

課程博士学位論文

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

Mechanisms and effects of maternal exposure to nanoparticle
on the central nervous system of offspring

小野田 淳人

Atsuto ONODA

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬科学専攻

2018年3月

査読

宮崎 智 教授 (主査)

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬科学専攻
生命情報科学研究室

鍛冶 利幸 教授

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬学専攻
環境健康学研究室

市原 学 教授

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬学専攻
労働衛生学研究室

山下 親正 教授

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬科学専攻
製剤学研究室

秋本 和憲 准教授

東京理科大学大学院
薬学研究科 薬科学専攻
分子医科学研究室

2018年3月 承認

—— *To my parents, who gave me everything and to my wife, who supported me every time*

—— 全てをもたらしてくれた両親に捧げ、常に支えてくれた妻に送る

謝 辞

本研究を遂行し、論文をまとめるにあたり、甚大なる御支援と御指導を賜りました山口東京理科大学薬学部設置準備室室長の武田健教授（元東京理科大学薬学部 教授、元戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター センター長）および、東京理科大学基礎工学部の梅澤雅和先生（元戦略的環境次世代健康科学研究基盤センター 講師）に最大級の感謝を申し上げます。大学 2 年生の頃から 8 年以上の長きにわたってお世話になり、大学院進学から研究全般、それだけでなく実生活においても常に温かく見守り、やさしく励まして下さったことに深く、深く感謝いたします。私が研究室で生み出すことのできた成果のその全ては、先生方の御指導あつての賜物でございます。先生方の元で研究を行えたことは、これからの私の人生において、最も大きな財産となると断言できます。時間を惜しんで、献身的な御指導をしてくださったことをいつまでも忘れずに、譲り受けた智慧を次の世代の若者たちへと受け継いでいける、そんな存在となれるようこれからも精進して参ります。本当に、本当にありがとうございました。

研究の遂行および研究生活において、多大な御指導、御助力を頂きました東京理科大学薬学部生命情報科学研究室の宮崎智教授、同大学薬学部環境健康学研究室の鍛冶利幸教授、同大学臨床薬剤情報学研究室の真野泰成准教授に厚く御礼謝申し上げます。行き場の失った私を快く受け入れて頂いたのみならず、学生生活や研究面において終始御指導、御支援頂き、心から感謝申し上げます。また、先生方からは幅広い学問分野において、アドバイスを頂戴しました。これから先、研究者として、大学教員として歩む私の人生においてこれほど貴重な経験はございません。この場を借りて深く感謝申し上げます。

博士号の学位審査にあたり、副査の労をお執り頂きました東京理科大学薬学部環境健康学研究室の鍛冶利幸教授、同大学薬学部労働衛生学研究室の市原学教授、同大学薬学部製剤学研究室の山下親正教授、同大学薬学部分子医科学研究室の秋本和憲准教授に謹んで感謝の意を申し上げます。また、修士号の学位審査に当たり、副査をお勤めいただきました同大学薬学部応用薬理学研究室の磯濱洋一郎教授、同大学薬学部分子病態学の深井文雄教授に謹んで感謝の意を申し上げます。時に応じて、厳しく御指導いただいたこと、またやさしく励ましてくださったことで、私自身のいたらなさを実感することができたことは、

今後の糧になるものであります。これから先、研究者として取り組む研究に存分に活かして参る所存です。

本研究のテーマに関し、共同で研究を行い、数多くの貴重な御助言、御助力を頂き、辛抱強く見守っていただきました栃木臨床病理研究所の菅又昌雄所長、井原智美先生、東京理科大学工学部の築山光一教授、同大学赤外自由電子レーザーセンターの川崎平康先生、同大学薬学部生命情報科学研究室の近藤 潤次先生、National Research Center for the Working Environment (Denmark) の Prof. Ulla Vogel、Associate Prof. Karin S Hougaard、Dr. Konstantin Khodosevich に加え、Damanhour University (Egypt) の Prof. Yasser El-Sayed、Prof. Hazem Shaheen、South Valley University (Egypt) の Ashraf Elghoneimy に深く感謝申しあげます。研究の壁に大きな阻まれたときに、それを乗り越えることができたのは、異分野の先生方の画期的なアイデアに基づくアドバイスのおかげです。先生方なくては、大学院での研究を完遂することは叶いませんでした。厚く御礼申し上げます。

本研究の円滑な遂行にあたり、他の研究以外のあらゆる業務を一手に引き受けて、研究に没頭できる環境を提供して下さった東京理科大学製剤学研究室秘書の神田由佳さん、同大学生命情報科学研究室秘書の黒田真理さん、東京理科大学環境健康学研究室秘書の大越京子さんに心より御礼申し上げます。とくに、神田由佳さんには、学部時代から自身の力では取り組むことの困難な、研究費の運用等をサポートして下さいまして、そのおかげで、研究活動に専念することができました。多くの成果を出すことができたのは神田さんのおかげと言っても過言ではございません。改めて、深く感謝申し上げます。

研究を進める上で、研究技術等、多岐にわたる御指導、御助力を頂きました元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部の田畑真佐子助教、二木力夫先生、沼崎理英先生、新海雄介先生、日本薬科大学薬学部の立花研講師、元東京理科大学工学部の丸山克俊教授、同大学工学部の柳田信也講師、久保田夏子先生に、心より感謝の意を申し上げます。一貫した信頼性の高い指導と援助のおかげで、私は大きく成長することができ、本学位を取得するに至るだけの研究成果を生み出すことに繋がりました。ここに感謝の意を表します。

さらに、博士在学中に海外留学の機会を与えて下さいました National Research Center for the Working Environment (Denmark) の Prof. Ulla Vogel、Associate Prof. Karin S Hougaard の

両名には大いなる御支援、御協力を頂きました。先生方の元で研究を行う機会を得ることができたのは、非常に幸運な出来事であり、その上、その留学先は、私が研究者として、一人の人間として成長することのできる極めて恵まれた環境でありました。そんな環境下で先生方とその研究室のメンバーIrina Korshunovaらと共に過ごすことができた時間は本当に幸せだと感じるものでした。深く、深く感謝申し上げます。また、Damanhour University (Egypt) の Prof. Yasser El-Sayed、Prof. Hazem Shaheen の両名には、エジプトから国費留学生として日本に来て共同研究をしたばかりでなく、エジプトにお招きいただき、講演や若手研究者との交流の機会を与えてくださいました。先生と共に研究を進め、現地の研究者や学生と交流することができたおかげで、私は大きく成長することができました。その経験はこれから研究者として生きる上で大きな糧となるものです。ここにその多大なる感謝の意を申し上げます。

本研究の遂行にあたり、実験動物の飼育並びに管理において多大な御支援を賜りました東京理科大学薬学部動物舎管理室の皆様に謹んで御礼申し上げます。

また、本研究は日本学術振興会・特別研究員奨励費 (15 J05718) の助成を受けたものです。後顧の憂いなく研究を行う環境を構築する上で基盤となる予算を提供し、自身が研究者として高める機会を与えてくださった、日本学術振興会をはじめ、その元となった日本全国の皆さまに深く感謝申し上げます。

そして、大学院進学以前から現在にわたり、私の生活と仕事の両面から支え、温かく励ましてくださいました妻である成田山赤城寺の杉山由香理副住職には深く感謝しております。貴女が存在が私の最も重要な精神的支柱であり、私の生きる意味を見出し、生きることを喜びで満たしてくれた大いなる存在です。彼女は数え切れないほど私を助けてくれました。そのことに関して永遠に感謝いたします。

最後に、これまで自分の思う道を思うままに進むことに対し、一切の反対をせずに、温かく見守り、そして影ながら辛抱強く支援して下さった私の偉大な両親に対し、深い感謝の意を表して謝辞といたします。

小野田 淳人 (杉山 淳人)

目次

目次	vii
図版一覧	xii
表一覧	xv
略語一覧	xvi
要約	xix
第1章 序論	1
1.1. 環境要因としてのナノ粒子	1
1.2. 粒子の分類とその大きさ	1
1.3. ナノ粒子の特徴的な性質	2
1.3.1 ナノ粒子の体内動態	2
1.3.2. ナノ粒子の表面反応性	4
1.3.3. 空気中に浮遊する粒子の粒径分布	5
1.4. ナノ粒子の生成源	6
1.4.1. 大気環境中に浮遊するナノ粒子の由来	6
1.4.2. 産業におけるナノマテリアルの製造とその増加	6
1.4.3. ナノマテリアルの安全な利用に向けて	7
1.5. ナノ粒子の胎児移行性とその標的候補	8
1.5.1. ナノ粒子の胎児への移行性	8
1.5.2. 発達期の脆弱な中枢神経系	9
1.6. 炭素で構成されたナノ粒子	10
1.7. 本論文の目的と位置付け	11
第2章 鋭敏に応答する出生児の脳領域と細胞の同定	13
2.1. 背景、目的	13
2.2. 材料と方法	14
2.2.1. 試薬類	14
2.2.2. 使用動物と飼育環境	14
2.2.3. 使用粒子	14

2. 2. 4. 投与物質の調製方法と測定	15
2. 2. 5. 曝露条件と解析項目	16
2. 2. 6. 近赤外光を用いた点鼻投与の体内動態	18
2. 2. 7. PAS (Periodic acid-Schiff) -Hematoxylin 染色法	19
2. 2. 8. Masson's trichrome 染色法	19
2. 2. 9. Oil Red O 染色法	20
2. 2. 10. Sudan Black B 染色法	21
2. 2. 11. 透過型電子顕微鏡による超微小形態の観察	21
2. 2. 12. PAS 陽性顆粒における自家蛍光の検出	22
2. 2. 13. 自家蛍光顆粒をもつ細胞の同定に向けた免疫蛍光染色	22
2. 2. 14. PAS 陽性細胞数と CD206 陽性細胞数の定量評価	23
2. 2. 15. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法	24
2. 2. 16. 大脳皮質からのタンパク質抽出	25
2. 2. 17. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と ウエスタンブロッティング法	26
2. 2. 18. GFAP-Aqp4 (Aquaporin 4) 重染色法	28
2. 2. 19. 免疫蛍光染色のラインプロファイリング	29
2. 2. 20. 大脳皮質と胎盤からの total RNA の抽出	29
2. 2. 21. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析	29
2. 2. 22. Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析	30
2. 2. 23. 定量的逆転写 PCR を用いた遺伝子発現解析	30
2. 2. 24. 統計解析	32
2. 3. 実験結果	32
2. 3. 1. 調製した分散液中の CB-NP の物性測定	32
2. 3. 2. 調製した分散液中の TiO ₂ -NP の物性測定	33
2. 3. 3. 用量依存性の検証用に調製した分散液中の CB-NP の物性測定	34
2. 3. 4. 出生児数と性比、体重	36
2. 3. 5. 点鼻投与によるナノ粒子の肺への移行性の評価	38
2. 3. 6. 各特殊染色法を用いた組織学的解析	40
2. 3. 7. 脳血管周辺に存在する PAS 陽性の顆粒状物質の同定	46
2. 3. 8. PVM の組織学的異変の脳領域別定量評価	50
2. 3. 9. 透過型電子顕微鏡を用いた脳血管周辺組織の超微小形態観察	52
2. 3. 10. PAS-GFAP 重染色法による PVM とアストロサイトの組織学的評価	54
2. 3. 10. 大脳皮質に発現する GFAP の用量依存性の評価	57
2. 3. 12. 大脳皮質における Aqp4 の発現変動	60

2.3.13. マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析と 定量的遺伝子機能解析	63
2.4. 考察	67
2.4.1. ナノ粒子の胎児期曝露により鋭敏かつ用量依存的に変動する指標	67
2.4.2. 点鼻投与によるナノ粒子の肺内移行	67
2.4.3. 実社会における曝露量	68
2.4.4. ナノ粒子の胎児期曝露に起因する PVM の組織学的異変と その毒性学的意義	69
2.4.5. 脳血管周囲のアストロサイトの組織学的異変とその意義	74
2.4.6. ナノ粒子の胎児期曝露によって発現変動する遺伝子群	79
2.5. 小括	80
第3章 脳血管周辺に生じる組織学的異変の <i>in situ</i> 赤外分光分析とメカニズムの解明	82
3.1. 背景、目的	82
3.2. 材料と方法	83
3.2.1. 試薬類	83
3.2.2. 使用動物と飼育環境	83
3.2.3. 使用粒子	83
3.2.4. 投与物質の調製方法と測定	84
3.2.5. 曝露条件と解析項目	84
3.2.6. 摘出した組織の前処理と切片の作製	84
3.2.7. <i>in situ</i> FT-IR データの測定と解析	85
3.2.8. 免疫蛍光染色と PAS-Hematoxylin 染色	85
3.2.9. タンパク質の二次構造予測	86
3.2.10. 脳血管周辺のタンパク質の染色	87
3.2.11. 統計解析	88
3.3. 実験結果	88
3.3.1. 出生児の数と性比、体重	88
3.3.2. 脳血管周辺組織の赤外吸収スペクトル	89
3.3.3. アストログリオシスの生じた血管周辺における タンパク質二次構造	91
3.3.4. PVM とタンパク質二次構造組成との関わり	95
3.3.5. タンパク質二次構造予測と組織学的解析	99
3.3.6. 脳血管周辺組織における小胞体ストレスの評価	100

3.4. 考察	103
3.4.1. CB-NP の胎児期曝露が脳血管周辺に β-sheet-rich protein が増加した要因	103
3.4.2. 脳血管周辺の組織病理学的異変を評価した in situ FT-IR 法	104
3.4.3. ナノ粒子の表面で生じ得るタンパク質の構造変化	105
3.4.4. 神経炎症応答によるタンパク質の構造変化の可能性	107
3.4.5. タンパク質の構造変化体の排出先	107
3.4.6. ナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺に組織学的異変を誘導する機序	108
3.4.7. タンパク質構造変化体の過剰な集積が誘導する中枢神経疾患	110
3.5. 小括	111
第4章 吸入曝露法を用いた 出生児の中枢神経機能に及ぼす影響の解明	114
4.1. 背景、目的	114
4.2. 材料と方法	116
4.2.1. 試薬類	116
4.2.2. 使用動物の飼育環境と曝露条件	116
4.2.3. 投与物質	117
4.2.4. 曝露方法	117
4.2.5. 曝露物質のモニタリング	118
4.2.6. 児の分娩とサンプルの採取	118
4.2.7. BALF の前処理と解析	119
4.2.8. Saa3 mRNA の発現解析	119
4.2.9. オープンフィールドテスト	120
4.2.10. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法	120
4.2.11. GFAP の免疫蛍光染色	121
4.2.12. GFAP 発現量の定量解析	122
4.2.13. パルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布の評価	123
4.2.14. 統計解析	123
4.3. 実験結果	124
4.3.1. 曝露物質の物性	124
4.3.2. 母マウスにおける呼吸器の炎症応答	125
4.3.3. 出生児における GFAP の発現と PVM の変化	125
4.3.4. 出生児の脳皮質における パルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布	129

4.3.5. オープンフィールドにおける出生児の行動変化	131
4.4. 考察	132
4.4.1. 実社会を想定した曝露経路と曝露量	132
4.4.2. 母体の呼吸器で確認されなかった炎症応答	133
4.4.3. PVM とアストロサイトの組織病理学的変化	133
4.4.4. パルブアルブミン陽性介在ニューロンの組織病理学的変化	134
4.4.5. オープンフィールドにおける行動変化	135
4.5. 小括	136
第5章 抗酸化剤の前投与による防御効果の検証	137
5.1. 背景、目的	137
5.2. 材料と方法	139
5.2.1. 試薬類	139
5.2.2. 使用動物と飼育環境	139
5.2.3. 使用粒子	139
5.2.4. 投与物質の調製方法と測定	139
5.2.5. 曝露条件と解析項目	139
5.2.6. 大脳皮質からのタンパク質抽出	140
5.2.7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動と ウエスタンブロッティング法	140
5.2.8. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法	142
5.2.9. 大脳皮質からの total RNA の抽出	143
5.2.10. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析	143
5.2.11. Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析	144
5.2.12. 統計解析	145
5.3. 実験結果	145
5.3.1. 出生児の数と性比、体重	145
5.3.2. CB-NP 胎児期曝露による GFAP と Aqp4 亢進に対する NAC の効果	148
5.3.3. CB-NP 胎児期曝露による GFAP と Aqp4 亢進に対する ascorbic acid の効果	148
5.3.4. 抗酸化剤による GFAP 発現変動の組織学的解析法を用いた評価	151
5.3.5. CB-NP の胎児期曝露によって変動する遺伝子の網羅的解析	153
5.3.6. ascorbic acid の前投与によって発現変動が抑制される遺伝子の探索	154
5.4. 考察	161
5.4.1. CB-NP 胎児期曝露の影響に対する抗酸化剤の効果	161

5. 4. 2. 大脳皮質におけるアストロサイト GFAP と Aqp4 の発現に対する NAC の効果	161
5. 4. 3. 大脳皮質におけるアストロサイト GFAP と Aqp4 の発現に対する ascorbic acid の効果	162
5. 4. 4. 大脳皮質における遺伝子の発現に対する ascorbic acid の効果	163
5. 4. 5. NAC 前投与によってアストロサイト GFAP の発現亢進が抑制された意義	164
5. 4. 7. Aqp4 の発現亢進が維持された意義	165
5. 4. 8. ナノ粒子の発達神経毒性における粒子の直接影響と間接影響	165
5. 4. 小括	166
第 6 章 総括・展望	167
参考文献	172
最終ページ	206

図版一覧

Fig. 1-1 空気環境中に浮遊する粒子の大きさ	2
Fig. 1-2 吸入した粒子のヒト気道の 鼻咽頭、気管支および肺胞領域における沈着率	3
Fig. 1-3 ナノ粒子の表面上で生じる反応とその反応に重要な粒子の物理学的性質	4
Fig. 1-4 空気中に排出される粒子の、 重量濃度および個数濃度に基づいた粒径分布	5
Fig. 1-5 ナノ粒子の胎児への移行と残留に起因する発達神経毒性の懸念	9
Fig. 2-1 組織学的異変の評価を行った実験系のデザイン	17
Fig. 2-2 用量依存性の検討を行った実験系のデザイン	18
Fig. 2-3 タンパク質を抽出した脳領域 (赤)	26
Fig. 2-4 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の粒径とその分布	33
Fig. 2-5 二酸化チタンナノ粒子 (TiO ₂ -NP) の粒径とその分布	34
Fig. 2-6 調整したカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 分散液の物理化学的性質	35
Fig. 2-7 点鼻投与によるナノ粒子の母体の肺への移行性の評価	39
Fig. 2-8 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群の	41

大脳皮質の血管周辺における PAS-Hematoxylin 染色像	
Fig. 2-9 対照群と二酸化チタンナノ粒子 (TiO ₂ -NP) 曝露群の 大脳皮質の血管周辺における PAS-Hematoxylin 染色像	42
Fig. 2-10 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群ならびに 老齢個体の大脳皮質の血管周辺における Masson's trichrome 染色像	44
Fig. 2-11 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群ならびに 老齢個体の大脳皮質の血管周辺における Oil Red O 染色像および Sudan Black B 染色像	45
Fig. 2-12 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化した 脳血管周辺に存在する PAS 陽性顆粒の同定	47
Fig. 2-13 PAS 染色性と緑色自家蛍光を持つ脳血管周辺顆粒の同定	49
Fig. 2-14 PAS 陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数 (Table 2-9 を図化したもの)	51
Fig. 2-15 CD206 (Macrophage Mannose Receptor) 陽性脳血管周囲マクロファージの 定量評価.	52
Fig. 2-16 脳血管周囲マクロファージ (PVM) とアストロサイトの電子顕微鏡観察	54
Fig. 2-17 PAS-GFAP 重染色を施した大脳皮質の広域顕微鏡像	56
Fig. 2-18 PAS-GFAP 重染色を施した大脳皮質の高倍率顕微鏡像	57
Fig. 2-19 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因する 大脳皮質 GFAP 発現亢進の用量依存性の検討	59
Fig. 2-20 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因する 大脳皮質 Aqp4 発現亢進の用量依存性の検討	62
Fig. 2-21 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により変動した 遺伝子の抽出条件	64
Fig. 2-22 定量的 RT-PCR を用いた大脳皮質における遺伝子発現解析	66
Fig. 2-23 脳血管周囲マクロファージおよびアストロサイト末端足を含む 脳血管周辺の断面図	70
Fig. 2-24 ナノ粒子の胎児期曝露による影響と加齢個体との類似性	78
Fig. 2-25 本研究により得られた成果のまとめ	81
Fig. 3-1 実験デザイン (動物への処置と解析手法)	84
Fig. 3-2 脳血管周囲組織の顕微赤外スペクトル分析	91
Fig. 3-3 組織病理学的異変の認められる脳血管周囲の顕微赤外スペクトル分析	93
Fig. 3-4 脳血管周囲マクロファージの存在する脳血管周囲の 顕微赤外スペクトル分析	96
Fig. 3-5 肥大化した消化顆粒を保有する脳血管周囲マクロファージ周辺の	98

顕微赤外スペクトル分析	
Fig. 3-6 脳血管周辺における ATF6 と GFAP の発現	101
Fig. 3-7 脳血管周辺における ATF6 と CD206 (MMR) の発現	102
Fig. 3-8 脳血管周辺における CHOP と CD206 (MMR) の発現	102
Fig. 3-9 ナノ粒子の表面上におけるタンパク質二次構造の変化と β-sheet 構造の増加	105
Fig. 3-10 中枢神経系における老廃物や不要物の排出経路	108
Fig. 3-11 本研究により提唱された、ナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺に 組織病理学的異変を誘導する機序の一端	113
Fig. 4-1 経気道曝露の種類とその特徴	115
Fig. 4-2 実験に使用した吸入用曝露チャンバーの模式図	118
Fig. 4-3 ELPI+を用いて測定した、空気中に分散させた カーボンブラックナノ粒子の個数粒子濃度と平均粒径分布	124
Fig. 4-4 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因する アストログリオシスと脳血管周囲マクロファージの組織学的異変	126
Fig. 4-5 大脳皮質におけるアストロサイト GFAP 発現亢進の用量依存性の検証	127
Fig. 4-6 海馬におけるアストロサイト GFAP 発現亢進の用量依存性の検証	128
Fig. 4-7 大脳皮質における パルブアルブミン陽性介在ニューロン (PV ⁺ IN) の定量評価	130
Fig. 4-8 オープンフィールドを用いた新奇環境下における行動試験の結果	132
Fig. 5-1 実験デザイン (動物への処置と解析手法)	140
Fig. 5-2 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による 6週および12週齢産児の GFAP と Aqp4 発現変動に対する N-acetyl cysteine (NAC) の前投与の効果 (定量解析)	149
Fig. 5-3 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による 6週および12週齢産児の GFAP と Aqp4 発現変動に対する アスコルビン酸の前投与の効果 (定量解析)	150
Fig. 5-4 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による 6週および12週齢産児の GFAP と Aqp4 発現変動に対する N-acetyl cysteine (NAC) の前投与の効果 (組織)	152
Fig. 5-5 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による 6週および12週齢産児の GFAP と Aqp4 発現変動に対する アスコルビン酸の前投与の効果 (組織)	153

Fig. 5-6 抽出された遺伝子数とその条件の可視化	155
Fig. 5-7 大脳皮質における遺伝子の発現に対する ascorbic acid の効果	164

表一覧

Table 1-1. 取り組んだ研究の目的と課題への貢献	12
Table 2-1 qRT-PCR による定量的遺伝子発現解析に使用したプライマーとプローブの配列	31
Table 2-2. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響	36
Table 2-3. 二酸化チタンナノ粒子 (TiO ₂ -NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響	36
Table 2-4. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢および12週齢時における体重 (g) に対する影響	37
Table 2-5. 二酸化チタンナノ粒子 (TiO ₂ -NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響	37
Table 2-6. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響	38
Table 2-7. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響	38
Table 2-8. 対照群とカーボンブラックナノ粒子曝露群それぞれの各個体におけるPAS陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数と定量した面積	50
Table 2-9. 対照群とカーボンブラックナノ粒子曝露群の各脳領域におけるPAS陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数 (counts/mm ²)	51
Table 2-10. カーボンブラックナノ粒子曝露によって用量依存的に発現の亢進した大脳皮質の遺伝子群	65
Table 3-1. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響	88
Table 3-2. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響	89
Table 3-3. 脳に最も隣接した領域 (Fig. 3-3A, F, K の赤色で示した部分) におけるアミド I ピークの波数	94
Table 3-4. 二次構造予測により抽出された β -sheet-rich protein	100

Table 4-1 ナノ粒子の発達神経毒性を検証した先行研究	116
Table 5-1. カーボンブラックナノ粒子およびN-acetyl cysteine の 妊娠期曝露による出生児数と性比への影響	146
Table 5-2. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の 妊娠期曝露による出生児数と性比への影響	146
Table 5-3. カーボンブラックナノ粒子およびN-acetyl cysteine の 妊娠期曝露による出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響	146
Table 5-4. カーボンブラックナノ粒子およびN-acetyl cysteine の 妊娠期曝露による出生児の12週齢時における体重 (g) に対する影響	147
Table 5-5. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の 妊娠期曝露による出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響	147
Table 5-6. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の 妊娠期曝露による出生児の12週齢時における体重 (g) に対する影響	147
Table 5-7. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、 アスコルビン酸の前投与によって その変動が抑制された遺伝子群 (6週齢)	157
Table 5-8. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、 アスコルビン酸の前投与によって その変動が抑制されなかった遺伝子群 (6週齢)	157
Table 5-9. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、 アスコルビン酸の前投与によって その変動が抑制された遺伝子群 (12週齢)	158
Table 5-10. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、 アスコルビン酸の前投与によって その変動が抑制されなかった遺伝子群 (12週齢)	158

略語一覧

ANOVA	: Analysis of variance
Aqp4	: Aquaporin 4
ATF6	: Activating transcription factor 6
BALF	: Bronchoalveolar Lavage Fluid
Cb	: Cerebellum

CB-NP	: Carbon Black nanoparticle
cc	: Corpus callosum
CHOP	: CCAAT-enhancer-binding protein homologous protein
Cx	: Cerebral cortex
DLS	: Dynamic light scattering
EDX	: Energy Dispersive X-ray spectrometry
ELPI	: Electrical Low Pressure Impactor
Fig	: Figure
FT-IR	: Fourier transform infrared spectrometer
GFAP	: Glial fibrillary acidic protein
Hex A	: Hexosaminidase A
Hex B	: Hexosaminidase B
HIP	: Hippocampus
Hy	: Hypothalamus
IgG	: Immunoglobulin G
IL	: Interleukin
MBr	: Midbrain
MMR	: Macrophage Mannose Receptor
MO	: Medulla oblongata
NAC	: N-acetyl cysteine
NHS	: Normal horse serum
Olf	: Olfactory bulb
OTN	: over-1000-nm
PAS	: Periodic acid-Schiff
PBS	: Phosphate buffered saline
PBS-Tx	: Phosphate buffered saline with Triton X
PdI	: Polydispersity Index
PM	: Particulate Matter
Po	: Pons
PVDF	: Polyvinylidene difluoride
PV ⁺ IN	: Parvalbumin Positive Interneurons
PVM	: Perivascular macrophage

qRT-PCR	: quantitative Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction
RNA	: Ribonucleic Acid
Saa3	: Serum Amyloid A3
SD	: Standard Deviation
SDS	: Sodium dodecyl sulfate
SEM	: Scanning Electron Microscope
SOT	: Society of Toxicology
SPM	: Suspended Particle Mater
Str	: Striatum
TBS-T	: Tris buffered saline with Tween 20
TEM	: Transmission Electron Microscope
Th	: Thalamus
TiO ₂ -NP	: Titanium dioxide nanoparticle
VEGFR	: Vascular Endothelial Growth Factor Receptor
WHO	: World Health Organization

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、PM10からPM2.5、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ァージ (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樞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、びまん性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、 β -sheet rich protein の顕著な増加が確認された。この β -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、 β -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 β -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⁺IN)が存在する。そこでPV⁺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⁺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、発達期中樞神経系が、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樞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

トログリオースに対して、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的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 が部分的に抑制する可能性を示した。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。

第1章 序論

1.1. 環境要因としてのナノ粒子

薬学の学問分野うち、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重要な命題として掲げられている。人々の健康状態を左右する要因には、先天的な遺伝要因と後天的な環境要因が存在し、一次予防のためには、遺伝要因を踏まえたうえで環境要因を適切に制御することが重要とされる (Ando et al., 2013; Hur et al., 2005)。その我々を取り巻く環境要因として、微生物やウイルスの感染、食事や運動に基づく生活習慣、化学物質や放射性物質の曝露に加えて、1952年に発生したロンドンスモッグによって空気中に浮遊する粒子状の物質が注目され始めた (Dooley, 2002)。粒子の生体応答に関する研究の初期には、労働環境下における粉じんやばいじんの吸入が呼吸器や発ガン、生殖機能に対して悪影響を及ぼすことが指摘され (McLaughlin, 1952)、その後、産業の進展に伴ってアスベストやディーゼル排ガス粒子による健康影響の問題が浮上した (Knox et al., 1968; McClellan, 1987)。そして21世紀になると、環境と産業の2つの観点から、微小粒子の中でもとくに小さい、ナノ粒子のもつ潜在的な健康リスクについての研究が盛んに進められた。

1.2. 粒子の分類とその大きさ

空気環境中に浮遊する粒子の分類として、その粒子の大きさ (粒径) に基づいて考案された、Particulate Matter 10 (PM₁₀)、浮遊粒子状物質 (Suspended Particle Mater: SPM)、PM_{2.5}、そしてナノ粒子 (超微小粒子、PM_{0.1}) の4つの用語を用いることが多い。PM₁₀とSPMは粒径10 μm (10000 nm) 以下の粒子を、PM_{2.5}は2.5 μm (2500 nm) 以下の粒子を、ナノ粒子は少なくとも一次元が0.001-0.1 μm (1-100 nm) の粒子を指す (Fig. 1-1) (WHO, 2005; NSET2010; Feynman, 1970; Taniguchi, 1974)。注意すべきは、米国で規定されたPM₁₀やPM_{2.5}、ナノ粒子は、その捕集効率が50%となる空気動力学径に基づいて定められた値であり、測定の上、それぞれの基準のサイズを越える粒子が完全に含まれていないわけではないことである。日本で規定されたSPMは他の3つの分類とは異なり、捕集効率が100%となる空気動力学径に基づいて定められているため、10 μm以上の粒子は完全に含まれない。概算すると、SPMは概ねPM_{6.5-7.0}に該当するとされる。したがって、これら4つの粒径分布の序列は、大きいものから順に PM₁₀ > SPM > PM_{2.5} > ナノ粒子 となる。

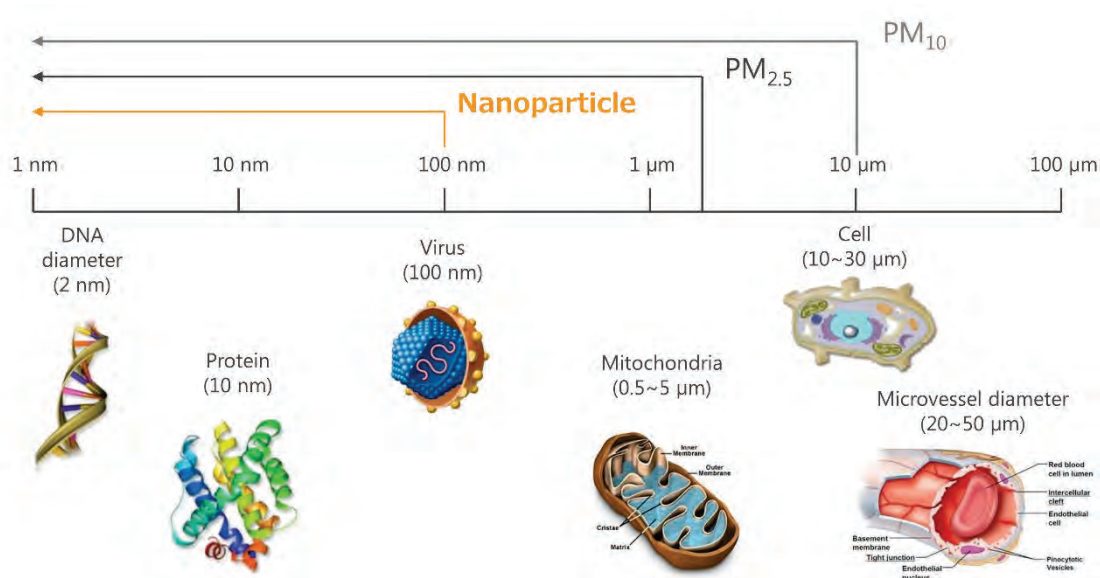


Fig. 1-1 空気環境中に浮遊する粒子の大きさ

空気環境中に浮遊する粒子の研究対象が、分析技術の発展とともにより小さな粒子へと移り、その中でも、ナノ粒子が突出して注目されるようになった要因として、ナノ粒子の持つ特徴的な性質が3つ存在する。

1.3. ナノ粒子の特徴的な性質

1.3.1. ナノ粒子の体内動態

ナノ粒子を含む、空気中に浮遊する粒子の主要な曝露経路は、吸入による呼吸器への曝露である。吸入した粒子は、鼻腔や咽頭、気管、細気管支を経て、最終的には肺の最深部である肺胞まで到達すると想定されるが、この呼吸器内における粒子の分布は、粒子の大きさによって異なることが明らかになっている (Oberdörster et al., 2005)。PM₁₀ 画分に相当する 10 μm 前後の粒子は鼻腔や咽頭で大半が捕捉されるのに対し、ナノ粒子画分に当たる 10-100 nm の粒子は肺の深部まで到達し、肺胞に沈着する (Fig. 1-2) (Oberdörster et al., 2005)。中でも粒径 20 nm のナノ粒子は肺胞領域への到達および沈着率が最も高く、50%程度になるという報告もある (Oberdörster et al., 2005)。呼吸器には外部からの異物が肺胞まで到達しないように多数の防御機構が備わっている (Stuart, 1976)。そのため、それらの防御機構をすり抜けて肺胞まで到達するナノ粒子は、未知の生体応答を示す可能性があるとして、経気道曝露による影響を明らかにすることが求められるようになった。

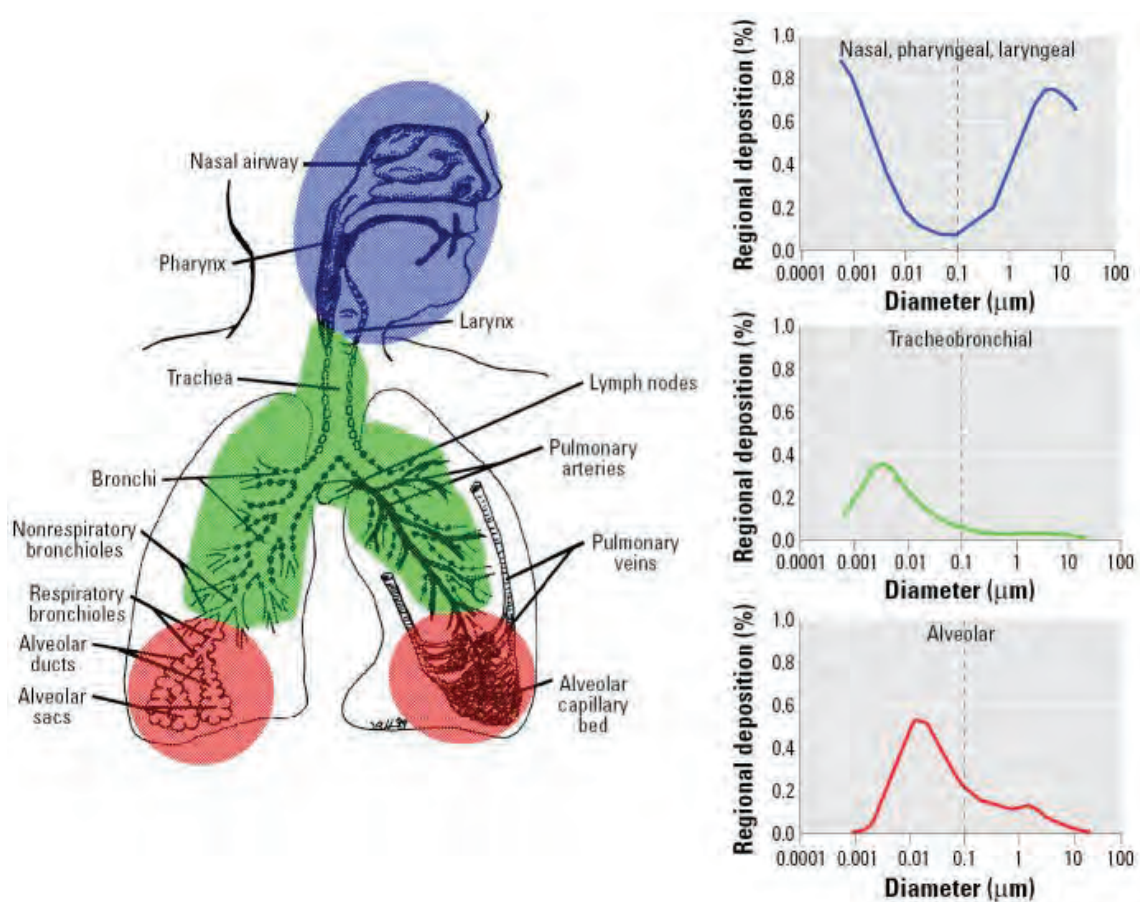


Fig. 1-2 吸入した粒子のヒト気道の鼻咽頭、気管支および肺泡領域における沈着率

(Ref; Oberdörster et al., 2005)

さらに、肺泡に沈着したナノ粒子は粘膜表面に留まった後、一部は物理的な作用やマクロファージ等の貪食により排出されるが、残りは肺泡上皮細胞のトランスサイトーシスによって血液空気関門を透過し、血液中に移行する (Oberdörster et al., 2002)。その後、ナノ粒子は血流を介して全身を循環し、呼吸器以外の組織へ到達する (Kreyling et al., 2002; Stone et al., 2007)。また、ナノ粒子のもつ高蓄積性は、移行したナノ粒子の分解や排出を妨げ、長期に影響を引き起こす要因となることも示唆された (Choi et al., 2007)。事実、6 nm よりも大きいナノ粒子は血液から尿中へ、腎臓の排泄器官を通過できずに、体内に長期的に残留することが示されている (Choi et al., 2007)。こうした知見により、ナノ粒子の曝露は呼吸器のみならず、他の器官への影響も懸念されるようになった。

1.3.2. ナノ粒子の表面反応性

粒子の生体応答は、粒子本体の体内動態に加えて、粒子表面の反応性にも依存するとされる。2000年以降、粒子は化学的組成が同じであっても、その大きさによって異なる反応性を持つことが示された (Donaldson et al., 2005; Oberdörster et al., 2005; Nel et al., 2006)。粒子の表面は生体分子との反応の場であり、単位質量当たりの表面積（比表面積）は粒子が小さくなるほど大きくなる。その比表面積の大きさは、物質との反応速度を高め、タンパク質や脂質等、生体内の様々な分子との反応を誘発する要因となることが示されている (Fig. 1-3) (Duffin et al., 2007; Ray et al., 2009; Nel et al., 2009)。さらに、粒子は小さいほどに曲率が大きくなり、その大きな曲率に起因して、粗大な粒子よりも生体分子に対して大きな影響を引き起こすことが予想された (Nel et al., 2006)。このような高い表面反応性に起因して、ナノ粒子はこれまで解析されてきた既存の物質とは異なる生体応答を引き起こすと考えられ、その影響について盛んに調査されるようになった。

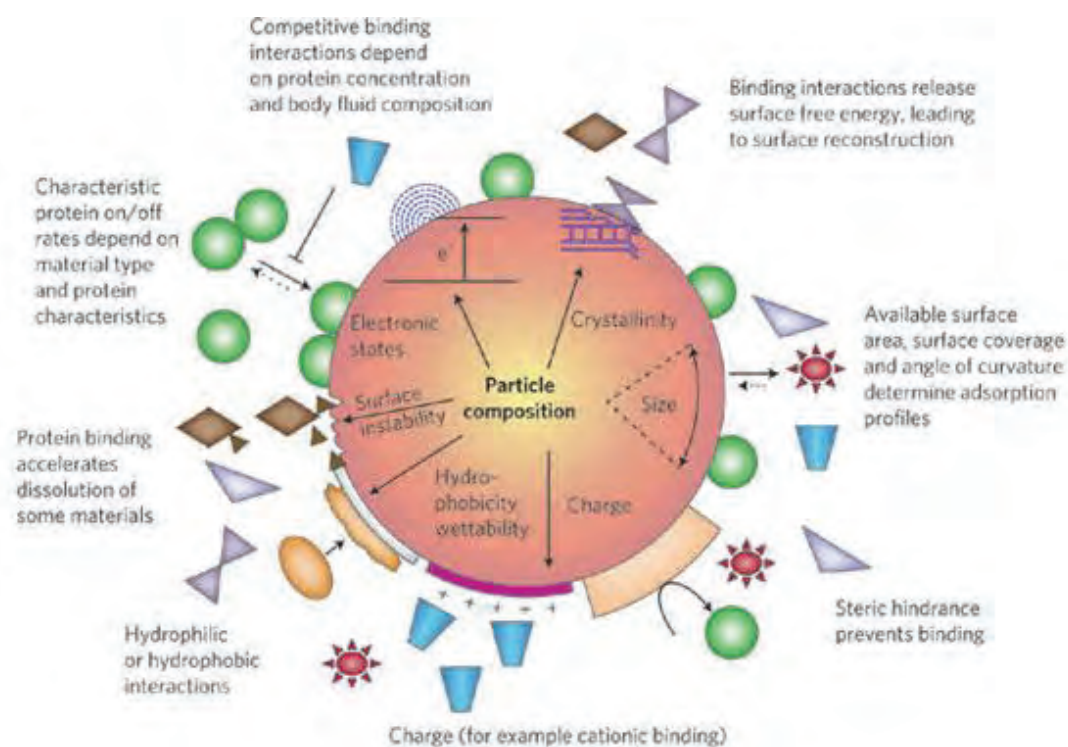


Fig. 1-3 ナノ粒子の表面上で生じる反応とその反応に重要な粒子の物理学的性質

(Ref: Nel et al., 2009)

1.3.3. 空気中に浮遊する粒子の粒径分布

空気中の微小粒子の「量」について報告した研究によると、空気中に排出される粒子の粒径分布は連続した均一な値を示すのではなく、粒径 $10\ \mu\text{m}$ 以下にひとつの最頻値(ピーク)が、 $2.5\ \mu\text{m}$ 以下にもうひとつのピークが確認される、ある程度とびとびの値を取る (Fig. 1-4) (Kittelson, 1998)。しかし、これは重量濃度に基づいて粒径分布を評価した場合のピークであり、個数濃度に基づいた分布では粒径 $100\ \text{nm}$ 前後に最大のピークが出現する (Fig. 1-4) (Kittelson, 1998)。粒子の生体応答は粒子の粒径や表面積に依存するため、重量濃度よりも個数濃度で最も多く存在するナノ粒子は、重要な研究対象であると考えられ、多くの研究がこの大きさの粒子に焦点が当てている。

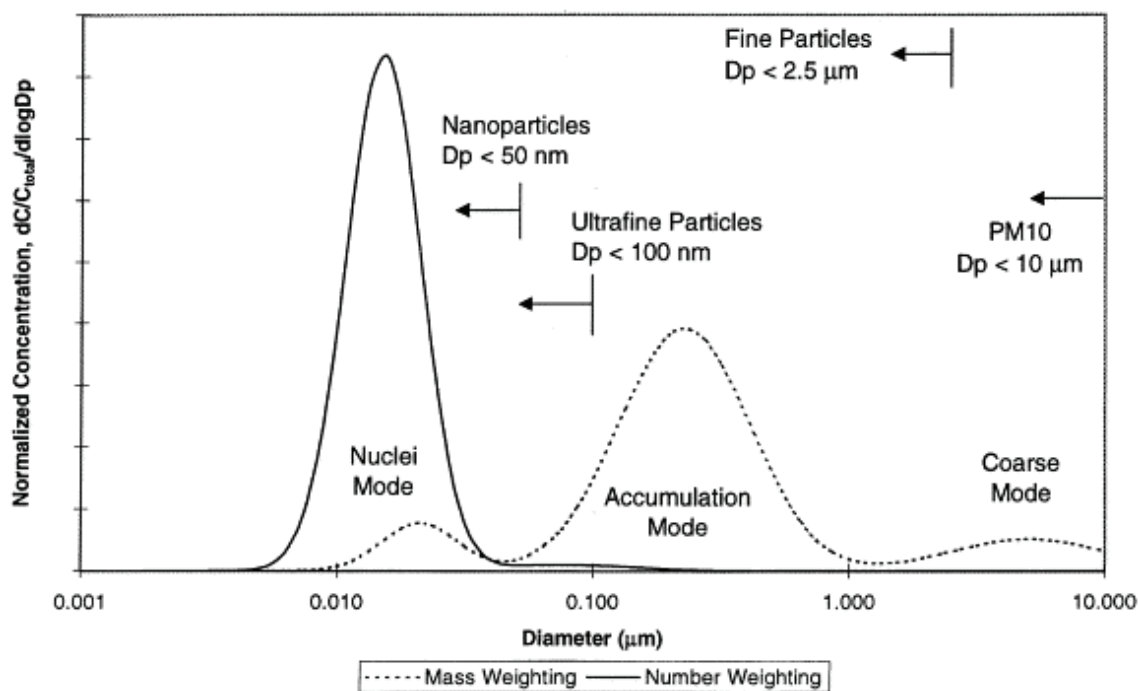


Fig. 1-4 空気中に排出される粒子の、重量濃度および個数濃度に基づいた粒径分布 (Ref: Kittelson, 1998)

ナノ粒子は、その小ささに起因して (1.3.1.) 特徴的な体内動態や (1.3.2.) 高い表面反応性を示し、(1.3.3.) その数自体は大気環境中に最も多く存在することから、注目され、その生体影響を明らかにすることが求められるようになった。

1.4. ナノ粒子の生成源

1.4.1. 大気環境中に浮遊するナノ粒子の由来

天然のナノ粒子として、燃焼の際に生成するカーボンのナノ粒子が存在する。もともと、ナノ粒子は高い比表面積に起因して界面エネルギーが高く、そのエネルギーを打ち消して安定させるために凝集しやすい性質を持つ (Oberdörster et al., 2005)。それゆえに、供給源が無ければ、自然界のナノ粒子が大幅に増加する可能性は低いとされている。唯一、燃焼の際に生成するスス中に含まれる、カーボンを構成元素の中心としたナノ粒子が、山火事や火山活動によって生み出され、自然界でも一定数存在するものであった (Tepe and Bau, 2014)。そこに加わる形で、18 世紀後半の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 (Kittelson, 1998)。とくに、ディーゼルエンジンに代表される内燃機関の発明は、その便利さの代償として、ナノ粒子を多量に含む排ガスを地球環境中に、大量に放出する主要な要因となった (Kittelson, 1998)。その結果、ナノ粒子を含む大気汚染の非意図的な曝露が、人々の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。世界保健機構 (WHO) は、大気中に浮遊する粒子状物質を半分以下に減らすことで、大気汚染に起因する世界年間死亡者 330 万人のうち、15%減らせると予測している (WHO, 2009)。このような背景から、大気環境中に浮遊するナノ粒子の健康被害を予測、対処するため、科学的根拠を提示することが重要視されている。

1.4.2. 産業におけるナノマテリアルの製造とその増加

大気環境中に存在するナノ粒子の健康影響が注目されたことに呼応し、産業面で利用される工業用ナノマテリアルも同じスケールの物体として健康影響が懸念された。ナノマテリアルは、近年目覚ましい発展を続けるナノテクノロジーを支える基盤材料であり、新奇機能を持ったナノマテリアルの開発がその発展には不可欠である。事実、新たに開発されたナノマテリアルの多くは、粗大粒子と比較して、単位質量あたりの表面積が大きいことに起因する高い反応性の他に、特殊な電気伝導性など、既存の物質には見られない特徴的な物理化学的特性を多数持つ (Ray et al., 2009)。

1990 年ごろまでは、ナノマテリアルを用いたナノテクノロジー自体、大学や企業等の研究室の中で利用されることが主流であったが、現在では、世界中の消費者が使用する製品にも多くの活用が見られる。とくに、光通信工学、電子工学、先端スポーツ用品、衣

料品、農業生産製品、再生可能エネルギーは、ナノ粒子が用いられている代表的な分野である (Chen et al., 2013; Li et al., 2014)。加えて、イメージングやドラッグデリバリーなど、ナノマテリアルを応用した医療技術は臨床試験の段階に達しており、近い将来、世界中の医療現場で利用されることが見込まれている (Kovacic et al., 2013)。現時点で、工業用ナノマテリアルを基盤とした製品は、2015年には1600を超える種類が市場に出回っており、現在もなお、年間200種類ほどのペースで増加している (PEN 2015)。最新の調査によると、これらの製品の市場経済的価値は2013年に229億米ドルに上った。過去の上昇速度をもとに試算された2019年の市場経済的価値は、642億米ドルに到達すると見積もられている (McWilliams, 2014)。このように、ナノマテリアルを根幹にした産業が拡大を続ける背景として、ナノマテリアルが生物学や化学、物理学等の学問分野の境界領域を橋渡しする素材であるためであると考えられている (Ray et al., 2009)。実際に、複合工学分野において、ナノ粒子は必要不可欠な素材となりつつある (Kamimura et al., 2017)。以上のことから、ナノテクノロジーは21世紀の科学の基幹を成す技術として幅広く期待されており、その基盤材料であるナノマテリアルが社会にもたらすメリットは計り知れない。ナノマテリアルは、既存の物質には不可能だった技術を生み出し、我々の社会に多大な恩恵を与えていると言える。

1.4.3. ナノマテリアルの安全な利用に向けて

ナノマテリアルが脚光を浴びるようになった理由の一つとして、既存の物質にはない特性を持つことがあげられるが、その特性は同時に、ナノマテリアルが未知の生体影響を及ぼす可能性をもたらしている。また、ナノテクノロジーの発展に伴うナノマテリアルの大量製造は、防護なしには工場労働者への曝露量増大を生じると予想され、多様な消費者製品の販売は消費者への無意識下での意図的曝露を増やす要因となる (Ray et al., 2009; Bakand and Hayes, 2016)。加えて、製造や消費、廃棄に伴い、環境中への放出量が増大し (Ray et al., 2009; Bakand and Hayes, 2016)、ヒトを含めた多様な生物種への曝露量が増大する可能性がある。さらに、大気環境中の微小粒子によって、呼吸器や循環器疾患のリスクが高まることを報告した多数の先行研究 (Durga et al., 2013) が、ナノマテリアルの曝露によって健康被害を及ぼすという懸念に一層の拍車をかけた。そのため、米国や欧州を中心に、国際的にナノマテリアルの安全性評価や管理方法の議論が盛んに行われている (NIOSH 2015; REACH 2011)。日本でも、国主導でナノマテリアル安全性評価の研究が遂行されてお

り、現在の衛生学が最優先で担う課題の一つとなっている (Ministry of Health, Labour and Welfare. 2009)。労働者や消費者の健康を守るためには、明瞭な安全性評価の結果をもとに、ナノマテリアルの利用に伴う弊害を減少させる安全管理の方法を確立することが急務である。また、労働者と消費者への曝露、環境中への排出を考慮した、より安全なナノマテリアルの開発や持続可能な利用方法の確立に向けて、毒性発現の機序に関する情報を提供することも衛生学に求められている。ナノマテリアルの持つ不確実な要素、とくに潜在的な健康影響への不安を取り除くことは、ナノテクノロジーの適用範囲を拡大し、持続的な発展を達成することに繋がると考えられる。

1.5. ナノ粒子の胎児移行性とその標的候補

1.5.1. ナノ粒子の胎児への移行性

ナノ粒子の健康影響に関する調査は環境と産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、免疫系、生殖器系に及ぶ影響が報告された(Song et al., 2009; Sheng et al., 2013; Nabeshi et al., 2011)。その過程で行われたナノ粒子の体内動態研究により、240 nm以下の粒子径を持つ物質は血液胎盤関門を通過し、胎児に到達することが示唆されている(Wick et al., 2010; Buerki-Thurnherr et al. 2012; Semmler-Behnke et al. 2014)。実際に、妊娠マウスに投与されたナノ粒子が、胎児 (胎生 18 日) へと移行し、出生児 (6 週児) の脳に長期にわたって残留することが明らかにされている (Yamashita et al., 2011, Takeda et al., 2009)。とくに、出生児の脳への移行性を検証した研究では、二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) のチタン原子を走査型電子顕微鏡とエネルギー分散型 X 線スペクトル解析を用いて同定することで、ナノ粒子の次世代移行がより明確に証明されている (Takeda et al., 2009)。これらの研究成果とナノ粒子特有の高蓄積性が相まって、妊娠母体に曝露されたナノ粒子は、次世代の個体に長期にわたって残留し、影響を引き起こし続ける可能性がある指摘された (Fig. 1-5)。そして、その指摘を契機に、ナノ粒子が誘発する発達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。

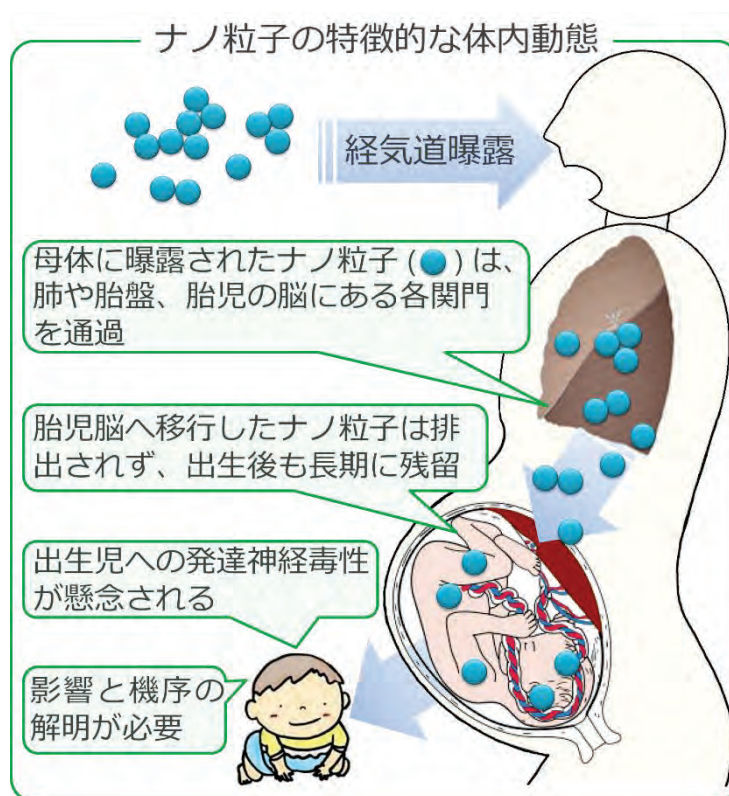


Fig. 1-5 ナノ粒子の胎児への移行と残留に起因する発達神経毒性の懸念

1.5.2. 発達期の脆弱な中枢神経系

元来、疾病や健康を出生前後の発達期における環境刺激との関わりから考える「生殖発生毒性 (Reproductive and developmental toxicity)」や「発達毒性 (Developmental toxicity)」は、衛生学や毒性学の重要な学問分野の一つと広く認知されている。とくに、子どもたちは社会的に弱い存在であり、生育する環境を自ら選択、形成する能力を持たない。次世代を担う子どもたちの健康を守るためには、健全に発育できる環境基盤や社会基盤を整えることが望まれ、そのためには、発達毒性に基づく科学的知見を整えることが必要となる。ナノ粒子に関する発達毒性についても例外ではなく、その科学的知見の蓄積が第一の課題となっている。とくに、胎児発育期間の中枢神経系は劇的な変化をしており、化学物質等による外部からの刺激に対して鋭敏に応答する組織であるため、様々な物質の胎児期曝露による健康影響の評価を優先的に行うべき組織の一つであるとされている (Rice et al., 2000; Grandjean and Landrigan, 2014; McQuillen and Ferrero, 2004)。

21 世紀において、中枢神経疾患の治療や予防戦略を確立することは医学薬学分野に課せられた最も挑戦的な課題の一つとして認知されている (WHO, 2006)。中枢神経系の異

常は、体質や加齢といった内因性の病因と反復的に曝露される環境刺激などの外因性の病因が複雑に絡み合っている。とくに、発達期における環境刺激は、中枢神経疾患の発症に関わる重要な因子として、近年注目されている (Knuesel et al., 2014)。実際に、疫学研究の成果により、胎児期における環境刺激と統合失調症や自閉症スペクトラム、てんかんなどの中枢神経疾患の発症率との間には明確な正の相関が認められている (Atladóttir et al., 2010; Sun et al., 2011; Brown, 2012)。さらに、妊娠期から新生児期にかけての外的刺激は、出生児の脳性まひといった発達神経障害やアルツハイマー病やパーキンソン病に代表される神経変性疾患の発症リスクとなること、最新の知見により示唆されている (Knuesel et al., 2014; Chin-Chan et al., 2015)。それゆえに、外的刺激が発達期の中枢神経系に引き起こす健康影響は、化学物質の安全性・リスク評価の毒性試験において、最も重要な構成要素の一つであり、発達神経毒性 (Developmental neurotoxicity) と名づけられている (Grandjean et al., 2017)。また、環境中の健康リスク因子の周産期曝露に起因する中枢神経系の異常な発達を追究することは、様々な中枢神経疾患の発症機序を根本から理解し、中枢神経疾患の治療方法や予防戦略の確立に貢献すると期待されている。

1.6. 炭素で構成されたナノ粒子

ナノ粒子の特徴的な表面反応性 (1.3.2) と体内動態 (1.3.3)、胎児移行性 (1.5.1) に加え、外的刺激に対する発達期の中枢神経系の脆弱さ (1.5.2) から、胎児期に曝露されたナノ粒子の重要な標的組織として出生児の中枢神経系が挙げられ、ナノ粒子の発達神経毒性が熟慮されるべき課題の最たるものとされた。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、実際に、多数の先行研究にて、胎児期におけるナノ粒子の母体曝露は出生児の中枢神経系に影響を及ぼすことが報告された (Umezawa et al., 2012; Jackson et al., 2011; Shimizu et al., 2009)。しかしながら、「炭素原子で構成されたナノ粒子」の妊娠期における「経気道曝露」が出生児の中枢神経系に及ぼす影響とその機序の解明に取り組んだ研究は存在していなかった。

ナノ粒子は多様な元素により構成されるが、炭素原子で構成されているナノ粒子の生体応答を調査することは、大気環境中に浮遊するナノ粒子 (1.4.1) と産業用のナノマテリアル (1.4.2)、双方のもつ潜在的な影響リスクについて新しい知見を提供することが期待される。その炭素原子で構成されるナノ粒子の候補として、カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) が挙げられる。CB-NP は、黒色染料として幅広く用いられるナノマテリアルであ

り、その消費量はナノマテリアルの中でも最も多いものの一つである。その中でも **Printex 90** と呼ばれる **CB-NP** は、不純物が少なく、高い純度を保ったまま均質な製造が可能であるため、大気環境中に浮遊するナノ粒子のモデル粒子として用いられ、毒性学的研究に使用される主たるナノ粒子である (Jacobsen et al., 2012; Jackson et al., 2011; Bourdon et al., 2012; Kyjovska et al., 2015)。先行研究によると、**CB-NP** の胎児期曝露は、出生児の免疫機能のバランスに異常を誘導するなどの影響が報告されている (El-Sayed et al., 2015; Shimizu et al., 2014)。また、先述の通り、経気道曝露がナノ粒子の主要な曝露経路であり、**CB-NP** も例外でなく、環境と産業の両方の場面で最も想定される曝露経路である。**CB-NP** の発達神経毒性を評価する上で、最優先で取り組まれる曝露経路は経気道曝露といえる。

1.7. 本論文の目的と位置付け

こうした背景を踏まえ、筆者は **CB-NP** の胎児期経気道曝露によって出生児の中樞神経系に引き起こされる変化を明らかにすべく 2012 年より研究を開始した。ナノ粒子の衛生学研究に求められる、主たる目標として、① 曝露の拡大が予想されるナノ粒子の潜在的なリスクを綿密に評価し、利便性との兼ね合いを考えた適切な安全管理を可能にすること、② ナノ粒子の曝露時に生じる健康被害の予測と対処や、より安全なナノマテリアルの開発と利用法の確立に向けて、ナノ粒子が生体影響を発現する機序を解明すること、③ ナノ粒子の持つ毒性を低減させる手段を模索すること の3点が挙げられる。本研究では、これら3つの命題の解決に貢献すべく、それぞれの命題を念頭に置いて、ナノ粒子の発達神経毒性に関連する以下の4つの研究課題を設定し、取り組んだ (Table 1-1)。

本論文で示す知見は、ナノ粒子の持つ潜在的なリスク解明とその予防に資する価値の高い知見を創出し、将来的に環境面では次世代を担う子どもたちが健全に成長することができる空気環境の形成に、産業面ではナノテクノロジーの持続的な発展に繋がること期待される。

Table 1-1. 取り組んだ研究の目的と課題への貢献

章	主要な目的	貢献する課題
第1章	序論	
第2章	ナノ粒子の胎児期曝露によって鋭敏かつ用量依存的に応答する細胞や脳領域の同定	①リスク評価・管理 ②機序解明
第3章	ナノ粒子の胎児期曝露が引き起こす生体影響の機序解明	①リスク評価・管理 ②機序解明 ③予防策の確立
第4章	実社会での曝露を模倣したナノ粒子吸入曝露による中枢神経系への影響評価	①リスク評価・管理
第5章	ナノ粒子の胎児期曝露による中枢神経系への影響に対する抗酸化剤前投与の効果の検証	②機序解明 ③予防策の確立
第6章	総括、展望	

第2章 鋭敏に応答する中枢神経系の領域と細胞の同定

2.1. 背景、目的

ナノ粒子の経気道曝露による発達神経毒性を評価するためには、鋭敏な指標を探索する必要がある。2016年の米国毒性学会 (Society of Toxicology: SOT) で行われたワークショップ “Maternal Exposure to Nanoparticles” においても、① 曝露量を抑えるための曝露評価研究、② ライフサイクルを考慮した意思決定のための産業用ナノマテリアルについてのリスクコミュニケーションとそれを可能にする社会基盤の形成、③ ナノ粒子の影響の予防に向けた発達毒性発現の機序解明に加えて、④ 感度の高いナノ粒子の発達毒性の評価指標 (エンドポイント) の確立が依然として未解決な喫緊の課題であると強調された (Susan and Makris, 2016)。さらに、このナノ粒子のハザード評価指標は、定量的でかつ用量 (曝露量) 依存的に変動するものであることが求められる。一般的に、毒性・衛生学において、用量依存的に変動する定量的な指標は、評価系を構築するために最も重要な基盤となるものである。ところが、ナノ粒子の発達神経毒性に関して用量依存性を調査している研究はわずか1つのみで、しかもその研究で用いた指標では用量依存性を捉えるに至っていなかった (Jackson et al., 2011)。事実、アメリカ合衆国環境保護庁 (US EPA) によると、ナノ粒子の発達毒性に関して用量依存性を捉えたデータの不足が、ナノ粒子の安全性評価の確立に向けた決定的な障害になっていると明確に述べている (Powers et al., 2013)。そこで、本研究課題では CB-NP や他の金属ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏にかつ用量依存的に応答する、中枢神経系の領域や細胞を同定することを目的として取り組んだ。

ナノ粒子の発達神経毒性に対して鋭敏に応答する指標を探索するためには、ナノ粒子の分布に基づいた解析が効率的であると考えられる。しかし、一方で、ナノ粒子の胎児期曝露による出生児の中枢神経系への移行性は確認されたものの、生体内に散ったナノ粒子の分布を解明することは現在の分析技術では難しく、その分布に基づいた生体影響の評価は望めない。そのため、ナノ粒子の胎児期曝露による出生児への影響の評価を脳の全領域にわたって、網羅的に行う必要がある。それには組織学的解析が有効であるが、既存の手法では低用量曝露に伴う微細な異変の評価は困難であった。そこで本研究では、特殊染色と免疫組織化学を組み合わせ、独自の染色法を確立、検証することで、ナノ粒子の発達神経毒性に対して鋭敏に応答する定量的な指標を明らかにした。

2.2. 材料と方法

2.2.1. 試薬類

本研究で用いた試薬はとくに記述の無い場合は、全て市販試薬特級を用いた。

2.2.2. 使用動物と飼育環境

本研究課題では、ICR系妊娠マウスを三協ラボサービス (Hamamatsu, Shizuoka, Japan) より購入し、実験に供した。実験動物の飼養については、東京理科大学動物実験委員会の審議を経て学長の承認を得た上で、東京理科大学の動物実験指針 (国内の「動物の愛護及び管理に関する法律」、「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、文部科学省「研究機関等における動物実験等の実施に関する基本指針」並びに日本学術会議「動物実験の適正な実施に向けたガイドライン」に準拠) に従い、カルタヘナ法を含めた実験動物係法令・指針を遵守して行った。

実験動物は、全て東京理科大学野田キャンパス薬学研究棟 (15号館) 動物舎内にて飼育した。12時間の明暗周期 (明期、8:00~20:00; 暗期、20:00~8:00) のもと、室温 23 ± 1 °C、湿度 $50\pm 5\%$ の条件下で飼育した。水及び飼料は自由摂取とした。妊娠11日目までは1ケージにつき3匹の飼育、妊娠11日目以降は個別飼育へと変更した。出産直後、出生児の発育が均一にするために、10-12匹になるように間引きを行った。出生児の3週齢時に離乳し、各ケージ3-5匹となるように飼育した。

2.2.3. 使用粒子

ナノ粒子はCB-NPと二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) の2種類を使用した。CB-NPは、粉体の状態で Degussa Ltd. (Frankfurt, Germany) から購入した PRINTEX90 を用いた。このCB-NPは水に不溶で、炭素原子以外の不純物が1%未満である (Jacobsen et al., 2007, 2011)。一次粒子径は14 nmで、表面積は295-338 m²/gと測定されている (Saber et al., 2011; Jackson et al., 2011)。TiO₂-NP分散液は Sigma-Aldrich (Cat. No. 700347-25G; MO, USA) から購入した。純度は99.5%で、一次粒子径が21 nmのナノ粒子が懸濁している。このTiO₂-NPの結晶構造は、ルチル型が20%、アナターゼ型が80%である。粒子自体は水に不溶性の性質を示す。

2.2.4. 投与物質の調製方法と測定

<組織学的異変の評価に用いたナノ粒子>

CB-NP 分散液は、粉体の CB-NP を 5 mg/mL となるように超純水中に懸濁させ、30 分間の超音波処理を施し、直ちに分散液の中間層を 1 mL 採取し、口径 450 nm のフィルター (S-2504; Kurabo Co. Ltd., Osaka, Japan) に通して調製した。エネルギー分散型 X 線装置 (EDX) を装着した走査型電子顕微鏡 (JSM-6500F) を用いて測定された炭素原子由来の蛍光 X 線 (0.277 keV) のピーク面積から、CB-NP 分散液の最終濃度は 95 µg/mL であると算出された。

購入した TiO₂-NP 分散液を口径 450 nm のフィルター (Cat. No. SLHU033RS; Merck Millipore Ireland BV, Cork, Ireland) に通すことで凝集粒子を取り除き、100 nm フィルター (Merck Millipore Ireland BV) に通した超純水を用いて、TiO₂-NP 分散液を 8 mg/mL に希釈した。

最終的に調製された CB-NP、TiO₂-NP 分散液 1 µL をコロジオン膜 (200 Cu Mesh; Nisshin EM, Cat.No. 6511) 上に滴下し、十分乾燥させた後に透過型電子顕微鏡 (JEM 1200EXII; JEOL Ltd., Akishima, Tokyo, Japan) を用いて、照射電流 56 µA、加速電圧 80 kV の条件下で粒子形状を解析した。また、分散液中の二次粒子の粒径分布は、濃厚系粒径アナライザー (NANO-ZS; Sysmex Co., Hyogo, Japan) を用いて、動的光散乱法 (DLS) により測定した。

<用量依存性の検証に使用したナノ粒子>

CB-NP を超純水中に 2 mg /mL で懸濁させ、20 分間超音波処理を行った後に、氷上静置を 20 分間行い、その分散液の中間層を 4 mL 採取した。この中間層を 16000 g、4°C で 20 分間遠心分離した後、上澄 2 mL を採取したものを高用量群用投与液とし、5 倍・25 倍希釈したものをそれぞれ中用量群・低用量群用投与液とした。最終的に調製した 3 種類の CB-NP 分散液 1 µL をコロジオン膜上に滴下し、十分乾燥させた後に透過型電子顕微鏡を用いて、照射電流 56 µA、加速電圧 80 kV の条件下で粒子形状を解析した。また、分散液中の二次粒子の粒径分布は、濃厚系粒径アナライザー (Zetasizer nano; Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK.) を用いて、DLS により測定した。

続いて、調製した 3 種類の CB-NP 分散液の濃度を測定した。CB-NP を超純水中に 500 µg /mL で懸濁させ、20 分間超音波処理を行った後、1/2 倍ずつ段階希釈を行ない、濃度既

知の検量線作成用 CB-NP 分散液 4 種 (0, 31.25, 62.5, 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を調製した。この検量線作成用 CB ナノ粒子分散液と実際に投与した濃度未知の CB-NP 分散液 3 種を各 1 mL ずつとり、微量用遠心濃縮機を用いて 6.5 時間 speed vac することで 20 μL に濃縮した (MV-100; Tomy Seiko Co, Ltd., Tokyo, Japan)。Speed vac 後、各 CB-NP 濃縮分散液 1 μL をモリブデン (Mo) Single Hole シートメッシュ (Φ 0.3 mm, 応研商事株式会社、東京) の中央に滴下し、十分に風乾した。濃度測定は測定時間 15 分、加速電圧 15 kV、倍率 x90、測定範囲 2.290 keV の条件下で行なった。これを走査型電子顕微鏡を用いて観察した後、EDX を用いて 蛍光 X 線スペクトル強度を測定し、質量濃度 (低用量群 : 2.9 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 中用量群 : 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 高用量群 : 73 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を算出した。また、CB ナノ粒子分散液 1 μL をコロジオン膜上に滴下し、十分乾燥させた後に透過型電子顕微鏡を用いて、照射電流 56 μA 、加速電圧 80 kV の条件下で粒子形状を解析した。

2.2.5. 曝露条件と解析項目

<組織学的異変の評価に供した動物>

妊娠 3 日目の ICR 系妊娠マウス (11 週齢) を 16 匹購入し、東京理科大学野田キャンパス薬学研究棟の動物舎内に搬入した。搬入した時点で、対照群 (n=8) と CB-NP 曝露群 (n=5) あるいは TiO_2 -NP 曝露群 (n=3) に無作為に分けた。被験物質の投与に際して、妊娠 5 日目と 9 日目の妊娠マウスをハロタンで充満させた麻酔瓶の中に静かに入れ、睡眠を確認した直後に取り出した。直ちに、妊娠マウスを仰向けにして、超純水あるいは CB-NP、 TiO_2 -NP いずれかの分散液 (CB-NP, 95 $\mu\text{g}/\text{kg}$ bwt; TiO_2 -NP, 8 mg/kg bwt; 1 mL/kg bwt) を点鼻投与した (Fig. 2-1)。なお、投与は両方の鼻腔に同じ体積が入るように行った。

6、12 週齢の雄性出生児 (1 腹あたり 4-6 匹) から、ペントバルビタールナトリウム (腹腔内投与; 0.1 mg/g bwt) 麻酔下で脳を摘出した。その後、各種特殊染色や免疫組織化学法を用いた組織学的解析や透過型電子顕微鏡観察を行った (Fig. 2-1)。

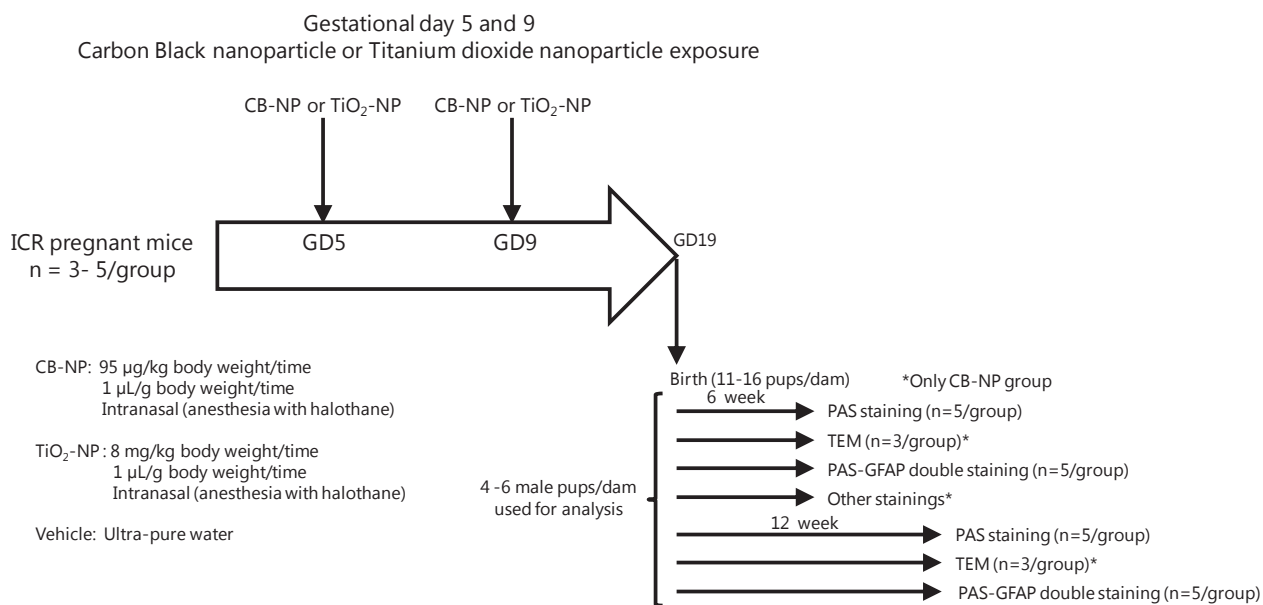
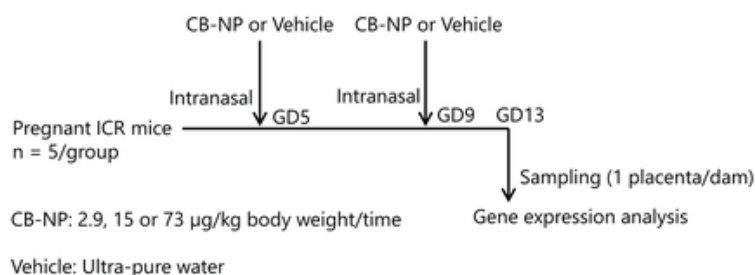


Fig. 2-1 組織学的異変の評価を行った実験系のデザイン

<用量依存性の検討に供した動物>

妊娠3日目のICR系妊娠マウス(11週齢)を20匹購入し、東京理科大学野田キャンパス薬学研究棟の動物舎内に搬入した。搬入した時点で、対照群(C群; n=10)、低用量群(L群; n=10)、中用量群(M群; n=10)、高用量群(H群; n=10)に無作為に分けた(Fig. 2-2)。妊娠マウスは、脳解析個体と胎盤解析個体にランダムに各群5匹ずつ分けて実験に供した。被験物質の投与に際して、妊娠5日目と9日目の妊娠マウスをハロタンで充満させた麻醉瓶の中に静かに入れ、睡眠を確認した直後に取り出した。直ちに、妊娠マウスを仰向けにして、超純水あるいはCB-NP分散液を点鼻投与(1 mL/kg bwt; L群, 2.9 µg/kg bwt; M群, 15 µg/kg bwt; H群, 73 µg/kg bwt)した(Fig. 2-2)。なお、投与は両方の鼻腔に同じ体積が入るように行った。胎盤は妊娠13日目の母体から、脳は6週齢の雄性出生児(1腹あたり2匹)から、ペントバルビタールナトリウム(腹腔内投与; 0.1 mg/g bwt)麻酔下で摘出した。摘出した脳および胎盤に対して、特殊染色および免疫組織化学重染色法、ウェスタンブロッティング法によるタンパク質の発現変動解析、網羅的遺伝子発現解析、定量的遺伝子発現解析を行った(Fig. 2-2)。

