

- expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **226**, 192-198.
- Tin Tin Win, S., Yamamoto, S., Ahmed, S., Kakeyama, M., Kobayashi, T. and Fujimaki, H. (2006): Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol. Lett.*, **163**, 153-160.
- Weiss, J.M., Goodman, P.A., Losito, B.G., Corrigan, S., Charry, J.M. and Bailey, W.H. (1981): Behavioral depression produced by an uncontrollable stressor: relationship to norepinephrine, dopamine, and serotonin levels in various regions of rat brain. *Brain Res. Rev.*, **3**, 167-205.
- Xia, T., Kovoichich, M., Liang, M., Madler, L., Gilbert, B., Shi, H., Yeh, J.I., Zink, J.I. and Nel, A.E. (2008): Comparison of the mechanism of toxicity of zinc oxide and cerium oxide nanoparticles based on dissolution and oxidative stress properties. *ACS Nano*, **2**, 2121-2134.
- Xia, Y., Cheng, S., He, J., Liu, X., Tang, Y., Yuan, H., He, L., Lu, T., Tu, B. and Wang, Y. (2011): Effects of subchronic exposure to benzo[a]pyrene (B[a]P) on learning and memory, and neurotransmitters in male Sprague-Dawley rat. *Neurotoxicology*, **32**, 188-198.
- Xiao, L. and Becker, J.B. (1994): Quantitative microdialysis determination of extracellular striatal dopamine concentration in male and female rats: effects of estrous cycle and gonadectomy. *Neurosci. Lett.*, **180**, 155-158.
- Yang, H., Liu, C., Yang, D., Zhang, H. and Xi, Z. (2009): Comparative study of cytotoxicity, oxidative stress and genotoxicity induced by four typical nanomaterials: the role of particle size, shape and composition. *J. Appl. Toxicol.*, **29**, 69-78.
- Zhu, X., Zhu, L., Duan, Z., Qi, R., Li, Y. and Lang, Y. (2008): Comparative toxicity of several metal oxide nanoparticle aqueous suspensions to Zebrafish (*Danio rerio*) early developmental stage. *J. Environ. Sci. Health A Tox. Hazard Subst. Environ. Eng.*, **43**, 278-284.

## 薬学・情報学・社会学をつないで 切り拓く次世代健康科学

東京理科大学 総合研究機構 助教 梅澤 雅和

### はじめに

次世代の社会を担う子どもの健康を守ることは、わが国だけでなく、世界の将来にとって重要な課題です。筆者は、大学院在学中から環境中の化学物質やナノ粒子の次世代影響の研究に関わる中で、子どもや次世代の健康を守るための仕事をしたいと強く思うようになりました。「人の健康を守る」ためには、環境中の物質の毒性の詳細やメカニズムを明らかにする生物学実験とともに、その研究データを社会で活用するまでのプロセスに関わることが重要であると筆者は考えています。そこで筆者は、膨大な生物情報（バイオフィーマティクス）を活用した生物学・毒性学研究と、その成果を社会で効果的に活用するためのリスク・コミュニケーションの研究を、本学薬学部ならびに総合研究機構・戦略的環境次世代健康科学研究基盤センターを拠点として推進しています。

本稿ではその研究内容の一端を紹介します。

### 出生前の環境と次世代の子ども健康

子どもの健康を守るためには、生まれた子どもの生活や環境が重要であることは言うまでもありません。一方で、親の生活環境も子どもの健康に重要であることは、皆さんもご存知なのではないでしょうか。例えば、妊婦の飲酒や喫煙が胎児の発達に影響を及ぼしてしまうことは、よく知られているでしょう。また、胎児性水俣病のように、親の世代に起こった公害の影響が子どもに重篤な影響を及ぼした例もあります。薬学の分野で言うと、妊婦が使用することのできない医薬品も数多く存在します。子どもの発達には、その子が生まれる前の母親が生活する習慣や「環境」がとても重要なのです。

筆者らは出生前の環境と次世代の健康との関係を明らかにしながら、人々の疾病を防ぐための新しい知見を示し、社会に活かしていくことを目指しています。ここで言う「環境」には食物、水、大気（空気）などさまざまなものが含まれますが、私はその中でも特に、大気環境を重要視しています（図1）。それは、人々の吸う空気が食物や水と比べても特に、“買って選ぶ”ことの困難なものであると言えるからです。大気が健康に害を及ぼすレベルに汚染されないようにするために、大気環境と健康との関係を明らかにしていくことは重要な研究課題です。

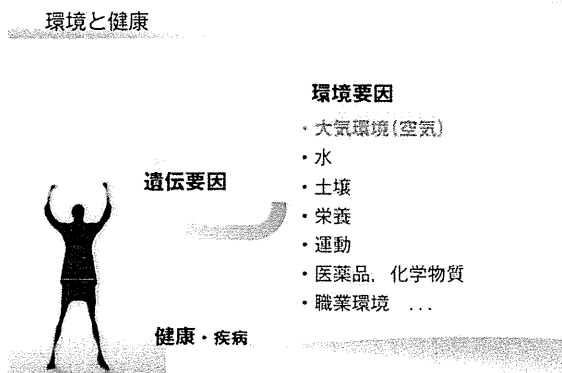


図1 人の健康に関わる「環境」

さて、大気中に存在し健康に有害な影響を及ぼすものとして、小さな「粒子」があることをご存知でしょうか。2013年のはじめに「PM2.5」がマスコミに大きく取り上げられたのを覚えている方も多いと思います。このPM2.5は、大気中の微小粒子状物質を意味します。大気中の粒子は以前からSPM（浮遊粒子状物質：suspended particulate matter）と呼ばれ、健康に有害なものとして注意が払われてきました。このSPMのうち、特に小さいものがPM2.5と呼ばれます。その中で、私たちの研究結果は、PM2.5の中でもさらに小さな粒子が、次世代の子どもの健康を考える上で特に注意すべきものであることを示してきました。

環境中に存在する「特に小さな粒子」は母親から子どもに移行し、成長した後の子どもの体内に留まって影響を及ぼし得ることが明らかになったのです。この「特に小さな粒子」が母から子に移行することは、筆者らにとっても驚きでした。しかし、その後の国内外の研究により、直径がおよそ200ナノメートル（1mmの5,000分の1）以下の超微小粒子は、胎盤を通過して母親の体内から胎児に移行できることが示されています。特に直径が1~100ナノメートル（1mmの1万~100万分の1）の粒子はナノ粒子と呼ばれ、その毒性が現在世界中で注目され、研究されています。

しかし、この粒子による次世代影響がどのような形で現れるかについては、まだ不明な点が多いのが現状です（本学薬学部・武田健教授の衛生化学研究室は、世界に先駆けてこの研究を推進し、実績を挙げています）。この研究の中で筆者は、超微小粒子やナノ粒子の次世代影響を明らかにするために、バイオインフォマティクスを活用する技術の確立を試みてきました。次に、筆者が薬学・衛生化学と情報学とをつないで進めてきた研究を紹介します。

## 毒性研究におけるバイオインフォマティクスの活用

あるものの毒性を研究することは、容易なことではありません。毒性の評価法にはいくつもの方法がありますが、それらはいずれも、毒性の一部を検出できるに過ぎません。そのような方法では、ナノ粒子のようにどのような毒性（影響）が現れるか分からないものについては、毒性を見逃してしまう可能性があるのであるのです。筆者はこれを打開するために、生体影響を遺伝子発現レベルで広く捉える方法を活用しています。筆者は、生体組織や細胞における遺伝子発現を網羅的に捉えられるために、マイクロアレイを用いた研究を進めてきました。

しかし、影響を「広く捉えられ」ればすべての毒性が容易に判るわけではありません。マイクロアレイを用いると、例えばヒトやマウス、ラットでは1万を超える遺伝子の発現データを一度に得ることができます。しかも、このデータは実験の数の分だけ多く得られることとなります。このデータが膨大であるために、また、さらにこれが玉石混交であるために、手を打ちあぐねている研究者が少なくありません。そこで私は、この膨大なデータとその裏にある情報をあわせて生体試料で生じている変化の「全体」を捉えるために、バイオインフォマティクスを活用した方法の開発を進めてきました。

具体的にはまず、遺伝子（一つの生物種につき2万個前後あります）の機能を分類する用語により遺伝子を分類します。次にその分類結果から、あるものの影響により発現量の変化した遺伝子が、どのような機能を持つものに偏っているかを明らかにします。それにより、1) あるものの毒性がどのような性質を持つものなのか、2) 毒性を把握する上で重要な遺伝子群はどれなのかを明らかにすることができます（図2）。

私の開発した網羅的な遺伝子発現データの

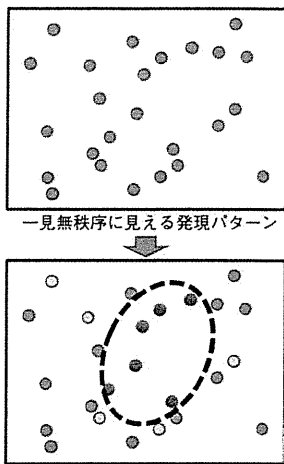


図2 網羅的な遺伝子発現データの機能的解析のイメージ

変動遺伝子群の特徴を、複数の分類用語をあわせて用いることで効果的に捉えることができる。この例では、機能「赤」の遺伝子が同じような発現パターン（位置）を持つことを示している。

特徴を見出そうとしてきた点にあります。これに加えて、私は遺伝子の分類用語として何を使うかについても工夫をしました。具体的には、もともと学術論文を分類する用語である医学主題見出し用語（MeSH, 医学・生物学分野の学術論文データベースとして有名なPubMedを公開している米国国立医学図書館NLMが管理している用語）を用いたのです。MeSH以外の分類用語では、各々の遺伝子の関わる現象やシグナル経路（パスウェイ）により、遺伝子を分類することができます。一方で、MeSHは疾病や組織、発現局在といった情報を遺伝子に付与することができます。このMeSHの活用は、ナノ粒子の毒性の全体を捉えようとする研究に大きく役立ちました（図3）。筆者は現在、この遺伝子発現解析法に改良を加えながら、医学・生物学分野の基礎研究や疾病の治療標的探索という医療につながる研究にも応用を広げることを試みています。

