

Fig. 5. Levels of dopamine and its metabolites in the prefrontal cortex and the amygdala. (A, B) Levels of DA and its metabolites in the prefrontal cortex 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). (C, D) Levels of DA and its metabolites in the amygdala at (C) three and (D) 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: DA, dopamine; DOPAC, 3,4-dihydroxyphenylacetic acid; HVA, homovanillic acid, 3-MT, 3-methoxytyramine hydrochloride.

and six weeks of age. We found a decrease in DA and its metabolite in the prefrontal cortex of DE-exposed mice (three-week-old), whereas we detected an increase in DA and its metabolite in the amygdala of DE-exposed mice (three- and six-week-old). We previously observed a distribution of DEP in the prefrontal cortex and striatum in adult offspring mice in adulthood (Sugamata *et al.*, 2006a). The direct toxicity of DEP on the DA neuron was reported in an *in vitro* study that demonstrated that DEP induces DA neuron damage (Block *et al.*, 2004). These findings suggest that inhaled DEP entered the fetal brain accumulating in the prefrontal cortex and striatum, ultimately resulting in DA neuron damage in these brain regions and a reduction in DA and its metabolites. However, DEP accumulation was not detected in the amygdala of offspring mice that were prenatally-exposed to DE. These findings suggest that the mechanism of toxicity associated with maternally inhaled DE may be due

to direct or indirect action of DEP. Our unpublished data showed that prenatal exposure to DE affected the CNS more seriously than that of filtered DE, which removes small nano-sized DEP from the exhaust with a filter. We previously reported that the inhalation toxicity of DE on androgenesis during the fetal period was reduced by filtering and cutting off DEP (Ono *et al.*, 2008). These observations suggest the possibility that surface chemical compounds such as PAH and estrogen around the DEP may affect the CNS of offspring mice. Further investigation will be required to trace DEP in order to identify the various neural cells that incorporate DEP. This study would lead to a better understanding of the precise mechanism associated with how DEP affects motor coordination and impulsive behavior.

In conclusion, in the present study, we showed that prenatal exposure to DE affected motor coordination and impulsive behavior of male offspring mice. In addition,

Fetal exposure to diesel exhaust affects behavior in male mice

Table 2. Maternal exposure to diesel exhaust changes serotonergic systems in offsprings at three weeks of age

Brain region	Group	Concentration (pg/mg protein)		Turnover
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Prefrontal cortex	Control	6692 ± 543	3520 ± 243	0.54 ± 0.03
	Exposed	6711 ± 561	3509 ± 225	0.53 ± 0.02
Striatum	Control	6110 ± 320	6384 ± 162	1.07 ± 0.05
	Exposed	6830 ± 403	7035 ± 278	1.05 ± 0.04
Hippocampus	Control	4910 ± 167	5507 ± 228	1.12 ± 0.03
	Exposed	4733 ± 286	5120 ± 292	1.10 ± 0.04
Amygdala	Control	10888 ± 490	5654 ± 168	0.52 ± 0.02
	Exposed	15426 ± 863**	7568 ± 466**	0.49 ± 0.01
Hypothalamus	Control	16168 ± 547	9625 ± 291	0.60 ± 0.01
	Exposed	18831 ± 1251	11458 ± 712	0.61 ± 0.02
Cerebellum	Control	1448 ± 138	1633 ± 102	1.17 ± 0.07
	Exposed	1988 ± 421	1691 ± 95	1.01 ± 0.09
Brainstem	Control	15369 ± 573	10437 ± 400	0.68 ± 0.02
	Exposed	16126 ± 724	10948 ± 336	0.68 ± 0.02

The data were presented as the mean ± S.E. of nine mice (*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group).

Table 3. Maternal exposure to diesel exhaust changes serotonergic systems in offsprings at six weeks of age

Brain region	Group	Concentration (pg/mg protein)		Turnover
		5-HT	5-HIAA	5-HIAA/5-HT
Prefrontal cortex	Control	6630 ± 426	2973 ± 150	0.45 ± 0.01
	Exposed	8686 ± 516*	3493 ± 223	0.41 ± 0.03
Striatum	Control	8530 ± 382	7309 ± 667	0.86 ± 0.07
	Exposed	8615 ± 346	6376 ± 636	0.74 ± 0.07
Hippocampus	Control	8096 ± 496	8061 ± 653	0.99 ± 0.05
	Exposed	8315 ± 551	9022 ± 625	1.09 ± 0.04
Amygdala	Control	11861 ± 948	5381 ± 476	0.45 ± 0.01
	Exposed	11020 ± 307	5136 ± 153	0.47 ± 0.02
Hypothalamus	Control	17518 ± 410	8544 ± 355	0.49 ± 0.01
	Exposed	19143 ± 731	11559 ± 697**	0.61 ± 0.04*
Cerebellum	Control	3470 ± 533	2165 ± 303	0.64 ± 0.04
	Exposed	2736 ± 431	1960 ± 166	0.79 ± 0.07
Brainstem	Control	13395 ± 435	8517 ± 538	0.63 ± 0.03
	Exposed	14436 ± 466	9092 ± 518	0.63 ± 0.03

The data were presented as the mean ± S.E. of nine mice (*P < 0.05, **P < 0.01 vs. control group).

we found that maternal DE exposure altered the monoaminergic systems in various brain regions in male offspring at both three and six weeks of age. The monoaminergic system plays an important role in regulating behavior and maintenance of the CNS. These results provide novel and

significant information regarding the health effects of DE and DEP, and further confirm the need to remove DEP from the environment in order to avoid the risk of expo-

ACKNOWLEDGMENTS

The authors would like to thank Dr. Isamu Sugawara and Mr. Tadashi Udagawa (Research Institute of Tuberculosis, Japan Anti Tuberculosis Association, Tokyo, Japan) for help with the diesel exhaust exposure system. We also would like to thank Dr. Masao Sugamata and Dr. Tomomi Ihara of the Tochigi Institute of Clinical Pathology, Dr. Ken Tachibana of Tokyo University of Science, Dr. Seiichi Yoshida of Oita University of Nursing and Health Sciences, and Dr. Naomi Tsukue of the Japan Automobile Research Institute for valuable discussion. This work was supported by Grant-in-Aid for JSPS Fellows (Satoshi Yokota, 22. 5895) and in part by a Grant-in-Aid for Science Research from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology of Japan. This work was also supported by a Grant-in Aid for the Private University Science Research Upgrade Promotion Business "Academic Frontier Project, a Grant-in Aid for Health and Labour Sciences Research Grants, Research on Risk of Chemical Substances, from the Ministry of Health, Labour and Welfare" and a Grant-in Aid for NEXT-Supported Program for the Strategic Research Foundation at Private Universities, 2011-2015.

