

氏名（本籍）	おのだ あつ と 小野田 淳 人（群馬県）
学位の種類	博士（薬科学）
学位記番号	甲第14号
学位授与の日付	2018年3月19日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
学位論文題目	ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の中枢神経系 に及ぼす影響とその機序の解明

論文審査委員	（主査）教授 宮崎 智
	教授 山下 親正 教授 市原 学
	教授 鍛冶 利幸 准教授 秋本 和憲

## 論文内容の要旨

衛生薬学では、一次予防の観点から人々の疾病を未然に防ぎ、健康増進を図ることが一つの命題として掲げられている。我々の健康を脅かす環境要因として、1950年頃から微小粒子が注目された。古くは、労働環境における粉じんの悪影響が指摘され、産業の発展に伴い、アスベストやディーゼル排ガス粒子などの健康影響が注目された。2000年以降、粒子は化学的組成が同じであっても、その大きさにより異なる反応性を持つことが示され、PM<sub>10</sub> から PM<sub>2.5</sub>、そしてナノ粒子へと、より小さな粒子に関する生体影響を捉えることが要求されるようになった。

もともと、山火事や火山活動に起因するナノ粒子が自然界にも存在していたが、産業革命に端を発する化石燃料の大量使用に伴い、炭素を核としたナノ粒子が人為的に排出され始めた。結果、ナノ粒子を多分に含む大気汚染が健康を害していると危惧され、社会的関心の高まりに繋がった。さらに、これに呼応し、工業用ナノマテリアルも大気中ナノ粒子と同じサイズの物体として健康影響が懸念された。ナノマテリアルはナノテクノロジーの基盤材料であり、潜在的な不安を取り除くことは、将来的な発展に向けた重要な課題と言える。労働者や消費者への曝露、環境への排出を考慮した安全なナノマテリアルの開発や持続可能な利用法の確立に向け、そして、大気環境中に浮遊するナノ粒子の健康被害を予測、予防、対処するために、ナノ粒子の生体影響とその機序を解き明かすことが求められている。

ナノ粒子の健康影響に関する調査は環境と工業の両面から進められ、その初期には、主に呼吸器や循環器に及ぶ影響が報告された。その過程で行われたナノ粒子の体内動態研究により、妊娠母体に曝露されたナノ粒子は胎児の脳に到達し、出生後も長期に残留することが明らかにされた。この発表を契機に、難分解性と高蓄積性を持つナノ粒子が誘発する発達神経毒性の可能性が活発に議論され始め、その知見を蓄積することが国際的に重要な課題として挙げられるようになった。それに伴い、2010年以降にナノ粒子の発達神経毒性を対象とした研究が進み、2015年以降には疫学研究成果が発表されはじめ、ナノ粒子の周産期曝露は中枢神経疾患の発症リスクを増大させることが示された。

筆者は2012年より、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の中枢神経系に及ぼす影響とその機序を明らかにすべく研究を開始した。主として、大気中ナノ粒子のモデルであるカーボンブラックナノ粒子（CB-NP）を、主要な曝露経路である経気道曝露法で妊娠マウスに投与し、4つの課題に取り組んだ。

### ① ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏に応答する出生児の脳領域と細胞の同定

ナノ粒子の発達神経毒性を評価するうえで、第一に、鋭敏かつ曝露量依存的に応答する細胞や領域の同定が求められる。脳全域を網羅的に評価するため、組織学的解析を行った結果、低用量のCB-NPの胎児期曝露が、脳血管周囲マクローフェージ（PVM）の保有する消化顆粒の肥大化ならびに蜂の巣状構造化を引き起こすことが示された。このPVMの変性を定量的に解析した結果、CB-NPの胎児期曝露によって、脳の広い範囲において正常形態を持つPVMが減少することが明らかになった。この結果から、PVMはナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏に応答する細胞であることが示唆され、その変性は出生児の脳全域に、びまん性に誘導されることが示された。

PVMを含む脳血管組織と密接な関係にある細胞として、アストロサイトが存在する。CB-NPの胎児期曝露による、アストロサイトの変化について追究した結果、末端足の膨潤化と活性化マーカーであるグリア線維性酸性タンパク質（GFAP）の発現亢進が認められた。とくに、アストロサイトの組織学的異変は、変性したPVMに隣接した領域において顕著であった。これらの結果は、ナノ粒子の胎児期曝露がアストロサイトの組織病理学的異変、すなわちアストログリオシスを誘導することを示している。さらに、複数の濃度のCB-NP分散液を作製し、アストログリオシスの誘導に伴って亢進するGFAPと水チャネル（AQP4）の発現量を評価した結果、曝露量依存的に亢進することが明らかになった。GFAPやAQP4は、ナノ粒子の発達神経毒性の定量的な評価指標となると考えられた。この成果は、胎児期におけるナノ粒子の曝露量と出生児の中枢神経系に生じる生体応答との間に、用量依存的な関係性があることを世界で初めて捉え、報告した研究成果である。