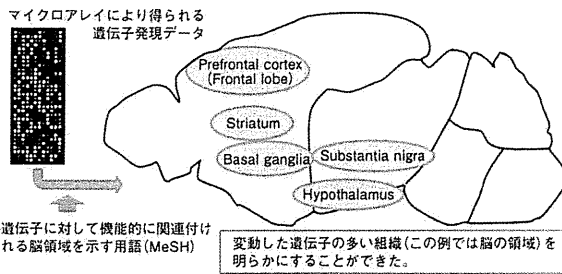


図3 MeSHを用いた遺伝子発現解析の結果の例

妊娠マウスの皮下に二酸化チタンナノ粒子を投与したときの、産仔の脳（出生後7日目）における発現変動遺伝子群に特徴付けられた脳の領域の情報。黄色の○内に示した語は、特定の発現パターン（二酸化チタンナノ粒子の胎児期投与により脳組織で発現変動）を示す遺伝子の多くに関連付けられた「脳の領域を表すMeSH」を示している。

解析方法の特徴の一つは、発現量の変化する遺伝子を「群」として捉え、その「機能」的な特徴

を解析解析法の開発でも、非常に数の多い遺伝子の機能的分類でどのデータベースを用いるのがいいのか、また、そのデータベースを実際に用いる上では何が必要なのか（例えば、膨大な遺伝子発現データと生物情報を整理するために、どのようなプログラムが必要か）について、学外の方と共同研究をする機会をいただくことができました。筆者らが見出したナノ粒子の毒性評価の方法を、皆さんが触れる市販製品の安全性評価に活かす機会も、民間企業との共同研究からいただいています。

実際に、ナノ粒子は私たちの触れる空気や市販製品の中に多数存在しています。そのため、ナノ粒子の毒性データは多くの人に理解してほしいものです。しかし、研究途上の知見を専門分野の外に伝える方法は大変脆弱であり、特に身の回りにある物質のリスクの情報を含む知見については、社会に過剰な不安を煽ってしまうといった問題も生じる恐れもあります。筆者はその問題を克服し、有用な毒性データを社会がよりうまく活用できるようにするために、リスク・コミュニケーションの研究にも取り組んでいます。

最後に、筆者が薬学・衛生化学と社会学とをつないで進めてきた研究を紹介します。

## 広く研究協力者を求めて

さて、私は衛生化学を含めた薬学研究をより効果的に進め、社会に活かせるものにするために、学外の人たちと連携して学際的な研究を進めることを重要視しています。

先に述べた遺伝

## 研究者・情報提供者の懸念に応えるリスク・コミュニケーション研究

わが国のリスク・コミュニケーションの脆弱さは、2011年3月に起こった東日本大震災・福島原子力発電所事故以来、特に顕在化しました。その中で、理科教員や研究者から「科学的な情報の発信やリスク・コミュニケーションに貢献したい」、リスクに関わる「必要な情報を発信してほしいとの要請がある」という声が数多く挙がりました。一方で、リスクのように確率が含まれるものや不確実性を含む科学的情報の提供では、建設的な議論やリスク回避に有効な行動変容に結び付けることが容易ではないという声も多数聞かれました。そこで筆者は共同研究者と、リスク・コミュニケーションの最前線に立つ人が直面し得る問題の抽出・パターン化と、その改善案とをまとめることを試んでいます。ここには、リスク情報に付随させるべき必須の情報は何かということや、リスクの説明に際してどのような言葉は誤解を生みやすいのかといった内容が含まれています。

ナノ粒子のリスク・コミュニケーションも、決して猶予のある問題ではありません。ナノ粒子の毒性研究が進められてリスク評価も進んできた現在、ナノ粒子を材料とした市販製品に“ナノ製品”の表示を付けようとする動きが欧米を中心に本格化しています。これが実施されるよりも前に、ナノ粒子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ます。なぜなら、ナノ材料のリスク情報が消費者に十分に理解されないと、“ナノ製品”の表示がされてもリスクを回避できない可能性が考えられるためです。つまり、リスクが過大に受け止められてこれを回避するために過大なコストが払われることや、逆にリスクが過小に受け止められ、有害事象が生じ得る場面での対応が取られない恐れがあるのです。

筆者らは現在、リスク・コミュニケーション

の問題と改善案の「パターン集」を作成し、教員や研究者、情報提供者が実際にリスクの情報を伝えるときのコミュニケーション手法を考える基点を提示したいと考えています。特に筆者は、ある物質のリスクを説明する際に他のリスク要因との程度の比較をすることと、どのような場合に誰にリスクが生じ得るのかという曝露シナリオの明示が、リスクの議論において重要なのではないかと考えています。

## 薬学・衛生化学のさらなる発展に向けて

本稿では、筆者が取り組んできた研究のうち、バイオインフォマティクスを活用した衛生化学（特にナノ粒子の毒性）研究と、そこから得られる知見を効果的に社会に伝えるためのリスク・コミュニケーションの研究を紹介しました。薬学は化学、生物、物理学を基礎とした基礎学問であると同時に、社会に応用されることの期待される知見が多く生み出される実学でもあります。有用な薬学研究成果をより社会に活かしていくにはどうすれば良いのか、逆に、効果的に社会に活かせる知見を得るにはどのような実験データが必要なのか。その点の議論は、薬学と他分野とをつないだ研究を進めることで深めることができます。筆者はそれをさらに進めることで、薬学、特に私の専門分野である衛生化学を、次世代の健康に寄与できるものに発展させていくことを目指しているところです。

## 謝辞

バイオインフォマティクスを活用した毒性研究は、本学客員研究員の田井中均先生のご指導をはじめ、多くの大学院生のご協力をいただき遂行しました。研究者・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研究では、共同研究者として難波美帆先生（早稲田大学、現在のご所属は北海道大学）ならびに石村源生先生（北海道大学）の多大なるご協力をいただきました。あわせて、一連の研究の遂行にあたり本学の多くの先生方および大学院生のご協力を賜りましたことに、深謝申し上げます。

## 小さなRNAから環境化学物質と次世代の健康を考える

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 助教 立花 研

### はじめに

私たちは生活を営む中でさまざまな物質に曝さらされています。水俣病や四日市ぜんそくなどといった公害で示されるように、私たちにとって有害な化学物質に曝さらされることもあります。環境中の化学物質によって生じる生体影響を回避することは健康な生活を営む上で重要であることは言うまでもありません。特に、胎児は異物に対する防御機構が十分に発達していないことから、環境中のさまざまな物質の曝さら露による影響を受けやすいと考えられ、その生体影響の予防・軽減は重要な課題です。

本学総合研究機構・戦略的環境次世代健康科学研究基盤センターでは、大気環境中に存在するさまざまな化学物質の次世代への影響を調べ、次世代の子どもが健康に生活できる社会を築くための情報の提供、予防法確立を目指して研究を行っています。私たちの研究グループでは、妊娠期にディーゼル排ガスやナノ粒子といった物質に曝さらされることによって、生まれてくる子に影響が生じる可能性を示してきました。これらの影響を軽減・予防するためには、なぜ生体影響が生じるのか、どのようにしたら回避できるのかといった問題を追求する必要があります。

筆者は、妊娠期が受精卵から個体が形成されていく発達期であることに注目し、正常な発達に重要な遺伝子発現とその制御機構に生じる変化から健康影響の原因の一端を明らかにしたいと考えています。本稿では、特に近

年注目されているマイクロRNAと呼ばれる分子に注目して行っている研究内容を紹介します。

### 個体の形成と遺伝子の関わり

研究紹介の前に、個体の形成と遺伝子の関わりについて少しお話ししたいと思います。

遺伝情報、すなわち個体を形成するための設計図はDNAであり、細胞の核の中に収められています。1個の受精卵が分裂・増殖するとともに、さまざまな機能を持つ細胞へと変化していき最終的に個体が形成されます。基本的にこの過程ではDNAの中の情報は変化しないので、個体を形成するほぼすべての細胞が同じ設計図を持っているということになります。つまり個体が形成される過程では、同じ設計図を持っているにもかかわらず、さまざまな機能を持った臓器・組織に機能が分かれていくという現象が起きているのです。このためには設計図の中に収められた遺伝情報の中から、必要な遺伝子を必要な時期に必要な量だけDNAの中から読み取る必要があります。この選択が個体が正常に発生・発達するために必要な要素の一つと言えます。この選択を行うメカニズムの一つとして、マイクロRNAと呼ばれる小さな分子が注目されています。

### マイクロRNAの働き

マイクロRNAは約20~30塩基程度の小分子のRNAであり、1993年にショウジョウバ

エでその存在が初めて発見されました。その後、ほ乳類の細胞でもマイクロRNAが存在し、生体内で働いていることが確認されています。ヒトではこれまでに約1,000種類のマイクロRNAの存在が報告されています。

マイクロRNAは、まず核内でDNAから長いRNAの鎖として読み出されます。その中の一部がDrosha、Dicerと呼ばれる酵素で短い鎖に切断された後、細胞質で働くことが示されています(図1)。作用としては、タンパク質を合成する鋳型になるRNA(mRNA)を標的としており、mRNAに結合することで、そのmRNAを分解、またはmRNAからのタンパク質合成を抑制します(図2)。つまり、マイクロRNAは細胞内の特定のタンパク質の量を調整することで細胞の機能を調整していると言えます。また、一つのマイクロRNAが複数のmRNAを標的にしていることが明らかになっていきますので、マイクロRNA量の変化が生体に及ぼす影響は大きいことが予想されます。

