

「ヒトへの外挿を目指したナノマテリアルの健康影響評価手法の開発」に関する研究
(H24-化学-一般-004)

研究代表者 武田 健 東京理科大学 総合研究機構 教授

研究要旨

本プロジェクトではげっ歯類ならびに霊長類モデルを用いて、ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代の免疫系、中枢神経系、雄性生殖系に生じる影響の詳細を検証した。これにより、ナノマテリアル(低用量曝露を含む)の次世代影響に焦点を当てたリスク評価法を確立することを目指した。具体的には、低用量のナノマテリアルによる次世代雄性生殖系への影響評価、ナノマテリアルの妊娠期曝露による次世代免疫系・中枢神経系への影響評価指標探索、ナノマテリアルによる霊長類リンパ節・中枢神経系への影響評価指標探索を目的として研究を進めた。最終年度に二年度目までの結果を総括しながら、In vivo だけでなく ex vivo のナノマテリアル健康影響評価系の構築を目指した。

研究分担者

グループ1

梅澤雅和 東京理科大学 講師
新海雄介 東京理科大学 研究員
立花 研 日本薬科大学 講師
菅又昌雄 栃木臨床病理研究所 所長
井原智美 栃木臨床病理研究所 部長
グループ2
光永総子 NPO プライマイトコーラ 部長

A. 研究目的

本研究課題は、ナノマテリアルの健康影響について特に、1)低用量曝露による次世代雄性生殖系への影響、2)次世代の免疫系・中枢神経系への影響、3)霊長類免疫系・中枢神経系に対する影響を明らかにしようとしたものである。1)では妊娠期におけるナノマテリアルの低用量曝露が次世代に及ぼす影響について、次世代の雄性生殖系機能をマーカーとしたげっ歯類の影響評価系の確立を目指した。2)3)を通して、ナノマテリアルが免疫系に及ぼす影響について、ヒトに外挿できる霊長類及びげっ歯類の評価系を確立することを目指した。

B. 研究方法

げっ歯類:

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

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

解析対象は、とくに次世代中枢神経系、免疫系、雄性生殖系とした。

霊長類:

胎仔の脳・神経系への影響:妊娠アカゲザルに、ナノマテリアルとしてディーゼル排気ナノ粒子(DEP)、非金属ナノ粒子(カーボンブラック:CB)および金属ナノ粒子(酸化チタン:TiO₂)を、7~10日間隔で投与し、経胎盤的に胎仔に達したナノマテリアルの脳・神経系への影響を解析した。胎仔脳での遺伝子発現変動を網羅的に解析すると共に、生化学・免疫組織化学的解析も加え、脳神経機能への影響を評価した。

免疫系への影響:アカゲザル新生仔及び成獣に対して、背部皮内に各種ナノマテリアルを7~10日間隔で投与し、投与部位、リンパ節、主要組織での遺伝子発現変動を網羅的に解析した。併せて組織化学的観察も実施し、免疫機能への影響を検討した。また、投与3年後の解析・観察を行い長期影響についても検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験に伴う倫理・福祉については、機関の動物委員会の承認を得た上で行った。

C. 研究結果

ナノマテリアルの妊娠期曝露が次世代中枢神経系に及ぼす影響は、出生後個体の脳のPAS-GFAP(IHC) 二重染色により、最も鋭敏かつ定量的に検出できることが見出された。また、大脳皮質

前頭野の GFAP や AQP4 のタンパク質発現定量解析により、発達毒性検出の定量性が確認できた。また、ナノマテリアルの妊娠期経気道投与により次世代中枢神経系に及ぶ影響を、遺伝子発現を制御するDNAメチル化プロファイルから検証した。その結果、Pcdh9などの複数の遺伝子を標的として、プロモーター領域のDNA脱メチル化に伴う遺伝子発現亢進が認められた。ナノマテリアルの妊娠期曝露が次世代免疫系・ならびに次世代雄性生殖系に及ぼす影響についても、それぞれ胸腺リンパ球新生に関わる遺伝子群の発現定量解析、ならびに精子産生量により各々定量的に、低濃度ナノマテリアルによる影響を検出できることを見出し報告した。新たなリスク・コミュニケーション手法も見出し、web上に公開した。

さらに、サル類とげっ歯類との比較発現解析から、リンパ節/免疫系ならびに中枢神経系への影響の分子機序を検討した。さらに、霊長類(ヒトを含む)での*ex vivo*あるいは*semi-in vitro*でのナノマテリアル影響評価系についても予備検討した。その結果、ナノマテリアル投与が免疫系において2型マクロファージ(M2マクロファージ)のマーカー遺伝子であるキチナーゼ(Chitinase 1, CHIT1)或いはCCL18(霊長類特異的ケモカイン)の遺伝子発現亢進が確認された。それらの遺伝子発現亢進は少なくとも3年間継続していた。また、サル・ラット双方において、ナノマテリアルがDendritic cell /MacrophageのT-cell活性化制御因子であるDC-Hil/GPNMBを顕著に発現亢進することを新たに見出した。ナノマテリアルがT-Cellレベルの免疫応答にも影響することが明らかになった。