REFERENCES

- Ball, J.C., Straccia, A.M., Young, W.C. and Aust, A.E. (2000): The formation of reactive oxygen species catalyzed by neutral, aqueous extracts of NIST ambient particulate matter and diesel engine particles. *J. Air Waste Manag. Assoc.*, **50**, 1897-1903.
- Birger, M., Swartz, M., Cohen, D., Alesh, Y., Grishpan, C. and Kotler, M. (2003): Aggression: the testosterone-serotonin link. *Isr. Med. Assoc. J.*, **5**, 653-658.
- Block, M.L. and Calderón-Garcidueñas, L. (2009): Air pollution: mechanisms of neuroinflammation and CNS disease. *Trends Neurosci.*, **32**, 506-516.
- Block, M.L., Wu, X., Pei, Z., Li, G., Wang, T., Qin, L., Wilson, B., Yang, J., Hong, J.S. and Veronesi, B. (2004): Nanometer size diesel exhaust particles are selectively toxic to dopaminergic neurons: the role of microglia, phagocytosis, and NADPH oxidase. *FASEB J.*, **18**, 1618-1620.
- Calderón-Garcidueñas, L., Azzarelli, B., Acuna, H., Garcia, R., Gambling, T.M., Osnaya, N., Monroy, S., DEL Tizapantzi, M.R., Carson, J.L., Villarreal-Calderon, A. and Rewcastle, B. (2002): Air pollution and brain damage. *Toxicol. Pathol.*, **30**, 373-389.
- Campen, M.J., Lund, A.K., Knuckles, T.L., Conklin, D.J., Bishop, B., Young, D., Seilkop, S., Seagrave, J., Reed, M.D. and McDonald, J.D. (2010): Inhaled diesel emissions alter atherosclerotic plaque composition in ApoE(-/-) mice. *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, **242**, 310-317.
- Chase, T.N. and Murphy, D.L. (1973): Serotonin and central nervous system function. *Annu. Rev. Pharmacol.*, **13**, 181-197.
- Diamanti-Kandarakis, E., Bourguignon, J.P., Giudice, L.C., Hauser, R., Prins, G.S., Soto, A.M., Zoeller, R.T. and Gore, A.C. (2009): Endocrine-disrupting chemicals: an Endocrine Society scientific statement. *Endocr. Rev.*, **30**, 293-342.
- George, Xu, Umezawa, M. and Takeda, K. (2009): Early Development Origins of Adult Disease Caused by Malnutrition and Environmental Chemical Substances. *J. Health Sci.*, **55**, 11-19.
- Gnoth, C., Bremme, M., Klemm, R., Frank-Herrmann, P., Godehardt, E. and Freundl, G. (1999): Research and quality control in natural family planning with relational database systems. *Adv. Contracept.*, **15**, 375-380.
- Handa, R.J., Nunley, K.M., Lorens, S.A., Louie, J.P., McGivern, R.F. and Bollnow, M.R. (1994): Androgen regulation of adrenocorticotropin and corticosterone secretion in the male rat following novelty and foot shock stressors. *Physiol. Behav.*, **55**, 117-124.
- Heffner, T.G., Hartman, J.A. and Seiden, L.S. (1980): A rapid method for the regional dissection of the rat brain. *Pharmacol. Biochem. Behav.*, **13**, 453-456.
- Heinrich, U., Fuhst, R., Rittinghausen, S., Creutzenberg, O., Bellmann, B., Koch, W. and Levsen, K. (1995): Chronic inhalation exposure of wistar rats and two different strains of mice to diesel engine exhaust, carbon black, and titanium dioxide. *Inhalation Toxicol.*, **7**, 533-556.
- Hougaard, K.S., Jensen, K.A., Nordly, P., Taxvig, C., Vogel, U., Saber, A.T. and Wallin, H. (2008): Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity and inflammation in mice. *Part. Fibre Toxicol.*, **5**, 3.
- Ichinose, T., Yajima, Y., Nagashima, M., Takenoshita, S., Nagamachi, Y. and Sagai, M. (1997): Lung carcinogenesis and formation of 8-hydroxy-deoxyguanosine in mice by diesel exhaust particles. *Carcinogenesis*, **18**, 185-192.
- Itoi, K., Suda, T., Tozawa, F., Dobashi, I., Ohmori, N., Sakai, Y., Abe, K. and Demura, H. (1994): Microinjection of norepinephrine into the paraventricular nucleus of the hypothalamus stimulates corticotropin-releasing factor gene expression in conscious rats. *Endocrinology*, **135**, 2177-2182.
- Kilburn, K.H. (2000): Effects of diesel exhaust on neurobehavioral and pulmonary functions. *Arch. Environ. Health*, **55**, 11-17.
- Landrigan, P.J., Sonawane, B., Butler, R.N., Trasande, L., Callan, R. and Droller, D. (2005): Early environmental origins of neurodegenerative disease in later life. *Environ. Health Perspect.*, **113**, 1230-1233.
- Matsui, Y., Sakai, N., Tsuda, A., Terada, Y., Takaoka, M., Fujimaki, H. and Uchiyama, I. (2009): Tracking the pathway of diesel exhaust particles from the nose to the brain by X-ray fluorescence analysis. *Spectrochimica Acta. Part. B.*, **64**, 796-801.
- Matsuoka, Y., Furuyashiki, T., Yamada, K., Nagai, T., Bito, H., Tanaka, Y., Kitaoka, S., Ushikubi, F., Nabeshima, T. and Narumiya, S. (2005): Prostaglandin E receptor EP1 controls impulsive behavior under stress. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 16066-16071.
- McEwen, B.S. and Alves, S.E. (1999): Estrogen actions in the central nervous system. *Endocr. Rev.*, **20**, 279-307.
- Mitoma, H. and Konishi, S. (1999): Monoaminergic long-term facilitation of GABA-mediated inhibitory transmission at cerebellar synapses. *Neuroscience*, **88**, 871-883.
- Nel, A., Xia, T., Mädler, L. and Li, N. (2006): Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science*, **311**, 622-627.
- Oberdörster, G., Oberdörster, E. and Oberdörster, J. (2005): Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ. Health Perspect.*, **113**, 823-839.
- Ono, N., Oshio, S., Niwata, Y., Yoshida, S., Tsukue, N., Sugawara, I., Takano, H. and Takeda, K. (2008): Detrimental effects of pre-