マイクロRNAの一部には特定の臓器のみに存在するものもあるので、各々の臓器の発生・分化や機能の發揮に重要な役割を果たしている可能性が考えられています。実際に、マイクロRNAの合成に必要な酵素(Drosha、Dicer)をもたないマウスは、発生の途中で異常が生じ、致死することが分かっています。このことは、個体の正常な発達にマイクロRNAが必要であるという考えを支持するものです。

### 環境化学物質と生体影響

さて、話を環境化学物質による健康影響に戻します。

私たちのプロジェクトで注目している環境化学物質の一つに大気中の粒子状物質があります。これまでの国内外の研究から、環境中に存在する粒子状物質によって生じる健康影響が多数報告されています。例えば、粒子状

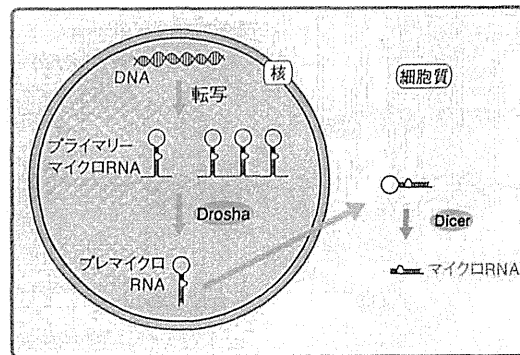


図1 細胞内でのマイクロRNAの合成

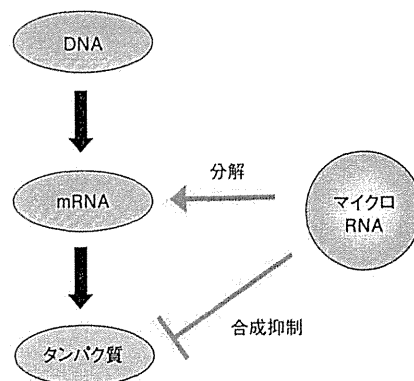


図2 マイクロRNAによるタンパク質量の調節

物質の吸入によって直接曝露を受ける呼吸器では気管支炎や肺がんが生じやすくなると考えられています。また、直径の小さな粒子は吸入されると肺から血流に乗って全身を循環しやすいので、肺だけでなくさまざまな組織に影響を及ぼすと考えられています。

疫学調査によると、大気中の粒子状物質の濃度が高いと呼吸器系や循環器系の疾患による死亡率が高くなることや、脳神経系へ影響が及ぶことが報告されています。私たちは、このようにさまざまな生体影響を及ぼす粒子状物質の中でも直径100ナノメートル以下の超微粒子が及ぼす生体影響に注目して研究を行っています。これまでに、マウスを用いた実験から、妊娠中に小さな粒子状物質を多く含むディーゼル排ガスやナノ粒子の懸濁液に曝露されると、仔マウスにさまざまな影響が生じることを報告してきました。しかし、これらの健康影響がなぜ生じるのかというメカ

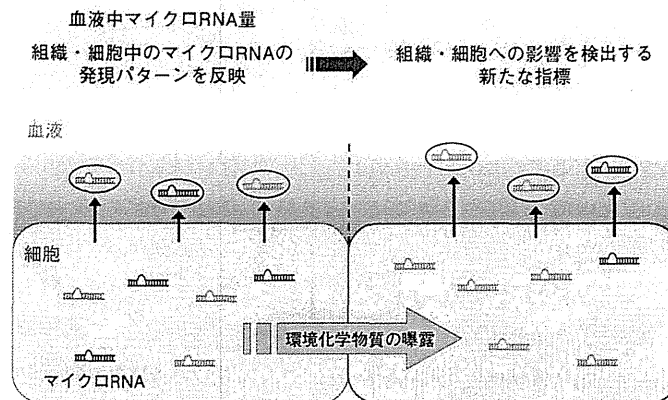


図3 血液中マイクロRNAを利用した環境化学物質の生体影響評価  
組織・細胞内で生じるマイクロRNAの変化を、血液を用いて検出できる可能性が考えられる。

ニズムについては十分に検討されていません。これまでに、環境化学物質の曝露によって影響が生じる組織でマイクロRNAの種類や量に変化が生じることが報告されています。

このことから、粒子状物質によって生じる生体影響にマイクロRNAが関与している可能性が考えられます。先述のとおり、マイクロRNAの制御は子どもの発生・発達の段階に重要であると考えられますので、その種類や量の変化は子どもの健康に大きく関わっていると予想されます。

### 粒子状物質の曝露と子に生じるマイクロRNAの変化

筆者は、妊娠期におけるナノ粒子の曝露によって生じる子どもへの影響とマイクロRNAの変化の関連を調べることにしました。妊娠期のマウスにナノ粒子を懸濁した溶液を肺から投与する実験を行いました。投与した後、胎仔・胎盤のマイクロRNAの種類と量を調べました。その結果、胎仔と胎盤のどちらにおいてもマイクロRNAの量が大きく変化することを見出しました。興味深いことに、雄性の胎仔と雌性の胎仔の間で変化するマイクロRNAに差がある可能性が考えられました。このことから、同じ粒子状物質の

曝露であっても雌雄で生じる影響が異なってくるということが予想されます。発現量が変わったマイクロRNAが、これまでに報告されてきた生体影響にどの程度関与しているか、検討を続けています。

### 血液中に存在するマイクロRNAを利用した生体影響評価

生体に生じる影響を軽減するためには、いかにその影響を早く発見し、対処するかということも重要なポイントの一つになります。

近年、マイクロRNAの大きな特徴として、組織中から放出されたマイクロRNAが血液中を循環していることが示されました。これはマイクロRNAが細胞内から細胞外へ放出されているためで、放出されるマイクロRNAの種類と量は細胞が持っている量と種類に関連があるとされています。このことから、組織や細胞に異常があると血中のマイクロRNAの種類や量に変化が生じてくることが予想されます。

実際に、がんや糖尿病といった疾病では、血液中のマイクロRNAの種類や量に変化が生じることが報告されています。この血液中のマイクロRNAは、さまざまな疾病の徴候を捉えるための新たな指標として注目されています。採血するだけで検査が可能ですし、



マイクロRNAはRT-PCR法を用いて増幅して検出することが可能なため、わずかな変化を捉えやすいという点が大きな利点です。また一般的にRNAの発現量の変化は組織学的な異常に先立って現れてくることが予想されますので、身体に生じる異常を早期に発見できる可能性をも秘めています。

このような推測から、さまざまな環境化学物質の生体影響について、血中のマイクロRNAを用いることでその影響を検出できるのではないかと考え、検討を行っています(図3)。

これまでにさまざまな健康影響が報告されているディーゼル排ガス曝露の実験系を用いて検討を行いました。まずは妊娠期のマウスではなく成長したマウスを用いて検討することにしました。また早期に現れる変化を捉えるため比較的短期間の曝露を行い、曝露の有無による血液中のマイクロRNAにどの程度違いが出てくるかを調べました。その結果、調べた約700個のマイクロRNAのうち、250個程度が血液中から検出され、その多くはディーゼル排ガスの曝露によって量が変わっていました。

このことから、比較的短期間の曝露によっても血液中のマイクロRNA量に変化が生じることが分かりました。現在は曝露期間を変えて経時的に観察を行っていくことで、この変化がどのように推移するかを調べています。また妊娠期の曝露についても検討を行うことで、妊娠期の母親や子に生じる生体影響を血液中のマイクロRNAを利用して検出し、次世代の子どもの健康増進に役立てることができると期待できます。血液中のマイクロRNAを生体影響の指標に利用するためには、変化が生じたマイクロRNAがどの組織に由来するもので、さらにはどのような働きをもっているのかといった観点からの理解が必要不可欠です。分子生物学的な手法を取り入れてこの課題に取り組み、新たな指標とし

て有用なマイクロRNAを見出したいと考えています。

## おわりに

本稿では粒子状物質と健康影響の関係について筆者が進めている研究を、その背景を含めて紹介しました。

粒子状物質をはじめとした環境化学物質によって生じる生体影響を予防・軽減するためには、それぞれの物質がどの組織・細胞に作用し、またどのようなメカニズムで身体の機能を乱しているのかを明らかにする必要があります。このような点を明らかにすることで、生体影響を回避するためにどのような手段を講じるべきかが見えてくると考えています。マイクロRNAの解析を環境化学物質の毒性研究に導入することで、その毒性発現のメカニズムの一端を解明し、さらには生体影響の早期発見に寄与できると期待しています。

現在は、粒子状物質とその生体影響の関連について検討を行っていますが、このような知見を積み重ねていくことで、どのような生体影響が表れるときにどのようなマイクロRNAが変化するのか、という情報が蓄積できるのではないかと考えています。将来的には、さまざまな症状とマイクロRNAの変化を対応させていくことで、環境化学物質だけでなく、食品や医薬品といったあらゆる物質の安全性を調べる手法として応用できる可能性を秘めています。生体内の小さなRNAを利用して、さまざまな環境要因から生じる生体影響の回避、特に次世代の社会を担う子どもの健康増進に貢献したいと考えています。

## 謝辞

本稿で紹介した研究の多くは、本学薬学部衛生化学研究室および総合研究機構・戦略的環境次世代健康科学研究基盤センターの先生方、大学院生・学部生のご協力をいただいで遂行しているものです。誌面をお借りして感謝申し上げます。

7—茶谷聡・他: 大気環境学会誌, 46, 101(2011)  
 8—大原利眞: 環境技術, 41, 275(2012)  
 9—坂本和彦・他: 大気汚染学会誌, 24, 365(1989)  
 10—東京都環境局: [http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/air\\_pollution/result\\_measurement.html](http://www.kankyo.metro.tokyo.jp/air/air_pollution/result_measurement.html)(2013年3月5日アクセス)  
 11—堀井伸浩: in '中国環境ハンドブック 2009-2010年版', 中国環境問題研究会編, 蒼蒼社(2009)pp. 102~108  
 12—東野達・他: 社会経済活動のグローバル化を考慮したエア