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

さらに、上記霊長類免疫系で得られたデータに基づき、ヒト細胞株を用いたナノマテリアルの影響評価系の確立を目指している。免疫系に及ぶ影響評価については、単球ならびにリンパ球の単培養では *in vivo*で認められるCHIT1或いはCCL18の発現変動が生じなかった。これはM2マクロファージ分化誘導について調べるためには、貪食能をある程度高めたマクロファージを用いて実験する必要性を示唆している。

生体では、貪食能を持つDendritic cell等マクロファージ系細胞がナノマテリアルを取り込み、多種類の細胞が相互作用しながら応答していると考えられる。ナノマテリアルの免疫系への影響

を検討する際には、*in vivo*の状態を部分的にでも模倣するモデル系を作製する必要がある。そのため、サイトカイン或いはフォルボールエステルのような化学物質で刺激した単球系細胞を用いたナノマテリアル影響評価系の検討しているが、課題が残った。

D. 考察

次世代雄性生殖系への影響についての結果は、投与時期(出生前=妊娠期/出生後)により銀ナノ粒子の影響する細胞種が異なる可能性を示唆している。また、銀ナノ粒子の毒性発現(とくに発達毒性)は二次粒子径に依存しなかった。ナノマテリアルの体内動態は、凝集状態が変わり二次粒子径が異なれば体内動態が異なるが、少なくとも溶解性のあるナノマテリアルについては、毒性発現プロファイルに対する体内動態の寄与がそれほど大きくない可能性がある。ナノマテリアルの毒性を考える上で、細胞への取り込みを介した直接的な細胞毒性以外によらない間接的なメカニズムの考慮が、ナノマテリアルの曝露によるヒト健康影響評価において重要であると考えられる。次世代免疫系・中枢神経系への影響についての結果は、ナノマテリアルの妊娠前期により次世代免疫系に生じる影響は、一般急性毒性の認められる用量に限られることから、ヒト健康影響防止を考える上で考慮に入れなくていいものと考えられる。ただし、ナノマテリアル曝露により次世代に生じ得る健康影響は、妊娠中の曝露時期により大きく異なる可能性があることには注意が必要である。

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

本研究の大きな特色は、ヒトに外挿可能なリスク評価系を確立するために、霊長類モデルを活用した点である。実験(3)では、ナノマテリアル投与により免疫系でM2マクロファージマーカー遺伝子発現亢進することが示された。更に、投与から3年を経てもなおナノマテリアルがリンパ節に蓄積したままであり、これらの遺伝子発現が継続的に亢進しているが明らかとなった。M2マクロファージはアレルギー応答に関与していることが知られている。このため、ナノマテリアルに暴露されたヒトが、長期的にアレルギー疾患発症或いは増悪のリスクを負う危険性が示唆された。リンパ節において変動した遺伝子は、霊長類特異的であるものが多かったが、中枢神経系においてはげっ歯類と共通する点が見出される傾向がある。霊長類の妊娠期ナノマテリアル曝露による産仔中枢神経系におけるヘモグロビン遺伝子発現亢進は、胎仔脳が酸化ストレス或いは低酸素状態に応答していることを示すものである。ヘモグロビン亢進は細胞障害を起こすことが知られているため、ナノマテリアルによる胎仔中枢神経系発達障害、高次脳機能障害の危険性を示唆している。

霊長類胎盤透過性はげっ歯類のそれよりも高く、母子間の物質交換は密であり、妊娠期間も長い。よって霊長類におけるナノマテリアル暴露影響はより重篤であることも推察されるが、げっ歯類モデルにおいても胎仔期ナノマテリアル暴露による中枢神経系のアポトーシスが報告されている。これらのことから、霊長類モデル及びげっ歯類モデルのそれぞれの特長を踏まえ、双方よりヒトへの外挿性を検討することが重要である。中枢神経系への着目は、本プロジェクトの後半からであったためトランスクリプトームデータを検証し切れていないが、このデータの検証を完了させることにより、マウスとサルにおいて妊娠期ナノマテリアル投与により変動した遺伝子群の相同性を検証することにより、げっ歯類の脳のデータのヒト外挿性についての結論が得られると期待している。

E . 結論

本研究により、ナノマテリアルの次世代影響（発達毒性）について中枢神経系、免疫系、雄性生殖系を対象に、**鋭敏かつ定量的な影響評価指標とその検出方法**を見出した。ヒト細胞株を用いた実験では、in vivo（サル）で認められるナノマテリアル曝露の影響が検出できなかった。免疫系影響評価のためには**貪食能を高めたマクロファージ系細胞を用いた評価系の有用性**が示唆された。

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

本プロジェクトの成果を考慮に入れた、ナノマテリアルのヒト健康影響評価（胎児や新生児という高感受性集団への影響評価を含む）法は、国民の健康・安全を守ることとナノテクノロジー産業の健全な発展との両立に貢献できると期待している。

F . 研究発表（別紙1参照）

1. 論文発表
2. 学会発表

G . 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし