

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) 総括研究報告書

「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」に関する研究

研究代表者: 武田 健(東京理科大学 総合研究機構 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た。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た。具体的には、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、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、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。最終年度に二年度目までの結果を総括しながら、In vivo だけでなく ex vivo のナノマテリアル健康影響評価系の構築を目指した。

研究分担者

梅澤雅和 東京理科大学 講師
立花 研 日本薬科大学 講師
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
光永総子 NPO プライベートアラ 部長

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た。

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、懸濁媒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

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したものである。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た。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

(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・精巢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。さらに、二酸化チタンナノ粒子の次世代影響標的として有力な脳において、影響発現メカニズムをエピジェネティクスの観点から明らかにするために、脳組織における DNA メチル化プロファイルを網羅的に解析した。

(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

アカゲザル新生仔及び成体の背部皮内に、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。

また、胎仔期暴露の影響を調べるため、妊娠アカゲザルの背部皮内に、DEP、CB、TiO₂ のいずれかを投与し、それらの新生仔の脳を含む主要組織を採取した。遺伝子及びタンパク質の発現変動をマイクロアレイ、RT-PCR、ウェスタンブロット、組織免疫染色により解析した。

(倫理面への配慮)

サルモデルでの実験は NPO 法人プライメイト・アゴラ動物実験倫理委員会での承認を得て実施した。その際、動物福祉に関しては同法人バイオメディカル研究所動物実験指針に準拠した。また、投与試験に関しては、環境汚染対応が可能な飼育・実験室で実施した。

C. 研究成果

1) 次世代雄性生殖系への影響

前年度に続いて、銀ナノ粒子の妊娠期飲水投与が次世代雄性生殖系に及ぼす影響を検証した。まず、懸濁液中の銀ナノ粒子を低濃度の塩により凝集させ、二次粒子径を大きくした (>200 nm) 場合でも、次世代雄性生殖系に及ぶ影響は消失しなかった。また、投与時期による影響発現を差異を検証する目的で、一部のマウスに対し出生後にも銀ナノ粒子を投与し、銀ナノ粒子の毒性発現に重要な曝露時期の検証を進めている。

銀ナノ粒子を思春期のみ投与した群に比べ胎児期のみ投与した群 (Ag-Pre

群)では精巣上体重量が、胎児期および思春期に投与した群(AgH 群)では精巣重量並びに精巣上体重量が有意に低下した。また、精細管の各構成細胞の細胞数を測定した結果、AgH 群のセルトリ細胞と精母細胞、Ag-Post 群のセルトリ細胞の細胞数が対照群と比較して有意に減少していた。

2) 次世代免疫系・中枢神経系への影響

前年度までに引き続き、カーボンブラックナノ粒子の妊娠前期投与が次世代免疫系に及ぼす影響を検証した。その結果、次世代免疫系(脾臓リンパ球 phenotype)に対する影響発現は、一般急性毒性(気管支肺胞洗浄 BALF 中細胞数増加)の生じるレベルであっても低用量で消失することが明らかになった。

一方で、同用量カーボンブラックナノ粒子の妊娠後期投与は、次世代免疫系(脾臓)に対し T 細胞等の細胞数を著しく増加させることが明らかになった(El-Sayed & Umezawa et al. *Toxicology* 2015)。

次世代中枢神経系に生じる影響について、ナノマテリアルのハザード分類・リスク評価に資する鋭敏かつ定量的なマーカーが得られた。ナノ粒子(カーボンブラック、二酸化チタン)を妊娠期に経気道投与すると、次世代個体の脳血管周囲の細胞(血管周囲マクロファージ PVM ならびにアストロサイト)が鋭敏に反応することが明らかになった(Onoda & Umezawa et al. *PLoS One* 2014)。その作用の程度は、二次粒子径を同程度にしたナノマテリアルで比較した場合、カーボンブラックの方が二酸化チタンナノ粒子に比して大きかった(国際会議 *Nanotoxicology* 2014, Best Poster