ロゾル排出源の評価, 文部科学省科学研究補助金新学術領域研究「東アジアにおけるエアロゾルの植物・人間系へのインパクト」平成23年度研究成果報告書(2012)pp. 21~28  
 13—東京都微小粒子状物質検討会: 東京都微小粒子状物質検討会報告書, 2011年7月  
 14—HTAP, Hemispheric Transport of Air Pollution 2010, Part A: Ozone and particulate matter, Air Pollution Studies No. 17, United Nations, New York and Geneva(2010)

特集 **越境する大気汚染**

# PM<sub>2.5</sub>の健康影響について 私たちが注意したいこと

**梅澤雅和** うめざわ まさかず

東京理科大学 薬学部 衛生化学

**武田 健** たけだ けん

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

大気環境中の微小粒子状物質 PM<sub>2.5</sub> は、現在でも高リスク物質の一つとして知られています。微小粒子はどのような健康影響を及ぼし得るのか、私たち自身がこのリスクを回避するために取る行動は何か。本稿では、SPM および PM<sub>2.5</sub> の健康影響に係わる疫学研究や私たちの研究成果をあわせて、PM<sub>2.5</sub> と向き合う上でのポイントと課題を論じます。

## PM<sub>2.5</sub> とは何か

PM<sub>2.5</sub> とは、大気中の浮遊粒子状物質(SPM: suspended particulate matter)のうち直径が2.5 μm以下の微小粒子の総称です。SPMのうち、とくに微小な粒子が健康に大きく影響を与えていることが明らかになったことから、直径10 μm以下のSPMの総称を表すPM<sub>10</sub>、次いでPM<sub>2.5</sub>という用語が生まれました。日本では、2001年から大気中のPM<sub>2.5</sub>のモニターがSPMとは別に始まり、2009

年にはPM<sub>2.5</sub>の環境基準値が策定されました\*1。直径2.5~10 μmの粒子は、吸入した際に多くが鼻腔や喉粘膜で捕捉されるのに対して、直径2.5 μm以下の微小粒子であるPM<sub>2.5</sub>は、肺の深部まで到達する量が多いことが知られています(図1)。

## SPM および PM<sub>2.5</sub> の健康影響に係わる疫学的知見

SPMによる健康影響が注目されるきっかけとなった代表的な研究の一つに、1950年代に起こったロンドンスモッグ以来の疫学研究があります。ロンドンでの大気汚染による健康影響を1958~1972年の14年間にわたり調査した結果、大気中SPM濃度と1日あたりの死亡者数との間に正の相関があることが示されたのです<sup>2</sup>。この死亡者

\*1—日本での環境基準値は、SPMについては「1時間値の1日平均値が0.10 mg/m<sup>3</sup>以下であり、かつ、1時間値が0.20 mg/m<sup>3</sup>以下」、PM<sub>2.5</sub>濃度の環境基準値は「1年平均値が15 μg/m<sup>3</sup>以下であり、かつ、1日平均値が35 μg/m<sup>3</sup>以下」と定められています。(2013年2月現在)

Understanding aspects and toxicity of PM<sub>2.5</sub> to reduce its risk  
Masakazu UMEZAWA and Ken TAKEDA

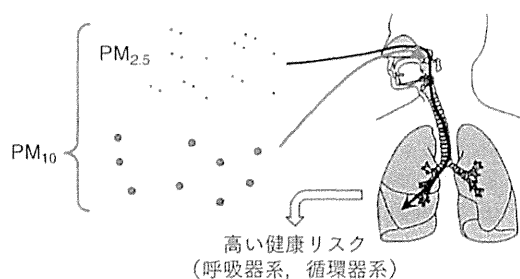


図1-PM<sub>2.5</sub>の特徴

微小粒子状物質 PM<sub>2.5</sub> は呼吸器の奥まで到達しやすく、健康リスクが高いことが知られています<sup>1</sup>。PM<sub>2.5</sub> は、直径 2.5～10 μm の粗大粒子よりも呼吸器や循環器系への影響を強く及ぼすことが疫学的に証明されている<sup>2</sup>ほか、動物を用いた毒性学的研究の結果からは、超微小粒子が胎児に移行し次世代にも影響を及ぼす可能性のあることも示されています<sup>3-9</sup>。

数の増加は、高濃度の SPM が循環器系や呼吸器系に影響を及ぼし、主に心筋梗塞や呼吸器疾患の発作を引き起こしたことにより生じたと考えられています。

その後も、SPM の健康影響についての複数の疫学研究が行われました。米国の環境保護庁 (EPA) は 2009 年にその結果をまとめ、SPM のうちとくに微小粒子状物質である PM<sub>2.5</sub> の短期および長期曝露が、死亡、心血管(循環器)系および呼吸器系に影響を及ぼしていることを報告しています。また、SPM による影響をとくに受けやすい集団が高齢者、小児、胎児や、心血管系もしくは呼吸器に疾病をもつ人、および肥満や糖尿病を罹患している人であることも報告されています<sup>9</sup>。

### 毒性学研究からの知見

筆者らはこれまでに、PM<sub>2.5</sub> を多く含むディーゼル排ガスの生体影響を、マウスやラットを用いて研究してきました。ディーゼル排ガスは、都市部における大気汚染の主要因の一つであることが知られています。筆者らは研究の結果から、大人の個体には顕著な影響を及ぼさない程度の低濃度の PM<sub>2.5</sub> が子どもの発達に影響を及ぼしてしまう可能性を懸念し、ここに焦点を絞って研究を進めています。

筆者らは、PM<sub>2.5</sub> を含むディーゼル排ガスを妊

娠中のマウスに吸入させ、生まれた子マウスを観察しました。すると、この子マウス自身は粒子を除いた清浄な空气中で飼育したにもかかわらず、妊娠マウスの吸入した微小粒子は子の脳の血管周囲に到達していることがわかりました<sup>4</sup>。その後、母マウスの体内に入った微小粒子が胎児に移行することは、国内外の複数の研究により裏付けられています<sup>5,6</sup>。

さらに、筆者らの研究結果は、微小なディーゼル排気粒子はその子が成長した後もこの産児(次世代)の脳の一部の細胞内に残っており、その細胞の性質を変化させ、周囲の細胞にも影響を及ぼす可能性があることを示しました。0.17 mg/m<sup>3</sup> の SPM<sup>\*2</sup> を含むディーゼル排ガスの妊娠曝露(2週間=マウスの妊娠期間の約70%)が、子マウスの脳内ドパミン神経系に影響を及ぼし、運動量を変化させることも明らかにしています<sup>7</sup>。

また、筆者らの研究は PM<sub>2.5</sub> を含むディーゼル排ガスの妊娠曝露が、雄の子マウスの生殖器の発達にも影響を及ぼすことも示してきました。とくに、前述の 0.17 mg/m<sup>3</sup> の SPM を含むディーゼル排ガスの妊娠曝露が、成長後の産児の精巣における特定の細胞<sup>\*3</sup>のミトコンドリアを傷害し、精子の形態に異常を生じさせることがわかっています<sup>8</sup>。さらに、それよりも低い濃度である 0.10 mg/m<sup>3</sup> の微小粒子を含むディーゼル排ガスの妊娠曝露が、胎児の生殖腺の発達に重要な遺伝子発現を変動させることも示しています<sup>9</sup>。

微小粒子による次世代への影響の詳細については、まだ不明な点が多いのが現状です。しかし、妊娠中の母親から子への微小粒子の移行は見過ごすことのできない問題であると筆者らは考え、現在も研究を進めています。

### 北京および日本の現状

北京の大気汚染は、従来から PM<sub>10</sub> の年平均値

\*2—前述の SPM 環境基準値(1日平均値)の約 1.7 倍。

\*3—セルトリ細胞という、雄性生殖器である精巣に存在し、精子の分化・形成を支持する細胞。

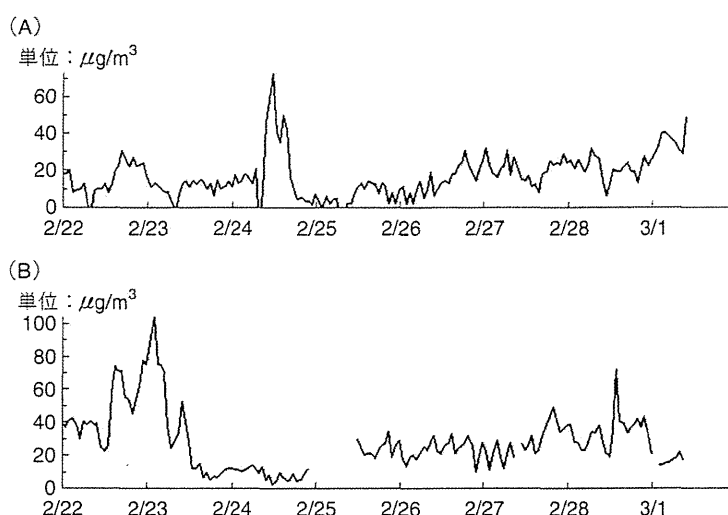


図2—PM<sub>2.5</sub>の経時的変化の例  
例として、(A)千葉県野田市桐ヶ作と(B)福岡市西区元岡[ともに環境省大気汚染物質広域監視システム・一般局]における、2013年2月22日から3月1日までのPM<sub>2.5</sub>濃度の速報値の推移を示した。

が0.121 mg/m<sup>3</sup>(2009~2010年)であり、PM<sub>2.5</sub>濃度が100 µg/m<sup>3</sup>を大きく超えることも頻繁に起こるといふ深刻な状況でした<sup>10</sup>。その上で、現在起きている大気汚染の特徴が「局地的な現象ではなく同時多発的に中国広域で発生」していることであると、大気環境学会は解説しています\*4。0.1 mg/m<sup>3</sup>を超える濃度のSPMについての研究は、40年以上前のデータはある一方で最近ではほとんどありません(東南アジアについての報告は散見されます)。北京をはじめとする中国のSPMおよびPM<sub>2.5</sub>濃度の現状は、最近の他の地域では例を見ない深刻な状況です。

