年に報告した。この報告は、工業用に用いられるナノ粒子が妊娠マウスから胎児に移行することを、電子顕微鏡とX線スペクトル解析とを組み合わせた技術により初めて示したものである。続いて、同様のナノ粒子曝露が次世代マウスの脳の機能的変化や、雄性生殖器における精子形成障害を引き起こすことも明らかにした。

ナノ粒子を扱う労働者や、ナノ製品を使用する消費者の健康被害を防ぐために、ナノ粒子のリスク管理を早期に実現することが望まれる。

3. 今後の課題

ナノ粒子およびナノテクノロジーのリスクを管理しようとする議論は国内外で進んでいる。しかし、ナノ粒子のリスク評価は、未だリスク管理を実現できる程度に至っているとは言いがたい。その理由には以下の例が挙げられる。

- 1) サイズによる有害性発現についての検討が不十分なデータが多い。(本当に“ナノサイズであるから”有害であるのか否かが判断し難い。)
- 2) ナノ粒子曝露による次世代影響について、用量の検討がなされていないデータが多い。
- 3) リスク評価において、“次世代影響”(生殖発生毒性)が、一般毒性よりもより低用量の曝露で起こるのかが不明である。
- 4) リスク評価に際して一般的に必要とされる、ナノ粒子の体内への吸収率や体内動態のデータが不十分である。生体内のナノ粒子の分布について定量的なデータを得ることは、定量性や検出力の限界などの技術的な面からも困難である。
- 5) 各々のマテリアルの曝露が、どの場面で問題になるのかについて整理が必要である。
- 6) 実験で示されたマウスの有害性が、ヒトに適用できるのか否かの検討が不十分である。実験的データの不確実性についても配慮が必要である。

リスク管理は健康影響の予防措置として実施されることを望まれる。より不確実性の小さい科学的

データの収集と併せて、実際的かつ効率的なリスク管理を早期に実現させるためにリスクコミュニケーションに期待を寄せ、我々は本課題研究においてもリスクコミュニケーションの検討事例としてナノ粒子のリスク評価について話題提供を行う。

[文献]

武田健ら: ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠早期曝露の子に及ぼす影響、薬学雑誌 13(2): 229-236 (2010)

[謝辞]

本稿で紹介したナノ粒子の健康影響の研究は、栃木臨床病理研究所・菅又昌雄所長をはじめ多くの共同研究者の協力の下に行われたもので、本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。

ナノ材料のリスクの情報提供に際する問題と対処法の抽出

Problems and solutions associated with risk communication of nanomaterials

○梅澤雅和¹, 難波美帆², 石村源生³, 武田健^{1,4}

Masakazu UMEZAWA, Miho NAMBA, Gensei ISHIMURA and Ken TAKEDA

Abstract. Propriety of the labeling “nano-product (nanomaterial use)” has been recently discussed internationally as well as in Japan. Each consumer (private citizens) will probably become a “risk manager” of nanomaterials, and therefore, communication of the risk of nanomaterials will increase. However, since risk evaluation of nanomaterials is still unsolved, attention should be paid to the process of communicating the risks and hazards of nanomaterials. In the present study, we focused on communicators’ anxiety and problems in the communication patterns related to emerging risks, and organized a workshop that aimed to visualize the anxiety, problems, and their solutions. This paper shows the results applied to the issues of risk communication related to nanomaterials.

Key Words: Nanomaterial, Risk communication, Consumer, Communicator, Anxiety

1. 研究の背景と目的

ナノ材料のハザード研究が進められ、リスク評価も進んできた現在、ナノ材料の環境中（労働環境を含む）への放出の規制や“ナノ製品”の表示により、リスクを管理しようとする動きが本格化している。ナノ材料のリスク管理の議論は EU において先進的であった。倫理・社会的問題といった観点からも、ナノ技術のリスクは課題になっている（Schulte ら、2007）。我が国でもナノ材料のリスク評価に向けた複数のプロジェクトが進み、

その成果も報告されつつある。それに伴い、ナノ材料の規制・リスク管理の問題は産業界における重要な議題の一つになっている。

近い将来、我が国でもナノ材料の消費者製品におけるナノ材料の使用表示を行おうという議論がある。これが実現すると、今まで以上に多くの市民が、ナノ材料のハザードやリスクの情報に触れることが予想される。そして、消費者である一般市民がナノ材料の“リスク管理者”となる状況が生じることも考えられる。これを踏まえると、“ナ