A Placenta experiment



B Brain of offspring experiment

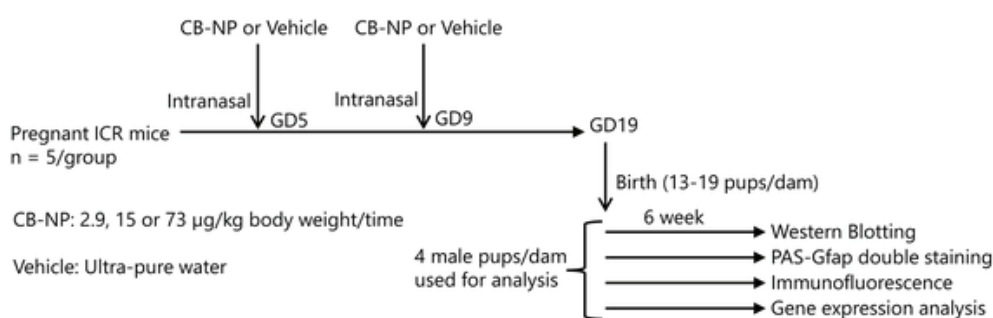


Fig. 2-2 用量依存性の検討を行った実験系のデザイン

2.2.6. 近赤外光を用いた点鼻投与の体内動態

生体組織に対して透過性が高い近赤外光 (波長 800-2500 nm) によって励起され、さらに透過性の高い OTN (over 1000 nm) 近赤外蛍光を示す希土類ドーパセラミックスナノ粒子の一種、 $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子 (粒径 120 nm) を用いて、点鼻投与による呼吸器への移行性を検証した。ポリエチレンイミンで被覆された $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子は溶媒熱合成法を用いて作成されたものを、東京理科大学基礎工学部曾我研究室より提供を受け、使用した (Kamimura et al., 2017)。 $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子分散液 (10 mg/mL) をマウスに、ペントバルビタール麻酔下で 40 µL 点鼻投与した後、自由に行動させ、80 分後および 24 時間後に開腹し、脳、心臓、胸腺、肺、胃、肝臓、脾臓を摘出した。摘出した各器官に対して、レーザー出力 5000 mW、露光時間 500 msec. でガルバノスキャンにより近赤外光 (波長 976 nm) を照射し、 $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子の蛍光を、インジウムガリウムヒ素 (InGaAs) CCD 搭載の近赤外カメラにより検出した。

2. 2. 7. PAS (Periodic acid-Schiff) -Hematoxylin 染色法

摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 7 日間固定した。パラフィン包埋ブロック作製装置 (TEC-P-S-J0; Sakura Finetek Japan) を用いて固定試料をアルコールで脱水し、キシレン及びパラフィンに順次置換した後、パラフィンに包埋した。翌日、リトラトーム REM-710 (Yamato Kohki Industrial Co., Ltd., Saitama, Japan) を用いて、包埋試料を矢状面方向に厚さ 3 μ m で薄切し、連続切片を作製した。スライドガラスに乗せ、42°C で 1 時間乾燥させた後、常温で一晩放置した。

キシレンを用いて脱脂を行い、99.5%、95%エタノールにそれぞれ 2 回ずつ通した後、精製水になじませた。1%過ヨウ素酸水溶液に 1 分間通して糖類を酸化させ、流水水洗を 3 分間、精製水に 10 秒通して、コールドシッフ試薬に 40 分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水を 3 回、各 5 分間通すことで、反応を停止させ、かつ表面のシッフ試薬を洗い落とした。流水水洗を 5 分間行い、ヘマトキシリンによる核染色を極めてうすく行った。流水中で色だしを 5 分間行い、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific Inc., Weltham, MA, USA) を用いてカバーガラスで封入した。光学顕微鏡 (BX51; Olympus Co., Tokyo, Japan) で完成したプレパラートの組織学的観察を行った。

PAS-Hematoxylin 染色法は、グリコーゲンをはじめとした多糖類に加え、糖タンパク質や糖脂質のような糖複合体、中性粘液多糖類、粘液タンパク質を検出することを目的とした染色方法である。一定の閾値以上の数の糖が連なった糖鎖が存在することで陽性となり、陽性の場合、赤色や赤紫色に染色される。

2. 2. 8. Masson's trichrome 染色法

摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 7 日間固定した。パラフィン包埋ブロック作製装置を用いて固定試料をアルコールで脱水し、キシレン及びパラフィンに順次置換した後、パラフィンに包埋した。翌日、リトラトーム REM-710 を用いて、包埋試料を矢状面方向に厚さ 3 μ m で薄切し、連続切片を作製した。スライドガラスに乗せ、42°C で 1 時間乾燥させた後、常温で一晩放置した。

キシレンを用いて脱脂を行い、99.5%、95%エタノールにそれぞれ 2 回ずつ通した後、

精製水になじませた。媒染剤として 10%トリクロロ酢酸水溶液 (Muto Pure Chemical) に 10 分間反応させ、流水水洗を 5 分間行った。精製水に通した後、カラッチ・ヘマトキシリン染色液 (Muto Pure Chemical) に 40 分間浸し、核の染色を行った。染色後、10 分間流水中で色だしを行った。その後、赤血球を染色するオレンジ G 染色液 (Muto Pure Chemical) に極めてわずかな時間接触させ、即座に 1%酢酸水で 2 回洗浄した。原液を 10 倍に希釈したマッソン染色液 B (Muto Pure Chemical) に 30 秒間通し、1%酢酸水で 2 回洗浄した。その後、膠原線維を染色するアニリンブルー染色液 (Muto Pure Chemical) に 5 分間浸し、1%酢酸水で 2 回洗浄した。流水水洗を 5 分間行い、精製水に 1 度通した後、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。光学顕微鏡で完成したプレパラートの組織学的観察を行った。

Masson's trichrome 染色法は、主に膠原線維の検出を目的に行われる。細胞の核が深い紫色に染色され、細胞質が赤や橙色に染色される。対比するように、膠原線維や基底膜が鮮やかな青色に染色される。また、オレンジ G は、赤血球を明るい橙色に染める。

2.2.9. Oil Red O 染色法

摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 7 日間固定した。固定後の試料を防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%スクロース/PBS に、それぞれ 4 時間、4 時間、12 時間浸漬させることで、凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で 24 時間乾燥させた。

染色を開始する 10 時間以上前に、99.5%イソプロパノールに溶解させた Oil Red O 染色液 (Sigma Chemical Co., Ltd., WA, USA) を 10 時間以上攪拌した。精製水を用いて、攪拌した Oil Red O 染色液を 60%に希釈した後、ろ紙を用いて 1 回濾過し、37°C まで加温した。切片を精製水に 2 回、各 3 分間ずつ通して Tissue-Tek OCT コンパウンドを取り除いた。その後、60%イソプロパノールに 1 分間置換し、37°C で維持された Oil Red O 染色液に 30 分間浸した。60%イソプロパノールに 1 度通し、精製水で 2 回、各 3 分間ずつ洗浄した。核染色のためにヘマトキシリンに 1 秒程度通して、流水中で色だしを 5 分間行った。精製水に通した後、水系封入剤 (グリセロール : PBS = 1 : 1) を 50 μL ほど用いてカバーガラスで封入し、マニキュアでカバーガラスとスライドガラスの境界を固めた。

Oil Red O 染色法はとくにトリグリセリドの検出に用いられるが、脂質全般に幅広い染色範囲を持つ。Oil Red O は、アゾ色素の一種で、無極性・脂溶性であるため、細胞内脂質に溶け込む。脂質が多く存在するところほど、Oil Red O が内部に溶け込み、強い赤色で染色される。

2.2.10. Sudan Black B 染色法

摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で7日間固定した。固定後の試料を防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%スクロース/PBS に、それぞれ4時間、4時間、12時間浸漬させることで、凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で24時間乾燥させた。

切片を精製水に5分間通して Tissue-Tek OCT コンパウンドを取り除いた。70%エタノールに3分間浸して切片をなじませ、ズダンブラック B 染色液 (Muto Pure Chemical) に20時間浸した。その後、新規の70%エタノールに3回通して、切片全体に吸着した余分なズダンブラック B 染色液を脱色した。目的の脂質まで脱色しないうちに、精製水に5分間つけて、エタノールを除去した。その後、再び精製水に通して、核染色をせずに水系封入剤 (グリセロール : PBS = 1 : 1) を 50 μL ほど用いてカバーガラスで封入し、マニキュアでカバーガラスとスライドガラスの境界を固めた。

Sudan Black B 染色法は、脂肪染色の中で Oil Red O 染色に次いで汎用される。Oil Red O 染色ほどの幅広い染色範囲は持たないが、Oil Red O のように色素が析出することが無いため、長時間の染色が可能であり、より微量の脂質を検出することが可能である。染色原理は、Oil Red O 染色と同じであり、脂質が多く存在するところほど Sudan 色素が残存し、暗青色や黒色に強く染色される。

2.2.11. 透過型電子顕微鏡による超微小形態の観察

摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドと 1%グルタルアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で前固定を10日間行った。その後、0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で2回洗浄し、四酸化オスミニウムを用いて後固定を行った。完全に固定された組織を、50、70、90、95、100%のエタノール、酸化プロピレンに10分間ずつ通すことで、

段階的に脱水した。その後、エポキシ樹脂 (Epon 812, Shell Chemicals Ltd., Houston, TX, USA) に包埋した。このエポキシ樹脂からウルトラミクロトームで厚さ 85 nm 超薄切片を作製し、酢酸ウラニル染色を施した。透過型電子顕微鏡 (JEOL100-S; JEOL Ltd.) を用いて、染色した超薄切片の超微小形態の観察を行った。なお、観察時の加速電圧は 80 kV である。

2. 2. 12. PAS 陽性顆粒における自家蛍光の検出

摘出した脳組織を、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) 中で3日間固定した。防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30% スクロース/PBS に、それぞれ4時間、4時間、12時間浸漬させることで、凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて 10 μm の厚さの連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で24時間乾燥させた。退色防止封入剤を用いてカバーガラスで封入し、低温暗室内に一晩放置した。蛍光顕微鏡を用い、励起フィルター波長 470 nm で自家蛍光顆粒を観察した。

また、無処置の切片の前後の切片に対し、室温で24時間の乾燥後、PAS-Hematoxylin 染色法を施した。乾燥後、精製水を用いて OCT コンパウンドを除去した。1%過ヨウ素酸水溶液 (Muto Pure Chemical CO., Ltd., Tokyo, Japan) に3分間通して糖類を酸化させ、流水水洗を1分間、精製水に10秒通して、コールドシッフ試薬 (Muto Pure Chemical) に60分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水 (Muto Pure Chemical) を3回、各5分間通すことで、反応を停止させ、かつ組織切片の表面に存在する余剰のシッフ試薬を洗い落とした。流水水洗を1分間行い、ヘマトキシリン (Sakura Finetek Japan) による核染色を極めてうすく行なった。流水中で色だしを5分間行い、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。PAS-Hematoxylin 染色像は蛍光顕微鏡の明視野モードで観察し、自家蛍光顆粒と PAS 陽性顆粒の局在を比較して観察した。

2. 2. 13. 自家蛍光顆粒をもつ細胞の同定に向けた免疫蛍光染色

摘出した脳組織を、即座に Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan Co., Ltd., Tokyo, Japan) 内に包埋し、-80°C で凍結した。その後、クライオスタット (Sakura Finetek Japan) を用いて 8 μm の厚さで薄切し、スライドガラス (S-8441; Matsunami, Osaka, Japan) に乗せ、室温で24時間乾燥させた。スライドガラスに張り付いた切片を 4°C の 4%

パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) 中で 10 分間固定した。固定後、4°C のリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS で 200 倍に希釈した一次抗体、goat polyclonal anti-Macrophage mannose receptor (MMR)/CD206 antibody (code no. AF2535, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA) を 4°C で 16 時間反応させた。常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS で 500 倍に希釈した二次抗体、Dylight 549-conjugated donkey anti-goat IgG (code no. 605-742-002, Rockland Immunochemicals, Inc.) を室温で 2 時間反応させた。常温の PBS で 2 回、精製水で 1 回、各 5 分間洗浄し、Hoechst 33342 (Cat. No. 861405; Sigma-Aldrich, USA) を用いて核染色を施した。その後、常温の精製水で 1 回、5 分間洗浄し、退色防止封入剤 (Cell Signaling Technology, Inc., MA, USA) を用いてカバーガラス (R3702; Matsunami) で封入した。低温暗室で一晩放置し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて観察した。この際、Hoechst、自家蛍光、CD206、それぞれについて励起波長を 320-400 nm、430-500 nm、560-680 nm で、蛍光波長を 410-510 nm、485-585 nm、625-775 nm で観察した。

2.2.14. PAS 陽性細胞数と CD206 陽性細胞数の定量評価

対照群と CB-NP 群において、矢状面方向に厚さ 3 μm で薄切した脳切片を大脳縦裂から各個体 50 枚、計 150 μm 用意した。このうち、30 μm 以上の間隔を空けて、各個体から 3 枚選択し、30 枚 (対照群: n = 5; CB-NP 群: n = 5) の切片全て同時に PAS-Hematoxylin 染色法を施した。染色した切片を 40 倍の光学顕微鏡で撮影した後、400 倍に拡大した状態で観察し、PAS 陽性顆粒の認められる脳血管周辺の細胞を 40 倍の撮影像にプロットした。切片全域のプロット終了後、単位面積 (1 mm^2) あたりの PAS 陽性 PVM 数を脳領域別に算出した。なお、矢状面で嗅球、大脳皮質、脳梁、海馬、視床、視床下部、中脳、橋、小脳、延髄、10 領域全てが観察可能な範囲はマウスの脳の大脳縦裂から約 1.8 mm までである。観察対象となる細胞の直径が 20-30 μm であるので、大脳縦裂から約 1.8 mm までの全ての対象細胞を観察するには、切片が 60-90 枚必要である。3 枚の観察は、この 3.3-5.0%にあたる。

さらに、対照群と CB-NP 群において、矢状面方向に厚さ 10 μm で薄切した脳の凍結切片を大脳縦裂から各個体 30 枚、計 300 μm 用意した。このうち、50 μm 以上の間隔を空けて、各個体から 3 枚選択し、30 枚 (対照群: n = 5; CB-NP 群: n = 5) の切片全て同時に CD206 の免疫蛍光染色を施した。CD206 を検出するための、二次抗体の蛍光標識として

Dylight 488 を使用した。大脳皮質における CD206 の陽性細胞数を定量的に評価するため、蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて 40 倍の染色像を撮影し、TIFF 形式のデジタル画像を取得した。取得した画像を ImageJ software (National Institute of Health, MD, USA) で開き、定量解析に向けた処置を行った (Schneider et al. 2012)。蛍光標識である Dylight 488 を緑色の擬似カラーで観察したため、緑色チャンネルの輝度をグレースケールにコンバートした (Image J command, Image: Color: Split Channels)。染色像の輝度を示したグレースケールの画像は 40-80 にコントラストと明るさを調整し (ImageJ command, Image: Adjust: Brightness/Contrast)、蛍光を定量するための閾値を 70 に設定し、70 以上の輝度が白色に、70 未満の輝度は黒色に示されるように設定した (ImageJ command, Image: Adjust: Threshold)。解析に起因するばらつきをなくすために、このコントラストと明るさ、そして閾値はすべての切片で同一の条件にしたうえで、解析を進めた。その後、ヒストグラム分析を用いて CD206 を示す白色のピクセルをカウントすることで、CD206 陽性細胞数を定量した (ImageJ command, Analyze: Measure after setting “Area” and “Limited to Threshold” in Image J command, Analyze: Set Measurement)。すべての準備と分析において、実験者は盲検状態で従事した。

2. 2. 15. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法

摘出した 6 週齢出生児の脳組織を 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 24 時間固定した。固定したサンプルは、広域観察用のパラフィン包埋と高倍率観察用の凍結包埋の 2 種類の包埋方法を施した。パラフィン包埋用の試料は、パラフィン包埋ブロック作製装置を用いて固定試料をアルコールで脱水し、キシレン及びパラフィンに順次置換した後、パラフィンで包埋することで作製した。翌日、リトラトーム REM-710 を用いて、包埋試料を矢状面方向に厚さ 6 μm の薄切切片を作製した。スライドガラスに乗せ、42°C で 1 時間乾燥させた後、常温で一晩放置した。凍結包埋用の試料は、固定後に防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%スクロース/PBS に、それぞれ 4 時間、4 時間、12 時間浸漬させることで凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で 24 時間乾燥させた。

パラフィン切片は、キシレンを用いて脱脂を行い、99.5%、95%エタノールにそれぞれ 2 回ずつ通した後、精製水になじませた。凍結切片は精製水を用いて OCT コンパウンド

を除去した。一度 PBS になじませた後、0.3% H_2O_2 を含んだ PBS に 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBS で各 5 分間、3 回洗浄し、10% の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience, Mukilteo, WA, USA) を 60 分間反応させ、ブロッキング操作を行った。再び PBS で 5 分間 3 回洗浄し、0.1% トリトン X を含む PBS (PBS-Tx) で 1000 倍に希釈した rabbit anti-mouse GFAP polyclonal antibody (Code-No. Z0334; DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) 溶液を 4°C で 16 時間反応させた。一次抗体の反応終了後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PBS-Tx で 1000 倍に希釈した、ビオチン標識済みの Donkey anti-rabbit IgG polyclonal antibody (AP182B; Chemicon, Temecula, CA, USA) を室温で 120 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PAS-Hematoxylin 染色の行程に進んだ。精製水に 1 分間通した後、1% 過ヨウ素酸水溶液に 3 分間反応させて、糖類を酸化させた。精製水で 1 分間洗浄し、コールドシッフ試薬に 60 分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水に 3 回、各 3 分間通すことで、反応を停止させ、かつ表面のシッフ試薬を洗い落とした。精製水で 1 分間洗浄し、免疫組織学法の発色過程に進んだ。PBS に 1 分間通した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼが結合したアビジン-ビオチン複合体 (Vectastain ABC peroxidase kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を PBS で 400 倍に希釈し、二次抗体に 200 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 3 回、各 5 分間洗浄し、0.01% H_2O_2 を使用直前に添加した 0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン/0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.6) をアビジン-ビオチン複合体に 20 分間反応させ、発色させた。発色の反応途中で、GFAP を高発現している繊維型アストロサイトが多く存在する脳梁領域は、うすく茶色に染まるのが視認できる。発色終了後、切片を PBS に 1 分間通し、精製水で反応を止めた。その後、核染色は行わず、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。光学顕微鏡で完成したプレパラートの組織学的観察を行った。

2.2.16. 大脳皮質からのタンパク質抽出

6 週齢児ならびに陽性対象として用いる無処置加齢個体から摘出した脳を、ブレインブロッカーを用いて、環状断面方向に厚さ 1 mm で切断した。直ちに、大脳皮質領域を採取し (Fig. 2-3)、液体窒素で凍結させた。採取した脳組織は、タンパク質分解酵素阻害剤 (Complete EDTA-free; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan) を含む T-PER®抽出液 (20 mL/g of tissue weight; Takara Bio, Inc., Shiga, Japan) の中で Biomasher II と Powermasher (Nippi, Inc.,

Tokyo, Japan) を用いて破砕、ホモジナイズした。ホモジナイズの際には温度上昇に留意し、氷上で行った。ホモジナイズされた組織を含む抽出液は 4°C で 10,000×g、5 分間遠心分離することで、不溶沈殿物を取り除き、上清を採取した。この上清をタンパク抽出液とし、その総タンパク濃度を Pierce™ BCA Protein Assay kit (Thermo Scientific K.K., Waltham, MA, USA) を用いたビシンコニン酸法によって定量した。タンパク質抽出液は、使用時まで -80°C で保管した。

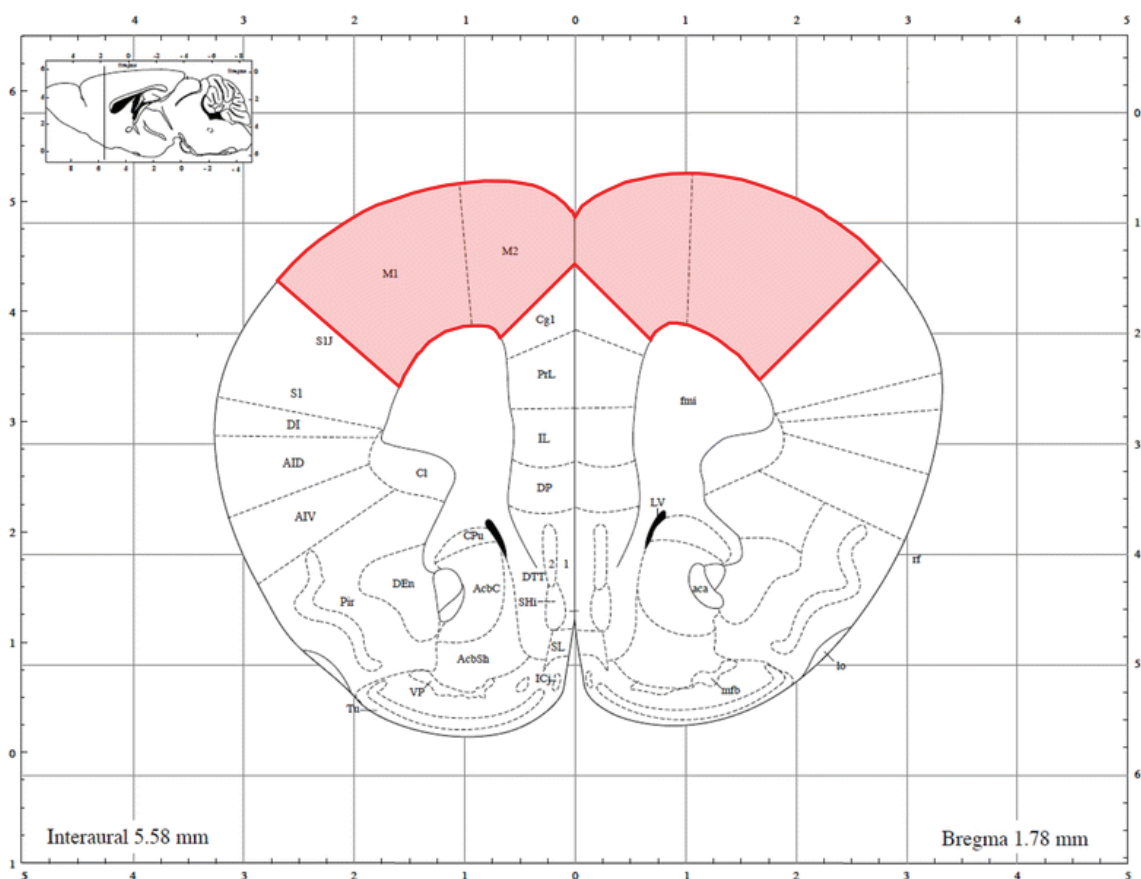


Fig. 2-3 タンパク質を抽出した脳領域 (赤)

2. 2. 17. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロッティング法

タンパク質量が 30 μg になるように各タンパク質抽出液を用意し、タンパク質変性用の緩衝液 (125 mM トリス-HCl (pH6.8) 、20% グリセロール、4% ラウリル硫酸ナトリウム (w/v) 、0.001% ブロモフェノールブルー (w/v) 、10% メルカプトエタノール) をタンパク質抽出液と同じ体積量添加して攪拌したのち、95°C、5 分間加熱してタンパク質を変性させた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動でタンパク質の分離を行う際、解析対

象である GFAP と Aqp4 には、それぞれ 10%、12%のポリアクリルアミドゲルを用いた。また、内在性対照物質として、 β -actin を用いた。ポリアクリルアミドゲルの各レーンに、タンパク質量が 25 μ g になるように添加し、110V で 30 分間電気泳動をした。電気泳動が安定したことを確認した後、4°C の環境下に移動し、電圧を 150V に上げて 110 分間電気泳動続けた。電気泳動終了後、分離された試料は、ポリフッ化ビニリデン樹脂 (PVDF membrane; Millipore, MA, USA) に 400mA、室温で 1 時間かけて転写した。トリス緩衝生理食塩水 (pH7.4) /0.1% Tween20 (TBS-T) に対して 5%の濃度になるように溶解させたスキムミルクを用いて、転写されたタンパク質のブロッキング操作を 4 °C の環境下で 5 時間行った。その後、一次抗体として Rabbit anti-mouse GFAP polyclonal antibody、Rabbit anti-Aqp4 polyclonal antibody (Code-No. AB3594; Millipore, MA, USA) あるいは、Rabbit anti- β -actin (13E5) monoclonal antibody (Code-No. 4970; Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA, USA) を 1% スキムミルク/TBS-T で希釈 (GFAP, 1:1000; Aqp4, 1:200; β -actin, 1:2000) し、PVDF メンブレンに転写されたタンパク質に対して、これらの抗体液を 4 °C で 12 時間反応させた。一次抗体の反応終了後、PVDF メンブレンを TBS-T で 3 回、各 10 分間洗浄した。その後、二次抗体として horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (Code-No. sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 5% スキムミルク/TBS-T で希釈 (GFAP, 1:5000; Aqp4, 1:2000; β -actin, 1:10000) し、室温で 2 時間反応させた。再び、TBS-T で 3 回、各 10 分間洗浄し、検出まで PBS に浸して 4 °C の暗室で保管した。標的タンパク質のバンドを化学発光法で可視化した。化学発光用の試薬として、GFAP と β -actin の検出には、Immobilon Westem Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, MA, USA) を用い、Aqp4 の検出には、ImmunoStar® Basic (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。

バンドの発光強度から、シグナルの定量を行うために、検出した画像を ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, CA, USA) で撮影し、Image Lab™ Software (Bio-Rad) でシグナル強度の数値化を行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法での分離によって、マウスの GFAP は 55 kDa と 48 kDa の 2 本のバンドが認められる (Laurence et al., 2005)。マウス Aqp4 の場合、38 kDa、34 kDa、32 kDa の 3 種類のアイソフォームが存在する (Uniprot, P55088-Aqp4)。他方、マウス中枢神経系の β -actin は、46 kDa のみである。以上のバンドの中から、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウエスタンブロッティング法で一般的に解析されているバンド (canonical sequence) を選択した。GFAP は 55 kDa、Aqp4 は 38 kDa、

β -actin は 46 kDa のバンドの発光強度を数値化して、定量評価した。バンドの数値化の際、バックグラウンドのノイズを減算し、GFAP または Aqp4 のシグナルの発光強度は、 β -actin の値によって補正した。なお、GFAP と Aqp4 の補正は同一の β -actin のバンドにより行った

2.2.18. GFAP-Aqp4 (Aquaporin 4) 重染色法

対照群と CB-NP 曝露群の 6 週齢児 (n = 5/group) と陽性対照として飼育した無処置加齢個体に対して、麻酔下で PBS を灌流して血液を除いた後、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) を用いて灌流固定した。摘出した脳組織を 4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 24 時間後固定し、防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%スクロース/PBS に、それぞれ 4 時間、4 時間、12 時間浸漬させることで凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) で凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μ m の連続切片を作製し、スライドガラス (S-8441; Matsunami) に乗せ、室温で 24 時間乾燥させた。作製した切片に対して、10 % の正常ロバ血清(IHR-8135, Immunobioscience) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い、PBS を用いて 500 倍に希釈した一次抗体 goat polyclonal anti-GFAP antibody (code-no. ab53554, Abcam, Cambridge, UK) を 4°C で 16 時間反応させた。反応後、切片を常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS を用いて 1000 倍に希釈した Dylight 488 標識二次抗体 donkey anti-goat IgG (code-no. 605-741-125, Rockland Immunochemicals Inc., PA, USA; 1:1000) を室温で 120 分反応させた。再度、常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄した後、PBS を用いて 100 倍に希釈した一次抗体 rabbit polyclonal anti-Aqp4 antibody (code-no. AB3594, Merck Millipore) を 4°C で 16 時間反応させた。反応後、切片を常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS を用いて 1000 倍に希釈した Dylight 649 標識二次抗体 donkey anti-rabbit IgG (code-no. 611-743-127, Rockland Immunochemicals Inc;) を室温で 120 分反応させた。最後に、常温の PBS で 3 回、各 5 分間、超純粋で 2 回、各 5 分間洗浄した後、Hoechst 33342 (code-no. 346-07951, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて核染色を施した。その後、常温の精製水で 1 回、5 分間洗浄し、退色防止封入剤 (Cell Signaling Technology) を用いてカバーガラス (R3702; Matsunami) で封入した。これを低温暗室で一晩放置し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて観察した。各マウス 1 検体につき、大脳縦裂から矢状面に沿って 30 の切片 (合計

300 μm) を作製し、そのうち、3 枚ごと (30 μm ごと) に 1 枚の切片を選択し、10 切片を観察した。Hoechst、GFAP、Aqp4、それぞれについて励起波長を 320-400 nm、430-500 nm、560-680 nm で、蛍光波長を 410-510 nm、485-585 nm、625-775 nm で観察した。

2.2.19. 免疫蛍光染色のラインプロファイリング

脳血管周辺における Aqp4 の発現を定量的に評価するため、取得した画像についてのラインプロファイリング (線形での輝度の分析) を行った (Kress et al., 2014)。専用のソフトウェア (BZ-H2C, Dynamic Cell Count Vers.1.1, Keyence) を用いて、血管壁から垂直に 40 μm のラインを設置し、その区間における Aqp4 の蛍光強度を測定した。

2.2.20. 大脳皮質と胎盤からの total RNA の抽出

6 週齢児から摘出した脳を、ブレインロッカーを用いて、冠状断面方向に厚さ 1 mm で切断した。直ちに、大脳皮質領域を採取し、液体窒素で凍結させた。また、胎生 13 日目に摘出した胎盤についても液体窒素で凍結させた。脳組織と胎盤組織を Isogen solution (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) で破砕したのち、クロロホルムを用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA はイソプロパノールで精製した後に、70% エタノールによって沈殿させて不純物を含む上清を除去した。最終的に沈殿した total RNA は RNase-free の純水で溶解させた。得られた total RNA 溶液は、BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いた OD260 分光測光法によって、濃度を測定した。抽出された total RNA は、網羅的遺伝子解析と定量的遺伝子発現解析に用いた。

2.2.21. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

抽出した total RNA 溶液を RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) でさらに精製し、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) を用いたキャピラリー電気泳動法によって RNA の純度を精密に評価した。高純度であることが保障された RNA 溶液を、各群に準備した 5 匹のマウスのうち、2 匹または 3 匹を一つのグループとしてプールし、各群 2 つずつの RNA 溶液を準備した。それぞれプールした RNA 溶液 ($n = 2/\text{group}$) に含まれる RNA は Cy3 で蛍光標識し、Takara Bio, Inc. protocol. に基づいて SurePrint G3 Mouse GE 8x60K microarray (Agilent Technologies) での分析に供した。マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析では、Gene Expression Wash Buffers Pack (Agilent Technologies) を用い

て機器の洗浄を行い、その後に DNA microarray scanner G2565CA (Agilent Technologies) によって走査した。走査によって得られた結果は、Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) guidelines (Brazma et al., 2001) および pre-processing method for Agilent data (Zahurak et al., 2007) に則って Agilent Feature Extraction software を用いることで、標準化およびデータの数値化を行った。発現変動の基準として、① 対照群 (超純水群) と高用量曝露群の発現を比較して、2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動 ($>2\text{-fold}$ and $<0.5\text{-fold}$ in the high-dose group/control group comparison) が認められ、かつ、② CB-NP の曝露量と遺伝子発現の相関係数が 0.7 以上または -0.7 以下の遺伝子を抽出し、CB-NP の用量依存的に変動する遺伝子を同定した。

2. 2. 22. Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析

マイクロアレイの結果を生物学的意義の観点から理解するために、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析 (アノテーション解析) を行った。National Center for Biotechnology Information (NCBI; MD, USA) から供給されたアノテーションファイル (gene2go.gz) を用いて、マイクロアレイにより抽出された変動遺伝子に対して Gene Ontology を付与した。アノテーションファイルは、2015 年 6 月 20 日に取得したものを使用した。各カテゴリーにおける Gene Ontology の濃縮係数 (Enrichment factors) は、(カテゴリー内の変動遺伝子数/全変動遺伝子数)/(カテゴリー内の総遺伝子数/総遺伝子数) の数式を用いて算出した。濃縮係数 2 以上、変動遺伝子数 3 以上でかつ、超幾何分布 (hypergeometric distribution) に基づくフィッシャーの確率検定によって $p < 0.01$ を示す Gene Ontology をもつ遺伝子群を抽出し、CB-NP の胎児期曝露によって変動する遺伝子群の機能を明らかにした。

2. 2. 23. 定量的逆転写 PCR を用いた遺伝子発現解析

まず、M-MLV Reverse Transcriptase (Invitrogen Co., Carlsbad, CA, USA) を用いて、それぞれの個体から抽出した total RNA (1 μg) から解析対象となる RNA の鋳型 DNA (cDNA) を作製した。その後、SYBR Green Real-Time PCR Master Mix (Toyobo Co. Ltd., Osaka, Japan) と解析対象となる遺伝子のプライマー (Fasmac Co., Ltd. Kanagawa, Japan) 、もしくは、Real-Time PCR Master Mix (Toyobo) と TaqMan primer/probe sets (Applied Biosystems Japan, Tokyo, Japan) を使用して、定量的逆転写 PCR (qRT-PCR) により、対象となる遺伝子の発現量を評価した。本研究では、マイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析と Ontology を

用いた遺伝子機能解析の結果に基づいて、CB-NP の発達神経毒性に深く関与すると考えられる9つの遺伝子を解析対象として選択した。qRT-PCR で用いたプライマーやプローブはTable 2-1 に示した。解析対象となった遺伝子の発現量は、ハウスキーピング遺伝子であるGAPDH の発現量を活用して標準化した。

Table 2-1 qRT-PCR による定量的遺伝子発現解析に使用したプライマーとプローブの配列

Gene		Sequence (5'-3')		Tm (°C)
Gapdh	(NM_008084.2)	F	TGTGCAGTGCCAGCCTCGTC	60
		R	GGATGCATTGCTGACAATCT	
Sox17	(NM_011441)	F	AAGTAGCTCCAGAACTGCAG	60
		R	CTGCTCATTGTATCCATGAGGTGA	
Tgfa	(NM_031199)	F	CTAGCGCTGGGTATCCTG	60
		R	CACTCACAGTGTTCGCGAG	
Nos3	(NM_008713)	F	CTCTGCCTCACTCATGGGCACG	60
		R	GGATTTTGTAGCTCTTGTGCTGCTC	
Tbx1	(NM_001285472)	F	CTACCAGAATCACCGGATCACG	60
		R	CCGAGAGCGAGCAAAGGC	
		P	TAAGATTGCCAGCAACCCCTTCGCCAAAG	
Kdr	(NM_010612)	F	TCACCGGAAATCTGGAGAATCAG	60
		R	CTCAGTACAATGCCTGAATCTTCTAC	
		P	ACAACCATTGGCGAGACCATTGAAGTGACT	
Flt1	(NM_010228)	F	TGAGGAGCTTTCACCGAACTC	60
		R	ACTCGCTATTCTCAAGTCTATCTTCA	
		P	CTTGGTCTCAGTCCAGGTGAACCGCTTC	
Tie1	(NM_011587)	F	CCATGCTTTTGTCTACCAAAGTCA	60
		R	GCGGCATTCCCAGAACCC	
		P	AGCCAGACAGGACCACAGCAGAGTT	
Cyr61	(NM_010516)	F	ATCGCAATTGGAAAAGGCAGC	60
		R	GGCGTGCAGAGGGTTGAAA	
		P	AGGCTTCCTGTCTTTGGCACCGAACC	
Cxcl12	(NM_021704)	F	TCGCCAGAGCCAACGTCAA	60
		R	GATCCACTTTAATTCGGGTCAATGC	
		P	CCAAACTGTGCCCTTCAGATTGTTGCACGG	

2.2.24. 統計解析

結果は全て、平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計学的解析のために、Windows 版の Excel 統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析のみ P 値が 0.01 未満の場合、ほかの解析では P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

出生児数及び性比については F 検定で等分散性を確認した後に student の t 検定を用いて、CB-NP または TiO₂-NP 曝露による影響を評価した。出生児の体重に関しては「CB-NP 曝露」と「週齢」を要因とした二元配置分散分析を行った。交互作用が認められた場合、Tukey-Kramer の多重比較検定を行った。PAS 陽性細胞数の定量分析をはじめとした組織学的手法における統計学的解析は、F 検定により等分散性を確認した後、student の t 検定を用いて CB-NP の胎児期曝露による影響を評価した。用量依存性について解析した項目については、全てのデータに関して「曝露濃度」を要因とした一元配置分散分析を行った。統計学的有意差が認められた場合、Dunnet の多重検定 (対照群との比較) を行った。

2.3. 実験結果

2.3.1. 調製した分散液中の CB-NP の物性測定

透過型電子顕微鏡観察と動的光散乱法を用いて、投与した CB-NP 分散液中 (95 µg/mL) の粒子の物性を評価した。透過型電子顕微鏡観察の結果、CB-NP 分散液中の粒子は、約 15 nm の一次粒子径の粒子が数個結合し、粒子径 30-200 nm の大きさのアグロメレート体の状態で分散していることが示された (Fig. 2-4)。動的光散乱法を用いた計測の結果、CB-NP 分散液から、平均粒子径 84.2 nm をもつ単分散の粒径分布 (多分散性指数 0.143) が確認された (Fig. 2-4)。また、動的光散乱法で示された平均粒子径 84.2 nm は透過型電子顕微鏡観察で観察された代表的なアグロメレート凝集体の粒子径と一致した。

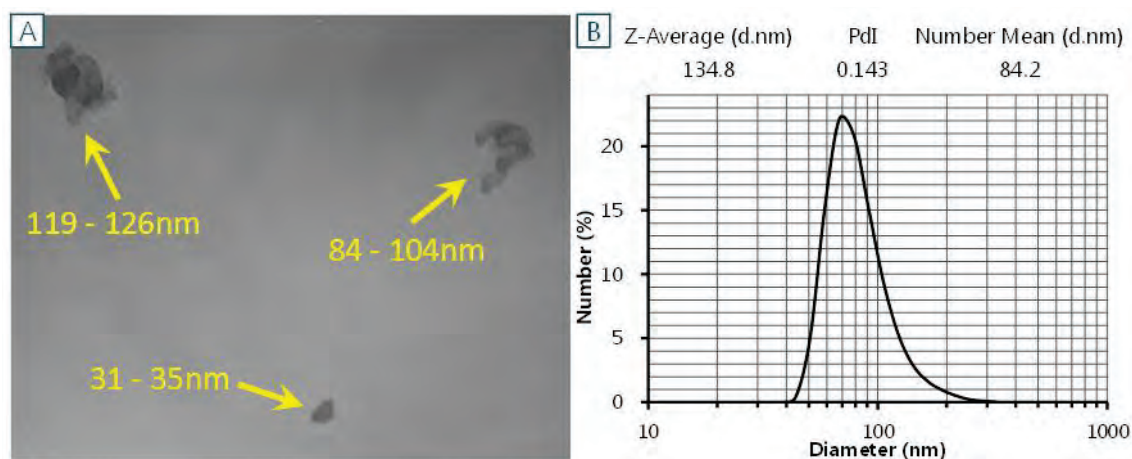


Fig. 2-4 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の粒径とその分布

A: 分散液中に存在する CB-NP の代表的な電子顕微鏡像。黄色で示した数値が二次粒子径の短軸と長軸の長さを示している。B: 動的光散乱法により取得した分散液中に存在する CB-NP の二次粒子径分布。

2.3.2. 調製した分散液中の TiO_2 -NP の物性測定

透過型電子顕微鏡観察と動的光散乱法を用いて、投与した TiO_2 -NP 分散液 (8 mg/mL) 中の粒子の物性を評価した。透過型電子顕微鏡観察の結果、 TiO_2 -NP 分散液中の粒子の多くは、約 20 nm の一次粒子径の粒子が数個結合し、粒子径 40-120 nm の大きさのアグロメレート体の状態で分散していることが示された (Fig. 2-5)。また、一部の粒子は他の粒子とアグロメレート体を形成することなく、単一の状態で分散していることも観察された。動的光散乱法を用いた計測の結果、分散液から、平均粒子径 43.1 nm をもつ単分散の粒径分布 (多分散性指数 0.157) が認められた (Fig. 2-5)。また、動的光散乱法で示された平均粒子径 43.1 nm は透過型電子顕微鏡観察で観察された代表的なアグロメレート凝集体の粒子径と一致した。

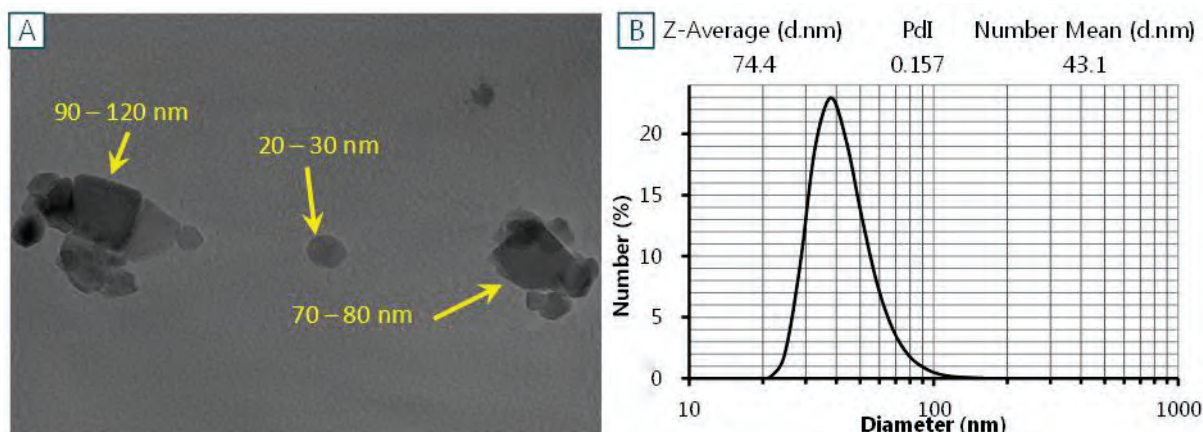


Fig. 2-5 二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) の粒径とその分布

A: 分散液中に存在する TiO₂-NP の代表的な電子顕微鏡像。黄色で示した数値が二次粒子径の短軸と長軸の長さを示している。B: 動的光散乱法により取得した分散液中に存在する TiO₂-NP の二次粒子径分布。

2.3.3. 用量依存性の検証用に調製した分散液中の CB-NP の物性測定

透過型電子顕微鏡観察と動的光散乱法を用いて、用量依存性の検証用に調製した CB-NP 分散液中の粒子の物性を評価した。透過型電子顕微鏡観察の結果、CB-NP 分散液中の粒子は、約 15 nm の一次粒子径の粒子が数個から十数個結合し、粒子径 250 nm 以下の大きさのアグロメレート体の状態で分散していることが示された (Fig. 2-6)。動的光散乱法を用いた計測の結果、CB-NP 分散液から、主要なピーク粒径 91 nm を示した粒径分布が確認された (Fig. 2-6)。また、動的光散乱法で示されたピーク粒径 91 nm は透過型電子顕微鏡観察で観察された代表的なアグロメレート凝集体の粒子径と一致した。

投与した 3 種類の CB-NP 分散液の濃度を測定するために、濃度既知の CB-NP 分散液 4 種 (62.5 μg/mL - 500 μg/mL) を、EDX を用いて X 線スペクトル強度を測定した。その測定値をもとに検量線を作成し、濃度未知の投与用 CB-NP 分散液の濃度を概算した結果、高用量群に投与した CB-NP 分散液の濃度は 73 μg/mL と算出された (Fig. 2-6)。希釈倍率をもとに、中用量群に投与した CB-NP 分散液は 15 μg/mL、低用量群に投与した CB-NP 分散液は 2.9 μg/mL と算出された。

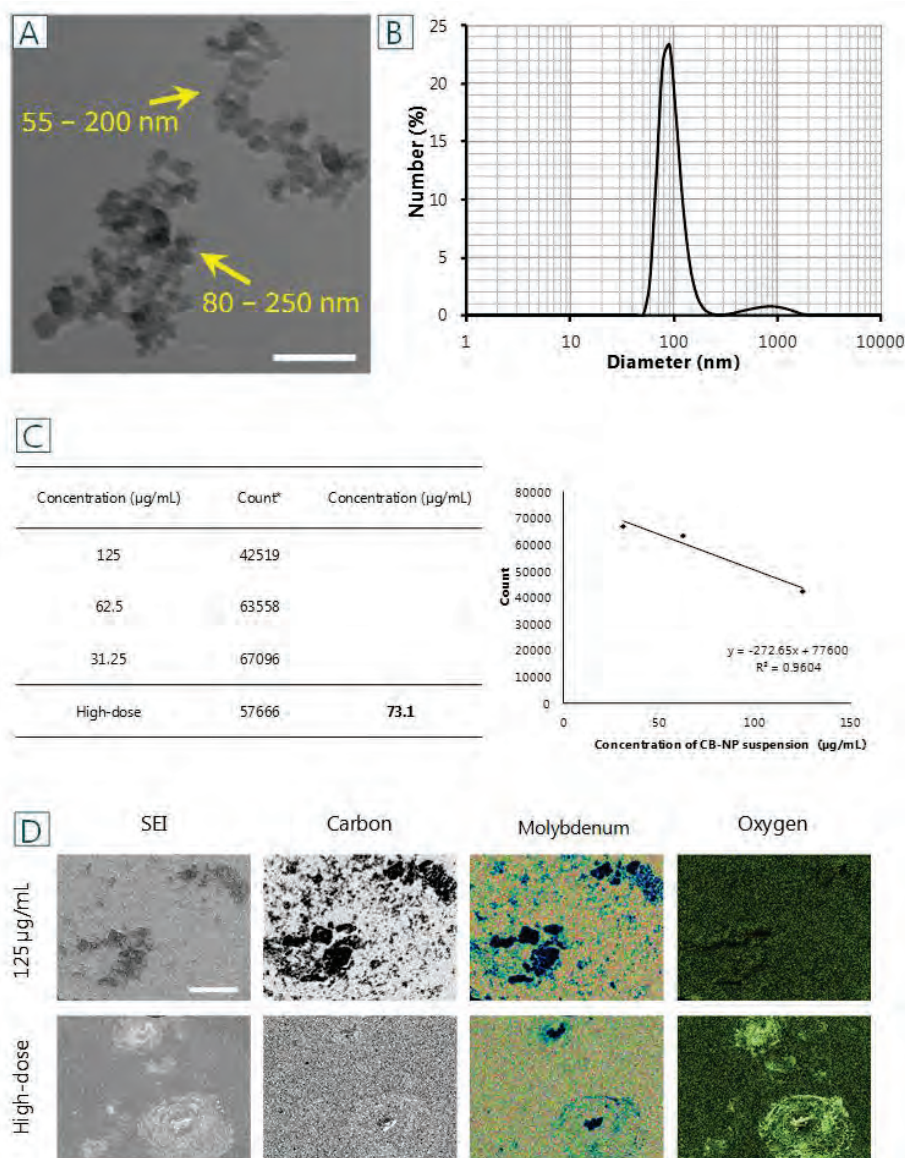


Fig. 2-6 調整したカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 分散液の物理化学的性質

A: 分散液中に存在する CB-NP (高用量群) の代表的な電子顕微鏡像。黄色で示した数値が二次粒子径の短軸と長軸の長さを示している。B: 動的光散乱法により取得した分散液中に存在する CB-NP (高用量群) の二次粒子径分布。C: SEM/EDX を用いて算出した CB-NP 分散液の濃度とその検量線。CB-NP 分散液 (高用量群) は 73 µg/ mL であることが示された。表中の Count* は Molybdenum X-ray Spectrum intensity (2.290 keV) の値である。D: 濃度定量に使用した SEM/EDX の CB-NP 画像 (125 µg/ mL と High-dose group)。SEI は二次電子線像を表している。

2.3.4. 出生児数と性比、体重

出生児数及び性比に関して、CB-NP 及び TiO₂-NP の胎児期曝露による違いは認められなかった (Table 2-2, 2-3)。週齢の要因による体重の増加は確認されたが、CB-NP 及び TiO₂-NP の胎児期曝露による体重の増減は認められなかった (Table 2-4, 2-5)。用量依存性を検証した実験系においても、出生児数、性比及び体重の増減に関して、いずれの曝露量でも CB-NP の胎児期曝露による違いは認められなかった (Table 2-6, 2-7)。

Table 2-2. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響

Group name	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%) [*]
Ultra-pure water	5	13.8 ± 2.2	46.8 ± 9.8
CB-NP	5	13.0 ± 1.2	62.5 ± 21.4

出生児数ならびに性比について、超純水群と CB-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male / (male + female) × 100」で算出した。

Table 2-3. 二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響

Group name	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%) [*]
Ultra-pure water	3	14.0 ± 0.0	50.0 ± 14.3
TiO ₂ -NP	3	11.7 ± 4.0	57.1 ± 7.1

出生児数ならびに性比について、超純水群と TiO₂-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male / (male + female) × 100」で算出した。

Table 2-4. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢および12週齢時における体重 (g) に対する影響

Group name	Number of dam (Number of offspring)	Age	Body weight (g)
Ultra-pure water	5 (20)	6 w	33.9 ± 3.0
	5 (14)	12 w	42.8 ± 3.3 ^{###}
CB-NP	5 (20)	6 w	33.9 ± 2.1
	5 (15)	12 w	40.8 ± 5.2 ^{###}

二元配置分散分析の結果、体重に対する週齢の主効果は認められたものの [F (1, 16) = 47.1, ^{###}P<0.001]、CB-NP の曝露の主効果と、CB-NP 曝露/週齢の交互作用は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。

Table 2-5. 二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響

Group name	Number of dam (Number of offspring)	Age	Body weight (g)
Ultra-pure water	3 (3)	6 w	34.5 ± 2.1
TiO ₂ -NP	3 (3)	6 w	32.9 ± 1.4

6週齢時における体重について、超純水群と TiO₂-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。

Table 2-6. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響

Group name	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%)*
Ultra-pure water	5	15.8 ± 1.9	47 ± 16
Low CB-NP	5	15.2 ± 1.9	44 ± 9
Middle CB-NP	5	14.2 ± 1.6	42 ± 9
High CB-NP	5	16.4 ± 1.1	53 ± 13

一元配置分散分析の結果、出生児数ならびに性比について、各群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male / (male + female) × 100」で算出した。

Table 2-7. カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響

Group name	Number of dam (Number of offspring)	Age	Body weight (g)
Ultra-pure water	5 (18)	6 w	33.2 ± 1.9
Low CB-NP	5 (18)	6 w	34.7 ± 3.0
Middle CB-NP	5 (19)	6 w	32.6 ± 1.6
High CB-NP	5 (20)	6 w	32.0 ± 1.4

一元配置分散分析の結果、6週齢時における体重について、各群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値 ± SD」で示している。

2.3.5. 点鼻投与によるナノ粒子の肺への移行性の評価

本研究では、経気道曝露の中でも、母体への負荷が最も小さい点鼻投与法を選択した。点鼻投与法は、喘息モデル動物を作製する際の抗原感作に用いられる手法であり、この手法により肺を中心とした呼吸器への投与が可能である。しかしながら、実験者の手技によっては、胃に移行することや動物が吐き出してしまうことなど、想定した通りに投与物質が肺へと移行しないことがある。そこで、本研究で用いた点鼻投与法により、ナノ粒

子が肺へと移行していることを確認するため、希土類ドープセラミックスナノ粒子と近赤外光を用いて評価した。

希土類ドープセラミックスナノ粒子は、生体組織における透過性の高い近赤外光によって励起され、OTN 近赤外蛍光を示すナノ粒子である (Kamimura et al., 2017)。実際に、本検証で用いた $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子分散液 (粒径 120 nm, 10 mg/mL) に近赤外光 (波長 976 nm) を照射すると、1550 nm の波長を持つ OTN 近赤外蛍光が放出された (Fig. 2-7A-C)。この $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ ナノ粒子をマウスに点鼻投与し、その 80 分後に摘出した各器官に近赤外光を照射して観察した結果、肺の全域に顕著な蛍光が確認された (Fig. 2-7D-G)。一方で、肺以外の器官において、蛍光は認められなかった。さらに、投与から 24 時間後に摘出した各器官に近赤外励起光を照射して観察した結果、肺の一部の領域に強い蛍光が残っていた (Fig. 2-7H-K)。80 分後の観察と同様に、24 時間後の観察においても肺以外の器官で蛍光は検出されなかった (Fig. 2-7D-K)。

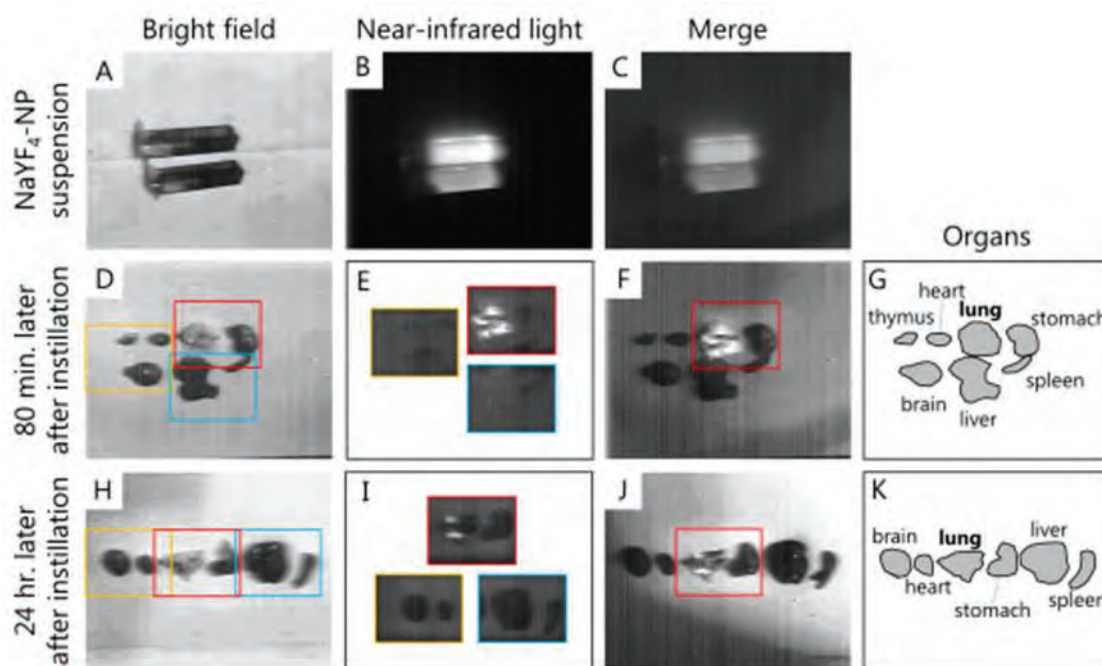


Fig. 2-7 点鼻投与によるナノ粒子の母体の肺への移行性の評価

A-C: $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ -NP 分散液の画像と、その分散液に近赤外光を照射して発光を確認した画像。D-G: $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ -NP 分散液投与 80 分後の各臓器におけるナノ粒子の分布。H-K: $\text{NaYF}_4: \text{Yb}^{3+}, \text{Er}^{3+}$ -NP 分散液投与 24 時間後の各臓器におけるナノ粒子の分布。

2.3.6. 各特殊染色法を用いた組織学的解析

<PAS-Hematoxylin 染色法>

CB-NP 及び TiO₂-NP の胎児期曝露が出生児の中枢神経系に引き起こす影響を脳全域について網羅的に評価するため、多数の組織学的解析を行った。ここでは、最も顕著な変化が認められた PAS-Hematoxylin 染色法の結果について解説する。厚さ 3 μm の切片を 30 μm 以上の間隔をあけて、マウス 1 匹あたり 20 枚、計 320 枚を PAS-Hematoxylin 染色の組織形態学的観察に使用した。

PAS-Hematoxylin 染色像観察の結果、脳全域の血管内皮細胞と脳実質の間に、PAS 陽性の顆粒状物質が確認された (Fig. 2-8; Fig. 2-9)。とくに、対照として用意した、超純粋群の脳血管周辺で確認された顆粒状物質の大きさは直径が 1 μm 前後であったのに対し (Fig. 2-8A-D; Fig. 2-9A, B)、CB-NP 胎児期曝露群の脳血管周辺には直径 2-3 μm 前後の肥大化した顆粒状物質が確認された (Fig. 2-8F, H)。また、対照群の血管周囲に存在する顆粒状物質の PAS 染色態度は比較的弱く、いくつかの顆粒の輪郭がぼやけて観察された (Fig. 2-8B, D; Fig. 2-9B)。それに対して、曝露群の血管周囲に存在する顆粒状物質の PAS 染色態度は対照群と比べて強く、消化顆粒の輪郭の明瞭なものが多く観察された (Fig. 2-8F, H)。また、この脳血管周辺に存在する PAS 陽性の顆粒状物質の肥大化は、CB-NP 曝露群と同様に TiO₂-NP 曝露群でも観察された (Fig. 2-9B, D)。PAS-Hematoxylin 染色法を用いた組織形態観察の結果、ナノ粒子の胎児期曝露は出生児の脳血管周辺に存在する顆粒状物質を肥大化させることが示された。

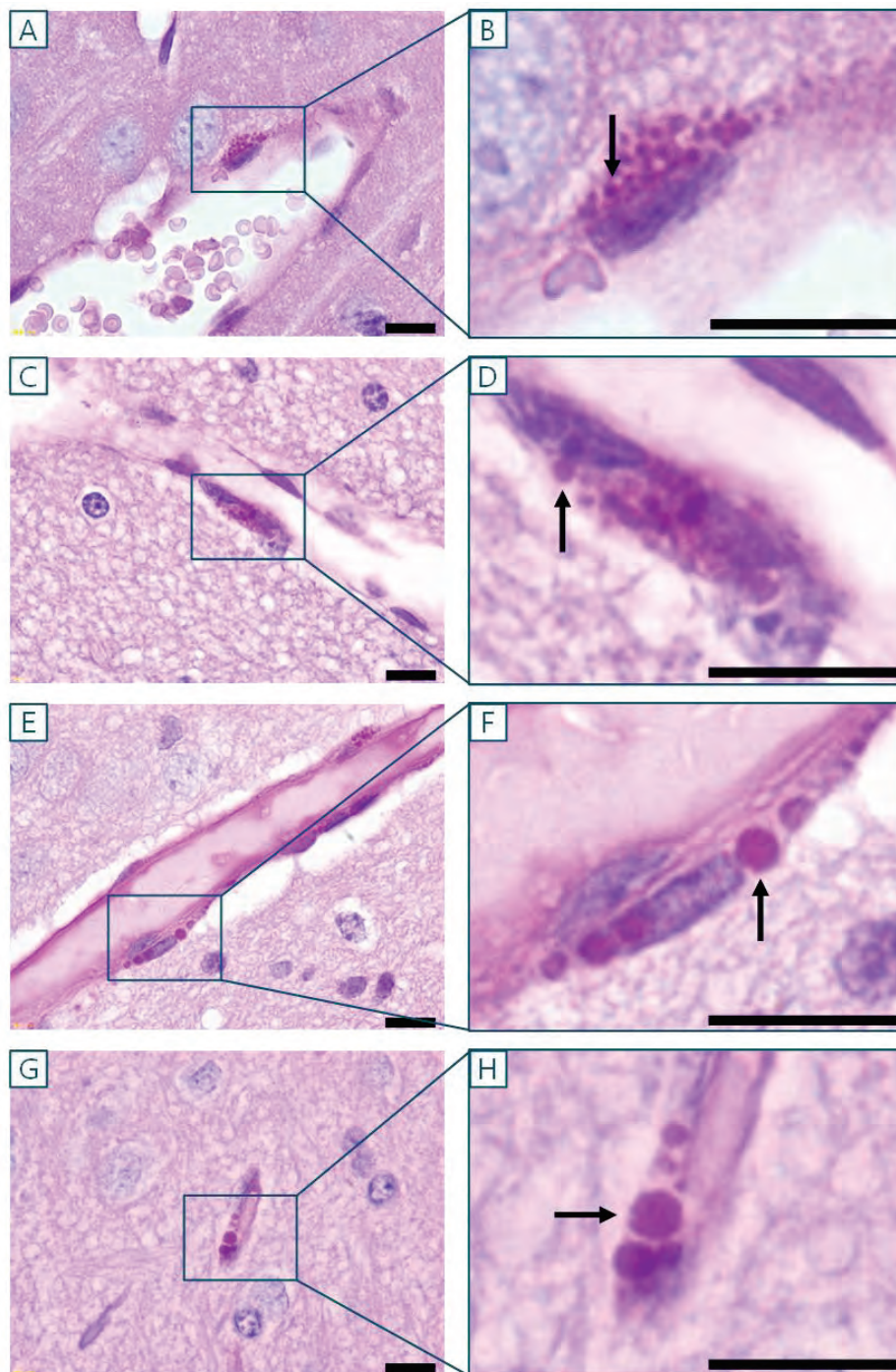


Fig. 2-8 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群の脳皮質の血管周辺における PAS-Hematoxylin 染色像

A, B: 対照群 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。C, D: 対照群 12 週齢産児における脳血管周辺の染色像。E, F: CB-NP 曝露群 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。G, H: CB-NP 曝露群 12 週齢産児における脳血管周辺の染色。スケールバーはすべて 10 μ m。

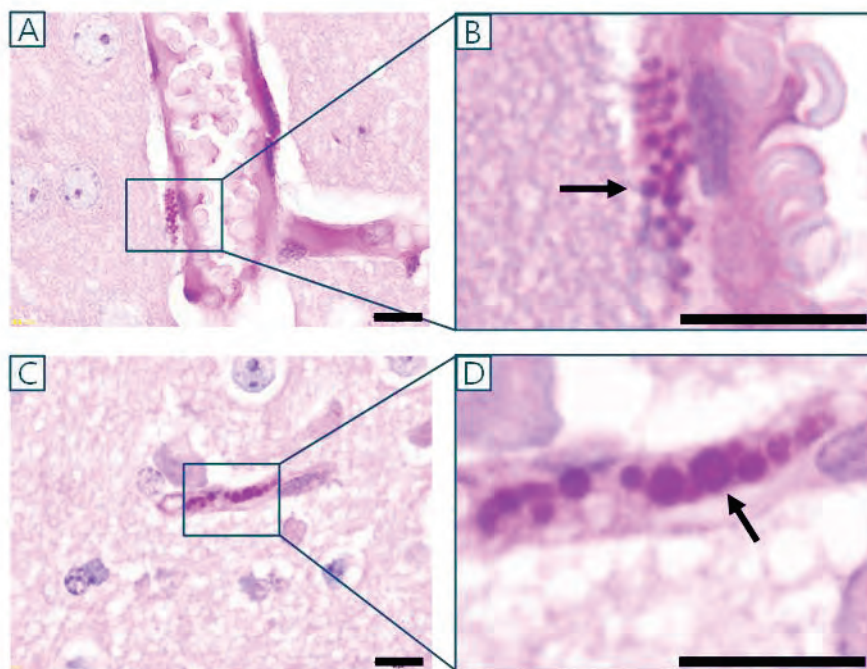


Fig. 2-9 対照群と二酸化チタンナノ粒子 (TiO₂-NP) 曝露群の脳皮質の血管周辺におけるPAS-Hematoxylin 染色像

A, B: 対照群 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。C, D: 対照群 12 週齢産児における脳血管周辺の染色像。E, F: TiO₂-NP 曝露群 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。G, H: TiO₂-NP 曝露群 12 週齢産児における脳血管周辺の染色。スケールバーはすべて 10 μm。

<Masson's trichrome 染色法>

他の多くの臓器と異なり、中枢神経系は膠原繊維をほとんど発現していないが、血管周辺組織に限り、化学物質の曝露や加齢に伴って膠原繊維の発現が亢進すると報告されている (Tahajjodi et al., 2014; Uspenskaia et al., 2004)。PAS-Hematoxylin 染色法による組織形態観察の結果から、胎児期のナノ粒子曝露が脳血管周辺の組織に組織学的異変を引き起こしている可能性が示唆されたため、Masson's trichrome 染色法を用いて血管周辺組織の膠原繊維を観察した。

陽性対象として、対照群と同様の飼育方法で 2 年間飼育した老齢マウスを使用した。この老齢マウスから脳組織を摘出し、ホルマリン固定を施した後、パラフィン切片を作製した。作製した切片に対して、Masson's trichrome 染色を行った結果、脈管構造の外環に膠原線維 (鮮青色) の染色が認められた (Fig. 2-10E, F)。一方で、対照群及び CB-NP 曝

露群における6週齢出生児の脳切片からは、一切の膠原線維が認められなかった (Fig. 2-10A, B: 対照群, C, D: CB-NP 曝露群)。以上のことから、CB-NP の胎児期曝露は、6週齢出生児の中枢神経系の脈管構造に対して膠原線維の発現を亢進させないことが示された。

<Oil Red O 染色法と Sudan Black B 染色法>

脳血管周辺に顆粒状物質を観察した PAS-Hematoxylin 染色法は、糖類に加え、糖タンパク質や糖脂質のような糖複合体の検出を目的とした染色方法である。先行研究によると、中枢神経系では、ある一定以上の週齢を超えると、脳血管周辺に顆粒状の脂質あるいは糖脂質が集積する (Mato et al., 1983)。そこで、ナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化した顆粒状物質が、脂質や糖脂質に由来するものか調査すべく、多様な脂質を染色する Oil Red O 染色法と Sudan Black B 染色法を行った。

陽性対象として、対照群と同様の飼育方法で2年間飼育した老齢マウスを使用した。この老齢マウスから脳組織を摘出し、ホルマリン固定を施した後、凍結切片を作製した。作製した切片に対して、Oil Red O 染色または Sudan Black B 染色を行った結果、いずれの染色法においても、脳血管周辺に顆粒状の脂質が認められた (Fig. 2-11E: Oil Red O, F: Sudan Black B)。一方で、対照群および CB-NP 胎児期曝露群における6週齢出生児の脳切片からは、いずれの染色法においても一切の染色が認められなかった (Fig. 2-11A: 対照群 Oil Red O, B: 対照群 Sudan Black B, C: CB-NP 曝露群 Oil Red O, D: CB-NP 曝露群 Sudan Black B)。これらの結果から、ナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化する顆粒状物質は脂質の集合体ではない可能性が示唆された。

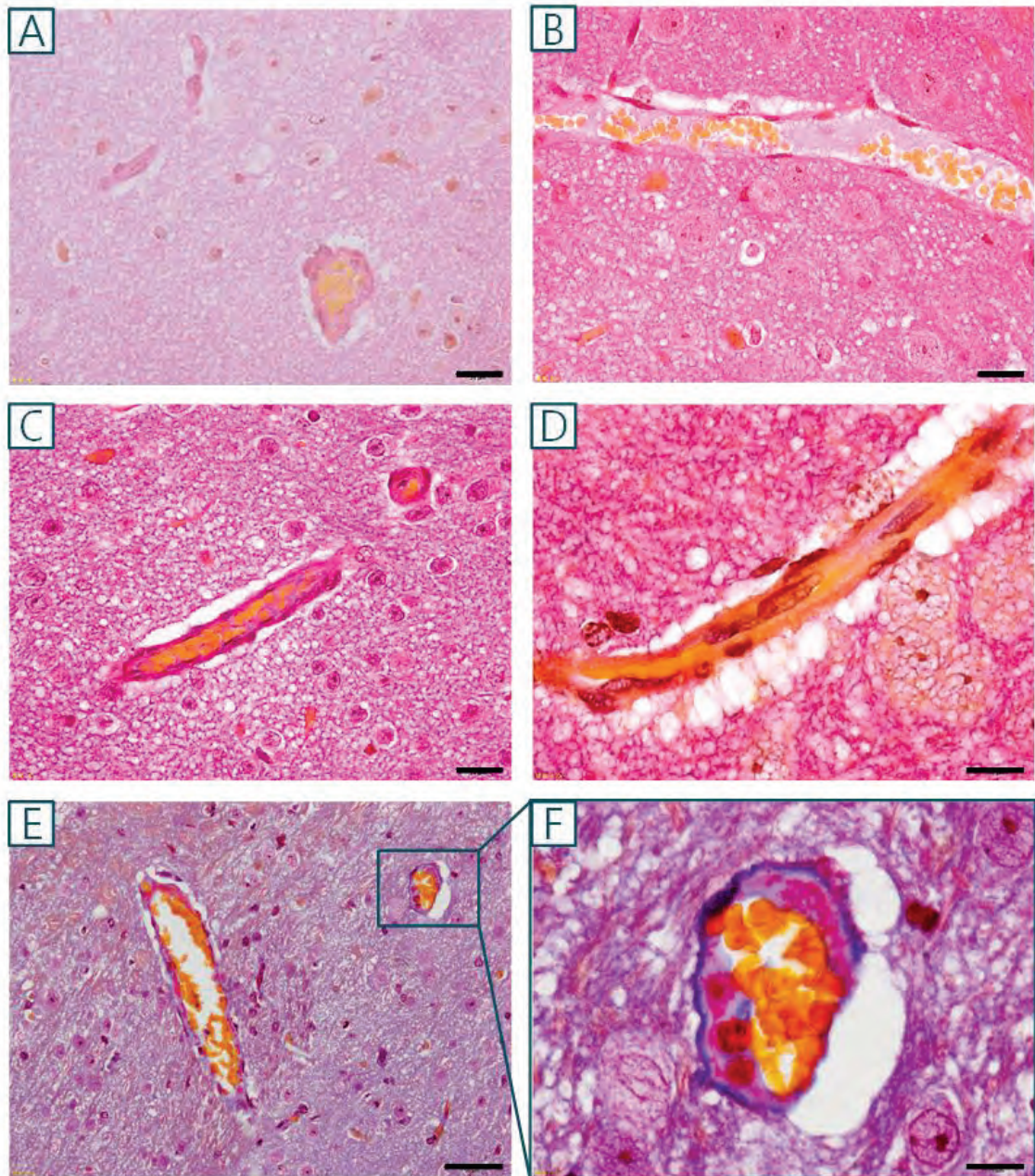


Fig. 2-10 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群ならびに老齢個体の大脳皮質の血管周辺における Masson's trichrome 染色像

A, B: 対照群の6週齢産児における脳血管周辺の染色像。C, D: CB-NP 曝露群の6週齢産児における脳血管周辺の染色像。E, F: 陽性対照として用意した2年齢老齢マウスにおける脳血管周辺の染色像。青色が膠原繊維を表している。スケールバーは、A, B, C, Dが20 μm 、Eが50 μm 、Fが10 μm となる。

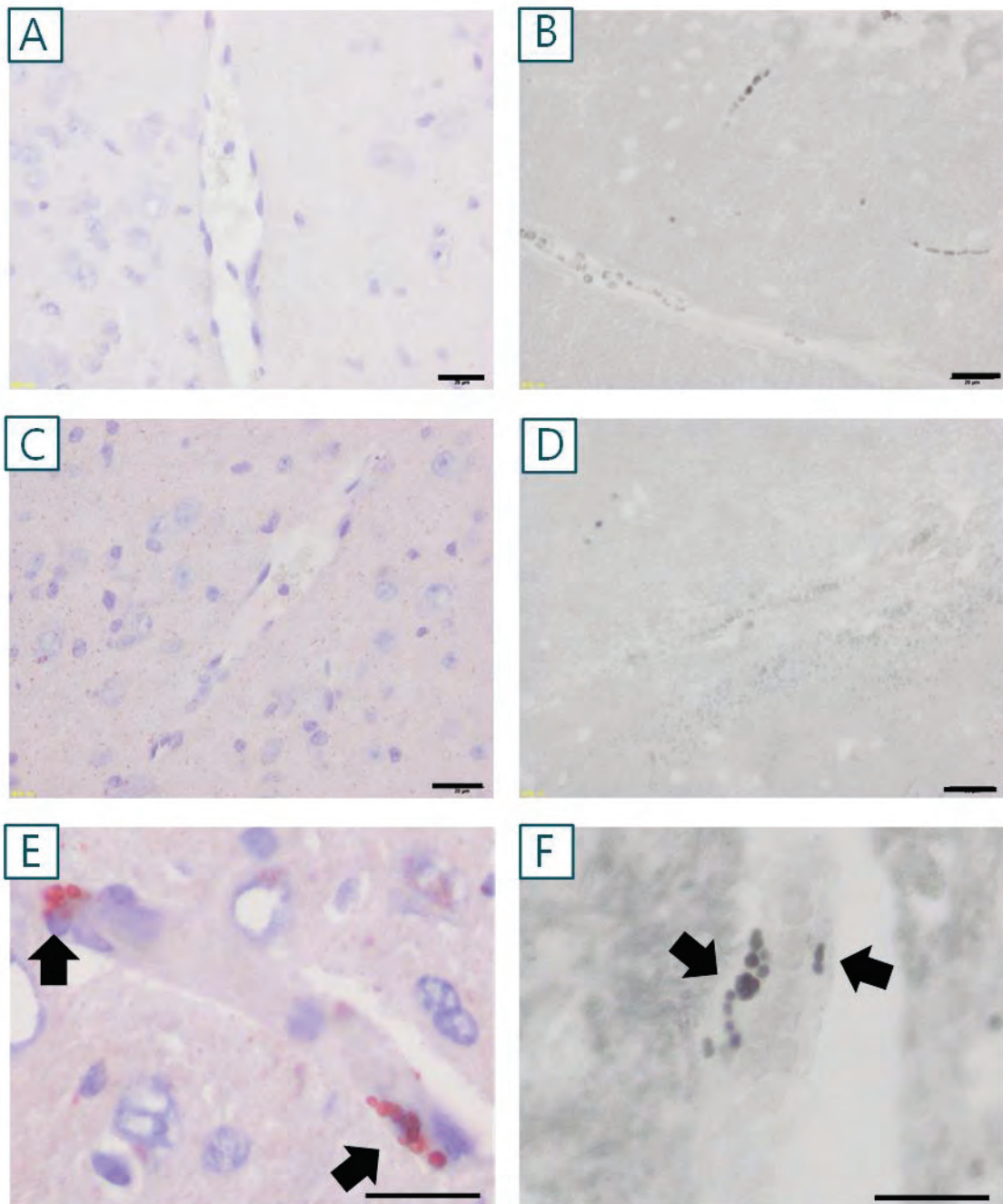


Fig. 2-11 対照群とカーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) 曝露群ならびに老齢個体の大脳皮質の血管周辺における Oil Red O 染色像および Sudan Black B 染色像

A, C, E: Oil Red O 染色像。B, D, F: Sudan Black B 染色像。A, B: 対照群の 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。C, D: CB-NP 曝露群の 6 週齢産児における脳血管周辺の染色像。E, F: 陽性対照として用意した 2 年齢老齢マウスにおける脳血管周辺の染色像。黒色矢印は脳血管周辺に存在する顆粒状の脂質を示している。スケールバーはすべて 20 µm である。

2.3.7. 脳血管周辺に存在する PAS 陽性の顆粒状物質の同定

ナノ粒子の胎児期曝露が引き起こす中枢神経系への影響を評価すべく、免疫蛍光染色を施した切片の観察を行った。その際に、脳血管周辺には緑色の強い自家蛍光を持つ顆粒状の物質が存在することに気づいた。この脳血管周辺に存在する緑色自家蛍光をもつ顆粒状物質と PAS 陽性の顆粒状物質の関係性について評価すべく、連続切片を用いて蛍光顕微鏡観察と PAS 染色像の観察を行った。

無染色の凍結切片を蛍光顕微鏡で観察した結果、脳血管周辺に強い緑色蛍光顆粒が認められた (Fig. 2-12B, C)。その蛍光顕微鏡観察を行った切片と連続した切片に対して PAS-Hematoxylin 染色法で染色し、同じ血管周辺の PAS 陽性顆粒を明視野設定で観察した。その結果、緑色の蛍光顆粒が観察された同一の血管のほぼ同じ場所に PAS 陽性の顆粒状物質が確認された (Fig. 2-12D, E, F)。一方で、緑色蛍光顆粒が観察されない血管周辺組織には、PAS 陽性の顆粒も認められなかった。なお、右側の血管の右上部には PAS 陽性顆粒が3つ存在するのに対し (Fig. 2-12F)、緑色蛍光顆粒は1つしか認められない (Fig. 2-12B)。これは、蛍光顕微鏡の蛍光設定と明視野設定の解像度の違いによるものであると考えられる。以上のことから、ナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化した脳血管周辺の PAS 陽性の顆粒状物質は、緑色の自家蛍光を発することが明らかになった。

ここで、PAS 染色に対して陽性を示し、かつ緑色の自家蛍光をもつ、脳血管周辺に存在する顆粒状物質について記載している先行研究を調査した結果、まったく同一の性質を示す消化顆粒が脳血管周囲マクロファージ (PVM: Perivascular Macrophage) の内部に存在することが明らかになった (Mato et al., 1979; 1996)。そこで、本研究により観察された、緑色の自家蛍光を発する PAS 陽性の顆粒状物質が、PVM の保有する消化顆粒と同一のものか明らかにするために、免疫蛍光染色を行った。

正常な PVM が保有する消化顆粒は、450-490 nm の波長の光で励起し、緑色の自家蛍光を発する (Nakazawa et al., 2002)。また、生理条件下の中枢神経系において、PVM の細胞膜には Macrophage Mannose Receptor (MMR/CD206) が特異的に発現しており、PVM の同定のために MMR の検出を目的とした免疫蛍光法や免疫組織化学法が行われている (Galea et al., 2005)。そこで、MMR を PVM のマーカーとして用いて、MMR 陽性細胞と緑色蛍光顆粒の局在を比較した。なお、PVM の蛍光顆粒は老化に伴って励起波長の上限が 560 nm まで幅が広がるため (Mato et al., 1996)、できる限り蛍光漏れを起こさないように CD206 抗体の二次抗体には DyLight 649 により標識されたものを用いた。

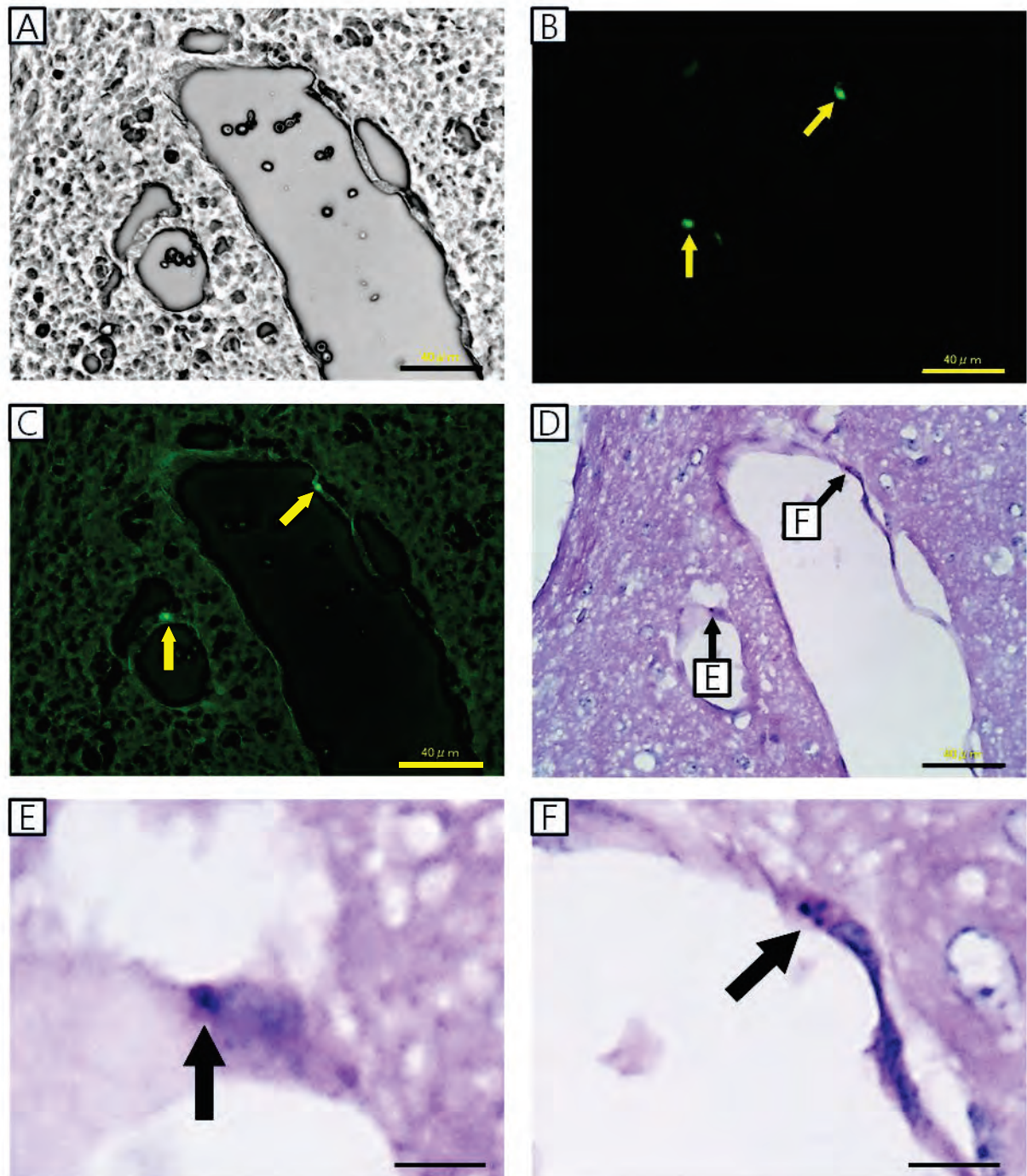


Fig. 2-12 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化した脳血管周辺に存在する PAS 陽性顆粒の同定

A: 無染色明視野像。 B: A における緑色自家蛍光の検出。 C: A と B のマージ像。 D: A-C の連続切片の PAS 染色像。 E, F: D の拡大像。 B で検出された自家蛍光と局在が一致する。スケールバーはすべて A-D が 40 μm で、E, F が 10 μm である。

620 nm の波長の励起フィルターを装着した蛍光顕微鏡を用いて脳切片を観察した結果、血管周辺に横長の CD206 陽性細胞が確認された (Fig. 2-13 circle)。また、470 nm の波長の励起フィルターを装着した蛍光顕微鏡を用いて観察した結果、同一の血管に円形の蛍光物質が認められた (Fig. 2-13)。核染色を行った画像 (Fig. 2-13 arrow) と共に、3つの画像を重ね合わせた結果、CD206 陽性細胞の中央に核が確認され、蛍光物質は CD206 細胞の細胞質内に存在することが示された (Fig. 2-13 square, B)。一方で、脳実質組織中に細胞核は観察されるものの、円形の緑色蛍光物質や CD206 陽性細胞は一切認められなかった。血管周辺を除いた場合、唯一、髄膜に CD206 と緑色蛍光物質が両方とも認められる細胞が確認されたが、これは PVM と性質が酷似した髄膜マクロファージだと考えられる。したがって、先の実験で観察された緑色の自家蛍光は PVM の保有する消化顆粒であることが示された。

PAS-Hematoxylin 染色、自家蛍光観察、MMR を指標にした免疫蛍光観察結果から、CB-NP の胎児期曝露によって肥大化した PAS 陽性の顆粒状物質は、自家蛍光を発する PVM の消化顆粒であることが明らかになった。以降の実験では、血管周辺に存在する PAS 陽性顆粒を保有した細胞は PVM と判断した。

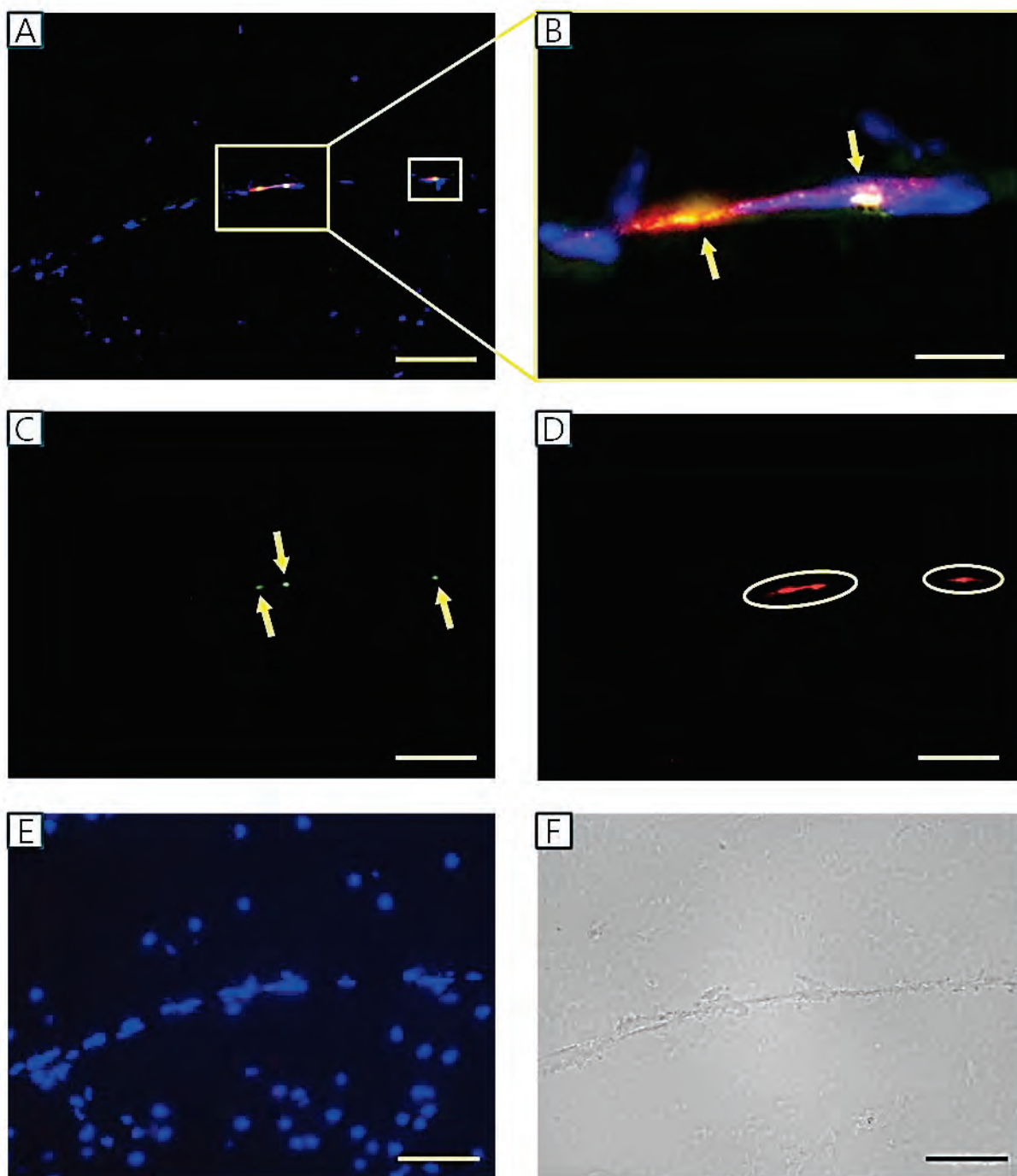


Fig. 2-13 PAS 染色性と緑色自家蛍光を持つ脳血管周辺顆粒の同定

A: C-E のマージ像。 B: A の拡大像。 C: 緑色自家蛍光。 D: CD206 (Macrophage Mannose Receptor) 陽性の確認。 E: 核染色像。 F: 明視野像。スケールバーはすべて A と C-F が 40 μm で、B が 10 μm である。

2.3.8. PVM の組織学的異変の脳領域別定量評価

PVM が保有する消化顆粒は、特定の疾患や細胞への傷害、老化などによって、PAS-Hematoxylin 染色性が失われることが報告されている (Mato et al., 1996; 2002)。本研究においても、PVM 消化顆粒の肥大化が確認され、CB-NP の胎児期曝露によって PVM に組織学的異変が生じていると考えられた。そこで、PAS 陽性の PVM 細胞数を脳領域別に定量評価した。各マウスの脳組織 1 つあたり 3 枚のパラフィン切片、計 30 枚 (対照群 15 枚、CB-NP 群 15 枚) の切片を光学顕微鏡下で網羅的に観察した。なお、解析には全て 6 週齢出生児を用いた。

対照群において、脳切片全域の PAS 陽性 PVM 数は、1 mm² あたり 7.42 個であった (Table 2-8, Fig. 2-14)。一方の CB-NP 曝露群では、1 mm² あたり 5.04 個と、対照群と比較して統計学的有意に減少していることが示された (Table 2-9, Fig. 2-14)。脳領域別に評価すると、CB-NP の胎児期曝露によって、大脳皮質 (Cx)、海馬 (HIP)、視床下部 (Hy)、中脳 (MBr)、小脳 (Cb)、延髄 (MO) の領域で PAS 陽性 PVM 細胞数、統計学的に有意な減少が認められた (Table 2-9, Fig. 2-14)。また、出生児の脳梁 (cc) を除く全ての脳領域で、PAS 陽性 PVM 細胞数の減少傾向が確認された (Table 2-9 Fig. 2-14)。

Table 2-8. 対照群とカーボンブラックナノ粒子曝露群それぞれの各個体における PAS 陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数と定量した面積

Ultra-pure water						
Sample ID	C1	C2	C3	C4	C5	Sum
Total counts	991	890	1225	1036	1206	5348
Total area [mm ²]	156.6	132.0	144.1	132.6	155.7	721.0
Carbon Black nanoparticle						
Sample ID	E1	E2	E3	E4	E5	Sum
Total counts	677	770	690	943	998	4078
Total area [mm ²]	157.7	163.4	154.4	164.4	166.3	806.2

Table 2-9. 対照群とカーボンブラックナノ粒子曝露群の各脳領域における PAS 陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数 (counts/mm²)

PAS-positive PVMs [count/mm ²]						
	Olf	Cx ^{***}	cc	Str	HIP ^{**}	Th
Ultra-pure water	8.89 ± 1.10	8.53 ± 0.63	1.92 ± 0.27	4.89 ± 1.10	9.62 ± 0.86	9.70 ± 1.75
CB-NP	6.47 ± 2.27	5.23 ± 0.49	2.14 ± 0.90	3.90 ± 0.84	6.15 ± 1.46	7.69 ± 1.80

PAS-positive PVMs [count/mm ²]						
	Hy ^{***}	MBr ^{**}	Po	Cb [*]	MO [*]	total ^{**}
Ultra-pure water	7.98 ± 1.09	7.88 ± 0.99	6.42 ± 1.32	7.42 ± 1.81	6.34 ± 1.37	7.42 ± 0.88
CB-NP	4.15 ± 0.81	5.69 ± 0.26	4.53 ± 1.70	4.15 ± 1.40	4.39 ± 1.07	5.04 ± 0.78

Olf: 嗅球、Cx: 大脳皮質、cc: 脳梁、Str: 線条体、HIP: 海馬、Th: 視床、Hy: 視床下部、MBr: 中脳、Po: 橋、Cb: 小脳、MO: 延髄、*p<0.05, **p<0.01, ***p<0.001

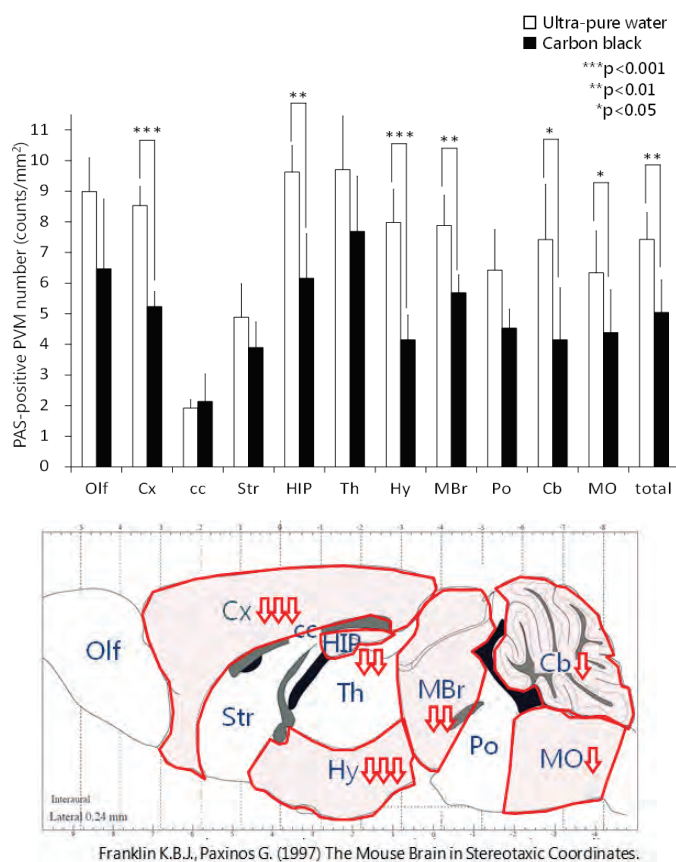


Fig. 2-14 PAS 陽性脳血管周囲マクロファージの細胞数 (Table 2-9 を図化したもの)

この定量的解析の結果から、CB-NP の胎児期曝露によって、PVM そのものの細胞数減少と、PAS 陽性の消化顆粒を保有する PVM の細胞数減少のいずれが起こっているのか、という新たな課題が。そこで、PVM の特異的マーカーである MMR を用いて PVM 細胞数の定量評価を行った。定量評価は、PAS 陽性 PVM 細胞数の減少が最も顕著であった大脳皮質で行った。その結果、対照群と CB-NP 胎児期曝露群の MMR 陽性 PVM 細胞数に、統計学的有意な差は認められなかった (Fig. 2-15)。したがって、CB-NP の胎児期曝露により、PVM 細胞数が減少したのではなく、PAS 染色性を持つ正常な PVM 細胞数の減少が引き起こされていることを示した。そして、CB-NP の胎児期曝露に起因する PVM の組織学的異変は、出生児の中枢神経系の幅広い領域においてびまん性に引き起こされていることが明らかになった。

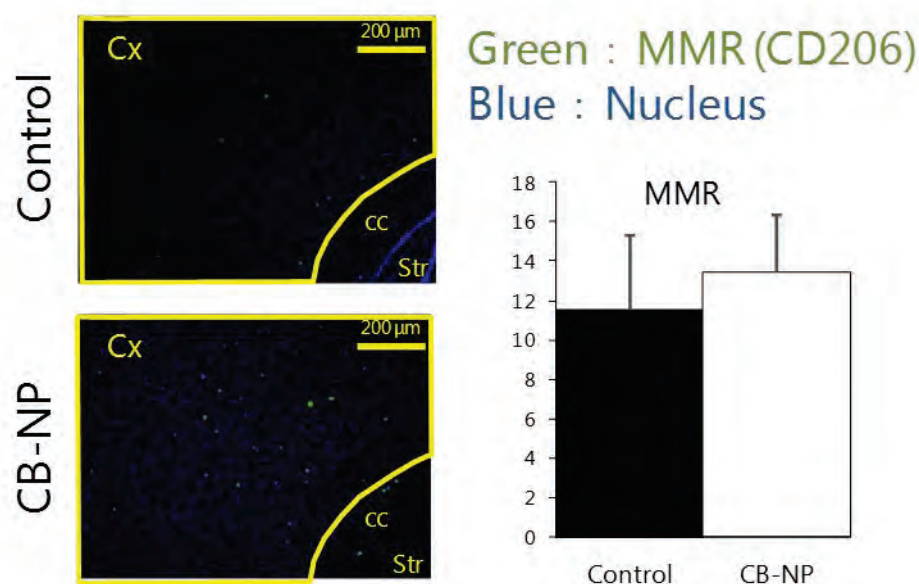


Fig. 2-15 CD206 (Macrophage Mannose Receptor) 陽性脳血管周囲マクロファージの定量評価.

2.3.9. 透過型電子顕微鏡を用いた脳血管周辺組織の超微小形態観察

CB-NP の胎児期曝露によって、出生児の PVM に PAS 陽性消化顆粒の肥大化や PAS 陽性 PVM 数のびまん性の減少が認められたことを受け、より詳細に PVM の組織学的異変を評価するために透過型電子顕微鏡を用いた脳血管周辺組織の超微小形態を観察した。実際に、ディーゼル排ガス粒子を妊娠期間中に曝露し、脳血管周辺の超微小形態観察を行っ

た研究では、脳血管周辺に観察される顆粒状物質に異常構造が確認されたことを報告しているため (Sugamata et al., 2006)、CB-NP の胎児期曝露によって同様の所見が認められると考えられた。

対照群、CB-NP 曝露群のいずれの個体においても大脳微小血管の周囲に平坦な構造を持つ血管内皮細胞や環状構造を持つ平滑筋細胞が観察された。また、血管の外側 (脳実質側) には血管内皮細胞とアストロサイトの末端足に挟まれて PVM が存在していた。対照群の 6、12 週齢出生児で観察された大半の PVM 消化顆粒は円形の構造とり、内部構造は均一で、高い電子密度を保有していることが確認された (Fig. 2-16A, C)。いずれの週齢においても一部の PVM 消化顆粒には軽度の空胞化が認められた。胎児期に CB-NP を曝露した 12 週齢出生児においては、いくつかの PVM 消化顆粒は蜂の巣状構造を形成していた (Fig. 2-16E, F)。蜂の巣状構造に変性した消化顆粒は顆粒が歪な構造をとり、顆粒内部の電子密度が不均一で極端な空胞化が進行していた (Fig. 2-16E)。これらの結果から、CB-NP の胎児期曝露は PVM の保有する消化顆粒に対して肥大化を引き起こすだけでなく、蜂の巣状構造化といった組織病理学的異変を誘導することが明らかになった。

さらに詳細に解析を進めると、蜂の巣状構造化が起きた PVM 消化顆粒の近傍に存在するアストロサイト末端足において重度の膨潤化が観察された (Fig. 2-16E)。この結果は、CB-NP の胎児期曝露は、PVM のみならず、PVM の周囲に存在するアストロサイトに対しても影響を及ぼしている可能性を示している。

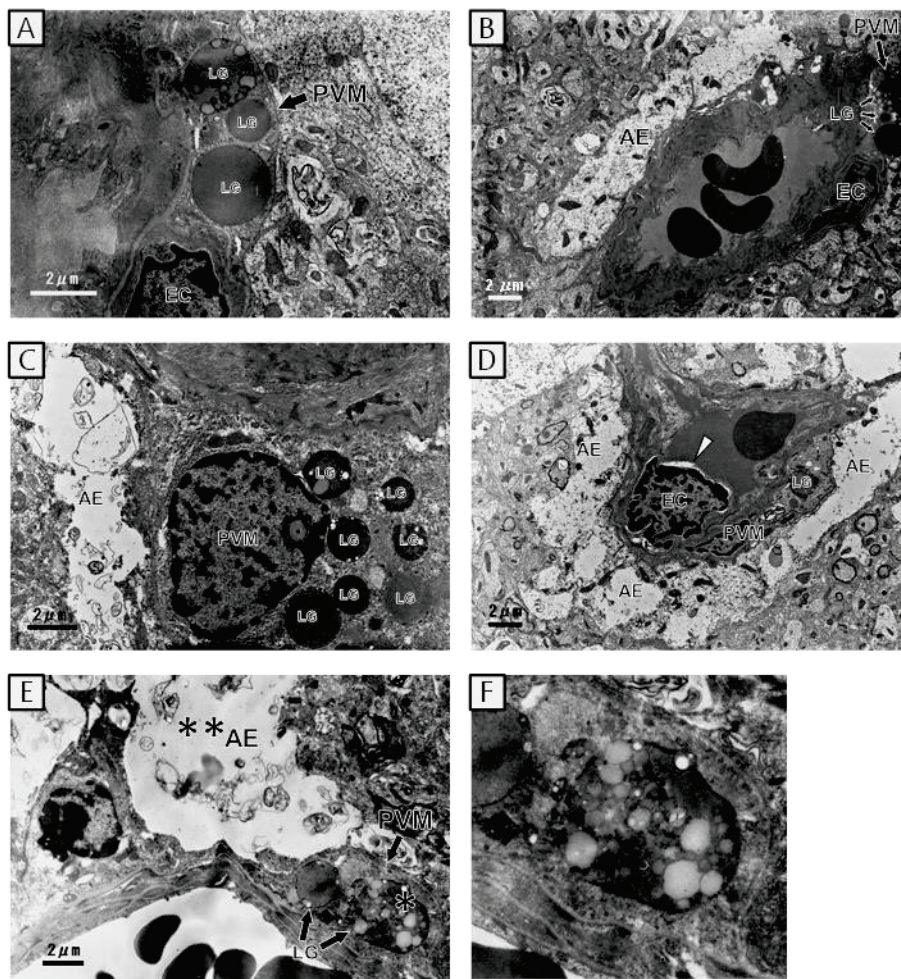


Fig. 2-16 脳血管周囲マクロファージ (PVM) とアストロサイトの電子顕微鏡観察
 A-C: 対照群の PVM 消化顆粒 (LG) とアストロサイト (AE) ならびに血管内皮細胞 (EC)。
 D-F: 曝露群の PVM 消化顆粒 (LG) とアストロサイト (AE) ならびに血管内皮細胞 (EC)。
 曝露群には、PVM 消化顆粒の蜂の巣状構造化 (F) やアストロサイト末端足の膨潤化 (**AE)、
 血管内皮細胞 (EC) のアポトーシスの前兆が確認された (矢印の先端の空白)。すべてのス
 ケールバーは 2 μm である。

2. 3. 10. PAS-GFAP 重染色法による PVM とアストロサイトの組織学的評価

透過型電子顕微鏡を用いた脳微小血管周辺の超微小形態観察の結果から、異常形態を示す消化顆粒を保有する PVM の近傍に、アストロサイトの組織学的異変が認められたため、アストロサイトと PVM の組織学的異変を同時に観察する方法を検討した。そこで、血管や神経の傷害によってアストロサイトで発現が亢進するグリア線維性酸性タンパク質 (GFAP: Glial fibrillary acidic protein) の免疫組織化学法と PAS-Hematoxylin 染色法の複合染

色法 (PAS-GFAP 重染色法) を確立した。

CB-NP 及び TiO₂-NP 曝露群ならびに対照群のいずれの群においても、白質領域のアストロサイトが強い GFAP 陽性を示した (Fig. 2-17A, C, E)。一方で、灰白質領域、とくに大脳皮質では、対照群において GFAP 陽性アストロサイトがほとんど認められなかった (Fig. 2-17B) が、CB-NP 及び TiO₂-NP 曝露群において血管周囲に多数の GFAP 陽性アストロサイトが認められた (Fig. 2-17D, F)。以上のことから、CB-NP 及び TiO₂-NP の胎児期曝露によって、出生児の大脳皮質におけるアストロサイト GFAP の発現量が亢進することが示された。さらに、GFAP 陽性のアストロサイトをより詳細に観察した結果、GFAP 陽性のアストロサイトは、小さな消化顆粒 (直径 1 μm) を保有する PVM が存在する血管周辺には認められず (Fig. 2-18A)、ナノ粒子の胎児期曝露によって肥大化した消化顆粒 (直径 2-3μm) を保有する PVM が存在する血管周辺に認められた (Fig. 2-18B, C)。顕著な例として、同一の血管上に小さな消化顆粒を保有する PVM と肥大化した消化顆粒を保有する PVM が存在する場合、GFAP 陽性のアストロサイト末端足は肥大化した消化顆粒を保有する PVM の周辺のみを観察された (Fig. 2-18E, G, H)。これに対して、その近くに存在する小さな消化顆粒を保有する PVM 周辺には GFAP 陽性のアストロサイト末端足は認められなかった (Fig. 2-18F, I)。以上のことから、CB-NP の胎児期曝露によって組織学的異変の生じた PVM の周辺に存在するアストロサイトにおいて、GFAP の発現亢進は顕著に誘導されることが明らかになった。

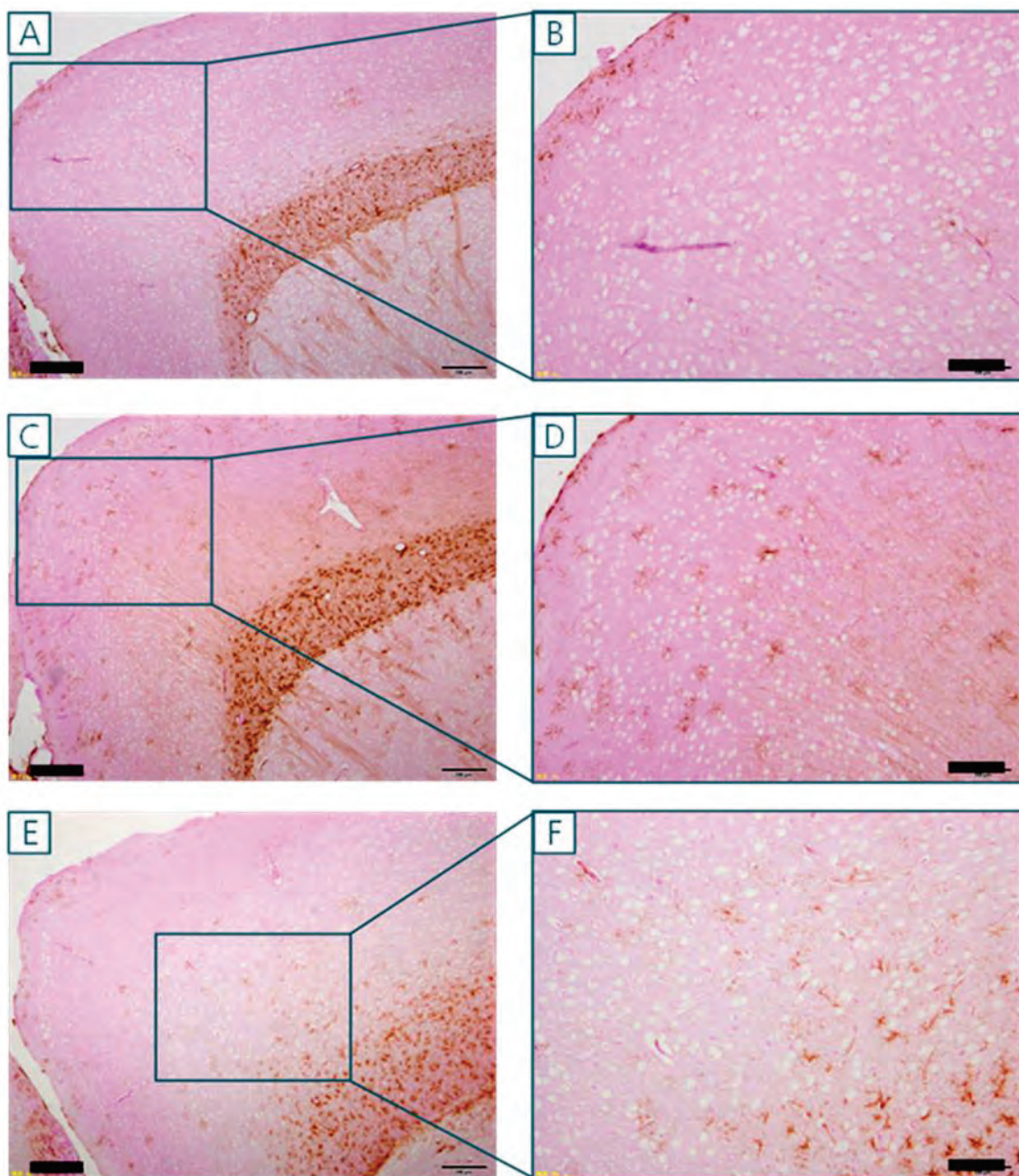


Fig. 2-17 PAS-GFAP 重染色を施した大脳皮質の広域顕微鏡像

A, B: 対照群。C, D: カーボンブラックナノ粒子曝露群。E, F: 二酸化チタンナノ粒子曝露群。
茶色に染色されているものがアストロサイトの GFAP を表している。スケールバーは、A, C, E が 200 μm で B, D, F が 100 μm である。

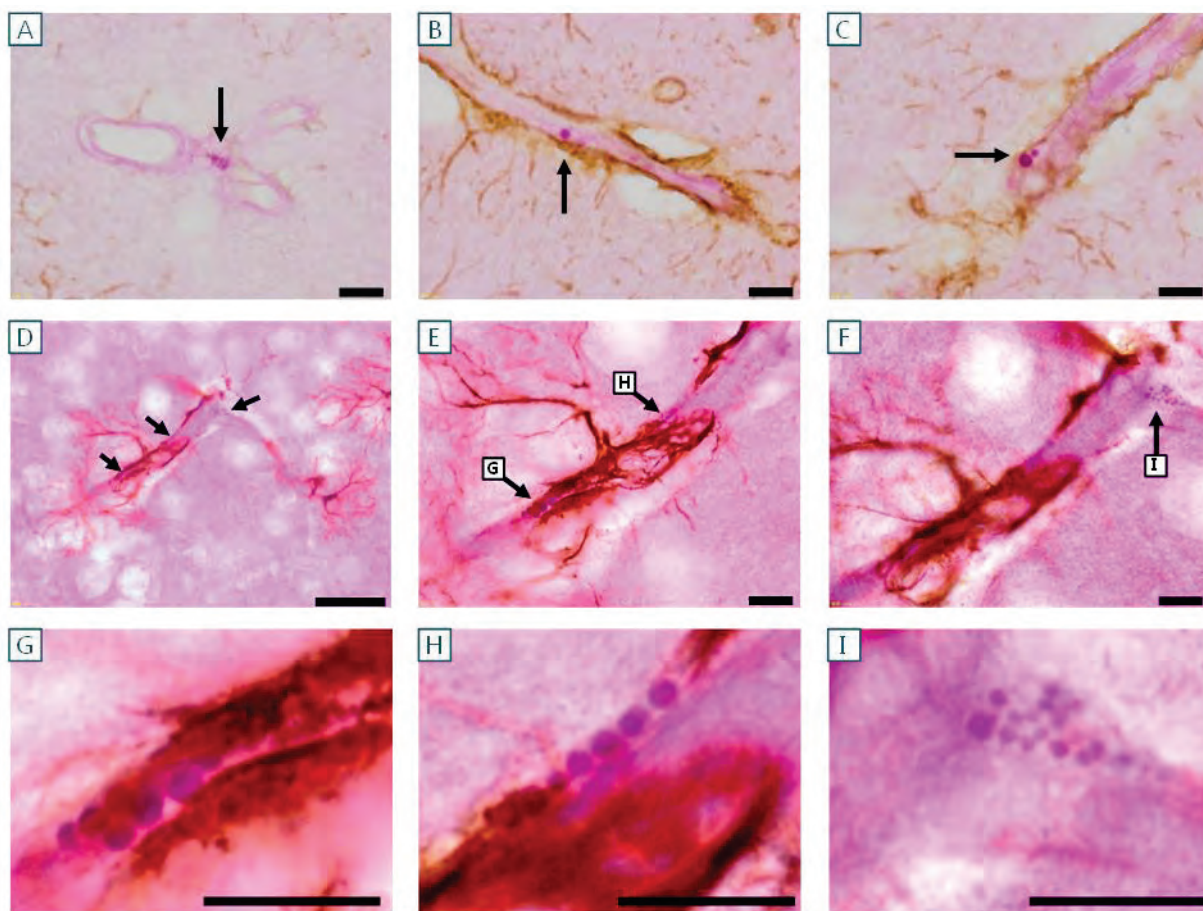


Fig. 2-18 PAS-GFAP 重染色を施した大脳皮質の高倍率顕微鏡像

A: 対照群。B-I: カーボンブラックナノ粒子曝露群。茶色に染色されているものがアストロサイトの GFAP を表している。肥大化した消化顆粒を保有する脳血管周囲マクロファージの周囲においてとくに顕著なアストロサイト GFAP の発現が確認される。スケールバーはすべて 10 μm である。

2.3.11. 大脳皮質に発現する GFAP の用量依存性の評価

PAS-GFAP 重染色法の解析により、CB-NP の胎児期曝露が出生児の大脳皮質において、アストロサイト GFAP の発現亢進を引き起こすことが示されたため、その GFAP の定量的な解析を行い、用量依存性を検証した。

曝露量の異なる 4 群の出生児の大脳皮質からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロットティング法を用いて解析を進め、CB-NP の胎児期曝露を要因とした一元配置分散を行った。その結果、GFAP の発現量において CB-NP の胎児期曝露による主効果が認められた [F(3, 16) = 17.46, P < 0.001] (Fig. 2-19)。その後、Dunnnett の多重比較を行った結果、対照群と

比較して中用量曝露群と高用量曝露群において統計学的有意な増加が認められた (Fig. 2-19A, B)。大脳皮質における GFAP の発現量は、曝露した CB-NP の量に比例して増大していることから、CB-NP の胎児期曝露における GFAP の発現亢進は用量依存的に誘導されることが示唆された。また、大脳皮質における GFAP の発現量は、加齢に伴って亢進することが示されているため (Haley et al., 2010)、無処置の加齢個体を陽性対照として用意した。その陽性対照と比較した結果、CB-NP 高用量曝露群 (6 週齢) の GFAP は、無処置の 24 週齢個体と同等の発現量を示すことが明らかになった (Fig. 2-19A, B)。

さらに、この用量依存的な変化を組織学的解析でも確認できるか検証するために、同一の 4 群を用いて PAS-GFAP 重染色法により評価した。その結果、対照群の大脳皮質には、GFAP 陽性アストロサイトはほとんど観察されなかったのに対して (Fig. 2-19C, D)、低用量群においては少数の GFAP 陽性アストロサイトが (Fig. 2-19E, F)、中用量群と高用量群においては、多数の GFAP 陽性アストロサイトが脳血管の周辺に確認された (Fig. 2-19G-J 中用量群; K-M: 高用量群)。とくに、(2.3.10.) で示した組織学的解析の結果と同様に、肥大化顆粒を保有する PVM 周辺における GFAP の発現亢進が顕著であった (Fig. 2-19J, G arrows)。高用量群においては、PAS 陽性 PVM 数が少なく、GFAP が極めて高く発現している脳血管周辺に PAS 陽性顆粒の存在自体が認められなかった (Fig. 2-19M)。これらの結果は、CB-NP の胎児期曝露は出生児の大脳皮質におけるアストロサイトの GFAP を、用量依存的に増加させることを示している。

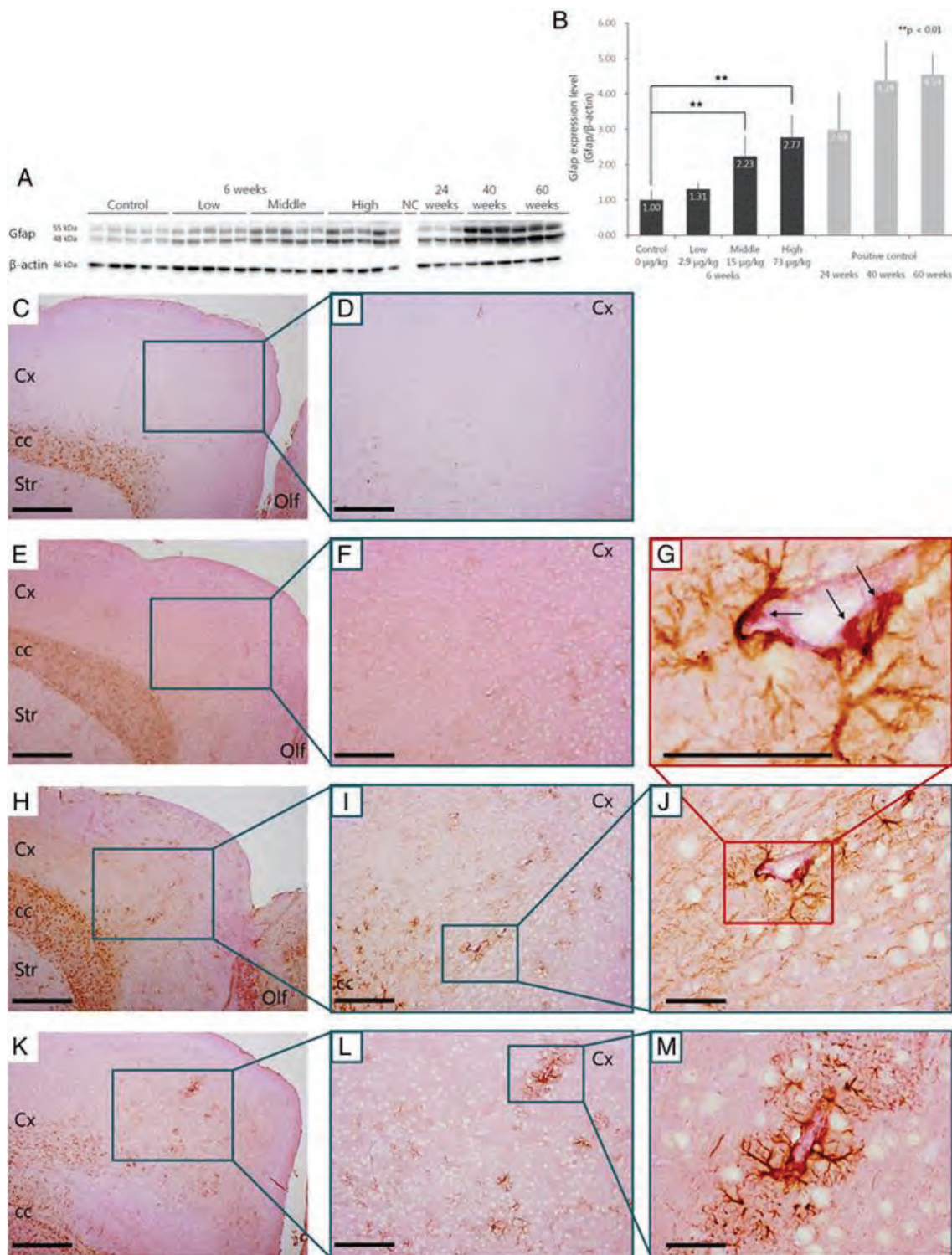


Fig. 2-19 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因する大脳皮質 GFAP 発現亢進の用量依存性の検討

A: ウェスタンブロッティングのバンド。B: A のバンドを定量化し、グラフ化したもの。陽

性対照として加齢個体を使用した。C, D: 超純水群。E, F: 低用量曝露群。G-J: 中用量曝露群。K-M: 高用量曝露群。タンパク質発現レベル、組織学的レベルの両方で GFAP の用量依存的な発現亢進を確認。とくに中用量群以上において、GFAP の発現亢進は肥大化した消化顆粒を保有する脳血管周囲マクロファージの周囲において顕著であった (G)。スケールバーは C, E, H, K で 200 μm 、D, F, I, L で 100 μm 、G, J, M で 20 μm である。

2.3.12. 大脳皮質における Aqp4 の発現変動

大脳皮質に存在するアストロサイトの末端足の血管に接合している部分では、Aqp4 と呼ばれる水チャンネルの高い発現が認められる (Yamamoto et al., 2001; Venero et al., 2001)。アストロサイトは、Aqp4 を介して血管-脳実質間における水分子の輸送を担っているため (Yamamoto et al., 2001; Venero et al., 2001)、電子顕微鏡観察によってアストロサイト末端足の膨潤化が認められたことから、水チャンネルの一種である Aqp4 の亢進が予想された。

GFAP と同様に、ウエスタンブロッティング法を用いることで大脳皮質領域における Aqp4 の発現量を定量評価した。CB-NP の胎児期曝露を要因とした一元配置分散分析を行った結果、Aqp4 の発現量において、CB-NP の胎児期曝露による主効果が認められた [F(3, 16) = 6.95, $P < 0.01$] (Fig. 2-20A, B)。その後、Dunnett の多重比較を行った結果、対照群と比較して、高用量曝露群においてのみ、統計学的有意な増加が認められた (Fig. 2-20A, B)。大脳皮質における Aqp4 の発現量は、曝露した CB-NP の量に比例して増加している傾向にあり、CB-NP の胎児期曝露は用量依存的な Aqp4 の発現亢進を誘導すると考えられる。また、大脳皮質における Aqp4 の発現量は、加齢に伴って亢進することが示されているため (Haley et al., 2010)、無処置の加齢個体を陽性対照として用意した。その陽性対照と比較した結果、CB-NP 高用量曝露群 (6 週齢) の Aqp4 は、無処置の 60 週齢個体と同等の発現量を示すことが明らかになった (Fig. 2-20A, B)。

ウエスタンブロッティング法を用いた定量的解析により、大脳皮質における Aqp4 の発現が、胎児期に曝露された CB-NP の用量依存的に亢進することが明らかになったことを受け、組織学的解析を行って Aqp4 の発現分布とその局在について評価した。とくに GFAP と Aqp4 の発現している分布の関連性を評価するため、GFAP と Aqp4 の二重免疫蛍光法で染色し、さらに蛍光強度をラインプロファイルで測定することで、血管周辺における Aqp4 の発現パターンを取得した。対照群の大脳皮質における Aqp4 の発現は、脳血管の近傍であるグリア限界膜周辺 (glia limitans region) に局在しており、血管から離れた脳実質

組織周辺 (parenchyma region > 5 μm from vessels) での発現は極めて低い (Fig. 2-20 J, K)。対照的に、高用量曝露群の脳皮質における Aqp4 の発現パターンを評価すると、グリア限界膜周辺のみならず、血管から離れた脳実質組織周辺においても Aqp4 の発現が高いことがわかる (Fig. 2-20J)。その血管から離れた脳実質組織周辺における Aqp4 発現強度を定量化し、対照群と比較すると、高用量曝露群の発現強度の方が統計学的有意 ($p < 0.05$) に高いことが示された (Fig. 2-20K)。とくに、対照群と比較して高用量曝露群における Aqp4 の発現パターンが変動していたアストロサイトでは、脳血管に隣接したアストロサイト末端足での GFAP の発現亢進が認められた (Fig. 2-20D, G)。したがって、CB-NP 胎児期曝露群における Aqp4 の発現亢進は、GFAP を高発現しているアストロサイトの中で顕著に生じていることが示された (Fig. 2-20H)。さらに、その Aqp4 のアストロサイト内における発現分布は、脳血管に極めて近いグリア限界膜側の末端足ではなく、血管から離れた脳実質組織側の末端足で発現亢進していることが明らかになった。

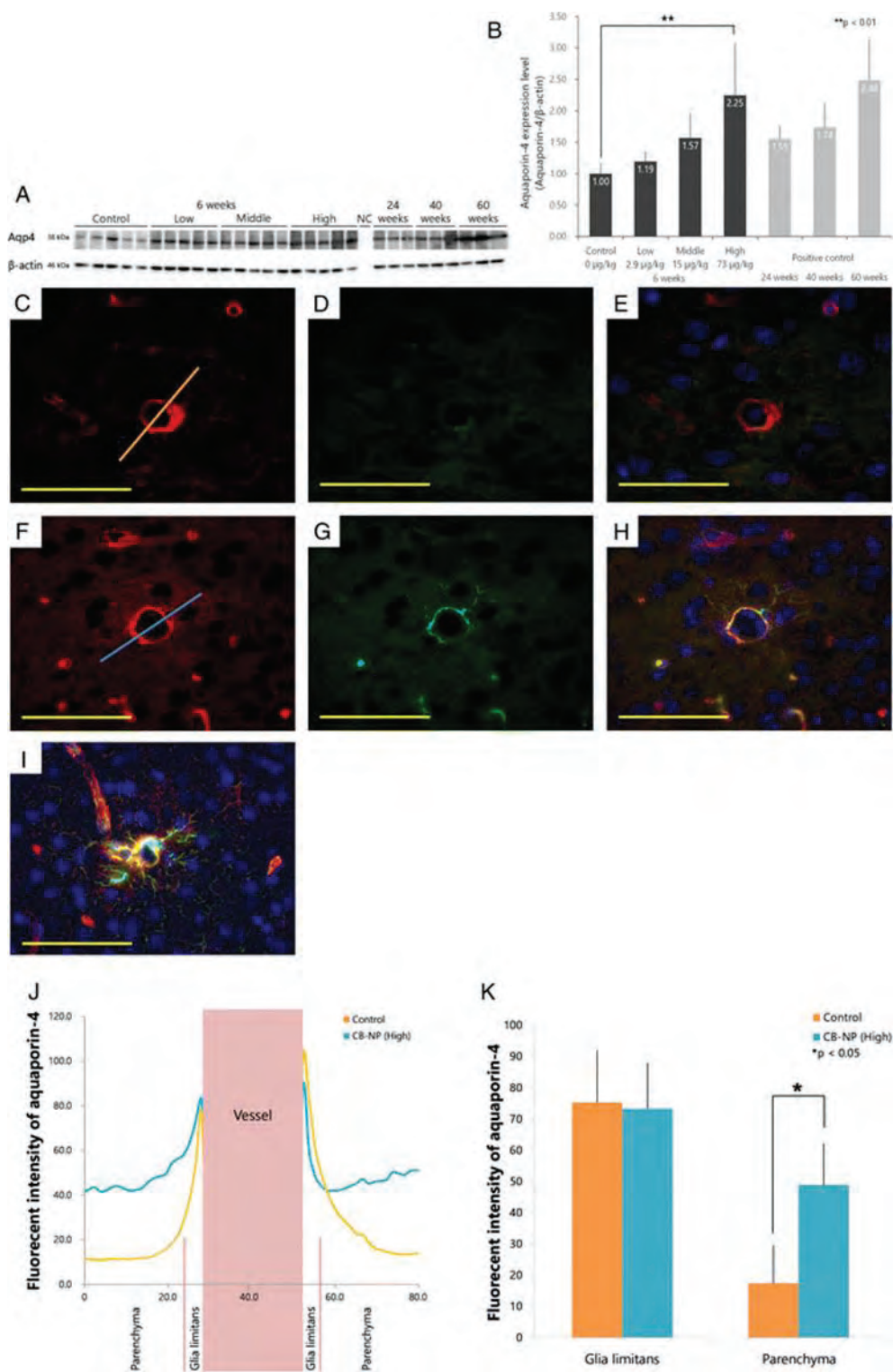


Fig. 2-20 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因する大脳皮質 Aqp4 発現亢進の用量依存性の検討

A: ウエスタンブロットティングのバンド。B: A のバンドを定量化し、グラフ化したもの。陽

性対照として加齢個体を使用した。C-E: 超純水群。F-H: 高用量曝露群。I: 老齢個体。J, K: C, Fのラインプロファイルをグラフ化したもの。C, F: Aqp4。D, G: GFAP。E, H, I: 核染色、Aqp4、GFAPのマージ像。Aqp4の用量依存的な発現亢進を確認した他、その発現亢進は、とくに脳実質領域において統計学的有意に引き起こされていた (K)。スケールバーはすべて50 μm である。

2.3.13. マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析と定量的遺伝子機能解析

ここまでで、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の脳血管周辺において用量依存的な組織学的異変を引き起こすことを示してきたが、その異変の生物学的意義を追究し、脳実質組織で生じている変化を網羅的かつ機能的に捉えるために、マイクロアレイ法を用いた網羅的遺伝子発現解析と、それによって変動の認められた遺伝子について機能的解析を行った。

CB-NPの胎児期曝露による組織学的異変の度合いが最も大きく、アストロサイトのGFAPとAqp4が用量依存的に発現亢進していた大脳皮質に注目し、大脳皮質から抽出したmRNAの発現レベルを網羅的に評価した。マイクロアレイで測定することのできるマウスのmRNA、28950 (62972 spots) の内、22908種のmRNA (30700 spots) が遺伝子発現解析に使用可能な信頼の高い結果を示した。その22908種のmRNAを遺伝子発現解析の対象とし、① 対照群と比較して、高用量曝露群において2倍以上または0.5倍以下の発現変動、および② 対照群、低用量曝露群、中用量曝露群、高用量曝露群の発現レベル間に、0.7以上または-0.7以下の相関係数、この①と②の両方の条件を満たすmRNAを抽出した (Fig. 2-21)。その結果、268のmRNA (278 spots) がCB-NPの胎児期曝露によって用量依存的に発現変動を示すことが明らかになった。

これら268のmRNAに対して、Gene Ontologyを用いた遺伝子機能解析を行った結果、主として、血管に関連する機能を持った遺伝子群 (angiogenesis, blood vessel patterning, positive regulation of endothelial cell proliferation, vasculogenesis, blood vessel development, and ventricular septum development)、細胞増殖や成長因子に関連する機能を持った遺伝子群 (positive regulation of cell migration, positive regulation of mesenchymal cell proliferation, growth factor binding, and positive regulation of endothelial cell proliferation)、そして、細胞遊走 (chemotaxis/positive regulation of cell migration) に関連する機能を持った遺伝子群が抽出された (Table 2-10)。抽出された遺伝子群は、CB-NPの胎児期曝露によって用量依存的に発

現の変動する遺伝子であり、CB-NP の胎児期曝露が引き起こす脳血管周辺の組織学的異変に関わっている可能性が考えられる。

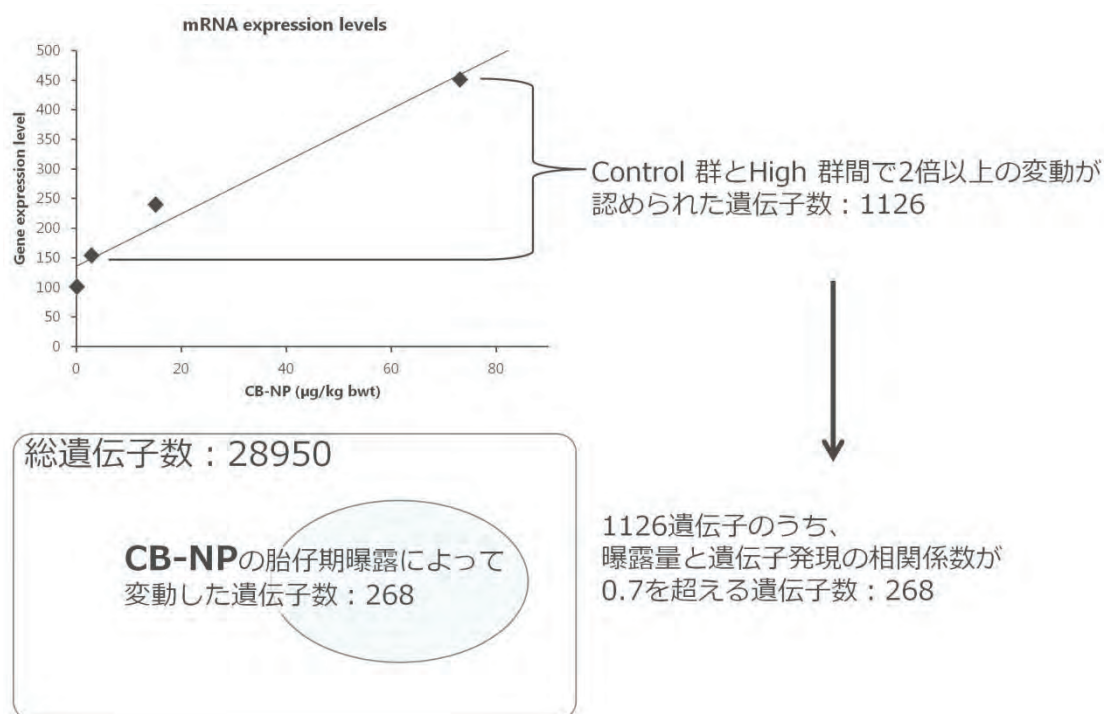


Fig. 2-21 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により変動した遺伝子の抽出条件

さらに、出生児の脳皮質における遺伝子発現変動に加えて、胎児の発育に重要な胎盤における遺伝子発現についても評価した。マイクロアレイで測定することのできるマウスの mRNA、28950 (62972 spots) の内、18269 種の mRNA (31781 spots) が遺伝子発現解析に使用可能な信頼の高い結果を示した。その 22908 種の mRNA を遺伝子発現解析の対象とし、① 対照群と比較して、高用量曝露群において 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動、および ② 対照群、低用量曝露群、中用量曝露群、高用量曝露群の発現レベル間に、0.7 以上または -0.7 以下の相関係数、この①と②の両方の条件を満たす mRNA を抽出した。その結果、19 の mRNA (26 spots) が CB-NP の胎児期曝露によって用量依存的に発現変動を示すことが明らかになった。この 19 種の遺伝子に対して、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析を行った結果、統計学的有意に濃縮された遺伝子用語は確認されなかった。この結果は、CB-NP の胎児期曝露が胎盤の遺伝子発現に大きな影響を及ぼさないことを示している。

Table 2-10. カーボンブラックナノ粒子曝露によって用量依存的に発現の亢進した大脳皮質の遺伝子群

Gene ontology	Enrichment factor	P-value	Gene symbol up-regulation	Gene symbol down-regulation
Angiogenesis	3.66	<0.001	<i>Flt1, Kdr, Nos3, Ptprb, Robo4, Sox17, Tbx1, Tgfa, Tie1</i>	
Positive regulation of mesenchymal cell proliferation	10.11	<0.001	<i>Foxf1, Foxp2, Kdr, Tbx1</i>	
positive regulation of epithelial cell proliferation	6.64	<0.001	<i>ErbB2, Foxp2, Kdr, Tbx1, Tgfa</i>	
Growth factor binding	9.5	<0.001	<i>Cyr61, ErbB2, Flt1, Kdr</i>	
Patterning of blood vessels	8.47	0.001	<i>Cxcl12, Flt1, Lef1, Tbx1</i>	
Ventricular septum development	14.7	0.001	<i>Cyr61, Luzp1, Stra6</i>	
Chemotaxis	4.56	0.005	<i>Ccr3, Cmtm2b, Cxcl12, Cyr61, Flt1</i>	
Positive regulation of endothelial cell proliferation	5.7	0.005	<i>Ccr3, Cxcl12, Kdr, Rptor</i>	
Vasculogenesis	5.7	0.005	<i>Foxf1, Kdr, Sox17, Tie1</i>	
Blood vessel development	5.41	0.006	<i>Foxf1, Stra6, Tbx1, Tie1</i>	
Positive regulation of cell-substrate adhesion	7.13	0.008	<i>Cyr61, Foxf1, Nid1</i>	
Positive regulation of cell migration	3.36	0.009	<i>Cxcl12, Cyr61, Kdr, Lef1, Flt1, Foxf1</i>	

2.3.12. 定量的 RT-PCR を用いた大脳皮質における遺伝子発現解析

マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析の妥当性を評価するために、定量的 RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行った。解析対象として、遺伝子機能解析を行った際に、より多くの遺伝子用語 (Gene ontology) に含まれていた9つの遺伝子 (*Flt1, Kdr, Nos3,*

Sox17, Tbx1, Tgfa, Tie1, Cyr61, and Cxcl12) を選択した。解析の結果、高用量曝露群の脳皮質における Sox17, Tgfa, Flt1, Cyr61 の4つの遺伝子発現レベルは、対照群と比較して統計学的有意に増加することが示された (Sox17, Tgfa, and Cyr61: $p < 0.05$ vs. control; Flt1: $p < 0.01$ vs. control)。さらに、これらの4つの遺伝子の発現は、CB-NPの曝露量と相関性を示し、用量依存的に亢進していることが示唆された。また、Nos3, Tbx1, Kdr、3つの遺伝子は、各群間で統計学的有意差は認められないものの、CB-NPの用量依存的に発現変動を示す傾向であった (Fig. 2-22)。

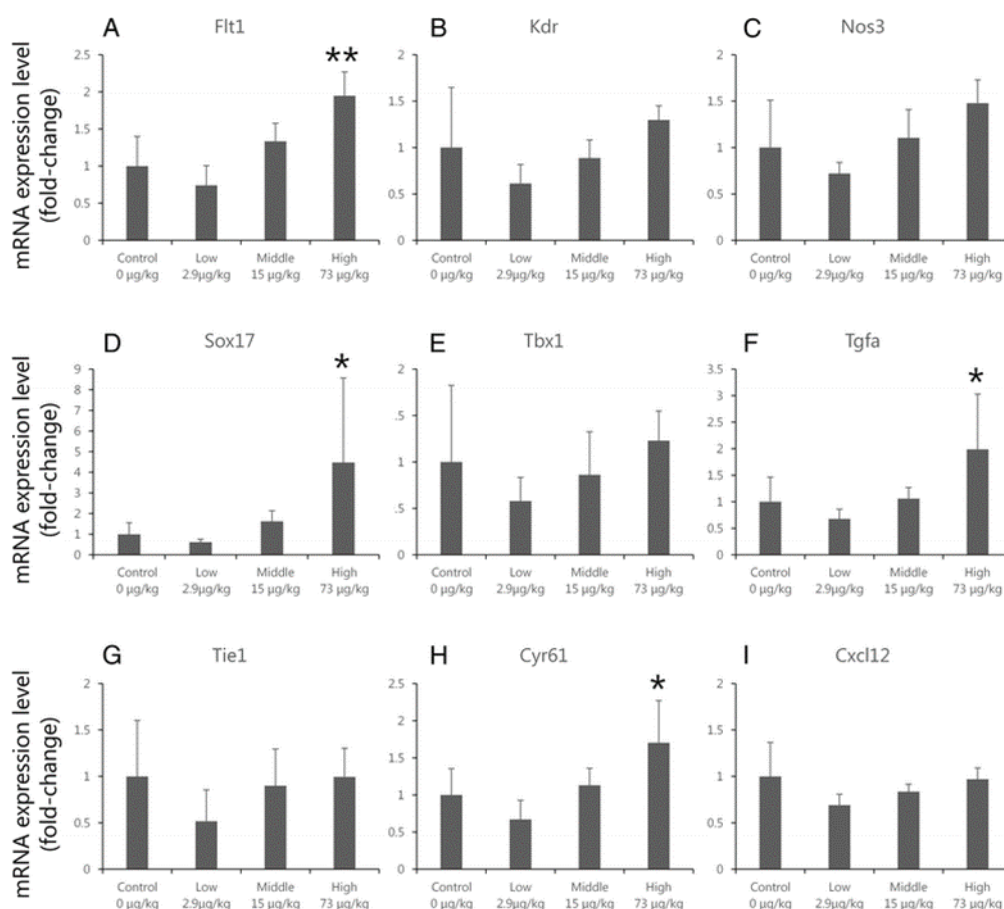


Fig. 2-22 定量的 RT-PCR を用いた脳皮質における遺伝子発現解析

網羅的遺伝子発現解析ならびに遺伝子機能解析によりとくに高頻度で抽出された9つの遺伝子について定量的な発現変動解析を行った。

2.4. 考察

2.4.1. ナノ粒子の胎児期曝露により鋭敏かつ用量依存的に変動する指標

本研究の主たる目的はナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏かつ用量依存的に応答する、中枢神経系の領域や細胞を同定することであった。この目的を達成するために、本研究では、実社会で想定しうる低用量で、かつ段階的な濃度を持つ CB-NP 分散液を準備して解析を行った。その結果、胎盤に顕著な変化を引き起こさない程度の CB-NP の妊娠期経気道曝露が、出生児の脳血管周辺において、顆粒状の構造体を持つ細胞に組織学的異変を誘導することを示し、その顆粒状の構造体を持つ細胞が PVM であることを明らかにした。さらに、その異変の認められる PVM の周辺においてのみ、アストロサイトの組織病理学的異変が認められたほか、アストロサイトの発現する GFAP や Aqp4 が、胎児期に曝露したナノ粒子の用量依存的に発現亢進することが示された。この結果は、ナノ粒子の胎児期曝露が、出生児の特定の脳血管周辺において持続的なアストロサイトの活性化、すなわちアストログリオーシスを誘導することを示唆している。したがって、PVM とその周辺に存在するアストロサイトが、ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏に応答し、用量依存的な発現変動を示すアストロサイトの GFAP と Aqp4 は、ナノ粒子の発達神経毒性を評価するための、鋭敏で定量的な指標になることが示唆された。

用量依存性を捉えることは、毒物学や衛生学において定量的な安全性評価指標の確立やデータの妥当性を検討する上で、最も重要な要素の一つである (Powers et al., 2013)。しかし、これまでに、ナノ粒子の胎児期曝露に起因する発達神経毒性について用量依存性を捉えた研究は存在していなかった (Ema et al., 2016a; 2016b; Hougaard et al., 2015)。アメリカ合衆国環境保護庁 (US EPA) は、ナノ粒子のリスク評価に向けて、用量依存的に変動する評価指標を見出すことが優先して取り組む課題であると主張している (Powers et al., 2013)。つまり本研究成果は、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捉え、報告した初めての知見であり、これまで不足していたナノ粒子の発達神経毒性のデータを提供した価値の高いものである。

2.4.2. 点鼻投与によるナノ粒子の肺内移行

大気環境および労働環境下におけるナノ粒子の主要な曝露経路は、気道を経た呼吸器への曝露である。経気道曝露法には、主として点鼻投与法、期間内投与法、吸入曝露法

の3種類が存在するが、その中でも、被験動物に対する負担が最も小さく、妊娠母体への曝露に適した点鼻投与法を選択した。点鼻投与法は、喘息モデル動物を作製する際に、抗原を呼吸器へ輸送する目的で使用される (Fedulov et al., 2008)。しかし、実験者の技量によっては、投与物質が呼吸器に移行せず、口腔内や胃へと誤って移行してしまう可能性がある。そこで、本研究では、希土類ドーブセラミックスナノ粒子と近赤外光を活用してナノ粒子の点鼻投与による肺への移行性を確認した。検出された蛍光画像について解析した結果、点鼻投与の80分後には肺の全体にナノ粒子が移行していることが明らかになった。この結果から、本研究で用いた点鼻投与法は、ナノ粒子を呼吸器へと曝露する経気道曝露法として適していることが示された。さらに、肺に移行したナノ粒子の多くは24時間以内に肺から除去される可能性が示唆された。肺に移行したナノ粒子の一部は、繊毛の作用や肺胞マクロファージ等の貪食により排出され、残りは肺胞上皮細胞のトランスサイトーシスによって血液空気関門を透過し、血液中に移行することが明らかになっているため (Oberdörster et al., 2005)、投与80分から24時間の間でナノ粒子は、血流を介して他の器官に移行したと考えられる。器官全体を観察する本検出方法では、肺以外への器官でナノ粒子の蛍光が認められなかったため、ナノ粒子の他の器官への移行性とその分布を評価するためには、薄切切片を作製したうえで、顕微鏡観察を行う必要があると想定される。

2.4.3. 実社会における曝露量

ナノ粒子の生体応答の解明やリスク評価を目的とした研究について議論する際、最も重要な要素の一つが、実験で使用したナノ粒子の曝露量と実社会において曝露される量との相関性である。PM_{2.5}の環境基準値は、WHOが勧告している Air Quality Guidelines を元に、各国で設定され、米国および日本においては年平均値が15 µg/m³以下かつ日平均値が35 µg/m³以下と定められている (WHO, 2005)。しかしながら、大気環境中に浮遊するナノ粒子について環境基準値はまだ設定されていない。そこで、実社会において、最もCB-NPの曝露が想定される、CB-NPを製造または使用する労働環境下の基準値から試算し、比較した。CB-NPを用いる環境下で、労働者が吸入する空気中のCB-NP濃度は最大で14 mg/m³と見積もられている (Zhang et al., 2014)。その空気を吸入した際に肺に沈着するCB-NPは、全体の35%であると、粒径分布に基づいて試算されている (Jackson et al., 2012)。さらに、体重50kgの女性が1日当たりに吸入する空気の総量は約15 m³であり、その女性がCB-NPを使用する労働環境下で、1日当たり8時間の吸入をしたと仮定すると、その8時間で約

24 mg のCB-NP が肺に沈着すると予想される ($24 \text{ mg/day} = 14 \text{ mg/m}^3 \times 15 \text{ m}^3 \times 8/24 \text{ hr} \times 0.35$)。このCB-NPの呼吸器への沈着量を体重1 kgあたりに換算すると、 $480 \text{ }\mu\text{g/kg/day}$ となる。本研究で使用したCB-NP分散液の曝露量は、95、73、15、 $2.9 \text{ }\mu\text{g/kg/day}$ の4種類であるため、本研究で使用したCB-NPの曝露量は、実社会でのヒトへの曝露が十分に予想される量である。

さらに、本研究で用いたこの曝露量は、CB-NPの経気道曝露による毒性について報告してきたどの先行研究よりも低い値である (Jackson et al., 2012)。ナノ粒子の毒性評価を検証した先行研究の多くは、現実に曝露される量よりも高い曝露量を使用して、その生体応答を検出、評価している。そのため、実際の曝露量を想定して検証を行った本研究成果は、既存の多くの研究と一線を画す価値の高い研究成果であるといえる。したがって、本研究で認められた所見、とくに、胎盤の遺伝子群が顕著な発現変動を示さない曝露量で生じたPVMやアストロサイトの組織病理学的異変は、実社会でも引き起こされる可能性が十分にあり、そして、ナノ粒子の発達神経毒性の鋭敏なハザード評価指標の候補になると考えられる。

一方で、実社会における持続的な吸入曝露と異なり、短時間で曝露が完了する点鼻投与方法では、単位時間当たりの曝露量が大きくなる。そのため、本研究で認められた成果が、吸入曝露法による生体影響評価でも同様の所見が認められるか検証することが、ナノ粒子の包括的なリスク評価の実現や環境基準値の制定等、実社会への応用に向けて重要な課題といえる。なお、この課題については、本論文第4章にて検証した。

2.4.4. ナノ粒子の胎児期曝露に起因するPVMの組織学的異変とその毒性学的意義

本研究から得られた知見の中でも重要なものの一つが、CB-NPの胎児期曝露に対してPVMが鋭敏に応答したことである。CB-NPの胎児期曝露により生じるPVMの組織病理学的異変の生物学的意義、毒性学的意義について言及することは、本研究成果の価値を理解するために重要である。ここでは、本研究成果の正しく解釈するための基盤となる情報とともに、その意義について概説する。

<PVMのもつ機能とその機能不全から予測される影響>

中枢神経系には、ミクログリア、髄膜マクロファージ、脈絡叢マクロファージ、そしてPVMの4種類の常在型マクロファージが存在し、いずれも中枢神経系の恒常性維持

に必要不可欠な細胞である (Galea et al., 2005; Kim et al., 2006)。PVM は血管周囲ミクログリア、蛍光顆粒血管周皮細胞、スカベンジャー細胞とも呼ばれ、その存在が明らかにされて以来、機能や構造の解明を目的とした研究調査が盛んに行われている (Williams et al., 2001)。

PVM は、脳微小血管の血管基底膜とグリア限界膜に囲まれた境界空間である脳血管周囲隙 (Perivascular space; Virchow-Robin 腔とも呼ばれる) に局在している (Peters et al. 1976, Graeber et al. 1992)。この空間内で、PVM は血管内皮細胞や血管周皮細胞と隣接し、グリア細胞の一つであるアストロサイトの末端突起とともに脳血管を包み込む形態をとっている (Lassmann et al. 1991, 1993; Graeber et al. 1992; Streit and Graeber 1993) (Fig.2-23)。

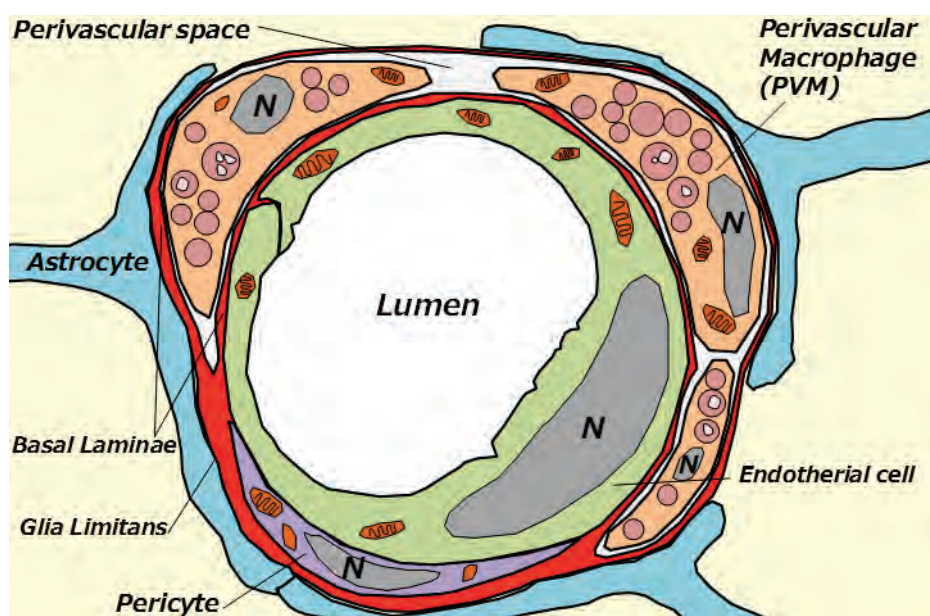


Fig. 2-23 脳血管周囲マクロファージおよびアストロサイト末端足を含む脳血管周辺の断面図

脳血管周囲隙には、大脳皮質や中心灰白質由来の脳脊髄液が流入するため、この空間は、 β -amyloid に代表される脳実質中の老廃物や不要物の主要な排出経路となっている (Iliff et al., 2012; Cserr et al., 1974; Weller et al., 1992; Zhang et al., 1992)。PVM は、この空間内に流入、集積した老廃物等の貪食を行うことで、脳血管周囲隙内を清浄に保つ役割を担っている (Williams et al., 2001)。一方で、脳実質由来の物質に加えて、血管側から侵入した HIV ウィルス等の病原体を貪食することで、これらの脳実質への侵入を防ぐことも報告されている (Holder et al., 2014)。事実、PVM 細胞膜表面にはカベンジャー受容体 (CD163, CD204) や

マンノース受容体 (CD206) といった、非特異的な貪食に不可欠な受容体が、常に高発現している (Fabrick et al., 2005; Galea et al., 2005; Guillemin et al., 2004)。このような貪食能と特徴的な局在から、PVM は血液脳関門機能の一部を担っていると考えられている。

貪食による自然免疫応答の他に、PVM は、主要組織適合因子クラス II (MHC II)、Fc 受容体、CD40、B7 などの免疫細胞特有の細胞膜表面分子の発現も確認されている (Williams et al., 2001; Guillemin et al., 2004)。脳組織において、これら免疫学的バイオマーカーの発現と盛んな貪食能の両方が恒常的に認められる細胞は、PVM のみである (Williams et al., 2001; Kida et al., 1993)。とりわけ特徴的な機能として、中枢神経系-免疫系相互応答の制御が存在する。PVM は IL-1 に代表される血行性サイトカインを認識し、プロスタノイド (とくにプロスタグランジン E2) を産生し、脳実質の神経細胞を刺激する (Serrats et al. 2010)。つまり、PVM は血中の分子を認識し、周辺に存在する脳実質内の細胞にシグナルを伝えることにより、生体内の状況を中枢神経系へ伝達する橋渡しとしての役割を担っている。

以上の知見をまとめると、PVM は脳血管周囲に局在し、主に ① 脳実質組織から排出される老廃物や不要物の除去、② 血液脳関門機能の一つとして、血中から脳実質組織へと侵入する病原物質の排除、③ 中枢神経系-免疫系相互応答の制御 の3つの重要な役割を担っていることがわかる。本研究で認められた、CB-NP や TiO₂-NP の妊娠期経気道曝露に起因する PVM の組織病理学的異変は、これら3つの機能に対して影響を及ぼし、脳実質における老廃物の適切な除去や病原物質の排除を妨げ、さらに、中枢神経系と免疫系に対するシグナル伝達の不全などを引き起こす可能性を示唆している。

<PVM の粒子に対する鋭敏な応答>

興味深いことに、病原体等の異物と比べて、PVM は粒子状の物質に対して特異な応答を示すことが明らかになっている。生理条件下の PVM 細胞回転率を評価した研究によると、ラットにおいて約 30% の PVM が 3 カ月で置き換わっていることが示された (Hickey et al. 1992, Williams et al., 2001)。これは、全ての PVM が新しい PVM に置き換わるのに、少なくとも 10 ケ月を要することを示している。一方で、実験的アレルギー性脳脊髄炎誘発ラットのような病理条件下では、置き換わる速度が一過性に増大し、中枢神経系の血管周辺に PVM が集積することが明らかになっている (Lassmann et al. 1993)。

一方で、ラット脳室内にカーボンブラック微小粒子を投与した先行研究によると、

PVM 細胞数の局所的な増大やその局在の変化等は確認されなかった。しかしながら、その粒子自体は、1 週間以内に脳血管周囲隙に排出され、PVM に貪食されることが確認され、PVM は粒子に応答していることが示された (Kida et al. 1993)。さらに、その投与から2年後のラットにおいても、PVM 内および脳血管周囲隙に多数のカーボンブラック微小粒子の残留が観察された (Kida et al. 1993)。粒子の曝露に伴う PVM 細胞数の増大は確認されていないため、生理条件下時と同じ速度で新しい PVM に置き換わっていると考えられる。それにもかかわらず、脳血管周囲隙や PVM 内に粒子の残留が認められたことは、粒子状物質を十分に分解、排出する機能が PVM に備わっていないこと、粒子を取り込んだ PVM や残留した粒子がその周辺の細胞や PVM そのものに対して長期的な細胞応答を誘発する可能性を示唆している。実際に、本研究でも、脳血管周辺に存在する PVM は、CB-NP と TiO₂-NP の胎児期曝露に起因する消化顆粒の肥大化と蜂の巣状構造化といった組織病理学的異変が、出生後 6 週また 12 週経過後に確認された。とくに PVM 消化顆粒の蜂の巣状構造化は、ディーゼル排ガス粒子を妊娠期間中に曝露し、脳血管周辺の超微小形態観察を行った研究でも確認されている (Sugamata et al., 2006)。したがって、PVM の持つ性質と先行研究の報告、ならびに本研究の結果から、PVM は粒子状の物質に対して鋭敏にかつ持続的に応答する細胞であると考えられる。つまり、PVM は、ナノ粒子の胎児期曝露による発達神経毒性等、そのハザード評価を行ううえで有益な指標になることが期待される。

<PVM に組織学的異変が生じた要因として想定されるもの>

本研究で行った多数の組織学的解析により、CB-NP と TiO₂-NP の妊娠期経気道曝露は、出生児の PVM に対して組織病理学的異変 (消化顆粒の肥大化と蜂の巣状構造化) を誘導し、さらに脳の幅広い範囲における PAS 陽性 PVM 細胞数を減少させることが明らかになった。

中枢神経系に老廃物 (とくにグングリオシド) が異常蓄積するテイサックス病とサンドホフ病と呼ばれる疾患が存在する (Patterson, 2013; Mahuran, 1991)。テイサックス病の場合、ヘキササミニダーゼ A (Hex A) 遺伝子が欠損しているために分解酵素である Hex A の合成ができず、サンドホフ病の場合、ヘキササミニダーゼ B (Hex B) 遺伝子が欠損しているために Hex A と Hex B の両方の分解酵素を合成できない疾患である (Patterson, 2013; Mahuran, 1991)。テイサックス病を模倣した Hex A ノックアウトマウスを用いた研究では、肥大化した PAS 陽性消化顆粒を持つ PVM が多数確認された (Mato et al., 2002)。他方のサ