Fetal exposure to diesel exhaust affects behavior in male mice

- natal exposure to filtered diesel exhaust on mouse spermatogenesis. *Arch. Toxicol.*, **82**, 851-859.
- Paxinos, G. and Franklin, K.B.J. (2001): The mouse brain in stereotaxic coordinates. Academic Press, 2.
- Pope, C.A. 3rd. (2004): Air pollution and health-good news and bad. *N. Engl. J. Med.*, **351**, 1132-1134.
- Santodonato, J. (1997): Review of the estrogenic and antiestrogenic activity of polycyclic aromatic hydrocarbons: relationship to carcinogenicity. *Chemosphere*, **34**, 835-848.
- Shimizu, H., Ohgoh, M., Momose, Y., Nishizawa, Y. and Ogura, H. (2002): Massive cell death of cerebellar granule neurons accompanied with caspase-3-like protease activation and subsequent motor discoordination after intracerebroventricular injection of vincristine in mice. *Neuroscience*, **115**, 55-65.
- 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.
- 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.
- 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.
- Szafarczyk, A., Malaval, F., Laurent, A., Gibaud, R. and Assenmacher, I. (1987): Further evidence for a central stimulatory action of catecholamines on adrenocorticotropin release in the rat. *Endocrinology*, **121**, 883-892.
- Szafarczyk, A., Guillaume, V., Conte-Devolx, B., Alonso, G., Malaval, F., Pares-Herbuté, N., Oliver, C. and Assenmacher, I. (1988): Central catecholaminergic system stimulates secretion of CRH at different sites. *Am. J. Physiol.*, **255**, E463-468.
- Takeda, K., Tsukue, N. and Yoshida, S. (2004): Endocrine-disrupting activity of chemicals in diesel exhaust and diesel exhaust particles. *Environ. Sci.*, **11**, 33-45.
- Tsukue, N., Watanabe, M., Kumamoto, T., Takano, H. and Takeda, K. (2009): Perinatal exposure to diesel exhaust affects gene expression in mouse cerebrum. *Arch. Toxicol.*, **83**, 985-1000.
- Umezawa, M. and Takeda, K. (2011): Automobile exhaust: Detrimental effects on pulmonary and extrapulmonary tissues and offspring. "Encyclopedia of Environmental Health", **1**, 247-252.
- Van den Hove, D.L., Jakob, S.B., Schraut, K.G., Kenis, G., Schmitt, A.G., Kneitz, S., Scholz, C.J., Wiescholleck, V., Ortega, G., Prickaerts, J., Steinbusch, H. and Lesch, K.P. (2011): Differential effects of prenatal stress in 5-Htt deficient mice: towards molecular mechanisms of gene × environment interactions. *PLoS One.*, **6**, e22715.
- Yokota, S., Mizuo, K., Moriya, N., Oshio, S., Sugawara, I. and Takeda, K. (2009): Effect of prenatal exposure to diesel exhaust on dopaminergic system in mice. *Neurosci. Lett.*, **449**, 38-41.
- Yoshida, S., Ono, N., Tsukue, N., Oshio, S., Umeda, T., Takano, H. and Takeda, K. (2006): In utero exposure to diesel exhaust increased accessory reproductive gland weight and serum testosterone concentration in male mice. *Environ. Sci.*, **13**, 139-147.
- Watson, M. and McElligott, J.G. (1984): Cerebellar norepinephrine depletion and impaired acquisition of specific locomotor tasks in rats. *Brain Res.*, **296**, 129-138.

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	P 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 $(nfn)/(NfN)$, 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).

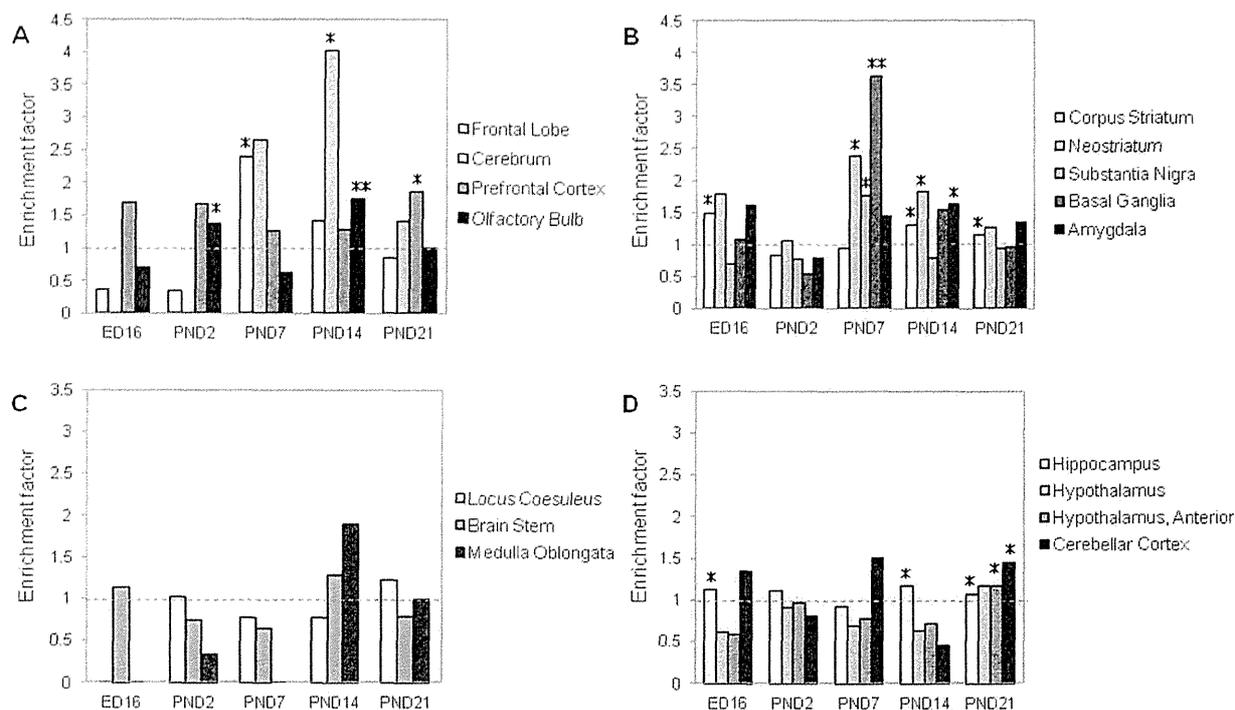


Fig. 1. Time-dependency of enrichment of each MeSH from genes dysregulated by maternal TiO₂ exposure. MeSH data indicating brain regions closely associated with (A) telencephalon, (B) dopamine neuron system, (C) noradrenaline and serotonin neuron system and (D) others of strong interest. The enrichment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