Award)。また、この影響は大脳皮質前頭野の GFAP タンパク質発現解析(ウェスタン・プロット法)により定量的に分析することが可能になり、ナノマテリアルの妊娠期経気道投与が次世代中枢神経系に及ぼす影響についての用量依存性も確認することができた。ナノマテリアルの曝露によるヒト健康影響に関して、とくに次世代影響・発達毒性の考慮は、免疫系以上に中枢神経系に及ぶ影響について考慮する必要があるようである。

また、ナノマテリアルの妊娠期経気道投与により次世代中枢神経系に及ぶ影響を、遺伝子発現を制御する DNA メチル化プロファイルから検証した。その結果、*Pcdh9* などの複数の遺伝子を標的として、プロモーター領域の DNA 脱メチル化に伴う遺伝子発現亢進が認められた。

3) 霊長類を用いた検討

サル類とげっ歯類との比較発現解析から、リンパ節/免疫系ならびに中枢神経系への影響の分子機序を検討した。さらに、霊長類(ヒトを含む)での *ex vivo* あるいは *semi-in vitro* でのナノマテリアル影響評価系についても予備検討した。

その結果、ナノマテリアル投与が免疫系において 2 型マクロファージ(M2 マクロファージ)のマーカー遺伝子であるキチナーゼ(Chitinase 1, CHIT1)或いは CCL18(霊長類特異的ケモカイン)の遺伝子発現亢進が確認された。それらの遺伝子発現亢進は少なくとも3年間継続していた。また、サル・ラット双方において、ナノマテリアルが Dendritic cell / Macrophage の T-cell 活性化制御因子である DC-Hil/GPNMB を顕著に発現亢進することを新たに見出した。ナノマテリアルが T-Cell レベルの免疫応答にも影響することが明らかになった。

前述のげっ歯類のデータを踏まえ、ナノマテリアル投与がリンパ節だけでなく中枢神経系(大脳皮質前頭野、小脳、海馬)に及ぼす影響を遺伝子発現変動プロファイリングにより検証した。その結果、胎仔期にナノマテリアルに暴露された新生仔の中枢神経系において複数のナノマテリアル・複数の脳領域に共通する変動パスウェイとして、ヘモグロビン代謝経路が見出された。

さらに、上記霊長類免疫系で得られたデータに基づき、ヒト細胞株を用いたナノマテリアルの影響評価系の確立を目指している。免疫系に及ぶ影響評価については、単球ならびにリンパ球の単培養では *in vivo* で認められる CHIT1 或いは CCL18 の発現変動が生じなかった。これは M2 マクロファージ分化誘導について調べるためには、貪食能をある程度高めたマクロファージを用いて実験する必要性を示唆している。生体では、貪食能を持つ Dendritic cell 等マクロファージ系細胞がナノマテリアルを取り込み、多種類の細胞が相互作用しながら応答していると考えられる。ナノマテリアルの免疫系への影響を検討する際には、*in vivo* の状態を部分的にでも模倣するモデル系を作製する必要がある。そのため、サイトカイン或いはフォルボールエステルのような化学物質で刺激した単球系細胞を用いたナノマテリアル影響評価系の検討しているが、課題が残った。

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。

その上で実験(1)の結果は、投与時期(出生前 = 妊娠期 / 出生後)により銀ナ

ノ粒子の影響する細胞種が異なる可能性を示唆している。また、銀ナノ粒子の毒性発現(とくに発達毒性)は二次粒子径に依存しなかった。ナノマテリアルの体内動態は、凝集状態が変わり二次粒子径が異なれば体内動態が異なるが、少なくとも溶解性のあるナノマテリアルについては、毒性発現プロファイルに対する体内動態の寄与がそれほど大きくない可能性がある。ナノマテリアルの毒性を考える上で、細胞への取り込みを介した直接的な細胞毒性以外によらない間接的なメカニズムの考慮が、ナノマテリアルの曝露によるヒト健康影響評価において重要であると考えられる。

