

課題名 C-0901ディーゼル排気ナノ粒子の脳、肝、腎、生殖器への影響バイオマーカー創出・リスク評価

課題代表者名 黒河佳香
(独立行政法人国立環境研究所環境リスク研究センター健康リスク研究室主任研究員)

研究実施期間 平成21～23年度

累計予算額 63,365千円(うち23年度 19,665千円)
予算額は、間接経費を含む。

研究体制

- (1) ナノ粒子曝露の脳への影響のメカニズム解明と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価
(独)国立環境研究所)
- (2) ナノ粒子の肝臓、腎臓への影響のメカニズム解析と新たなバイオマーカー創出・リスク評価
(名古屋大学大学院医学系研究科)
- (3) ナノ粒子曝露のホルモン系への影響と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価
(東京農工大学共生科学技術研究院)

研究協力機関

名古屋市立大学大学院

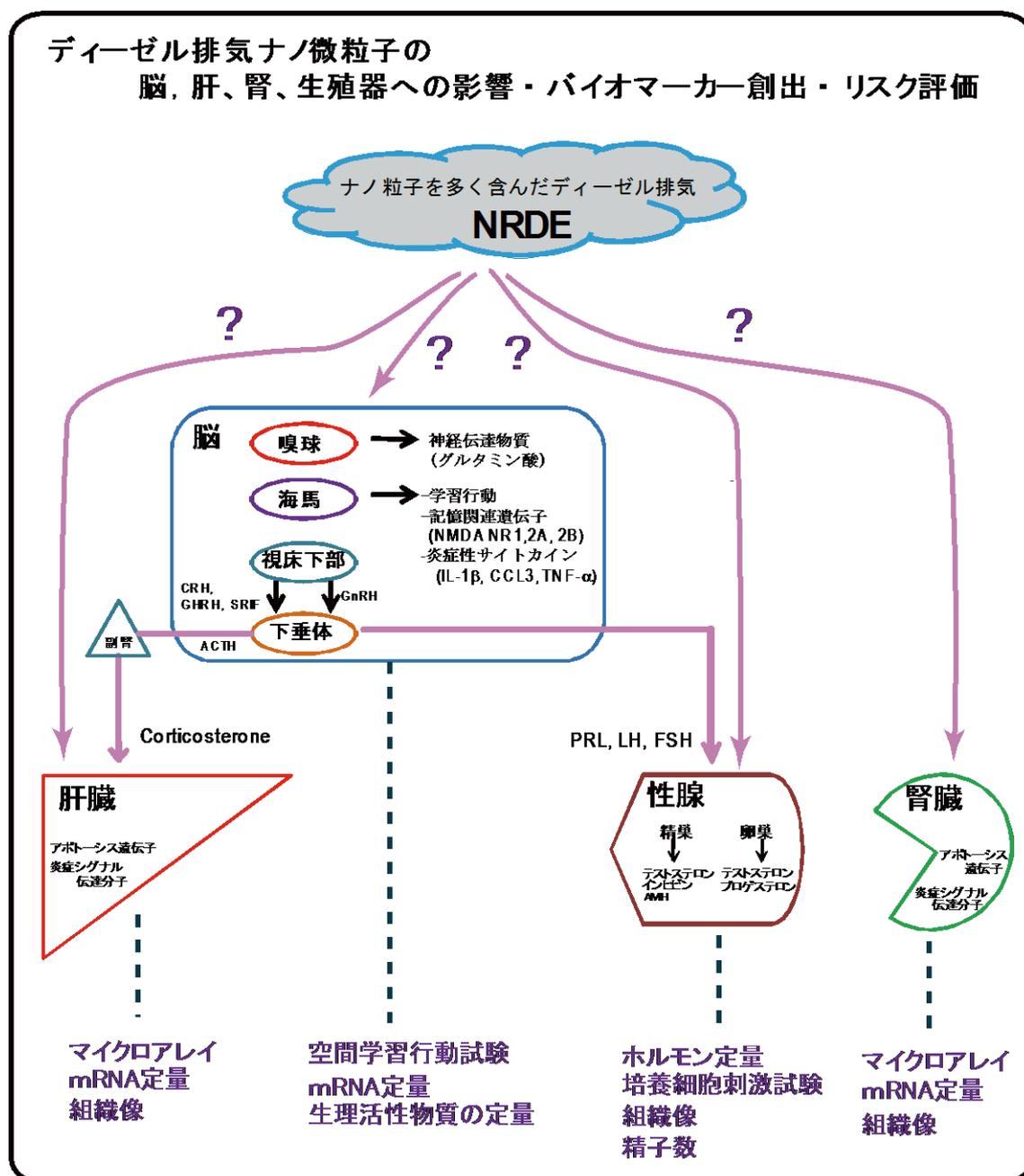
研究概要

1. はじめに

ディーゼル排気微粒子 (Diesel Exhaust Particle: DEP) は大気汚染の主要な成分であり、これらの中には粒径が50nm以下のナノ粒子も含まれている。これらの微粒子は非常に微小なために生体内への移行が容易で、重量あたりの表面積が大きいために生物組織への侵害作用が大きい可能性が懸念されている。しかし現在のところ、その生体影響の研究は十分に蓄積されているとはいえず、わが国において緊急性の高い課題となっている。この研究の必要性に応えるため、国立環境研究所では平成18年度よりナノ粒子を多く含むディーゼル排気 (Nanoparticle-rich Diesel Exhaust: NRDE) の曝露実験を開始し、呼吸・循環器系、炎症・免疫系への影響解明に取り組みはじめた。このような背景の下、我々は平成19~20年度の環境技術開発等推進費で、ラットにNRDEを曝露してその生殖器・次世代影響とメカニズム検証に関する研究を行ってきた。

2. 研究開発目的

上記のような背景のもとで、本研究では、これまで研究してきた生殖・次世代影響の知見に加えて、NRDEに曝露した動物における脳神経系、肝臓、腎臓、性腺ホルモン等への影響を多角的に評価し、さらにそれにとどまらず、影響のバイオマーカーを創出し、それらのマーカーをNRDEの健康リスク評価、環境基準設定の際に参考となる知見として提唱することを計画した(図参照)。



3. 研究開発の方法