## ② 脳血管周辺に生じる組織学的異変の *in situ* 赤外分光分析とメカニズムの解明

ナノ粒子の発達神経毒性の原因を追究し、その機序を理解する上で、**びまん**に生じる脳血管周辺の組織学的異変、網羅的かつ定量的に理解する必要があった。しかし、脳組織を一塊にした解析では血管周辺に限定した評価は難しく、組織学的解析では網羅性と定量性に乏しい。そこで、生体分子が保有する特徴的な赤外吸収波長を捉えることで、分子の種類や状態の解析が可能である *in situ* 赤外分光分析にマウス脳の組織切片を供した。結果、CB-NP 曝露群の中で、とくに PVM の組織学的異変やアストログリオシスが誘導された血管周辺において、 $\beta$ -sheet rich protein の顕著な増加が確認された。この  $\beta$ -sheet rich protein が増加した要因を明らかにすることを目的として、タンパク質の二次構造予測や組織学的解析を行った結果、CB-NP 曝露群の脳血管周辺において、小胞体ストレスマーカーである ATF6 と CHOP の発現亢進が確認された。とくに、ATF6 は GFAP の発現亢進したアストロサイトや PVM で、CHOP は PVM で発現亢進が認められた。先行研究により、生体内に移行したナノ粒子は、その表面でタンパク質の二次構造を変化させ、 $\beta$ -sheet 構造を増加させることが報告されている。さらに、脳実質内に存在するタンパク質異常構造体は、脳脊髄液の流れによって血管周辺に集積されることが明らかになっている。これらの知見と本論文の結果から、ナノ粒子の胎児期曝露により脳内にタンパク質の構造変化体が増加し、血管周辺への集積に伴ってアストロサイトと PVM に小胞体ストレスが誘導されたと考察される。そして、その小胞体ストレスの誘導に起因して、アストログリオシスや PVM の組織学的異変が引き起こされたと考えられる。したがって、ナノ粒子の胎児期曝露は、出生児の脳血管周辺に  $\beta$ -sheet rich protein を増加させ、アストロサイトや PVM に小胞体ストレスやそれに伴う組織病理学的異変を誘導することが示唆された。

## ③ 吸入曝露法を用いた出生児の中樞神経機能に及ぼす影響の解明

実際のナノ粒子の曝露に最も近い形態を取る吸入曝露法から得られる結果は、ナノ粒子の生体影響を評価する上で最も価値の高いデータとなる。本研究では、吸入曝露法を用いて、CB-NP の胎児期曝露が出生児の中樞神経機能に及ぼす影響を検証した。オープンフィールドを用いた行動試験を行った結果、曝露群の総移動距離と中央滞在時間の増加が確認された。この結果は、新規環境下における不安の感じにくさの誘導と自発行動量の増加を示している。こうした行動変化や中樞神経障害の原因となりうる神経として、抑制性の働きを持つパルブアルブミン陽性介在ニューロン (PV<sup>+</sup>IN) が存在する。そこで PV<sup>+</sup>IN を定量的に解析した結果、CB-NP の妊娠期吸入曝露は児の大脳皮質における PV<sup>+</sup>IN の細胞数を減少させることが明らかになった。注目すべき点は、これらの所見が、母体の炎症応答を引き起こさない程度の低い曝露量によって生じたことである。これらの知見は、発達期の

中枢神経系が、ナノ粒子の曝露に対して影響を受けやすく、ナノ粒子のリスク評価に向けて、発達神経毒性を優先的に評価することの重要性を示している。また、PVM やアストロサイトの組織病理学的異変は、点鼻投与法を用いて CB-NP 胎児期曝露の評価を行って得た所見と類似のものであり、点鼻投与法を用いて得られた知見の確からしさが強調された。

#### ④ ナノ粒子の発達神経毒性に対する抗酸化剤前投与の防御効果の検証

ナノ粒子の発達神経毒性を議論する上で、ナノ粒子の直接的な移行に加え、曝露を受けた母体の応答が児の発達に間接的に影響を及ぼす可能性を考慮する必要がある。ナノ粒子の経気道曝露は、呼吸器や循環器における酸化ストレスを亢進させる。一方で、妊娠期間中での感染などに起因する母体酸化ストレスの誘導は、発達障害等の原因となることが報告されている。そこで、ナノ粒子の胎児期曝露による母体酸化ストレスの亢進が出生児の中枢神経系に影響を与えているという仮説に則り、抗酸化剤である N-acetyl cysteine ならびにアスコルビン酸の母体投与がナノ粒子の発達神経毒性に抑制的に機能するか検証した。アストロサイトの GFAP と AQP4 を定量的な指標とし、その変動について解析した結果、CB-NP の胎児期曝露によって亢進した GFAP の発現量が、N-acetyl cysteine により抑制された。一方で、CB-NP による AQP4 の発現亢進は抑制されなかった。さらに、アスコルビン酸の母体投与では、CB-NP の胎児期曝露による GFAP と AQP4 の発現亢進は低下しなかった。これらの結果は、N-acetyl cysteine の母体投与がナノ粒子の胎児期曝露に起因するアストログリオシスに対して、部分的ではあるが、抑制的に作用することを示しており、N-acetyl cysteine の前投与がナノ粒子の発達神経毒性を抑制するための一つの手段となりうることを示唆している。

本論文では、ナノ粒子の胎児期曝露が中枢神経系へ及ぼす影響とその機序について、① 脳血管周辺の細胞群において曝露量依存性的かつ鋭敏な組織学的異変が生じることを明らかにし、② その脳血管周辺異常はタンパク質の構造変化体の集積に起因する可能性を示唆した。さらに、③ 吸入曝露系を用いて、中枢神経系の機能面への影響を明らかにし、④ それらの影響は、抗酸化剤 N-acetyl cysteine によって部分的に抑制される可能性を示した。これらの成果は、ナノ粒子の発達神経毒性によって生じる中枢神経疾患の初期病変を捉えたとともに、その発現機序の解明に向けた基盤となる知見を提供した。本論文で示した新規の知見は、工業的には、より安全なナノマテリアルの開発や持続可能な利用法の確立に、環境面では、大気中に浮遊するナノ粒子の健康影響の予測と予防に資するものと期待される。

## 論文審査の結果の要旨

本論文は、大気環境衛生に重要な超微小粒子（ナノ粒子）のモデルとしてカーボンブラックナノ粒子を対象とし、その低用量、妊娠期経気道曝露が児の脳神経系の発達に及ぼす影響の病理とメカニズムを検証した研究成果を論じたものである。大気環境に浮遊するナノ粒子は、現在も環境中に存在する健康への高リスク因子である微小粒子  $PM_{2.5}$  の中でも、とくに直径 1~100 nm と定義される粒子サイズの小さな画分である。このナノ粒子画分は、微小さによりそれ自体の計測や採集からの性状分析が容易でないことから、生体影響の分析も困難であった。ナノ粒子は大きな比表面積と大きな界面エネルギーのために反応性が高く、独特の体内動態を示すことから、その非意図的の曝露による生体影響に対応もしくは予防する策を講じることが衛生薬学分野でも重要な課題である。近年の疫学研究により、大気中に浮遊するナノ粒子の胎児期曝露は出生児の中樞神経疾患の発症率を増大化させることも報告されている。以上の状況の中で本論文は、ナノ粒子の妊娠期曝露が児に及ぼす影響のうち、とくに発達期の脳に及ぼす影響（発達神経毒性）に焦点を絞り、影響の病理とメカニズムについて以下の 4 点を明らかにしたものである。

低用量ナノ粒子の妊娠期曝露により、まず脳血管周辺の細胞群において曝露量依存的かつ慢性的、持続的な組織学的異変が生じること（第一章）、その脳血管周辺異常はタンパク質の構造変化体の集積に起因する可能性があることを示した（第二章）。また、同様の組織学的異変が実環境での曝露に最も近い吸入曝露によっても生じ、さらに随伴して起こる中樞神経系機能への影響として、自発行動量の低下やその原因と考えられる介在神経細胞の減少が起こることを明らかにした（第三章）。最後に、ナノ粒子の妊娠期経気道曝露によって児の脳血管周囲に生じる影響に対して、抗酸化剤 N-acetyl cysteine が部分的に抑制することを明らかにした（第四章）。低用量のナノ粒子妊娠期曝露により、児の脳に生じる病理を捉える上で、小動物の脳組織切片を観察する既存の主要な方法を用いるだけでは不十分であった。その方法論的な限界を打破するために、本論文では、脳血管周囲のグリア系の細胞の形態やタンパク質発現を可視化する PAS-抗体重染色法、組織病理学的解析と赤外顕微スペクトルマッピングとの統合的解析という新規の分析手法を確立し、その方法の詳細と得られた研究成果を第一章および第二章に記述するとともに、論文全体でその新規手法を活用している。

本論文で示した研究成果は、ナノ粒子の発達神経毒性によって生じる中樞神経疾患の初期病変を捉えたとともに、その発現機序の解明に向けた基盤となる知見を提供した。本論文で示した新規の知見は、工業的な側面におけるより安全なナノマテリアルの開発や持続可能な利用法の確立に、環境面では大気中に浮遊するナノ粒子の健康影響の予測と予防に資するものとなると期待される。