実験(2)の結果、ナノマテリアルの妊娠前期により次世代免疫系に生じる影響は、一般急性毒性の認められる用量に限られることから、ヒト健康影響防止を考える上で考慮に入れなくていいものと考えられる。ただし、ナノマテリアル曝露により次世代に生じ得る健康影響は、妊娠中の曝露時期により大きく異なる可能性があることには注意が必要である。

ナノマテリアル経気道投与により次世代中枢神経系に生じる影響については、前述のとおり感受性高くかつ定量性のある影響評価指標の存在を明らかにすることができた。また、脳に生じる遺伝子発現変動が、げっ歯類と霊長類との間で保存性の高いプロモーター領域の DNA メチル化変動により制御されることが明らかになり、げっ歯類を用いた試験系によりヒトへの外挿性も高く評価できる健康影響評価系と言えると考えられる。

本研究の大きな特色は、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た点である。実験(3)では、ナノマテリアル投与により免疫系で M2 マクロファージマーカー遺伝子

発現が亢進することが示された。更に、投与から 3 年を経てもなおナノマテリアルがリンパ節に蓄積したままであり、これらの遺伝子発現が継続的に亢進しているが明らかとなった。M2 マクロファージはアレルギー応答に関与していることが知られている。このため、ナノマテリアルに暴露されたヒトが、長期的にアレルギー疾患発症或いは増悪のリスクを負う危険性が示唆された。リンパ節において変動した遺伝子は、霊長類特異的であるものが多かったが、中枢神経系においてはげっ歯類と共通する点が見出される傾向がある。霊長類の妊娠期ナノマテリアル暴露による産仔中枢神経系におけるヘモグロビン遺伝子発現亢進は、胎仔脳が酸化ストレス或いは低酸素状態に応答していることを示すものである。ヘモグロビン亢進は細胞障害を起こすことが知られているため、ナノマテリアルによる胎仔中枢神経系発達障害、高次脳機能障害の危険性を示唆している。霊長類胎盤透過性はげっ歯類のそれよりも高く、母子間の物質交換は密であり、妊娠期間も長い。よって霊長類におけるナノマテリアル暴露影響はより重篤であることも推察されるが、げっ歯類モデルにおいても胎仔期ナノマテリアル暴露による中枢神経系のアポトーシスが報告されている。これらのことから、霊長類モデル及びげっ歯類モデルのそれぞれの特長を踏まえ、双方よりヒトへの外挿性を検討することが重要である。中枢神経系への着目は、本プロジェクトの後半からであったためトランスクリプトームデータを検証し切れていないが、このデータの検証を完了させることにより、マウスとサルにおいて妊娠期ナノマテリアル投与により変動した遺伝子群の相同性を検証することにより、げっ歯類の脳のデータのヒト外挿性

についての結論が得られると期待している。

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・中枢神経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・中枢神経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手法の開発を目指した。

本研究においてヒト細胞株を用いた実験では、in vivo(サル)で認められるナノマテリアル曝露の影響が検出できなかった。免疫系影響評価のためには貪食能を高めたマクロファージ系細胞を用いた評価系の有用性が示唆された。

一方で、発達精巢毒性をはじめとするナノマテリアルの次世代影響は、細胞への取り込みを介した直接的な細胞毒性以外によらない間接的なメカニズムが大きいようである。次には例えば、ナノマテリアルにより生じるタンパク質の高次構造変化と、それに起因する間接的生体影響評価系の構築を指向した研究などが、培養細胞系もしくは cell-free system でのナノマテリアル健康影響評価系の構築に力を発揮するであろうと期待される。

本プロジェクトの成果を考慮に入れた、ナノマテリアルのヒト健康影響評価(胎児や新生児という高感受性集団への影響評価を含む)法は、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。