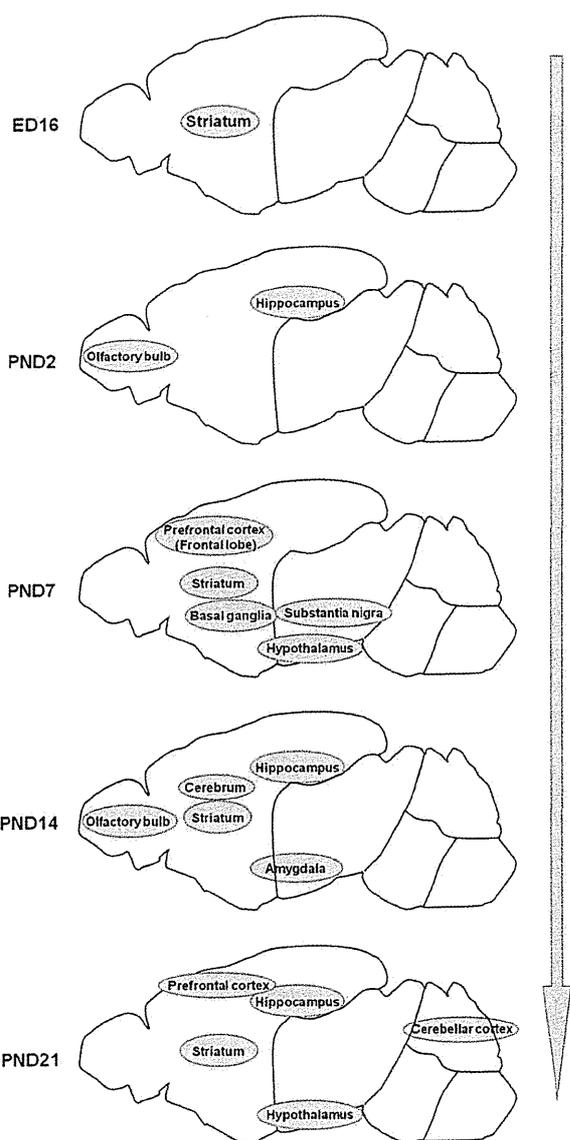
Target brain regions of prenatal nano-TiO₂ exposure

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の⁻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の⁻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難い。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が望まれる。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
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。

情報提供者の懸念に応える「リスクコミュニケーション・パターン集」の開発

Development of “risk communication basic patterns” in order to relieve communicators' anxiety and the expected utility

○難波美帆¹, 梅澤雅和², 石村源生³

Miho NAMBA, Masakazu UMEZAWA, and Gensei ISHIMURA

Abstract. After the serious accident of Fukushima Daiichi nuclear power plant, risk communication became more important in our society. And researchers, scientist, school teachers, and science communicators are expected to perform as risk communicators. However it is difficult for them to have a good communication in such conflict situation in which there is scientific uncertainty. In the present study, we focused on communicators' anxiety and problems in the situation and organized a workshop aimed to visualize the anxiety, problems and their solutions. We found 60 communication patterns related to emerging risks, This paper shows the content and utilities of the workshop.

Key Words: Risk communication, Communicator, Anxiety, Workshop utility, Pattern language

1. 研究の背景と目的

昨年3月11日以降、福島第一原子力発電所の事故を受け、「リスクコミュニケーション」という言葉が使われる機会が増えた。これまでは、行政や企業の担当者が使う専門的な言葉という感があったが、今では、一般向けにも短い解説付きで使われる。首相官邸のWebサイトにも登場する(1)。

同サイトで、京都医療科学大学学長の遠藤啓吾氏は、リスクコミュニケーションを「地域の安全において不可欠な役割を担う行政、専門家、企業、

住民、それぞれの役割を明らかにすること。そのために共通の意識を持ち、協力関係をつくること。...その方策として、互いに危機について意見や情報を交換し、共有し合う」と説明している。

その他、一般的な書籍やWebサイトを見ると、ここに合意形成を含めている記述も見られる。

福島第一原子力発電所の事故後、政府や東京電力は、国民に対して、環境中に放出された有害性物質(放射性物質)について速やかに暴露量の見積もりと回避手段を伝え、継続的に有害性(可能性を含む)情報について、国民が望む選択を共有

1 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)

2 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)

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)