ンドホフ病を模倣した Hex B ノックアウトマウスでは、PAS 陽性消化顆粒を持つ PVM が完全に消失していた (Mato et al., 2002)。さらに、電子顕微鏡を用いた超微小形態の観察の結果、いずれのノックアウトマウスの PVM 内に老廃物の蓄積が認められ、とくに、Hex B ノックアウトマウスの方がその蓄積が顕著であった (Mato et al., 2002)。つまり、これらの研究成果は、PVM 消化顆粒の肥大化や PAS 染色性の消失といった組織病理学的異変は、老廃物の蓄積によって誘導されることを示している。さらに、別の研究によると、加齢によっても PVM 消化顆粒の変性、肥大化が進むことが分かっている (Mato et al., 1996; Nakazawa et al., 2006)。先天的な代謝異常症とは異なり、緩慢な変化ではあるが、これもまた老廃物の取り込みと蓄積が原因であると考えられている (Mato et al., 1996)。

先述した通り、感染や疾患の発症、化学物質等の曝露などによって、脳実質中に生じた代謝産物や細胞の残骸等の老廃物は、脳実質中の老廃物や異物は脳脊髄液の流れに乗って、近傍の脳血管周囲隙に流入することで、脳実質から排出される (Ilf et al., 2012)。そして、PVM は脳血管周囲隙に流入した異物や老廃物を貪食することで、脳血管周囲隙内を清浄に保ち、脳実質から老廃物が適切に排除できる環境を整えている (Williams et al., 2001; Kida et al. 1993)。つまり、本研究において、CB-NP の胎児期曝露によって出生児の脳で PVM 消化顆粒の肥大化と蜂の巣状構造化、PAS 染色性の消失といった組織病理学的異変が生じたのは、脳血管周囲隙や PVM 内における老廃物の蓄積に伴うものである可能性が示唆される。

< PVM の定量的解析とその結果の解釈 >

本研究の目的の一つとして、ナノ粒子の胎児期曝露によって影響の受けやすい脳領域を同定することが挙げられた。PVM は、脳全域の血管周辺に存在していることから、各脳領域における影響の比較解析を行う上で、適した指標となると考えた。そこで、ナノ粒子の胎児期曝露に対して影響を受けやすい脳領域を明らかにすべく、脳の 11 領域それぞれにおける PVM 細胞数を定量的に評価した。その結果、CB-NP の胎児期曝露は、PVM 細胞数そのものは変化せず、正常な PVM 細胞数が脳全域の幅広い範囲において減少していることが明らかになった。これは、CB-NP の胎児期曝露が出生児の中枢神経系に対して、限定的な脳領域に影響を及ぼすのではなく、脳全域に対してびまん的に影響を及ぼしていることを示している。

また、先行研究によると、PVM の単位面積当たりの細胞数は灰白質領域において高

く、白質領域においては少ないことが示唆されている (Galea et al., 2005)。本研究においても、典型的な白質領域である脳梁 (cc) の PVM 細胞数は他の領域と比べて顕著に少なく、代表的な灰白質領域である大脳皮質 (Cx) の PVM 細胞数が多い傾向が示された。このような脳領域ごとの PVM 細胞数は、その領域の血管密度に依存していると考えられる。本研究における対照群の大脳皮質の PVM 細胞数は、脳梁の PVM 細胞数のおよそ 4 倍であり、中枢神経系の血管密度を測定した別の研究によると、大脳皮質の血管密度は脳梁の血管密度の 4 倍と (Cavaglia et al., 2001)、PVM 細胞数と血管密度の比率が同等であった。これらの知見から、本章で行った PVM 細胞数の定量的な解析結果は妥当な数値を示していたと考えられる。

2.4.5. 脳血管周囲のアストロサイトの組織学的異変とその意義

CB-NP、TiO₂-NP の胎児期曝露は、PVM だけでなく、血管周辺に存在するアストロサイトの組織学的異変も誘導することが明らかになった。とくに、そのアストロサイトの GFAP や Aqp4 は、CB-NP の胎児期曝露によって用量依存的な発現変動が誘導され、ナノ粒子の発達神経毒性に関する定量的で鋭敏な指標となりうることを示した。そこで、このアストロサイトに生じた組織学的異変の毒性学的意義、生物学的意義について言及し、深く議論する。なお、本研究が示した、CB-NP の胎児期曝露によるアストロサイト GFAP の発現亢進は、後に別グループが行った研究によっても報告されている (Allen et al., 2015)。

<ナノ粒子の胎児期曝露によるアストログリオーシスの誘導>

本研究で、CB-NP の胎児期曝露により用量依存的な発現亢進が認められた GFAP は、中間径フィラメントタンパク質の一つで、最も頻繁に使用されるアストロサイトの活性化マーカーである (Sofroniew et al., 2010)。白質領域に多く存在する線維型アストロサイトは、GFAP を常に強く発現している一方で、大脳皮質などの灰白質領域に多く存在する原形質型アストロサイトは、局所的な虚血状態や病原物質の感染、炎症応答、組織傷害時に活性化し、GFAP を強く発現するように変化する (Sofroniew et al., 2010; Molofsky et al., 2012)。さらに、その傷害が慢性的に、あるいは反復的に生じると、アストロサイトの持続的な活性化、すなわちアストログリオーシスが誘導され、傷害が修復された後も継続的な GFAP の高発現が認められる (Sofroniew et al., 2010; Klatzo et al., 1976; Tsai et al., 2012)。

とくに脳血管の周辺に存在する原形質型アストロサイトは、その末端足を脳血管に

伸ばすことで、血液脳関門機能の維持やその形成に関与している (Rodríguez et al., 2009)。そのため、アストロサイトは中枢神経系を防御するための重要な防衛ラインとされている (Abbott, 2002; Dringen et al., 2015)。この防衛ラインが破綻したとき、血管の損傷箇所から侵入する異物や病原物質、あるいは細胞が脳実質内で広がることを防ぐために、アストロサイトは末端足を損傷個所に伸ばし、物理的な保護と修復を行うように形態を変化させる (Sofroniew et al., 2010; Tsai et al., 2012)。このように血管周辺に存在するアストロサイトは末端足を伸長させる際に、アストロサイトが活性化し、GFAP の発現量が亢進すると報告されている (Sofroniew et al., 2010; Tsai et al., 2012)。

これらの知見から、アストロサイト GFAP の発現亢進は、アストロサイトの活性化を示すと同時に、その周囲で異変が生じていることを意味する。それゆえに、GFAP はアストロサイトの活性化マーカーとして使用されるのみならず、毒性学的な指標としても用いられる (Moon et al., 2004; Yang and Wang, 2015)。とくに、アストロサイトの持続的な活性化の結果として生じるアストログリオシスは、細胞傷害や炎症応答が静まった後も陳旧的に残り続け、周囲の神経細胞や血管の構築を阻害することが明らかになっているため、過剰なアストログリオシスの誘導は中枢神経系の正常な機能維持に悪影響を与える (Sofroniew et al., 2010; Klatzo et al., 1976; Tsai et al., 2012)。このように、アストロサイト GFAP の発現量や発現分布は、中枢神経系で生じている異変を理解するうえでの重要な指標である。

さらに、アストログリオシスは、GFAP の高発現とともに水チャネルである Aqp4 の発現亢進を伴う (Badaut et al., 2012; Haj-Yasein et al., 2011)。通常、Aqp4 は、脳血管に隣接したアストロサイト末端足において高く発現しており、脳脊髄液流出入の制御、脳実質組織におけるイオン濃度の恒常性維持、さらには、アストロサイト末端足の可塑性を維持するために重要な機能を示す (Yang et al., 2012)。しかしながら、中枢神経系の傷害時には Aqp4 の発現量やその分布が変動し、血液脳関門の機能異常やアストロサイトの異常な活性化を引き起こす (Badaut et al., 2012; Haj-Yasein et al., 2011)。これらの知見は、認められた Aqp4 の発現変動が、アストログリオシスを含むアストロサイトの活性化やその機能異常を誘発することを示唆している。

本研究では、ナノ粒子を胎児期に曝露した後、出生した 6 週齢児の脳血管周辺に GFAP と Aqp4 の過剰な発現亢進が認められたことから、CB-NP の胎児期曝露は脳血管周辺のアストロサイトを持続的に活性化し、アストログリオシスを誘導したと考えられる。

このアストロサイトの活性化が、脳血管にはじめから存在していたアストロサイトで生じたのか、傷害を感知して遊走してきたアストロサイトで生じたのか、または増殖によって細胞数が増加して生じたのかは明言することはできない。事実、網羅的遺伝子発現解析では細胞遊走や細胞増殖を制御する数多くの遺伝子群が発現亢進している。CB-NP の胎児期曝露が脳血管周辺にアストログリオシスを誘導したことについて、現時点で明確に断言することができるのは、「とくに脳血管周辺の細胞群が、ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏に応答する標的である可能性が高い」ということである。実際に、アストロサイト GFAP の発現亢進は肥大化した顆粒を保有する PVM 周辺において、より顕著に観察された。これは、アストロサイトが、PVM の変性を含む脳血管周辺の異変に応答して活性化し、末端足を伸長させたことを意味していると考えられる。また、電子顕微鏡を用いた超微小形態観察により、CB-NP の胎児期曝露はアストロサイト末端足の膨潤化を誘導した。この所見は、中枢神経系の微小血管が局所的な虚血性傷害を受けた際の特徴的な組織形態学的変化である (Sofroniew et al., 2010; Molofsky et al., 2012)。これらの研究成果は、CB-NP の胎児期曝露が、出生児の脳血管周辺組織に対して、アストログリオシスや PVM の組織学的異変をはじめとした、持続的な異変を引き起こしていることを示している。

加えて、アストロサイトの組織学的解析またはタンパク質発現解析は大脳皮質に絞って行ったが、ナノ粒子の胎児期曝露に起因する PVM の組織学的異変は脳全域においてびまん性に生じていた。そして PAS-GFAP 重染色法において、アストロサイト GFAP の発現亢進は変性した PVM の周辺において顕著であったため、CB-NP の胎児期曝露は、大脳皮質のみならず、脳の幅広い領域の血管周辺においてアストログリオシスを誘導する可能性がある。

<ナノ粒子の胎児期曝露による影響と加齢個体との類似性>

ウエスタンブロットィング法で示した、CB-NP の胎児期曝露に起因する GFAP と Aqp4 の発現亢進は、無処置の加齢個体の発現変動に酷似するものであった (Fig 2-24)。事実、加齢に伴ってアストロサイト GFAP や Aqp4 は、発現亢進することが明らかになっており (Haley et al., 2010; Gupta et al., 2013)、びまん性に生じるアストログリオシスは加齢脳に認められる一般的な所見である (Kress et al., 2014; Kohama et al., 1995; Nichols et al., 1993)。さらに、アストロサイトの活性化や GFAP の発現亢進は、アルツハイマー型認知症に代表される、加齢に伴って発症リスクが増大する神経変性疾患で共通して認められる所

見である (Rodríguez et al., 2009)。通常、脳虚血などの脳血管性の急性的な傷害が引き起こされると、Aqp4 は、脳血管に接したアストロサイトの末端足や血管内皮細胞で発現亢進することが明らかになっている (Morishima et al., 2008; Ito et al., 2006; Vajda et al., 2000)。興味深いことに、加齢個体における Aqp4 の発現亢進は、脳虚血などで見られる所見とは逆に、脳血管に接触しているアストロサイトの末端足ではなく、脳血管から少し離れた脳実質組織で生じていることが報告されている (Kress et al., 2014)。本研究で観察された、CB-NP の胎児期曝露に起因する Aqp4 の発現分布の変化は、脳虚血のような傷害時に誘導されるものではなく、加齢個体で生じる発現分布の変化に近い。脳血管周辺のアストロサイトに発現する Aqp4 が果たす役割は多数存在するが、その中には、脳実質と脳血管周囲隙を流れる脳脊髄液の流出入を制御するといったものが存在する (Iliff et al., 2012; Papadopoulos et al., 2007) この脳脊髄液の流出入は、amyloid β に代表される中枢神経系の老廃物を排出するための重要なクリアランス機構であり、その制御異常は、神経変性疾患の発症要因になると考えられている (Iliff et al., 2012; Papadopoulos et al., 2007)。加齢に伴う Aqp4 の発現変動は、この脳脊髄液の流出入に異常をきたし、老廃物の排出機構を弱める (Kress et al., 2014)。本研究で認められた GFAP と Aqp4 の発現変動パターンは加齢個体に類似したことから、胎児期に CB-NP を曝露された出生児の中枢神経系内は、加齢個体に近く、また、加齢に伴う神経変性疾患が発症しやすい状態になっている可能性が推察される。この推測を支持するかのように、近年の疫学研究により、ナノ粒子をたぶんに含む大気汚染の長期的な曝露は、脳の老化を促進することが報告されている (Chen et al., 2015)。この仮説を検証するためには、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の中枢神経系に引き起こす影響とその機序の解明に向けた、さらなる研究が必要となる。

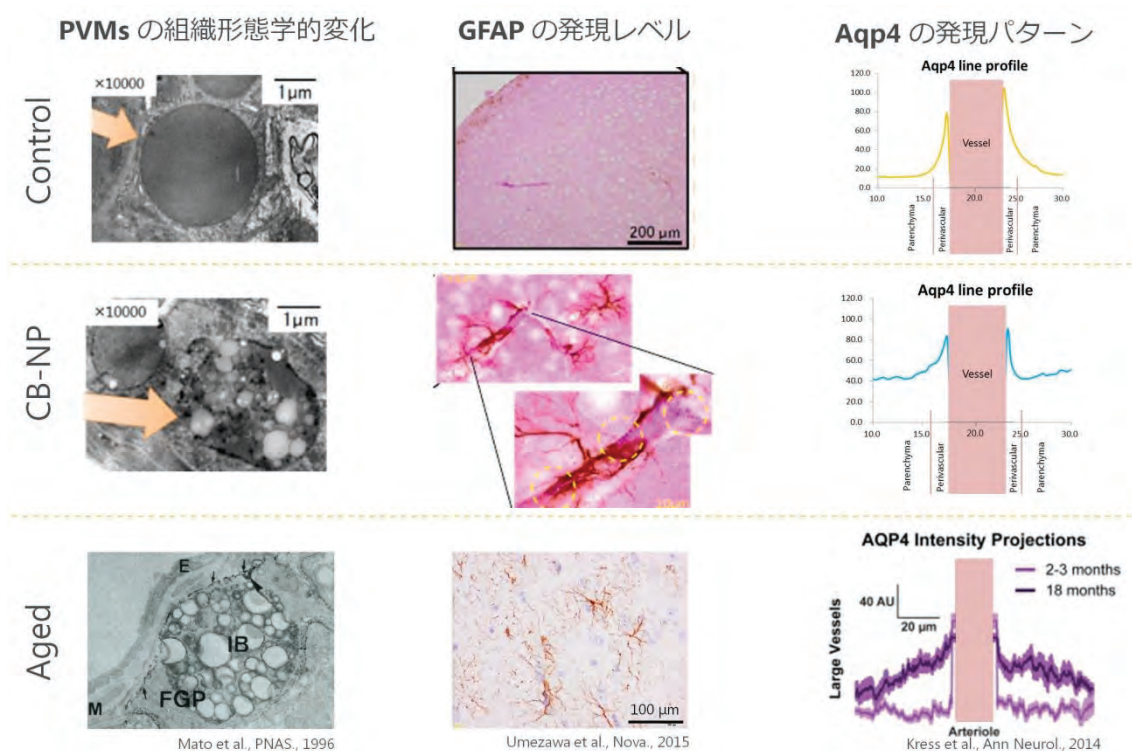


Fig. 2-24 ナノ粒子の胎児期曝露による影響と加齢個体との類似性

<ナノ粒子の胎児期曝露による Aqp4 の発現亢進の意義>

中枢神経系における Aqp4 の発現変動は、炎症 (Schain and Kreisl, 2017)、老化 (Chauhan, 2014; Van Raamsdonk et al., 2017)、物理的傷害 (Chauhan, 2014)、細菌やウイルス感染 (Perry et al., 2003; Rock et al., 2004) などによって引き起こされる。これらの要因は、同時に血液脳関門の破綻を引き起こすことが報告されている (Haj-Yasein et al., 2011; Erdö et al., 2017; Schain and Kreisl, 2017)。本研究においても、Aqp4 の発現亢進を含む組織学的異変が認められたため、CB-NP の胎児期曝露は血液脳関門に影響を及ぼしている可能性がある。また、アストロサイトや PVM は血液脳関門を制御する細胞の 1 つであるため、CB-NP の胎児期曝露に起因するこれらの細胞の組織学的な異変は、ナノ粒子の胎児期曝露が血液脳関門の破綻に関与する可能性が示唆される。加えて、Aqp4 の発現異常に起因する、中枢神経系の水の代謝制御異常は、イオン濃度や神経伝達物質の適切な機能を狂わせることで、中枢神経疾患を引き起こすことが示されている (Liu et al., 2012; Mack and Wolburg, 2013; Oku et al., 2015)。CB-NP の胎児期曝露による Aqp4 の発現亢進は、中枢神経内の水の代謝制御異常を誘導し、中枢神経疾患の発症リスクの増大につながる可能性が考えられる。

Aqp4 は、水分子の通り道としての機能が主であるが、近年、アミロイド β などの老

廃物の取り込みや輸送に重要な分子であることが明らかになっている (Yang et al., 2012)。CB-NP の胎児期曝露によるアストロサイトの Aqp4 の発現変動は、老廃物を取り込むために引き起こされた可能性がある。実際に PVM の組織学的異変は、脳実質組織における老廃物の蓄積に起因する可能性が高く、さらなる研究において、ナノ粒子の胎児期曝露と老廃物の生成、排出の関わりについて調査することが重要であると考えられる。

2.4.6. ナノ粒子の胎児期曝露によって発現変動する遺伝子群

本研究では、組織学的解析やタンパク質発現解析に加えて、CB-NP の胎児期曝露が母体と胎児を結ぶ胎盤や出生児の中枢神経系の遺伝子発現に及ぼす影響について評価した。網羅的遺伝子発現解析の結果、血管新生 (angiogenesis)、細胞増殖 (cell proliferation)、細胞遊走 (cell migration and chemotaxis)、成長因子 (growth factor) に関連する遺伝子群が出生児の中枢神経系において、CB-NP の胎児期曝露により変動を示した。とくに、Sox17、Tgfa、Flt1、Cyr61 の4つの遺伝子が、CB-NP の胎児期曝露に対して用量依存的に発現変動を示した。これら4つの遺伝子は、脳血管系の構築や機能制御を担う遺伝子であり (Hermanto et al., 2016; Zhao et al., 2003; Krum et al., 2008; Schwarz et al., 2002)、遺伝子発現解析においても、組織学的解析と同様に、脳血管や脳血管周辺がナノ粒子の胎児期曝露によって鋭敏に応答する部位であることを示した。実際に、先行研究においても、TiO₂-NP の妊娠期間における吸入曝露が、胎児の微小血管の形成に異常を引き起こすことが示されている (Stapleton et al., 2013)。この知見と本研究成果から、血管は、ナノ粒子の胎児期曝露によって影響を受けやすい脆弱な組織である可能性が高い。ナノ粒子の発達神経毒性を理解するためには、血管の形成に対するナノ粒子の影響やそのナノ粒子が引き起こす血管の病態変化を解明することが重要であると考えられる。また、血管の周辺に存在し、血管と相互に関わっている細胞や組織も、ナノ粒子の発達毒性の標的となると予測される。実際に、脳血管の機能制御に重要な役割を担っているアストロサイトは、本研究の遺伝子発現解析で変動が確認された血管新生 (angiogenesis)、細胞増殖 (cell proliferation)、細胞遊走 (cell migration and chemotaxis)、成長因子 (growth factor)、これらすべてに関与する (Kong et al., 2008; Zhao et al., 2015)。したがって、本研究で発現変動が認められた遺伝子は、ナノ粒子の胎児期曝露が引き起こす、脳血管周辺の組織病理学的異変の発現に深く関わり、その異変を誘導する鍵となる分子である可能性が考えられる。とくに、周産期における異常な神経刺激は、大脳皮質の正常な血管新生を妨げることが報告されている (Whiteus et al., 2014)。妊娠期にお

ける CB-NP の曝露は、周産期における神経活動を乱し、それによって血管新生が異常をきたしたという仮説が考えられる。この仮説を支持する証拠となる研究成果がないため、CB-NP の胎児期曝露が周産期の神経活動に及ぼす潜在的な影響を解明することが求められる。そして、その神経活動に対する影響が、児の行動パターンや脳血管周辺の組織学的異変にどのように寄与するのか明らかにすることが、ナノ粒子の発達神経毒性をより深く理解するために重要である。

ナノ粒子の胎児期曝露による出生児の脳に及ぼす影響が多数観察されたのに対して、胎盤に対する影響は小さいものであった。CB-NP の胎児期曝露によって変動し、共通の機能を持つ胎盤の遺伝子群を明らかにすべく、網羅的遺伝子発現解析と遺伝子機能解析を行ったが、該当する遺伝子は抽出されなかった。疫学研究によると、PM_{2.5} やディーゼル排ガス粒子を含む、大気中の微粒子状物質の妊娠期曝露は、胎盤の機能異常や形成不全 (Barrett et al., 2016; Dadvand et al., 2013; Fisher et al., 1986) に起因する胎児の奇形や未熟児、低体重などと強い関連性があることが示されている (Fleischer et al., 2014; Xu et al., 2009)。事実、ナノ粒子を多分に含むディーゼル排ガスの妊娠期曝露は、胎盤の血管新生異常に起因する子宮内低かん流や胎児虚血を引き起こすことが明らかになっている (Valentino et al., 2016)。本研究では、遺伝子発現を含む胎盤の異常のみならず、出生児の数や性比、体重に対する CB-NP 胎児期曝露の影響は認められなかった。この結果は、胎盤や出生児の体重や四肢形態に影響を及ぼさない程度の、低用量の CB-NP 曝露であっても、出生児の中枢神経系の血管周辺において組織病理学的異変を誘導することを示している。

2.5. 小括

本研究は、ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏かつ用量依存的に応答する、中枢神経系の領域や細胞を同定することを目的として取り組んだ。その結果、実社会で曝露しうる量の CB-NP の妊娠期経気道曝露が、出生児の中枢神経系の脳血管周辺に組織病理学的異変を引き起こすことが明らかになった (Fig. 2-25)。とくに PVM や脳血管周辺のアストロサイトは、胎盤の遺伝子発現に影響を及ぼさない程度の、低用量の CB-NP の胎児期曝露に対して鋭敏に応答することが示された。詳細には、CB-NP の胎児期曝露によって、組織病理学的異変の認められる PVM の周辺で、アストロサイトの活性化やアストログリオーシスが誘導されることを、独自に確立した組織学的解析手法を用いて明らかにした。また、その異変は脳全域においてびまん性に生じている可能性を示唆した。なお、構成元素の異な

る $\text{TiO}_2\text{-NP}$ の胎児期曝露によっても同様の所見が観察された。さらに、アストロサイトが発現する GFAP と Aqp4 は、CB-NP の胎児期曝露に対して、用量依存的に発現亢進することが明らかになり、アストロサイトのナノ粒子の発達神経毒性を評価するための、定量的な指標になると考えられた。同時に、これら2つの分子は、ナノ粒子の発達神経毒性をより深く理解するための鍵となる分子であると期待される。とくに、この GFAP と Aqp4 の発現変動解析により得られた結果は、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。この成果は、将来的に、ナノ粒子の発達神経毒性の評価とその機序解明に向けた研究の遂行や、ナノ粒子の曝露に対する安全性評価手法や予防手法の確立に大きく貢献する先進的な知見である。

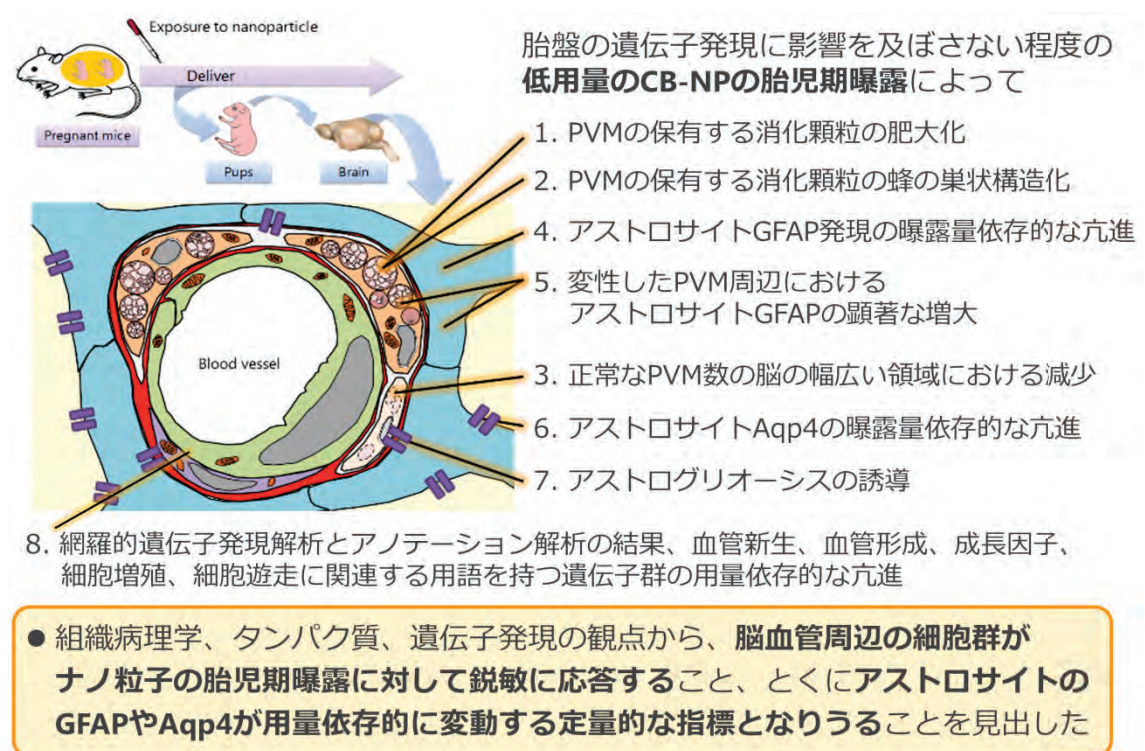


Fig. 2-25 本研究により得られた成果のまとめ

第3章 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

3.1. 背景、目的

第2章により、CB-NPの胎児期曝露は出生児の中枢神経系において、末端足の膨潤化を伴うアストログリオシスやPVMの組織学的異変など、慢性的な脳血管周辺異常をびまん性に引き起こすことが明らかになった。とくに、アストロサイトの活性マーカーであるGfapとAqp4は、CB-NPの胎児期曝露に対して、タンパク質レベルで用量依存的に発現亢進することが示され、ナノ粒子の発達神経毒性に関する定量的な評価指標となる可能性が示唆された。一方で、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の脳血管周辺に組織学的異変を誘導する機序は、未解明であった。毒性学において、生じた生体応答の機序を解明することは、研究成果の確からしさや整合性を保証するばかりでなく、その物質によって引き起こされる影響の毒性学的意義をより深く理解するための重要な知見になる。また、影響を受けやすい体質や条件を明らかにし、個々人に応じた予防策や医学的処置を講じるためにも、機序の解明が不可欠である。事実、より安全なナノマテリアルの開発と利用法の確立に向けて、ナノ粒子が生体影響を発現する機序を解明することが国際的に求められている(Powers et al., 2013)。

ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の脳血管周辺に組織学的異変を誘導する機序を解明するためには、脳血管周辺に生じている組織学的異変を網羅的かつ定量的に追究する必要がある。しかしながら、特殊染色や免疫組織化学法といった古典的な組織学的解析手法では、解析対象となる単一の生体分子の分布についての分析が多く、網羅性と定量性に乏しいことが欠点である。逆に、組織全体を一塊にして解析するウエスタンブロットティング等の発現解析法は、定量性に優れるものの、局所的に生じた微細な変動が捉えにくく、その変動した分子の分布を評価することが困難である。とくに、プロテオーム解析やメタボロミクス解析は網羅性に優れた手法であるが、脳血管のような限定した微小領域についての情報を得ることは、既存の分析技術では不可能である。そこで本研究では、脳血管周辺の異変を網羅的かつ定量的に理解すべく、組織切片上で行う赤外分光分析(*in situ* FT-IR法)を活用した。

赤外分光分析は、タンパク質や脂質、多糖類、核酸を含む生体分子の化学結合がもつ固有の赤外吸収波長をもとに、生体分子の構造や状態の情報を明らかにすることが可能

である (Caine et al., 2012; Kawasaki et al., 2016a,b)。とくに、*in situ* FT-IR 法は、この赤外分光分析を組織切片上で行う新奇的な手法であり、特定の領域に絞った生体分子の網羅的な解析を行える点が特徴である (Caine et al., 2012; Kawasaki et al., 2016a,b)。近年になり、各種の腫瘍 (Caine et al., 2012) や心筋梗塞 (Yang et al., 2011)、慢性閉塞性肺疾患 (COPD) (Whiteman et al., 2008)、そして、神経変性疾患 (Choo et al., 1995) 等の組織病理学的な異変や生体分子の構造変化を分析するために、本手法の利用が拡大されてきている。これらの研究では、*in situ* FT-IR 法を主に迅速な病理診断や病態変化の分析に活用している。さらに、*in situ* FT-IR 法は、特定の化学結合が持つ赤外スペクトルのピークを計算科学的に解析することで、疾患や病態に関与する生体分子の変化を定量的に分析することができる点も注目されている (Zhang et al., 2015)。この技術は、とくにタンパク質の二次構造の組成を評価するために用いられることが多く、例えば、パーキンソン病患者の神経細胞内で検出される特徴的なタンパク質異常凝集体 (レビー小体) を構成するタンパク質の構造とその分布の情報を得るために活用された (Araki et al., 2015)。このように、*in situ* FT-IR 法は、組織切片上における生体分子の組成や構造情報を定量的に評価することが可能である。また、染色試薬などを用いることなく組織上での解析が可能であるため、実験上のミスに起因するアーティファクトを減らす利点もある。それゆえに、*in situ* FT-IR 法は、ナノ粒子の胎児期曝露に起因する脳血管周辺異常の網羅的かつ定量的な分析に適した手法といえる。本研究では、ナノ粒子の発達神経毒性の評価とその機序解明に向けて、*in situ* FT-IR 法と古典的な組織学的解析手法を併せて用いることで脳血管周辺に生じる異変の機序解明に迫った。

3.2. 材料と方法

3.2.1. 試薬類

本研究で用いた試薬はとくに記述の無い場合は、全て市販試薬特級を用いた。

3.2.2. 使用動物と飼育環境

使用した動物とその飼育環境は第2章 (2.2.2.) と同一である。

3.2.3. 使用粒子

ナノ粒子は第2章 (2.2.3.) に記した CB-NP と同一のものを使用した。

3.2.4. 投与物質の調製方法と測定

CB-NP 懸濁液は、第2章 (2.2.4. <組織学的異変の評価に用いたナノ粒子>) と同一の方法で調製し、物性を測定した。

3.2.5. 曝露条件と解析項目

妊娠3日目の ICR 系妊娠マウス (11 週齢) を 10 匹購入し、東京理科大学野田キャンパス薬学研究棟の動物舎内に搬入した。搬入した時点で、対照群 (n=5) と CB-NP 曝露群 (n=5) に無作為に分けた。被験物質の投与は、第2章 (2.2.5.) に記載した内容と同一の手法を用いた。妊娠5日目と9日目の妊娠マウスをハロタンで充満させた麻醉瓶の中に静かに入れ、睡眠を確認した直後に取り出し、直ちに妊娠マウスを仰向けにして、超純水あるいは CB-NP 懸濁液 (1 mL/kg bwt) を点鼻投与した。なお、投与は両方の鼻腔に同じ体積が入るように行った。6 週齢の雄性出生児 (1 腹あたり 3 匹) から、ペントバルビタールナトリウム (腹腔内投与; 0.1 mg/g bwt) 麻醉下で脳を摘出した。その後、*in situ* FT-IR 法と各種染色法を用いて解析を行った (Fig. 3-1)。

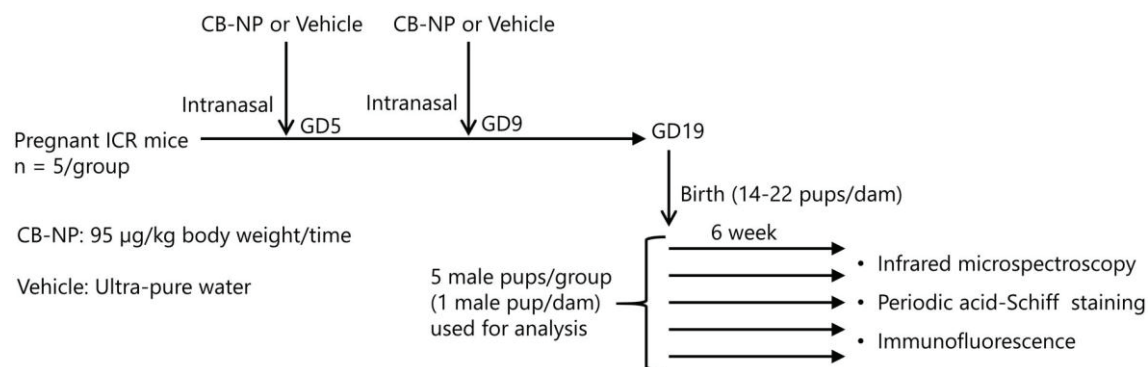


Fig. 3-1 実験デザイン (動物への処置と解析手法)

3.2.6. 摘出した組織の前処理と切片の作製

対照群と CB-NP 曝露群の 6 週齢児 (n = 5/group) と陽性対照として飼育した無処置加齢個体に対して、麻醉下で PBS を灌流して血液を除いた後、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) を用いて灌流固定した。摘出した脳組織を 1 mm 厚で冠状面方向に切断し、4%パラホルムアルデヒドを含む 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 5 時間後固定し、防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%ス

クロス/PBS に、それぞれ4時間、4時間、12時間浸漬させることで凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) で凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μm の連続切片を作製し、赤外反射光専用のステンレススチール基盤 (IR-reflective stainless-steel base) とスライドガラス (S-8441; Matsunami) に交互に接着させた。その後、湿気がスペクトル測定に干渉しないように、室温で24時間以上放置し、十分に乾燥させた。

3.2.7. *in situ* FT-IR データの測定と解析

赤外吸収スペクトルの測定には、フーリエ変換型赤外スペクトル測定器 (FT/IR-6100; Jasco Co., Tokyo, Japan) とカセグレン方式の焦点系を持つレンズを搭載した赤外顕微鏡 (IRT-7000; Jasco Co.) を使用した。本機は、標的となる領域に中赤外光 (波長領域 700–4000 cm^{-1}) を照射して、反射光 (分解能: 4 cm^{-1}) を検出することで赤外吸収スペクトルを取得する。本研究では、格子測定法を用いて、大脳皮質に存在する血管を中心に 7×7 区画 (1 区画: 30×30 μm^2)、計 49 個の赤外吸収スペクトルを測定した。そして、その測定を各群 5 検体、1 検体あたり 1~2 つの血管を対象に行った。取得したスペクトルは、専用のソフトウェアである Spectra Manager Ver. 2 (Jasco International Co., Ltd, Tokyo, Japan) を用いて平滑化と標準化処理を施した。さらに、赤外吸収スペクトルのうち、amide I 領域 (1600–1700 cm^{-1}) におけるピークにデコンボリューション処理を行い、タンパク質の二次構造解析を進めた。デコンボリューション処理を施したスペクトルから、タンパク質の主要な二次構造組成である α -helix と β -sheet、 β -turn、random coil の含有比を算出した。算出した値は、マッピング解析ソフトウェアを用いて可視化され (IR-SSE; JASCO Co., Ltd) (Sarver and Krueger, 1991)、血管からの距離に応じて 4 つの組に分類し、統計学的解析に用いた。

3.2.8. 免疫蛍光染色と PAS-Hematoxylin 染色

in situ FT-IR 法によって解析された切片に隣接した連続切片に対して、免疫蛍光染色と PAS-Hematoxylin 染色を行った。

免疫蛍光染色では、赤外吸収スペクトルを測定した脳血管周辺における GFAP、Aqp4 ならびに MMR の発現パターンを評価する目的で行った。組織切片を純水に 5 分間、2 回浸して、作製した切片の Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) 除去した後、

10 % の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience) を用いて室温で1時間ブロッキングを行い、PBSを用いて500倍に希釈した一次抗体 goat polyclonal anti-GFAP antibody (code-no. ab53554, Abcam) または、rabbit polyclonal anti-GFAP antibody (code-no. Z0334, DakoCytomation) 溶液を4°Cで16時間反応させた。反応後、切片を常温のPBSで3回、各5分間洗浄し、PBSを用いて1000倍に希釈した Dylight 488 標識二次抗体 donkey anti-goat IgG (code-no. 605-741-125, Rockland Immunochemicals) または donkey anti-rabbit IgG (code-no. 611-742-127, Rockland Immunochemicals) 溶液を室温で120分反応させた。再度、常温のPBSで3回、各5分間洗浄した後、PBSを用いて200倍に希釈した一次抗体 rabbit polyclonal anti-Aqp4 antibody (code no. AB3594, Merck Millipore) または、goat polyclonal anti-MMR/CD206 antibody (code no. AF2535, R&D Systems) 溶液を4°Cで16時間反応させた。反応後、切片を常温のPBSで3回、各5分間洗浄し、PBSを用いて1000倍に希釈した Dylight 549 標識二次抗体 donkey anti-rabbit IgG (code-no. 611-743-127, Rockland Immunochemicals) または、donkey anti-goat IgG (code-no. 605-742-002, Rockland Immunochemicals) 溶液を室温で120分反応させた。最後に、常温のPBSで3回、各5分間、超純水で2回、各5分間洗浄した後、Hoechst 33342 (code-no. 346-07951, Dojindo Laboratories) を用いて核染色を施した。その後、常温の精製水で1回、5分間洗浄し、退色防止封入剤 (Cell Signaling Technology) を用いてカバーガラス (R3702; Matsunami) で封入した。低温暗室で一晩放置し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて観察した。

PAS-Hematoxylin 染色法は、PVM の消化顆粒の状態を観察する目的で行った。純水に5分間、2回浸して、作製した切片の Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) 除去した後、1%過ヨウ素酸水溶液に1分間通して糖類を酸化させ、流水水洗を3分間、精製水に10秒通して、コールドシッフ試薬に45分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水を3回、各5分間通すことで、反応を停止させ、かつ表面のシッフ試薬を洗い落とした。流水水洗を5分間行い、ヘマトキシリンによる核染色を極めてうすく行った。流水中で色だしを5分間行い、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。完成したプレパラートの組織学的観察には、光学顕微鏡 (BX51; Olympus) を用いた。

3.2.9. タンパク質の二次構造予測

第2章で行った網羅的遺伝子発現解析の結果 (2.3.11) から得られた、CB-NP の胎

児期曝露によって発現が亢進する mRNA の Entrez Gene ID を用いて、アミノ酸配列データベース (Entrez Protein) を参照することで、それぞれの mRNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列情報を割り出した。得られた全てのアミノ酸配列情報をタンパク質二次構造予測ツール (PSIPRED) に入力して、アミノ酸配列情報から予測されるタンパク質の二次構造情報を得た (Jones, 1999)。予測したタンパク質の持つ全体のアミノ酸残基数から、 α -helix ならびに β -Sheet を構成するアミノ酸残基数の割合を算出し、 α -helix および β -Sheet 含有率を比較した。

3.2.10. 脳血管周辺のタンパク質の染色

純水に 5 分間、2 回浸して、作製した切片の Tissue-Tek OCT コンパウンド (Sakura Finetek Japan) 除去した後、10 % の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い、PBS を用いて 500 倍に希釈した一次抗体 goat polyclonal anti-GFAP antibody (code-no. ab53554, Abcam)、または、goat polyclonal anti-MMR/CD206 antibody (code no. AF2535, R&D Systems) 溶液を 4°C で 16 時間反応させた。反応後、切片を常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS を用いて 1000 倍に希釈した Dylight 488 標識二次抗体 donkey anti-goat IgG (code-no. 605-741-125, Rockland Immunochemicals) を室温で 120 分反応させた。再度、常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄した後、PBS を用いて 100 倍に希釈した一次抗体 rabbit polyclonal anti-ATF6 antibody (code no. ab37149, abcam)、rabbit polyclonal anti-CHOP/GADD153 antibody (code no. PAB8734, Abnova)、rabbit polyclonal anti-Robo4 antibody (code no. bs-5795R, Bioss)、rabbit polyclonal anti-Kdr/VEGFR2 antibody (code no. bs-3468R, Bioss)、rabbit polyclonal anti-Flt1/VEGFR1 antibody (code no. bs-0170R, Bioss) または、rabbit polyclonal anti-Tie1 antibody (code no. bs-1334R, Bioss) 溶液を 4°C で 24 時間反応させた。反応後、切片を常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS を用いて 1000 倍に希釈した Dylight 549 標識二次抗体 donkey anti-rabbit IgG (code-no. 611-743-127, Rockland Immunochemicals) 溶液を室温で 120 分反応させた。最後に、常温の PBS で 3 回、各 5 分間、超純粋で 2 回、各 5 分間洗浄した後、Hoechst 33342 (code-no. 346-07951, Dojindo Laboratories) を用いて核染色を施した。その後、常温の精製水で 1 回、5 分間洗浄し、退色防止封入剤 (Cell Signaling Technology) を用いてカバーガラス (R3702; Matsunami) で封入した。低温暗室で一晩放置し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて観察した。

3.2.11. 統計解析

結果は全て、平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計学的解析のために、Windows 版の Excel 統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。出生児数、性比ならびに出生児の体重については F 検定で等分散性を確認した後に student の t 検定を用いて、CB-NP 曝露による影響を評価した。脳血管周辺におけるタンパク質二次構造の割合については、一元配置分散分析に統計学的有意差が認められた場合、Tukey の多重検定を行い、CB-NP の胎児期曝露による影響を評価した。

3.3. 実験結果

3.3.1. 出生児の数と性比、体重

出生児数及び性比に関して、CB-NP の胎児期曝露による違いは認められなかった (Table 3-1)。また、CB-NP の胎児期曝露による体重の増減は認められなかった (Table 3-2)。

Table 3-1. カーボンブラックナノ粒子(CB-NP)の妊娠期曝露による出生児数と性比に対する影響

Group name	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%)*
Control	5	19 ± 2	52 ± 14
CB-NPs	5	17 ± 3	50 ± 16

出生児数ならびに性比について、超純水群と CB-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male/(male + female) ×100」で算出した。

Table 3-2. カーボンブラックナノ粒子(CB-NP)の妊娠期曝露による、出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響

Group name	Number of dams (Number of offspring)	Age	Body weight (g)
Control	5 (20)	6 weeks	36 ± 4
CB-NPs	5 (20)	6 weeks	35 ± 2

6週齢時における体重について、超純水群とCB-NP曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。

3.3.2. 脳血管周辺組織の赤外吸収スペクトル

第一にCB-NPの胎児期曝露に起因する、大脳皮質脳における血管周辺組織の赤外吸収スペクトルを測定した (Fig. 3-2)。Fig. 3-2Dは、Fig. 3-2A-C内の青、橙および赤色、それぞれの区画から取得した赤外吸収スペクトルを示している。得られた赤外吸収スペクトルを解析した結果、CB-NPの胎児期曝露によってAmide I bandを示すピーク (1650 cm^{-1} 前後: アミド結合のC=Oの伸縮振動に起因) に高波数から低波数への顕著なシフトが確認された。一方で、Amide I bandとは対照的に、Amide II bandのピーク (1550 cm^{-1} 前後: N-H変角振動、C-N伸縮振動に起因) には変化は認められなかった。そこで、Amide I bandのピークをピックアップして (Fig. 3-2E: Fig. 3-2D内の破線を拡大したもの、 $1500\text{--}1800\text{ cm}^{-1}$)、詳細に解析を進めた (Fig. 3-2F-H)。Amide I領域内にはbroad peak (1660 cm^{-1}) とそれに付随するshoulder ($1610\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$) が確認された (Fig. 3-2E, blue line)。対照群とCB-NP胎児期曝露群のスペクトルを比較すると、CB-NPの胎児期曝露群において、shoulder部 ($1610\text{--}1640\text{ cm}^{-1}$ 付近の波数) に、より強い赤外吸光が認められた (Fig. 3-2E, orange and red lines)。一般的に、broad peakはタンパク質の二次構造組成の一つである α -helix構造内に含まれるアミド結合を、shoulder部は β -sheet構造におけるアミド結合の共鳴周波数を表している (Caine et al., 2012; Kawasaki et al., 2016a)。つまり、CB-NP胎児期曝露群のAmide I領域内において、shoulder部に強い吸光が確認されたことは、CB-NPの胎児期曝露によって β -sheet構造の割合が増加した可能性を示している。この結果を受け、タンパク質二次構造組成の違いについて定量的に評価すべく、赤外吸収スペクトルのAmide I領域にデコンボリューション処理を施し、得られた4つのピーク面積を数値化した (Fig. 3-2F-H) (Sarver

and Krueger, 1991; Seshadri et al., 1999; Bousset et al., 2013)。対照群と比較して、CB-NP 胎児期曝露群の α -helix 構造の割合が低いのにに対して (Fig. 3-2F-H)、 β -sheet 構造の割合については CB-NP 胎児期曝露群の方が対象群よりも高い (Fig. 3-2F-H)。同様に算出した β -turn 構造と random coil の割合は、対象群と CB-NP 胎児期曝露群でほぼ同一の値が示された。

興味深いことに、CB-NP 胎児期曝露群では、Amide I 領域に顕著なピークシフトを示す血管 (Fig. 3-2E, red line) と隠微なピークシフトを示す血管 (Fig. 3-2E, orange line)、2種類の血管が同一個体の中で混在していることが確認された。タンパク質の二次構造の割合は Amide I 領域のピークシフトに起因するため、その2種類の血管の間には、 β -sheet 構造の割合にも差異が存在していた。ここで筆者は、この異なるピークシフトを示す2種類の血管について追究することが、CB-NP の胎児期曝露によってタンパク質二次構造組成の割合が変化した原因を明らかにするための重要なヒントになると考えた。第2章では低用量の CB-NP の胎児期曝露が、脳血管周辺においてアストログリオシスや PVM の組織学的異変を引き起こすことを示した。これを受け、Amide I 領域におけるピークシフトの違いは、脳血管周辺における組織病理学的異変の度合いと関連すると考え、*in situ* FT-IR 法と古典的な組織学的解析手法を組み合わせ、さらなる解析を進めた。

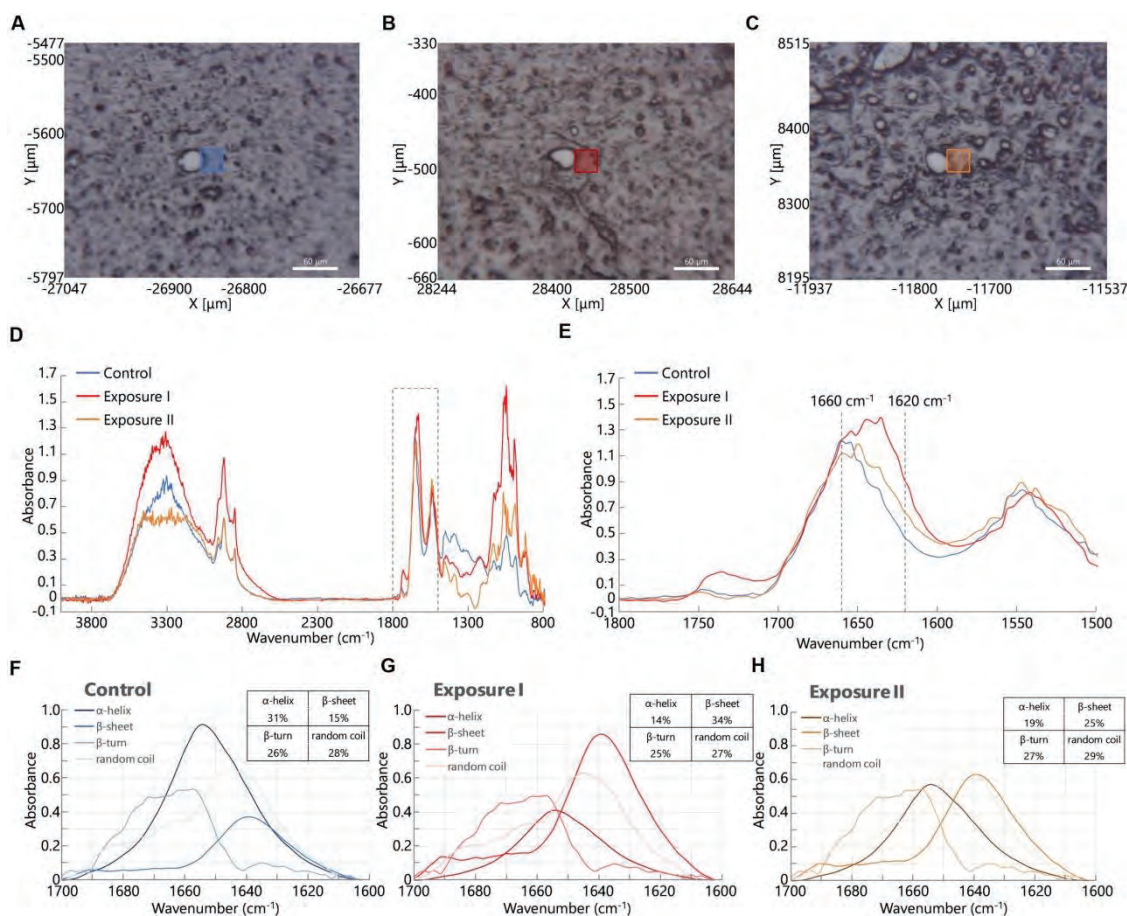


Fig. 3-2 脳血管周辺組織の顕微赤外スペクトル分析

A: 対照群。B, C: カーボンブラックナノ粒子曝露群。D: それぞれの画像中の四角の枠 (30 μm 四方) の部分のスペクトル。E: Dの破線内の拡大図。F, G, H: それぞれのEのスペクトルをデコンボリューションしたもの。Sarver and Krueger, 1991の論文に基づいて、タンパク質の二次構造の割合を算出した。

3.3.3. アストログリオシスの生じた血管周辺におけるタンパク質二次構造

第2章の研究成果により、CB-NPの胎児期曝露は、出生児の脳血管周囲において、アストロサイトの活性化マーカーであるGFAPとAqp4の用量依存的な発現亢進を誘導することが明らかになった。この結果は、CB-NPの胎児期曝露により、出生児の中枢神経系におけるアストロサイトの持続的な活性化、すなわちアストログリオシスが引き起こされたことを示している。とくに、アストログリオシスが生じている脳血管周辺のアストロサイトの末端足では、膨潤化を伴う顕著なGFAPの発現亢進が認められた。これらの知見を踏まえ、アストログリオシスの生じている血管周辺と、生じていない血管周辺にお

けるタンパク質の二次構造解析を行い、その違いを評価した。

Fig. 3-3A-O は、連続切片を用いて評価した赤外吸収スペクトルのマッピング解析と免疫蛍光染色の結果を示している。明視野像である Fig 3-3A, F, K は、それぞれ、Fig. 3-3C-E, H-J, M-O との連続切片であり、赤外吸収スペクトルを測定した領域を示している。タンパク質二次構造組成の変化を脳血管から距離別に捉えるため、血管を中心にして格子状に測定領域を設定して、赤外吸収スペクトルを取得した。免疫蛍光染色により、第2章で報告した内容と同様に、CB-NP の胎児期曝露は脳血管周辺に存在するアストロサイトの GFAP と Aqp4 を増加させ、アストログリオシスを誘導することが示された (Fig. 3-3M-O)。このアストログリオシスの生じている脳血管周辺において、タンパク質二次構造の二次元マッピング解析を行った結果、 β -sheet 構造の増加と α -helix 構造の減少が確認された (Fig. 3-3B, G, L)。このタンパク質二次構造組成の変化 (Fig. 3-3L) は、対照群 (Fig. 3-3B) のみならず、アストログリオシスの生じていない同一個体の血管周辺の結果 (Fig. 3-3G) と比較しても、顕著な変動であった。一方で、脳血管周辺における β -turn や random coil 構造の割合については、対照群と CB-NP 胎児期曝露群との間に違いは認められず、また、組織病理学的異変の有無とも関わりはなかった (Fig. 3-3B, G, L)。

さらに、CB-NP の胎児期曝露に起因するタンパク質の二次構造組成の変化は、血管からの距離に応じて異なることが明確に示された (Fig. 3-3A, F, K, P-S; 0 μ m: gray; 0-30 μ m: red; 30-60 μ m: orange; 60-90 μ m: green; more than 90 μ m: blue)。対照群および CB-NP 胎児期曝露群の血管周辺におけるタンパク質の二次構造組成を血管からの距離ごとに定量化し、統計学的に評価するために、格子測定で得られた全てのスペクトルにデコンボリューション処理を施し、Fig. 3-2 に記載した内容と同じ手法を用いてタンパク質の二次構造組成の割合を算出した。その結果、CB-NP の胎児期曝露群の中でも、アストログリオシスが認められる脳血管周辺において、血管に最も隣接した区画 (red area: 0-30 μ m from the centered blood vessel) の β -sheet 構造の割合の統計学的有意な増加 (**p < 0.01) が確認された (Fig. 3-3Q)。対照的に、アストログリオシスが認められる脳血管に最も隣接した区画における α -helix 構造の割合は、対照群と比較して統計学的有意に減少した (Fig. 3-3P; **p < 0.01)。なお、 β -turn や random coil 構造の割合には、脳血管周辺のどの区画においても統計学的有意な変動は認められなかった (Fig. 3-3P-S)。

Table 3-3 は、格子測定時に設定した 49 区画のうち、血管に最も隣接した 4 つの区画 (red squares) における Amide I band のピークの波数を示したものである。対照群における

ピーク波数の幅が、1651 から 1661 cm^{-1} であり、CB-NP の胎児期曝露群の中で、アストログリオシスの認められない脳血管周辺では、ピーク波数の幅が 1648 から 1657 cm^{-1} であった。それらに対し、CB-NP 胎児期曝露群のうち、アストログリオシスが生じている脳血管周辺では、Amide I band ピークの波数の幅は、1636 から 1654 cm^{-1} であった。これらの結果から、CB-NP の胎児期曝露は、血管に近接した脳組織における Amide I band ピークを高波数側から低波数側へとシフトさせることが明らかになり、そのシフトはアストログリオシスの生じている血管周辺で顕著であることを示した。

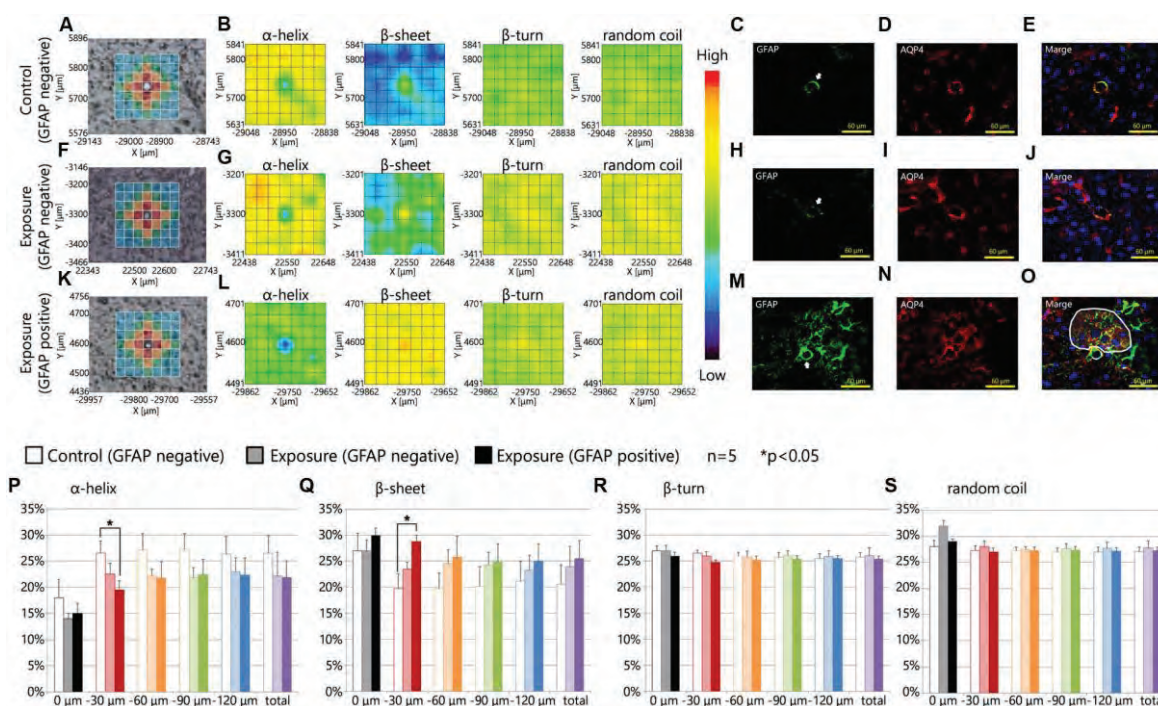


Fig 3-3 組織病理学的異変の認められる脳血管周辺の顕微赤外スペクトル分析

A, F, K: 測定領域を示した明視野像 (7×7 区画。1 区画 30 μm 四方)。A: 対照群、F: 曝露群 (組織学的異変の認められない血管周辺)。K: 曝露群 (組織学的異変の認められる血管周辺)。
 B, G, L: それぞれのタンパク質二次構造の 2D マッピング分析。C-E, H-J, M-O: A, F, K それぞれの連続切片の組織学的解析像。白矢印は血管を示している。C, H, M: GFAP。D, I, N: Aqp4。
 E, J, O: 核染色と GFAP、Aqp4 のマージ像。白枠は組織病理学的異変の顕著な領域。P-S: それぞれのタンパク質二次構造の割合を血管からの距離別に算出したもの。

Table 3-3. 脳に最も隣接した領域 (Fig. 3-3A, F, K の赤色で示した部分) におけるアミド I ピークの波数

Group name	Mouse ID	Wave-number (cm ⁻¹)	Means ± standard deviations
Control	C1	1655.6	1655.4 ± 3.2
		1651.7	
		1659.5	
		1654.6	
	C2	1654.6	1652.0 ± 4.1
		1646.0	
		1654.6	
		1652.7	
	C3	1657.5	1658.8 ± 1.0
		1659.5	
		1659.5	
		1658.5	
	C4	1660.4	1660.9 ± 0.6
		1660.4	
		1661.4	
1661.4			
C5	1657.5	1657.0 ± 1.7	
	1658.5		
	1657.5		
	1654.6		
Exposure GFAP negative sites	E1	1654.6	1652.2 ± 2.9
		1648.8	
		1654.6	
		1650.8	
	E2	1655.6	1654.2 ± 3.3
		1657.5	
		1649.8	
		1653.7	
	E3	1651.7	1653.2 ± 1.3
		1652.7	
		1654.6	
		1653.7	
	E4	1649.8	1652.7 ± 2.1
		1652.7	
		1653.7	
1654.6			
E5	1648.8	1653.9 ± 3.5	
	1656.6		
	1655.6		
	1654.6		
Exposure GFAP positive sites	E1	1648.8	1651.0 ± 2.8
		1654.6	
		1651.7	
		1648.8	
	E2	1636.3	1642.6 ± 6.8
		1646.9	
		1649.8	
		1637.3	
	E3	1651.7	1648.4 ± 2.4
		1646.0	
		1647.9	
		1647.9	
	E4	1646.0	1649.3 ± 2.8
		1652.7	
		1649.8	
1648.8			
E5	1651.7	1648.6 ± 3.8	
	1651.7		
	1644.0		
	1646.9		

3.3.4. PVM とタンパク質二次構造組成との関わり

CB-NP の胎児期曝露に起因する出生児のアストログリオシスは、PVM の組織病理学的異変が誘導されている血管周辺において、とくに顕著であることが第2章により示された。そこで、アストログリオシスに加えて、PVM の周囲においても赤外吸収スペクトルを測定し、タンパク質の二次構造解析を行った。PVM の有無を検出するために PVM の特異的マーカーである MMR (CD206) (Galea et al., 2005) を指標にした MMR と GFAP の二重免疫蛍光法を用い、さらに、PVM のもつ消化顆粒の組織病理学的異変を検出するために PAS-Hematoxylin 染色を行った (Mato and Ookawara, 1979; Mato et al., 2002)。これらの染色を施した切片の連続切片から赤外吸収スペクトルを取得し、組織学的に検出した病態変化と光学的に解析したタンパク質の二次構造変化を比較し、その関連性を評価した。

Fig. 3-4A-O は、連続切片を用いて評価した赤外吸収スペクトルのマッピング解析と免疫蛍光染色の結果を示している。明視野像である Fig. 3-4A, F, K は、それぞれ、Fig. 3-4C-E, H-J, M-O との連続切片であり、赤外吸収スペクトルを測定した格子領域を示している。タンパク質二次構造組成の変化を脳血管から距離別に捉えるため、血管を中心にして格子状に測定領域を設定して、赤外吸収スペクトルを取得した。免疫蛍光染色を施した切片を観察した結果、対照群と曝露群のいずれにおいても、PVM を示す MMR の発現分布とアストロサイト GFAP の発現量との間に相関性は認められなかった (Fig. 3-4C-E, H-J, M-O)。対照群に関しては、MMR と GFAP のいずれも観察されない血管周辺を、曝露群に関しては、MMR のみ観察される血管周辺と MMR と GFAP の両方の発現が認められる血管周辺を赤外吸収スペクトルの測定と解析対象とした。これらの血管周辺において、タンパク質二次構造の二次元マッピング解析を行った結果、CB-NP 胎児期曝露群の中でも、MMR と GFAP の両方の発現が認められる血管周辺においてのみ β -sheet 構造の増加と α -helix 構造の減少が確認された (Fig. 3-4L)。一方で、MMR の発現が認められるものの、GFAP の発現亢進が認められない血管周辺においては、タンパク質の二次構造の変化は隠微なものであった (Fig. 3-4G)。なお、脳血管周辺における β -turn や random coil 構造の割合については、対照群と CB-NP 胎児期曝露群との間に違いは認められず、また、PVM の有無とも関わりはなかった (Fig. 3-4B, G, L)。

さらに、各々の血管周辺におけるタンパク質の二次構造組成を血管から距離別に定量化し、統計学的に評価した (Fig. 3-4A, F, K, P-S; 0 μ m: gray; 0-30 μ m: red; 30-60 μ m:

orange; 60–90 μm: green; >90 μm: blue)。格子測定で得られた全てのスペクトルにデコンボリューション処理を施し、Fig 3-2 に記載した内容と同じ手法を用いてタンパク質の二次構造組成の割合を算出することで、定量化を行った。その結果、MMR と GFAP の両方が確認される曝露群の脳血管周辺において、血管に最も隣接した区画 (red area: 0–30 μm from the centered blood vessel) の β-sheet 構造の割合の統計学的有意な増加 (**p < 0.01) が確認された (Fig. 3-4Q)。加えて、MMR と GFAP の両方が確認される脳血管に最も隣接した区画における α-helix 構造の割合は、対照群と比較して統計学的有意に減少した (Fig. 3-4P; **p < 0.01)。MMR と GFAP の両方が確認される脳血管周辺とは対照的に、同じ曝露群の同一個体内にある MMR のみが観察される血管周辺においては、β-sheet 構造ならびに α-helix 構造の割合に統計学的有意な変化は認められなかった (Fig. 3-4P, Q)。これらの研究結果は、タンパク質の二次構造組成を反映する Amide I ピークのシフトに、PVM の有無は関係ないことを示唆している。なお、β-turn や random coil 構造の割合には、脳血管周辺のどの区画においても統計学的有意な変動は認められなかった (Fig. 3-4P-S)。

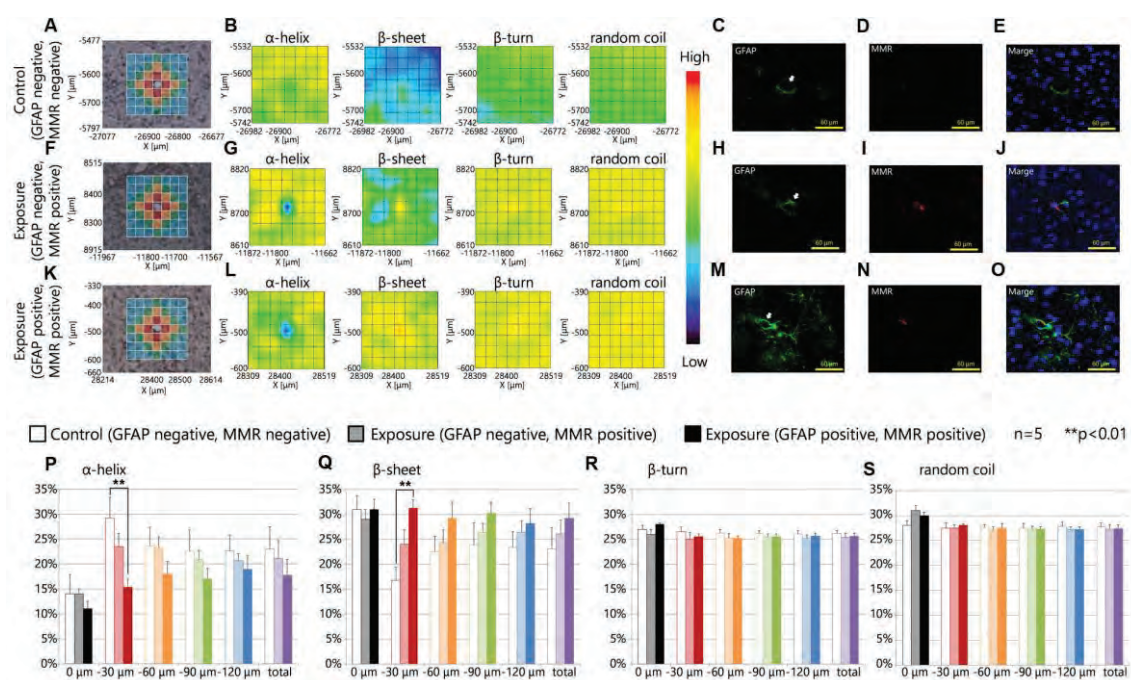


Fig. 3-4. 脳血管周囲マクロファージの存在する脳血管周辺の顕微赤外スペクトル分析
A, F, K: 測定領域を示した明視野像 (7×7 区画。1 区画 30 μm 四方)。A: 対照群 (GFAP 陰性、CD206 陰性)、F: 曝露群 (GFAP 陰性、CD206 陽性)。K: 曝露群 (GFAP 陽性、CD206 陽性)。

B, G, L: それぞれのタンパク質二次構造の2D マッピング分析。C-E, H-J, M-O: A, F, K それぞれの連続切片の組織学的解析像。白矢印は血管を示している。C, H, M: GFAP。D, I, N: CD206 (Macrophage Mannose Receptor)。E, J, O: 核染色と GFAP、Aqp4 のマージ像。P-S: それぞれのタンパク質二次構造の割合を血管からの距離別に算出したもの。

PVM の存在は、CB-NP の胎児期曝露に起因する Amide I ピークのシフトに関与していないことが示唆されたが、PVM の組織病理学的異変がそのピークシフトに関与している可能性がある。とくに CB-NP の胎児期曝露は PVM の保有する消化顆粒の肥大化を引き起こすことが、第2章の研究により明らかにされた。この PVM の消化顆粒の組織病理学的異変は PAS-Hematoxylin 染色法により検出することが可能である。そこで、対照群における正常な PVM 周辺ならびに曝露群の肥大化した消化顆粒を持つ PVM の周辺における赤外吸収スペクトルを測定し、その違いを評価した。

Fig. 3-5C, G が示すように、PVM の保有する特徴的な細胞内消化顆粒は PAS 染色により赤色に染色される。第2章で得られた結果と同じく、CB-NP の胎児期曝露によって、PVM 消化顆粒は肥大化することが確認された (Fig. 3-5D, H, arrows)。Fig. 3-5A-O は、連続切片を用いて評価した赤外吸収スペクトルのマッピング解析と免疫蛍光染色の結果を示している。明視野像である Fig. 3-5A, E は、それぞれ、Fig. 3-5C, G との連続切片であり、赤外吸収スペクトルを測定した格子領域を示している。対照群における正常な PVM の周辺ならびに、肥大化した消化顆粒を保有する PVM の周辺組織についてタンパク質二次構造の二次元マッピング解析を行った結果、CB-NP の胎児期曝露によって消化顆粒の肥大化した PVM の周辺において、対象群と比較して、 β -sheet 構造の増加と α -helix 構造の減少が確認された (Fig. 3-5B, F)。MMR に分布と赤外吸収スペクトルの関連性について追究した研究結果 (Fig. 3-4) では、PVM の有無は CB-NP の胎児期曝露に起因する Amide I 領域のピークシフトに関与していないことが示されたが、PVM の保有する消化顆粒の組織病理学的異変は、そのピークシフトおよびタンパク質二次構造組成の変化と関連している可能性が明らかになった。とくに、CB-NP の胎児期曝露によって組織病理学的異変の生じた PVM に最も隣接した領域 (red area: 30 μ m from the blood vessel) において、 β -sheet 構造の割合の統計学的有意な亢進が、血管からの距離別解析によって示された (Fig. 3-5J)。同じく、組織病理学的異変が認められる血管に最も隣接した領域において、統計学的有意差は認められなかったものの、 α -helix 構造の割合の減少傾向が確認された。なお、 β -turn や random coil

構造の割合には、脳血管周辺のどの区画においても統計学的有意な変動は認められなかった (Fig. 3-5K, L)。

ここまでで示された赤外吸収スペクトルの結果から、CB-NP 曝露群の中で、とくにアストログリオシスや PVM の組織学的異変が誘導された血管周辺において、amide I 領域のピークシフトとタンパク質二次構造組成の変化が生じていることが明らかになった。これらの結果は、CB-NP の胎児期曝露によって脳血管周辺に生じた組織学的異変は、 β -sheet 含有率の高いタンパク質 (β -sheet rich protein) の増加、あるいは集積を伴うことを示している。その β -sheet rich protein は CB-NP の胎児期曝露に起因する慢性的な脳血管周辺の組織学的異変と深く関わっている可能性があり、そのタンパク質を明らかにすることがナノ粒子の発達神経毒性の機序解明に繋がると考えられた。

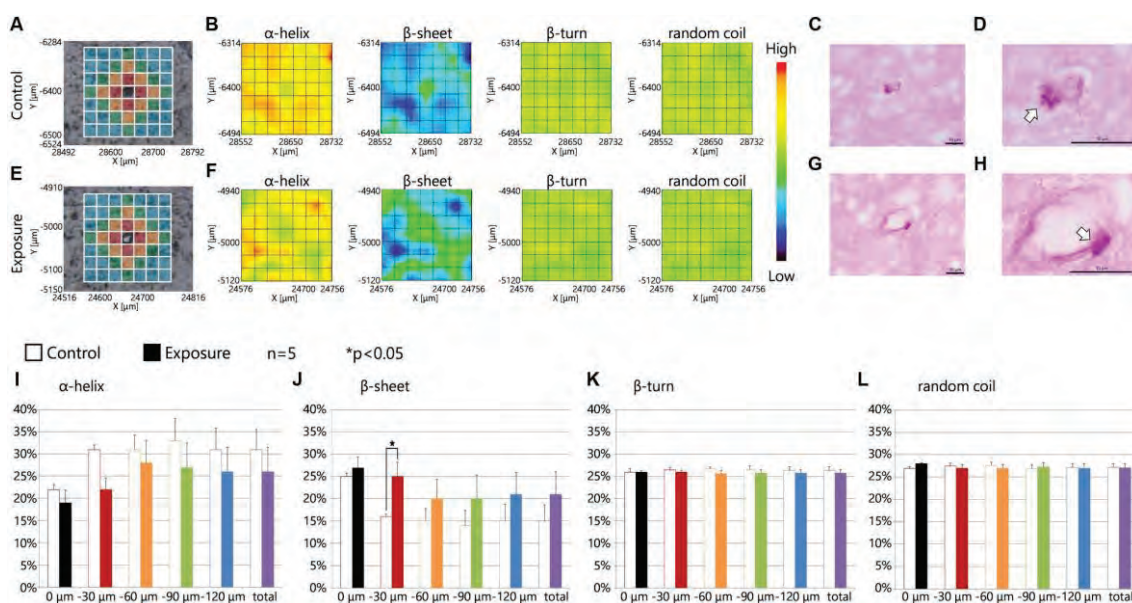


Fig. 3-5. 肥大化した消化顆粒を保有する脳血管周囲マクロファージ周辺の顕微赤外スペクトル分析

A, E: 測定領域を示した明視野像 (7×7 区画。1 区画 30 μ m 四方)。A: 対照群、E: 曝露群 (脳血管周囲マクロファージの保有する消化顆粒の肥大化を確認)。B, F: それぞれのタンパク質二次構造の 2D マッピング分析。C, D, G, H: A, E それぞれの連続切片の PAS 染色像。D, H はそれぞれ C, G の拡大像。白矢印は脳血管周囲マクロファージの消化顆粒を示している。I-L: それぞれのタンパク質二次構造の割合を血管からの距離別に算出したもの。

CB-NP の胎児期曝露によって生じた脳血管周辺における β -sheet rich protein について、2つの仮説が考えられる。一つ目は、CB-NP の胎児期曝露によって脳血管周辺の細胞で β -sheet rich protein の発現が亢進した可能性、二つ目は CB-NP の胎児期曝露によって β -sheet rich に構造変化した protein の集積が起こった可能性である。一つ目の仮説を検証するために、タンパク質の二次構造予測とそれにより抽出された候補タンパク質の組織学的解析を行い、二つ目の仮説を検証するために、脳血管周辺における小胞体ストレスの評価を行った。

3.3.5. タンパク二次構造予測と組織学的解析

CB-NP の胎児期曝露によって増加する β -sheet rich protein が、脳血管周辺で発現亢進したタンパク質であるという仮説に則り、タンパク質の二次構造予測とその結果に基づいた組織学的解析を行った。

最初に CB-NP の胎児期曝露によって発現亢進したと想定されるタンパク質を絞り込む必要がある。そこで、第2章で行ったマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現解析の結果を活用した。網羅的遺伝子発現解析で発現亢進を示した大脳皮質の mRNA がコードするタンパク質のアミノ酸配列情報を元に、それぞれのタンパク質の二次構造を予測した。その後、予測したタンパク質の持つアミノ酸残基数から α -helix と β -sheet の含有率を比較した結果、 β/α 比が 100%を超えるタンパク質が 10 種に絞られた (Table 3-4)。さらに、この 10 種類のタンパク質のうち、中枢神経系での発現が認められるタンパク質のみに焦点を絞り、結果、Robo4, Kdr (VEGFR2), Flt1 (VEGFR1), Tie1 の 4 種類のタンパク質が、CB-NP の胎児期曝露によって脳血管周辺で発現亢進している β -sheet rich protein の候補として抽出された (Table 3-4)。これら、4 種のタンパク質は全て細胞膜上または細胞内に発現する非分泌型タンパク質であり、 β/α 比が 100%を超える分泌型タンパク質は抽出されなかった。

抽出された 4 種のタンパク質が、CB-NP の胎児期曝露によって、脳血管周辺において発現亢進を示すのか評価するために、免疫蛍光染色を用いて解析を行った。*in situ* FT-IR 法の解析により、 β -sheet 構造の割合は CB-NP 胎児期曝露群の中でもアストログリオーシスの認められる血管周辺において高い数値を示していたため、アストログリオーシスの生じている血管に絞って解析を進めた。しかしながら、CB-NP の胎児期曝露群によってアストログリオーシスの生じている脳血管周辺において、Robo4, Kdr, Flt1, Tie1、いずれのタン

パク質の発現亢進は認められなかった (Data not shown)。したがって、タンパク質の二次構造予測によって選出された4種のタンパク質は、*in situ* FT-IR 法によって示された、組織学的異変の認められる脳血管周辺に存在する β -sheet rich protein ではない可能性が高いことが示された。

Table 3-4. 二次構造予測により抽出された β -sheet-rich protein

Gene ID	Gene symbol	配列長	α	β	α /全体比	β /全体比	β/α 比
AK020115	Adamtsl1	192	3	50	2%	26%	1667%
NM_029928	Ptprb	1998	134	848	7%	42%	633%
NM_010917	Nid1	1245	43	266	3%	21%	619%
NM_001085376	Pappa2	1789	113	422	6%	24%	373%
NM_028783	Robo4	1015	78	226	8%	22%	290%
NM_175938	Btn2a2	514	69	167	13%	32%	242%
NM_010612	Kdr	1345	175	407	13%	30%	233%
NM_010228	Flt1	1333	192	414	14%	31%	216%
NM_010516	Cyr61	379	39	65	10%	17%	167%
NM_011587	Tie1	1134	177	295	16%	26%	167%

3.3.6. 脳血管周辺組織における小胞体ストレスの評価

生体内に存在するナノ粒子は、その周囲のタンパク質と反応してタンパク質の構造を変化させ、 β -sheet 構造を増加させることが明確に証明されている (Khanal et al., 2016)。そのため、*in situ* FT-IR 法で確認された β -sheet 構造の割合の増加は、CB-NP の胎児期曝露によって構造の変化したタンパク質を捉えた可能性が、もうひとつの仮説として考えられた。この仮説を検証するために、タンパク質構造変化体の集積に伴って応答する、小胞体ストレスの評価を行った。

軽度の小胞体ストレスの指標として ATF6 を、重度の小胞体ストレスの指標として CHOP (GADD153) を用いて、免疫蛍光染色により、その発現分布を評価した。その結果、脳血管周辺において CB-NP の胎児期曝露による ATF6 と CHOP の発現亢進が確認された。さらに、ATF6 の局在は、過剰発現した GFAP ならびに MMR の分布と一致し (Fig. 3-6,

3-7)、CHOP の局在は MMR の分布と一致した (Fig. 3-8)。つまり、CB-NP の胎児期曝露によって生じるアストログリオーシスは ATF6 の発現亢進を伴うことから、軽度の小胞体ストレスが誘導されていることを、また、MMR 陽性細胞である PVM に ATF6 と CHOP の両方の発現亢進が認められたことから、CB-NP 胎児期曝露群の PVM には、重度の小胞体ストレスが誘導されていることを示している。

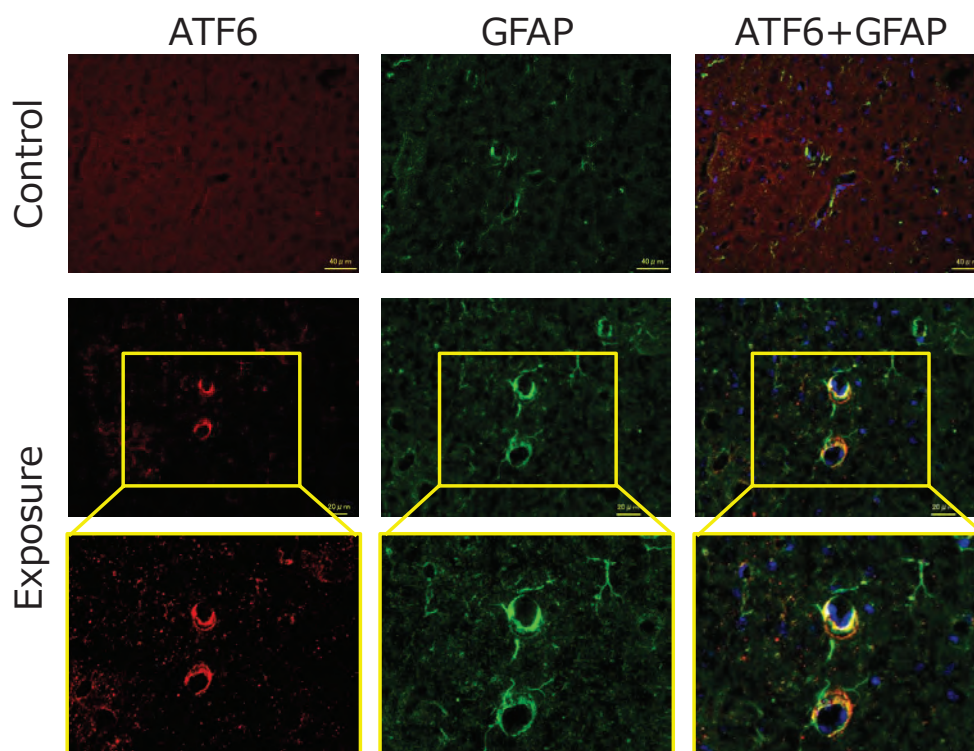


Fig. 3-6 脳血管周辺における ATF6 と GFAP の発現

曝露群の脳血管周辺に存在する GFAP 陽性アストロサイトにおいて顕著な ATF6 の発現亢進が確認される。

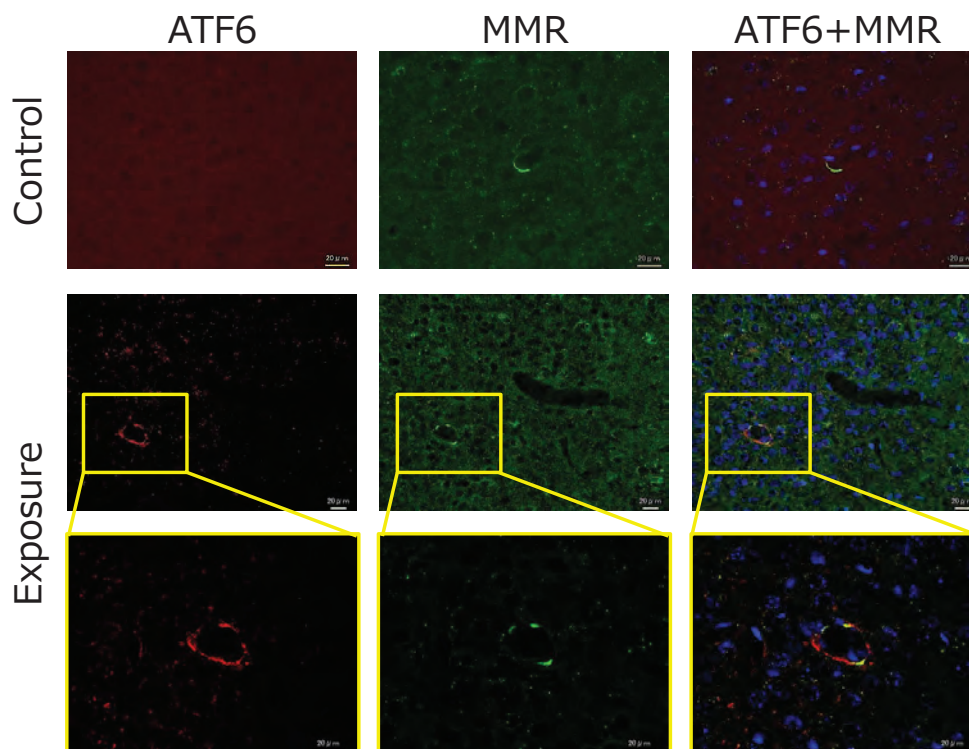


Fig. 3-7 脳血管周辺における ATF6 と CD206 (MMR) の発現
 曝露群の脳血管周辺に存在する CD206 (MMR) 陽性脳血管周囲マクロファージにおいて ATF6 の発現亢進が確認される。

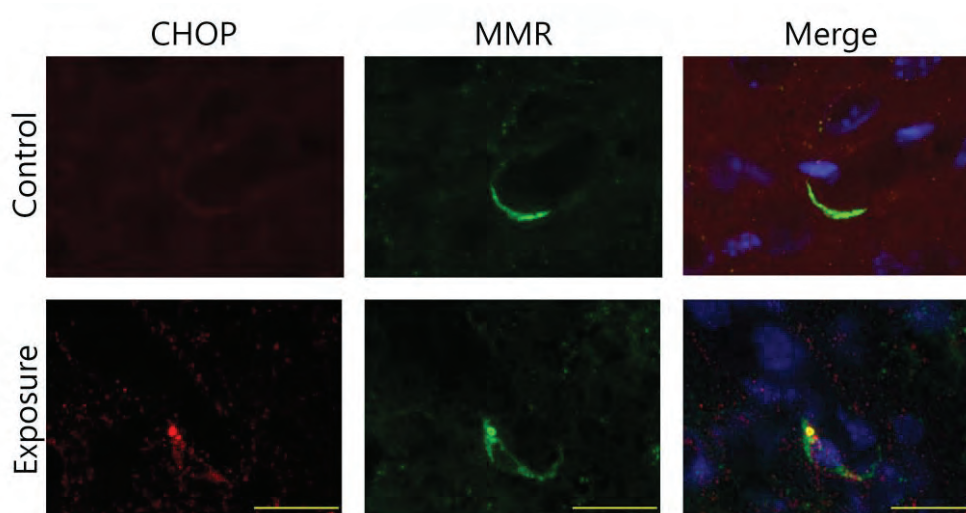


Fig. 3-8 脳血管周辺における CHOP と CD206 (MMR) の発現
 曝露群の脳血管周辺に存在する CD206 (MMR) 陽性脳血管周囲マクロファージにおいて CHOP の発現亢進が確認される。

3.4. 考察

3.4.1. CB-NP の胎児期曝露が脳血管周辺に β -sheet-rich protein が増加した要因

第2章の研究により、CB-NP の胎児期曝露は出生児脳血管周辺に慢性的なアストログリオシスや PVM の組織病理学的異変を誘導することを明らかにした。第3章では、この CB-NP の胎児期曝露が脳血管周辺に組織学的異変を引き起こす機序の解明を目的として、脳血管周辺組織の赤外吸収スペクトルを測定し、脳血管周辺に生じている異変を網羅的かつ定量的に評価した。*in situ* FT-IR 法を用いて赤外吸収スペクトルを取得し、解析した結果、脳血管周辺組織から得られた赤外吸収スペクトルの Amide I 領域のピークが CB-NP 胎児期曝露によって低波数側にシフトすることが明らかになった。とくに、CB-NP 胎児期曝露群で観察された Amide I band の顕著なピークシフトは、アルツハイマー病患者の脳内にある amyloid- β の集積した領域で認められる Amide I 領域のピークシフトに酷似していた (Choo et al., 1996)。興味深いことに、このピークシフトは全ての血管に対して均一に生じているわけではなく、ピークシフトの顕著な血管と隠微な血管の2種類が CB-NP 胎児期曝露群の同一個体内に存在していた。血管ごとにピークシフトの違いが生じる要因を解き明かすことが、CB-NP の胎児期曝露が脳血管周辺に異変を誘導する機序の解明につながるかと考え、*in situ* FT-IR 法と古典的な組織病理学的解析手法を組み合わせ評価した。その結果、CB-NP の胎児期曝露によってアストログリオシスや PVM の組織病理学的異変が生じた血管周辺においてのみ、Amide I 領域の顕著なピークシフトが認められた。さらに、タンパク質の二次構造解析の結果、CB-NP 胎児期曝露群の組織病理学的異変が認められる血管の最も近接した領域において、統計学的に有意な β -sheet 構造の増加および、 α -helix 構造の減少が確認された。すなわち、CB-NP の胎児期曝露によって組織学的異変が生じた脳血管周辺に β -sheet rich protein が増加していることが示された。さらに組織学的解析を進めた結果、この β -sheet rich protein が集積していると考えられる、CB-NP の胎児期曝露によって組織学的異変が生じた脳血管周辺に、ATF6 や CHOP といった小胞体ストレスマーカーの発現亢進が認められ、小胞体ストレスが誘導されていることが明らかになった。中枢神経系において、タンパク質の構造変化体が集積すると、その周囲で小胞体ストレスを誘導することが報告されているため (Brown and Neher, 2014)、組織学的異変の認められる脳血管周辺で増加した β -sheet rich protein は、脳血管に集積したタンパク質の構造変化体である可能性が示唆された。一方で、CB-NP の胎児期曝露によって、脳血管周辺で β -sheet rich protein の発現が亢進した可能性も考えられた。タンパク質の二次構造予測を用

いて、Robo4, Kdr, Flt1, Tie1 の4つのタンパク質を候補として抽出したが、いずれも脳血管周辺における発現亢進は確認されなかった。また、抽出された β/α 比が100%を超える候補タンパク質は全て非分泌型タンパク質であり、分泌型タンパク質は抽出されなかった。したがって、CB-NP の胎児期曝露群の組織学的異変の認められる血管の最も近接した領域において、 β -sheet 構造の割合の増加が確認されたのは、構造の変化したタンパク質の脳血管周辺における集積に起因すると考えられる。

3.4.2. 脳血管周辺の組織病理学的異変を評価した *in situ* FT-IR 法

本研究では、取得した赤外吸収スペクトルのうち、最も劇的にピークがシフトしていた Amide I 領域 ($1600\text{--}1700\text{ cm}^{-1}$) に焦点を当てて解析を進めた。とくに、Amide II 領域 ($1500\text{--}1560\text{ cm}^{-1}$) のピークに変化が認められず、Amide I 領域のみにピークシフトが観察されたことから、測定した脳血管周辺領域では、CB-NP の胎児期曝露によって、タンパク質の量的変化が生じているのではなく、タンパク質に質的な変化が引き起こされたことを示している。事実、Amide I 領域はタンパク質の二次構造の変化を鋭敏に反映する領域である (Sekar et al., 2015)。タンパク質の二次構造の変化を捉える手法として、円二色分光分析法も優れている (Greenfield, 2006)。ところが、円二色分光分析法は、液体を対象にした測定に用いるため、タンパク質の二次構造組成の変化に関する局在や分布についての情報得ることができない (Pelton and McLean, 2000)。本研究では、脳血管周辺生じた組織病理学的異変を網羅的かつ定量的に生体分子の組成や構造変化を評価することを目的にしていたため、組織切片に適用することのできない円二色分光分析法は適しておらず、*in situ* FT-IR 法を選択して解析を行った。本研究で用いた *in situ* FT-IR 法では、最小の区画を $30\text{-}\mu\text{m}$ 四方の大きさに設定し、赤外吸収スペクトルを測定した。これ以下のサイズの区画から赤外吸収スペクトルを取得すると、光量不足に起因して、不安定かつ信頼性のないスペクトルとなってしまうため、タンパク質の二次構造解析は行えない。それゆえに、本研究で用いた格子測定で設定した1区画 $30\text{-}\mu\text{m}$ 四方の大きさは、マッピング解析において最も高い解像度を保持しつつ、タンパク質の二次構造解析に信頼の置ける赤外吸収スペクトルを取得できるバランスの取れたサイズであった。タンパク質の二次構造解析は、Sarver と Krueger の研究を基にして作られたソフトウェアを使用した (Sarver and Krueger, 1991)。この研究は、X 線結晶構造解析などにより構造情報が完全に解明されている17種類のタンパク質を用いて、それらのタンパク質の二次構造組成と赤外吸収スペクトルの Amide I 領域における

ピークシフトの相関性について調査することで、Amide I 領域におけるピークシフトからタンパク質の二次構造組成を予測する方法を確立した研究である。さらに、この研究は、タンパク質の二次構造組成のうち、 β -sheet 構造の割合を見積もる際は円二色分光分析法より FT-IR 法の方が、わずかに感度がよく、優れていることを報告している。したがって、脳血管周辺の組織病理学的異変を評価することを目的とした本研究において、*in situ* FT-IR 法は最も適した方法であったと考えられる。

3.4.3. ナノ粒子の表面で生じ得るタンパク質の構造変化

タンパク質の二次構造組成の変化を理解する上で、ナノ粒子の表面反応性は、最も重要な要素である。先行研究によると、タンパク質や脂質を含む生体分子はナノ粒子の表面に吸着し、バイオコロナあるいはプロテインコロナと呼ばれるナノ粒子表面の生体分子の層を形成する (Saptarshi et al., 2013; Treuel et al., 2015)。ナノ粒子表面でバイオコロナを形成する際、吸着したタンパク質に構造変化が引き起こされ (Saptarshi et al., 2013)、中でも、タンパク質の二次構造組成はナノ粒子との表面相互作用にとくに鋭敏に反応し、構造変化が引き起こされることが明らかになっている (Wang et al., 2011; Khanal et al., 2016)。実際に、生体内に移行したナノ粒子は、その周囲のタンパク質と反応して β -sheet 構造を増加させることが、原子間力顕微鏡と赤外分光分析を用いた研究によって明確に証明されている (Fig 3-9: Khanal et al., 2016)。

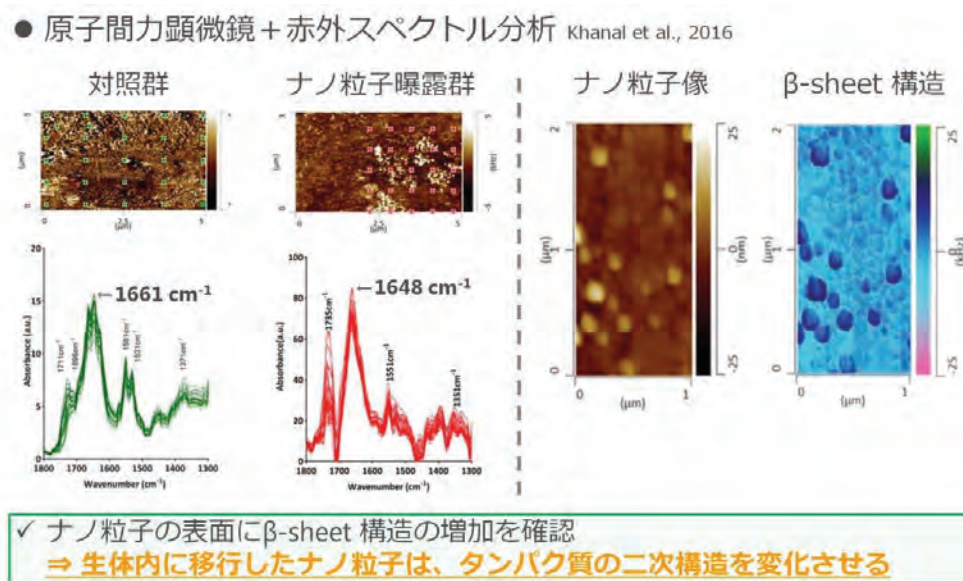


Fig. 3-9 ナノ粒子の表面上におけるタンパク質二次構造の変化と β -sheet 構造の増加

本研究では、CB-NP の胎児期曝露により、出生児の脳血管周辺においてタンパク質の二次構造組成が変化したことを報告したが、これは、ナノ粒子の表面と反応したことで構造変化したタンパク質を捉えた可能性が考えられる。実際に、妊娠中の母体が 1-100 nm の大きさのナノ粒子に曝露された際、母体の血液空気関門 (Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2002; Choi et al., 2010) や血液胎盤関門 (Wick et al., 2010)、胎児の未熟な血液脳関門を通過して胎児の脳へ移行することが明らかになっている (Takeda et al., 2009; Yamashita et al., 2011)。とくに、胎児期に曝露されたナノ粒子は、出生 6 週齢児の脳からも検出され、長期に残留し続けることが示されている (Takeda et al., 2009)。また、炭素粒子をラットの脳室内に投与した研究では、投与した炭素粒子が中枢神経系の細胞内あるいは細胞の周囲に 2 年間以上残留し続けたことを報告している (Kida et al., 1993)。これらの知見は、ナノ粒子は胎児の脳への移行性を持つこと、移行したナノ粒子は分解や排出されにくく、長期にわたって残留し続けることを示し、そして、残留したナノ粒子が周囲の生体分子と反応し続ける可能性を示唆している。

ヒトへの外挿を考えた場合、実験動物とヒトの胎盤の種差を考慮する必要がある。本研究で用いたマウス (げっ歯類) は霊長類と同じ盤状胎盤であり、有蹄類等の他の哺乳類よりも種差は小さい。本研究では、CB-NP を妊娠マウス 5 日目と 9 日目に投与したが、これは、ヒトにおける妊娠 3~4 週 (着床期と器官形成期の過渡期) と妊娠 5~6 週 (器官形成期) に相当する。胎盤形成の完了は、マウスでは妊娠 11 日目頃であり、ヒトの場合は妊娠 15 週目頃である。つまり、ヒトとマウスを比較すると、マウスの方が、胎児の生育速度と比較して胎盤の完成が相対的に速いことが分かる。胎盤は、胎児への不要物や異物の移行を防ぐ役割を持つため、胎盤の形成段階と曝露時期の関係性は生体応答を正確に理解するために重要である。本研究では、マウスの妊娠 5 日目と 9 日目に曝露したため、胎盤が完成していない段階での曝露であり、そのために胎児へ移行しやすかった可能性がある。そして、同時期 (妊娠 3~4 週ならびに 5~6 週) においては、ヒトでも胎盤が完成していないため、本研究においてマウスで認められた現象は、ヒトでも起こる可能性が高いと考えられる。

以上から、胎児期に曝露した CB-NP は、母体から胎児に移行し、出生児の脳内に残留、そして、脳内のタンパク質と表面相互作用を引き起こし、タンパク質の構造変化を引き起こすと考えられる。その結果として、本研究で用いた *in situ* FT-IR は、CB-NP の胎児期曝露に起因するタンパク質の二次構造組成の変化を捉えたのだと推測される。さらに、

周産期の中枢神経系は劇的に発達し、グリア細胞や脳血管を含む神経ネットワークを構築している (Kolb and Gibb, 2011)。ナノ粒子のような異物自体がそのネットワークの構築に異常を引き起こす可能性があり、さらにナノ粒子との表面相互作用により生じたタンパク質の構造変化体はその原因となる可能性もある (Calderón-Garcidueñas et al., 2016a)。胎児期におけるナノ粒子の曝露は、成人への曝露よりもその影響が大きくなると考察される。

3.4.4. 神経炎症応答によるタンパク質の構造変化の可能性

脳内におけるタンパク質の構造変化を考える上では、周産期における神経炎症応答についても議論する必要がある。先行研究により、ウイルスや細菌などの母体感染は胎児や新生児の中枢神経系に炎症応答を誘発し、その炎症応答に伴って脳の発育に異常をきたすことが明確に証明されている (Atladóttir et al., 2010; Brown, 2012)。また、最新の知見により、ナノ粒子を多分に含む大気汚染の胎児期曝露も、胎児の脳に神経炎症応答を引き起こすことが示唆されている (Bolton et al., 2012; Hougaard et al., 2015)。重要なことは、発達期における神経炎症応答は、タンパク質のミスフォールディングを誘導する要因となり (Soto, 2003; Amor et al., 2010)、さらに、 β -sheet 構造の含有比の高い異常構造を持つタンパク質や老廃物の生成、集積を引き起こすことである (Stefani, 2004)。したがって、CB-NP の胎児期曝露によって引き起こされた神経炎症応答がタンパク質の構造変化を引き起こし、その構造変化に起因する β -sheet 構造の増加を、本研究で用いた *in situ* FT-IR 法が捉えた可能性も十分考慮すべきである。

3.4.5. タンパク質の構造変化体の排出先

本研究では、CB-NP の胎児期曝露により、組織学的異変の認められる血管の最も近接した領域において、 β -sheet 構造の割合が顕著に増加することを報告した。しかしながら、CB-NP 胎児期曝露群の血管周辺で認められた β -sheet 構造の増加が、ナノ粒子の表面相互作用により生じたタンパク質の構造変化体に起因するのであれば、脳血管周辺にナノ粒子が存在していると考えられるが、第2章で行った透過型電子顕微鏡観察では、脳血管周辺にナノ粒子は検出できなかった。この矛盾を解決するためには、脳内における老廃物や異物の排出機構を考慮する必要がある。

中枢神経系では、脳脊髄液が Aqp4 を介して動脈周囲から静脈周囲へと常に一定方向に流れており、その流れによって異常な構造を持つタンパク質や老廃物、異物が脳血管

周囲空間 (Perivascular space, Virchow-Robin space) に排出される (Iilff et al., 2012; Xie et al., 2013; Kress et al., 2014)。また、別の経路では、脳内の老廃物や異物は、脳血管周辺の平滑筋細胞に集積されることも報告されている (Weller et al., 2008)。いずれの排出経路にしても、脳内の不要な老廃物や異物は、脳血管周辺に集積され、排出されるということを示している (Fig. 3-10)。つまり、脳血管周辺において β -sheet 構造の割合が最も顕著に増加したのは、CB-NP の胎児期曝露によって構造の変化したタンパク質が、脳脊髄液の流れによって脳血管周辺に排出、集積されたことに起因する可能性が高い。CB-NP の胎児期曝露により、 β -sheet rich な分泌型タンパク質が発現亢進し、脳血管周辺に集積した可能性も考えられるが、 β/α 比が 1 を超える分泌型タンパク質の発現亢進は、本研究では見出されなかったため、その可能性は低いと判断できる。したがって、本研究で得られた成果と先行研究の知見から、出生児の脳内に残留したナノ粒子が、脳血管周辺に存在して、そこでタンパク質と表面相互作用を引き起こすのではなく、脳実質組織の内部に存在し、そこでタンパク質の構造を変化させ、その構造の変化したタンパク質が脳脊髄液の流れに乗って脳血管周辺に排出された可能性が考えられる。

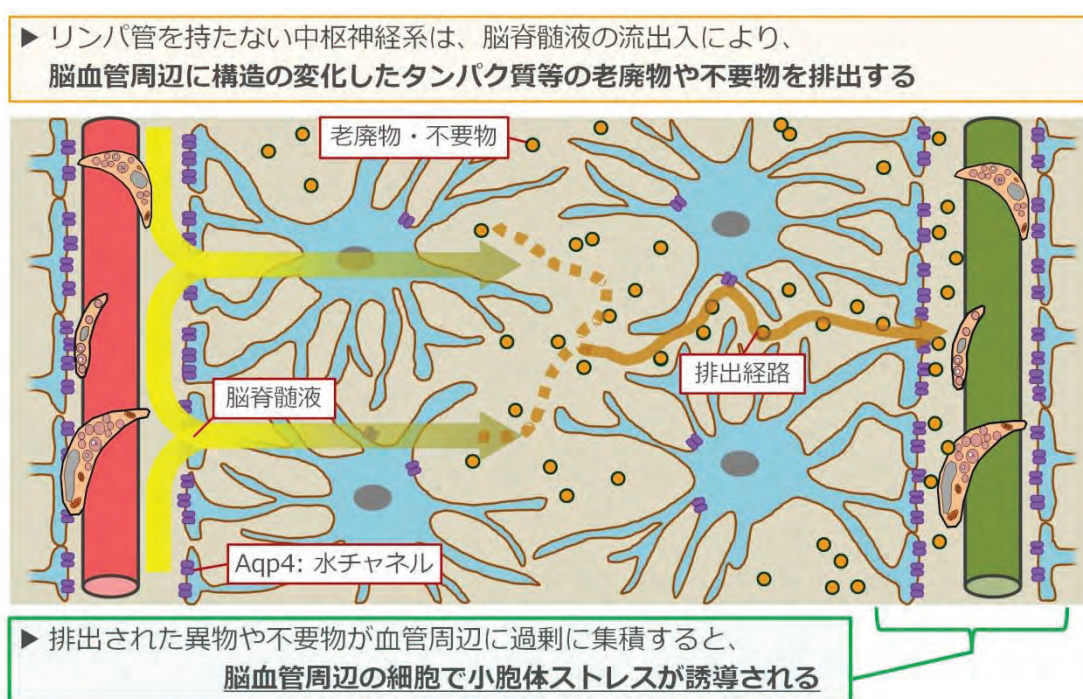


Fig. 3-10 中枢神経系における老廃物や不要物の排出経路

3.4.6. ナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺に組織学的異変を誘導する機序

in situ FT-IR は、CB-NP 胎児期曝露群の脳血管周辺における β -sheet 構造の増加を明

らかにしたが、その増加は組織病理学的異変の生じている血管周辺で顕著であった。この知見と中枢神経系の老廃物排出機構に密接な関わりがあることが考察される。脳血管周辺に集積されたタンパク質の構造変化体は、一般的に脳血管周囲空間に存在し、遊走している PVM によって貧食、処理される (Kida et al., 1993; Lai and McLaurin, 2012; Serrats et al., 2010)。継続した貧食行為は、PVM の保有する PAS 陽性消化顆粒の変性と肥大化を誘導するため (Mato et al., 2002, 2009)、CB-NP の胎児期曝露によって引き起こされる PVM の組織病理学的異変は、脳血管周辺に排出された構造の変化したタンパク質を過剰に貧食した結果として引き起こされた可能性が考えられる。その過剰な貧食や組織病理学的異変に伴って、PVM には重篤なストレスがかかり、小胞体ストレスが誘導されたと考えられる。

さらに、PVM の変性はアストログリオシスとも深く関わっている。第2章では、脳血管周辺におけるアストロサイト GFAP の発現亢進は、消化顆粒の肥大化した PVM の周辺において顕著であることを示した。本研究では、組織学的異変の認められる PVM が存在する血管周囲と同様に、アストログリオシスの認められる血管周囲においても β -sheet 構造の割合の増加が認められた。この結果から、ナノ粒子の胎児期曝露によって持続的な活性化が生じているアストロサイトの周囲に構造変化したタンパク質が集積している可能性を示唆している。あるいは、そのアストロサイトの持続的な活性化は、ナノ粒子の胎児期曝露によって構造が変化し、集積したタンパク質によって引き起こされている可能性が考えられる。細胞の周囲に集積したタンパク質の構造変化体は、その細胞に対して小胞体ストレスを誘導することが明らかになっている (Gulyaeva, 2015)。実際に、CB-NP の胎児期曝露群の脳血管周囲に存在するアストロサイトは活性化マーカーである GFAP とともに、小胞体ストレスマーカーである ATF6 も高発現していた。ATF6 は、アストロサイトの活性化を促し、アストログリオシスを引き起こす分子の一つである (Gulyaeva, 2015)。つまり、CB-NP の胎児期曝露によって生じた、脳内のタンパク質構造変化体が脳脊髄液の流れによって脳血管周辺へと集積され、それに伴い周囲のアストロサイトで小胞体ストレスの誘導とアストロサイトの活性化が進み、最終的にアストログリオシスが生じたという一連の流れが推測される。加えて、小胞体ストレスの誘導は、細胞死を引き起こすことに繋がる。事実、微小粒子の胎児期曝露により、出生児の脳内で細胞死が誘導されることが報告されている (Zhang et al., 2018)。本研究の成果は、胎児期における粒子状物質の曝露に起因する細胞死に小胞体ストレスが関与している可能性を示唆している。

また、中枢神経系の老廃物排出機構である脳脊髄液の流れは、Aqp4 によって制御さ

れ (Kress et al., 2014)、 β -sheet rich protein が脳血管周囲に集積すると、アストロサイトは活性化し、Aqp4 の発現亢進を誘導する (Vajda et al., 2000; Papadopoulos and Verkman, 2007)。脳脊髄液による老廃物排出機構は Aqp4 の発現量に依存することが明らかになっているため (Kress et al., 2014)、CB-NP の胎児期曝露によって Aqp4 が発現亢進したのは、脳内に生じたタンパク質の構造変化体を老廃物として脳の実質組織から迅速に排除するための防衛機構の一つが働いた可能性が考えられる。この知見もまた、CB-NP の胎児期曝露によって組織病理学的異変が生じた脳血管周囲にタンパク質の構造変化体が集積している可能性を支持している。

以上から、*in situ* FT-IR と古典的な組織学的解析手法を組み合わせることで、CB-NP の胎児期曝露に起因するアストログリオシスや PVM の組織病理学的異変は、脳血管周囲におけるタンパク質の構造変化体の集積に起因している可能性が考えられた。さらに、CB-NP の胎児期曝露群の脳血管周囲において β -sheet 構造の割合が高い値を示したのは、タンパク質の構造変化体の除去が、その生成に追いついておらず、そのタンパク質が血管周囲に蓄積したためであるという可能性を示唆している。

3.4.7. タンパク質構造変化体の過剰な集積が誘導する中枢神経疾患

本章の最後に、CB-NP の胎児期曝露によって組織学的異変が生じた脳血管周辺における β -sheet rich protein の集積と中枢神経疾患との関わりについて議論し、その臨床学的意義について考察する。近年報告された疫学研究により、ナノ粒子を多分に含む大気汚染が、発達期の脳における神経血管単位 (neurovascular unit) に対して慢性的な傷害を与えることが示され、それにより、孤発性のアルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患が発症しやすくなることが示唆された (Calderón-Garcidueñas et al., 2013, 2016a,b; Heusinkveld et al., 2016)。異常構造を持つタンパク質の増加は、タンパク質と細胞膜の過剰な相互作用、誤ったタンパク質局在の誘導、細胞や他のタンパク質の劣化の促進、タンパク質凝集体の形成やその沈着の原因となり、最終的には正常な機能を持つタンパク質の減少と異常な毒性を持つタンパク質の増加を引き起こし、神経変性疾患の発症へと繋がる (Bucciantini et al., 2002; Gidalevitz et al., 2010)。実際に、異常な構造を持つタンパク質の沈着は、アルツハイマー病やパーキンソン病を含むほとんど全ての神経変性疾患で観察されている (Soto and Estrada, 2008)。それゆえに、タンパク質の異常構造体は、老廃物や不要物として適切に排出されることが、中枢神経系の正常な機能と恒常性を維持するために必須

となる。とくに、神経変性疾患の原因となるタンパク質の多くは、もともと β -sheet 構造の含有比が高いか、もしくは、正常な構造から異常構造への変化にともなって β -sheet 構造の含有比が高くなることが明らかになっている (Zerovnik, 2002; Meredith, 2005; Gidalevitz et al., 2010)。また、 β -sheet 構造の含有比の高い構造への変換によってタンパク質の細胞毒性が上昇することも報告されている (Bucciantini et al., 2002)。赤外分光分析を用いた研究により、アルツハイマー病やパーキンソン病の神経病理学的マーカーであり、患者の脳内で沈着が認められる amyloid- β や Lewy bodies は、主として β -sheets 構造によって構成されていることが明らかにされた (Choo et al., 1996; Araki et al., 2015)。ハンチントン病の場合、ハンチンチンタンパク質の構造が β -sheet-rich に変化し、それに伴って、細胞毒性を示すオリゴマーの形成や繊維化が進むことが明らかになった (Smaoui et al., 2016)。クロイツフェルトヤコブ病や牛海綿状脳症に代表されるプリオン病の原因物質とされるプリオンタンパク質の二次構造は、 α -helix 構造が β -sheet 構造に変化することで毒性を発現することが明確に示されている (Ronga et al., 2007; Baskakov, 2009; Coleman et al., 2009)。したがって、 β -sheet-rich proteins の増加と集積は、神経変性疾患の発症の鍵となることが予測されている。先行研究の知見と本研究によって得られた結果から、周産期におけるナノ粒子の経気道曝露は、 β -sheet-rich proteins の増加と集積を伴う、神経変性疾患の発症リスクを上げる可能性が示唆された。とくに、CB-NP 胎児期曝露群の脳血管周辺における β -sheet 構造の増加とアストロサイトの GFAP と Aqp4 の発現変動は、局所的な神経変性によって観察される病態所見と酷似する (Maragakis and Rothstein, 2006; Foglio and Rodella, 2010)。したがって、本研究では、*in situ* FT-IR 法と古典的な組織学的解析手法を組み合わせることで、ナノ粒子の胎児期曝露によって生じる神経変性疾患の早期病態変化を捉えた可能性がある。これは、ナノ粒子を多分に含む大気汚染の周産期曝露によって生じる中枢神経疾患の理解を加速させるうえで、重要な所見となる。

3.5. 小括

本章では、ナノ粒子の胎児期曝露によって生じる脳血管周辺の組織学的異変を網羅的かつ定量的に理解することを目的として、*in situ* FT-IR と古典的な組織学的解析を組み合わせで行った。脳血管周辺組織から赤外吸収スペクトルを取得し、解析を行った結果、CB-NP の胎児期曝露によって Amide I 領域のピークが高波数から低波数へとシフトすることが明らかになった。さらに、このピークシフトは、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顕著であることが示された。タンパク質二次構造解析によって、この Amide I 領域のピークシフトは β -sheet 構造の割合の増加を表していることが明らかになり、とくに、CB-NP 胎児期曝露群の組織学的異変の生じている血管に最も隣接した区画において統計学的有意な β -sheet 構造の割合の増加が確認された。これらの結果は、CB-NP の胎児期曝露によって脳血管周辺に生じた組織学的異変は、 β -sheet rich protein の増加を伴うことを示している。この β -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 での発現亢進が認められた。タンパク質の構造変化体の集積は、その周囲で小胞体ストレスを誘導することが報告されているため (Gulyaeva, 2015)、組織学的異変の認められる脳血管周辺で増加した β -sheet rich protein は、脳血管に集積したタンパク質の構造変化体である可能性が示唆された。

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、 β -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、その構造変化体は脳内の老廃物排出機構によって脳血管周辺へ排出、集積され、その集積によ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 (Fig. 3-11)。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 の組織病理学的異変が引き起こされたと考えられる (Fig. 3-11)。したがって、ナノ粒子の胎児期曝露による脳血管周辺の組織学的異変は、出生児の脳内に生じたタンパク質の構造変化体の集積とそれに伴う小胞体ストレスの亢進に起因すると考えられる (Fig. 3-11)。

本研究の成果は、空気中に浮遊するナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺の組織学的異変を誘導する機序の一端を解明し、ナノ粒子を多分に含む大気汚染の周産期曝露が中枢神経系の異変を誘導する原因として、粒子によるタンパク質の構造変化体の脳血管周辺における集積が重要な因子であることを示唆した。本研究は、脳血管周辺における赤外吸収スペクトルを血管からの距離別に測定、解析した初めての研究であり、本研究から得られた新奇的な知見は、妊娠期の環境刺激に起因する中枢神経疾患の機序解明に貢献し、治療

や予防に向けた一助となることが期待される。

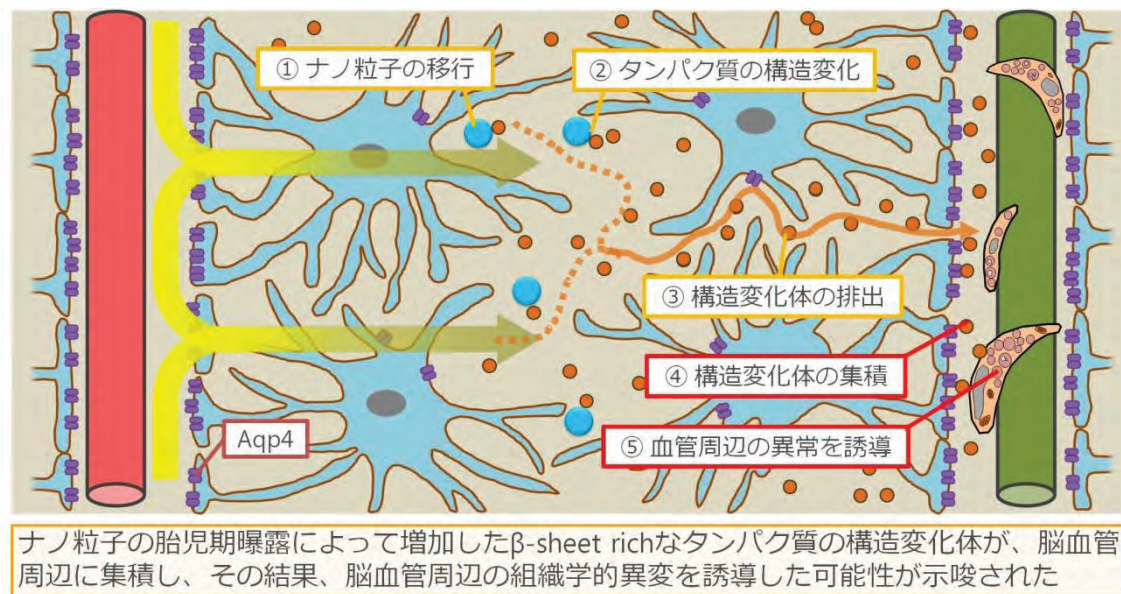


Fig. 3-11. 本研究により提唱された、ナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺に組織病理学的異変を誘導する機序の一端

第4章 吸入曝露法を用いた 出生児の中枢神経機能に及ぼす影響の解明

4.1. 背景、目的

ナノ粒子を含む、空気中に浮遊する粒子の主要な曝露経路は、気道を解した吸入による呼吸器への曝露である (Ema et al. 2016b)。第2章、第3章においても、経気道曝露法の一つである点鼻投与を用いて、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を解明すべく、研究を進めた。ナノ粒子の主要な曝露経路である経気道曝露法を模倣する手法として、主に ① 点鼻投与法、② 気管内投与法、③ 吸入曝露法 の3種類が存在する (Fig. 4-1)。ナノ粒子の経気道曝露による影響を評価する上では、各々の曝露法の特徴を踏まえて、研究目的に合致した手法を選択することが大切である。

①の点鼻投与法は、ナノ粒子の懸濁液を麻酔下の動物の鼻腔内へと投与する手法である。この手法は3種類の経気道曝露の中で動物への負担が最も小さく、特別な設備・備品等が不要で、曝露量の制御が比較的容易である点が利点として挙げられる。そのため、点鼻投与法は妊娠動物への曝露に適しており、ナノ粒子の発達毒性を評価するための初期段階に選択される手法である。しかしながら、投与手技によっては、胃や口腔へ移行して、呼吸器へ確実に曝露することができない場合があり、実験者の技量によってばらつきが生じやすいといった欠点がある。

②の気管内投与法は、気管内にマイクロスプレーヤーを挿入し、呼吸器へと直接投与する手法であるため、呼吸器へと確実に曝露できたのか判断できる。曝露量の厳密な調節も可能であり、ナノ粒子懸濁液を噴霧するため、点鼻投与法よりも実際の曝露に近い形式の投与とされている。しかしながら、動物への負担は3種の手法の中で最も大きく、妊娠期間中の曝露は基本的に1回が限度である。また、麻酔を長時間作用させる必要があることや、マイクロスプレーヤーが咽頭や気管に接触することなど、毒性を評価するうえで好ましくない条件が含まれているのも事実である。

本研究で用いた③の吸入曝露法は、点鼻投与法や気管内投与法とは異なり、懸濁液を強制的に投与するのではなく、空気中に分散させた粒子を動物の自発呼吸によって能動的に吸入させる手法である。実際の現実社会において、空気中に浮遊する粒子のヒトへの曝露は、一過性に生じるものではなく、持続的なものである (Oberdörster et al., 2005)。これは、点鼻投与法や気管内投与法のように、短時間で急速に曝露を完結させる手法では再

現することが困難であり、唯一、吸入曝露法が持続的な曝露の模倣を可能とする (Oberdörster et al., 2005)。事実、吸入曝露法を用いた研究は実際の曝露により近い実験デザインであるとされ、その研究から得られた科学的知見は、浮遊粒子の曝露に起因するハザードやリスクを評価するうえで最も重要視される。吸入曝露法には、専用の大型設備が必要であることや、動物に取り込まれた粒子の量を計測することが不可能である点など、不都合な点が見受けられる事実はある。それを踏まえてもなお、ナノ粒子のリスク評価や予防法の確立に必要とされる決定的な知見の不足を補うために、現実社会での曝露に最も相似した吸入曝露法を用いてナノ粒子の生体影響を明らかにすることが、国際的に強く求められている。

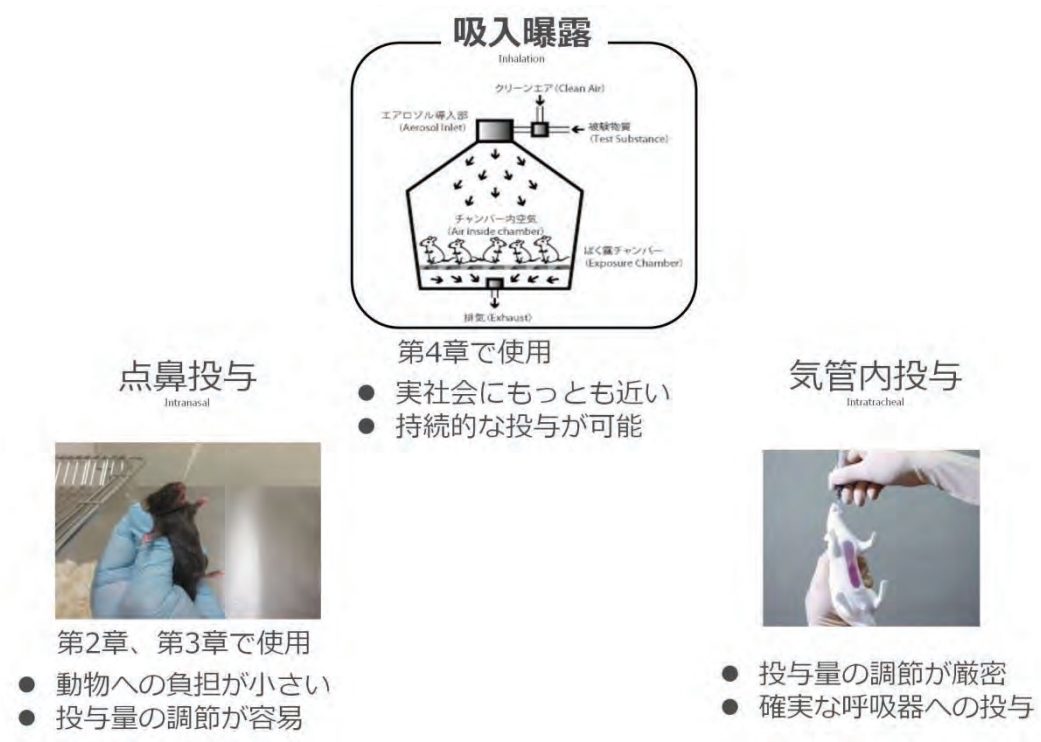


Fig. 4-1 経気道曝露の種類とその特徴

ナノ粒子の吸入曝露法による発達神経毒性の評価が求められる一方で、大半の先行研究では、血中 (Yamashita et al., 2011)、皮下 (Takeda et al., 2009)、気管内 (Jackson et al., 2012)、鼻腔 (Onoda et al., 2014, 2017) への投与を曝露経路として用いており、ナノ粒子の妊娠期吸入曝露による出生児の脳への影響を検証した研究報告はほとんど存在しなかった (Table 4-1)。近年になり、濃縮した浮遊粒子を周産期に吸入曝露させ、児の中樞神経系に生じる異変を評価する研究が増えてきた (Allen et al., 2015)。本研究では、CB-NP の妊娠期吸

入曝露が出生児の中樞神経系に及ぼす影響を明らかにすることを目的として取り組んだ。とくに、第1章で確認されたアストロサイトとPVMの組織学的異変を指標にして、妊娠期における吸入曝露が、出生児の脳に対して、点鼻投与と同様の生体応答を引き起こすのかを検証した。さらに、行動変化と組織病理学的変化の観点から、中樞神経機能に焦点を当てた表現形についても追及することで、ナノ粒子の妊娠期吸入曝露が引き起こす発達神経毒性の毒性学的意義についてより深く考察した。

Table 4-1 ナノ粒子の発達神経毒性を検証した先行研究

NP	Exposure	Main outcomes	Source
CB-NP	点鼻投与	<ul style="list-style-type: none"> 脳血管周辺の組織病理学的変性 曝露量依存的なアストログリオシスの誘導 	Onoda et al. 2014 Onoda et al. 2017
CB-NP	気管内曝露	<ul style="list-style-type: none"> 新奇環境下における行動変化 	Jackson et al. 2011
MWCNT	気管内曝露	<ul style="list-style-type: none"> 自発運動量の増加 	Hougaard et al. 2013
TiO ₂ -NP	吸入曝露	<ul style="list-style-type: none"> 不安様行動の増加 瞬目反射と驚愕反応の大幅な抑制 	Hougaard et al. 2010
TiO ₂ -NP	皮下投与	<ul style="list-style-type: none"> 中樞神経機能と疾患に関与する遺伝子群の発現変動 大脳皮質前頭前野におけるドパミン分泌量の増加 抑うつ様行動の増加 	Shimizu et al. 2009 Takahashi et al. 2010 Cui et al. 2013
Ag-NP	皮下投与	<ul style="list-style-type: none"> モノアミン酸化酵素遺伝子の発現亢進 空間認知機能の減退 	Wu et al. 2015 Fatemi et al. 2017
ZnO-NP	口腔内投与	<ul style="list-style-type: none"> 学習と記憶機能の減退 ドパミンとセロトニンの代謝異常 	Xiaoli et al. 2017 Okada et al., 2013

4.2. 材料と方法

4.2.1. 試薬類

本研究で用いた試薬はとくに記述の無い場合は、全て市販試薬特級を用いた。

4.2.2. 使用動物の飼育環境と曝露条件

60匹の未経産雌性マウス (NMRI, Taconic Europe, Ejby, Denmark) を用意し、交尾させた。妊娠3日の妊娠マウスをランダムに透明のポリペプチドケージ (open cage system, 1296D Eurostandard Type 3) に、1ケージあたり5匹ずつ振り分け、aspen bedding (Tapvei, Estonia) を床材として用いて、一定の環境下 (light 6 a.m. to 6 p.m., temperature 21°C ± 2°C and humidity 50 % ± 5 %) で飼育を行った。飼育ケージ内にはマウスの寝床 (80-ACRE011, Techniplast, Italy)、ヤマナラシの小型の木片 (Tapvei, Estonia)、巣材 (Enviro Dri, Lillico,

Biotechnology, UK) を用意し、水と餌 (Altromin 1314) に自由に摂取できる環境を準備した。その後、妊娠マウスを20匹ずつ3つのグループにランダムに振り分けた。飼育に関しては、デンマークの動物実験規則(Permit 2015-15-0201-00569) と EC Directive 86/609/EEC を遵守し、正式な手続きを踏まえたうえで実験を遂行した。

4.2.3. 投与物質

ナノ粒子は第2章 (2.2.3.) に記した CB-NP と同一のものを使用した。

4.2.4. 曝露方法

NMRI マウスに対して、妊娠4から18日にかけて、1日45分間、CB-NPを吸入曝露させた。吸入させたCB-NPの濃度は、対照群で0 mg/m³ (filtered clean air)、低用量群で4.6 mg/m³、高用量群は37 mg/m³ となるように設定した。この曝露量は、デンマークの労働環境下における曝露基準値3.5 mg/m³を、低用量群は1時間吸入した場合、高用量群は8時間吸入した場合を想定して設定した (Arbejdstilsynet 2016)。回転ディスク粉末エアロゾル装置 (Fraunhofer Institute für Toxicologie und Aerosolforschung, Hannover, Germany) を使用して、5気圧の負荷をかけてノズルからCB-NPを放出し、空気中に分散させた (Fig. 4-2)。送風装置は曝露チャンバー内でCB-NPを均一に分散できるように設計され、1分当たり20 Lの気体をチャンバー内に送り込むように調節された。曝露チャンバーには、“12枚のパイ生地状”に区分けされた区画 (部屋) があり、妊娠マウスをそれぞれの区画に1匹ずつ入れて、曝露した。チャンバーの大きさは、直径29 cm、高さ9 cmの円筒形であり、これがワイヤメッシュにより12区画に仕切られている。妊娠マウスは曝露終了後は、曝露以外の毒性影響が出ないように5分以内に元のケージに戻した。

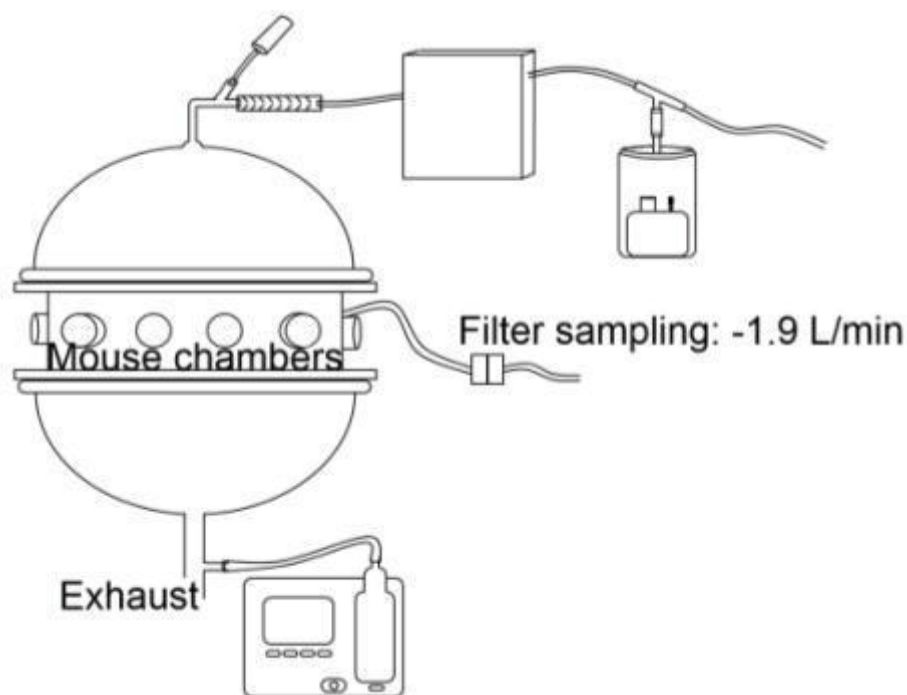


Fig. 4-2 実験に使用した吸入用曝露チャンバーの模式図

4.2.5. 曝露物質のモニタリング

チャンバー内の空気中に分散している全粒子の質量濃度は常にモニタリングされ、曝露濃度が各群の指定の濃度になるように制御されている。曝露させた空気を1分あたり2Lの速度で Millipore Fluoropore filters (直径 2.5 cm; 孔径 0.45 μm 、事前に秤量済み)に通してナノ粒子を捕集した。捕集した粒子の重量は、Sartorius Microscale (Type M3P 000V001)を用いて計測した。空気中に含まれる粒子の数と空気力学的粒度分布は、Electrical Low Pressure Impactor (ELPI, ELPI+, Dekati Ltd., Tampere, Finland) を用いて計測した。この測定機器は、6 nm から 10 μm までの粒径を持つ粒子を計測することが可能である。対照群については、粒径 10 nm から 1 μm の粒子を計測することのできる、condensation particle counter TSI model 3007 (CPC; TSI Inc., Shoreview, MN, USA) を用いて計測した。

4.2.6 児の分娩とサンプルの採取

曝露を終えた妊娠 18 日目の母マウスは、1 匹ずつ独立したケージ内に移された。全ての妊娠マウスの出産は、妊娠 20 日目に起こり、この日を出生 0 日目と定義した。出生 21 日目までは、母マウスと出生児を一緒にケージ内で飼育した。その後、6 週齢の雄性産児を脳の GFAP 発現解析に、出生 25 日目ならびに 120 日目の雄性産児と雌性産児をパルブ

アルブミン陽性介在ニューロンの解析に、出生 12 週齢の雄性産児と雌性産児をオープンフィールドの行動試験に使用した。なお、母マウス 1 匹につき、それぞれの解析に 1 匹の出生児を使用した。動物の解剖は、無菌の生理食塩水を用いて調製した 3 種の混合麻酔 (Zoletil Forte 250 mg/ml、Rompun 20 mg/ml、Fentanyl 50 µg/ml) を腹腔内に投与し (0.1 ml/25 g body weight)、麻酔下で安楽死させて行った。出生 9 日目に当たる日に、交配に失敗した雌性マウスに、また、出生 26-27 日目に当たる日に、出産後に飼育する子がいなくなった母マウスに、3 種の混合麻酔を用いて安楽死させ、気管支肺胞洗浄 (BAL) を施し、気管支肺胞洗浄液 (BALF) を採取した。

4. 2. 7. BALF の前処理と解析

母マウスからの BALF の採取は、滅菌した生理食塩水 0.8 mL を、気管を通して、肺の中を 2 回洗浄することで採取した。採取した BALF に氷上で保管し、その後、400×g、10 分間、遠心分離処置を行った。遠心分離によって沈殿した BALF 中の細胞は、100 µl の細胞培地 (HAM F-12 with 1% penicillin/streptomycin and 10% fetal bovine serum) により、再懸濁された。BALF 中に含まれていた細胞の中で、生存細胞数と死亡細胞数 NucleoCounter NC-200TM (Chemometec, Denmark) を用いて定量した。また、再懸濁した細胞溶液を、さらに、55 × g で 4 分間、Cytofuge 2 (StatSpin, TRIOLAB, Brøndby, Denmark) を用いて遠心分離した後、スライドガラス上に滴下し、96% ethanol で 5 分間固定処理を施した。その後、すべてのスライドガラスに対して、May-Grünwald-Giemsa 染色を施し、顕微鏡観察を行うことで、各細胞種の比率を評価した (Wallin et al. 2017)。この顕微鏡観察では、1 サンプルあたり、200 個の細胞を観察した。

4. 2. 8. Saa3 mRNA の発現解析

Maxwell® 16 (Promega, USA) と Maxwell® 16 LEV simply RNA Tissue Kit (AS1280, Promega, USA) を用いて、肺組織 (16-20 mg) から RNA を単離した。単離した RNA は、50 µl の nuclease free (DEPC) water を用いて溶出された。その後、Taq-Man® reverse transcription reagents (Applied Biosystems, USA) を用いて、DNase を処置した RNA から、cDNA を作製した。total RNA と cDNA の濃度は、NanoDrop 2000c (ThermoFisher, USA) を用いて計測した。Saa3 mRNA の発現レベルは、内在性のコントロール遺伝子である 18S RNA を基準にして、定量的 RT-PCR 法により評価した (Saber et al. 2009)。すべてのサン

ルは、ViiA7 Real-Time PCR (Applied Biosystems, USA) を用いて測定した。Saa3 のプライマーとプローブは、Saa3 forward: 5' GCC TGG GCT GCT AAA GTC AT 3'、Saa3 reverse: 5' TGC TCC ATG TCC CGT GAA C 3'、Saa3 probe: 5' FAM-TCT GAA CAG CCT CTC TGG CAT CGC T-TAMRA 3' であり、Saa3 のプローブシーケンスは、Saa3 forward: 5' GCC TGG GCT GCT AAA GTC AT 3'、Saa3 reverse: 5' TGC TCC ATG TCC CGT GAA C 3'、と Saa3 probe: 5' FAM-TCT GAA CAG CCT CTC TGG CAT CGC T-TAMRA 3' である。すべての解析において、TaqMan predeveloped mastermix (Applied Biosystems, USA) を使用した。Saa3 mRNA の相対的な発現量は、 $2^{-\Delta Ct}$ 法により算出された。18S RNA 含有量が検量線の直線範囲外になった場合、mRNA 測定結果を除外した (Kyjovska et al. 2015)。解析時には、RNA を cDNA に変換していない陰性対照 (no template control) を組み入れて進めた。

4.2.9. オープンフィールドテスト

オープンフィールドテストは日中に行われた。曝露群の個体と対照群の個体を交互にテストした。動物は、テストを行う1時間前に実験室へと移された。実験者はすべてブラインドされ、実験動物がどのグループに所属するのか不明な状態で行った。そして、すべての実験を同じ実験者が遂行した。自発活動量は、オープンフィールド (直径 100 cm) 内で、初動3分間の運動量より評価した。被験マウスのオープンフィールド内におけるマウスの位置は、Noldus Ethovision XT version 5 により記録され、その結果から、中央滞在時間を算出した。慣れの試験を行うために、トラッキングデバイスを用いて初動3分間の運動量を1分ごとに分けて解析を行った。オープンフィールド内の中央滞在大および壁に近い周辺部に滞在する時間を測定する際、その間にまたがっている時間はすべて排除した。

4.2.10. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法

摘出した6週齢出生児の脳組織を4%パラホルムアルデヒド含有0.1 Mリン酸緩衝固定液 (pH7.4) で24時間固定した。固定後に防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ10%、20%、30%スクロース/PBSに、それぞれ4時間、4時間、12時間浸漬させることで凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ10 μm の連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で24時間乾燥させた。

パラフィン切片は、キシレンを用いて脱脂を行い、99.5%、95%エタノールにそれぞれ

れ2回ずつ通した後、精製水になじませた。凍結切片は精製水を用いて OCT コンパウンドを除去した。一度 PBS になじませた後、0.3% H₂O₂ を含んだ PBS に 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBS で各 5 分間、3 回洗浄し、10 % の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience, Mukilteo, WA, USA) を 60 分間反応させ、ブロッキング操作を行った。再び PBS で 5 分間 3 回洗浄し、0.1% トリトン X を含む PBS (PBS-Tx) で 1000 倍に希釈した rabbit anti-mouse GFAP polyclonal antibody (Code-No. Z0334; DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) 溶液を 4°C で 16 時間反応させた。一次抗体の反応終了後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PBS-Tx で 1000 倍に希釈した、ビオチン標識済みの Donkey anti-rabbit IgG polyclonal antibody (AP182B; Chemicon, Temecula, CA, USA) を室温で 120 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PAS-Hematoxylin 染色の行程に進んだ。精製水に 1 分間通した後、1% 過ヨウ素酸水溶液に 3 分間反応させて、糖類を酸化させた。精製水で 1 分間洗浄し、コールドシッフ試薬に 60 分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水に 3 回、各 3 分間通すことで、反応を停止させ、かつ表面のシッフ試薬を洗い落とした。精製水で 1 分間洗浄し、免疫組織学法の発色過程に進んだ。PBS に 1 分間通した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼが結合したアビジン-ビオチン複合体 (Vectastain ABC peroxidase kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を PBS で 400 倍に希釈し、二次抗体に 200 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 3 回、各 5 分間洗浄し、0.01% H₂O₂ を使用直前に添加した 0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン/0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.6) をアビジン-ビオチン複合体に 20 分間反応させ、発色させた。発色の反応途中で、GFAP を高発現している繊維型アストロサイトが多く存在する脳梁領域は、うすく茶色に染まるのが視認できる。発色終了後、切片を PBS に 1 分間通し、精製水で反応を止めた。その後、核染色は行わず、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。光学顕微鏡で完成したプレパラートの組織学的観察を行った。

4.2.11. GFAP の免疫蛍光染色

作製した切片に対して、10 % の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience) を用いて室温で 1 時間ブロッキングを行い、PBS を用いて 500 倍に希釈した一次抗体 goat polyclonal anti-GFAP antibody (code-no. ab53554, Abcam, Cambridge, UK) を 4°C で 16 時間反応させた。反応後、切片を常温の PBS で 3 回、各 5 分間洗浄し、PBS を用いて 1000 倍に

希釈した Dylight 488 標識二次抗体 donkey anti-goat IgG (code-no. 605-741-125, Rockland Immunochemicals Inc., PA, USA; 1:1000) を室温で 120 分反応させた。再度、常温の PBS で 3 回、各 5 分間、超純粋で 2 回、各 5 分間洗浄した後、Hoechst 33342 (code-no. 346-07951, Dojindo Laboratories, Kumamoto, Japan) を用いて核染色を施した。その後、常温の精製水で 1 回、5 分間洗浄し、退色防止封入剤 (Cell Signaling Technology) を用いてカバーガラス (R3702; Matsunami) で封入した。低温暗室で一晩放置し、蛍光顕微鏡 (BZ-9000; Keyence Co., Osaka, Japan) を用いて観察した。各マウス 1 検体につき、大脳縦裂から矢状面に沿って 30 の切片 (合計 300 μm) を作製し、そのうち、3 枚ごと (30 μm ごと) に 1 枚の切片を選択し、10 切片を観察した。

4. 2. 12. GFAP 発現量の定量解析

対照群、低用量群、高用量群それぞれにおいて、矢状面方向に厚さ 10 μm で薄切した脳の凍結切片を大脳縦裂から各個体 30 枚、計 300 μm 用意した。このうち、30 μm 以上の間隔を空けて、各個体から 3 枚選択し、45 枚 (対照群: $n = 4$; 低用量群: $n = 6$; 高用量群: $n = 5$) の切片全て同時に GFAP の免疫蛍光染色を施した。GFAP を検出するための、二次抗体の蛍光標識として Dylight 488 を使用した。

大脳皮質と海馬における GFAP の発現量を定量的に評価するため、蛍光顕微鏡 (BZ-9000) を用いて 40 倍の染色像を撮影し、TIFF 形式のデジタル画像を取得した。取得した画像を ImageJ software (National Institute of Health, MD, USA) で開き、定量解析に向けた処置を行った (Schneider et al. 2012)。蛍光標識である Dylight 488 を緑色の擬似カラーで観察したため、緑色チャンネルの輝度をグレースケールにコンバートした (Image J command, Image: Color: Split Channels)。染色像の輝度を示したグレースケールの画像は 40-80 にコントラストと明るさを調整し (ImageJ command, Image: Adjust: Brightness/Contrast)、蛍光を定量するための閾値を 70 に設定し、70 以上の輝度が白色に、70 未満の輝度は黒色に示されるように設定した (ImageJ command, Image: Adjust: Threshold)。解析に起因するばらつきをなくすために、このコントラストと明るさ、そして閾値はすべての切片で同一の条件にしたうえで、解析を進めた。その後、ヒストグラム分析を用いて GFAP を示す白色のピクセル面積を数値化することで、GFAP の発現強度を定量した (ImageJ command, Analyze: Measure after setting “Area” and “Limited to Threshold” in Image J command, Analyze: Set Measurement)。すべての準備と分析において、実験者は盲検状態で従事した。

4.2.13. パルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布の評価

パルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布を評価するために、出生25日目と120日目の対照群ならびに高用量群の個体から摘出した脳組織を使用した。摘出後、脳に対して4%パラホルムアルデヒドによる固定処置を施し、vibratome (Leica VT1000S, Leica, Germany) を用いて、脳組織を冠状面方向に薄切し、脳切片 (50 μm) を作製した。その後、作製した切片を浮遊法による免疫蛍光染色に使用した。組織切片に、0.4% Triton と 5% BSA in PBS を用いて30分間ブロッキング処理を行った後、rabbit anti-EGFP antibody (Invitrogen, Germany; 1:1000, 0.2% Triton, 5% BSA in PBS) を4°Cで1晩反応させた。その後、goat anti-rabbit 488 secondary antibody (Invitrogen, Germany; 1:10000, 0.2% Triton, 5% BSA in PBS) を室温で2時間反応させた (Khodosevich et al. 2012; García-González et al. 2017)。最後に、DAPI を用いて核染色 (1:1000 in PBS, 10 min at room temperature) を施し、Immunmount (ThermoScientific, Germany) を用いて封入した。

パルブアルブミン陽性介在ニューロンの観察は、共焦点顕微鏡 Leica SP8 (Leica Microsystems, Germany) を用いて行った。200倍に拡大した単層画像を取得し、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの定量解析に使用した。取得した画像はすべて同一条件で撮影し、Fiji/ImageJ software を用いて定量的に解析に使用された (Schneider et al., 2012)。

4.2.14. 統計解析

結果は全て、平均値 \pm 標準偏差 (SD) で示した。統計学的解析のために、Windows版のExcel 統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析のみ P 値が 0.01 未満の場合、ほかの解析では P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

BALF 中の細胞と Saa3 遺伝子の解析については、「曝露量」と「週齢」を要因とした二元配置分散分析を行った。オープンフィールドテストについては、「曝露量」と「性別」を要因とした二元配置分散分析を行った (Hougaard et al. 2005)。それぞれの解析について交互作用が確認された際、Fisher's Least-Statistical-Difference test (SYSTAT Software Package 9) によるペアワイズ比較分析を行った。GFAP の発現レベルについては一元配置分散分析を行い、その後、Tukey-Kramer の多重検定を行った。この統計解析には、Excel Statistics 2012 (Social Survey Research Information) を使用した。パルブアルブミン陽性介在ニューロンの

統計解析には、GraphPad Prism version 6.00 for Mac OS X (GraphPad Software, USA, www.graphpad.com) を使用し、データは一元配置分散分析と Student's t-test を用いた。

4.3. 実験結果

4.3.1. 曝露物質の物性

妊娠マウスの曝露に用いた CB-NP の重量濃度は、対照群で 0 mg/m^3 (filtered clean air)、低用量群で 4.6 mg/m^3 、高用量群は 37 mg/m^3 となるように設定した。実際に測定したナノ粒子 (450 nm 以下) の重量濃度は、対照群では検出限界以下であり、低用量群で $4.79 \pm 1.86 \text{ mg/m}^3$ 、高用量群は $33.87 \pm 14.77 \text{ mg/m}^3$ であった (Fig. 4-3, control not shown)。さらに、ナノ粒子の個数濃度は、対照群で $0.42 \pm 2.47 \times 10^2 \text{ 個/cm}^3$ 、低用量群で $3.62 \pm 5.33 \times 10^5 \text{ 個/cm}^3$ 、高用量群は $2.43 \pm 1.53 \times 10^6 \text{ 個/cm}^3$ と示された (Fig. 4-3, control not shown)。空気中における CB-NP の粒径分布は二峰性を示し、そのピーク粒径は約 100 nm と 300 nm であった (Fig. 4-3)。

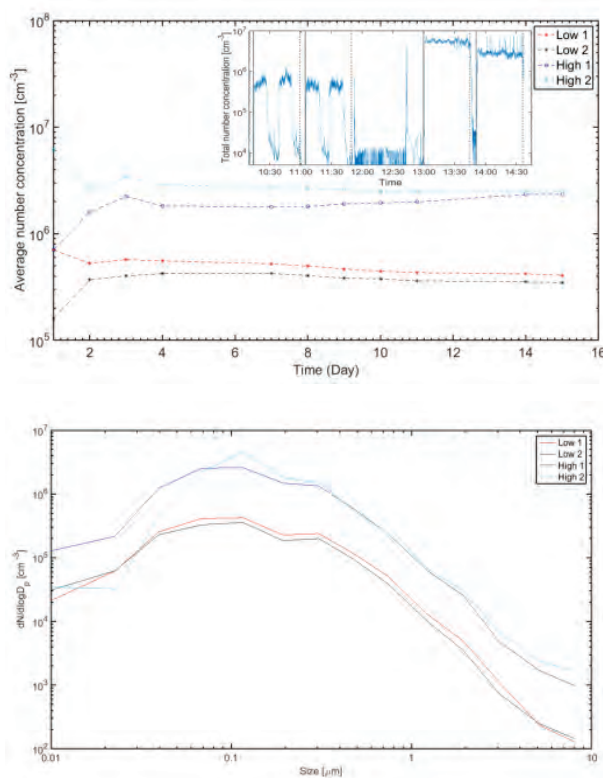


Fig. 4-3 ELPI+を用いて測定した、空気中に分散させたカーボンブラックナノ粒子の個数粒子濃度と平均粒径分布

4.3.2. 母マウスにおける呼吸器の炎症応答

CB-NP を吸入曝露させた母マウスの肺において、炎症応答が誘導される可能性が考えられたため、BALF 中の総細胞数と細胞比、肺組織中の急性期炎症タンパク質 Saa3 (Serum Amyloid A: 炎症応答の鋭敏なマーカー) の遺伝子発現解析を行った。いずれの群間において、BALF 中総細胞数および細胞比に、統計学的有意な差は認められなかった。なお、細胞比に関して、細胞数が 200 個以下のスライドは、定量解析のデータから除外したため、n 数に変動が生じた (n=4-13)。また、Saa3 mRNA の発現量に関しても、いずれの群間で統計学的有意な差は認められなかった (Data not shown)。

4.3.3. 出生児における GFAP の発現と PVM の変化

出生児の脳の凍結切片に対して PAS-GFAP 重染色法を行い、アストロサイトと PVM の組織学的変化やその分布について評価した。その結果、大脳皮質の脳血管周辺に存在するアストロサイトに、CB-NP の妊娠期吸入曝露による、GFAP の用量依存的な発現亢進が認められた (Fig. 4-4)。さらに高用量群の中で、アストロサイトの GFAP が発現亢進している血管に、消化顆粒の肥大化した PVM が確認された (Fig. 4-4)。

PAS-GFAP 重染色法の結果を受け、免疫蛍光染色法を活用し、大脳皮質と海馬における GFAP の発現量を定量的に評価した。その結果、高用量群の大脳皮質における GFAP の発現量が、低用量群や対照群と比較して統計学的有意に増加していることが示された (Cortex GFAP Fig. 4-5)。さらに、高用量群の海馬における GFAP の発現量が、低用量群や対照群と比較して統計学的有意に増加し (Fig. 4-5)、さらに、低用量群の海馬における GFAP の発現も対照群と比較して統計学的有意に増加していることが明らかになった (Hippocampus GFAP Fig. 4-6)。これらの結果は、出生児の大脳皮質および海馬におけるアストロサイト GFAP の発現量が、CB-NP の妊娠期吸入曝露によって用量依存的に亢進することを示している (Fig. 4-6)。

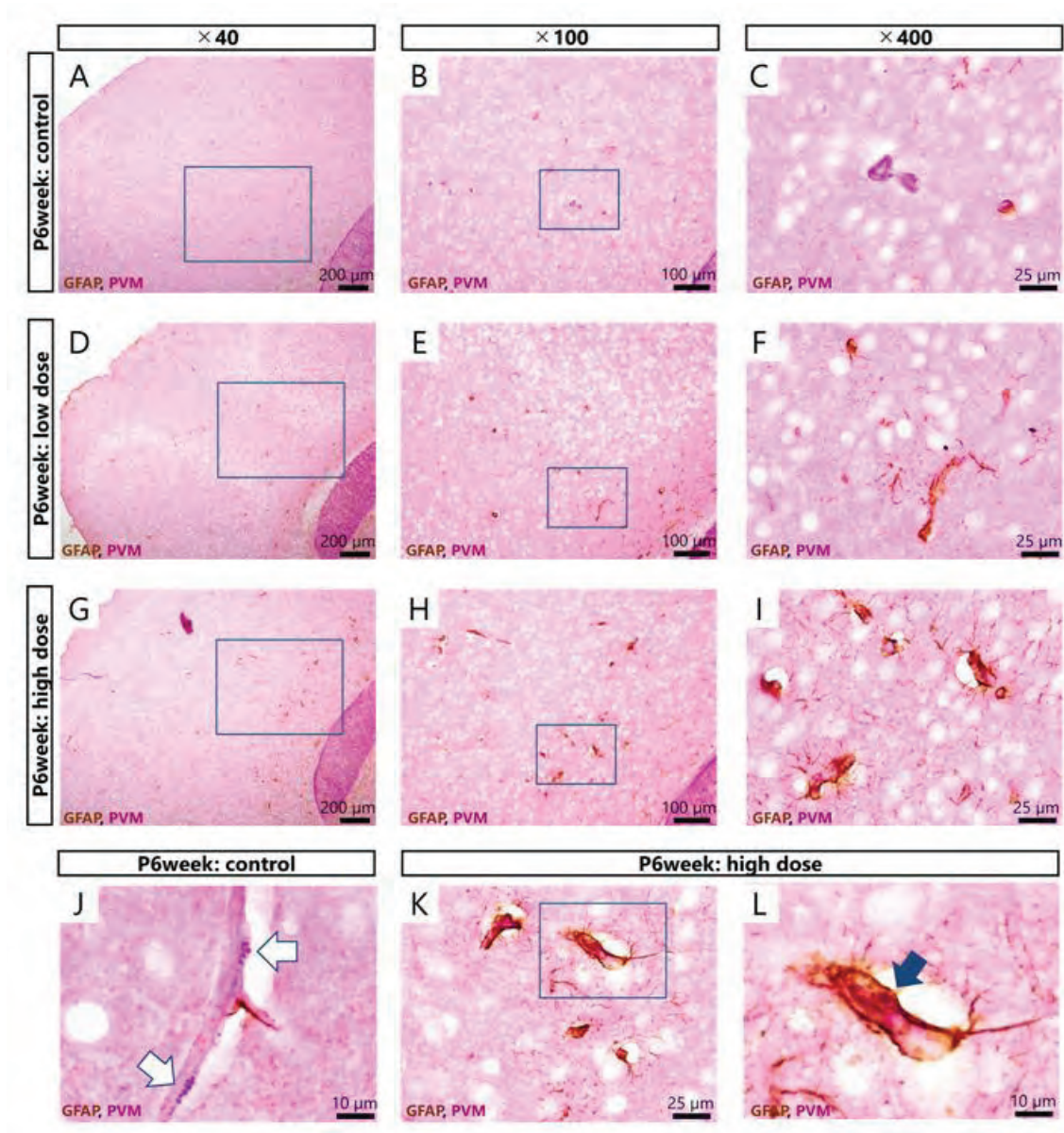


Fig. 4-4 カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に起因するアストログリオシスと脳血管周囲マクロファージの組織学的異変

A-C, J: 対照群。D-F: 低用量曝露群。G-I, K, L: 高用量曝露群。茶色に染色されているタンパク質が GFAP である。白矢印は正常な脳血管周囲マクロファージの消化顆粒を示している。青矢印は、脳血管周囲マクロファージの肥大化した消化顆粒を示している。スケールバーは A, D, G が 200 μm、B, E, H が 100 μm、C, F, I, K が 25 μm、J, L が 10 μm である。

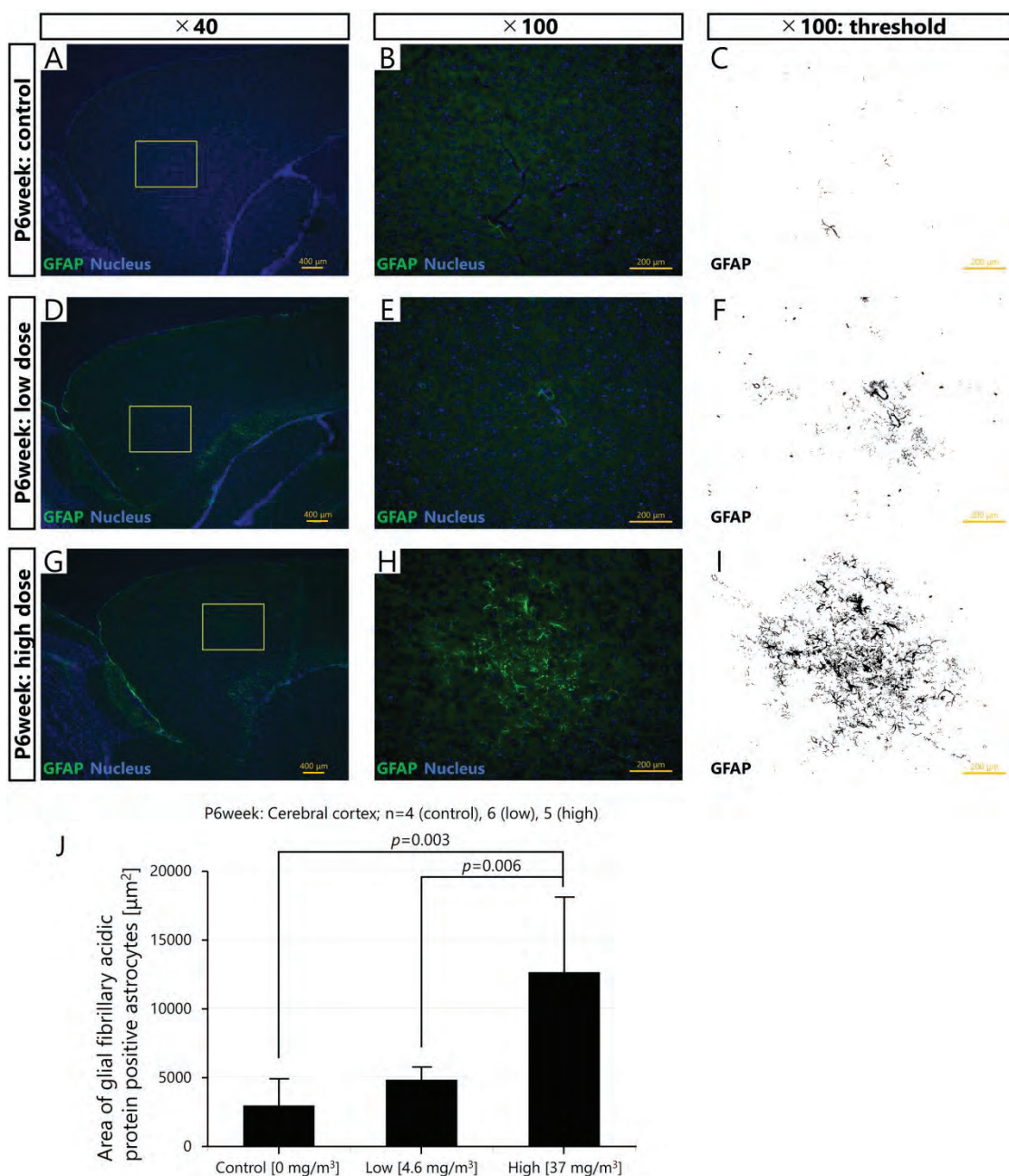


Fig. 4-5 大脳皮質におけるアストロサイト GFAP 発現亢進の用量依存性の検証

A-C: 対照群。D-F: 低用量曝露群。G-I: 高用量曝露群。緑色に染色されているタンパク質が GFAP で、青色が細胞核である。J: 全切片 (対照群 n=4、低用量群 n=6、高用量群 n=5、各個体 3 枚ずつの切片) 共通閾値を定めて白黒に変換した threshold の図を用いて定量化したグラフ。スケールバーは A, D, G が 200 μm、B, E, H が 100 μm、C, F, I が 25 μm である。

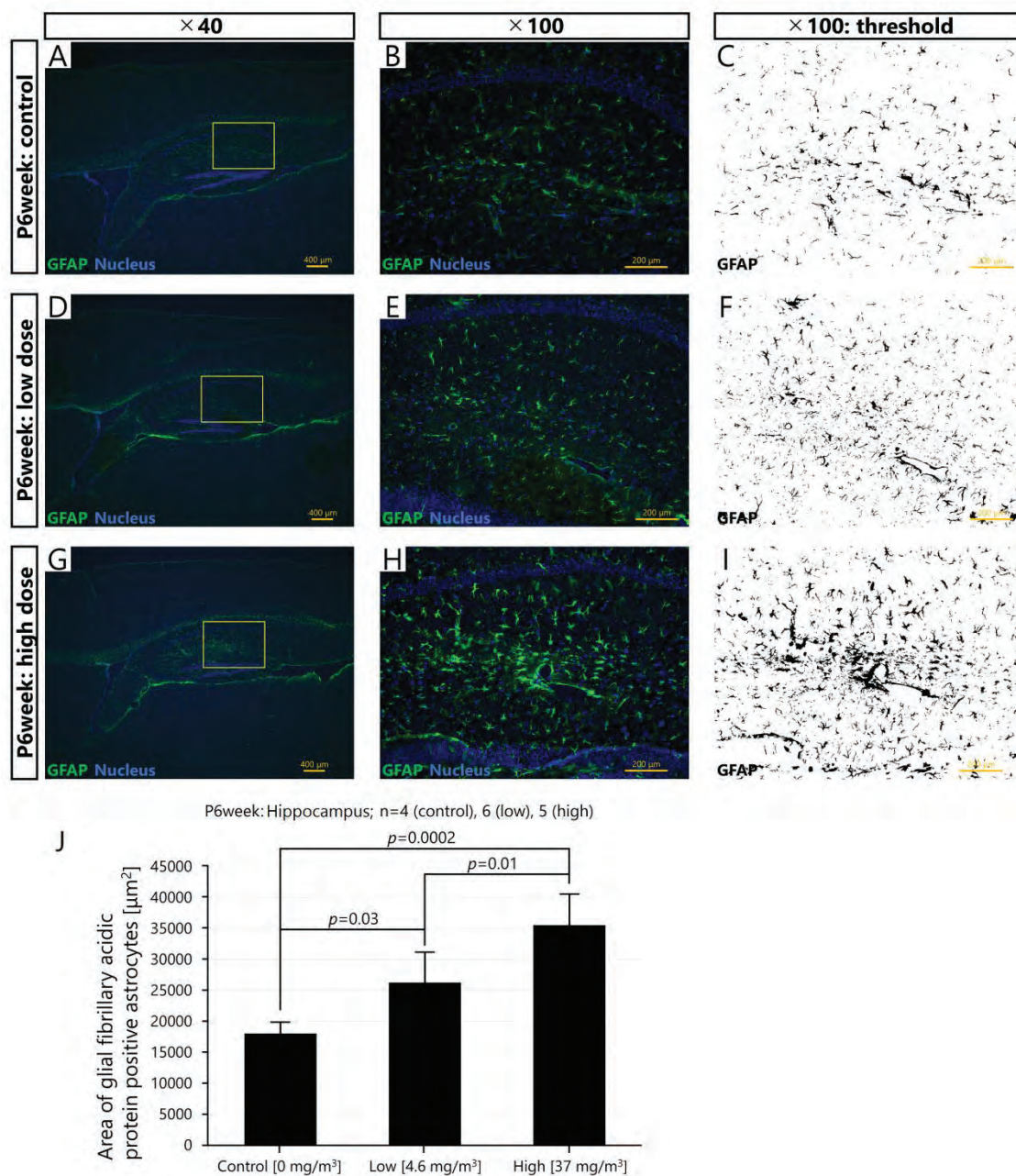


Fig. 4-6 海馬におけるアストロサイト GFAP 発現亢進の用量依存性の検証

A-C: 対照群。D-F: 低用量曝露群。G-I: 高用量曝露群。緑色に染色されているタンパク質が GFAP で、青色が細胞核である。J: 全切片 (対照群 n=4、低用量群 n=6、高用量群 n=5、各個体 3 枚ずつの切片) 共通閾値を定めて白黒に変換した threshold の図を用いて定量化したグラフ。スケールバーは A, D, G が 200 μm 、B, E, H が 100 μm 、C, F, I が 25 μm である。

4.3.4. 出生児の大脳皮質におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布

パルブアルブミン陽性介在ニューロンは発達期の中樞神経系において最も脆弱な細胞のひとつであり、その異変は発達神経障害の原因になることが示されている (Owen et al. 2016; Millan et al. 2016; Caballero and Tseng 2016; Meyer 2013; Rubenstein and Merzenich 2003)。そこで、CB-NP の妊娠期吸入曝露による大脳皮質前頭前野と運動野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンに対する影響を評価した。25 日齢の出生児の大脳皮質前頭前野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの分布を評価した結果、雄性産児と雌性産児いずれにおいても、対照群ではパルブアルブミン陽性介在ニューロンが多数確認されるのに対し、高用量群ではわずかし確認されなかった。とくに、定量的な解析の結果、この大脳皮質前頭前野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少は、大脳皮質前頭前野の上層部と下層部の両方で生じていることが明らかになった (Fig. 4-7A,C)。さらに、CB-NP の妊娠期吸入曝露に起因する、大脳皮質前頭前野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少は出生 120 日齢でも同様に確認された (Fig. 4-7D)。

一方で、興味深いことに、大脳皮質の運動野においては、上層部と下層部で異なる結果が示された。出生 25 日齢における高用量群の運動野上層部には多数のパルブアルブミン陽性介在ニューロンが確認できたのに対し、下層部のパルブアルブミン陽性介在ニューロンの細胞数は対照群と比較して減少傾向にあった (Fig. 4-7B,E)。この知見は、CB-NP の妊娠期吸入曝露による出生児のパルブアルブミン陽性介在ニューロンへの影響が、脳の領域によって異なる可能性を示している。出生 120 日齢の出生児については、25 日齢児の結果と異なり、高用量群の運動野上層部および下層部の両方において、CB-NP の妊娠期吸入曝露によるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの細胞数の減少が確認された (Fig. 4-7F)。さらに、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの細胞内におけるパルブアルブミンの発現量が、CB-NP の妊娠期吸入曝露によって、大脳皮質前頭前野と大脳皮質運動野の両方の領域で低下していることも示された。これらの結果は、統合失調症に認められる所見と酷似していた (Chung et al. 2016; Alshammari et al. 2016; Glausier et al. 2014; Mauney et al. 2013)。

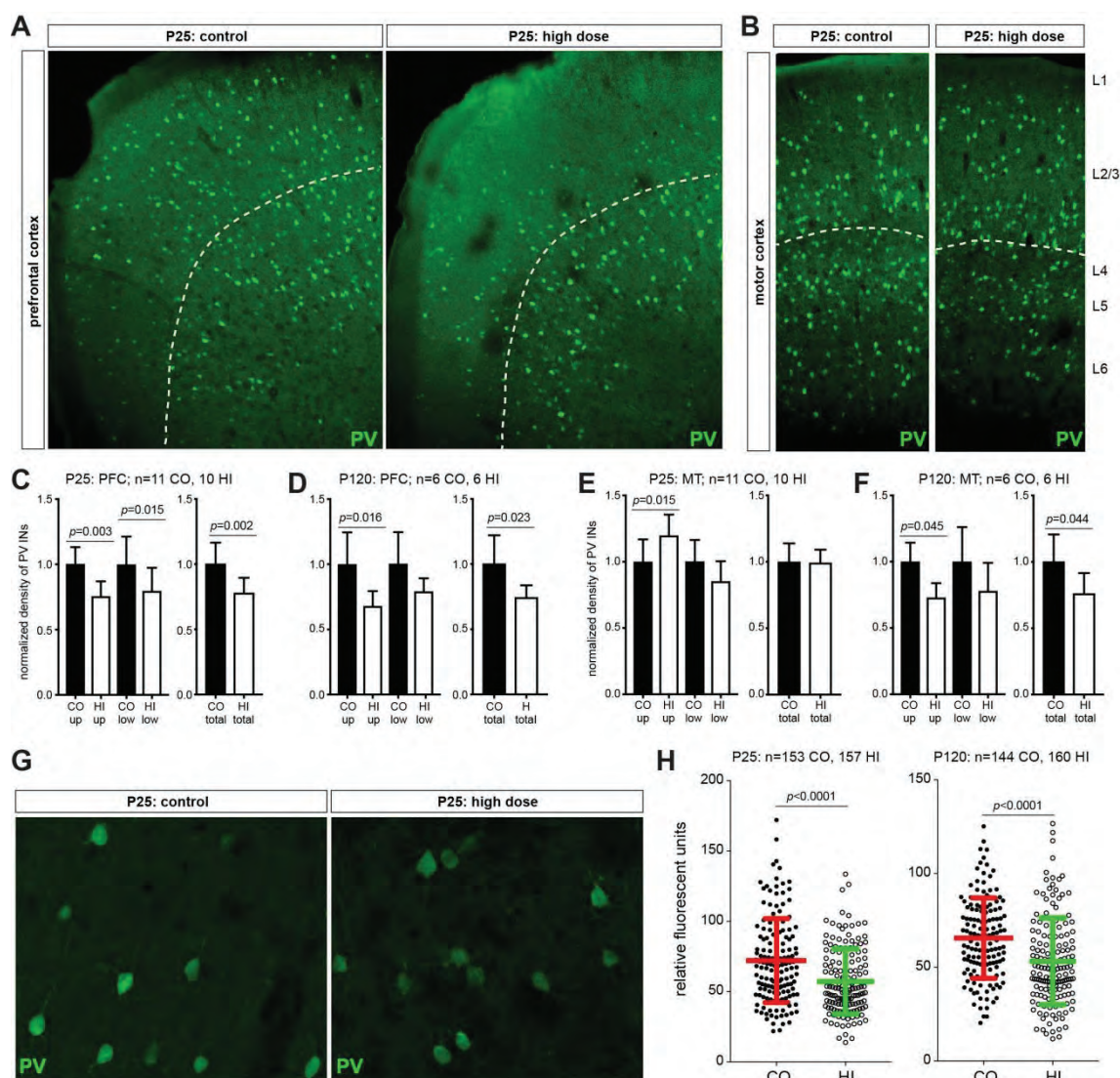


Fig. 4-7 大脳皮質におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロン (PV+IN) の定量評価

A: 出生後 25 日目の大脳皮質前頭前野。B: 出生後 25 日目の大脳皮質運動野。C: 出生後 25 日目の大脳皮質前頭前野における PV+IN を定量化したグラフ。D: 出生後 120 日目の大脳皮質前頭前野における PV+IN を定量化したグラフ。E: 出生後 25 日目の大脳皮質運動野における PV+IN を定量化したグラフ。D: 出生後 120 日目の大脳皮質運動野における PV+IN を定量化したグラフ。G: PV+IN のパルブアルブミン (緑色) 発現強度を比較した画像。H: 出生後 25 日目および 120 日目の大脳皮質に存在する PV+IN を、パルブアルブミンの発現強度別にプロットしたグラフ。

4.3.5. オープンフィールドにおける出生児の行動変化

オープンフィールドを用いた行動試験の結果 (Fig. 4-8)、対照群と比較して、CB-NP曝露群では総移動距離が長くなった (ANOVA; $p < 0.05$, Fig. 4-8A)。雌雄に分けて解析を進めた結果、雌性産児の総移動距離については、CB-NPの妊娠期吸入曝露による用量依存的な増加の傾向が見られ (ANOVA; $p = 0.025$, Fig. 4-8A)、さらに、雌性産児では、高用量群の総移動距離が、対照群と比較して統計学的有意に長かった (ペアワイズ比較; $p = 0.007$, Fig. 4-8A)。また、CB-NP曝露群の出生児は、対照群と比較して、中央に滞在している時間が統計学的有意に長いことが明らかになった (ANOVA; $p = 0.008$, Fig. 4-8B)。この中央滞在時間の結果は雌雄によって異なることも示された (ANOVA; $p = 0.006$, Fig. 4-8B)。とくに本結果は、雄性産児において顕著であり、高用量群と低用量群のいずれにおいても、中央滞在時間が対照群と比較して長かった (ペアワイズ比較: low: $p = 0.010$; high: $p = 0.034$, Fig. 4-8B)。加えて、CB-NPの曝露により、中央に滞在する時間だけでなく、中央に侵入する回数も増加した (ANOVA; Exposure: $p = 0.005$; Sex: $p = 0.001$; Exposure*Sex: $p = 0.028$, Fig. 4-8C)。雌雄別の解析から、この中央侵入回数は雄性産児で顕著であることが明らかになり (ANOVA; males: $p = 0.009$; females: $p = 0.096$, Fig. 4-8C)、低用量群および高用量群、両方の雄性産児が示した中央への侵入回数は、対照群と比較して統計学的有意にかつ顕著に多いことが示された (ペアワイズ比較; low: $p = 0.044$; high: $p = 0.043$, Fig. 4-8C)。これらの行動特性の変化は、CB-NPの妊娠期吸入曝露が、出生児の自発活動量を増加させ、新規環境下における不安の感じにくさを誘導している可能性を示している。

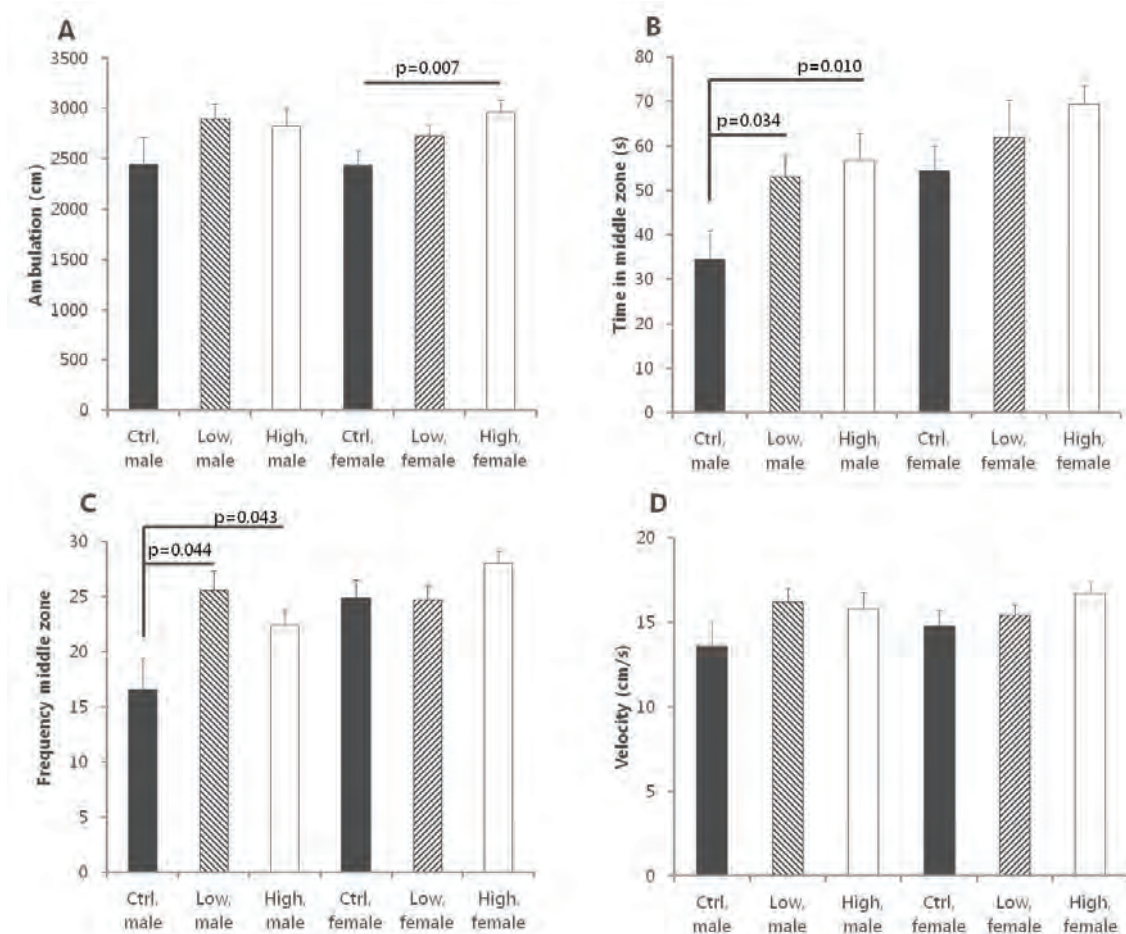


Fig. 4-8 オープンフィールドを用いた新奇環境下における行動試験の結果

A: 3分間の総移動距離。B: 中央滞在時間。C: 中央侵入回数。D: 移動速度。データは全て平均値 ± 標準偏差で示している。n=9-13。図中の p 値は Fisher's Least-Statistical-Difference test によるペアワイズ比較分析で算出された値を示している。

4.4. 考察

4.4.1. 実社会を想定した曝露経路と曝露量

本研究では、浮遊しているナノ粒子の曝露経路として想定される経気道曝露のうち、最も実社会に近い形態での曝露が可能である吸入曝露法を用いて研究に取り組んだ。さらに、本研究で準備した CB-NP の重量濃度は、低用量 4.8 mg/m^3 および高用量 33.9 mg/m^3 である。これを 1 日 45 分ずつ妊娠マウスに吸入させた。この曝露量は、デンマークにおける CB-NP を製造または使用する労働環境下の基準値 (35 mg/m^3) (Arbejdstilsynet 2016) から計算したものであり、低用量の曝露量は労働環境基準値の濃度を 1 時間吸い込んだ量、高用

量の曝露量は労働環境基準値の濃度を8時間吸い込んだ量に相当する。したがって、本研究で用いた曝露経路ならびに曝露量は、既存の研究と比較しても、実社会に極めて近く、実際の曝露をより正確に模倣している。本研究で得られた知見は、実際の社会でも生じることが十分に想定され、ナノ粒子の安全評価やその基準値の制定等に大きく貢献する。

4.4.2. 母体の呼吸器で確認されなかった炎症応答

本研究では、いずれの曝露濃度においても、母体の呼吸器における炎症応答は確認できなかった。CB-NPの亜慢性吸入曝露を行った先行研究は、 7.1 mg/m^3 または 52.8 mg/m^3 ; 6 h/day, 5 days/week for 13 weeks の条件で吸入曝露を行うと呼吸器に炎症応答が引き起こされるが、 1.1 mg/m^3 ; 6 h/day, 5 days/week for 13 weeks の条件で吸入曝露を行った場合には、呼吸器の炎症応答は誘発されないことを示している (Driscoll et al. 1996)。炎症応答が誘発されなかった条件を換算すると、1日あたりのCB-NP吸入曝露量は 6.6 mg/m^3 となり、一方で炎症応答が誘発された条件を換算すると、1日の曝露量は 43 mg/m^3 となる。さらに別の先行研究によると、BALF中に好中球の浸潤が確認される1日あたりのCB-NP吸入曝露量は 42 mg/m^3 であり (Jackson et al. 2012)、浸潤が引き起こされない曝露量は 30 mg/m^3 である (Saber et al. 2005)。本研究で用いた、1日あたりのCB-NP吸入曝露量は 3.6 mg/m^3 と 25 mg/m^3 (1日45分の曝露なので設定濃度の0.75倍) であり、先行研究で呼吸器に炎症や細胞の浸潤が確認されなかった曝露量よりも低いことがわかる。したがって、本研究で用いた曝露量により、母体の呼吸器において炎症応答が生じず、BALF中の細胞のポピュレーションが変化していなかったのは、妥当な結果であるといえる。また、これらの知見は、母体の呼吸器に炎症応答を誘導しない (あるいは検出できないレベルの炎症応答を誘導する程度の) ナノ粒子の曝露量であっても、胎児や出生児の脳に生体影響を引き起こすことを示している。第2章においても胎盤が顕著な影響を受けない程度の曝露量であっても、CB-NPの胎児期曝露は出生児の脳血管周辺に組織学的異変を誘導した。したがって、胎児などの発達期の脳は、ナノ粒子の曝露に対して鋭敏に応答し、その影響を受けやすい器官であると考えられ、これらの知見は、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支持している。

4.4.3. PVMとアストロサイトの組織病理学的変化

妊娠期におけるCB-NPの吸入曝露は、6週齢児の中樞神経系に存在するPVMの消

化顆粒に組織病理学的異変を誘導した。さらに、出生児の大脳皮質と海馬におけるアストロサイトのGFAPの発現が、CB-NPの妊娠期吸入曝露によって用量依存的に亢進することを、免疫蛍光染色法と画像処理技術を用いた組織定量解析により明らかにした。これらの研究成果は、点鼻投与方法を用いたCB-NP胎児期曝露が出生児の脳に引き起こす影響として、第2章で示した所見と酷似している。したがって、第2章、第3章で点鼻投与方法を用いて明らかになった結果は、吸入曝露によっても生じると考えられ、逆に本研究で認められた知見もまた点鼻投与で生じる可能性が高い。さらに、点鼻投与方法から得られた結果が実社会の曝露条件により近い吸入曝露法の結果に酷似していることから、点鼻投与方法はCB-NP妊娠期経気道曝露の投与方法として適した手法の一つであると考えられる。本研究成果により、これまで得られた知見の確かさが強調され、CB-NPの妊娠期吸入曝露によっても、妊娠期点鼻投与によっても、組織病理学的異変が生じるPVMと用量依存的に応答するアストロサイトは、ナノ粒子の発達神経毒性を評価、理解する上で重要であり、かつ信頼のおける評価指標であるといえる。

4.4.4. パルブアルブミン陽性介在ニューロンの組織病理学的変化

本研究で新たに解析したパルブアルブミン陽性介在ニューロンは、多くの先行研究により、妊娠期間中や発達期の環境刺激に対して最も脆弱な細胞の一つであると報告されている (Steullet et al. 2017; Boksa et al. 2016; Canetta et al. 2016; Meyer et al. 2008; Meyer et al. 2006)。とくに、この細胞は母体で生じる炎症応答や酸化ストレスに対して、鋭敏に応答することが示されている (Steullet et al. 2017; Boksa et al. 2016; Canetta et al. 2016; Meyer et al. 2008)。本研究では、CB-NPの妊娠期吸入曝露が、出生児の大脳皮質におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの細胞数を減少させ、さらに、細胞内のパルブアルブミン発現量を低下させることを明らかにした。この所見は、妊娠期炎症モデル動物に認められる所見と高く相関している (Boksa et al. 2016; Meyer et al. 2008; Steullet et al. 2017)。モデル動物のみならず、感染等による妊娠期炎症応答が、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの細胞数の減少や機能異常を引き起こすことも報告されている (Canetta et al. 2016)。さらに、本研究が示した、高用量群の出生児の大脳皮質前頭前野と運動野で生じたパルブアルブミン陽性介在ニューロンの顕著な減少は、統合失調症患者の脳に確認される所見と同じものである (Chung et al. 2016; Alshammari et al. 2016; Glausier et al. 2014; Mauney et al. 2013)。これらの知見とは異なり、本研究において、母体での炎症応答が確認できない（もしくは

検出できないレベルの炎症応答である)にも関わらず、高用量群および低用量群の出生児でパルブアルブミン陽性介在ニューロンの異変が認められたことは注目すべき所見である。これを理解するためには、アストロサイトの活性化が重要になると考えられる。本研究では、CB-NPの妊娠期吸入曝露が出生児の大脳皮質のGFAPの発現亢進を誘導し、アストロサイトを活性化することを明らかにした。そして、CB-NPの胎児期曝露によって生じた活性化型アストロサイトは、炎症性サイトカインであるIL-6を分泌することが、先行研究により報告されている (Gruol and Nelson 1997)。つまり、CB-NPの妊娠期吸入曝露によって活性化したアストロサイトが、IL-6を分泌することで、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの組織病理学的異変を誘導した可能性が考えられる。したがって、母体において炎症応答が認められないにもかかわらず、炎症モデル動物に類似したパルブアルブミン陽性介在ニューロンの組織病理学的異変が生じたのは、CB-NPの妊娠期吸入曝露に起因するアストロサイトの活性化と、その活性化に伴うIL-6の分泌が鍵となっている可能性がある。本研究では検証を行っていないが、妊娠期におけるCB-NPの吸入曝露によって、パルブアルブミン陽性介在ニューロンに組織病理学的異変が生じる機序の解明やその病態変化の意義の理解に向けて、活性化したアストロサイトがIL-6を分泌する可能性を追究することが、今後の検証課題であると考えられる。

4.4.5. オープンフィールドにおける行動変化

オープンフィールドを用いた行動試験により、CB-NPの妊娠期吸入曝露が用量依存的に12週齢児の行動を変化させることが明らかになった。低用量群および高用量群の雌性産児の初期3分間における総移動距離が、対照群に比べて有意に長く、雄性産児は中央に滞在する時間が対照群よりも有意に長かった。これらの行動特性の変化は、CB-NPの妊娠期吸入曝露が、出生児の自発活動量を増加させ、新規環境下における不安の感じにくさを誘導している可能性を示している。言い換えれば、CB-NPの胎児期曝露によって、出生児は多動的な行動を示すようになったと考えられ (Kawaai et al., 2015)、運動や情動に関わる神経の過剰の活性化が予想される。事実、CB-NPを胎児期に曝露した個体において、運動機能を司る大脳皮質運動野と情動反応を制御する大脳皮質前頭前野において、他の神経細胞に対して抑制的に機能するパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少が確認されている。つまり、本研究で認められたCB-NP胎児期曝露群の行動変化は、パルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少に起因した、運動や情動を司る神経細胞の過剰な活性化によっ

て引き起こされた可能性がある。実際に、大脳皮質前頭前野における機能障害は、注意欠陥多動性障害 (ADHD) 様の行動変化に強く関わっていることが先行研究によって報告され (Barkley, 1998; Fuster, 1997)、本考察を支持している。今後、CB-NP の胎児期曝露によって引き起こされた行動変化を決定づける神経細胞への影響について評価を進めることが、ナノ粒子の胎児期曝露が神経機能に及ぼす影響を理解する上で重要であると考えられる。

4.5. 小括

本研究において、実社会の曝露量、曝露方法を想定した吸入曝露法を用いて、CB-NP の胎児期曝露を行った結果、出生児に、PVM の組織病理学的異変、大脳皮質と海馬におけるアストロサイト GFAP の用量依存的な発現亢進、大脳皮質前頭前野と運動野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少、オープンフィールドテストによる自発活動量の増加といった、4 つの所見が認められた。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、発達期の中樞神経系が、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、第2章と第3章で得られた知見の確からしさが強調された。

第5章 抗酸化剤の前投与による防御効果の検証

3.1. 背景、目的

ナノ粒子の発達神経毒性を十分に理解するためには、粒子の移行に起因する直接的な影響に加え、曝露によって母体に生じた変化が胎児に及ぶ間接的な影響を考慮する必要がある (Jackson et al., 2011)。

ナノ粒子は吸入された後、肺胞に沈着し (Oberdörster et al., 2005)、その一部は血液空気関門を通過して血中に移行する (Choi et al., 2010; Kreyling et al., 2017; Oberdörster et al., 2002)。血流に乗ったナノ粒子は全身を循環して各器官へと移行するが、妊娠母体の場合には、血液胎盤関門を通過し、胎児へも移行することが確認されている (Wick et al., 2010; Buerki-Thurnherr et al., 2012; Semmler-Behnke et al. 2014)。さらに、胎児の脳へと移行したナノ粒子は、出生後も分解されずに長期的に残留することが明らかになっている (Takeda et al. 2009)。ナノ粒子の種類によって、胎盤透過性や胎児への移行性の度合いは異なるが (Pietroiusti et al. 2013)、胎児の脳に移行し、出生児の脳に残留したナノ粒子が引き起こす直接的な影響は、長期的な生体応答を誘導し、ナノ粒子の発達神経毒性に対して大きく寄与していると推測される。事実、第2章と第3章で示した、ナノ粒子の胎児期曝露による脳血管周辺の組織学的異変は、出生児の脳内に移行したナノ粒子と生体分子の粒子表面における相互作用に起因する可能性が考えられた。

一方で、ナノ粒子の移行による直接的な影響に加えて、ナノ粒子の曝露によって母体に生じる変化や生体応答に基づいた、胎児や出生児への間接的な影響についても無視することはできない (Møller et al., 2010)。とくに、最新の包括的な総説によると、ナノ粒子の発達神経毒性に関して、ナノ粒子の曝露に起因する母体酸化ストレスの誘導が次世代の中枢神経系に対して間接的に影響を及ぼす可能性があるとは指摘されている (Hougaard et al., 2011; Jackson et al., 2012; Kovacic et al., 2013; Manke et al., 2013)。

多数の先行研究により、CB-NP を含む多種多様なナノ粒子は、程度の差こそあれ、構成する元素や大きさを含む物理化学的特性に関係なく、酸化ストレスの原因物質である活性酸素種 (ROS: Reactive Oxygen Species) を生み出し、酸化ストレスとそれに起因する細胞傷害を誘導することが明らかになっている (Shen et al., 2006; Sheng et al., 2013; Shvedova et al., 2003)。動物を用いた先行研究でも、ナノ粒子の経気道曝露は酸化ストレスの亢進を誘導することが明らかになっている (Hougaard et al., 2015; Ema et al., 2016)。中でも、抗酸

化剤とナノ粒子の両方を投与した研究が興味深い結果を示している。例えば、 α -tocopherol (ビタミン E の一種) の投与は、ナノ粒子の気管内曝露によって生じる酸化ストレスの亢進を大きく緩和する(Li et al., 2014)。逆に、 α -tocopherol の欠乏したマウスに対してナノ粒子の気管内曝露を行うと、 α -tocopherol の欠乏していないマウスにナノ粒子を曝露した場合と比較して、呼吸器に過剰な酸化ストレスの亢進を誘発した (Shvedova et al., 2007)。さらに、尾静脈内に注射された単層カーボンナノチューブによって生じた中枢神経系の組織学的変化や酸化ストレス、炎症応答の亢進、細胞死の増大は、腹腔内投与した L-ascorbic acid (ビタミン C) によって抑制されることが示されている (Liu et al., 2014)。これらの研究報告は、ROS の産生や過剰な酸化ストレスの誘導は、ナノ粒子の曝露による生体影響を理解する上で、重要な要素の一つであることを示している。

その ROS の産生や酸化ストレスの誘導に対して、過敏に応答する脆弱な器官の一つが発達期の中枢神経系である (Hall et al., 2015; Dalmases et al., 2014)。感染や化学物質の曝露に起因する母体酸化ストレスの過剰な亢進は、児の中枢神経系の発達や成熟に異常を引き起こし、発達神経障害を発症させるリスク因子となることが示唆されている (Al-Amin et al., 2016; Neri et al., 2015; Oskvig et al., 2012)。事実、マウスモデルを用いた研究により、妊娠期間中におけるウイルスや細菌の感染に起因する母体酸化ストレスの亢進は、出生児の行動異常を誘導することが明らかになっている (Graciarena et al., 2010; Meyer 2014; Reisinger et al., 2015)。また、疫学研究の成果により、母体酸化ストレスの度合いと、児の統合失調症や自閉症スペクトラムといった中枢神経疾患の発症率との間に、正の相関が認められている (Atladóttir et al., 2010; Brown 2012; Estes and McAllister 2016)。

以上の知見から、ナノ粒子の妊娠期経気道曝露による発達神経毒性に、酸化ストレスが関与している可能性があり、その毒性の発現は抗酸化剤の投与によって抑制されるのではないかという仮説がたてられた。そこで本研究では、CB-NP の胎児期曝露によって出生児の脳血管周辺の誘発する組織学的異変が、抗酸化剤の前投与によって抑制されるか検証することを目的として行った。とくに本研究では、抗酸化剤として N-acetyl cysteine (NAC) と ascorbic acid の2種類を使用した。また、抗酸化剤の投与時期や投与量などの実験モデルに関しては、妊娠期のリポ多糖 (LPS: Lipopolysaccharide) の曝露によって誘発される母体酸化ストレスの亢進が抗酸化剤の投与によって抑制された研究報告 (Chen et al., 2006) をもとに研究デザインを設定した。

5.2. 材料と方法

5.2.1. 試薬類

本研究で用いた試薬はとくに記述の無い場合は、全て市販試薬特級を用いた。

5.2.2. 使用動物と飼育環境

使用した動物とその飼育環境は第2章 (2.2.2.) と同一である。

5.2.3. 使用粒子

ナノ粒子は第2章 (2.2.3.) に記した CB-NP と同一のものを使用した。

5.2.4. 投与物質の調製方法と測定

CB-NP 懸濁液は、第2章 (2.2.4. <組織学的異変の評価に用いたナノ粒子>) と同一の方法で調製し、物性を測定した。Ascorbic acid 溶液 (50 mg/mL) は、無菌環境下で L(+)-ascorbic acid (Kanto chemical Co. Inc., Tokyo, Japan) の粉体を生理食塩水に溶解することで調製した。NAC 溶液 (5 mg/mL) は、無菌環境下で N-acetyl-L-cysteine (Sigma-Aldrich Co. LLC., MO) の粉体を生理食塩水に溶解することで調製した。

5.2.5. 曝露条件と解析項目

妊娠3日目の ICR 系妊娠マウス (11 週齢) を 80 匹購入し、東京理科大学野田キャンパス薬学研究棟の動物舎内に搬入した。搬入した時点で、NAC グループ: CB-NP+NAC 群、CB-NP + saline (CB-NP) 群、ultra-pure water + NAC (NAC) 群、ultra-pure water+saline (control) 群の4群と、Ascorbic acid グループ: CB-NP + ascorbic acid 群、CB-NP + saline (CB-NP) 群、ultra-pure water + ascorbic acid (ascorbic acid) 群、ultra-pure water + saline (control) 群の4群、計8群に、各群4-5匹になるように無作為に分けた。1つの実験系に供した出生児の個体数は、母体1匹につき、児1匹であり、出生した雄性産児数の都合上、各群 n=3-5 となっている。妊娠5日目と9日目の妊娠マウスに対して、生理食塩水を用いて 10 mL/kg に調整した ascorbic acid 溶液 (500 mg/kg body weight)、同じく生理食塩水を用いて 1 mL/kg に調整した NAC 溶液 (50 mg/kg body weight)、あるいは生理食塩水を腹腔内投与した。抗酸化剤溶液の投与から1時間後に、超純水あるいは CB-NP 懸濁液 (1 mL/kg bwt) を点鼻投与した。CB-NP 懸濁液の投与は、被験物質の投与は、第2章 (2.2.5.) に記載した内容と同

一の手法を用いた。その後、6週齢および12週齢の雄性出生児（1腹あたり3-5匹）から、ペントバルビタールナトリウム（腹腔内投与；0.1 mg/g bwt）麻酔下で脳を摘出した。その後、ウエスタンブロッティング法を用いたタンパク質の定量解析、PAS-GFAP 重染色法による組織学的解析、マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った（Fig. 5-1）。

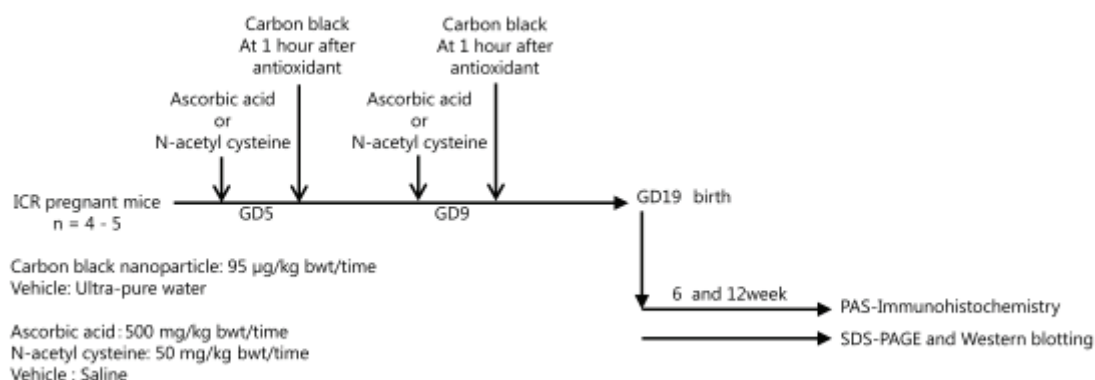


Fig. 5-1 実験デザイン（動物への処置と解析手法）

5.2.6. 大脳皮質からのタンパク質抽出

6週齢児ならびに12週齢児から摘出した脳を、ブレインブロッカーを用いて、環状断面方向に厚さ1 mmで切断し、直ちに、大脳皮質領域を採取し、液体窒素で凍結させた。採取した脳組織は、タンパク質分解酵素阻害剤（Complete EDTA-free; Roche Diagnostics, Tokyo, Japan）を含むT-PER®抽出液（20 mL/g of tissue weight; Takara Bio, Inc., Shiga, Japan）の中でBiomasher IIとPowermasher（Nippi, Inc., Tokyo, Japan）を用いて破碎、ホモジナイズした。ホモジナイズの際には温度上昇に留意し、氷上で行った。ホモジナイズされた組織を含む抽出液は4°Cで10,000×g、5分間の遠心分離処理を施すことで、不溶沈殿物を取り除き、上清を採取した。この上清をタンパク抽出液とし、その総タンパク濃度をPierce™ BCA Protein Assay kit（Thermo Scientific K.K., Waltham, MA, USA）を用いたビシンコニン酸法によって定量した。タンパク抽出液は、次に使用するまで-80°Cで保管した。

5.2.7. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動とウエスタンブロッティング法

タンパク質量が30 µgになるように各タンパク抽出液を用意し、タンパク質変性用の緩衝液（125 mM トリス-HCl（pH6.8）、20% グリセロール、4% ラウリル硫酸ナトリ

ウム (w/v) 、0.001% ブロモフェノールブルー (w/v) 、10% メルカプトエタノール) をタンパク質抽出液と同じ体積量添加して攪拌したのち、95°C、5 分間加熱してタンパク質を変性させた。SDS ポリアクリルアミドゲル電気泳動でタンパク質の分離を行う際、解析対象である GFAP と Aqp4 には、それぞれ 10%、12%のポリアクリルアミドゲルを用いた。また、内在性対照物質として、 β -actin が用いられた。ポリアクリルアミドゲルの各レーンに、タンパク質量が 25 μ g になるように添加し、110V で 30 分間電気泳動をした。電気泳動が安定したことを確認した後、4°C の環境下に移動し、電圧を 150V に上げて 110 分間電気泳動続けた。電気泳動終了後、分離された試料は、ポリフッ化ビニリデン樹脂 (PVDF membrane; Millipore, MA, USA) に 400mA、室温で 1 時間かけて転写した。トリス緩衝生理食塩水 (pH7.4) /0.1% Tween20 (TBS-T) に対して 5%の濃度になるように溶解させたスキムミルクを用いて、転写されたタンパク質のブロッキング操作を 4 °C の環境下で 5 時間行った。その後、一次抗体として Rabbit anti-mouse GFAP polyclonal antibody、Rabbit anti-Aqp4 polyclonal antibody (Code-No. AB3594; Millipore, MA, USA) あるいは、Rabbit anti- β -actin (13E5) monoclonal antibody (Code-No. 4970; Cell Signaling Technology, Inc., Boston, MA, USA) を 1% スキムミルク/TBS-T で希釈 (GFAP, 1:1000; Aqp4, 1:200; β -actin, 1:2000) し、PVDF メンブレンに転写されたタンパク質に対して、これらの抗体液を 4 °C で 12 時間反応させた。一次抗体の反応終了後、PVDF メンブレンを TBS-T で 3 回、各 10 分間洗浄した。その後、二次抗体として horseradish peroxidase conjugated anti-rabbit IgG (Code-No. sc-2004; Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA, USA) を 5% スキムミルク/TBS-T で希釈 (GFAP, 1:5000; Aqp4, 1:2000; β -actin, 1:10000) し、室温で 2 時間反応させた。再び、TBS-T で 3 回、各 10 分間洗浄し、検出まで PBS に浸して 4 °C の暗室で保管した。標的タンパク質のバンドを可視化するために、化学発光法を行った。化学発光用の試薬として、GFAP と β -actin の検出には、Immobilon Westem Chemiluminescent HRP Substrate (Millipore, MA, USA) を使い、Aqp4 の検出には、ImmunoStar® Basic (Wako Pure Chemical Industries, Ltd., Osaka, Japan) を用いた。

バンドの発光強度から、シグナルの定量を行うために、検出した画像を ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, CA, USA) で撮影し、Image Lab™ Software (Bio-Rad) でシグナル強度の数値化を行った。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法での分離によって、マウスの GFAP は 55 kDa と 48 kDa の 2 本のバンドが認められる (Laurence et al., 2005) 。マウス Aqp4 の場合、38 kDa、34 kDa、32 kDa の 3 種類のアイソフォームが存在する (Uniprot, P55088-

Aqp4)。他方、マウス中枢神経系の β -actin は、46 kDa のみである。以上のバンドの中から、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法、ウェスタンブロッティング法で一般的に解析されているバンド (canonical sequence) を選択した。GFAP は 55 kDa、Aqp4 は 38 kDa、 β -actin は 46 kDa のバンドの発光強度を数値化して、定量評価した。バンドの数値化の際、バックグラウンドのノイズを減算し、GFAP または Aqp4 のシグナルの発光強度は、 β -actin の値によって補正した。なお、GFAP と Aqp4 の補正に用いた β -actin のバンドは同一のものである。

5. 2. 8. PAS-GFAP (Glial fibrillary acidic protein) 重染色法

摘出した 6、12 週齢出生児の脳組織を 4%パラホルムアルデヒド含有 0.1 M リン酸緩衝固定液 (pH7.4) で 24 時間固定した。固定したサンプルは、防腐剤としてのアジ化ナトリウムを含んだ 10%、20%、30%スクロース/PBS に、それぞれ 4 時間、4 時間、12 時間浸漬させることで凍結による組織崩壊を防ぐ処置を施した。その後、Tissue-Tek OCT コンパウンドで凍結包埋した。クライオスタットを用いて厚さ 10 μ m の連続切片を作製し、スライドガラスに乗せ、室温で 24 時間乾燥させた。

パラフィン切片は、キシレンを用いて脱脂を行い、99.5%、95%エタノールにそれぞれ 2 回ずつ通した後、精製水になじませた。凍結切片は精製水を用いて OCT コンパウンドを除去した。一度 PBS になじませた後、0.3% H₂O₂ を含んだ PBS に 30 分間反応させ、内因性ペルオキシダーゼを失活させた。PBS で各 5 分間、3 回洗浄し、10% の正常ロバ血清 (IHR-8135, Immunobioscience, Mukilteo, WA, USA) を 60 分間反応させ、ブロッキング操作を行った。再び PBS で 5 分間 3 回洗浄し、0.1%トリトン X を含む PBS (PBS-Tx) で 1000 倍に希釈した rabbit anti-mouse GFAP polyclonal antibody (Code-No. Z0334; DakoCytomation, Copenhagen, Denmark) 溶液を 4°C で 16 時間反応させた。一次抗体の反応終了後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PBS-Tx で 1000 倍に希釈した、ビオチン標識済みの Donkey anti-rabbit IgG polyclonal antibody (AP182B; Chemicon, Temecula, CA, USA) を室温で 120 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 5 分間 3 回洗浄し、PAS-Hematoxylin 染色の行程に進んだ。精製水に 1 分間通した後、1%過ヨウ素酸水溶液に 3 分間反応させて、糖類を酸化させた。精製水で 1 分間洗浄し、コールドシッフ試薬に 60 分間反応させることで、糖鎖構造を呈色させた。その後、亜硫酸水に 3 回、各 3 分間通すことで、反応を停止させ、かつ表面のシッフ試薬を洗い落とした。精製水で 1 分間洗浄し、免疫組織学法の発色過程に進んだ。PBS に 1 分

間通した後、ホースラディッシュペルオキシダーゼが結合したアビジン-ビオチン複合体 (Vectastain ABC peroxidase kit; Vector Laboratories Inc., Burlingame, CA, USA) を PBS で 400 倍に希釈し、二次抗体に 200 分間反応させた。その後、PBS-Tx で 3 回、各 5 分間洗浄し、0.01% H₂O₂ を使用直前に添加した 0.02% 3,3'-ジアミノベンジジン/0.1M トリス-HCl 緩衝液 (pH 7.6) をアビジン-ビオチン複合体に 20 分間反応させ、発色させた。発色の反応途中で、GFAP を高発現している繊維型アストロサイトが多く存在する脳梁領域は、うすく茶色に染まるのが視認できる。発色終了後、切片を PBS に 1 分間通し、精製水で反応を止めた。その後、核染色は行わず、アルコールとキシレンを用いて脱水、透徹したのち、エンテランニュー (Thermo Fisher Scientific) を用いてカバーガラスで封入した。光学顕微鏡で完成したプレパラートの組織学的観察を行った。

5.2.9. 大脳皮質からの total RNA の抽出

Ascorbic acid グループの 6、12 週齢児から抽出した脳を、ブレインロッカーを用いて、環状断面方向に厚さ 1 mm で切断した。直ちに、大脳皮質領域を採取し、液体窒素で凍結させた。脳組織を Isogen solution (Nippon Gene Co., Ltd., Tokyo, Japan) 下で破碎したのち、クロロホルムを用いて total RNA を抽出した。抽出した total RNA はイソプロパノールで精製した後に、70% エタノールによって沈殿させて不純物を含む上清を除去した。最終的に沈殿した total RNA は RNase-free の純水で溶解させた。得られた total RNA 溶液は、BioPhotometer Plus (Eppendorf, Hamburg, Germany) を用いた OD₂₆₀ 分光測光法によって、濃度を測定した。抽出された total RNA は、網羅的遺伝子解析と定量的遺伝子発現解析に用いた。

5.2.10. マイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析

抽出した total RNA 溶液を RNeasy Micro Kit (Qiagen, Hilden, Germany) でさらに精製し、Bioanalyzer 2100 (Agilent Technologies, Inc., CA, USA) を用いたキャピラリー電気泳動法によって RNA の純度を精密に評価した。高純度であることが保障された RNA 溶液を、各群に準備した 4-5 匹のマウスのうち、2 匹または 3 匹を一つのグループとしてプールし、各群 2 つずつの RNA 溶液を準備した。それぞれプールした RNA 溶液 (n=2/group) に含まれる RNA は Cy3 で蛍光標識され、Takara Bio, Inc. protocol. に基づいて SurePrint G3 Mouse GE 8x60K microarray (Agilent Technologies) に使用された。マイクロアレイを用いた

網羅的遺伝子発現解析では、Gene Expression Wash Buffers Pack (Agilent Technologies) を用いて機器の洗浄を行い、その後に DNA microarray scanner G2565CA (Agilent Technologies) によって走査した。走査によって得られた結果は、Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) guidelines (Dose 19) と a pre-processing method for Agilent data (Dose 20) に則って Agilent Feature Extraction software を用いることで、標準化およびデータの数値化を行った。データの解析では、CB-NP の胎児期曝露によって変動する遺伝子の基準として、① control 群と CB-NP 群を比較して、2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動 ($> \text{two-fold}$ and $< 0.5\text{-fold}$ in CB vs. control) を示すものと設定した。さらに、①で抽出された遺伝子を CB-NP の胎児期曝露によって発現亢進したもの ($> 2\text{-fold}$ in CB vs. control) と発現低下したものの ($< 0.5\text{-fold}$ in CB vs. control) に分けた。得られた発現変動遺伝子に対して、ascorbic acid の前投与の効果を検証するために、CB-NP の胎児期曝露によって発現亢進した遺伝子のうち、ascorbic acid の前投与によってその発現亢進が抑制されたもの ($< 0.5\text{-fold}$ in CB+AA vs. CB) (gene-group 1) と抑制されなかったもの (> 0.5 fold in CB+AA vs. CB) (gene-group 2)、CB-NP の胎児期曝露によって発現低下した遺伝子のうち、ascorbic acid の前投与によって発現低下が抑制されたもの ($> 2\text{-fold}$ in CB+AA vs. CB) (gene-group 3) と抑制されなかったもの ($< 2\text{-fold}$ in CB+AA vs. CB) (gene-group 4) の 4 つのグループに分けた。これら 4 つのグループのうち、gene-group 1 と 3 に分類された遺伝子は、CB-NP の胎児期曝露によって生じる発現変動に対して ascorbic acid の前投与の効果が認められた遺伝子であり、一方で、gene-group 2 と 4 に分類された遺伝子は CB-NP の胎児期曝露によって生じる変動変動に対して ascorbic acid の前投与の効果が認められなかった遺伝子である。

5. 2. 11. Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析

マイクロアレイの結果を生物学的意義の観点から理解するために、得られた 4 つの遺伝子グループに対して、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析 (アノテーション解析) を行った。National Center for Biotechnology Information (NCBI; MD, USA) から供給されたアノテーションファイル (gene2go.gz) を用いて、マイクロアレイにより抽出された変動遺伝子に対して Gene Ontology を付与した。アノテーションファイルは、2015 年 6 月 20 日に取得したものを使用した。各カテゴリにおける Gene Ontology の濃縮係数 (Enrichment factors) は、 $(\text{カテゴリ内の変動遺伝子数} / \text{全変動遺伝子数}) / (\text{カテゴリ内の総遺伝指数} / \text{総遺伝子数})$ の数式を用いて算出した。濃縮係数 2 以上、変動遺伝子数 3 以上でかつ、超

幾何分布 (hypergeometric distribution) に基づくフィッシャー検定によって $p < 0.01$ を示す Gene Ontology をもつ遺伝子群を抽出し、CB-NP の胎児期曝露によって変動する遺伝子群の機能を明らかにした。

5.2.12. 統計解析

結果は全て、平均値±標準偏差 (SD) で示した。統計学的解析のために、Windows 版の Excel 統計 2012 (Social Survey Research Information, Tokyo, Japan) を用いた。統計学的有意差は、Gene Ontology を用いた遺伝子機能解析のみ P 値が 0.01 未満の場合に、他の解析では P 値が 0.05 未満の場合に有意差ありと判定した。

出生児数および性比ならびに、大脳皮質領域の GFAP および Aqp4 発現量に関して、「CB-NP 曝露」と「アスコルビン酸」を要因とした二元配置分散分析を行った。交互作用が認められた場合、Tukey の多重比較検定を行った。出生産児の体重に関して、「CB-NP 曝露」、「アスコルビン酸」、「週齢」を要因とした三元配置分散分析を行った。交互作用が認められた場合、Tukey の多重比較検定を行った。

5.3. 結果

5.3.1. 出生児の数と性比、体重

出生児数と性比に関して、CB-NP の曝露及び抗酸化剤の投与による違いは認められなかった (Table 5-1 and 5-2)。また、6 週、12 週における出生児の体重に関しても各群の間に統計学的有意な差は認められなかった (Table 5-3, 5-4, 5-5, and 5-6)。

Table 5-1. カーボンブラックナノ粒子および N-acetyl cysteine の妊娠期曝露による出生児数と性比への影響

Carbon black nanoparticle	N-acetyl cysteine	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%)*
-	-	4	11.5 ± 1.4	42 ± 10
-	+	4	13.8 ± 1.3	44 ± 11
+	-	4	11.8 ± 1.9	46 ± 23
+	+	4	12.8 ± 2.0	45 ± 10

出生児数ならびに性比について、超純水群と CB-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male/ (male + female) ×100」で算出した。

Table 5-2. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の妊娠期曝露による出生児数と性比への影響

Carbon black nanoparticle	Ascorbic acid	Number of dams	Number of offspring	Sex ratio (%)*
-	-	4	11.8 ± 2.2	56 ± 16
-	+	4	14.5 ± 1.0	54 ± 12
+	-	5	11.4 ± 3.2	52 ± 13
+	+	5	14.2 ± 2.2	45 ± 16

出生児数ならびに性比について、超純水群と CB-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。性比は、「*Sex ratio (%) = male/ (male + female) ×100」で算出した。

Table 5-3. カーボンブラックナノ粒子および N-acetyl cysteine の妊娠期曝露による出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響

Carbon black nanoparticle	N-acetyl cysteine	Number of dams (Number of offspring)	Body weight (g)
-	-	4 (8)	35.0 ± 2.6
-	+	4 (8)	35.2 ± 2.3
+	-	4 (8)	35.0 ± 1.7
+	+	4 (8)	34.0 ± 4.2

6週齢時における体重について、超純水群と CB-NP 曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。

Table 5-4. カーボンブラックナノ粒子および N-acetyl cysteine の妊娠期曝露による出生児の12週齢時における体重 (g) に対する影響

Carbon black nanoparticle	N-acetyl cysteine	Number of dams (Number of offspring)	Body weight (g)
-	-	3 (6)	40.0 ± 6.7
-	+	3 (6)	41.8 ± 4.4
+	-	3 (6)	42.9 ± 7.4
+	+	4 (8)	39.9 ± 7.2

12週齢時における体重について、超純水群とCB-NP曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。

Table 5-5. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の妊娠期曝露による出生児の6週齢時における体重 (g) に対する影響

Carbon black nanoparticle	Ascorbic acid	Number of dams (Number of offspring)	Body weight (g)
-	-	4 (8)	35.9 ± 3.3
-	+	4 (8)	34.7 ± 1.9
+	-	5 (10)	36.0 ± 1.9
+	+	5 (10)	33.5 ± 2.2

6週齢時における体重について、超純水群とCB-NP曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。

Table 5-6. カーボンブラックナノ粒子およびアスコルビン酸の妊娠期曝露による出生児の12週齢時における体重 (g) に対する影響

Carbon black nanoparticle	Ascorbic acid	Number of dams (Number of offspring)	Body weight (g)
-	-	3 (6)	40.8 ± 2.1
-	+	4 (8)	39.8 ± 1.8
+	-	4 (8)	42.5 ± 2.3
+	+	4 (8)	40.8 ± 2.0

12週齢時における体重について、超純水群とCB-NP曝露群の間に統計学的有意差は認められなかった。データは「平均値±SD」で示している。

5.3.2. CB-NP 胎児期曝露による GFAP と Aqp4 亢進に対する NAC の効果

第2章の結果から、大脳皮質における GFAP と Aqp4 は、CB-NP の曝露によって用量依存的に発現亢進することが示されたため、CB-NP の発達神経毒性に対する抗酸化剤の効果を検証するための定量的な指標として用いられた。

6週齢児において、CB-NP 胎児期曝露と NAC 前投与を要因とした二元配置分散を行った結果、GFAP の発現に対して、CB-NP 胎児期曝露 [F (1, 12) = 19.87, ###P < 0.001] および NAC 前投与の主効果が認められた [F (1, 12) = 12.36, ††P < 0.01]。しかしながら、CB-NP 胎児期曝露と NAC 前投与の二要因に交互作用は認められなかった (Fig. 5-2A)。

12週齢児において、同様に CB-NP 胎児期曝露と NAC 前投与を要因とした二元配置分散を行った結果、GFAP の発現に対して、NAC 前投与の主効果が認められ [F (1, 9) = 6.33; p < 0.05]、さらに、CB-NP 胎児期曝露と NAC 前投与の二要因に統計学的有意な交互作用が確認された [F (1, 9) = 5.28; p < 0.05] (Fig 5-2B)。交互作用が確認されたため、Tukey の多重比較検定を行った結果、CB-NP + NAC 群の GFAP の発現レベルは、CB-NP 群と比較して、統計学的有意に低いことが示された (**p < 0.01) (Fig 5-2B)。これらの結果は、CB-NP 胎児期曝露に起因する 6週、12週齢児の大脳皮質 GFAP の発現亢進は、NAC の前投与によって抑制されることを示している。

さらに、Aqp4 についても同様の解析を行った。6週、12週齢児において、CB-NP 胎児期曝露と NAC 前投与を要因とした二元配置分散を行った結果、Aqp4 の発現量に対して、CB-NP 胎児期曝露および NAC 前投与の主効果は認められなかった (Fig. 5-2C, D)。GFAP の発現亢進とは異なり、CB-NP 胎児期曝露による Aqp4 の発現亢進に対して、NAC の前投与は抑制的に機能しないことが示された。

5.3.3. CB-NP 胎児期曝露による GFAP と Aqp4 亢進に対する ascorbic acid の効果

NAC に続き、CB-NP の胎児期曝露によって引き起こされる GFAP と Aqp4 の発現亢進に対する ascorbic acid 前投与の効果についても検証した。6週齢児において、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与を要因とした二元配置分散を行った結果、Aqp4 の発現に対して、CB-NP の胎児期曝露 [F (1, 14) = 10.88, ###P < 0.01] および、ascorbic acid 前投与 [F (1, 14) = 9.74, §§P < 0.01] による主効果が認められた。しかしながら、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与の二要因に交互作用は認められなかった (Fig. 5-3A)。

12週齢児においても同様に、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与を要因とした

二元配置分散を行った結果、Aqp4 の発現に対して、CB-NP の胎児期曝露 [F (1, 11) = 8.20, #P < 0.05] による主効果が認められたものの、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与の二要因に交互作用は認められなかった (Fig. 5-3B)。

さらに、Aqp4 に関しても同様の解析を行い、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与を要因とした二元配置分散を行った結果、Aqp4 の発現に対して、CB-NP の胎児期曝露の主効果が、6 週 [F (1, 14) = 5.67, #P < 0.05] および 12 週 [F (1, 11) = 12.95, ##P < 0.01] の両週齢児に確認された。しかしながら、いずれの週齢児においても、CB-NP 胎児期曝露と ascorbic acid 前投与の二要因に交互作用は認められなかった (Fig. 5-3C, D)。これらの結果は、CB-NP 胎児期曝露に起因する 6 週、12 週齢児の脳皮質 GFAP ならびに Aqp4 の発現亢進は、ascorbic acid の前投与によって抑制されないことを示唆している。

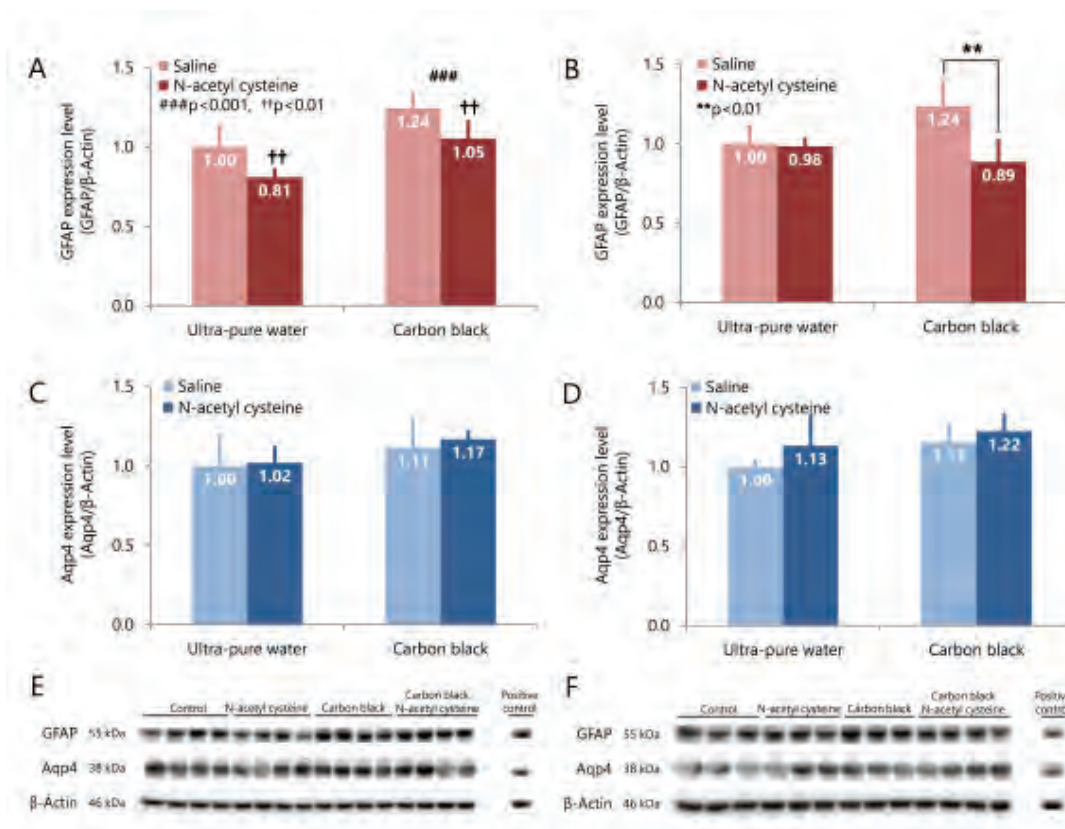


Fig. 5-2 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による 6 週および 12 週齢産児の GFAP と Aqp4 発現変動に対する N-acetyl cysteine (NAC) の前投与の効果 (定量解析)
 A: 6 週齢児の GFAP の発現量。二元配置分散分析により、CB-NP の主効果 [F (1, 12) = 19.87, ###P < 0.001] および NAC の主効果 [F (1, 12) = 12.36, ++P < 0.01] が認められた。交互作

用はなし。B: 12週齢児のGFAPの発現量。NACの主効果 [F (1, 9) = 6.33; p < 0.05] が認められ、さらにCB-NPとNACの間に交互作用が確認された [F (1, 9) = 5.28; p < 0.05]。Post-hocのTukey's testにより、CB-NP + NAC群においてCB-NP曝露群と比較してGFAPの統計学的有意な減少が認められた (**p < 0.01)。C: 6週齢児のAqp4の発現量。主効果ならびに交互作用は確認されなかった。D: 12週齢児のAqp4の発現量。主効果ならびに交互作用は確認されなかった。E, F: 定量化に用いたウエスタンブロットングのバンド。データは全て「平均値 ± 標準偏差」で示している。

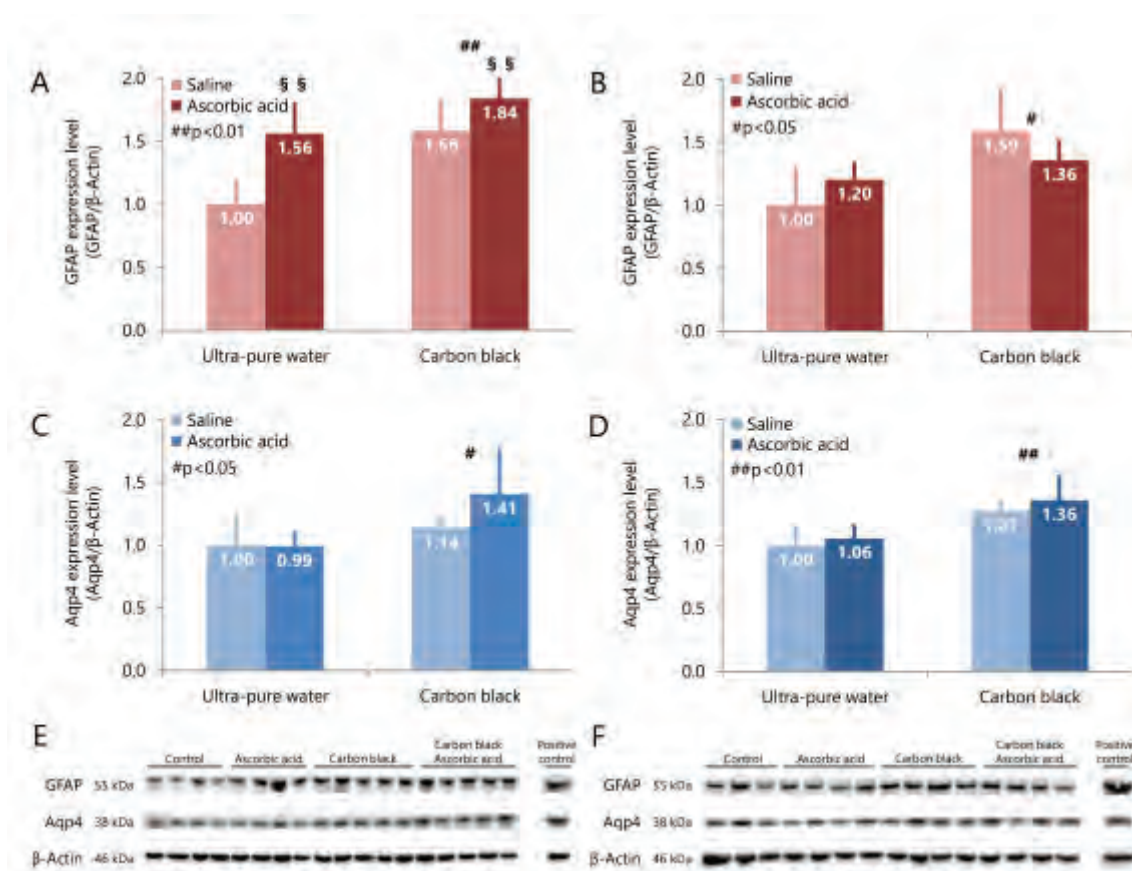


Fig. 5-3 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による6週および12週齢産児のGFAPとAqp4発現変動に対するアスコルビン酸の前投与の効果 (定量化解析)

A: 6週齢児のGFAPの発現量。二元配置分散分析により、CB-NPの主効果 [F (1, 14) = 10.88, ##P < 0.01] およびアスコルビン酸の主効果 [§§F (1, 14) = 9.74, P < 0.01] が認められた。交互作用はなし。B: 12週齢児のGFAPの発現量。CB-NPの主効果 [F (1, 11) = 8.20, #P <

0.05] が認められた。交互作用はなし。C: 6 週齢児の Aqp4 の発現量。CB-NP の主効果 [F (1, 14) = 5.67, #P < 0.05] が認められた。交互作用はなし。D: 12 週齢児の Aqp4 の発現量。CB-NP の主効果 [F (1, 11) = 12.95, ##P < 0.01] が認められた。交互作用はなし。E, F: 定量化に用いたウエスタンブロッティングのバンド。データは全て「平均値 ± 標準偏差」で示している。

5.3.4. 抗酸化剤による GFAP 発現変動の組織学的解析法を用いた評価

ウエスタンブロッティング法を用いた定量的な解析から、NAC の前投与は CB-NP 胎児期曝露に起因する GFAP の発現亢進を抑制し、ascorbic acid の前投与はそれを抑制しないことが示された。これらの結果から、大脳皮質における GFAP の発現量のみならず、その分布が NAC の前投与によって影響を受けている可能性が考えられたため、ウエスタンブロッティング法の結果をより正確に解釈すべく、組織学的解析を行った。control 群 (Fig 5-4A, E, I, and M) と NAC 群 (Fig 5-4B, F J, and N) の 6 週および 12 週齢児の大脳皮質において、GFAP 陽性アストロサイトがごく少数観察された。また、CB-NP+NAC 群 (Fig 5-4D, H, L, and P) の 6 週および 12 週齢児の大脳皮質において観察された GFAP 陽性アストロサイトの数も、control 群や NAC 群と同程度に少数であった。これに対し、CB-NP 群 (Fig 5-4C, G, K, and O) の 6 週および 12 週齢児の大脳皮質において、GFAP 陽性アストロサイトは多数観察された。これらの結果は、CB-NP の胎児期曝露によって増加した GFAP 陽性アストロサイトの細胞数が、NAC 前投与によって減少したことを示している。

加えて、組織学的解析により観察された大脳皮質における GFAP 陽性細胞はすべて星状の形態をしており、これはアストロサイト特有の形態である。したがって、GFAP 陽性細胞はアストロサイトであり、NAC の前投与に起因する GFAP の発現変動は、アストロサイト以外の細胞で、異所的に生じたわけではないことを強く支持している。

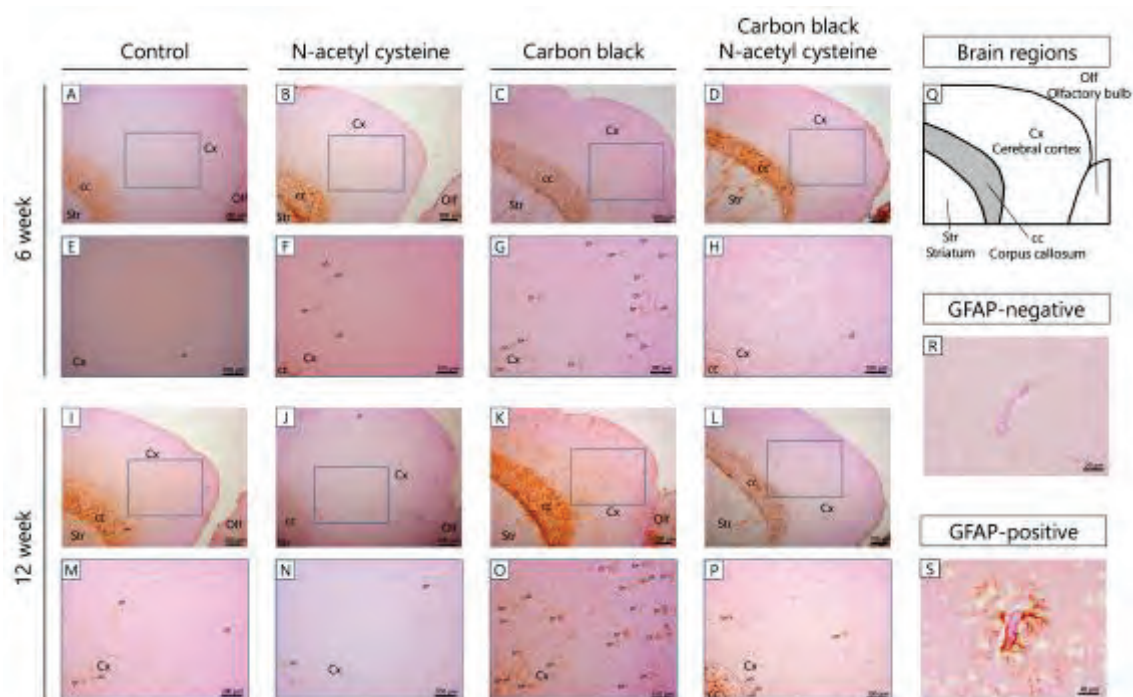


Fig. 5-4 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による6週および12週齢産児のGFAPとAqp4発現変動に対するN-acetyl cysteine (NAC)の前投与の効果(組織)
 A, E, I, M: 対照群。B, F, J, N: NAC単独群。C, G, K, O: CB-NP単独群。D, H, L, P: CB-NP + NAC群。A-H: 6週齢児。I-P: 12週齢児。Q: 観察領域の模式図。R: GFAPの発現亢進の認められない脳血管の拡大図。S: GFAPの発現亢進の認められる脳血管の拡大図。スケールバーは、A-D, I-Lが200 μ m、E-H, M-Pが100 μ m、R, Sが20 μ mである。矢印の先端はGFAP陽性アストロサイトを示している。青い区画(A-D, I-L)は、その下段の拡大図(E-H, M-P)の位置を示している。Olf: 嗅球、Cx: 大脳皮質、cc: 脳梁、Str: 線条体。

NACの前投与がCB-NPによるGFAPの発現亢進を抑制したのに対して、Ascorbic acidの前投与はGFAPの発現量および発現分布を変化させなかった。control群 (Fig 5-5A, E, I, and M) と ascorbic acid群 (Fig 5-5B, F J, and N) の6週および12週齢児の大脳皮質において、GFAP陽性アストロサイトがごく少数観察された。その一方で、CB-NP群 (Fig 5-5C, G, K, and O) およびCB-NP + ascorbic acid群 (Fig 5-5D, H, L, and P) の6週および12週齢児の大脳皮質においては、GFAP陽性アストロサイトが多数観察された。したがって、組織学的解析の結果はウエスタンブロッティング法による定量的な解析と同じく、CB-NPの胎児期曝露に起因する大脳皮質GFAPの発現亢進は、ascorbic acidの前投与によって抑制されな

いことが示された。

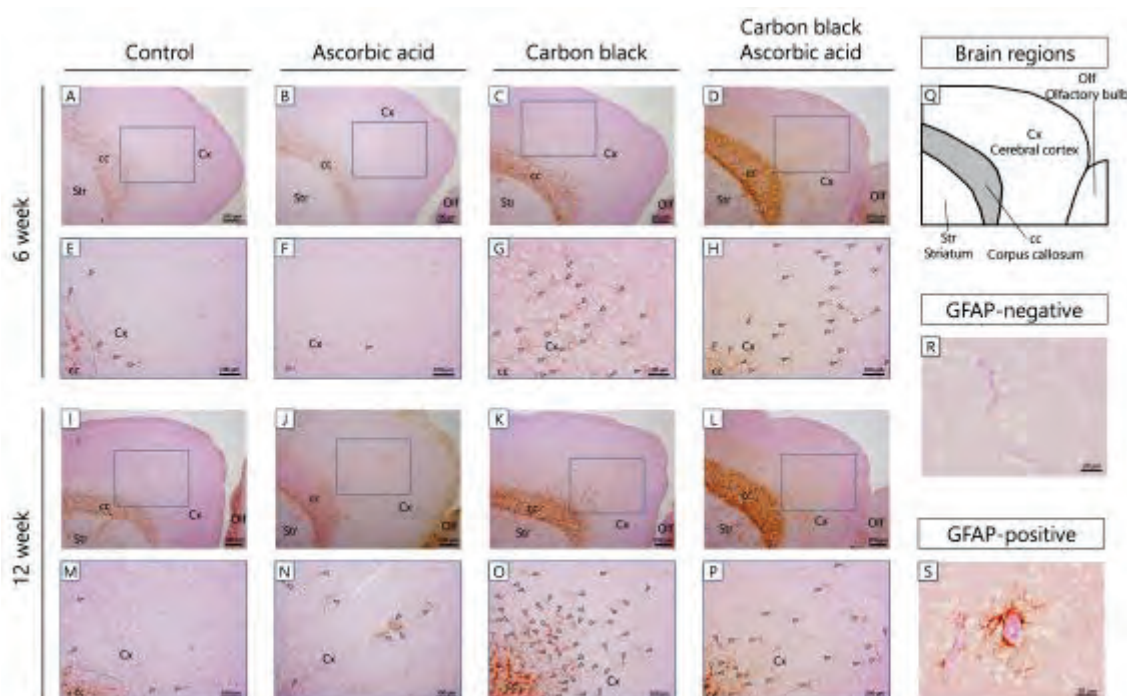


Fig. 5-5 カーボンブラックナノ粒子 (CB-NP) の胎児期曝露による6週および12週齢産児のGFAPとAqp4発現変動に対するアスコルビン酸の前投与の効果 (組織)

A, E, I, M: 対照群。B, F, J, N: アスコルビン酸単独群。C, G, K, O: CB-NP単独群。D, H, L, P: CB-NP + アスコルビン酸群。A-H: 6週齢児。I-P: 12週齢児。Q: 観察領域の模式図。R: GFAPの発現亢進の認められない脳血管の拡大図。S: GFAPの発現亢進の認められる脳血管の拡大図。スケールバーは、A-D, I-Lが200 μm、E-H, M-Pが100 μm、R, Sが20 μmである。矢印の先端はGFAP陽性アストロサイトを示している。青い区画(A-D, I-L)は、その下段の拡大図(E-H, M-P)の位置を示している。Olf: 嗅球、Cx: 大脳皮質、cc: 脳梁、Str: 線条体。

5.3.5. CB-NPの胎児期曝露によって変動する遺伝子の網羅的解析

タンパク質発現変動解析および組織学的解析では ascorbic acid の前投与が、CB-NP の胎児期曝露に起因する大脳皮質 GFAP の発現亢進を抑制しないことが示された。一方で、他の生体分子に対しても GFAP と同様に ascorbic acid の前投与は抑制的に機能しないのか、疑問が生じる。そこで、網羅的遺伝子発現解析を用いて、CB-NP の胎児期曝露により変動

する遺伝子を抽出し、それらの遺伝子の変動が ascorbic acid の前投与により抑制されるか検証した。そのためには、まず、CB-NP の胎児期曝露によって発現が変動する遺伝子を明らかにした。

はじめに、control 群と CB-NP 群の 6 週齢児の脳皮質から抽出した mRNA を解析に使用した。マイクロアレイで測定することのできるマウスの mRNA、28950 (62972 spots) の内、23595 種の mRNA (47796 spots) が遺伝子発現解析に使用可能な信頼の高い結果を示した。その 23595 種の mRNA を遺伝子発現解析の対象とし、超純水群と比較して、高用量曝露群において 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動を示す mRNA を抽出した。その結果、652 の mRNA (672 spots) が CB-NP の胎児期曝露によって発現変動を示すことが明らかになった。

次に、control 群と CB-NP 群の 12 週齢児の脳皮質から抽出した mRNA を解析に使用した。同じく 28950 (62972 spots) の内、23427 種の mRNA (31344 spots) が遺伝子発現解析に使用可能な信頼の高い結果を示した。その 23427 種の mRNA を遺伝子発現解析の対象とし、超純水群と比較して、高用量曝露群において 2 倍以上または 0.5 倍以下の発現変動を示す mRNA を抽出した。その結果、775 の mRNA (825 spots) が CB-NP の胎児期曝露によって発現変動を示すことが明らかになった。

以上の 6 週齢および 12 週齢児の結果を合わせて、1353 種 (重複 74 種) の mRNA が、CB-NP の胎児期曝露によって発現変動を示すことが明らかになった (Fig. 5-6A)。

5.3.6. ascorbic acid の前投与によって発現変動が抑制される遺伝子の探索

CB-NP の胎児期曝露により発現変動を示す脳皮質の遺伝子は、さらに CB-NP + ascorbic acid 群のデータを用いて細分化した。第一に、CB-NP の胎児期曝露によって発現の変動した遺伝子を、A. 発現上昇と B. 発現低下の 2 組に分けた。

<A. CB-NP の胎児期曝露によって発現上昇を示した遺伝子>

CB-NP の胎児期曝露によって発現上昇を示した遺伝子のうち、CB-NP + ascorbic acid 群において、CB-NP 群と比較して 0.5 倍以下の発現低下を示したものを抽出した (<0.5-fold in the CB-NP + ascorbic acid group compared with the CB-NP group)。これにより抽出された遺伝子は、ascorbic acid によって CB-NP 胎児期曝露に起因する発現上昇が「抑制された遺伝子 (protected genes)」とし、この条件に該当しなかった遺伝子は「抑制されなかった遺伝子

(unprotected genes)」と定義した (Fig. 5-5B)。

<B. CB-NP の胎児期曝露によって発現低下を示した遺伝子>

CB-NP の胎児期曝露によって発現低下を示した遺伝子のうち、CB-NP + ascorbic acid 群において、CB-NP 群と比較して2倍以下の発現上昇を示したものを抽出した (>2-fold in the CB-NP + ascorbic acid group compared with the CB-NP group)。これにより抽出された遺伝子は、ascorbic acid によって CB-NP 胎児期曝露に起因する発現低下が「抑制された遺伝子 (protected genes)」とし、この条件に該当しなかった遺伝子は「抑制されなかった遺伝子 (unprotected genes)」と定義した (Fig. 5-5C)。

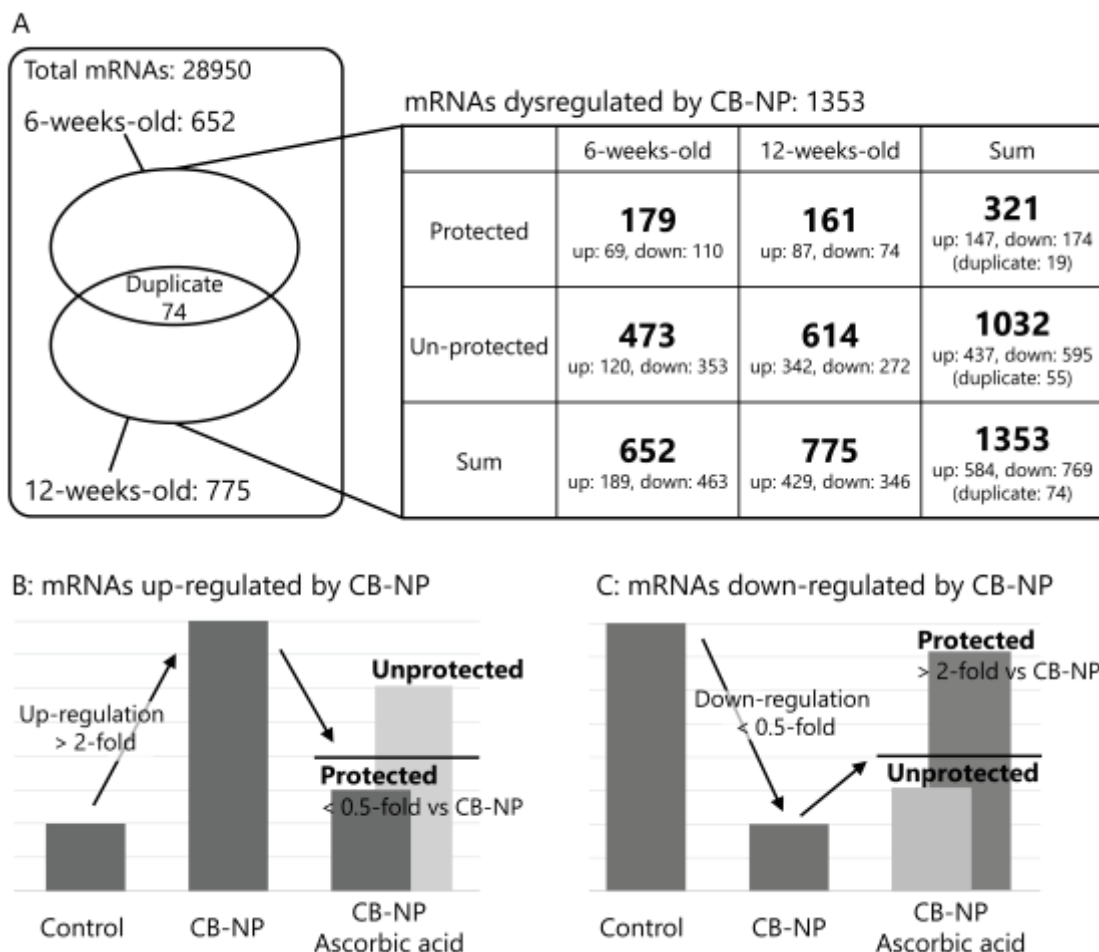


Fig. 5-6 抽出された遺伝子数とその条件の可視化

A: 28950 の総遺伝子の中から、CB-NP の胎児期曝露により 2 倍以上または 0.5 倍以下の変

動を示した遺伝子が6週齢児から652、12週齢児から775種抽出された。74の遺伝子が重複し、計1353の遺伝子が抽出された。さらに、これらの変動遺伝子は、アスコルビン酸の前投与によって「抑制された遺伝子 (Protected)」と「抑制されなかった遺伝子 (Un-protected)」に分類された。その結果、抑制された遺伝子は合計で321、抑制されなかった遺伝子は合計で1032種存在していた。B: 抑制された遺伝子と抑制されなかった遺伝子の条件。CB-NPにより2倍以上の発現亢進が認められる遺伝子は、そのCB-NP群の発現量に対し、CB-NP +アスコルビン酸群で半分以下の発現量に低下していたものを抽出した。C: CB-NPにより0.5倍以下の発現低下が認められる遺伝子は、そのCB-NP群の発現量に対し、CB-NP +アスコルビン酸群で2倍以上の発現量に増加していたものを抽出した。

実験結果 (5.3.5.) で明らかにされた、CB-NPの胎児期曝露によって発現変動を示す6週齢児の652種のmRNA (672 spots) のうち、179種のmRNA (発現亢進が69種、発現低下が110種; 225 spots) が、ascorbic acidの前投与によって「抑制された遺伝子」に分類され、473種のmRNA (発現亢進が120種、発現低下が353種; 483 spots) が「抑制されなかった遺伝子」に分類された (Fig. 5-6A)。また、CB-NPの胎児期曝露によって発現変動を示した12週齢児の775種のmRNA (825 spots) のうち、161種のmRNA (発現亢進が87種、発現低下が74種; 167 spots) が、ascorbic acidの前投与によって「抑制された遺伝子」に分類され、614種のmRNA (発現亢進が342種、発現低下が273種; 658 spots) が「抑制されなかった遺伝子」に分類された (Fig. 5-6A)。

ここで抽出された遺伝子を機能的に解釈するために、Gene Ontologyを用いた遺伝子機能解析を行った。その結果、ascorbic acidの前投与によって「抑制された遺伝子」として抽出された6週齢児の179種のmRNAは、2つの遺伝子群 (extracellular matrix structural constituent, and cellular response to interferon-beta) に濃縮された (Table 5-7)。一方で、ascorbic acidの前投与によって「抑制されなかった遺伝子」として抽出された6週齢児の473種のmRNAは、4つの遺伝子群 (cytokine activity, hemostasis, regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway, and epithelial cell development) に濃縮された (Table 5-8)。さらに、12週齢児に関しては、ascorbic acidの前投与によって「抑制されなかった遺伝子」として抽出された161種のmRNAは、2つの遺伝子群 (muscle organ development, and cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process) に濃縮され (Table

5-9)、そして、「抑制されなかった遺伝子」として抽出された 614 種の mRNA は、26 個の遺伝子群 (主として cytokine activity, chemotaxis, cell proliferation and differentiation, blood vessel, and dopaminergic neurotransmission に関連する Gene Ontology を持つ遺伝子群) に濃縮された (Table 5-10)。

興味深いことに、cytokine activity や cell proliferation and differentiation、blood vessel に関連する 3 つの Gene Ontology を持つ遺伝子群が、6 週齢児と 12 週齢児の「抑制されなかった遺伝子」から共通して抽出された。一方で、「抑制された遺伝子」の中から、6 週齢児と 12 週齢児の両週齢児に共通して抽出された遺伝子群は存在しなかった。

Table 5-7. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、アスコルビン酸の前投与によってその変動が抑制された遺伝子群 (6 週齢)

Gene ontology	P-value	Enrichment factor	Gene symbol	
			Up-regulation by CB-NP	Down-regulation by CB-NP
extracellular matrix structural constituent	<0.001	15.69	<i>Col1a2, Pxdn</i>	<i>Col4a4</i>
cellular response to interferon-beta	0.001	13.73	<i>lfi202b</i>	<i>lgtp, Pyhin1</i>

Table 5-8. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、アスコルビン酸の前投与によってその変動が抑制されなかった遺伝子群 (6 週齢)

Gene ontology	P-value	Enrichment factor	Gene symbol	
			Up-regulation by CB-NP	Down-regulation by CB-NP
epithelial cell development	0.002	11.73	-	<i>Esr1, Pax6, Hydin</i>
cytokine activity	0.005	2.78	<i>Edn1, Cklf, Fgf2</i>	<i>Il9, Tgfb1, Tnfsf9, Il17f, Tnfsf15, Gm13271</i>

regulation of transforming growth factor beta receptor signaling pathway	0.006	8.06	-	<i>Cav3, Tgfb1, Il17f</i>
hemostasis	0.009	4.92	<i>F13b</i>	<i>Anxa8, Serpinc1, Adamts13</i>

Table 5-9. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、アスコルビン酸の前投与によってその変動が抑制された遺伝子群（12 週齢）

Gene ontology	P-value	Enrichment factor	Gene symbol	
			Up-regulation by CB-NP	Down-regulation by CB-NP
cysteine-type endopeptidase inhibitor activity involved in apoptotic process	0.001	14.12	<i>Tnfsf14</i>	<i>Bcl2a1d, Lef1</i>
muscle organ development	0.009	7.06	<i>Foxo4</i>	<i>Des, Zbtb42</i>

Table 5-10. CB-NP の胎児期曝露により変動した遺伝子のうち、アスコルビン酸の前投与によってその変動が抑制されなかった遺伝子群（12 週齢）

Gene ontology	P-value	Enrichment factor	Gene symbol	
			Up-regulation by CB-NP	Down-regulation by CB-NP
dopamine neurotransmitter receptor activity	<0.001	25.76	<i>Drd1, Drd2, Drd5</i>	-

structural constituent of myelin sheath	<0.001	20.61	<i>Mal, Mbp, Mobp</i>	-
dopamine receptor signaling pathway	<0.001	11.45	<i>Drd1, Drd2, Drd5, Rgs9</i>	-
cell migration involved in sprouting angiogenesis	<0.001	9.16	<i>Fgf2, Kdr, Nrp1</i>	<i>Tdgf1</i>
response to amphetamine	<0.001	8.59	<i>Drd1, Drd2, Drd5, Nr4a2</i>	-
chemokine receptor activity	<0.001	8.59	<i>Cxcr2, Ccr9</i>	<i>Ccr10, Cxcr6</i>
positive chemotaxis	<0.001	6.36	<i>Fgf10, Fgf2, Figf, Nrp1, Sema5a</i>	-
chemokine-mediated signaling pathway	<0.001	6.36	<i>Cxcr2, Ccr9, Cxcl1</i>	<i>Ccr10, Cxcr6</i>
dopamine binding	0.001	12.88	<i>Drd1, Drd2, Drd5</i>	-
phospholipase C-activating dopamine receptor signaling pathway	0.001	12.88	<i>Drd1, Drd2, Drd5</i>	-
positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	0.001	3.24	<i>Drd2, Fgf10, Fgf2, Ctgf, Gcnt2, Kdr, Nrp1, Oprm1, P2ry1, Dstyk</i>	-
positive regulation of long-term synaptic potentiation	0.002	11.45	<i>Drd1, Drd2, Shank3</i>	-
adenylate cyclase-activating dopamine receptor	0.002	11.45	<i>Drd1, Drd5, Oprm1</i>	-

signaling pathway				
astrocyte development	0.002	11.45	<i>Drd1, Gfap, Tspan2</i>	-
vascular endothelial				
growth factor receptor signaling pathway	0.002	7.63	<i>Figf, Kdr, Nrp1, Sulf1</i>	-
positive regulation of leukocyte chemotaxis	0.004	8.59	<i>Cxcr2, Cxcl1</i>	<i>Edn3</i>
positive regulation of cell differentiation	0.004	4.64	<i>Fgf2, Ctgf, Insm1</i>	<i>Socs3, Edn3</i>
chemotaxis	0.004	3.19	<i>Cxcr2, Ccr9, Fgf10, Cmtm2a, Cklf, Cmtm2b</i>	<i>Ccr10, Cxcr6</i>
cellular response to fibroblast growth factor stimulus				
cellular response to fibroblast growth factor stimulus	0.006	7.93	<i>Tbx1, Dstyk</i>	<i>TdGF1</i>
synaptic transmission, dopaminergic	0.007	7.36	<i>Drd1, Drd2, Drd5</i>	-
positive regulation of hormone secretion	0.007	7.36	<i>Cntf, P2ry1</i>	<i>Edn3</i>
positive regulation of epithelial cell proliferation	0.007	3.49	<i>Fgf10, Fgf2, Kdr, Tbx1, Osr1, Foxp2</i>	-
blood vessel morphogenesis	0.008	4.91	<i>Fgf10, Meis1, Tbx1, Shb</i>	-
cytokine activity	0.008	2.47	<i>Cer1, Cntf, Fgf2, Cxcl1, Il10, Cmtm2a, Cklf, Cmtm2b, Gm13272</i>	<i>Il20</i>
response to cocaine	0.009	6.87	<i>Drd1, Drd2, Drd5</i>	-

neuronal action potential	0.009	4.74	<i>Drd1, Gpr88</i>	<i>Chrna1, P2rx3</i>
---------------------------	-------	------	--------------------	----------------------

5.4. 考察

5.4.1. CB-NP 胎児期曝露の影響に対する抗酸化剤の効果

本研究は、ナノ粒子の妊娠期経気道曝露による発達神経毒性の誘導には、「母体酸化ストレスに起因する間接影響が重要な要因である」と仮説を立て、その仮説に則り、CB-NPの胎児期曝露が出生児のアストロサイトに引き起こす影響が抗酸化剤の前投与により予防できるか、その効果を調査した。その結果、母体へのNACの前投与が、CB-NPの胎児期曝露によって出生児に生じたアストロサイトGFAPの発現亢進を抑制することが明らかになった。この結果は、NACの持つ抗酸化・抗炎症機能に関連する細胞保護効果に起因していると考えられる (Du et al., 2013; Janda et al., 2015)。他方、NACの前投与はCB-NP胎児期曝露によるGFAPの発現亢進を抑制したが、Aqp4の発現は抑制しなかった。またascorbic acidの前投与はGFAPとAqp4の発現、その両方に対して抑制効果を発揮しなかった。とくに、ascorbic acidの前投与では、大脳皮質の遺伝子発現を網羅的に調査した結果、CB-NPの胎児期曝露によって発現変動を示す大半の遺伝子群がascorbic acidによって抑制されないことを示した。

5.4.2. 大脳皮質におけるアストロサイトGFAPとAqp4の発現に対するNACの効果

NACの前投与が、CB-NPの胎児期曝露群のアストロサイトGFAPとAqp4、2つのタンパク質発現に与えた影響は異なるものであった。しかしながら、一般的に、アストロサイトのAqp4の発現亢進は、GFAPの発現亢進に随伴して生じるものである (Badaut et al., 2012; Haj-Yasein et al., 2011)。先行研究では、アストロサイトのGFAPとAqp4は酸化促進剤 (pro-oxidant) によって、共に発現亢進が引き起こされ、その発現の亢進は、抗酸化剤の投与によって一緒に抑制される (Noël et al., 2011)。本研究で示したNACの前投与による抑制効果は、アストロサイトGFAPの発現に対してのみ認められ、Aqp4に対しては抑制効果を発揮せず、これは先行研究と一貫しない結果であった。このことは、CB-NPの胎児期曝露は出生児の大脳皮質におけるアストロサイトのGFAPとAqp4の発現に対して、異なる機序を介して影響を及ぼしている可能性を示唆している。実際に、炎症性サイトカインで

ある IL-1 β は、本研究で示した NAC の影響とは逆に、GFAP の発現を亢進させ、Aqp4 の発現を低下させることが明らかになっている (Chastre et al., 2010)。これは、IL-1 β がアストロサイトの GFAP と Aqp4 に異なる機序で影響を及ぼしていることに起因する。したがって、NAC の前投与が GFAP および Aqp4 発現を調節する機序の差異を明らかにすることは、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の脳血管周辺組織に与える影響をより深く理解することに貢献すると考えられる。

5.4.3. 大脳皮質におけるアストロサイト GFAP と Aqp4 の発現に対する ascorbic acid の効果

NAC の前投与の結果とは対照的に、ascorbic acid の妊娠母体への投与は、大脳皮質におけるアストロサイト GFAP と Aqp4 の発現に対して抑制的な効果を発揮しなかった。それどころか、ascorbic acid の投与によって、その発現量はわずかに増加していた。この結果は、ascorbic acid が抗酸化剤よりも pro-oxidant として機能した可能性を示唆している。興味深いことに、ascorbic acid は体内の存在する量によって、抗酸化剤と pro-oxidant、その両方の性質を示すことが明らかになっている (Rodrigues et al., 2014)。通常、ascorbic acid は、radical (ROO \cdot and RO \cdot) と α -tocopherol の酸化還元反応により生じた tocopheroxyl radical を直接的に還元することで酸化ストレスを抑制する (Packer et al., 2001)。ところが、過剰な濃度の ascorbic acid が体内に存在すると、pro-oxidant としての活性を示すようになる (Rodrigues et al., 2014)。過剰量の ascorbic acid は Fe³⁺ を Fe²⁺ に還元し、自身は ascorbate radical になる (Chen et al., 2007)。生成した Fe²⁺ は、電子を酸素に供給し、Fe³⁺ へと戻る (Chen et al., 2007)。電子を受容した酸素は、superoxide (O₂ \cdot^-) 等の活性酸素種となり、生体分子との反応を介して、最終的に H₂O₂ に変わる (Chen et al., 2007)。Fe³⁺ は、再度、過剰に存在する ascorbic acid によって還元され、そして、酸素に電子を供給する。一連の流れをまとめると、過剰な ascorbic acid は、Fe イオンのリサイクル反応とその後の Fenton 反応を促すことで、活性酸素種の生成を促進させる。このようにして生成した Fe²⁺ と活性酸素種は、中枢神経系において、GFAP の過剰発現や末端足の膨潤化などのアストロサイトの形態異常を誘導することが明らかになっている (Bao and Liu, 2004; Solano et al., 2008)。本研究で用いた、ascorbic acid は 500 mg/kg であり、これを妊娠母体の腹腔内に投与した。これは、ascorbic acid の投与が、妊娠期 LPS 曝露に起因する母体および胎児の酸化ストレスの亢進を抑制した先行研究 (Chen et al., 2006) を元に設定したものである。しかし、非常に強

い酸化ストレスと炎症応答を誘導する LPS と比べて、それよりも弱い酸化ストレスを誘導する低用量の CB-NP 曝露に対しては、この ascorbic acid の投与量は、過剰量であったと考えられる。したがって、本研究で投与した ascorbic acid は、CB-NP の胎児期曝露に起因する GFAP と Aqp4 の発現亢進に対して、抗酸化剤として機能せず、むしろ pro-oxidant として働き、その発現量を増加させた可能性がある。今後、より低用量の ascorbic acid の前投与がナノ粒子の発達神経毒性に対して抑制的な効果を発揮するのか検証し、最適な投与量を明らかにすることが重要な課題となる。

5.4.4. 大脳皮質における遺伝子の発現に対する ascorbic acid の効果

本研究で用いた Ascorbic acid の前投与は、CB-NP の胎児期曝露に起因する大脳皮質 GFAP の発現亢進を抑制せず、ナノ粒子の発達神経毒性に対して保護的に機能しないことを示唆したが、この結論に確証を与えるためには、他の生体分子に対する、ascorbic acid の前投与の効果を検証することが重要である。そこで、網羅的遺伝子発現解析を用いて、CB-NP の胎児期曝露によって変動を示す遺伝子が ascorbic acid の前投与によってその変動が抑制されるか検証した。その結果、CB-NP の胎児期曝露によって発現変動を示す大半の遺伝子、とくに cytokine activity や hemostasis、growth factor、chemotaxis、cell proliferation、blood vessel、dopaminergic neurotransmission に関する機能を持つ遺伝子群は、ascorbic acid の前投与によって抑制されないことが明らかになった。それに対して、ascorbic acid の前投与によって、CB-NP の胎児期曝露に起因する発現変動が抑制された遺伝子群は少数であった。したがって、タンパク質発現解析に加えて、遺伝子発現解析においても、本研究で用いた ascorbic acid の前投与は、CB-NP の胎児期曝露による出生児の脳への影響に対して抑制的な効果を示さないことが明らかになった (Fig. 5-6)。

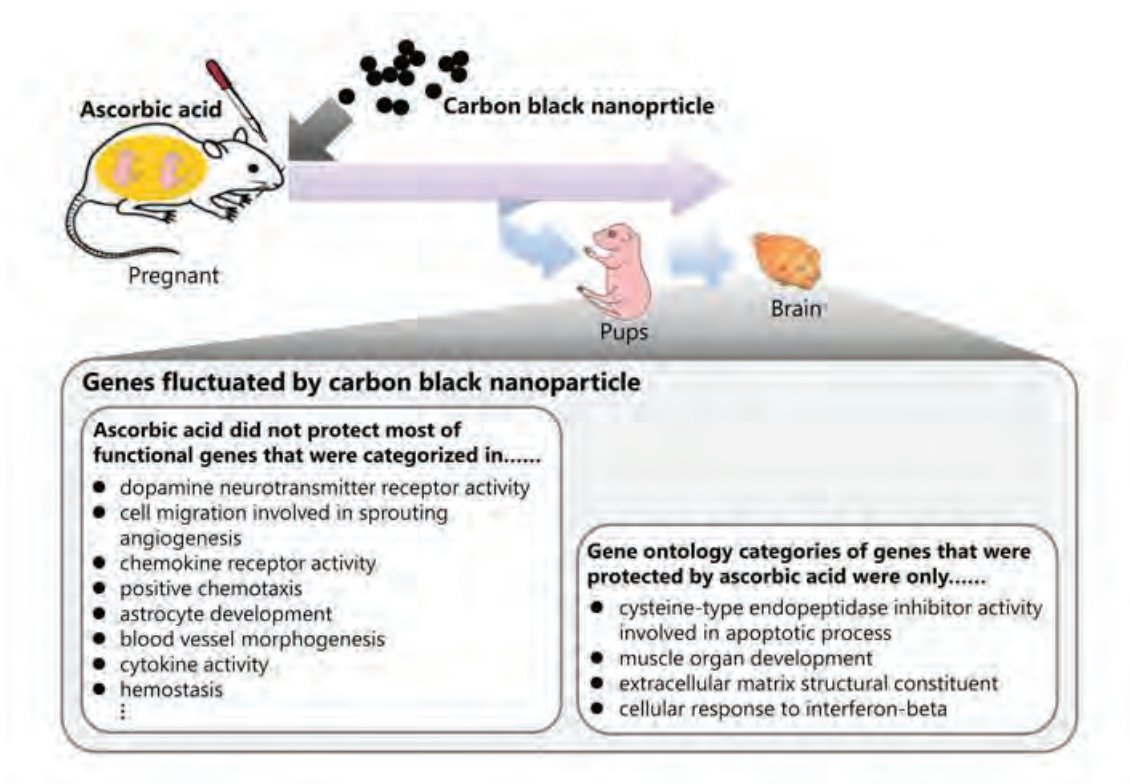


Fig. 5-7 大脳皮質における遺伝子の発現に対する ascorbic acid の効果

5. 4. 5. NAC 前投与によってアストロサイト GFAP の発現亢進が抑制された意義

第2章 (2. 4. 5.) で言及したように、GFAP の発現亢進は、原型質型アストロサイトの活性化やアストログリオシスの誘導を示しており、アストロサイト GFAP の発現量は、毒性学的な指標として用いられる (Moon et al., 2004; Yang and Wang, 2015)。アストログリオシスは神経変性疾患の治療標的のひとつであり、神経変性疾患の治療に向けて、アストログリオシスの抑制を目的とした先行研究が多数存在する (Colangelo et al., 2012, 2014)。とくに、アストログリオシスに伴う GFAP の過剰な発現は、酸化ストレスの亢進を伴う神経炎症応答や母体炎症応答に起因して生じる神経細胞や血管の異常や傷害によって、誘導されることが明らかになっている (Bates et al., 2007; Rousset et al., 2006; Santhanasabapathy et al., 2015; Zager et al., 2015)。炎症や酸化ストレスが引き起こす脳への影響は、多くの場合、神経保護作用や活性酸素種の除去機能を持つ抗酸化剤の投与によって抑制される (Achat-Mendes et al., 2007; Cuzzocrea et al., 2000; Karalija et al., 2012)。その最たる例として、NAC が挙げられる。それゆえに、CB-NP の胎児期曝露によって生じた GFAP の発現亢進が NAC の前投与によって抑制されたことは、CB-NP の胎児期曝露に起因する

アストログリオシスやその周囲の神経細胞や血管に生じる異変に対しても NAC の前投与が、抑制的に、さらには保護的に機能する可能性を示している。

5.4.7. Aqp4 の発現亢進が維持された意義

原型質型アストロサイトは、水チャネルである Aqp4 を脳血管に接した末端足で強く発現している。その Aqp4 は、血流やイオン濃度の制御、傷害時のアストロサイトの可塑性を制御している生体分子である (Yang et al., 2012)。とくに、このアストロサイトの Aqp4 の発現異常は、脳の傷害部におけるアストログリオシスや血液脳関門の破綻に強く関わっていることが報告されているほか (Badaut et al., 2012; Haj-Yasein et al., 2011)、脳脊髄液の流出入の適切な制御に悪影響を及ぼすことが明らかになっている (Iloff et al., 2012; Papadopoulos and Verkman., 2007)。脳脊髄液の流出入は、中枢神経系に存在する不要物、とくに外部から侵入してきた異物や脳内で生じたタンパク質の異常構造体などの排除を担うため、Aqp4 の発現異常に伴って脳脊髄液の流出入が滞ると、中枢神経系内の異物や不要物が適切に排出できず、その場で蓄積する (Iloff et al., 2012; Papadopoulos and Verkman., 2007)。実際に、Aqp4 ノックアウトマウスを用いた研究や老齢マウスを用いた研究により、Aqp4 の発現異常や機能異常は、脳脊髄液の流出入を抑制し、アルツハイマー病患者の脳内で認められる amyloid β の脳実質内における増加と沈着を引き起こすことが報告されている。(Kress et al., 2014; Iliff et al., 2012)。本研究では、NAC の前投与により Aqp4 の発現変化は認められなかったため、NAC の前投与は脳脊髄液の流出入や老廃物の排出に影響を及ぼさないことが示唆される。

5.4.8. ナノ粒子の発達神経毒性における粒子の直接影響と間接影響

ナノ粒子の発達神経毒性の機序を十分に理解するためには、ナノ粒子の胎児への移行と出生児への残留に起因する直接的な影響と母体に生じる生体応答が児に及ぶ間接的な影響について議論することが重要である。1-100 nm と定義されるナノ粒子は、生体内の様々な関門を通過し、胎児の脳へ移行、その後も長期に残留することが、数多くの研究により支持され、明確に証明されている (Choi et al., 2014; Kreyling et al., 2002; Oberdörster et al., 2002; Wick et al., 2010; Takeda et al., 2009; Yamashita et al., 2011)。ゆえに、胎児期に曝露したナノ粒子が、胎児や出生児に対して、直接的に影響を及ぼすことが十分に想定される。それにもかかわらず、母体の酸化ストレスなど、ナノ粒子の妊娠期曝露による間接的な影響

が児に及ぼす影響について議論することもまた重要である (Jackson et al., 2012; Hougaard et al., 2011)。実際に、様々な種類のナノ粒子の経気道曝露が呼吸器に酸化的傷害を誘導することが明らかになっているうえ (Shvedova et al. 2005; Shrivastava et al., 2014)、妊娠期間中における酸化ストレスの亢進は、児の中樞神経疾患の発症リスクを高める (Al-Amin et al. 2016; Neri et al. 2015; Oskvig et al. 2012)。それゆえに、ナノ粒子の妊娠期曝露により生じる酸化ストレスの亢進が、出生児の中樞神経系の発育に悪影響を及ぼす可能性があると考えられ、その間接影響の評価と解析が求められていた。本研究は、抗酸化剤として用いた NAC の前投与が、CB-NP の胎児期曝露に起因する脳血管周辺の組織病理学的異変を抑制することを示し、この結果は、酸化ストレスがナノ粒子の発達神経毒性の発現に関与している可能性があることを示唆している。一方で、NAC の前投与が出生児のアストロサイト Aqp4 の発現変動には抑制的に機能しなかったことから、本研究は、酸化ストレス以外の機序によってナノ粒子の発達神経毒性が引き起こされる可能性を完全に棄却することはできない。その両方が関与している可能性は高い。これらの研究成果をより深く、正確に理解するために、各タイムポイントに生じる児の酸化ストレスを、酸化ストレスマーカーを使用して評価することが今後の研究課題になる。とくに、ascorbic acid を用いた本研究の成果からもわかるように、ナノ粒子の低用量曝露によって生じる酸化ストレスは、微細な変化である可能性が高いため、組織を一塊にした解析ではなく、*in situ* での分析を利用し、領域特異的あるいは細胞特異的な評価を行うことが、その微細な変化を捉えるためには必要であると考えられる。

5.5. 小括

本研究は、CB-NP の胎児期曝露に起因するアストログリオシスが NAC の前投与によって部分的に抑制されることを明らかにした。これは、NAC 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的手段となりうることを示唆している。一方で、NAC の抑制効果は、CB-NP 胎児期曝露により発現亢進を示す Aqp4 には機能しなかったことや、アスコルビン酸の母体投与は、CB-NP の胎児期曝露による GFAP と AQP4 の発現亢進を低下させなかったことから、ナノ粒子の発達神経毒性には母体酸化ストレス以外の機序も存在することが想定される。本研究は、ナノ粒子の発達神経毒性の機序をより正しく理解することに貢献し、その影響や毒性を予防するための手段を確立することに繋がる。

第6章 総括・展望

高い反応性を持ちながら、生物に備わっている防御機構をすり抜けて胎児の脳へと移行し、長期にわたって残留するナノ粒子は、次世代の子ども達に特異な健康影響を引き起こす可能性があると考えられている。その影響が現実問題として顕在化する前に、予防・予測・対処する手段を見出すための研究を行うことは、21世紀の持続可能な社会の形成に貢献する重大な役割であると言える。本研究では、次世代を担う子ども達の健康を守り、いざ問題が生じた際に対処できるようにするため、その基盤となる科学的根拠を提示すべく、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の中樞神経系に及ぼす影響とその機序の解明を目的として取り組んだ。

第2章では、ナノ粒子の胎児期曝露に対して鋭敏かつ用量依存的に応答する、中樞神経系の領域や細胞を同定することを目的として行った。ナノ粒子の胎児期曝露による生体影響を評価するうえでは、低用量曝露でも鋭敏かつ用量依存的に応答する細胞や脳領域の同定が求められる。そのためには、通常、研究対象となる物体の体内分布を評価して、その物体の存在する細胞について解析する方法が標準的になるが、生体内に散ったナノ粒子の分布を解明することは、現在の分析技術では難しく、その分布に基づいた評価は望めなかった。ゆえに、本研究では網羅的な影響評価を別の手法で行う必要があり、それに最も有効な組織学的解析を中心に行うことでこの問題を解決した。また、既存の組織学的解析法のみでは低用量曝露に伴う微細な異変を評価することが困難であったため、独自の組織病理学的解析手法を確立して、解析を行った。その結果、実社会で曝露しうる、胎盤の遺伝子発現に影響を及ぼさない程度の低用量のCB-NPの妊娠期経気道曝露に対し、出生児の脳血管周辺に存在するPVMやアストロサイトが鋭敏に応答することが明らかになった。とくにアストロサイトのGFAPとAqp4のタンパク質の発現量は、CB-NPの用量依存的に亢進することが示された。これは、ナノ粒子の発達神経毒性を評価するための、定量的な指標になると考えられた。この成果は、これまで課題となっていた用量依存性のデータ不足を補完するものであり、胎児期におけるナノ粒子の曝露量と出生児の中樞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。したがって、ナノ粒子の発達神経毒性の評価とその機序解明に向けた研究の遂行や、ナノ粒子の曝露に対する安全性評価手法や予防手法の確立に大きく貢献する先進的な知見である。

第3章では、第2章で観察された脳血管周辺の組織学的異変に注目し、その病態に

ついて、*in situ* FT-IR 法と古典的な染色方法を組み合わせた解析により解明した。興味深いことに、CB-NP の胎児期曝露に対して鋭敏に応答した脳血管周辺組織について、電子顕微鏡を用いた超微小形態観察を行った際に、ナノ粒子自体をその脳血管周辺で見つけることはできなかった。ナノ粒子の生体影響を追究し、その機序を理解する上では、ナノ粒子が検出されないにも関わらず、脳血管周辺が顕著な影響を受ける要因を明らかにする必要があった。しかし、組織を一塊にした手法では血管周辺に限定した解析は難しく、組織学的解析では網羅性と定量性に乏しくなる。この問題を同時に解決するため、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、分子の種類や状態を解析することが可能な *in situ* 赤外分光分析法と古典的な組織学的解析手法を融合させた評価系を構築し、解析に臨んだ。その結果、CB-NP の胎児期曝露によって組織病理学的異変の生じている血管周辺には、 β -sheet-rich protein が集積していることが明らかになった。さらに、その β -sheet-rich protein は、小胞体ストレスの評価により、中枢神経系内で生じたタンパク質の構造変化体であることが示唆された。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、 β -sheet 構造を増加させること、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脳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、その構造変化体が脳内の老廃物排出機構によって血管周辺への排出、集積され、その集積によ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、アストログリオーシスや 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、本研究により、空気中に浮遊するナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺の組織学的異変を誘導する機序の一端が解明され、ナノ粒子を多分に含む大気汚染の周産期曝露が中枢神経系の異変を誘導する原因として、粒子によるタンパク質の構造変化体が重要な因子である可能性が示された。これは、これまで情報の乏しかった、ナノ粒子の胎児期曝露が出生児の脳へ影響を及ぼす機序の解明に繋がる、先駆的な研究と言える。本研究の成果は、ナノ粒子の曝露時に生じる健康被害の予測と対処や、より安全なナノマテリアルの開発と利用法の確立に向けて、ナノ粒子が生体影響を発現する機序の解明に大きく貢献する、価値の高いものである。

第4章では、第2章と第3章から得られた知見が、より実社会に近い曝露方法（吸入曝露系）でも同様の所見が生じるのか検証した。その結果、出生児に、PVM の組織病理

学的異変、大脳皮質と海馬におけるアストロサイト GFAP の用量依存的な発現亢進が確認された。これは、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、第2章と第3章で得られた知見の確からしさが強調された。さらに、大脳皮質前頭前野と運動野におけるパルブアルブミン陽性介在ニューロンの減少、オープンフィールドテストによる自発活動量の増加といった所見が認められた。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、発達期の中樞神経系が、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。実社会に極めて近い条件で曝露した本章の研究成果は、曝露により生じる生体応答について厳密に捉えたものだと考えられ、ナノ粒子の基準値の制定やリスク評価等、実社会への応用が期待される。

第5章では、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樞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、NAC により抑制された。これは、NAC 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的手段となりうることを示唆している。一方で、NAC の抑制効果は、CB-NP 胎児期曝露により発現亢進を示す Aqp4 には機能しなかったことや、アスコルビン酸の母体投与は、CB-NP の胎児期曝露による GFAP と AQP4 の発現亢進を低下させなかったことから、ナノ粒子の発達神経毒性には母体酸化ストレス以外の機序も存在することが想定される。本研究成果は、ナノ粒子の発達神経毒性の機序をより正しく理解することに貢献し、また、その影響や毒性を予防するための手段を確立することに繋がると考えられる。

本研究では、ナノ粒子の胎児期曝露が子どもの脳に及ぼす影響を評価する上で重要な、鋭敏に応答する定量的評価指標を明らかにし、さらに、その影響が生じる機序の一端を解明するに至った。これは、ナノ粒子がもつ潜在的なリスクを解明したばかりでなく、ナノ粒子の胎児期曝露に対する予防法や対処法の確立、あるいは、その影響の論理的な予測に大きく貢献する価値の高い知見と言える。また、本学位論文に記載した研究を遂行している最中に、ナノ粒子を多分に含む大気汚染の妊娠期間中の曝露が中枢神経疾患の発症リスクを増加させることが疫学研究により明らかになった (Calderón-Garcidueñas et al.,

2014, 2016a; Heusinkveld et al., 2016)。中でも、炭素原子を核にもつナノ粒子の妊娠期曝露と自閉症スペクトラムや統合失調症の発症率との間に、曝露量依存的な相関性が明確に示された (Allen et al., 2015; Raz et al., 2015; Woodward et al., 2015)。加えて、PM_{2.5}の周産期曝露が、発達期の脳における神経細胞と血管内皮細胞、ペリサイト、アストロサイト、ミクログリアにより構成された神経血管単位 (neurovascular unit) に対して長期的な傷害を誘導し、アルツハイマー病やパーキンソン病などの神経変性疾患の発症要因となることも示唆されている (Calderón-Garcidueñas et al., 2013, 2016a,b; Heusinkveld et al., 2016)。本研究で得られた所見は、これら神経変性疾患や発達神経障害の初期病変や早期の病態を捉えたと考えられ、その疾病発症の理解に向けた基盤となる知見を提供した他、その予防、あるいは新たな治療戦略に貢献することが期待される。

2017年12月には、ユニセフ（国際連合児童基金）が、大気環境と子どもの健康に関する最新の国際動向をまとめた報告書、*Danger in the Air: How air pollution can affect brain development in young children* を発表した (UNICEF, 2017)。この報告書では、大気環境中に浮遊する粒子状物質が子どもの「脳の発達」に及ぼす影響こそ、最も注意すべきものとして取り上げている。ヒトを対象にした疫学研究の成果から、粒子状物質を含む大気汚染の著しい地域に住む子どもたちの認知機能や知能指数 (IQ) の低下が明らかになっている他 (Sunyer et al., 2015; Suglia et al., 2008)、妊娠期や新生児期、乳幼児期における粒子状物質の曝露が、出生後3歳から5歳になった頃に注意欠陥多動症 (ADHD) や自閉症スペクトラム、うつ様症状、不安神経症といった神経発達障害を誘導することが報告されている (Raz et al., 2015; Perera et al., 2006; Perera et al., 2009; Perera et al., 2014; Jedrychowski et al., 2015; Yorifuji et al., 2016;)。他にも、粒子状物質を多量に含む大気汚染は、神経発達障害と強い相関性が認められる早産や低体重出産を引き起こすことも示されている (Sly et al., 2012; Fleischer et al., 2014)。こうした知見から、現状として、大気中に浮遊する粒子状物質が子どもの脳の健全な発育に不都合な影響を及ぼす潜在的なリスク因子であることは明白である。したがって、次世代を担う子どもたちの健康を守るため、大気環境について正しく理解し、子どもたちが健全に育むことのできる持続可能な社会基盤と環境基盤を構築することが強く求められている。そのためには、政策の意思決定を支える、影響評価や機序解明を目的とした基盤となる研究を行い、科学的根拠を整えることが大切になる。本研究のように、動物を用いて得られた研究成果は、ヒトを対象にした疫学研究では得ることの難しい、脳組織に関する病理学的所見や生体分子の詳細な情報を取得することができ、子ども

達の健康増進を目的とした政策を打ち立てる上で欠かせない、科学的根拠を提供する大切な役割を持つ。つまり、本研究の成果は、大気環境と健康の関わりについて正しい理解を促し、次世代を担う子ども達が健全に発育することのできる空気環境の形成、社会基盤・環境基盤の構築に繋がることが期待される。

一方で、別の視点から見ると、環境面のみならず、産業面に対しても本研究が示した新規の知見は有効に活用できる。大気環境中に浮遊するナノ粒子と酷似した大きさである、ナノマテリアルという素材が存在する。産業面で利用される工業用ナノマテリアルは、近年目覚ましい発展を続けるナノテクノロジーを支える基盤材料であり、新奇機能を持ったナノマテリアルの開発がその発展には不可欠である。本研究の成果は、労働者と消費者への曝露、環境中への排出を考慮した、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資するという側面も持っている。本研究で得られた知見が、我々の生活水準を向上させる新規科学技術の持続的な発展に繋がることが期待される。

以上、課程博士の在学期間中に取り組んだ、5つの研究により、ナノ粒子の衛生学研究に求められる、主たる研究課題、① 曝露の拡大が予想されるナノ粒子の潜在的なリスクを綿密に評価し、利便性との兼ね合いを考えた適切な安全管理を可能にすること、② ナノ粒子の曝露時に生じる健康被害の予測と対処や、より安全なナノマテリアルの開発と利用法の確立に向けて、ナノ粒子が生体影響を発現する機序を解明すること、③ ナノ粒子の持つ毒性を低減させる手段を模索すること それぞれを解決するための基盤となる価値ある知見を提供した。将来的に、環境面では次世代を担う子どもたちが健全に成長することのできる空気環境の形成に、産業面ではナノテクノロジーの持続的な発展に資することが期待される。今後は、本研究の成果に基づいてさらに研究を深め、とくに、ナノ粒子の胎児期曝露が脳血管周辺組織に影響を及ぼす機序の全容を解明することが課題になる。それが、大気汚染の曝露に起因する神経発達障害について深く理解することに繋がり、将来的に、ナノ粒子をはじめとした大気汚染の曝露から子どもたちの健康を守り、対処する術の確立に貢献すると考えられる。こうした研究を進め、社会基盤レベルの改革から個人が取れる対策まで考え、展開していくことが、次世代を担う子ども達のために、今を生きる私達に課せられた使命であるとここに強く主張する。

参考文献

- Abbott NJ. (2002). Astrocyte-endothelial interactions and blood-brain barrier permeability. *J Anat.* 200(6):629-38.
- Achat-Mendes C, Anderson KL, Itzhak Y. (2007). Impairment in consolidation of learned place preference following dopaminergic neurotoxicity in mice is ameliorated by N-acetylcysteine but not D1 and D2 dopamine receptor agonists. *Neuropsychopharmacology.* 32(3):531-41.
- Ahamed, M., (2011) Toxic response of nickel nanoparticles in human lung epithelial A549 cells. *Toxicol. In Vitro,* 25, 930-936.
- Ahamed, M., Posgai, R., Gorey, T.J., Nielsen, M., Hussain, S.M., Rowe, J.J., (2010): Silver nanoparticles induced heat shock protein 70, oxidative stress and apoptosis in *Drosophila melanogaster*. *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 242, 263-269.
- Al-Amin MM, Alam T, Hasan SM, Hasan AT, Quddus AH. (2016). Prenatal maternal lipopolysaccharide administration leads to age- and region-specific oxidative stress in the early developmental stage in offspring. *Neuroscience.* 318:84-93.
- Allen JL, Oberdorster G, Morris-Schaffer K, Wong C, Klocke C, Sobolewski M, Conrad K, Mayer-Proschel M, Cory-Slechta DA. (2017). Developmental neurotoxicity of inhaled ambient ultrafine particle air pollution: Parallels with neuropathological and behavioral features of autism and other neurodevelopmental disorders. *Neurotoxicology* 59: 140-54
- Al-Rasheed, N.M., Faddah, L.M., Mohamed, A.M., Abdel Baky, N.A., Al-Rasheed, N.M., Mohammad, R.A., (2013). Potential impact of quercetin and idebenone against immunoinflammatory and oxidative renal damage induced in rats by titanium dioxide nanoparticles toxicity. *J. Oleo. Sci.* 62, 961-971.
- Alshammari TK, Alshammari MA, Nenov MN, Hoxha E, Cambiaghi M, Marcinno A, James TF, Singh P, Labate D, Li J, Meltzer HY, Sacchetti B, Tempia F, Laezza F. (2016). Genetic deletion of fibroblast growth factor 14 recapitulates phenotypic alterations underlying cognitive impairment associated with schizophrenia. *Transl Psychiatry* 6: e806
- Amor S, Puentes F, Baker D, van der Valk P. (2010). Inflammation in neurodegenerative diseases. *Immunology.* 129(2):154-69.
- Ando J, Fujisawa KK, Shikishima C, Hiraishi K, Nozaki M, Yamagata S, Takahashi Y, Ozaki K, Suzuki K, Deno M, Sasaki S, Toda T, Kobayashi K, Sugimoto Y, Okada M, Kijima N, Ono

- Y, Yoshimura K, Kakihana S, Maekawa H, Kamakura T, Nonaka K, Kato N, Ooki S. (2013). Two cohort and three independent anonymous twin projects at the Keio Twin Research Center (KoTReC). *Twin Res Hum Genet.* 16(1):202-16.
- Araki K, Yagi N, Ikemoto Y, Yagi H, Choong CJ, Hayakawa H, et al. (2015). Synchrotron FTIR micro-spectroscopy for structural analysis of Lewy bodies in the brain of Parkinson's disease patients. *Sci Rep.* 5:17625. doi: 10.1038/srep17625.
- Arbejdstilsynet. Bekendtgørelse om grænseværdier for stoffer og materialer. Arbejdstilsynets bekendtgørelse nr. 507 af 17. maj 2011 med senere ændringer - ikke autoriseret sammenskrivning. 2011. Copenhagen, Arbejdstilsynet. (2016).
- Atladóttir HO, Thorsen P, Østergaard L, Schendel DE, Lemcke S, Abdallah M, et al. (2010). Maternal infection requiring hospitalization during pregnancy and autism spectrum disorders. *J Autism Dev Disord.* 40(12):1423-30. doi: 10.1007/s10803-010-1006-y.
- Axelstad M, Boberg J, Hougaard KS, Christiansen S, Jacobsen PR, Mandrup KR, Nellemann C, Lund SP, Hass U. (2011). Effects of pre- and postnatal exposure to the UV-filter octyl methoxycinnamate (OMC) on the reproductive, auditory and neurological development of rat offspring. *Toxicol Appl Pharmacol* 250(3): 278-290.
- Badaut J, Copin JC, Fukuda AM, Gasche Y, Schaller K, da Silva RF. (2012). Increase of arginase activity in old apolipoprotein-E deficient mice under Western diet associated with changes in neurovascular unit. *J Neuroinflammation.* 18;9:132. doi: 10.1186/1742-2094-9-132.
- Bakand S, Hayes A. Toxicological Considerations, Toxicity Assessment, and Risk Management of Inhaled Nanoparticles. *Int J Mol Sci.* 17(6), 929.
- Balasingam V, Tejada-Berges T, Wright E, Bouckova R, Yong VW. (1994). Reactive astrogliosis in the neonatal mouse brain and its modulation by cytokines. *J Neurosci.* 14(2):846-56.
- Bao F, Liu D. (2004). Hydroxyl radicals generated in the rat spinal cord at the level produced by impact injury induce cell death by necrosis and apoptosis: protection by a metalloporphyrin. *Neuroscience.* 126(2):285-95.
- Barkley RA. (1998). Attention-Deficit Hyperactivity Disorder: A Handbook for Diagnosis and Treatment, Second Edition, The Guilford Press, New York.
- Barrett JR. (2016). Prenatal Air Pollution and Reduced Birth Weight: Decline in Placental Mitochondria as a Potential Mechanism. *Environ Health Perspect.*; 124(5):A98.

- Baskakov IV. (2009). Switching in amyloid structure within individual fibrils: implication for strain adaptation, species barrier and strain classification. *FEBS Lett.* 583(16):2618-22. doi: 10.1016/j.febslet.2009.05.044.
- Bates KA, Martins RN, Harvey AR. (2007). Oxidative stress in a rat model of chronic gliosis. *Neurobiol Aging.* 28(7):995-1008.
- Bhattacharjee, S., de Haan, L.H., Evers, N.M., Jiang, X., Marcelis, A.T., Zuilhof, H., Rietjens, I.M., Alink, G.M., (2010). Role of surface charge and oxidative stress in cytotoxicity of organic monolayer-coated silicon nanoparticles towards macrophage NR8383 cells. *Part. Fibre Toxicol.* 7, 25.
- Bleyl SB and Schoenwolf GC. (2010). What is the timeline of important events during pregnancy that may be disrupted by a teratogenic exposure? *Teratology Primer*, edited by Barbara Hales et al. The Teratology Society.
- Blum JL, Edwards JR, Prozialeck WC, Xiong JQ, Zelikoff JT. (2015). Effects of Maternal Exposure to Cadmium Oxide Nanoparticles During Pregnancy on Maternal and Offspring Kidney Injury Markers Using a Murine Model. *J Toxicol Environ Health A.* 78(12):711-24.
- Boksa P, Zhang Y, Nouel D, Wong A, Wong TP. (2016). Early Development of Parvalbumin-, Somatostatin-, and Cholecystokinin-Expressing Neurons in Rat Brain following Prenatal Immune Activation and Maternal Iron Deficiency. *Dev Neurosci* 38(5): 342-353
- Bolton JL, Smith SH, Huff NC, Gilmour MI, Foster WM, Auten RL, et al. (2012). Prenatal air pollution exposure induces neuroinflammation and predisposes offspring to weight gain in adulthood in a sex-specific manner. *FASEB J.* 26(11):4743-54.
- Bourdon JA, Halappanavar S, Saber AT, Jacobsen NR, Williams A, Wallin H, Vogel U and Yauk CL. (2012). Hepatic and pulmonary toxicogenomic profiles in mice intratracheally instilled with carbon black nanoparticles reveal pulmonary inflammation, acute phase response and alterations in lipid homeostasis. *Toxicol Sci.* 127(2): 474-484
- Bousset L, Pieri L, Ruiz-Arlandis G, Gath J, Jensen PH, Habenstein B, et al. (2013). Structural and functional characterization of two alpha-synuclein strains. *Nat Commun.* 4:2575.
- Brazma A, Hingamp P, Quackenbush J, Sherlock G, Spellman P, Stoeckert C, Aach J, Ansorge W, Ball CA, Causton HC, Gaasterland T, Glenisson P, Holstege FC, Kim IF, Markowitz V, Matese JC, 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 (4), 365–71.
- Brown AS. (2012). Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. *Dev Neurobiol.* 72(10):1272-6. doi: 10.1002/dneu.22024.
- Brown GC, Neher JJ. (2014). Microglial phagocytosis of live neurons. *Nat Rev Neurosci.* 15(4):209-16. doi: 10.1038/nrn3710.
- Bucciantini M, Giannoni E, Chiti F, Baroni F, Formigli L, Zurdo J, et al. (2002). Inherent toxicity of aggregates implies a common mechanism for protein misfolding diseases. *Nature.* 416(6880):507-11.
- Buerki-Thurnherr T, von Mandach U, Wick P. (2012). Knocking at the door of the unborn child: engineered nanoparticles at the human placental barrier. *Swiss Med Wkly.* 142: w13559.
- Bulcke F, Thiel K, Dringen R. (2014). Uptake and toxicity of copper oxide nanoparticles in cultured primary brain astrocytes. *Nanotoxicology.* 8(7):775-85.
- Butt AM, Hamilton N, Hubbard P, Pugh M, Ibrahim M. (2005). Synantocytes: the fifth element. *J Anat.* 207(6):695–706.
- Caballero A, Tseng KY. (2016). GABAergic Function as a Limiting Factor for Prefrontal Maturation during Adolescence. *Trends Neurosci* 39(7): 441-448
- Caine S, Heraud P, Tobin MJ, McNaughton D, Bernard CC. (2012). The application of Fourier transform infrared microspectroscopy for the study of diseased central nervous system tissue. *Neuroimage.* 15;59(4):3624-40.
- Calderón-Garcidueñas L, Franco-Lira M, Mora-Tiscareño A, Medina-Cortina H, Torres-Jardón R, and Kavanaugh M. (2013). Early Alzheimer's and Parkinson's disease pathology in urban children: friend versus foe responses—it is time to face the evidence. *Biomed. Res. Int.* 161687.
- Calderón-Garcidueñas L, Leray E, Heydarpour P, Torres-Jardón R, and Reis J. (2016a). Air pollution, a rising environmental risk factor for cognition, neuroinflammation and neurodegeneration: the clinical impact on children and beyond. *Rev. Neurol.* 172(1), 69–80.
- Calderón-Garcidueñas L, Reynoso-Robles R, Vargas-Martínez J, Gómez-Maqueo-Chew A, Pérez-Guillé B, Mukherjee PS, et al. (2016b). Prefrontal white matter pathology in air pollution exposed Mexico City young urbanites and their potential impact on neurovascular

- unit dysfunction and the development of Alzheimer's disease. *Environ Res.* 146:404-17.
- Calderón-Garcidueñas L, Torres-Jardón R, Kulesza RJ, Park SB, D'Angiulli A. (2014). Air pollution and detrimental effects on children's brain. The need for a multidisciplinary approach to the issue complexity and challenges. *Front Hum Neurosci.* 8:613. doi: 10.3389/fnhum.2014.00613.
- Canetta S, Bolkan S, Padilla-Coreano N, Song LJ, Sahn R, Harrison NL, Gordon JA, Brown A, Kellendonk C. (2016). Maternal immune activation leads to selective functional deficits in offspring parvalbumin interneurons. *Mol Psychiatry* 21(7): 956-968
- Cavaglia M, Dombrowski SM, Drazba J, VasANJI A, Bokesch PM, et al. (2001). Regional variation in brain capillary density and vascular response to ischemia. *Brain Res* 10;910(1–2): 81–93.
- Chastre A, Jiang W, Desjardins P, Butterworth RF. (2010). Ammonia and proinflammatory cytokines modify expression of genes coding for astrocytic proteins implicated in brain edema in acute liver failure. *Metab Brain Dis.* 25(1):17-21.
- Chauhan NB. (2014). Chronic neurodegenerative consequences of traumatic brain injury. *Restor Neurol Neurosci.* 32(2):337-65. d
- Chen H, Wang B, Gao D, Guan M, Zheng L, Ouyang H, Chai Z, Zhao Y, Feng W. (2013). Broad-spectrum antibacterial activity of carbon nanotubes to human gut bacteria. *Small.* 26;9(16):2735-46.
- Chen JC, Wang X, Wellenius GA, Serre ML, Driscoll I, Casanova R, McArdle JJ, Manson JE, Chui HC, Espeland MA. (2015). Ambient air pollution and neurotoxicity on brain structure: evidence from women's health initiative memory study. *Ann Neurol* 78(3): 466–476.
- Chen Q, Espey MG, Sun AY, Lee JH, Krishna MC, Shacter E, Choyke PL, Pooput C, Kirk KL, Buettner GR, Levine M. (2007). Ascorbate in pharmacologic concentrations selectively generates ascorbate radical and hydrogen peroxide in extracellular fluid in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007 104(21):8749-54.
- Chen YH, Xu DX, Zhao L, Wang H, Wang JP, Wei W. (2006). Ascorbic acid protects against lipopolysaccharide-induced intra-uterine fetal death and intra-uterine growth retardation in mice. *Toxicology.* 217(1):39-45.
- Chen, B., Liu, Y., Song, W.M., Hayashi, Y., Ding, X.C., Li, W.H., (2011). In vitro evaluation of cytotoxicity and oxidative stress induced by multiwalled carbon nanotubes in murine RAW

- 264.7 macrophages and human A549 lung cells. *Biomed. Environ. Sci.* 24, 593-601.
- Chin-Chan M, Navarro-Yepes J, Quintanilla-Vega B. (2015). Environmental pollutants as risk factors for neurodegenerative disorders: Alzheimer and Parkinson diseases. *Front Cell Neurosci.* 10;9:124. doi: 10.3389/fncel.2015.00124.
- Choi et al., (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.*, 25, 1165-70
- Choi HS, Ashitate Y, Lee JH, Kim SH, Matsui A, Insin N, et al. (2010). Rapid translocation of nanoparticles from the lung airspaces to the body. *Nat Biotechnol.* 28(12):1300-3. doi: 10.1038/nbt.1696.
- Choi, H.S., Liu, W., Misra, P., Tanaka, E., Zimmer, J.P., Ity, Ipe, B., Bawendi, M.G., Frangioni, J.V., (2007). Renal clearance of quantum dots. *Nat. Biotechnol.* 25, 1165-1170.
- Choo LP, Mansfield J, Pizzi N, Somorjai R, Jackson M, Halliday W, et al. (1995). Infrared spectra of human central nervous system tissue: diagnosis of alzheimer's disease by multivariate analyses. *Biospectroscopy* 1 (2):141-8.
- Chung DW, Fish KN, Lewis DA. (2016). Pathological Basis for Deficient Excitatory Drive to Cortical Parvalbumin Interneurons in Schizophrenia. *Am J Psychiatry* 173(11): 1131-1139
- Colangelo AM, Alberghina L, Papa M. (2014). Astroglialosis as a therapeutic target for neurodegenerative diseases. *Neurosci Lett.* 565:59-64.
- Colangelo AM, Cirillo G, Lavitrano ML, Alberghina L, Papa M. (2012). Targeting reactive astroglialosis by novel biotechnological strategies. *Biotechnol Adv.* 1:261-71.
- Coleman BM, Nisbet RM, Han S, Cappai R, Hatters DM, et al. (2009). Conformational detection of prion protein with biarsenical labeling and FIAsh fluorescence. *Biochem Biophys Res Commun.* 380(3):564-8. doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.120.
- Cools R, and D'Esposito M. (2011). Inverted-U-shaped dopamine actions on human working memory and cognitive control. *Biol Psychiatry.* 69 (12), e113-25.
- Cserr HF, Ostrach LH (1974). Bulk flow of interstitial fluid after intracranial injection of blue dextran 2000. *Exp Neurol* 45(1): 50-60.
- Cui Y, Chen X, Zhou Z, Lei Y, Ma M, Cao R, Sun T, Xu J, Huo M, Cao R, Wen C, and Che Y. (2014). Prenatal exposure to nanoparticulate titanium dioxide enhances depressive-like behaviors in adult rats. *Chemosphere.* 96, 99-104.
- Cuzzocrea S, Mazzon E, Costantino G, Serraino I, Dugo L, Calabrò G, Cucinotta G, De Sarro A,

- Caputi AP. 2000. Beneficial effects of n-acetylcysteine on ischaemic brain injury. *Br J Pharmacol.* 130(6):1219-26.
- Dadvand P, Parker J, Bell ML, Bonzini M, Brauer M, Darrow LA, et al. (2013). Maternal exposure to particulate air pollution and term birth weight: a multi-country evaluation of effect and heterogeneity. *Environ Health Perspect.* 21(3):267-373.
- Dalmases M, Torres M, Márquez-Kisinousky L, Almendros I, Planas AM, Embid C, Martínez-García MÁ, Navajas D, Farré R, Montserrat JM. (2014). Brain tissue hypoxia and oxidative stress induced by obstructive apneas is different in young and aged rats. *Sleep.*;37(7):1249-56.
- de Souza DF, Wartchow KM, Lunardi PS, Brolese G, Tortorelli LS, Batassini C, Biasibetti R, Gonçalves CA. (2015). Changes in astroglial markers in a maternal immune activation model of schizophrenia in Wistar rats are dependent on sex. *Front Cell Neurosci* 9: 489
- Donaldson K, Tran L, Jimenez LA, Duffin R, Newby DE, et al. (2005). Combustion-derived nanoparticles: a review of their toxicology following inhalation exposure. *Part Fibre Toxicol* 21;2: 10.
- Dooley EE. (2002). Fifty years later: clearing the air over the London smog. *Environ Health Perspect.* 110(12):A748. No abstract available.
- Dringen R, Brandmann M, Hohnholt MC, Blumrich EM. (2015). Glutathione-Dependent Detoxification Processes in Astrocytes. *Neurochem Res.* 40(12):2570-82.
- Driscoll KE, Carter JM, Howard BW, Hassenbein DG, Pepelko W, Baggs RB, Oberdörster G. (1996). Pulmonary inflammatory, chemokine, and mutagenic responses in rats after subchronic inhalation of carbon black. *Toxicol Appl Pharmacol* 136(2): 372-380.
- Du X, Ewert DL, Cheng W, West MB, Lu J, Li W, Floyd RA, Kopke RD. (2013). Effects of antioxidant treatment on blast-induced brain injury. *PLoS One.* 8(11):e80138.
- Duffin R, Tran L, Brown D, Stone V, Donaldson K. (2007). Proinflammatory effects of low-toxicity and metal nanoparticles in vivo and in vitro: highlighting the role of particle surface area and surface reactivity. *Inhal Toxicol* 19; : 849–856.
- Durga M, Devasena T and Prakhya BM. (2013). Toxicity of exhaust nanoparticles. *African J Pharm Pharmacol.* 7(7)318-331
- El-Sayed YS, Shimizu R, Onoda A, Takeda K, Umezawa M (2015). Carbon black nanoparticle

- exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology*: 327:53-61.
- Ema M, Gamo M, Honda K. (2016a). Developmental toxicity of engineered nanomaterials in rodents. *Toxicol Appl Pharmacol*. 299:47-52.
- Ema M, Hougaard KS, Kishimoto A, Honda K. (2016b). Reproductive and developmental toxicity of carbon-based nanomaterials: A literature review. *Nanotoxicology*. 10(4), 391-412.
- Engler-Chiurazzi EB, Stapleton PA, Stalnaker JJ, Ren X, Hu H, Nurkiewicz TR, McBride CR, Yi J, Engels K, Simpkins JW. (2016). Impacts of prenatal nanomaterial exposure on male adult Sprague-Dawley rat behavior and cognition. *J Toxicol Environ Health A* 79(11): 447-452
- Erdő F, Denes L, de Lange E. (2017). Age-associated physiological and pathological changes at the blood-brain barrier: A review. *J Cereb Blood Flow Metab*. 37(1):4-24.
- Estes ML, McAllister AK. (2016). Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science* 353: 772-777
- Fabriek BO, Van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Döpp ED, et al. (2005). CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 51: 297–305.
- Faraco G, Park L, Anrather J, and Iadecola C. (2017). Brain perivascular macrophages: characterization and functional roles in health and disease. *J Mol Med (Berl)*. [Epub ahead of print]
- Fedulov, A.V., Leme, A., Yang, Z., Dahl, M., Lim, R., Mariani, T.J. and Kobzik, L. (2008). Pulmonary Exposure to Particles during Pregnancy Causes Increased Neonatal Asthma Susceptibility. *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.*, 38, 57-67.
- Feynman, R.P., (1970). There's plenty of room at the bottom. *Engineering Science* 23, 22-36.
- Fisher SE, Duffy L, Atkinson M. Selective fetal malnutrition: effect of acute and chronic ethanol exposure upon rat placental Na,K-ATPase activity. *Alcohol Clin Exp Res*. 1986; 10(2):150-3.
- Fleischer NL, Merialdi M, van Donkelaar A, Vadillo-Ortega F, Martin RV, Betran AP et al. (2014). Outdoor air pollution, preterm birth, and low birth weight: analysis of the world health organization global survey on maternal and perinatal health. *Environ Health Perspect*. 122(4):425-430.

- Foglio E, Rodella LF. (2010). Aquaporins and neurodegenerative diseases. *Curr Neuropharmacol.* 8(2):112-21. doi: 10.2174/157015910791233150.
- Franklin K.B.J., Paxinos G. (1997). *The Mouse Brain in Stereotaxic Coordinates*. San Diego: Academic Press
- Fuster JM. (1997). *The Prefrontal Cortex: Anatomy, Physiology, and Neuropsychology of the Frontal Lobe*, Third edition, Lippincott-Raven, New York
- Galea I, Palin K, Newman TA, Van Rooijen N, Perry VH, Boche D. (2005). Mannose receptor expression specifically reveals perivascular macrophages in normal, injured, and diseased mouse brain. *Glia.* 49(3):375-84.
- García-González D, Khodosevich K, Watanabe Y, Rollenhagen A, Lübke JHR, Monyer H. (2017). Serotonergic Projections Govern Postnatal Neuroblast Migration. *Neuron* 94(3): 532-549
- Gentleman SM, Leclercq PD, Moyes L, Graham DI, Smith C, Griffin WS, Nicoll JA. (2004). Long-term intracerebral inflammatory response after traumatic brain injury. *Forensic Sci Int.* 2:97–104.
- Gidalevitz T, Kikis EA, Morimoto RI. (2010). A cellular perspective on conformational disease: the role of genetic background and proteostasis networks. *Curr Opin Struct Biol.* 20(1):23-32. doi: 10.1016/j.sbi.2009.11.001.
- Glausier JR, Fish KN, Lewis DA. (2014). Altered parvalbumin basket cell inputs in the dorsolateral prefrontal cortex of schizophrenia subjects. *Mol Psychiatry* 19(1): 30-36.
- Goldmann T, Wieghofer P, Jordão MJ, Prutek F, Hagemeyer N, Frenzel K, Amann L, Staszewski O, Kierdorf K, Krueger M, Locatelli G, Hochgerner H, Zeiser R, Eelman S, Geissmann F, Priller J, Rossi FM, Bechmann I, Kerschensteiner M, Linnarsson S, Jung S, Prinz M. (2016). Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces. *Nat Immunol* 17(7): 797-805
- Götz M, Huttner WB. (2005). The cell biology of neurogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 6(10):777-88.
- Graciarena M, Depino AM, Pitossi FJ. (2010). Prenatal inflammation impairs adult neurogenesis and memory related behavior through persistent hippocampal TGFbeta1 downregulation. *Brain Behav Immun* 24:1301–9.
- Graeber MB, Streit WJ, Buringer D, Sparks DL, Kreutzberg GW (1992). Ultrastructural location of

- major histocompatibility complex(MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain. *J Neuropathol Exp Neurol* 51: 303–311.
- Grandjean P, Kishi R, Kogevinas M; International Society for Environmental Epidemiology. (2017). Prevention of Developmental Neurotoxicity. *Epidemiology*. 28(2):157-158.
- Grandjean P, Landrigan PJ. (2014). Neurobehavioural effects of developmental toxicity. *Lancet Neurol*. 13(3):330-8.
- Greenfield NJ. (2006). Using circular dichroism spectra to estimate protein secondary structure. *Nat Protoc*. 1(6):2876-90.
- Gruol DL, Nelson TE. (1997). Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. *Mol Neurobiol* 15(3): 307-339.
- Guillemin GJ, Brew BJ (2004). Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification. *J Leukoc Biol* 75(3): 388–97.
- Gulyaeva NV. (2015). Brain ischemia, endoplasmic reticulum stress, and astroglial activation: new insights. *J Neurochem*. 2015 Feb;132(3):263-5.
- Gupta RK, Kanungo M. (2013). Glial molecular alterations with mouse brain development and aging: up-regulation of the Kir4.1 and aquaporin-4. *Age (Dordr)*. 35(1):59-67.
- Haj-Yasein NN, Vindedal GF, Eilert-Olsen M, Gundersen GA, Skare Ø, Laake P, Klungland A, Thorén AE, Burkhardt JM, Ottersen OP, Nagelhus EA. (2011) Glial-conditional deletion of aquaporin-4 (Aqp4) reduces blood-brain water uptake and confers barrier function on perivascular astrocyte endfeet. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108(43):17815-20.
- Halappanavar S, Jackson P, Williams A, Jensen KA, Hougaard KS, Vogel U et al. (2011). Pulmonary response to surface-coated nanotitanium dioxide particles includes induction of acute phase response genes, inflammatory cascades, and changes in microRNAs: a toxicogenomic study. *Environ Mol Mutagen*. 52:425–39.
- Haley GE, Kohama SG, Urbanski HF, Raber J. (2010) Age-related decreases in SYN levels associated with increases in MAP-2, apoE, and GFAP levels in the rhesus macaque precerebral cortex and hippocampus. *Age (Dordr)*. 32(3):283-96.
- Hall ED, Wang JA, Bosken JM, Singh IN. (2015) Lipid peroxidation in brain or spinal cord mitochondria after injury. *J Bioenerg Biomembr*. [Epub ahead of print]
- Hasegawa H, Ma T, Skach W, Matthay MA, Verkman AS. (1994). Molecular cloning of a

- mercurial-insensitive water channel expressed in selected water-transporting tissues. *J Biol Chem.* 25;269(8):5497-500.
- Hawkes CA, Gentleman SM, Nicoll JA, Carare RO. (2015). Prenatal high-fat diet alters the cerebrovasculature and clearance of β -amyloid in adult offspring. *J Pathol* 235: 619-631
- Hermanto Y, Takagi Y, Ishii A, Yoshida K, Kikuchi T, Funaki T, et al. (2016). Immunohistochemical Analysis of Sox17 Associated Pathway in Brain Arteriovenous Malformations. *World Neurosurg.* 87:573-83.e1-2.
- Heusinkveld HJ, Wahle T, Campbell A, Westerink RH, Tran L, Johnston H, et al. (2016). Neurodegenerative and neurological disorders by small inhaled particles. *Neurotoxicology.* 56:94-106. doi: 10.1016/j.neuro.2016.07.007.
- Hickey WF, Vass K, Lassmann H. (1992). Bone marrow derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras. *J Neuropathol Exp Neurol* 5: 246–256.
- Holder GE, McGary CM, Johnson EM, Zheng R, John VT, Sugimoto C, Kuroda MJ, Kim WK. (2014). Expression of the mannose receptor CD206 in HIV and SIV encephalitis: a phenotypic switch of brain perivascular macrophages with virus infection. *J Neuroimmune Pharmacol.* Dec;9(5):716-26.
- Hougaard KS, Andersen MB, Hansen AM, Hass U, Werge T, Lund SP. (2005). Effects of prenatal exposure to chronic mild stress and toluene in rats. *Neurotoxicol Teratol* 27(1): 153-167.
- Hougaard KS, Campagnolo L, Chavatte-Palmer P, Tarrade A, Rousseau-Ralliard D, Valentino S, Park MV, de Jong WH, Wolterink G, Piersma AH, Ross BL, Hutchison GR, Hansen JS, Vogel U, Jackson P, Slama R, Pietroiusti A, Cassee FR. (2015). A perspective on the developmental toxicity of inhaled nanoparticles. *Reprod Toxicol* 56: 118-140.
- Hougaard KS, Fadeel B, Gulumian M, Kagan VE, Savolainen KM. (2011). Developmental toxicity of engineered nanoparticles. In: Ramesh CG, editor. *Reproductive and developmental toxicology.* San Diego: Academic; p.269–90.
- Hougaard KS, Jackson P, Jensen KA, Sloth JJ, Löschner K, Larsen EH, Birkedal RK, Vibenholt A, Boisen AM, Wallin H, and Vogel U. (2016). Effects of prenatal exposure to surface-coated nanosized titanium dioxide (UV-Titan). A study in mice. *Part. Fibre. Toxicol.* 7, 16.
- Hougaard KS, Jackson P, Kyjovska ZO, Birkedal RK, De Temmerman PJ, Brunelli A, Verleyesen E,

- Madsen AM, Saber AT, Pojana G, Mast J, Marcomini A, Jensen KA, Wallin H, Szarek J, Mortensen A, Vogel U. (2013). Effects of lung exposure to carbon nanotubes on female fertility and pregnancy. A study in mice. *Reprod Toxicol*. 41:86-97.
- Hougaard KS, Jensen KA, Nordly P, Taxvig C, Vogel U, Saber AT et al. (2008). Effects of prenatal exposure to diesel exhaust particles on postnatal development, behavior, genotoxicity, and inflammation in mice. *Part Fibre Toxicol*;5:3.
- Hougaard KS, Saber AT, Jensen KA, Vogel U, Wallin H. (2009). Diesel exhaust particles: effects on neurofunction in female mice. *Basic Clin Pharmacol Toxicol* 105(2): 139-143
- Hur YM, Luciano M, Martin NG, Boomsma DI, Iacono WG, McGue M, Shin JS, Jun JK, Ooki S, van Beijsterveldt CE, Han JY. (2005). A comparison of twin birthweight data from Australia, the Netherlands, the United States, Japan, and South Korea: are genetic and environmental variations in birthweight similar in Caucasians and East Asians? *Twin Res Hum Genet*. 8(6):638-48.
- Ihara T, Yamamoto T, Sugamata M, Okumura H, Ueno Y (1998). The process of ultrastructural changes from nuclei to apoptotic body. *Virchows Arch* 433(5): 443–7.
- Iliff JJ, Wang M, Liao Y, Plogg BA, Peng W, Gundersen GA, et al. (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β . *Sci Transl Med*. 4(147):147ra111.
- Ito H, Yamamoto N, Arima H, Hirate H, Morishima T, Umenishi F, et al. (2006). Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- κ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem*. 99(1):107-18.
- Izak-Nau E, Kenesei K, Murali K, Voetz M, Eiden S, Puentes VF, Duschl A, Madarász E. (2014). Interaction of differently functionalized fluorescent silica nanoparticles with neural stem- and tissue-type cells. *Nanotoxicology*. 8 Suppl 1:138-48.
- Jackson P, Hougaard KS, Boisen AM, Jacobsen NR, Jensen KA, Møller P, Brunborg G, Gutzkow KB, Andersen O, Loft S, Vogel U, Wallin H. (2012). Pulmonary exposure to carbon black by inhalation or instillation in pregnant mice: effects on liver DNA strand breaks in dams and offspring. *Nanotoxicology*. 6(5), 486–500.
- Jackson P, Hougaard KS, Vogel U, Wu D, Casavant L, Williams A, et al. (2012). Exposure of pregnant mice to carbon black by intratracheal instillation: Toxicogenomic effects in dams

- and offspring. *Mutat Res.* 745, 73-83.
- Jackson P, Vogel U, Wallin H, and Hougaard KS. (2011). Prenatal exposure to carbon black (printex 90): effects on sexual development and neurofunction. *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.* 109 (6), 434-7.
- Jackson P, Vogel U, Wallin H, Hougaard KS (2011). Maternal Exposure to Particulate Air Pollution and Engineered Nanoparticles: Reproductive and Developmental Effects. In: Anca, M M, editor. *Air Pollution - New Developments*. Rijeka University Campus Step Ri. pp. 59–84.
- Jacobsen NR, Saber AT, White P, Møller P, et al. (2007). Increased mutant frequency by carbon black, but not quartz, in the lacZ and cII transgenes of muta mouse lung epithelial cells. *Environ Mol Mutagen* 48(6): 451–61.
- Jacobsen NR, White PA, Gingerich J, Møller P, Saber AT, et al. (2011). Mutation spectrum in FE1-MUTA(TM) Mouse lung epithelial cells exposed to nanoparticulate carbon black. *Environ Mol Mutagen* 52(4): 331–7.
- Janda E, Lascalea A, Carresi C, Parafati M, Aprigliano S, Russo V, Savoia C, Ziviani E, Musolino V, Morani F, et al. (2015). Parkinsonian toxin-induced oxidative stress inhibits basal autophagy in astrocytes via NQO2/quinone oxidoreductase 2: Implications for neuroprotection. *Autophagy*. 11(7):1063-80.
- Jedrychowski et al., (2015). Prenatal exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons and cognitive dysfunction in children. *Environ Sci Pollut Res Int.*, 22(5): 3631-9
- Jones (1999) Protein Secondary Structure Prediction Based on Position-specific Scoring Matrices. *J. Mol. Biol.* 292, 195-202
- Kafri T, Ariel M, Brandeis M, Shemer R, Urven L, McCarrey J, Cedar H, Razin A. (1992). Developmental pattern of gene-specific DNA methylation in the mouse embryo and germ line. *Genes Dev* 6(5): 705-714.
- Kamimura M, Omoto A, Chiu CH, Soga K. (2017). Enhanced Red Upconversion Emission of NaYF₄:Yb³⁺, Er³⁺, Mn²⁺ Nanoparticles for Near-infrared-induced Photodynamic Therapy and Fluorescence Imaging. *Chemistry letters*. 436 (8): 1076-1078
- Karalija A, Novikova LN, Kingham PJ, Wiberg M, Novikov LN. (2012). Neuroprotective effects of N-acetyl-cysteine and acetyl-L-carnitine after spinal cord injury in adult rats. *PLoS One*. 7(7):e41086.