なお、我々は 2014 年 9 月 6 日に、**日本学術会議トキシコロジー分科会シンポ**

ジウム「PM2.5 とナノ粒子 微小粒子の健康影響とその対策を考える」を開催

し、本研究課題の経過についても報告し、研究成果の普及(社会還元)に向けた議論を実現した。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Tachibana K, Takayanagi K, Akimoto A, Ueda K, Shinkai Y, Umezawa M, Takeda K.(2015) Prenatal diesel exhaust exposure disrupts the DNA methylation profile in the brain of mouse offspring. *J,Toxicol,Sci.* 40(1)1 – 11. (査読有)
2. El-Sayed YS, Shimizu R, Onoda A, Takeda K, Umezawa M.(2015) Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology.* 327.53 – 61. (査読有)
3. 梅澤雅和、武田健、(2015)トキシコロジーからナノ規制ガバナンスへの提言 予防原則の最適化、日本リスク研究学会年次大会講演論文集、27巻A-2-5頁(査読有)
4. Shimizu R, Umezawa M, Okamoto S, Onoda A, Uchiyama M, Tachibana K, Watanabe S, Ogawa S, Abe R, Takeda K. (2014) Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle during early gestation on the splenic phenotype of neonatal mouse. *J,Toxicol,Sci.* 39(4) 571-578. (査読有)
5. Kojima S, Negishi Y, Tsukimoto M, Takenouchi T, Kitani H, Takeda K. (2014) Purinergic signaling via P2X7 receptor mediates IL-1 β production in Kupffer cells exposed to silica nanoparticle. *J,Toxicol,Sci.*321,13-20. (査読有)
6. Nagakura C, Negishi Y, Tsukimoto M, Itou S, Kondo T, Takeda K, Kojima S. (2014) Involvement of P2Y11 receptor in silica nanoparticles 30-induced IL-6 production by human keratinocytes. *J,Toxicol,Sci.* 322, 61-68. (査読有)
7. 梅澤雅和、大気中の小さな粒子 (PM2.5) による健康影響を防ぐために、日本幼少

児健康教育学会第32回大会(春季:千葉大会)発表抄録集, 14-15, 2014 (査読無)

8. 梅澤雅和、難波美帆、石村源生、リスクコミュニケーション手法の改善の取り組みと教育プロセス、日本幼少児健康教育学会第32回大会(春季:千葉大会)発表抄録集, 72-73, 2014 (査読有)

2. 学会発表

1. 中村仁幸、El-Ghoneimy Ashraf A、新海雄介、Shaheen Hazem ME、小野田淳人、武田健、梅澤雅和、N-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに対するディーゼル排ガス曝露の影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日~3月28日
2. 福田紗希、田畑真佐子、萩原伸、吉川洋一郎、二木力夫、武田健、梅澤雅和、銀ナノ粒子経口曝露による高脂肪食摂取マウス肝臓への影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日~3月28日
3. 梅澤雅和、El-Sayed Yasser S、小野田淳人、清水隆平、武田健、妊娠中期及び後期におけるカーボンブラックナノ粒子の経気道曝露が次世代免疫系に及ぼす影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日~3月28日
4. 小野田淳人、Shaheen Hazem ME、中村仁幸、新海雄介、El-Ghoneimy Ashraf A、武田健、梅澤雅和、ディーゼル排ガスの低用量曝露が呼吸器系の酸化ストレス応答とセラミド代謝に及ぼす影響、日本薬学会第135年会、神戸、2015年3月26日~3月28日
5. Sugamata M, Ihara T, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to diesel exhaust