していかなければならなかった。

ところが見積もりについては SPEEDI が有効活用されなかったことから始まり、情報の行き違いで実測も遅れ、緊急情報の発信と避難誘導が決定的に遅れてしまった。その結果、しなくてもすんだ被曝をしてしまった人たちがいる。また、その後、マスメデや専門家からの「安全だ」という判断を押し付けるような情報発信が相次いだことから、マスメディアと国民との間でも信頼関係が大きく損なわれてしまった。その結果、緊急時を過ぎ、平時に向けての回復期に向けて、国民と行政やマスメディアの間でコミュニケーションの前提となる信頼が完全には回復しておらず、情報共有に支障をきたしている。被災地がれきの広域処理の問題などはその表れであろう。

一方で、放射性物質のそのものや健康影響の専門家ではないが、周辺領域の専門家やジャーナリストが、ソーシャルネットワークを使い活発に情報発信し、多くの読者を集めている。また、各地域においては、行政による除染の手が回らず、有志による環境放射線の測定、除染、勉強会が行われ、そこでは小中高の先生や科学ジャーナリスト、理系研究者が講師役やコミュニケーターを務めているケースもある。科学コミュニケーターと呼ばれる人材においても、このような役割を期待する声が上がっている。

このような中であって、最前線でリスクコミュニケーションに当たる教員や研究者からは、科学的に不確実性のある情報を適切に発信するためにどのような点に留意してコミュニケーションすればよいか、また、必ずしも専門家ではないのに判断を求められたときにはどうすればよいか、違う考え方をする人たちが鋭く対立してしまった時はどうすればよいか、などの不安・懸念の声が聞かれる。いわば、科学的な認識の共有の前の段階として、リスクコミュニケーションについての、信頼関係とコンセンサスの構築が必要と考えられる。

これに応える試みとして、今夏、早稲田大学では、東日本大震災復興研究の一環で、様々なリスクコミュニケーション場面に見られる共通の形式(=「パターンランゲージ」)を参加者の知見から抽出するワークショップを考案、実施した。

これにより、ワークショップ参加者が、困難な状況を含む多様なリスクコミュニケーションの場面で、落ちついて対処できるようになること、さ

らにワークショップの成果物として、「パターン集」の作成・公開を目指した。(難波ら、2012)

2. 研究方法

ワークショップは、早稲田大学大学院ジャーナリズムコース集中演習を履修する大学院生と、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。

ワークショップでは、まず参加者に、情報編集、個人のリスク認知、社会のリスク管理手法等についての講義を受けてもらった。その後、健康影響が顕在化しつつある「ナノ粒子」について研究者の情報提供を受け、この話題提供の聴講を共通体験とし、リスクコミュニケーションを考える上でのかきつけにってもらうことにした。約 20 名の参加者は、講義、ナノ粒子についてのリスクコミュニケーションを 1 日半かけて共有した後、さらに 1 日半をかけてパターン集の作成に取り組んだ。

パターン集の作成では、最初にナノ粒子の健康影響について直前に研究者から聞いた内容(コンテンツ)そのものと、情報提供者のコミュニケーションの態度をふりかえり、併せて自身の体験を元に、リスクコミュニケーションの場面で繰り返し起こりうる類型的・普遍的な問題やジレンマ状況の書き出しを行った。本ワークショップでは、始めにフリーディスカッションで、グループ内でコミュニケーションの上で「問題」となることを挙げる。次に自らの提案した問題状況を、個々人でワークシートに書き込む。その際に、「問題」が起きる状況(話題となっているコンテンツは何か、どのようなステークホルダーが関与しているか、誰がコミュニケーションしているか、など)を抽出し、「問題」の記述自体をなるべく短く抽象化して記述するように工夫したワークシートを用意して利用してもらった。ワークシートには、その問題についての対処案の提案を書き込んでもらう用に構成されていた(対処案は解決策ではなく、さらなる問題を生むこともあるので、その場合はそれを書いてもらうようなフォーマットとした)。

書き込んだワークシートはグループ内で相互に添削し、考えを共有するとともに、読みやすく理解しやすい文章にブラッシュアップした。その後、ワークシートを壁に張り出して、全体で共有し、同種の問題ごとにワークシートのグループ分けを行ったり、同様の問題を統合する作業を行った。

井庭氏の考案したパターンランゲージは、人間の経験知や暗黙知を平易でかつキャッチーな言葉で一般化、体系化してパターン集としてまとめているところに特徴がある。リスクコミュニケーションのパターン集でも、参加者の今後に役立つだけでなく、作成したパターンを、これを読む人々にとって参考になるように、一般化・体系化を目指し、ワークのほとんどは、表現の推敲による一般化に費やした。推敲は一人で行うのではなく、前述した通り、相互の添削と議論を元に進めていった。

3. 研究成果

結果として、3日間のワークショップで、「リスクコミュニケーションの場で情報提供者が遭遇する懸念や問題」と「対処案」について計60のパターンを得ることができた。現在も、このパターンの公開を目指してブラッシュアップの作業を続けている。

参加者には、ワークの最初と最後に、それぞれ「学習目標シート」と「ふりかえりシート」を記入してもらい、ワークにどのような経験を求め、どのような成果を得られたのかを自己評価してもらった。これらを分析してみると、