- Kawaai K, Mizutani A, Shoji H, Ogawa N, Ebisui E, Kuroda Y, Wakana S, Miyakawa T, Hisatsune C, Mikoshiba K. (2015). IRBIT regulates CaMKII α activity and contributes to catecholamine homeostasis through tyrosine hydroxylase phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*.112(17):5515-20.
- Kawasaki T, Ohori G, Chiba T, Tsukiyama K, Nakamura K. (2016a). Picosecond pulsed infrared laser tuned to amide I band dissociates polyglutamine fibrils in cells. *Lasers Med Sci*. 31(7):1425-31. doi: 10.1007/s10103-016-2004-x.
- Kawasaki T, Yaji T, Ohta T, Tsukiyama K. (2016b). Application of mid-infrared free-electron laser tuned to amide bands for dissociation of aggregate structure of protein. *J Synchrotron Rad*. 23:152-157. doi: 10.1107/S1600577515020731
- Kestler LP, Walker E, and Vega EM. (2001). Dopamine receptors in the brains of schizophrenia patients: a meta-analysis of the findings. *Behav. Pharmacol*. 12 (5), 355-71.
- Khanal D, Kondyurin A, Hau H, Knowles JC, Levinson O, Ramzan I, et al. (2016). Biospectroscopy of Nanodiamond-Induced Alterations in Conformation of Intra- and Extracellular Proteins: A Nanoscale IR Study. *Anal Chem*. 88(15):7530-8. doi: 10.1021/acs.analchem.6b00665.
- Khanal et al., (2016). Biospectroscopy of nanodiamond-induced alterations in conformation of intra- and extracellular proteins: a nanoscale IR study. *Anal Chem.*, 88(15):7530-8.
- Khodosevich K, Zuccotti A, Kreuzberg MM, Le Magueresse C, Frank M, Willecke K, Monyer H. (2012). Connexin45 modulates the proliferation of transit-amplifying precursor cells in the mouse subventricular zone. *Proc Natl Acad Sci USA* 109(49): 20107-20112.
- Kida S, Steart PV, Zhang ET, Weller RO. (1993). Perivascular cells act as scavengers in the cerebral perivascular spaces and remain distinct from pericytes, microglia and macrophages. *Acta Neuropathol (Berl)* 85: 646–652.
- Kilkenny C, Browne W, Cuthill IC, Emerson M, Altman DG, National Centre for the Replacement, Refinement and Reduction of Animals in Research. (2011). Animal research: reporting in vivo experiments--the ARRIVE guidelines. *J Cereb Blood Flow Metab*. 31(4):991-3. doi: 10.1038/jcbfm.2010.220.
- Kim DW, Glendining KA, Grattan DR, Jasoni CL. (2016). Maternal obesity leads to increased proliferation and numbers of astrocytes in the developing fetal and neonatal mouse

- hypothalamus. *Int J Dev Neurosci.* 53: 18-25.
- Kim WK, Alvarez X, Fisher J, Bronfin B, Westmoreland S, McLaurin J, Williams K. (2006). CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood. *Am J Pathol.* 2:822–834.
- Kittelsohn BD. (1998). Engines and nanoparticles: a review. *Journal of Aerosol Science.* 29 (5):575-588
- Klatzo I (1976). Presidential address. Neuropathological aspects of brain edema. *J Neuropathol Exp Neurol* 1967. 26: 1–14.
- Knox JF, Holmes S, Doll R, Hill ID. (1968). Mortality from lung cancer and other causes among workers in an asbestos textile factory. *Br J Ind Med.* 25(4):293-303.
- Knuesel I, Chicha L, Britschgi M, Schobel SA, Bodmer M, Hellings JA, et al. (2014). Maternal immune activation and abnormal brain development across CNS disorders. *Nat Rev Neurol.* 10(11):643-60. doi: 10.1038/nrneurol.2014.187.
- Kohama SG, Goss JR, Finch CE, McNeill TH. (1995). Increases of glial fibrillary acidic protein in the aging female mouse brain. *Neurobiol Aging.* 16(1):59-67.
- Kolb B, Gibb R. (2011). Brain plasticity and behaviour in the developing brain. *J Can Acad Child Adolesc Psychiatry.* 20(4):265-76.
- Kovacic P, Somanathan R. (2013). Nanoparticles: toxicity, radicals, electron transfer, and antioxidants. *Methods Mol Biol.* 1028:15-35.
- Kress BT, Iliff JJ, Xia M, Wang M, Wei HS, Zeppenfeld D, et al. (2014). Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann Neurol.* 76(6):845-61. doi: 10.1002/ana.24271.
- Kreyling WG, Holzwarth U, Haberl N, Kozempel J, Wenk A, Hirn S, Schleh C, Schäffler M, Lipka J, Semmler-Behnke M, Gibson N. (2017). Quantitative biokinetics of titanium dioxide nanoparticles after intratracheal instillation in rats: Part 3. *Nanotoxicology.* 11(4):454-464.
- Kreyling WG, Semmler M, Erbe F, Mayer P, Takenaka S, et al. (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.
- Krum JM, Mani N, Rosenstein JM. (2008). Roles of the endogenous VEGF receptors flt-1 and flk-1 in astroglial and vascular remodeling after brain injury. *Exp Neurol.* 212(1):108-17.

- Kyjovska ZO, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Wallin H, Vogel U. (2015). DNA strand breaks, acute phase response and inflammation following pulmonary exposure by instillation to the diesel exhaust particle NIST1650b in mice. *Mutagenesis* 30(4): 499-507
- Lai AY, McLaurin J. (2012). Clearance of amyloid- β peptides by microglia and macrophages: the issue of what, when and where. *Future Neurol.* 7(2):165-176.
- Lassmann H, Schmied M, Vass K, Hickey WF. (1993). Bone marrow derived elements and resident microglia in brain inflammation. *Glia* 7: 19–24.
- Lassmann H, Zimprich F, Vass K, Hickey WF. (1991). Microglial cells are a component of the perivascular glia limitans. *J Neurosci Res* 28: 236–243.
- Lau SK, Chu PG, Weiss LM. (2004). CD163: a specific marker of macrophages in paraffin-embedded tissue samples. *Am J Clin Pathol.* 2:794–801.
- Laurence JA1, Fatemi SH. (2005). Glial fibrillary acidic protein is elevated in superior frontal, parietal and cerebellar cortices of autistic subjects. *Cerebellum.*;4(3):206-10.
- Lee, J.G., Noh, W.J., Kim, H., Lee, M.Y., (2011). Generation of reactive oxygen species contributes to the development of carbon black cytotoxicity to vascular cells. *Toxicol. Res.* 27, 161-166.
- Le-Niculescu H, Balaraman Y, Patel SD, Ayalew M, Gupta J, Kuczenski R, Shekhar A, Schork N, Geyer MA, and Niculescu AB. (2011). Convergent functional genomics of anxiety disorders: translational identification of genes, biomarkers, pathways and mechanisms. *Transl. Psychiatry.* 1, e9.
- Li J, Chen H, Chang Q, Liu X, Wu Y, Wei C, Li R, Kwan JK, Yeung KL, Xi Z, Lu Z, Yang X. (2014). Application of vitamin E to antagonize SWCNTs-induced exacerbation of allergic asthma. *Sci Rep.* 4;4:4275.
- Li J, Li L, Chen H, Chang Q, Liu X, Wu Y, Wei C, Li R, Kwan JK, Yeung KL, et al. (2014). Application of vitamin E to antagonize SWCNTs-induced exacerbation of allergic asthma. *Sci Rep.* 4: 4275.
- Lin, Z., Ma, L., X, Z.G., Zhang, H., Lin, B., (2013). A comparative study of lung toxicity in rats induced by three types of nanomaterials. *Nanoscale Res. Lett.* 8, 521.
- Liu L, Lu Y, Kong H, Li L, Marshall C, et al. (2012). Aquaporin-4 deficiency exacerbates brain oxidative damage and memory deficits induced by long-term ovarian hormone deprivation and D-galactose injection. *Int J Neuropsychopharmacol.* 15(1):55-68. doi:

- 10.1017/S1461145711000022.
- Liu, X., Zhang, Y., Li, J., Wang, D., Wu, Y., Li, Y., Lu, Z., Yu, S.C., Li, R., Yang, X., (2014). Cognitive deficits and decreased locomotor activity induced by single-walled carbon nanotubes and neuroprotective effects of ascorbic acid. *Int. J. Nanomedicine* 9, 823-839.
- Mack AF, Wolburg H. (2013). A novel look at astrocytes: aquaporins, ionic homeostasis, and the role of the microenvironment for regeneration in the CNS. *Neuroscientist*. 19(2):195-207. doi: 10.1177/1073858412447981.
- Mahuran DJ. (1991). The biochemistry of HEXA and HEXB gene mutations causing GM2 gangliosidosis. *Biochim Biophys Acta*. 22;1096(2):87-94.
- Manke A, Wang L, Rojanasakul Y. (2013). Mechanisms of nanoparticle-induced oxidative stress and toxicity. *Biomed Res Int*. 2013:942916.
- Mao J, Zhang X, Sieli PT, Falduto MT, Torres KE, Rosenfeld CS. (2010). Contrasting effects of different maternal diets on sexually dimorphic gene expression in the murine placenta. *Proc Natl Acad Sci U S A*.107(12):5557-62.
- Maragakis NJ, Rothstein JD. (2006). Mechanisms of Disease: astrocytes in neurodegenerative disease. *Nat Clin Pract Neurol*. 2(12):679-89.
- Marcho C, Cui W, Mager J. (2015). Epigenetic dynamics during preimplantation development. *Reproduction* 150(3): R109-20.
- Markram H, Toledo-Rodriguez M, Wang Y, Gupta A, Silberberg G, Wu C (2014). Interneurons of the neocortical inhibitory system. *Nat Rev Neurosci* 5(10): 793-807
- Mato M, Ookawara S, Sakamoto A, Aikawa E, Ogawa T, et al. (1996). Involvement of specific macrophage-lineage cells surrounding arterioles in barrier and scavenger function in brain cortex. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 3269–3274.
- Mato M, Ookawara S, Sano M, Fukuda S, Sokabe H. (1983). Behavior of fluorescent granular perithelium (FGP) in cerebral cortex of SHR-SP rats under some conditions. *Exp Mol Pathol*. 39(1):100-9.
- Mato M, Ookawara S. (1979). A simple method for observation of capillary nets in rat brain cortex. *Experientia* 15;35(4): 501–3.
- Mato M, Ookawara S. (1981). The effect of vitamin E on aging of granular perithelial cell in cerebral fine vessels of rat (author's transl). *Nihon Ronen Igakkai Zasshi*. 18(3):169-78.

- Mato M, Takeuchi K, Ookawara S, Yamanaka S, Mashiko T, et al. (2002). Inclusions in novel perivascular macrophages (Mato's fluorescent granular perithelial cells) and neurons in the cerebral cortex of Hex A- and Hex B-deficient mice. *Acta Neuropathol* 103: 119–130.
- Mato M., Mato T., Kouki T., Tsutsumi H. (2007). Study on the Distribution of Collagen Fibers in the Bifurcating Area of Cerebral Arterioles of Wistar Rats. *Brain and Nerve*. 59(2):158–164.
- Mato T, Kamei M, Ito R, Sawano M, Inokuchi K, et al. (2009). Beneficial Effects of Cocoa in Perivascular Mato Cells of Cerebral Arterioles in SHR-SP (Izm) Rats. *J Clin Biochem Nutr* 44(2): 142–150. doi: 10.3164/jcbrn.08-209.
- Mauney SA, Athanas KM, Pantazopoulos H, Shaskan N, Passeri E, Berretta S, Woo TU. (2013). Developmental pattern of perineuronal nets in the human prefrontal cortex and their deficit in schizophrenia. *Biol Psychiatry* 74(6): 427-435.
- McClellan RO. (1987). Health effects of exposure to diesel exhaust particles. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*. 27:279-300.
- Mclaughlin AI. (1952). The diagnosis of the occupational dust diseases of the lungs. *Proc R Soc Med*.45(9):603-9.
- McQuillen PS, Ferriero DM. (2004). Selective vulnerability in the developing CNS. *Pediatr Neurol*. 30(4):227-35.
- McWilliams A, *Nanotechnology: A Realistic Market Assessment*, Published: November (2014). Report Code: NAN031F
- Mendes-da-Silva RF, Lopes-de-Morais AA, Bandim-da-Silva ME, Cavalcanti Gde A, Rodrigues AR, Andrade-da-Costa BL, Guedes RC. (2014). Prooxidant versus antioxidant brain action of ascorbic acid in well-nourished and malnourished rats as a function of dose: a cortical spreading depression and malondialdehyde analysis. *Neuropharmacology*. 86:155-60.
- Meredith SC. (2005). Protein denaturation and aggregation: Cellular responses to denatured and aggregated proteins. *Ann N Y Acad Sci*. 1066:181-221.
- Meyer U, Feldon J, Schedlowski M, Yee BK. (2005). Towards an immuno-precipitated neurodevelopmental animal model of schizophrenia. *Neurosci Biobehav Rev* 29(6): 913-947.
- Meyer U, Nyffeler M, Engler A, Urwyler A, Schedlowski M, Knuesel I, Yee BK, Feldon J. (2006). The time of prenatal immune challenge determines the specificity of inflammation-mediated

- brain and behavioral pathology. *J Neurosci* 26: 4752-4762.
- Meyer U, Nyffeler M, Yee BK, Knuesel I, Feldon J. (2008). Adult brain and behavioral pathological markers of prenatal immune challenge during early/middle and late fetal development in mice. *Brain Behav Immun* 22(4): 469-486.
- Meyer U. (2013). Developmental neuroinflammation and schizophrenia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry* 42: 20-34.
- Meyer U. (2014). Prenatal poly(i:C) exposure and other developmental immune activation models in rodent systems. *Biol Psychiatry* 75(4): 307-315.
- Millan MJ, Andrieux A, Bartzokis G, Cadenhead K, Dazzan P, Fusar-Poli P, Gallinat J, Giedd J, Grayson DR, Heinrichs M, Kahn R, Krebs MO, Leboyer M, Lewis D, Marin O, Marin P, Meyer-Lindenberg A, McGorry P, McGuire P, Owen MJ, Patterson P, Sawa A, Spedding M, Uhlhaas P, Vaccarino F, Wahlestedt C, Weinberger D. (2016). Altering the course of schizophrenia: progress and perspectives. *Nat Rev Drug Discov* 15: 485-515.
- Miller LM, Gragg M, Kim TG, Park PS. (2015). Misfolded opsin mutants display elevated β -sheet structure. *FEBS Lett.* 2015 589(20 Pt B):3119-25.
- Ministry of Health, Labour and Welfare. (2009). Committee on Safety Measures for Nanomaterials Report. March.
- Møller P, Jacobsen NR, Folkmann JK, Danielsen PH, Mikkelsen L, Hemmingsen JG, Vesterdal LK, Forchhammer L, Wallin H, Loft S. (2010). Role of oxidative damage in toxicity of particulates. *Free Radic*: 44(1):1-46.
- Molofsky AV, Krencik R, Ullian EM, Tsai HH, Deneen B, et al. (2012). Astrocytes and disease: a neurodevelopmental perspective. *Genes Dev* 26: 891–907.
- Moon C, Ahn M, Kim S, Jin JK, Sim KB, Kim HM, Lee MY, Shin T. (2004). Temporal patterns of the embryonic intermediate filaments nestin and vimentin expression in the cerebral cortex of adult rats after cryoinjury. *Brain Res.* 1028(2):238-42.
- Morishima T, Aoyama M, Iida Y, Yamamoto N, Hirate H, Arima H, et al. (2008). Lactic acid increases aquaporin 4 expression on the cell membrane of cultured rat astrocytes. *Neurosci Res.* 61(1):18-26.
- Müller, L., Riediker, M., Wick, P., Mohr, M., Gehr, P., Rothen-Rutishauser, B., (2010). Oxidative stress and inflammation response after nanoparticle exposure: differences between human

- lung cell monocultures and an advanced three-dimensional model of the human epithelial airways. *J. R. Soc. Interface.* 7 (Suppl 1), S27-S40.
- Nabeshi, H., Yoshikawa, T., Matsuyama, K., Nakazato, Y., Matsuo, K., Arimori, A., Isobe, M., Tochigi, S., Kondoh, S., Hirai, T., Akase, T., Yamashita, T., Yamashita, K., Yoshida, T., Nagano, K., Abe, Y., Yoshioka, Y., Kamada, H., Imazawa, T., Itoh, N., Nakagawa, S., Mayumi, T., Tsunoda, S., Tsutsumi, Y. (2011). Systemic distribution, nuclear entry and cytotoxicity of amorphous nanosilica following topical application. *Biomaterials.* 32(11):2713-24.
- Nakazawa T, Nishikawa M, Aikawa E, Mato M. (2002). In vitro characterization of Mato's FGP cells isolated from rat cerebrum. *Neurosci Lett.* 14;317(3):127-30.
- Nakazawa T, Yamamura H, Shimizu S, Nishikawa M, Ezaki T, et al. (2006). Acceleration of Age-related Changes in the Granules of Perivascular Macrophages from the Brain of Senescence Accelerated Mice (SAM). *J Tokyo Wom Med Univ* 76: 82–91.
- Narendran R, Frankle WG, Keefe R, Gil R, Martinez D, Slifstein M, Kegeles LS, Talbot PS, Huang Y, Hwang DR, Khenissi L, Cooper TB, Laruelle M, and Abi-Dargham A. (2005). Altered prefrontal dopaminergic function in chronic recreational ketamine users. *Am. J Psychiatry.* 162 (12), 2352-9.
- Nel A, Xia T, Mädler L, Li N (2006). Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 311(5761): 622–7.
- Nemmar, A., Al-Salam, S., Zia, S., Dhanasekaran, S., Shudadevi, M., Ali, B.H., (2010). Time-course effects of systemically administered diesel exhaust particles in rats. *Toxicol. Lett.* 194, 58-65.
- Neri M, Bello S, Turillazzi E, and Riezzo I. (2015). Drugs of abuse in pregnancy, poor neonatal development, and future neurodegeneration. Is oxidative stress the culprit? *Curr. Pharm. Des.* 21 (11), 1358-68.
- Nichols NR, Day JR, Laping NJ, Johnson SA, Finch CE. (1993). GFAP mRNA increases with age in rat and human brain. *Neurobiol Aging* 14(5): 421–429.
- NIOSH. (2015). Approaches to Safe Nanotechnology: Managing the Health and Safety Concerns Associated with Engineered Nanomaterials. Accessed January 15, from the website: <http://www.cdc.gov/niosh/docs/2009-125/>

- Noël G, Stevenson S, Moukhles H. (2011). A high throughput screen identifies chemical modulators of the laminin-induced clustering of dystroglycan and aquaporin-4 in primary astrocytes. *PLoS One*.6(3):e17559.
- NSET, (2010): The National Nanotechnology Initiative. Research and Development Leading to a Revolution in Technology and Industry Supplement to the President's FY 2011 Budget. Washington, DC: Subcommittee on Nanoscale Science, Engineering and Technology, Committee on Technology, National Science and Technology Council.
- Oberdörster et al., (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A.*, 65: 1531–43
- Oberdörster et al., (2005). Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect.*, 113(7): 823–39.
- Oberdörster G, Maynard A, Donaldson K, Castranova V, Fitzpatrick J, Ausman K, Carter J, Karn B, Kreyling W, Lai D, et al. (2005). Principles for characterizing the potential human health effects from exposure to nanomaterials: elements of a screening strategy. *Part Fibre Toxicol.* 6;2:8.
- Oberdörster G, Oberdörster E, Oberdörster J (2005) Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environ Health Perspect* 113(7): 823–39.
- Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, Elder A, Gelein R, et al. (2002). Extrapulmonary translocation of ultrafine carbon particles following whole-body inhalation exposure of rats. *J Toxicol Environ Health A* 65: 1531–1543.
- O'Connell BA, Moritz KM, Roberts CT, Walker DW, Dickinson H. (2011). The placental response to excess maternal glucocorticoid exposure differs between the male and female conceptus in spiny mice. *Biol Reprod.*85(5):1040-7.
- Okada Y, Tachibana K, Yanagita S, and Takeda K. (2013). Prenatal exposure to zinc oxide particles alters monoaminergic neurotransmitter levels in the brain of mouse offspring. *J Toxicol. Sci.* 38 (3), 363-70.
- Oku H, Morishita S, Horie T, Kida T, Mimura M, et al. (2015). Nitric Oxide Increases the Expression of Aquaporin-4 Protein in Rat Optic Nerve Astrocytes through the Cyclic Guanosine Monophosphate/Protein Kinase G Pathway. *Ophthalmic Res.* 54(4):212-21. doi: 10.1159/000440846.

- Onoda A, Takeda K, and Umezawa M. (2017a). Dose-dependent induction of astrocyte activation and reactive astrogliosis in mouse brain following maternal exposure to carbon black nanoparticle. *Part. Fibre Toxicol.* 14(1), 4
- Onoda A, Kawasaki T, Tsukiyama K, Takeda K, and Umezawa M. (2017b). Perivascular Accumulation of β -Sheet-Rich Proteins in Offspring Brain following Maternal Exposure to Carbon Black Nanoparticles. *Front. Cell. Neurosci.* 11:92.
- Onoda et al., (2017c). Pretreatment with N-acetyl cysteine suppresses chronic reactive astrogliosis following maternal nanoparticle exposure during gestational period. *Nanotox.*, 11(8): 1012-25
- Onoda A, Takeda K, Umezawa M (2015). The potential protective effect of antioxidants on nanoparticle toxicity. Chapter 15, *PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects & Prevention Strategy*, Nova Science Publishers (NY, USA), in press
- Onoda A, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. (2014). Effects of maternal exposure to ultrafine carbon black on brain perivascular macrophages and surrounding astrocytes in offspring mice. *PLoS One.* 9(4):e94336.
- Onoda et al., (2015). The potential protective effect of antioxidants on nanoparticle toxicity. Li YJ, Umezawa M, Takizawa H, Takeda K, Kawada T (Eds.), *PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy*, Nova Science Publishers Inc., (NY, USA), pp197-210
- Oskvig DB, Elkahloun AG, Johnson KR, Phillips TM, and Herkenham M. (2012): Maternal immune activation by LPS selectively alters specific gene expression profiles of interneuron migration and oxidative stress in the fetus without triggering a fetal immune response. *Brain Behav. Immun.* 26 (4), 623-34.
- Owen MJ, Sawa A, Mortensen PB. (2016). Schizophrenia. *Lancet* 388: 86-97.
- Packer L, Weber SU, Rimbach G. (2001). Molecular aspects of alpha-tocotrienol antioxidant action and cell signalling. *J Nutr.* 131(2):369S-73S.
- Papadopoulos MC, Verkman AS. (2007). Aquaporin-4 and brain edema. *Pediatr Nephrol.* 2007; 2(6):778-84.
- Park, E.J., Yi, J., Chung, K.H., Ryu, D.Y., Choi, J., Park, K., (2008). Oxidative stress and apoptosis induced by titanium dioxide nanoparticles in cultured BEAS-2B cells. *Toxicol. Lett.* 180:

222-229.

- Patterson MC. (2013). Gangliosidoses. *Handb Clin Neurol*.113:1707-8.
- Pekny M, Nilsson M. (2005). Astrocyte activation and reactive gliosis. *Glia*. 50(4):427-34.
- Pekny M, Pekna M. (2014). Astrocyte reactivity and reactive astrogliosis: costs and benefits. *Physiol Rev*. 94(4):1077-98.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Bogestål YR, Pekna M. (2007). The role of astrocytes and complement system in neural plasticity. *Int Rev Neurobiol*. 82:95–111.
- Pekny M, Wilhelmsson U, Pekna M. (2014). The dual role of astrocyte activation and reactive gliosis. *Neurosci Lett*. 565:30–8.
- Pelton JT, McLean LR. (2000). Spectroscopic methods for analysis of protein secondary structure. *Anal Biochem*. 277(2):167-76.
- PEN (2014). Woodrow Wilson International Centre for Scholars. Project on Emerging Nanotechnologies. Consumer Products Inventory of Nanotechnology Products. Accessed December 2014 from the website: <http://www.nanotechproject.org/cpi/>
- Perera et al., (2006). Effect of Prenatal Exposure to Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbons on Neurodevelopment in the First 3 Years of Life among Inner-City Children. *Environ Health Perspect.*, 114(8): 1287-92
- Perera et al., (2009). Prenatal Airborne Polycyclic Aromatic Hydrocarbon Exposure and Child IQ at Age 5 Years. *Pediatrics*. 124(2): e195-202
- Perera et al., (2014). Early-Life Exposure to Polycyclic Aromatic Hydrocarbons and ADHD Behavior Problems. *PLoS One.*, 9(11): e111670
- Perry VH, Newman TA, Cunningham C. (2003). The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease. *Nat Rev Neurosci*. 4(2):103-12.
- Peters A, Palay SL, Webster HD (1976). The fine structure of the nervous system: the neurons and supporting cells. Philadelphia: WB Saunders.
- Petters C, Thiel K, Dringen R. (2016). Lysosomal iron liberation is responsible for the vulnerability of brain microglial cells to iron oxide nanoparticles: comparison with neurons and astrocytes. *Nanotoxicology*. 10(3):332-42.
- Pey P, Pearce RK, Kalaitzakis ME, Griffin WS, Gentleman SM. (2014). Phenotypic profile of alternative activation marker CD163 is different in Alzheimer's and Parkinson's disease.

- Acta Neuropathol Commun. 14;2:21.
- Pietroiusti A, Campagnolo L, Fadeel B. (2013). Interactions of engineered nanoparticles with organs protected by internal biological barriers. *Small* 9: 1557-1572
- Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, et al. (2011). Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS Nano*. 28;5(6): 4624–33.
- Posgai R, Cipolla-McCulloch CB, Murphy KR, Hussain SM, Rowe JJ, Nielsen MG. (2011).. Differential toxicity of silver and titanium dioxide nanoparticles on *Drosophila melanogaster* development, reproductive effort, and viability: size, coatings and antioxidants matter. *Chemosphere* 85(1): 34-42.
- Powers CM, Bale AS, Kraft AD, Makris SL, Trecki J, Cowden J, et al. (2013). Developmental neurotoxicity of engineered nanomaterials: identifying research needs to support human health risk assessment. *Toxicol Sci*. 134(2):225-42.
- Préau L, Fini JB, Morvan-Dubois G, Demeneix B. (2015). Thyroid hormone signaling during early neurogenesis and its significance as a vulnerable window for endocrine disruption. *Biochim Biophys Acta*. 1849(2):112-21.
- Prinz M, Erny D, Hagemeyer N. (2017). Ontogeny and homeostasis of CNS myeloid cells. *Nat Immunol* 18(4): 385-392.
- Pujalté, I., Passagne, I., Brouillaud, B., Tréguer, M., Durand, E., Ohayon-Courtès, C., L'Azou, B., (2011). Cytotoxicity and oxidative stress induced by different metallic nanoparticles on human kidney cells. *Part. Fibre Toxicol.* 8, 10.
- Ray PC, Yu H, Fu PP. (2009). Toxicity and environmental risks of nanomaterials: challenges and future needs. *J Environ Sci Health C Environ Carcinog Ecotoxicol Rev.* 27(1):1-35.
- Raz R, Roberts AL, Lyall K, Hart JE, Just AC, Laden F, and Weisskopf MG. (2015). Autism spectrum disorder and particulate matter air pollution before, during, and after pregnancy: a nested case-control analysis within the Nurses' Health Study II Cohort. *Environ. Health Perspect.* 123(3), 264–70.
- REACH. (2011). Specific Advice on Exposure Assessment and Hazard/Risk Characterisation for Nanomaterials under REACH. Final Project Report July
- Reddy, A.R., Reddy, Y.N., Krishna, D.R., Himabindu, V., (2010). Multi wall carbon nanotubes

- induce oxidative stress and cytotoxicity in human embryonic kidney (HEK293) cells. *Toxicology* 272, 11-16.
- Reisinger S, Khan D, Kong E, Berger A, Pollak A, Pollak DD. (2015). The poly(I:C)-induced maternal immune activation model in preclinical neuropsychiatric drug discovery. *Pharmacol Ther* 149: 213-226
- Rice D, Barone S Jr. (2000). Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. *Environ Health Perspect.* 108 Suppl 3:511-33.
- Rico, C.M., Hong, J., Morales, M.I., Zhao, L., Barrios, A.C., Zhang, J.Y., Peralta-Videa, J.R., Gardea-Torresdey, J.L., (2013). Effect of cerium oxide nanoparticles on rice: a study involving the antioxidant defense system and in vivo fluorescence imaging. *Environ. Sci. Technol.* 47, 5635-5642.
- Roberts ES, Masliah E, Fox HS. (2004). CD163 identifies a unique population of ramified microglia in HIV encephalitis (HIVE). *J Neuropathol Exp Neurol.* 2:1255–1264.
- Rock RB, Gekker G, Hu S, Sheng WS, Cheeran M, et al. (2004). Role of microglia in central nervous system infections. *Clin Microbiol Rev.* 17(4):942-64.
- Rodríguez JJ, Olabarria M, Chvatal A, Verkhatsky A. (2009). Astroglia in dementia and alzheimer's disease. *Cell Death Differ.* 16(3):378–85.
- Ronga L, Palladino P, Costantini S, Facchiano A, Ruvo M, et al. (2007). Conformational diseases and structure-toxicity relationships: lessons from prion-derived peptides. *Curr Protein Pept Sci.* 8(1):83-90.
- Rousset CI, Chalon S, Cantagrel S, Bodard S, Andres C, Gressens P, Saliba E. (2006). Maternal exposure to LPS induces hypomyelination in the internal capsule and programmed cell death in the deep gray matter in newborn rats. *Pediatr Res.* 59(3):428-33.
- Rubenstein JL, Merzenich MM. (2003). Model of autism: increased ratio of excitation/inhibition in key neural systems. *Genes Brain Behav* 2(5): 255-267.
- Rui, Q., Zhao, Y., Wu, Q., Tang, M., Wang, D. (2013). Biosafety assessment of titanium dioxide nanoparticles in acutely exposed nematode *Caenorhabditis elegans* with mutations of genes required for oxidative stress or stress response. *Chemosphere* 93, 2289-2296.
- Saber AT, Bornholdt J, Dybdahl M, Sharma AK, Loft S, Vogel U, Wallin H. (2005). Tumor necrosis factor is not required for particle-induced genotoxicity and pulmonary inflammation. *Arch*

- Toxicol 79(3): 177-182.
- Santhanasabapathy R, Vasudevan S, Anupriya K, Pabitha R, Sudhandiran G. (2015). Farnesol quells oxidative stress, reactive gliosis and inflammation during acrylamide-induced neurotoxicity: Behavioral and biochemical evidence. *Neuroscience*;308:212-27.
- Saptarshi SR, Duschl A, Lopata AL. (2013). Interaction of nanoparticles with proteins: relation to bio-reactivity of the nanoparticle. *J Nanobiotechnology*. 11:26.
- Sarver RW Jr, Krueger WC. (1991). Protein secondary structure from Fourier transform infrared spectroscopy: a data base analysis. *Anal Biochem*. 194(1):89-100.
- Sekar G, Mukherjee A, Chandrasekaran N. (2015). Comprehensive spectroscopic studies on the interaction of biomolecules with surfactant detached multi-walled carbon nanotubes. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 128:315-21. doi: 10.1016/j.colsurfb.2015.02.006.
- SCAW, (1987). Consensus Recommendations on Effective Institutional Animal Care and Use Committees. *Laboratory Animal Science*, Special Issue; p.11-13.
- Schacht JP. (2016). COMT val158met moderation of dopaminergic drug effects on cognitive function: a critical review. *Pharmacogenomics J*. 16 (5), 430-8.
- Schain M, Kreisl WC. (2017). Neuroinflammation in Neurodegenerative Disorders-a Review. *Curr Neurol Neurosci Rep*. 17(3):25. doi: 10.1007/s11910-017-0733-2.
- Schliebs R, Arendt T. (2011). The cholinergic system in aging and neuronal degeneration. *Behav Brain Res*. 221(2):555-63. doi: 10.1016/j.bbr.2010.11.058.
- Schwarz DA, Barry G, Mackay KB, Manu F, Naevé GS, Vana AM, et al. (2002). Identification of differentially expressed genes induced by transient ischemic stroke. *Brain Res Mol Brain Res*. 101(1-2):12-22.
- Semmler-Behnke M, Lipka J, Wenk A, Hirn S, Schäffler M, Tian F, Schmid G, Oberdörster G, Kreyling WG. (2014). Size dependent translocation and fetal accumulation of gold nanoparticles from maternal blood in the rat. *Part Fibre Toxicol*: 11:33.
- Serrats J, Schiltz JC, García-Bueno B, van Rooijen N, Reyes TM, and Sawchenko PE. (2010). Dual roles for perivascular macrophages in immune-to-brain signaling. *Neuron*. 65 (1), 94-106.
- Seshadri S, Khurana R, Fink AL. (1999). Fourier transform infrared spectroscopy in analysis of protein deposits. *Methods Enzymol*. 309:559-76.
- Shen B, Scaiano JC, and English AM. (2006). Zeolite encapsulation decreases

- TiO₂-photosensitized ROS generation in cultured human skin fibroblasts. *Photochem. Photobiol.* 82 (1), 5-12
- Sheng, L., Wang, X., Sang, X., Ze, Y., Zhao, X., Liu, D., Gui, S., Sun, Q., Cheng, J., Cheng, Z., Hu, R., Wang, L., Hong, F., (2013). Cardiac oxidative damage in mice following exposure to nanoparticulate titanium dioxide. *J. Biomed. Mater. Res. A.* 101, 3238-3246.
- Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, 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.
- Shimizu R, Umezawa M, Okamoto S, Onoda A, Uchiyama M, Tachibana K, Watanabe S, Ogawa S, Abe R, Takeda K. (2014). Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle during early gestation on the splenic phenotype of neonatal mouse. *J Toxicol Sci.* 39(4):571-8.
- Shrivastava, R., Raza, S., Yadav, A., Kushwaha, P., Flora, S.J., (2014). Effects of sub-acute exposure to TiO₂, ZnO and Al₂O₃ nanoparticles on oxidative stress and histological changes in mouse liver and brain. *Drug Chem. Toxicol.* 37, 336-347.
- Shvedova AA, Castranova V, Kisin ER, Schwegler-Berry D, Murray AR, Gandelsman VZ, Maynard A, and Baron P. (2003). Exposure to carbon nanotube material: assessment of nanotube cytotoxicity using human keratinocyte cells. *J Toxicol. Environ. Health. A.* 66 (20), 1909-26
- Shvedova AA, Kisin ER, Murray AR, Gorelik O, Arepalli S, Castranova V, Young SH, Gao F, Tyurina YY, Oury TD, et al. (2007). Vitamin E deficiency enhances pulmonary inflammatory response and oxidative stress induced by single-walled carbon nanotubes in C57BL/6 mice. *Toxicol Appl Pharmacol.* 221(3):339-48.
- Sly et al., (2012). *Environmental Pollutants and Postnatal Growth, Handbook of Growth and Growth Monitoring in Health and Disease.* Springer, 757-68
- Smaoui MR, Mazza-Anthony C, Waldispühl J. (2016). Investigating Mutations to Reduce Huntingtin Aggregation by Increasing Htt-N-Terminal Stability and Weakening Interactions with PolyQ Domain. *Comput Math Methods Med.* 2016:6247867. doi: 10.1155/2016/6247867.
- Sofroniew MV, Vinters HV. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol* 119: 7–35.

- Solano RM, Casarejos MJ, Menéndez-Cuervo J, Rodriguez-Navarro JA, García de Yébenes J, Mena MA. (2008). Glial dysfunction in parkin null mice: effects of aging. *J Neurosci.* 28(3):598-611.
- Pan XQ, Malykhina AP. (2014). Estrous cycle dependent fluctuations of regulatory neuropeptides in the lower urinary tract of female rats upon colon-bladder cross-sensitization. *PLoS One.* 9(5):e94872.
- Song Y, Li X, Du X. (2009). Exposure to nanoparticles is related to pleural effusion, pulmonary fibrosis and granuloma. *Eur Respir J.* Sep;34(3):559-67.
- Soto C, Estrada LD. (2008). Protein misfolding and neurodegeneration. *Arch Neurol.* 65(2):184-9. doi: 10.1001/archneurol.2007.56.
- Soto C. (2003). Unfolding the role of protein misfolding in neurodegenerative diseases. *Nat Rev Neurosci.* 4(1):49-60.
- Srinivas, A., Rao, P.J., Selvam, G., Goparaju, A., Murthy, P.B., Reddy, P.N., (2012). Oxidative stress and inflammatory responses of rat following acute inhalation exposure to iron oxide nanoparticles. *Hum. Exp. Toxicol.* 31:1113-1131.
- Stapleton PA, Minarchick VC, Yi J, Engels K, McBride CR, Nurkiewicz TR. (2013). Maternal engineered nanomaterial exposure and fetal microvascular function: does the Barker hypothesis apply? *Am J Obstet Gynecol.* 209(3):227.e1-11. 49.
- Kong H, Fan Y, Xie J, Ding J, Sha L, Shi X, et al. (2008). AQP4 knockout impairs proliferation, migration and neuronal differentiation of adult neural stem cells. *J Cell Sci.* 121(Pt 24):4029-36.
- Stapleton PA, Nichols CE, Yi J, McBride CR, Minarchick VC, Shepherd DL, Hollander JM, Nurkiewicz TR. (2015). Microvascular and mitochondrial dysfunction in the female F1 generation after gestational TiO₂ nanoparticle exposure. *Nanotoxicology.* 9(8):941-51.
- Stefani M. (2004). Protein misfolding and aggregation: new examples in medicine and biology of the dark side of the protein world. *Biochim Biophys Acta.* 1739(1):5-25.
- Steullet P, Cabungcal JH, Coyle J, Didriksen M, Gill K, Grace AA, Hensch TK, LaMantia AS, Lindemann L, Maynard TM, Meyer U, Morishita H, O'Donnell P, Puhl M, Cuenod M, Do KQ. (2017). Oxidative stress-driven parvalbumin interneuron impairment as a common mechanism in models of schizophrenia. *Mol Psychiatry* 22(7): 936-943.

- Stone V, Johnston H, Clift MJ (2007). Air pollution, ultrafine and nanoparticle toxicology: cellular and molecular interactions. *IEEE Trans Nanobiosci* 6: ; 331–340.
- Streit WJ, Graeber MB (1993). Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7: 68–74.
- Stuart BO. (1976). Deposition and clearance of inhaled particles. *Environ Health Perspect.* 16:41-53
- Suglia et al., (2008). Association of Black Carbon with Cognition among Children in a Prospective Birth Cohort Study. *Am J Epidemiol.*, 167(3): 280-6
- Sun Y, Vestergaard M, Christensen J, Olsen J. (2011). Prenatal exposure to elevated maternal body temperature and risk of epilepsy in childhood: a population-based pregnancy cohort study. *Paediatr Perinat Epidemiol.* 25(1):53-9. doi: 10.1111/j.1365-3016.2010.01143.x.
- Sunyer et al., (2015). Association between Traffic-Related Air Pollution in Schools and Cognitive Development in Primary School Children: A Prospective Cohort Study. *PLoS Med.*, 12(3): e1001792.
- Susan L, Makris. (2016). Maternal Exposure to Nanoparticles – How Does It Affect the Fetus? Status, Mechanism, and Future Directions.
- 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.
- Tahajjodi SS, Amerion M, Mahdavi Shahri N, Jalali M, Nikraves MR. (2014). The effect of maternal nicotine on basement membrane collagen IV of brain microvessels changes in neonatal Balb/C mice. *Iran J Reprod Med.* 12(4):275-80.
- 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 (5), 749-56.
- Takeda K, Shinkai Y, Suzuki K, Yanagita S, Umezawa M, Yokota S, Tainaka H, Oshio S, Ihara T, Sugamata M. (2011). Health effects of nanomaterials on next generation. *Yakugaku Zasshi* 131(2): 229-236.
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Masako T, Oshio S, Nihei Y, Ihara T,

- Sugamata M. (2009). Nanoparticles transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *J Health Sci.* 55(1):95–102.
- Takemoto T, Ishihara Y, Ishida A, Yamazaki T. (2015). Neuroprotection elicited by nerve growth factor and brain-derived neurotrophic factor released from astrocytes in response to methylmercury. *Environ Toxicol Pharmacol.*40(1):199-205.
- Tamminga CA. (2006). The neurobiology of cognition in schizophrenia. *J Clin. Psychiatry.* 67 (9), e11.
- Taniguchi, N., (1974). On the basic concept of "Nano-Technology." 1974 Proceedings of International Conference in Production Engineering, Japan Society of Precision Engineering, Tokyo, Japan, Part II, vol. 18.
- Tepe N, Bau M. (2014). Importance of nanoparticles and colloids from volcanic ash for riverine transport of trace elements to the ocean: evidence from glacial-fed rivers after the 2010 eruption of Eyjafjallajökull Volcano, Iceland. *Sci Total Environ.* 1;488-489:243-51.
- Treuel L, Docter D, Maskos M, Stauber RH. (2015). Protein corona - from molecular adsorption to physiological complexity. *Beilstein J Nanotechnol.* 6:857-73. doi: 10.3762/bjnano.6.88. eCollection 2015.
- Tsai HH, Li H, Fuentealba LC, Molofsky AV, Taveira-Marques R, et al. (2012). Regional astrocyte allocation regulates CNS synaptogenesis and repair. *Science* 337(6092): 358–62.
- Umezawa and Onoda et al., (2015). Findings Regarding the Hazard Assessment of Nanoparticles and their Effects on the Next Generation. Li YJ, Umezawa M, Takizawa H, Takeda K, Kawada T (Eds.), *PM2.5: Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy*, Nova Science Publishers Inc., (NY, USA), pp159-175
- Umezawa and Onoda et al., (2017). Developmental Toxicity of Nanoparticles on the Brain. *Yakugaku Zasshi*, 137(1): 73-8
- Umezawa M, Kudo S, Yanagita S, Shinkai Y, Niki R, Oyabu T, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. (2011). Maternal exposure to carbon black nanoparticle increases collagen type VIII expression in the kidney of offspring. *J Toxicol Sci.* 36(4):461-8.
- Umezawa M, Onoda A, Takeda K. (2017). Developmental toxicity of nanoparticles on the brain. *Yakugaku Zasshi* 137(1):73-78.
- Umezawa M, Tainaka H, Kawashima N, Shimizu M, Takeda K. (2012). Effect of fetal exposure to

- titanium dioxide nanoparticle on brain development - brain region information. *J Toxicol Sci.* 37(6):1247-52.
- UNICEF, (2017). *Danger in the Air: How air pollution can affect brain development in young children.* Div of Data, Res and Policy.
- Uniprot, P55088- Aqp4, <http://www.uniprot.org/uniprot/P55088>
- Uspenskaia O, Liebetrau M, Herms J, Danek A, Hamann GF. (2004). Aging is associated with increased collagen type IV accumulation in the basal lamina of human cerebral microvessels. *BMC Neurosci.* 24;5:37.
- Vajda Z, Promeneur D, Dóczy T, Sulyok E, Frøkiaer J, Ottersen OP, et al. (2000). Increased aquaporin-4 immunoreactivity in rat brain in response to systemic hyponatremia. *Biochem Biophys Res Commun.* 270(2):495-503.
- Valentino SA, Tarrade A, Aioun J, Mourier E, Richard C, Dahirel M, et al. Maternal exposure to diluted diesel engine exhaust alters placental function and induces intergenerational effects in rabbits. *Part Fibre Toxicol.* 2016; 13(1):39.
- Van Raamsdonk JM, Vega IE, Brundin P. (2017). Oxidative stress in neurodegenerative disease: causation or association? *Oncotarget.* doi: 10.18632/oncotarget.14650.
- Vance ME, Kuiken T, Vejerano EP, McGinnis SP, Hochella MF Jr, Rejeski D, Hull MS. (2015). Nanotechnology in the real world: Redeveloping the nanomaterial consumer products inventory. *Beilstein J Nanotechnol.* 6:1769-80.
- Venero JL, Vizuete ML, Machado A, Cano J. (2001). Aquaporins in the central nervous system. *Prog Neurobiol.*;63(3):321-36.
- Wadhwa et al., (2009). Developmental origins of health and disease: brief history of the approach and current focus on epigenetic mechanisms. *Semin Reprod Med.*, 27(5):358-68
- Wallin H, Kyjovska ZO, Poulsen SS, Jacobsen NR, Saber AT, Bengtson S, Jackson P, Vogel U. (2017). Surface modification does not influence the genotoxic and inflammatory effects of TiO₂ nanoparticles after pulmonary exposure by instillation in mice. *Mutagenesis* 32(1): 47-57
- Wang HD, Niu CH, Yang Q, Badea I. (2011). Study on protein conformation and adsorption behaviors in nanodiamond particle-protein complexes. *Nanotechnology.* 22(14):145703. doi: 10.1088/0957-4484/22/14/145703.

- Weller RO, Kida S, Zhang ET. (1992). Pathways of fluid drainage from the brain—morphological aspects and immunological significance in rat and man. *Brain Pathol* 2(4): 277–84.
- Weller RO, Subash M, Preston SD, Mazanti I, Carare RO. (2008). Perivascular drainage of amyloid-beta peptides from the brain and its failure in cerebral amyloid angiopathy and Alzheimer's disease. *Brain Pathol.* 18(2):253-66.
- Whiteman S, Yang Y, Jones J, Spiteri M. (2008). FTIR spectroscopic analysis of sputum: preliminary findings on a potential novel diagnostic marker for COPD. *Ther Adv Respir Dis* 2(1):23–31. doi: 10.1177/1753465807087972.
- Whiteus C, Freitas C, Grutzendler J. (2014). Perturbed neural activity disrupts cerebral angiogenesis during a postnatal critical period. *Nature.* 505(7483):407-11.
- WHO (World Health Organization) (2005). Air quality guidelines -Global update 2005- Particulate matter, ozone, nitrogen dioxide and sulfur dioxide”
- WHO (World Health Organization) (2009). Air quality and health
- WHO. (2006). Neurological Disorders: Public Health Challenges. World Health Organization, Geneva.
- Wick P, Malek A, Manser P, Meili D, Maeder-Althaus X, Diener L, Diener PA, Zisch A, Krug HF, and von Mandach U. (2010). Barrier capacity of human placenta for nanosized materials. *Environ. Health Perspect.* 118 (3), 432–6.
- Wiłkość M, Hauser J, Tomaszewska M, Dmitrzak-Weglarczyk M, Skibińska M, Szczepankiewicz A, and Borkowska A. (2010). Influence of dopaminergic and serotonergic genes on working memory in healthy subjects. *Acta. Neurobiol. Exp. (Wars).* 70 (1), 86-94.
- Williams GV, and Castner SA. (2006). Under the curve: critical issues for elucidating D1 receptor function in working memory. *Neuroscience.* 139 (1), 263-76.
- Williams K, Alvarez X, Lackner AA (2001). Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia* 36: 156–164.
- Wilson JG. (1972). Environmental effects on development-teratology. In: NF Affli, editor. *Pathophysiology of gestation*, vol. II. New York: Academic. pp. 270–320.
- Woodward N, Finch CE, Morgan TE. (2015). Traffic-related air pollution and brain development. *AIMS Environ Sci.* 2(2):353-373.

- Wu J, Yu C, Tan Y, Hou Z, Li M, Shao F, and Lu X. (2015). Effects of prenatal exposure to silver nanoparticles on spatial cognition and hippocampal neurodevelopment in rats. *Environ. Res.* 138, 67-73.
- Xiaoli F, Junrong W, Xuan L, Yanli Z, Limin W, Jia L, and Longquan S. (2017). Prenatal exposure to nanosized zinc oxide in rats: neurotoxicity and postnatal impaired learning and memory ability. *Nanomedicine (Lond)*. 12 (7), 777-95.
- Xie L, Kang H, Xu Q, Chen MJ, Liao Y, Thiyagarajan M, et al. (2013). Sleep drives metabolite clearance from the adult brain. *Science*. 342(6156):373-7. doi: 10.1126/science.1241224
- Xu G, Umezawa M, Takeda K. Early Development Origins of Adult Disease Caused by Malnutrition and Environmental Chemical Substances. *Journal of Health Science*. 2009; 55(1): 11–19
- Yamamoto N, Yoneda K, Asai K, Sobue K, Tada T, Fujita Y, Katsuya H, Fujita M, Aihara N, Mase M, Yamada K, Miura Y, Kato T. (2001). Alterations in the expression of the AQP family in cultured rat astrocytes during hypoxia and reoxygenation. *Brain Res Mol Brain Res*. 20;90(1):26-38.
- 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 (5), 321-8.
- Yang TT, Weng SF, Zheng N, Pan QH, Cao HL, Liu L, et al. (2011). Histopathology mapping of biochemical changes in myocardial infarction by Fourier transform infrared spectral imaging. *Forensic Sci Int* 207 (1):e34–9. doi: 10.1016/j.forsciint.2010.12.005.
- Yang W, Wu Q, Yuan C, Gao J, Xiao M, Gu M, Ding J, Hu G. (2012). Aquaporin-4 mediates astrocyte response to β -amyloid. *Mol Cell Neurosci*. 2012 Apr;49(4):406-14.
- Yang Z, Wang KK. 2015. Glial fibrillary acidic protein: from intermediate filament assembly and gliosis to neurobiomarker. *Trends Neurosci*. 38(6):364–74.
- 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 (1), 38-41.
- Yokota S, Moriya N, Iwata M, Umezawa M, Oshio S, and Takeda K. (2013). Exposure to diesel

- exhaust during fetal period affects behavior and neurotransmitters in male offspring mice. *J Toxicol. Sci.* 38 (1), 13-23.
- Yorifuji et al., (2016). Prenatal Exposure to Traffic-related Air Pollution and Child Behavioral Development Milestone Delays. *Epidemiology*, 27(1): 57-65
- Zager A, Peron JP, Mennecier G, Rodrigues SC, Aloia TP, Palermo-Neto J. (2015). Maternal immune activation in late gestation increases neuroinflammation and aggravates experimental autoimmune encephalomyelitis in the offspring. *Brain Behav Immun.* 43:159-71.
- Zahurak M, Parmigiani G, Yu W, Scharpf RB, Berman D, Schaeffer E, et al. (2007). Pre-processing Agilent microarray data. *BMC Bioinformatics.* 8:142.
- Zerovnik E. (2002). Amyloid-fibril formation. Proposed mechanisms and relevance to conformational disease. *Eur J Biochem.* 269(14):3362-71.
- Zhang et al., (2017). Current understanding of the toxicological risk posed to the fetus following maternal exposure to nanoparticles. *Expert Opin Drug Metab Toxicol.*, 13(12):1251-63
- Zhang ET, Richards HK, Kida S, Weller RO. (1992). Directional and compartmentalised drainage of interstitial fluid and cerebrospinal fluid from the rat brain. *Acta Neuropathol* 83(3): 233–9.
- Zhang J, Niu F, Dong H, Liu L, Li J, Li S. (2015). Characterization of protein alterations in damaged axons in the brainstem following traumatic brain injury using fourier transform infrared microspectroscopy: a preliminary study. *J Forensic Sci.* 60(3):759-63. doi: 10.1111/1556-4029.12743.
- Zhang R, Dai Y, Zhang X, Niu Y, Meng T, Li Y, et al. (2014). Reduced pulmonary function and increased pro-inflammatory cytokines in nanoscale carbon black-exposed workers. *Part Fibre Toxicol*, 11:73.
- Zhang T, Zheng X, Wang X, Zhao H, Wang T, Zhang H, Li W, Shen H, Yu L. (2018). Maternal Exposure to PM2.5 during Pregnancy Induces Impaired Development of Cerebral Cortex in Mice Offspring. *Int J Mol Sci.* 19(1).
- Zhao Y, Mao Y, Zhou LF, Zhang YL. (2003). Immunohistochemical study on central nervous system cavernous hemangiomas. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi.* 83(7):544-7.
- Zhao Z, Nelson AR, Betsholtz C, Zlokovic BV. (2015). Establishment and Dysfunction of the

Blood-Brain Barrier. *Cell*. 163(5):1064-78.

Zotova E, Holmes C, Johnston D, Neal JW, Nicoll JA, Boche D. (2011). Microglial alterations in human Alzheimer's disease following Abeta42 immunization. *Neuropathol Appl Neurobiol.* :513–524.

研究業績一覧

主論文を構成する論文

1. **Atsuto Onoda**, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. (2017). Pretreatment with N-acetyl cysteine suppresses chronic reactive astrogliosis following maternal nanoparticle exposure during gestational period. *Nanotoxicology*, Vol. 11, No. 8, pp1012-1025
2. **Atsuto Onoda**, Takayasu Kawasaki, Koichi Tsukiyama, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. (2017). Perivascular Accumulation of β -Sheet-Rich Proteins in Offspring Brain following Maternal Exposure to Carbon Black Nanoparticles. *Frontiers in Cellular Neuroscience*, Vol.11, 92
3. **Atsuto Onoda**, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. (2017). Dose-dependent induction of astrocyte activation and reactive astrogliosis in mouse brain following maternal exposure to carbon black nanoparticle. *Particle and Fibre Toxicology*, Vol.14, 4
4. **Atsuto Onoda**, Masakazu Umezawa, Ken Takeda, Tomomi Ihara, Masao Sugamata. (2014). Effects of Maternal Exposure to Ultrafine Carbon Black on Brain Perivascular Macrophages and Surrounding Astrocytes in Offspring Mice *PLOS ONE*, Vol.9, No.4, e94336
5. Masakazu Umezawa*, **Atsuto Onoda***, Irina Korshunova, Alexander CØ Jensen, Ismo K Kooponen, Keld A Jensen, Konstantin Khodosevich, Ulla Vogel, Karin S Hougaard. (Under review). Maternal inhalation of carbon black induces a neurodevelopmental disorder-like phenotype in mouse offspring. *Particle and Fibre Toxicology*, *Co-First Author
6. **Atsuto Onoda**, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. (Under review). Dysregulation of major functional genes in frontal cortex by maternal exposure to carbon black nanoparticle is not inhibited by ascorbic acid pretreatment. *Science of the Total Environment*

その他の論文

1. Dalia H. Samak, Yasser S. El-Sayed, Hazem M. Shaheen, Ali H. El-Far, **Atsuto Onoda**, Mohamed M. Abdel-Daim, Masakazu Umezawa. (2018). *In-ovo* exposed carbon black nanoparticles altered mRNA gene transcripts of antioxidants, proinflammatory and apoptotic pathways in the brain of chicken embryo. *Chemico-Biological Interactions*, (in press)
2. Masakazu Umezawa, Masayuki Nakamura, Ashraf A. El-Ghoneimy, **Atsuto Onoda**, Hazem M. Shaheen, Hiroshi Hori, Yusuke Shinkai, Yasser S. El-Sayed, Ali H. El-Far, Ken Takeda. (2018). Impact of Diesel Exhaust Exposure on the Liver of Mice Fed on Omega-3 Polyunsaturated Fatty Acids-Deficient Diet. *Food and Chemical Toxicology*, Vol. 111, pp 284-294
3. Hamida M. Saleh, Yasser S. El-Sayed, Sherif M. Naser, Abdelgawad S. Eltahawy, **Atsuto Onoda**, Masakazu Umezawa. (2017). Efficacy of α -lipoic acid against cadmium toxicity on metal ion and oxidative imbalance, and expression of metallothionein and antioxidant genes in rabbit brain. *Environmental Science and Pollution Research*, Vol. 24, No. 31, pp 24593-24601
4. Kazuki Kobayashi, Euro Saito, Kanato Hirokami, Tsutomu Hiroi, **Atsuto Onoda**. (2017). Bioethanol Production from Waste Flying Powder (Tobiko), Generated in the Manufacturing Process of Konjac-derived Products. *Journal of the Japan Institute of Energy* Vol.96, No.6, pp189-195

5. Masakazu Umezawa, **Atsuto Onoda**, Ken Takeda. (2017). Developmental Toxicity of Nanoparticles on the Brain. *Yakugaku Zasshi*, Vol.137, No.1, pp73-78.
6. 梅澤 雅和, 立花 研, **小野田 淳人**, 武田 健. (2016). 大気中ナノ粒子の健康影響. *環境技術*, Vol. 45, No.11, pp571-576
7. Hazem M. Shaheen*, **Atsuto Onoda***, Yusuke Shinkai, Masayuki Nakamura, Ashraf A. El-Ghoneimy, Yasser S. El-Sayed, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. (2016). The ceramide inhibitor fumonisins B1 mitigates the pulmonary effects of low-dose diesel exhaust inhalation in mice. *Ecotoxicology and Environmental Safety*, Vol. 132, pp390-396 *Co-First Author,
8. 梅澤 雅和, 新海 雄介, **小野田 淳人**, 武田 健, 上村 真生, 曾我 公平. (2016). 動物体内におけるナノ粒子の未知なる動態メカニズムと検出技術改善のニーズ. *バイオイメージング*, Vol.25, No.1, pp22-27
9. **小野田 淳人**, 川崎 平康, 築山 光一, 武田 健, 梅澤 雅和. (2016). 超微小粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微法による可視化. *バイオイメージング*, Vol.25, No.1, pp0-1
10. Yasser S. El-Sayed, Ryuhei Shimizu, **Atsuto Onoda**, Ken Takeda, Masakazu Umezawa. Carbon black nanoparticle exposure during middle and late fetal development induces immune activation in male offspring mice. *Toxicology*, Vol. 327, pp53-61.
11. Ryuhei Shimizu, Masakazu Umezawa, Saki Okamoto, **Atsuto Onoda**, Mariko Uchiyama, Ken Tachibana, Shiho Watanabe, Shuhei Ogawa, Ryo Abe and Ken Takeda. (2014). Effect of maternal exposure to carbon black nanoparticle during early gestation on the splenic phenotype of neonatal mouse. *The Journal of Toxicological Sciences*, Vol.39, No.4, pp571-578

書籍等出版物

1. **Atsuto Onoda**, Masakazu Umezawa, Ken Takeda. (2015). THE POTENTIAL PROTECTIVE EFFECT OF ANTI-OXIDANTS ON NANOPARTICLE TOXICITY. PM2.5 -Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy-, In: Li YJ et al., editors; Published by Nova Science Publishers, Inc. (NY, USA), Chap. 15, pp197-210
2. Masakazu Umezawa, **Atsuto Onoda**, Ken Takeda. (2015). FINDINGS REGARDING THE HAZARD ASSESSMENT OF NANOPARTICLES AND THEIR EFFECTS ON THE NEXT GENERATION. PM2.5 -Role of Oxidative Stress in Health Effects and Prevention Strategy-, In: Li YJ et al., editors; Published by Nova Science Publishers, Inc. (NY, USA), Chap. 13, pp159-175
3. 有澤琴子、馬谷千恵、大上雅史、**小野田淳人**、香川璃奈、杉山康憲、高橋裕佳、瀧慎太郎、道喜慎太郎、豊田優、藤原慶 (2014). これだけ！ 生化学. 秀和システム株式会社. (担当: 第1章 高校化学の復習)
4. 馬場 錬成. (2013). 青年よ 理学をめざせ : 東京理科大学物語. 東京書籍. (担当: 図版作成).

その他の著作物

1. 小野田淳人, 橋本 崇志. (2018) "研究室の運営は放任的であるべきか、管理的であるべきか.", 洋土社 実験医学 Opinion—研究の現場から (in press).
2. 小野田淳人, 梅澤雅和. (2018). 大気環境と子どもの健康に関する最新の国際動向 — Clean air for children—. 日本幼少児健康教育学会第 36 回大会論文集
3. 小野田淳人. (2018). 学生生活の過ごし方 -若き卒業生の歩む路-. 東京理科大学 浩洋 51 14-15.
4. 小野田淳人. (2017). 学生生活の過ごし方 -課外活動や研究室で身につけておきたいこと-. 東京理科大学 浩洋 50 16-17.
5. 小野田淳人. (2017). 学生生活の過ごし方 -自分に適した研究室の選び方-. 東京理科大学 浩洋 49 24-25.
6. 小野田淳人. (2017). 学生生活の過ごし方 -大学での効率のよい学習の仕方-. 東京理科大学 浩洋 48 44-45.
7. 小野田淳人, 梅澤雅和 (2017). 大気環境と子どもの脳の発育. 日本幼少児健康教育学会第 35 回大会論文集.
8. 小野田淳人. (2017). グローバル社会で活躍するために - Novartis Biocamp に参加して -. 東京理科大学 FD 通信 49.
9. 小野田淳人. (2017). デンマークにおける研究者のワークライフバランス. Slide share
10. 小野田淳人, 梅澤雅和. (2016). 脳内の老廃物排出に対する睡眠の効果ならびに出生前環境の関わり. 日本幼少児健康教育学会第 34 回大会論文集.
11. Atsuto Onoda. (2015). Nanotoxicology, brain research and prospects for health education. International Symposium on Environment and Health Research for the Next Generation.
12. 小野田淳人. (2014). ビタミン E の相反する効果 —呼吸器疾患を悪化させる γ -tocopherol と緩和する α -tocopherol—. 日本薬学会 学生コロキウム ジャーナルクラブ.
13. 小野田淳人. (2014). 学習相談室の新しいカタチ - SNS 型学習相談室の提案 - 東京理科大学 FD 通信 35
14. 小野田淳人. (2013). 学生が考えて動く教育活動 - 学生 FD -. 東京理科大学 FD 通信 31
15. 小野田淳人. (2011). ストレートは変化球? Rikejo 9(48)
16. 小野田淳人. (2011). 薬と食品の意外な関係 Rikejo 5(48)
17. 小野田淳人. (2015). Image J を用いた組織像の定量解析. Slide share

社会貢献活動

1. 【取材協力】私たちの大学院生活 ~博士後期課程編~, 東京理科大学 浩洋, 2017 年 1 月
2. 【助言・指導】Google Science Jam 2015, Google, 2015 年 6 月 - 2015 年 12 月
3. 【企画】生命科学夏の学校, 生化学若い研究者の会, 2011 年 9 月 - 2014 年 8 月

競争的資金等の獲得研究課題

1. ナノ物質の妊娠期曝露が引き起こす母体炎症応答と胎児への間接影響の評価, 日本学術振興会 JSPS 特別研究員奨励費 DC, 2015 年 4 月 - 2018 年 3 月 代表: 小野田淳人
2. 脳脊髄液の流出入に伴う老廃物の排出機構に着目した周産期脳障害の病態解明, 日本学術振興会 JSPS 特別研究員奨励費 PD, 2018 年 4 月 - 2021 年 3 月 代表: 小野田淳人

受賞

1. 日本学術振興会 育志賞. 2018 年 3 月
2. 東京理科大学 大村賞 (博士課程首席総代表). 2018 年 3 月
3. 東京理科大学 学生表彰 (研究等の成果が優秀な学生を表彰). 2018 年 3 月
4. 第 57 回 生命科学夏の学校, 最優秀発表賞. 2017 年 9 月
5. 日本薬学会・環境衛生部会, 優秀若手研究者賞. 2017 年 9 月
6. The 8th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE2017), Young Researcher Award. 2017 年 5 月
7. International Conference on Prenatal Programming and Toxicity V (PPTOX V), The Best Presentation Award. 2016 年 11 月
8. The International Particle Toxicology Conference 2016 (IPTC2016), ANF-Asia Nano Safe Prize for the Oral Lecture と Travel grant award の同時受賞. 2016 年 9 月
9. リケイフェスティバル 2016, MVP 講演賞. 2016 年 8 月
10. The 8th International Nanotoxicology Congress (Nanotox 2016), Congress Travel Award. 2016 年 6 月
11. 東京理科大学, 学生表彰 (研究等の成果が優秀な学生を表彰). 2016 年 3 月
12. International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences 2016 (iPoPS 2016), Oral Presentation Award. 2016 年 2 月
13. 日本バイオイメージング学会 第 24 回学術大会, ベストイメージング賞 (ニコソ賞). 2015 年 9 月
14. 第 55 回 生命科学夏の学校, 優秀発表賞. 2015 年 8 月
15. 日本学生支援機構, 特に優れた業績による奨学金全額返還免除. 2015 年 5 月
16. 東京理科大学大学院 薬学研究科, 修士論文優秀賞. 2015 年 3 月
17. The 7th International Nanotoxicology Congress (Nanotox 2014), The Best poster presentation と Fellowship Award の同時受賞. 2014 年 4 月
18. 日本薬学会 第 134 年会, 優秀発表賞. 2014 年 4 月
19. 東京理科大学, 薬学部 首席卒業 (学部総代表). 2013 年 3 月
20. 東京理科大学 こうよう会 学生論文コンテスト, 優秀賞. 2012 年 10 月
21. 出版甲子園大会 全国大会決勝, 第 5 位 (全 257 企画中). 2011 年 11 月
22. 東京理科大学 こうよう会 学生論文コンテスト, 奨励賞. 2011 年 10 月
23. 東京理科大学 こうよう会 学生論文コンテスト, 奨励賞. 2010 年 10 月
24. 日刊工業新聞社 第 12 回全国理工系学生科学技術論文コンクール, 入賞. 2010 年 3 月
25. 東京理科大学 こうよう会 学生論文コンテスト, 最優秀賞. 2009 年 10 月

講演・学会発表（筆頭のみ）

招待講演

1. 小野田 淳人. "PM2.5 にまつわる健康影響の今." 理系フェスティバル 2016. 中野, 東京. (2016, Aug).
2. Onoda A. "Brain perivascular macrophage, the sensitive target of Nanotoxicology" International Joint Workshop on Environmental Toxicity & Mental Health. Damanhour, Behera, Egypt. (2016, Jan.).
3. 小野田 淳人. "自身の研究を伝えるために." 群馬県樹徳高等学校講演会. 桐生, 群馬. (2015, Sep.).
4. Onoda A. "Nanotoxicology - oxidative stress and its potential target, brain perivascular cells" International Joint Workshop on Nanoscience: Benefits and Risks. Damanhour, Behera, Egypt. (2015, Mar.).
5. Onoda A. "Nanotoxicology, brain research and prospects for health education" International Symposium on Environment and Health Research for the Next Generation. Noda, Chiba, Japan. (2015, Feb.).

国際会議口頭発表

6. Onoda A., Umezawa M, Takeda K, Jensen CØ A, Koponen KI, Jensen AK, Vogel U, Hougaard SK. "Induction of behavioral changes and astrogliosis in the brain of offspring mice following maternal inhalation of carbon black nanoparticle" 8th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Copenhagen, Denmark. (2017, May.).
7. Onoda A., Takeda K, Umezawa M. "Effects of antioxidant preadministration on the long-term damage of astrocytes induced by maternal exposure to carbon black nanoparticle in mice." 11th International Particle Toxicology Conference. Singapore, Singapore. (2016, Sep.).
8. Onoda A., Takeda K, Umezawa M. "Diffuse perivascular abnormalities and GFAP and aquaporin-4 dysregulation in the brain induced by maternal exposure to carbon black nanoparticle." 4th International Postgraduate Conference on Pharmaceutical Sciences. Chiba, Japan. (2016, Feb.).
9. Onoda A., Takeda K, Umezawa M. "Dysregulation of GFAP and aquaporin-4 proteins of astrocytes in the frontal cortex by prenatal exposure to carbon black nanoparticle." 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Limpopo Province, South Africa. (2015, Oct.).

国際会議ポスター発表

10. Onoda A., Kawasaki T, Tsukiyama K, Takeda K, Umezawa M. "Infrared Microscopy Analysis of Brain Perivascular Abnormalities Induced by Maternal Exposure to Carbon Black Nanoparticle." International Symposium on Imaging Frontier. Tokyo, Japan. (2017, July).
11. Onoda A., Takeda K, Umezawa M. "Effects of N-acetyl cysteine pretreatment on the long-term astrocyte activation induced by maternal exposure to carbon black nanoparticle in mice." International Conference on Prenatal Programming and Toxicity V. Hakata, Japan. (2016, Nov.).

12. **Onoda A**, Kawasaki T, Tsukiyama K, Takeda K, Umezawa M. "In situ characterization of the brain perivascular abnormalities induced by maternal exposure to nanoparticle using fourier transform infrared microspectroscopy (FT-IR)." The 10th Forum of neuroscience. Copenhagen, Denmark. (2016, July).
13. **Onoda A**, Kawasaki T, Tsukiyama K, Takeda K, Umezawa M. "Prenatal exposure to carbon black nanoparticle induces protein conformational change in the brain determined by in situ fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR)." The 8th International Conference on Nanotoxicology. Boston, U.S.A. (2016, Jun.).
14. **Onoda A**, Takeda K, Umezawa M. "Effect Of Ascorbic Acid Pretreatment On Brain Perivascular Injury Induced By Prenatal Exposure To Carbon Black Nanoparticle In Mice." The Society of Toxicology 55th Annual Meeting and ToxExpo 2016. New Orleans, U.S.A. (2016, Mar.).
15. **Onoda A**, Umezawa M, Ihara T, Sugamata M, Takeda K. "Effects of maternal exposure to carbon black and titanium dioxide nanoparticle on perivascular macrophages and surrounding astrocytes in the brain of offspring mouse." The 7th International Conference on Nanotoxicology. Antalya, Turkey. (2014, Apr.).
16. **Onoda A**, Umezawa M, Takeda K, Ihara T, Sugamata M. "Maternal exposure to carbon black nanoparticle affects perivascular cells in the brain of offspring." 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health .Nagoya, Japan. (2013, Sep).

国内会議口頭発表

17. **小野田淳人**, 近藤洋介, 宮崎智, 武田健, 梅澤雅和. "カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露により出生児の脳血管周囲病変で誘導される小胞体ストレス." 日本薬学会 138 年会. 金沢, 石川. (2018, Mar.).
18. **小野田淳人**, 梅澤雅和. "大気環境と子どもの健康に関する最新の国際動向 -Clean air for children-". 日本幼少児健康教育学会第 36 回大会【春季：朝霞大会】. (2018, Feb.).
19. **小野田 淳人**, Karin S Hougaard, Ulla B Vogel, 武田 健, 梅澤 雅和. "カーボンブラックナノ粒子の妊娠期吸入曝露により児に誘導されるアストログリオシスと新奇環境下における行動変化." フォーラム 2017 衛生薬学・環境トキシコロジー. 仙台, 宮城. (2017, Sep.).
20. **小野田淳人**, 武田健, 梅澤雅和. "ナノ粒子の発達神経毒性に対する抗酸化剤の効果." 第 44 回日本毒性学会学術年会. 横浜, 神奈川. (2017, July).
21. **小野田淳人**, 川崎平康, 築山光一, 武田健, 梅澤雅和. "ナノ粒子胎児期曝露により出生児の脳に起こるアストログリオシスの顕微赤外スペクトル法による病態解析." 日本薬学会 137 年会. 仙台, 宮城. (2017, Mar.).
22. **小野田淳人**, 梅澤雅和. "PM2.5 の胎児期曝露により出生児の脳に起こるアストログリオシスの赤外顕微分析." FEL-TUS 光利用ワークショップ 2016. 神楽坂, 東京. (2017, Feb.).
23. **小野田淳人**, Hazem M. E. S., 中村仁幸, 新海雄介, Ashraf A. El-G., 武田健, 梅澤雅和. "低用量のディーゼル排ガス曝露が呼吸器系のセラミド代謝に及ぼす影響." 日本薬学会 136 年会. 横浜, 神奈川. (2016, Mar.).

24. 小野田淳人, 梅澤雅和. "脳内の老廃物排出に対する睡眠の効果ならびに出生前環境の関わり." 日本幼少児健康教育学会第 34 回大会. 青山, 東京. (2016, Mar.).
25. 小野田淳人, 梅澤雅和. "ナノ粒子の胎児期曝露が引き起こす脳血管周辺組織の異常の赤外顕微法による可視化." FEL-TUS 利用者懇談会. 神楽坂, 東京. (2015, Nov.).
26. 小野田淳人, 川崎平康, 築山光一, 武田健, 梅澤雅和. "超微小粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微法による可視化." 第 24 回日本バイオイメージング学会学術大会. 葛飾, 東京. (2015, Sep.).
27. 小野田淳人, 武田健, 梅澤雅和. "ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲細胞に及ぼす影響とアスコルビン酸の前投与による効果の検証" フォーラム 2015 衛生薬学・環境トキシコロジー. 神戸, 兵庫. (2015, Sep.).
28. 小野田淳人, 菅又昌雄, 井原智美, 武田健, 梅澤雅和. "ナノ粒子の胎児期曝露は若齢マウスの脳に老齢個体と類似の慢性所見を誘導する." 第 42 回日本毒性学会学術年会. 金沢, 石川. (2015, Jun.).
29. 小野田淳人, Hazem M. E. S., 中村仁幸, 新海雄介, Ashraf A. El-G., 武田健, 梅澤雅和. "ディーゼル排ガスの低用量曝露が呼吸器系の酸化ストレス応答とセラミド代謝に及ぼす影響." 日本薬学会 135 年会. 神戸, 兵庫. (2015, Mar.).
30. 小野田淳人, 岡本沙紀, 清水隆平, 小川修平, 渡辺志帆, 安部良, 武田健. "カーボンブラックナノ粒子の胎仔期曝露が新生仔免疫系に及ぼす影響の曝露時期による差異." フォーラム 2014 衛生薬学・環境トキシコロジー. 筑波, 茨城. (2014, Sep.).
31. 小野田淳人, 梅澤雅和, 武田健, 井原智美, 菅又昌雄. "炭素ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲マクロファージ及びアストロサイトに及ぼす影響." 日本薬学会 134 年会. 熊本, 熊本. (2014, Mar.).
32. 小野田淳人, 梅澤雅和, 井原智美, 菅又昌雄, 武田健. "ナノ粒子の胎仔期曝露が出生仔の脳血管周辺細胞へ及ぼす影響." 第 41 回日本毒性学会学術年会. 神戸, 兵庫. (2014, July).

国内会議ポスター発表

33. 小野田淳人. "デンマークにおける研究者のワークライフバランス." 第 57 回生命科学夏の学校, 高島, 滋賀. (2017, Sep.).
34. 小野田淳人, 梅澤 雅和. "大気環境と子どもの脳の発育." 日本幼少児健康教育学会第 35 回大会. 世田谷, 東京 (2017, Mar.).
35. 小野田淳人, 川崎平康, 築山光一, 武田健, 梅澤雅和. "ナノ粒子の胎児期曝露による脳血管周辺異常の in situ 赤外顕微スペクトル法を用いた評価." フォーラム 2016 衛生薬学・環境トキシコロジー. 品川, 東京. (2016, Sep.).
36. 小野田淳人, 川崎平康, 築山光一, 武田健, 梅澤雅和. "β-Sheet リッチタンパク質の蓄積した脳血管周辺領域における組織学的イメージング." 第 25 回日本バイオイメージング学会学術大会. 名古屋, 愛知. (2016, Aug.).
37. 小野田淳人, 川崎平康, 築山光一, 武田健, 梅澤雅和. "カーボンブラックナノ粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の赤外顕微分析" 東京理科大学・日本医科大学第 2 回合同シンポジウム. 葛飾, 東京. (2015, Dec.).
38. 小野田淳人. "ナノ粒子の胎児期曝露に伴う脳血管周辺異常の解析." 第 55 回 生命科学夏の学校, 白子, 千葉. (2015, Aug.)

39. 小野田淳人, 庄野厚. "東京理科大学 教育開発センター 学習相談室の活動報告." 学生FDサミット 2013 夏. 京都, 京都. (2013, Aug.).
40. 小野田淳人, 梅澤雅和, 二木力夫, 武田健, 井原智美, 菅又昌雄. "炭素ナノ粒子の胎仔期曝露が脳血管周囲マクロファージに与える影響." フォーラム 2012 衛生薬学・環境トキシコロジー. 名古屋, 愛知. (2012, Oct.).

Thank you for your reading my doctoral dissertation to the end.....