- nanoparticles enhances the risk of Alzheimer's disease by promote beta-amyloid fibrillation in offspring. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. 12th International Conference on Alzheimer's and Parkinson's Diseases. Nice, France. 2015年3月18日～3月22日
6. 吉川洋一郎、入江美代子、萩原伸、福田紗希、武田健、梅澤雅和、胎児期及び思春期の銀ナノ粒子投与によるマウス雄性生殖器への影響、第17回環境ホルモン学会研究発表会、東京、2014年12月9日～12月10日
 7. Umezawa M, Onoda A, Shimizu R, Okamoto S, Yoshida A, Takeda K. Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle on the thymus and spleen of neonatal mouse. PPTOXIV – the 4th International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity, Endocrine Society. Boston. 2014年10月28日～10月31日
 8. Kawazoe S, Tachibana K, Takeda K, Umezawa M. Effects of prenatal exposure to titanium dioxide nanoparticle on DNA methylation and gene expression profile in the brain of mouse. PPTOXIV – the 4th International Conference on Fetal Programming and Developmental Toxicity, Endocrine Society. Boston. 2014年10月28日～10月31日
 9. 梅澤雅和、立花研、岡本沙紀、武田健、幼児期マウスの脾臓 mRNA ならびに miRNA 発現プロファイルに認められる性差の機能的特徴、第87回日本生化学会大会、京都、2014年10月15日～10月18日
 10. 小番美鈴、立花研、川副翔太郎、上田剛司、新海雄介、梅澤雅和、武田健、二酸化チタンナノ粒子の胎仔期曝露により神経幹細胞に生じる遺伝子発現変動、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば、2014年9月19日～9月20日
 11. 中村仁幸、堀寛、田畑真佐子、久保田夏子、武田健、梅澤雅和、カーボンブラックナノ粒子曝露が N-3 系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに及ぼす影響、フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー、つくば、2014年9月19日～9月20日
 12. 吉田英美果、小野田淳人、吉川洋一郎、武田健、梅澤雅和、妊娠期カーボンブラックナノ粒子曝露による母体の肺と出生仔脾臓への影響、第21回日本免疫毒性学会学術年会、徳島、2014年9月11日～9月12日
 13. 中村仁幸、堀 寛、二木力夫、武田 健、梅澤雅和、n-3系多価不飽和脂肪酸欠乏食を摂取したマウスに対するナノ粒子曝露の影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～4日
 14. 梅澤雅和、横田理、森家望、岩田麻里、押尾茂、武田健、胎仔期ディーゼル排ガス曝露が次世代マウスの行動及び神経伝達物質に及ぼす影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日
 15. 小野田淳人、梅澤雅和、井原智美、菅

又昌雄、武田健、ナノ粒子の胎仔期曝露が出生仔の脳血管周辺細胞へ及ぼす影響、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日

16. El-Said YS, Umezawa M, Shimizu R, Onoda A, Takeda K. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014

17. Umezawa M, Ishinabe T, Okamoto S, Shimizu R, Onoda A, Takeda K. Effects of prenatal exposure to carbon black and titanium dioxide nanoparticle on thymic and splenic phenotypes of neonatal mouse. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014

18. Onoda A, Umezawa M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. Effects of maternal exposure to carbon black and titanium dioxide nanoparticle on perivascular macrophages and surrounding astrocytes in the brain of offspring mouse. The 7th International Conference on Nanotoxicology, Nanotoxicology 2014. Antalya, Apr 23-26.2014

3. 招待講演

1. 梅澤雅和、武田健、トキシコロジーからナノ規制ガバナンスへの提言 予防原則の最適化、第27回日本リスク研究学会年次大会、企画セッション A-2「規制ガバナンスの核心—根拠に基づく意思決定プロセスの事例と潮流」、京都、2014年11月

28日～11月29日

2. 梅澤雅和、武田健、井原智美、菅又昌雄、ディーゼル排ガス微粒子及びナノ材料の次世代健康影響、日本学術会議トキシコロジー分科会シンポジウム「PM2.5とナノ粒子—微小粒子の健康影響とその対策を考える—」、2014年9月6日

3. 梅澤雅和、菅又昌雄、武田健、微小粒子の次世代影響とヒト健康影響評価への課題、第41回日本毒性学会学術年会、神戸、2014年7月2日～7月4日

H. 知的財産権の出願・登録状況 なし