参加者がワークショップで達成したいこととして挙げていたもののうち、回答が多かったのは、

- ・ 他の参加者の意見を聞きたい
- ・ リスクコミュニケーションを企画・実施したい
- ・ リスクコミュニケーションとは何かを理解したい

であった。

受講者たちのニーズは、主催者がワークショップの目標としていた「リスクコミュニケーションについての理解を深め、多様なリスクコミュニケーション場面に対応できる「構え」を身につける」に合致していた。

これに対してふりかえりのシートでは、

- ・ リスクコミュニケーションには正確な答えはないが、今回のようなワークショップをやっていくことでさまざまなパターンランゲージが出てきて対処法が見出せていくと思いました。
- ・ リスクコミュニケーションと一口に言っても、伝える個人や内容によってコミュニケーションの上で考慮する問題や対処法がことなる想

像力が必要。多くの人の考えや意見をきいて話すことで、解決の糸口になりそう。

- ・ 様々な立場やバックグラウンドを持つ参加者と議論する機会により、自分の考えの偏向性と多様な視点に気付いた。
- ・ リスクの種類も、リスクコミュニケーションの形も、自分が思っていたよりずっと多様だということ。

と、リスクについての考え方が多種多様であるが故に、相手の立場を想像しながら議論することが必要であることを多くの人が書き記していた。

このことから、このワークショップにより、参加者はリスクコミュニケーションの本質を、科学的な情報の受け止め方は多種多様であり、一方的でない情報伝達をしないと対処できないことを、体験知の抽出とワークシートのブラッシュアップ作業から気づいたということが言える。

4. 考察

今回のワークショップの知見を活かし、まずはそれぞれのリスク物質、例えば放射性物質のリスクコミュニケーションを企画したり、その場で情報提供する役割を果たしたりする人同士で集まり、リスクコミュニケーションのパターンを検討するワークショップを実施することを提案する。

これにより、参加者は立場の違う人とどの様に意見交換すれば信頼関係を失わずにコミュニケーションできるかについて、抽出されるパターン(参加者のそれまでの経験知)から学べるだけでなく、抽出過程において、体験的に学ぶことができる。

合意形成の手法の一つとして、「共同事実確認」という方法がある。これは、特に科学技術の専門的知識に関わる合意形成のときに、ステークホルダー間に、何が事実なのか、何が科学的に正しいのかが、共有されないことがある。そのときにステークホルダーとは別に専門家パネルを作り、ステークホルダーと「共同」で「確認できる事実」を作っていく手法である。(3)

今回のワークショップは、その一つ前の段階として、リスク管理をしたい側の人々が、コンテンツ(リスク物質)によらず、共同でリスクコミュニケーションの困難を確認しあう作業である。これにより、こじれてしまっているリスクコミュニケーションの状況に対して、感情的ないらだちや恐れを抱きにくくし、ひいては実際のリスクコミュニケーションの企画・運営、情報提供を行うと

きに、難しい状況における「心構え」を得ることができると考えられる。

また、一からパターン抽出するこのようなワークショップの実施は時間がかかるので、今回のワークショップで作成されるパターン集をサンプルに、検討・改訂するような方法でパターンの抽出のワークショップを実施することも可能だろう。

さらに、パターン集では、リスクコミュニケーションの問題が発生する際の状況を可視化しているので、コミュニケーション不全の原因が、ステークホルダー間の立場の違いにあるのか、科学的な事実認識の違いにあるのか、リスクの原因に依存したものなのか、など原因を特定し改善につなげることができる。

5. 結論

本ワークショップでは、あえてきっかけとなる話題提供は「ナノ粒子の健康影響」にした。これは、震災以来、これまで数々のシンポジウムやパネルディスカッションなどで、原発利用の是非や低線量被曝の問題について、参加者の意見が二極化され、双方に理解が進むことなく物別れに終わってしまう様子を多々見てきたからである。本ワークショップ内でも、放射性物質の例が話題に上ることは予想されたし、実際にそれを阻むことはしなかったが、あえて有害性が現在明らかになりつつある別の物質のリスクコミュニケーションを提示することで、ひと呼吸置いて、放射性物質とそれについての自分の意見にこだわらず、より普遍的、一般的なリスクコミュニケーションの話をしてもらうことを狙った。

実際、参加者の中には、原発の是非や放射生物質の健康影響に様々な意見の方がいたが、原発の是非において全く意見が違ふメンバーともグループのなかで冷静に、自らの立場に固執せずにパターンの抽出が行われていた。

今後もリスクコミュニケーションの問題パターンを検討するときには、対立が先鋭化している話題から始めないようにするなどの配慮が必要であろう。

また、リスクコミュニケーションについては、環境、化学物質、食の安心・安全等の分野で省庁や関係研究機関等にすでに蓄積があることが、本研究の過程で、参加者らからの情報提供でわかった。それらを一度棚卸しして、各地の最前線でリスクコミュニケーションにあたっている人、あ