1 東京理科大学 総合研究機構 戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター (The Center for Environmental Health Science on the Next Generation, Research Institute for Science and Technology, Tokyo University of Science)

2 早稲田大学大学院 政治学研究科 ジャーナリズムコース (J-SCHOOL: Journalism School, Graduate School of Political Science, Waseda University)

3 北海道大学 高等教育推進機構 高等教育研究部 科学技術コミュニケーション教育研究部門 (CoSTEP: Communication in Science and Technology Education and Research Program, Hokkaido University)

4 東京理科大学 薬学部 衛生化学 (Department of Hygienic Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science)

ノ製品”の表示に関する議論に伴い、ナノ材料のリスクに関する情報提供についても十分な準備がなされる必要があると考えられる。ナノ材料のリスク情報が一般市民に十分に理解されないと、消費者に判断材料が十分に届かず、効率的かつ実際的なリスク回避が行われない可能性が考えられるためである。(すなわち、リスクが過大に受け止められてリスクを回避するために必要な投資が過大になることや、逆に、リスクが過小に受け止められ、実際にリスクが発生し得る場面での対応が取られないことなどが発生する恐れがある。)

ナノ材料のように、リスクが比較的広範囲に及ぶ可能性があり、かつ比較的大きな不確実性を孕むものの情報については、そのリスクの情報提供者も多く不安や懸念(ジレンマ状況)に遭遇することが予想される。このジレンマ状況が最も顕著に表れ、問題として顕在化した例が、2011年3月以降に発生した福島原子力発電所事故以降のリスクコミュニケーションであろう。これらのことを背景として、本研究は、不確実性を孕むリスクの知見の提供者が遭遇し得るジレンマ状況に焦点を当て、この問題と対処法を形式知化することを目的として実施した。我々は、リスクの情報提供者が遭遇し得るジレンマ状況の形式知化にあたり、情報提供者の不安・懸念・問題と対処法を見出すためのワークショップを実施した。ここでは、このワークショップから得られた成果をナノ材料のリスクの情報提供という事例に当てはめて報告する。

2. 研究方法(ワークショップの実施と話題提供)

ワークショップは、リスクコミュニケーションを学ぶ早稲田大学大学院集中演習の中で、ジャーナリズムコースの学生と、一般社団法人サイエンス・メディア・センター夏期集中ワークショップ参加者の協力の下で実施した。このグループワークにより、参加者の経験知の可視化を経て、リスクコミュニケーションにおけるジレンマ状況(不安・懸念)として問題と対処案をセットとした「基本パターン集」を作成することを目指した(難波ら、2012)。

本ワークショップの参加者に対して、ナノ粒子の有害性評価およびリスク評価に関する話題提供を武田が実施した。その内容は、要約すると以下の通りである。①ナノ材料が、妊娠中個体から次世代の子の体内に移行すること(Takedaら、2009)。

②ナノ材料の妊娠期曝露が、仔の中枢神経系発達の過程で様々な影響を及ぼすこと。③その影響が疾患(原因不明とされるものを含む)とどのような関わりをもつか、今後の研究課題であること。④これらの知見が、培養細胞ではなく動物個体を観察することにより得られたものであること。⑤重大な有害事象が起こる可能性を、予防的措置により回避したいということ。(武田ら、2010)

ワークショップでは、ナノ材料のリスクの問題に加えて、参加者各々の経験を題材にしたジレンマ状況のパターン抽出を実施した。これにより、リスク物質・材料・技術というコンテンツに依存しないパターンの抽出を目指した。

3. 研究成果

本ワークショップでは、「リスクの知見の提供者が遭遇し得る懸念や問題」と「対処案」について計60のパターンを得ることができた。そのうち、

表 1. ナノ材料のリスクの情報提供に際して予想される問題と対処案

問題	対処案
すでに存在する物質と疾患との関連の示唆することの問題	そのような情報は慎重に取り扱う。
潜在的リスクを表面化させることの問題	リスク管理をすることのメリット(トレードオフ)をよく説明する。
情報の発し手と受け手との間の信頼関係の有無の問題	情報の受け手のこと(背景・状況・理解度)を理解する。「相手」の主張・要望を聞く。
統計的データ・数値データ・専門用語をどのように使い、伝えるかという問題	別紙で補足の解説を配布する。
誰がリスクの有無を判断するのか・責任を持つのかという問題	リスク評価をする者と判断をする者・責任を持つ者とが異なることを明示する。
研究途上の有害性のデータを発表すること、リスクを過剰に印象付ける恐れの問題	他の要因に対する位置付け、影響度を始めに(できる限り)明示する。