一方で、日本ではPM<sub>2.5</sub>濃度の1日平均値が日本の環境基準値を超えることがあります。環境省は、国内の各測定地点におけるPM<sub>2.5</sub>の環境基準達成状況を、一般局で34地点中11地点(32.4%、2010年度)であると報告しています<sup>11</sup>。私たちはこの現状を知った上で、PM<sub>2.5</sub>濃度が環境基準値を超える頻度や、測定されるPM<sub>2.5</sub>濃度の高さに注意を払う必要があります(図2)。そこで、私たち

一人一人がPM<sub>2.5</sub>の健康リスクを回避できるよう、PM<sub>2.5</sub>濃度のデータを解釈する際に知っておくべきと思われる点を次にまとめました。

\*\*\*\*\*  
**PM<sub>2.5</sub>のデータ解釈に際する  
注意点**

\*\*\*\*\*  
**日平均値なのか、年平均値なのか、他の時期の数値  
と比べてどのレベルか**

大気中のSPM濃度やPM<sub>2.5</sub>濃度は、日内変動の大きいものです。そのため、たとえば同じ「50 µg/m<sup>3</sup>」というデータでも、それがある1時間だけその濃度であることと、1日平均としてその濃度であることと、1年間の平均値としてその濃度であることとでは各々まったく意味が異なります。PM<sub>2.5</sub>濃度の高値が報告されたときに、それが一時的なものなのか、長期的に続いているものなのかを確認することが望ましいと思われます。

また、健康リスクの大きさを推測するためには、前述の環境基準値との比較が一つの目安になります。SPMやPM<sub>2.5</sub>の濃度は、地域や季節の違いによっても変わります。そのため、これらの濃度のデータを見る際には「同地点での以前の濃度」や「同地点で前年以前の同じ季節における濃度」

\*4—大気環境学会の緊急声明「中国におけるPM<sub>2.5</sub>大気汚染問題への大気環境学会の取り組み」(2013年2月12日)より

との比較をすることが重要です。その比較を行うことで、はじめて「いま起っていることは何に起因しているのか」を判断することができます。

これを言い換えると、PM<sub>2.5</sub>の高濃度時に何が起っているかを知るためには、地域・地点ごとの濃度の測定や監視を平常時から実施していることが重要であるとも言えます。環境省をはじめとする行政には、今後も平常時からの大気環境を継続的に監視し、そのデータを公開し続けることが期待されます。

### 地表からどの高さについてのものなのか

健康影響を考えた場合に重要なのは、あくまで「地表近く」(地上高約1~1.5m程度)での濃度です。PM<sub>2.5</sub>の広域拡散をシミュレーションする際には、地表から離れた上空(たとえば、地表から1000m以下程度)でのPM<sub>2.5</sub>濃度のデータも重要です。ただし、上空でのPM<sub>2.5</sub>濃度と地表近くでのその濃度とがどのように相関するのかについては、注意を払った上で議論や対策が行うことが望ましいと思われる。

たとえば、上空から地表近くにPM<sub>2.5</sub>が降下するのに時間がかかるのであれば、地表近くのPM<sub>2.5</sub>濃度の上昇と上空での濃度上昇との間に時間差が生じます。上空から地表近くに降下するPM<sub>2.5</sub>量が少なければ、地表近くでのPM<sub>2.5</sub>濃度の上昇は小さいかもしれません。逆に、降下したPM<sub>2.5</sub>が地表近くで拡散せずに滞留することがあれば、地表近くでのPM<sub>2.5</sub>濃度は予測以上に上昇するかもしれません。上空と地表近くのPM<sub>2.5</sub>濃度にはこれだけの差があり得ることには、注意が必要であると思われます。

なお、例として環境省の大気汚染物質広域監視システム(そらまめ君)は、実際に地上高約1~1.5m程度の大气環境をモニターしています。

\* \*

2013年2月27日に環境省の専門家会合は、PM<sub>2.5</sub>の大気中濃度が上昇したときに外出自粛などの注意喚起をする暫定指針を決定しました。私たちは、この注意喚起が出されたときに自らの健

康を守るために、どのように行動すればいいのでしょうか。まず、不要不急の外出を控えることや、屋内にいる場合に屋外の空気を取り込んでしまう換気を控えることが考えられます。また、マスクの着用により微小粒子の吸入量を減らせることも学術的に証明されており<sup>12</sup>、これが屋外に出る必要がある場合にも有効な対策になるでしょう。

筆者らは以前の稿<sup>5</sup>で、環境中の粒子を減らすことが私たちの健康を守るために重要であると述べました。しかし、環境中の微小粒子PM<sub>2.5</sub>には自然起源のものも多く存在し、決してゼロにはなり得ないものです。PM<sub>2.5</sub>の特徴やデータの読み方を理解することで、一人一人がPM<sub>2.5</sub>のリスクを効果的に回避することが可能になるであろうと筆者らは考えています。

### 文献・資料

- 1—G. Oberdörster et al.: Environ. Health Perspect., 113, 823 (2005)
- 2—J. Schwartz & A. Marcus: Am. J. Epidemiol., 131, 185(1990)
- 3—EPA(米国環境保護庁): Integrated science assessment for particulate matter.(2012年12月)
- 4—M. Sugamata et al.: J. Health Sci., 52, 82(2006)
- 5—武田健: 科学, 82, 1093(2012)
- 6—梅澤雅和: 科学, 82, 1098(2012)
- 7—T. Suzuki et al.: Part Fibre Toxicol., 7, 7(2010)
- 8—M. Kubo-Irie et al.: Inhal. Toxicol., 23, 805(2011)
- 9—S. Yoshida et al.: Environ. Sci., 13, 117(2006)
- 10—岡崎雄太:「北京市の大気汚染について——粒子状物質“PM<sub>2.5</sub>”とは」, 北京日本人会・中国日本商会共催「生活安全セミナー」における講演資料(2012年2月7日), [http://www.cn.emb-japan.go.jp/consular\\_j/air\\_pollution.pdf](http://www.cn.emb-japan.go.jp/consular_j/air_pollution.pdf)
- 11—環境省: 平成22年度大気汚染状況について(PM<sub>2.5</sub>), [http://www.env.go.jp/air/osen/jokyo\\_h22/pm25.html](http://www.env.go.jp/air/osen/jokyo_h22/pm25.html)
- 12—S. Rengasamy et al.: Ann. Occup. Hyg., 54, 789(2010)

Original Article

## Exposure to diesel exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice

Satoshi Yokota<sup>1,3</sup>, Nozomu Moriya<sup>2</sup>, Mari Iwata<sup>1</sup>, Masakazu Umezawa<sup>3</sup>, Shigeru Oshio<sup>4</sup>  
and Ken Takeda<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Department of Hygiene Chemistry, Faculty of Pharmaceutical Sciences, Tokyo University of Science,  
2641 Yamazaki, Noda-city, Chiba 278-8510, Japan

<sup>2</sup>Department of Biopharmaceutics, Hyogo University of Health Sciences,  
1-3-6 Minatojima, Chuo-ku, Kobe, Hyogo, 650-8530, Japan

<sup>3</sup>The Center for Environmental Health Science for the Next Generation, Research Institute for Science and  
Technology, Tokyo University of Science, 2641 Yamazaki, Noda-city, Chiba 278-8510, Japan

<sup>4</sup>Department of Hygiene Chemistry, School of Pharmaceutical Sciences, Ohu University, 31-3 Misumido, Tomita-cho,  
Koriyama-city, Fukushima 963-8611, Japan

(Received October 4, 2012; Accepted October 31, 2012)

**ABSTRACT** — Exposure to ambient particulate matter (PM) has been associated with the onset of cardiovascular and respiratory diseases. Diesel exhaust particles (DEP) are major components of ambient PM. We first reported DEP in the central nervous system of offspring utilizing maternal inhalation to diesel exhaust (DE). In addition, we found that the effects of maternal exposure to DE reduced spontaneous motor activity. However, it is still unknown whether maternal exposure to DE affects higher order behavioral function. Therefore, the aim of the present study was to examine the effects of fetal exposure to DE on motor coordination, impulsive behavior and monoaminergic systems in various brain regions. The results of the rotating rod test showed that DE-exposed mice displayed decreased time on the rota rod compared to control mice. However, no changes were detected between the two groups in the hanging test. Furthermore, the cliff avoidance test revealed that DE-exposed mice spent more time in the corner and fell off an inverted glass beaker compared to control mice. High performance liquid chromatography analysis revealed that noradrenaline turnover in the cerebellum was decreased by prenatal exposure to DE, and was significantly increased in the hypothalamus. Dopamine and serotonin levels in various brain regions were also changed by prenatal exposure to DE. Our study found that prenatal exposure to DE alters motor coordination, impulsive behavior and related monoamine levels. Therefore, the present study underscores the role of behavioral changes related to monoamine in response to maternal inhalation of DE.

**Key words:** Fetal period, Diesel exhaust, Air pollutants, Central nervous system, Motor coordination, Impulsive behavior

### INTRODUCTION

Numerous studies have indicated a causal relationship between ambient particulate matter (PM) in metropolitan areas and health risks (Pope, 2004). Recently, attention has focused on the effects of ultrafine particles or nanoparticles (< 100 nm) (Oberdörster *et al.*, 2005; Nel *et al.*, 2006). Diesel exhaust (DE) is composed of gaseous compounds and particulate matter defined as diesel exhaust particles (DEP). DEP emitted from diesel engines are

the largest contributor of airborne PM, and DEP can persist in the air where these compounds are readily inhaled. Therefore, the effects of exposure to DE represent a significant concern for healthcare.