りたいと考えている人たちと共有したり、さらには、情報提供を受ける市民とともに問題所在のパターンを共有していくことを呼びかけたい。

謝辞

本研究は、科学研究費補助金（基盤研究C）（難波、2012～2014年度）、ならびに早稲田大学東日本大震災復興研究拠点、先端環境医工科学研究所、先端科学・健康医療融合研究機構による支援を受けて実施した。

参考文献

1. 東秘本大震災への対応～首相官邸災害対策ページ～ リスクコミュニケーションの役割（平成23年12月2日）
http://www.kantei.go.jp/saigai/senmonka_g20.html
2. 慶応大学井庭崇氏のブログ
『井庭崇の Concept Walk』
<http://web.sfc.keio.ac.jp/~iba/sb/sb.cgi?cid=54> 参照
3. Matsuura.com
(<http://www.mmatsuura.com/research/cbuilding/>)
「合意形成の研究と実践」
武田健ら(2010) ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠期曝露の子に及ぼす影響, 薬学雑誌, 13(2), 229-236.
難波美帆, 石村源生, 梅澤雅和(2012) 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回年会論文集, 36, 217-222.

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 discussing internationally as well as in Japan. Each consumer (private citizens) will probably become a “risk manager” of nanomaterials, and therefore the case of communicating the risk of nanomaterials will increase. However, since risk evaluation of nanomaterials is still unsolved, the process of communicating risk and hazard of nanomaterials should be paid attention to. In the present study, we focused on communicators’ anxiety and problems in the communication patterns related to emerging risks, and organized a workshop 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う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の不安や懸念(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)として問題と対処法をセットとした「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「対処法」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法

問題	対処法
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	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。

「ナノ材料のリスクの情報提供」に際してとくに生じ得るものについて、抽出された問題（リスクコミュニケーションの課題）と対処案を示した(表1)。

また、パターン抽出を含むすべての過程において、「限られたリソースの中で、伝える情報をどのように取舍選択するか」ということが議論に上がった。「わかりやすさ」と「正確さ」とは相反する場面の少なくないことが指摘されており（ワークショップの中で、中谷内一也氏〔同志社大学心理学部教授〕も講演で言及した）、これが本研究においても最も重要な検討課題の一つであることが明らかになった。

4. 考察

本研究により、リスク情報の提供に際する“ジレンマ状況”の一部をリストアップすることができた。その中には、ナノ材料のリスクコミュニケーションに活用できると期待できるものも数多く得られた。

ただし、現時点で示すことのできた「対処案」はまだ具体的であるとはいえない。そのため、リスク情報の提供者（リスクコミュニケーター）の不安・懸念に答えるものになっているとはいえ切れない部分もある。しかし、経験知・暗黙知として存在する「問題」と「対処案」のパターンが例として明示されているだけでも、ナノ材料のリスクに関する情報提供者にとって有益となることが期待される。今後、さらに推敲を進めて「パターン集」としての形式知化を実現することにより、より確実にリスクの情報提供者の不安に答えるものを作り上げることを目指したい。

5. 結論

本研究では、リスク未知の物質・技術を対象としたリスクコミュニケーションの課題として、とくにナノ材料の有害性・リスク研究を事例として示した。その過程で、リスク情報の提供に際する“ジレンマ状況”をパターンランゲージ化するワークショップにより、ナノ材料のリスクの情報提供を担う者が遭遇するであろうと予想される問題と対処案のパターンを抽出することができた。得られたパターンは、ナノ粒子の有害性やリスクの情報を社会に発信する際の注意点として有用であり、リスクの情報提供者に役立つものになることが期待される。今後も、不確実性を伴うリスクを

回避するための仕組み（リスク評価・リスク管理・モニタリング）の中で、リスクコミュニケーションの果たす役割に注目し、コミュニケーション手法の改善とコミュニケーターの教育に期待したい。

謝辞

一連の研究は、日本学術振興会・科学研究費補助金・若手研究（B）[24790130]（梅澤、2012～13年度）ならびに私立大学戦略的研究基盤形成支援事業（2011～2015年度）の研究課題として実施した。ここで示したワークショップは、早稲田大学東日本大震災復興研究拠点、先端環境医工科学研究所、先端科学・健康医療融合研究機構による支援を受けて実施した。

参考文献

- Schulte ら(2007) Ethical and scientific issues of nanotechnology in the workplace. *Environ. Health Perspect.*, 115(1), 5-12.
- Takeda ら(2009) Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci*, 55(1), 95-102.
- 武田健ら(2010) ナノマテリアルの次世代健康影響—妊娠期曝露の子に及ぼす影響, *薬学雑誌*, 13(2), 229-236.
- 難波美帆, 石村源生, 梅澤雅和(2012) 情報提供者の懸念に答えるリスク・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回年会論文集, 36, 217-222.

Science Journal K A G A K U

科学

別刷

岩波書店