(1) ナノ粒子曝露の脳への影響のメカニズム解明と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

マウスを中濃度～高濃度NRDEに亜急性に曝露させて、曝露がマウスの海馬依存的な学習能力に影響をおよぼすかどうかを行動科学的に調べる。また海馬や嗅球組織を用いて分子生物学的な検査も加える。

(2) ナノ粒子の肝臓、腎臓への影響のメカニズム解析と新たなバイオマーカー創出・リスク評価

マウス・ラットを中濃度～高濃度NRDEに亜急性に曝露させて、NRDEが肝臓の炎症と脂質代謝の恒常性に攪乱をもたらすかどうかを調べる。また曝露動物の肝臓を用いて分子生物学的な検査を行ない、肝臓の脂質代謝の変化を詳細に調べる。

(3) ナノ粒子曝露のホルモン系への影響と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

マウス・ラットを中濃度～高濃度NRDEに亜急性に曝露させて、雌雄別に内分泌・生殖器系機能への影響を調べる。階層的な支配関係にある内分泌・生殖器系の機能変化を系統だてて検証するために、マクロ観察から分子生物学的手法にいたるまでの各種検査を行なう。

4. 結果及び考察

(1) ナノ粒子曝露の脳への影響のメカニズム解明と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

雌マウスに高濃度のNRDEを3ヶ月間曝露した結果、海馬依存的な空間学習(水迷路試験)および海馬依存的な非空間学習(新奇物体探索試験)に影響が現れた。また、脳内での一部の炎症性サイトカイン・ケモカインおよびグルタミン酸受容体のmRNA発現レベルにも変化が認められた。

(2) ナノ粒子の肝臓、腎臓への影響のメカニズム解析と新たなバイオマーカー創出・リスク評価

中濃度および高濃度NRDEの1ヶ月曝露により、肝臓に炎症が惹起されていることが明らかとなった。さらに肝臓におけるPPAR α 標的遺伝子の蛋白合成が阻害されていることが判明した。さらに調べると、抗炎症作用を持つPPAR α の変化が肝毒性に関与していることが示唆された。NRDEの曝露、除粒子曝露ともに中性脂肪、総コレステロールの蓄積が観察され、脂質合成の促進が起こっていることが明らかとなった。

NRDE曝露後の雄ラット肝臓を用いてDNAマイクロアレイ解析を行なったところ、アラキドン酸カスケードの変化が観察された。また、血漿・肝臓中の脂肪酸分画の測定を行ったところ、血漿中のリノレイン酸量の減少と肝臓中のEPA上昇が見られた。これらの脂質ホメオスタシスの攪乱は粒子成分よりもむしろガス成分によるものと考えられた。腎臓については、明らかな影響は観察されなかった。