While most studies of the toxicological effects of air pollution have focused on cardiovascular and pulmonary functions (Campen *et al.*, 2010; Ichinose *et al.*, 1997), more recent studies have examined the effect of air pollution on the central nervous system (CNS) (Block and Calderón-Garcidueñas, 2009). In fact, the effects of expo-

sure to DE and DEP on the CNS have been reported in several epidemiological studies. One of these studies found a potential adverse effect of air pollutants in Mexico City on the CNS of dogs (Calderón-Garcidueñas *et al.*, 2002). In humans, a subsequent study showed neurobehavioral and pulmonary impairment in railroad workers and electricians (Kilburn, 2000). Furthermore, X-ray fluorescence analysis in a kinetics report revealed that metal elements of DEP, which contained nano-sized particles, were detected in the olfactory epithelium and bulb of mice (Matsui *et al.*, 2009).

Several experimental studies have been performed to evaluate the mechanisms underlying the effects associated with exposure to DE on the CNS. To date, the molecular mechanisms were primarily attributed to inflammation mediated by oxidative stress. The inflammatory effects of DEP appear to be driven by the particulate component such as the surface area effect (Heinrich *et al.*, 1995). However, the organic and metal components also appear to play a role in oxidative and proinflammatory effects related to pathogenicity (Gnoth *et al.*, 1999; Ball *et al.*, 2000). DEP are composed of a carbonaceous core with adsorbed organic compounds, sulfates, and trace elements (Umezawa and Takeda, 2011). Soluble organic compounds, including polycyclic aromatic hydrocarbon (PAH), can represent up to sixty percent of the mass of the DEP particle. PAH resemble steroid hormones, and can elicit estrogenic and antiestrogenic activity (Santodonato, 1997). The effects of perinatal exposure to DE on the expression levels of estrogen receptors of the cerebrum of a neonate was previously reported (Tsukue *et al.*, 2009). The literature has established that estrogen is modulate brain development, neuroprotection as well as the regulation of monoaminergic systems (McEwen and Alves, 1999).

Evidence indicates that environmental exposure *in utero* and during early life can permanently change the body's structure, physiology and metabolism, and this exposure can lead to diseases in adults (George *et al.*, 2009). Due to unprotected barriers in the CNS and developmental plasticity influenced by the environment, a long period of vulnerability in the developmental process exists that increases the susceptibility of the CNS to environmental insult (Landrigan *et al.*, 2005). For instance, a previous report found that *in utero* exposure to DEP decreased weight gain during lactation (Hougaard *et al.*, 2008). In our previous study using a mouse model, caspase 3-positive cells were increased in the cerebellum by prenatal exposure to DE, a structure that regulates motor coordination (Sugamata *et al.*, 2006b). In addition, serum testosterone concentration, a parameter of impul-

sive behavior such as aggression, was also increased by maternal exposure to DE (Yoshida *et al.*, 2006). Furthermore, we showed that prenatal exposure to DE decreased locomotion as well as dopamine metabolites in the nucleus accumbens (Yokota *et al.*, 2009), which was confirmed in a subsequent study (Suzuki *et al.*, 2010).

However, it is not known whether the changes in higher order behavior (i.e., motor coordination and impulsive behavior) are induced by maternal exposure to DE. In the present study, we hypothesized that monoamine levels would be altered in specific brain regions following maternal exposure to DE. Therefore, the aim of the present study was to examine the effects of prenatal exposure to DE on motor coordination and impulsive behavior. Following the behavioral testing, we also assessed monoaminergic systems in various brain regions considered to be related to these behavioral changes.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

Pregnant ICR mice at gestational days (GD) 1 were purchased from Japan SLC Inc. (Shizuoka, Japan). The mice were divided into two groups: (1) diesel exposure group (n = 15) and (2) control group (n = 15). The two groups of mice were housed in separate inhalation chambers, and were housed under controlled conditions with 12 hr light/12 hr dark cycle and *ad libitum* access to food and water. The mice were exposed to diesel exhaust for 8 hr/day (9:00-17:00) for five days per week in the inhalation chambers at the Research Institute of Tuberculosis (Japan Anti-Tuberculosis Association, Tokyo, Japan) from GD 2 to 17. Pregnant mice were housed in stainless steel wire mesh cages during the exposure period; postpartum offspring would immediately drop away from the cages. GD 17 is considered to be the end of teratogenic period in mice; hence, the designated exposure period was from GD 2 to 17. After this period, mothers and pups were maintained in a clean room. On postnatal day (PND) 7, the number of pups per litter was adjusted to ten. The pups were weaned on PND 21, and male mice were then transported to Tokyo University of Science (Chiba, Japan). Mice were transported carefully to minimize stress factors by Sankyo Labo Service Co., Inc. (Tokyo, Japan) and Tokyo Laboratory Science Co., Ltd. (Tokyo, Japan). Experiments were approved by institutional and national guidelines for the care and use of laboratory animals.

### Diesel exhaust exposure

A 2369 cc diesel engine (Isuzu Motors Ltd., Tokyo,

## Fetal exposure to diesel exhaust affects behavior in male mice

Japan) was operated at a speed of 1,050 rpm and at 80% load with a commercial oil. The exhaust was introduced into a stainless steel dilution tunnel (450 mm diameter × 6,250 mm) where the exhaust was mixed with clean air. The average concentrations of exhaust constituents were maintained at 1.0 mg/m<sup>3</sup>, 2.67 ppm for carbon monoxide (CO), 0.23 ppm for nitrogen dioxide (NO<sub>2</sub>), and less than 0.01 ppm for sulfur dioxide (SO<sub>2</sub>).

### Behavioral analysis

The rotating rod test, the hanging test, and the cliff avoidance test were performed as previously described (Shimizu *et al.*, 2002; Matsuoka *et al.*, 2005). The rotating rod test and the hanging test were performed when offspring male mice were five weeks old. Motor coordination was assessed with a rotating rod apparatus (ENV-576 Mouse Rota Rod Single Station, MED Associates Inc., St. Albans, VT, USA), which consisted of a plastic rod (3 cm diameter, 8 cm long) with a gritted surface flanked by two large discs (40 cm diameter). The mice were placed on the rod, and the rod was rotated at a speed of 0 (stationary) rpm, 4 rpm, and 16 rpm. Three trials were conducted at each speed except for the stationary. Latency was monitored for 120 sec or until a fall occurred. Intra-trial intervals for each animal were more than 20 min. In the hanging test, a mouse was placed on the stainless bar (50 cm length, 2 mm diameter, elevated 37 cm from a surface) at a point midway between the supports, and was observed for 30 sec in four separate trials. The amount of time spent hanging was recorded. Cliff avoidance tests were performed when male offspring were six weeks of age. Cliff avoidance, defined as not jumping from the platform, were evaluated with the use of a round platform (an inverted glass container with a diameter of 13 cm and height of 20 cm). For this test, the mice were placed on the platform, and behaviors were video recorded for 10 min.

### Sampling procedure

Brains in anesthetized male offspring mice were isolated at three and six weeks of age, respectively. No differences were observed in body weight between the expo-

sure group and the control group (Table 1). The brains were dissected into various regions required for monoamine analysis. The brain regions were frozen in liquid nitrogen, and stored at -80°C until use.

### Brain dissection

Brain dissection was performed according to the modified method of Heffner *et al.* (1980), and was based on the atlas described by Paxinos and Franklin (Paxinos and Franklin, 2001). The following brain regions were rapidly dissected from coronal brain sections: (1) prefrontal cortex (containing cingulate cortex and motor cortex areas 1 and 2), (2) striatum, (3) hippocampus, (4) amygdala, (5) hypothalamus, (6) cerebellum and (7) brainstem. Determination of monoamine levels was conducted in the prefrontal cortex, striatum, hippocampus, hypothalamus, amygdala, cerebellum and brainstem.

### Neurochemical analysis

Frozen brain tissues were homogenized in ice cold 0.2 M perchloric acid (Nacalai Tesque Inc., Kyoto, Japan) containing 100 mM EDTA 2Na (Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) and 100 ng isoproterenol (Sigma-Aldrich Co., St. Louis, MO, USA), as an internal standard. The homogenates were centrifuged at 20,000 × 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 (Kanto Chemical Co., Inc., Tokyo, Japan), and stored at -80°C until analysis. For HPLC, 10 µl of the pH adjusted supernatant was injected with a microsyringe (702SNR; Hamilton Co., Reno, NV, USA) into an HPLC system with electrochemical detection (HTEC-500MAB; EICOM Co., Kyoto, Japan). Each group contained samples from nine mice. The standard solution contained the monoamines dopamine (DA) and noradrenaline (NA) as well as serotonin (5-HT) and their metabolites. The DA metabolites were 3-methoxytyramine hydrochloride (3-MT), 3,4-dihydroxyphenylacetic acid (DOPAC) and homovanillic acid (HVA). The NA metabolites were normetanephrine hydrochloride (NM) and 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol hemipiperazinium (MHPG). The

**Table 1.** Body weights of mice at three and six weeks old

	3 weeks		6 weeks	
	Control	DE	Control	DE
Number	10	10	10	10
Weight (g)	20.5 ± 1.2	21.8 ± 0.8	40.0 ± 1.2	42.5 ± 1.3

The data were presented as the mean ± S.E. of ten mice.



5-HT metabolites were 5-hydroxyindole-3-acetic acid (5-HIAA). Standards DA, HVA, 3-MT, NM, MHPG, 5-HT and 5-HIAA were obtained from Sigma-Aldrich. Standards NA and DOPAC were obtained from Nacalai Tesque and Wako Pure Chemical Industries, Ltd. (Osaka, Japan), respectively. The monoamines and their metabolites were separated by passage through a C18 reverse-phase column (Eicompak SC-5ODS; 3.0 mm × 150 mm; Eicom) maintained at 25°C and connected to an electrochemical detector (EPC-500, Eicom). The mobile phase was 0.1 M acetic acid/citric acid buffer (pH 3.5) containing EDTA 2Na (5 mg/l), sodium 1-octanesulfonate (190 mg/l; Nacalai Tesque), and 15% methanol (Kanto Chemical Co., Inc.). The flow rate was maintained at 0.5 ml/min for 35 min. Data were collected and analyzed with the PowerChrom 280 System (eDAQ Pty Ltd., New South Wales, Australia). To determine the protein concentration, the pellets were dissolved in 100 mM Tris-HCl for protein determination by a high sensitivity version of the Bradford method with a commercial reagent (ADV-01; Cytoskeleton Inc., Denver, CO, USA), and measurements were performed according to the manufacturer's protocol. The absorbance was measured at 595 nm with a 96 well microplate reader (model 550; Bio-Rad Laboratories Inc., Hercules, CA, USA), and protein concentration was calculated from a standard curve generated with bovine gamma globulin (Pre-Diluted Protein Assay Standards: Bovine Gamma Globulin Set; Thermo Fisher Scientific Inc., Rockford, IL, USA). Concentrations of monoamines and their metabolites are expressed as pg/mg of protein, and the catabolism rate is expressed as the ratio of metabolite to monoamine (e.g. MHPG/NA).

### Statistical analysis

Data from the rotating rod test and hanging test were analyzed using a two-way analysis of variance (ANOVA) with repeated measures for the trials. The remaining data were analyzed by the Mann Whitney U-test. Data were expressed as mean ± S.E. Differences between groups were examined for statistical significance, and  $P < 0.05$  and  $P < 0.01$  indicate statistical significance.

## RESULTS

### Behavioral analysis (Rotating rod test, Hanging test, Cliff avoidance test)

To assess the motor function of offspring male mice, the rotating rod test and hanging test were performed. The rotating rod test was performed at five weeks of age. In this test, the rodents were exposed to three variations of speed (0 rpm, 4 rpm, 16 rpm), and the test was per-

formed in three separate trials at 4 rpm and 16 rpm. In the stationary phase (0 rpm), no differences were detected in latency time to fall off in the maternally DE exposed group compared to controls. However, the retention time of DE exposed mice on the rod was significantly shorter than that of controls at both 4 rpm and 16 rpm [4 rpm:  $F(1, 84) = 10.16$ ;  $P = 0.002$ ; 16 rpm:  $F(1, 84) = 10.90$ ;  $P = 0.001$ ] (Fig. 1A). While learning effects of both control and DE exposed mice were observed at every speed [4 rpm:  $F(2, 84) = 3.41$ ;  $P = 0.038$ ; 16 rpm:  $F(2, 84) = 6.50$ ;  $P = 0.002$ ], no exposure × trials interaction was detected using a two-way analysis of variance (ANOVA). The hanging test was performed in four separate trials two days after the rotating rod test, and this test did not detect any differences between the two groups (Fig. 1B).

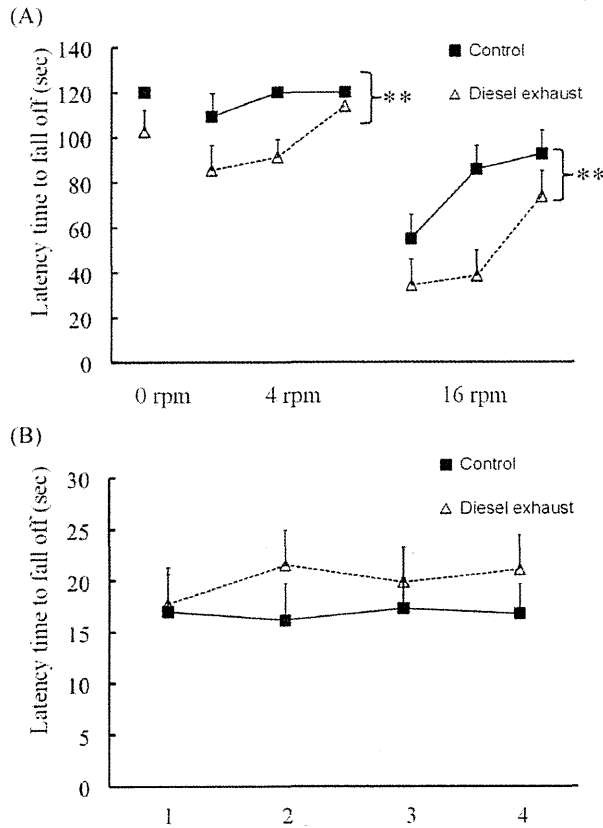
The cliff avoidance test was subsequently performed at six weeks of age. The elevated transparent platform consisted of the base of an inverted glass beaker with a height more than twice the animal's body length. Eight of the fifteen control mice that were placed on an elevated transparent platform avoided the edge of the platform and did not jump off, whereas eleven of the fifteen DE exposed mice jumped off the platform within 10 min. We found differences in the time latency to jump off the platform between the two groups in that the DE-exposed mice jumped off the inverted beaker earlier than the control mice ( $P = 0.036$ ) (Fig. 2).

### Neurochemical analysis

The brain samples were obtained immediately after the cliff avoidance test, and the levels of monoamine and their metabolites were examined in various brain regions in mice. In the noradrenergic system, prenatal exposure to DE altered the concentration of NA metabolites in the cerebellum of both three- and six-week-old male offspring. Fetal exposure to DE decreased the concentration of MHPG at three weeks of age ( $P = 0.013$ , Fig. 3A), and decreased MHPG and NM concentrations at six weeks of age (MHPG;  $P = 0.031$ , NM;  $P = 0.007$ , Fig. 3B). NA turnover is an index of NA neuronal activity that is calculated as a ratio of NA metabolites to NA, and we found that NA turnover was decreased by maternal exposure to DE (MHPG/NA;  $P = 0.002$ , Fig. 3C) (MHPG/NA;  $P = 0.015$ , NM/NA;  $P = 0.003$ , Fig. 3D). The NA concentration in the hypothalamus was not altered at three weeks of age (Fig. 4A), and was dramatically increased in DE-exposed mice at six weeks of age ( $P = 0.043$ , Fig. 4B).

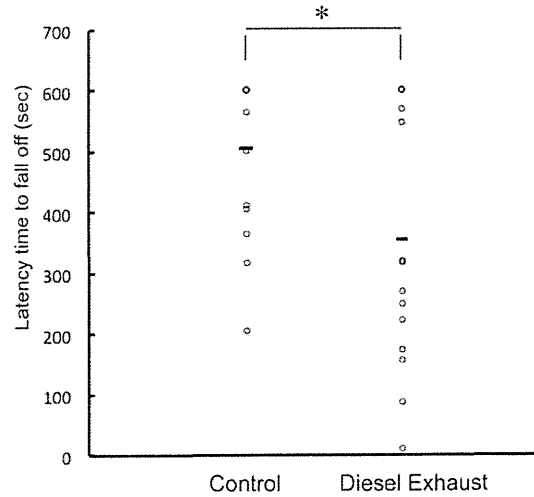
Similar to our previous reports (Yokota *et al.*, 2009; Suzuki *et al.*, 2010), we detected decreased DA metabolites in the nucleus accumbens in DE-exposed male offspring (three-week-old, data not shown) in the dopamin-

Fetal exposure to diesel exhaust affects behavior in male mice



**Fig. 1.** Evaluation of motor function in the rotating rod test and the hanging test. (A) Retention time of control and maternally exposed diesel exhaust groups on the rotating rod at speed 0 rpm, 4 rpm, and 16 rpm. Mice that were maternally exposed to diesel showed decreased time on the rotating rod at 4 rpm and 16 rpm. The data represents time course changes in control and the maternally exposed diesel exhaust group. (B) Hanging time of control and maternally exposed diesel exhaust groups. No differences were detected between the two groups. Solid squares and triangles represent control and maternally exposed diesel exhaust mice (n = 15), respectively. Values are mean ± S.E. (\*P < 0.05, \*\*P < 0.01).

ergic system. DA and a DA metabolite, 3-MT, were decreased in the prefrontal cortex in DE-exposed mice at three weeks of age (DA; P = 0.034, 3-MT; P = 0.041, Fig. 5A), but not changed at six weeks of age (Fig. 5B). In contrast, we found that DA levels were increased in DE-exposed mice at six weeks of age in the amygdala, and its metabolites were also increased at both three and six weeks of age (DA; P = 0.028, DOPAC; P = 0.008, HVA; P = 0.011, 3-MT; P = 0.023, Fig. 5C) (DOPAC; P = 0.012, Fig. 5D).

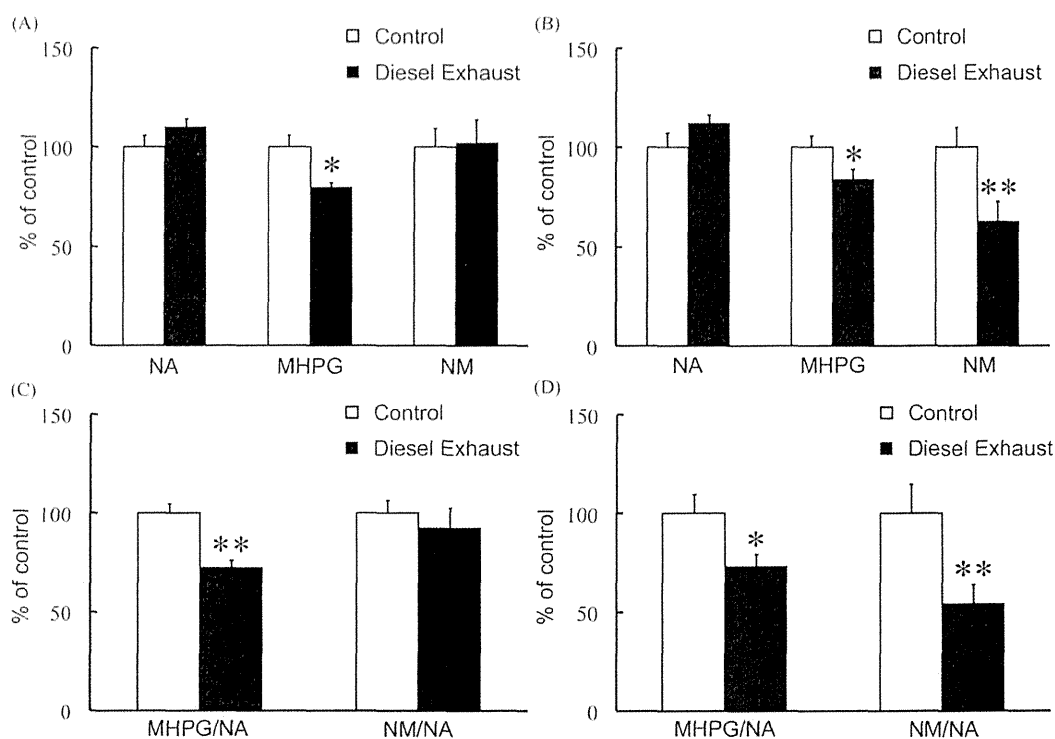


**Fig. 2.** Evaluation of impulsive behavior in the cliff avoidance test. Maternally exposed diesel exhaust mice tended to explore the corner of the inverted beaker which resulted in jumping off the inverted beaker. Significant differences were detected in cliff avoidance behavior between control and maternally exposed diesel exhaust mice. The data were expressed as scatter plot of latency to jump off within 10 min in control and diesel exhaust exposed groups. Mice that stayed on the inverted glass beaker were shown as 600 sec. Each black bar represents the mean latency to jump off the inverted glass beaker (n = 15; \*P < 0.05 vs. control group).

In the serotonergic system, we found that prenatal exposure to DE increased 5-HT and 5-HIAA levels in the amygdala at three weeks of age (Table 2). At six weeks of age, an increase was detected in the prenatal DE exposure group in 5-HT and 5-HIAA concentrations in the prefrontal cortex and hypothalamus, respectively (Table 3).

**DISCUSSION**

The results of the present study indicate for the first time that maternal exposure to DE affects motor coordination and impulsive behavior in mice. In addition, this study demonstrates neurochemical alterations in specific brain regions related to these behavioral deficits. In the present study, DE concentrations were approximately 10 times higher than realistic concentrations. However, the DE concentrations were not so high when lifespan is taken into account, given that mice were only exposed in the fetal period. Only male offspring mice were used in this study due to the variations associated with hormonal imbalance during the estrous cycle seen in female mice.



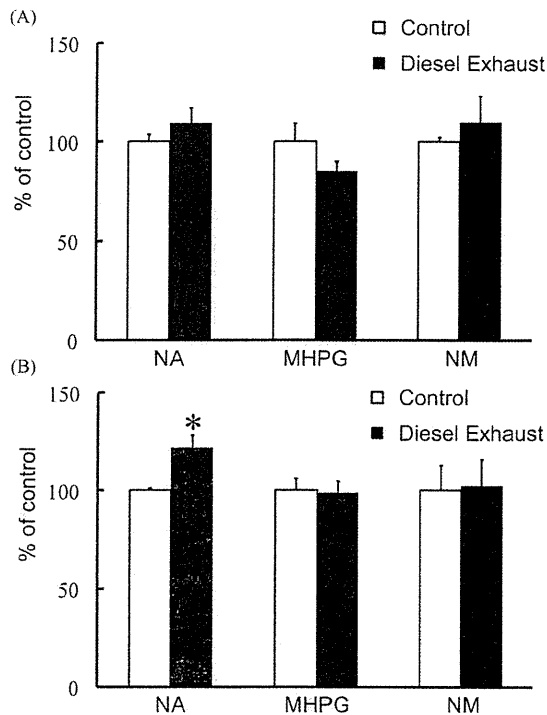
**Fig. 3.** Levels of noradrenaline and its metabolites in the cerebellum. (A, B) Levels of NA and its metabolites in the cerebellum at (A) three and (B) six weeks old of age. The data were expressed as a percentage of the value in control mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of nine mice (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control group). (C, D) Measurement of NA turnover in the cerebellum at (C) three and (D) six weeks old of age. The data were expressed as a percentage of the value in control mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of nine mice (\* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs. control group). Abbreviations: NA, noradrenaline; MHPG, 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol hemipiperazine; NM, normetanephrine hydrochloride.

First, we found that prenatal DE exposure decreased the time latency to fall off in the rotating rod test, but did not alter the time latency to fall off in the hanging test. The cerebellum is important for regulation of motor coordination; higher order motor function (Shimizu *et al.*, 2002). It is possible that prenatal exposure to DE affected motor coordination that was specific to parts of the CNS such as the cerebellum, but not components of the periphery such as the skeletal muscle. The results indicated that the concentration of NA metabolites and NA turnover in the cerebellum were decreased by the maternal exposure to DE at three and six weeks of age. The cerebellum, especially Purkinje cells, is important to the modulation of motor coordination and motor learning tasks regulated by gamma aminobutyric acid (GABA) neuron activity (Mitoma and Konishi, 1999). Previous studies indicate that the cerebellum receives widespread nerve terminal projections from noradrenergic neurons (Watson and McElligott, 1984). GABAergic neurons in the Purkinje

cells are stimulated by NA neurons to elicit a prolonged inhibition of Purkinje cell activity (Mitoma and Konishi, 1999). A previous study showed that the number of caspase 3 positive cells in the Purkinje cells were significantly increased in maternally DE exposed mice (Sugamata *et al.*, 2006b). In addition, it was reported that vincristine caused massive apoptosis in the cerebellum with caspase 3-like protease activation, which was associated with motor dysfunction in the rotating rod test (Shimizu *et al.*, 2002). It was quite possible that the impairment seen in the rotating rod test following maternal DE exposure may be caused by a reduction in the activity of noradrenergic systems in the cerebellum.

The cliff avoidance test showed that maternal exposure to DE affected impulsive behavior of offspring under novel environmental stress. Impulsive behavior is related to various psychological factors such as social and environmental stress (Matsuoka *et al.*, 2005). In addition, prenatal exposure to DE also affected the concentration of NA

## Fetal exposure to diesel exhaust affects behavior in male mice



**Fig. 4.** Levels of noradrenaline and its metabolites in the hypothalamus. (A, B) Levels of NA and its metabolites in the hypothalamus at (A) three and (B) six weeks of age. The data were expressed as a percentage of the value in control mice. Each column represents the mean  $\pm$  S.E. of nine mice (\* $P < 0.05$  vs. control group). Abbreviations: NA, noradrenaline; MHPG, 4-hydroxy-3-methoxyphenylglycol hemipiperazinium; NM, normetanephrine hydrochloride.

in the hypothalamus, and these results suggest that DE may represent a stressor when exposed to mouse fetuses. The hypothalamus receives rich noradrenergic innervation from the brainstem, and secretes adrenocorticotrophic hormone due to the noradrenergic input (Szafarczyk *et al.*, 1987, 1988). Moreover, intracerebral administration of NA into the paraventricular nucleus, a part of the hypothalamus, also results in an activation of the stress axis (Itoi *et al.*, 1994). On the contrary, noradrenergic antagonists can block stress axis activation. These findings confirm the importance of NA in stimulating corticotropin releasing hormone neurons, which stimulate corticosterone secretion from the adrenal gland into blood (Handa *et al.*, 1994). It was previously reported that prenatal exposure to endocrine disrupting compounds during development affects the hypothalamo-pituitary-adrenal

(HPA) axis (Diamanti-Kandarakis *et al.*, 2009). Furthermore, DE and DEP were also reported to elicit hormone-like activity (Takeda *et al.*, 2004). Therefore, the alteration of impulsive behavior in the prenatal DE exposure group may be mediated by hypothalamic impairment, which is induced by HPA axis activation as well as hormone-like reactions of some DE components.

Understanding the critical periods associated with the effects of DE exposure on the CNS is very important. Previous studies indicate that stimulation or insult at critical phases of CNS development can result in long-term changes in brain structure and function due to neural plasticity via gene-environmental interactions. For instance, the serotonin system in the CNS is well known to be affected by perinatal environmental alterations (Van den Hove *et al.*, 2011). In the present study, we evaluated serotonergic systems of various brain regions in male offspring following maternal DE exposure. At three weeks of age, increased levels of 5-HT and 5-HIAA were observed in the amygdala, and increases in 5-HT and 5-HIAA levels were observed in the prefrontal cortex and hypothalamus at six weeks of age, respectively. Serotonin-based activity propagates from neurons located in the raphe nuclei of the brainstem, the most primitive part of the brain. Therefore, the serotonergic systems are involved in fundamental aspects of physiology including body temperature control, cardiovascular activity as well as respiration, and this system also regulates motor control as well as higher order behaviors, such as impulsive behavior and depressive like behavior (Chase and Murphy, 1973). The broad range of physiology and behavior associated with the serotonin nerve systems can be attributed to the widespread distribution of serotonin-containing nerve fiber terminals that arise from the raphe nuclei. Indeed, the branching of the serotonin network comprises the most expansive neurochemical system in the brain. In our previous study, we found that maternal exposure to DE increased serum testosterone levels in adulthood, which is related to aggressive behavior (Yoshida *et al.*, 2006). A strong relationship between serotonin and testosterone has also been reported in the literature (Birger *et al.*, 2003). The alteration of the serotonin nervous system by maternal exposure to DE may contribute changes in impulsive behavior. However, contradictory findings have been reported regarding the reduction in serotonin concentration and impulsive behavior such as aggression (Birger *et al.*, 2003). Therefore, further investigation is necessary to examine the effects of prenatal exposure to DE on the serotonergic systems and impulsive behavior.

In the present study, the dopaminergic system was investigated in prenatally DE-exposed mice at both three