(3) ナノ粒子曝露のホルモン系への影響と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

ナノ粒子を多く含むディーゼル排気は、実験動物の精巣ライディヒ細胞・下垂体前葉細胞のホルモン分泌機能に影響する内分泌攪乱作用を有することがうかがわれた。またナノ粒子と除粒子ガス成分では、ステロイドホルモン分泌細胞と蛋白質ホルモン分泌細胞への作用が異なるものと推察された。

NRDEに曝露された雄マウスで精巣ライディヒ細胞からのテストステロン分泌量が増加するメカニズムを調べた結果、分泌増加作用は下垂体からの性腺刺激ホルモン分泌を介するものではなく、精巣のライディヒ細胞への直接作用であると推察された。いっぽう、ライディヒ細胞からのテストステロン分泌抑制メカニズムは不明であった。さらに、NRDE曝露後の雄ラット精巣を用いてDNAマイクロアレイ解析を行なったところ、アラキドン酸カスケードの変化が観察された。

5. 本研究により得られた主な成果

(1) 科学的意義

NRDEの亜急性曝露(1～12か月)がマウス・ラットの脳・肝・腎・生殖器系に与える影響を検証した。まず、行動科学的検査および脳組織の分子生物学的分析で得られた所見では、NRDE曝露により海馬依存的な学習機能に影響が表れる可能性が示唆された。また、NRDE曝露による肝機能への影響の一端が明らかになった。その影響の一部にPPAR α が関与すること、脂質のホメオスタシスが1ヶ月曝露で攪乱されること、そして長期曝露の結果として実際に肝臓に脂質の蓄積が起こることを本研究では明らかにした。さらに、先行研究で観察されていた曝露後のテストステロンの上昇は精巣への直接作用(精巣ライディヒ細胞におけるステロイドホルモン生合成酵素と関連因子の活性上昇、エイコサノイド合成系の関与)である可能性が示唆された。また、妊娠ラットの高濃度曝露で認められる黄体機能の低下・コルチコステロン分泌増加は、曝露により流産や雄胎子の脳の脱雌性化の障害がおこりやすくなることも示唆された。

(2) 環境政策への貢献

本研究の結果から、環境基準値よりはるかに低い相当の曝露(15 µg/m³)でも肝臓の脂質量に変化をもたらすことが明らかとなった。同濃度の曝露は先行研究においてテストステロン濃度の有意な上昇が確認されている。また、長期DE曝露マウスの結果では、粒子を除去したガス成分のみの曝露においても高濃度NRDE曝露群同様に肝臓の脂質の蓄積が観察されている。これらのことから、環境基準値と粒子規制を主とする排気ガス規制の見直しの検討が必要となるかもしれないが、その際の科学的知見として貢献できると考えられる。

さらに、ナノ粒子曝露により雄の精巣機能に影響がでる可能性を示唆したことから、本研究は、ヒトを含んだ都市部で生活する雄動物の生殖機能への作用メカニズムを研究することの必要性を提示した。また、ナノ粒子曝露により妊娠動物の卵巣機能が抑制される可能性を示唆したことから、本研究は、都市部で生活する妊婦への影響について研究を深める必要性を提示した。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

- 1) T.T.WIN-SHWE, S.YAMAMOTO, Y.FUJITANI, S.HIRANO and H.FUJIMAKI: Nanotoxicology, Jun 13. [Epub ahead of print] (2011)
 “Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice”
- 2) N.YAMAGISHI, Y.ITO, DH.RAMDHAN, Y.YANAGIBA, Y.HAYASHI, D.WANG, CM.LI, S.TANEDA, AK.SUZUKI, K.TAYA, G.WATANABE, M.KAMIJIMA, T.NAKAJIMA: Inhal Toxicol, accepted
 “Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats.”
- 3) CM.LI, X.LI, AK.SUZUKI, Y.FUJITANI, J.JIGAMI, K.NAGAOKA, G.WATANABE & K.TAYA: Toxicology Letters 209,277-281, 2012
 “Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on adrenocortical function in adult male mice.”

<査読付論文に準ずる成果発表>

特になし

(2) 主な口頭発表(学会等)

- 1) Tin Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano, Hiroshi Nitta, Hidekazu Fujimaki: 第52回大気環境学会 (2011),9月,長崎.
 “Spatial and non-spatial learning performance in mice exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust particles”
- 2) 山岸希、伊藤由起、Ramdhan Doni Hikmat、柳場由絵、林由美、内藤久雄、鈴木明、井上健一郎、那須民江: 第80回日本衛生学会学術総会 2010/5/9-11(仙台).
 「ディーゼル排気ナノ粒子の海馬ステロイド合成系への影響」
 「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガスが 雌マウスおよび雌ラットの卵巣機能に及ぼす影響に関する研究」

7. 研究者略歴

課題代表者: 黒河佳香

愛媛大学医学部卒業、医学博士、現在(独)国立環境研究所主任研究員

(1): 黒河佳香(同上)

(2)1): 藤巻秀和

千葉大学理学部卒業、理学博士、元(独)国立環境研究所主席研究員

2): 山元昭二

岡山大学大学院自然科学研究科修了、元(独)国立環境研究所主任研究員、
2010年10月に逝去

3): Tin Tin Win Shwe

ミャンマー第一医学大学卒業、医学博士、現在(独)国立環境研究所特任研究員

4): 那須民江

信州大学理学部卒業、理学博士、

名古屋大学大学院医学系研究科教授を経て、現在中部大学客員教授

5): 伊藤由紀

名古屋大学医学部保健学科卒業、医学博士、

現在 名古屋市立大学大学院医学研究科環境保健学助教

6): 田谷 一善

東京農工大学農学部卒業、農学博士、現在 東京農工大学共生科学技術院教授

7): 渡辺 元

東京農工大学農学部卒業、農学博士、現在 東京農工大学共生科学技術院教授

C-0901 ディーゼル排気ナノ粒子の脳、肝、腎、生殖器への影響

バイオマーカー創出・リスク評価

(1) ナノ粒子曝露の脳への影響のメカニズム解明と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

(独)国立環境研究所環境リスク研究センター

藤巻 秀和、山元 昭二、Tin Tin Win Shwe、黒河 佳香

平成21～23年度累計予算額：25,866 千円

(うち、平成23年度予算額： 7,664 千円)

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 二十数 nm 付近の粒径のナノ粒子を多く含んだディーゼル排気 (NRDE : nanoparticle-rich diesel exhaust) の亜急性曝露がマウスの脳機能に与える影響を検証した。マウスに3カ月の曝露を行なった直後に強化学習を評価するオペラント行動試験を実施した結果、有意な変化は観察されなかった。一方、海馬依存的な空間学習であるモリス水迷路試験および海馬依存的な非空間学習である新奇物体探索試験を行なった結果、それぞれの学習成績の指標のうえにNRDE曝露によるものと思われる変化が観察された。同じく曝露マウスの脳組織を用いて分子生物学的分析を行なったところ、海馬において学習に関連した分子の発現に曝露によると思われる変化が認められた。以上より、NRDEに亜急性に曝露されたマウスで海馬機能への影響が観察され、本研究によりディーゼル排気中のナノ粒子が神経毒性をもつ可能性が示唆された。

【キーワード】 ディーゼル排気ガス、全身吸入曝露、ナノ粒子、脳、マウス

1. はじめに

ディーゼル排気微粒子 (DEP : diesel exhaust particle) は大気汚染の主要成分であり、これらの中には粒径が50nm以下のナノ粒子も含まれている。これらのナノ粒子は非常に微小なために生体内への移行が容易で、重量あたりの表面積が大きいために生物組織への侵害作用が大きいことが懸念されるが、その生体影響の研究は非常に乏しく、わが国において緊急性の高い課題となっている。この研究の必要性に応えるため、(独)国立環境研究所では平成18年度よりナノ粒子を多く含むディーゼル排気 (NRDE : nanoparticle-rich diesel exhaust) の曝露実験を開始し、呼吸・循環器系、炎症・免疫系への影響解明に取り組み始めた。このような背景の下、我々は平成19,20年度の環境技術開発等推進費で、ラットにNRDEを曝露し、生殖器・次世代影響とそのメカニズムに関する研究を行った。本研究では、これまで研究してきた生殖・次世代影響に加えて、NRDEに曝露した動物における脳神経系 (特に認知・学習機能) への影響を評価し、さらにそれにとどまらず影響のバイオマーカーを創出し、それらのマーカーをNRDEの健康リスク評価、環境基準設定の際に参考となる知見として提唱することをめざした。

2. 研究開発目的

(独)国立環境研究所に設置されている実験動物用NRDE曝露システムを用いて、マウスに亜急性にNRDEを全身曝露し、各種学習行動 (強化学習、空間記憶学習、非空間記憶学習など)

への影響を調べる。さらに、NRDEの神経系機能分子（特に記憶学習にかかわるもの）をターゲットとして曝露マウスの脳標本を用いた分子生物学的検査を行ない、考えられるNRDEの神経毒性のメカニズムを明らかにする。

3. 研究開発の方法

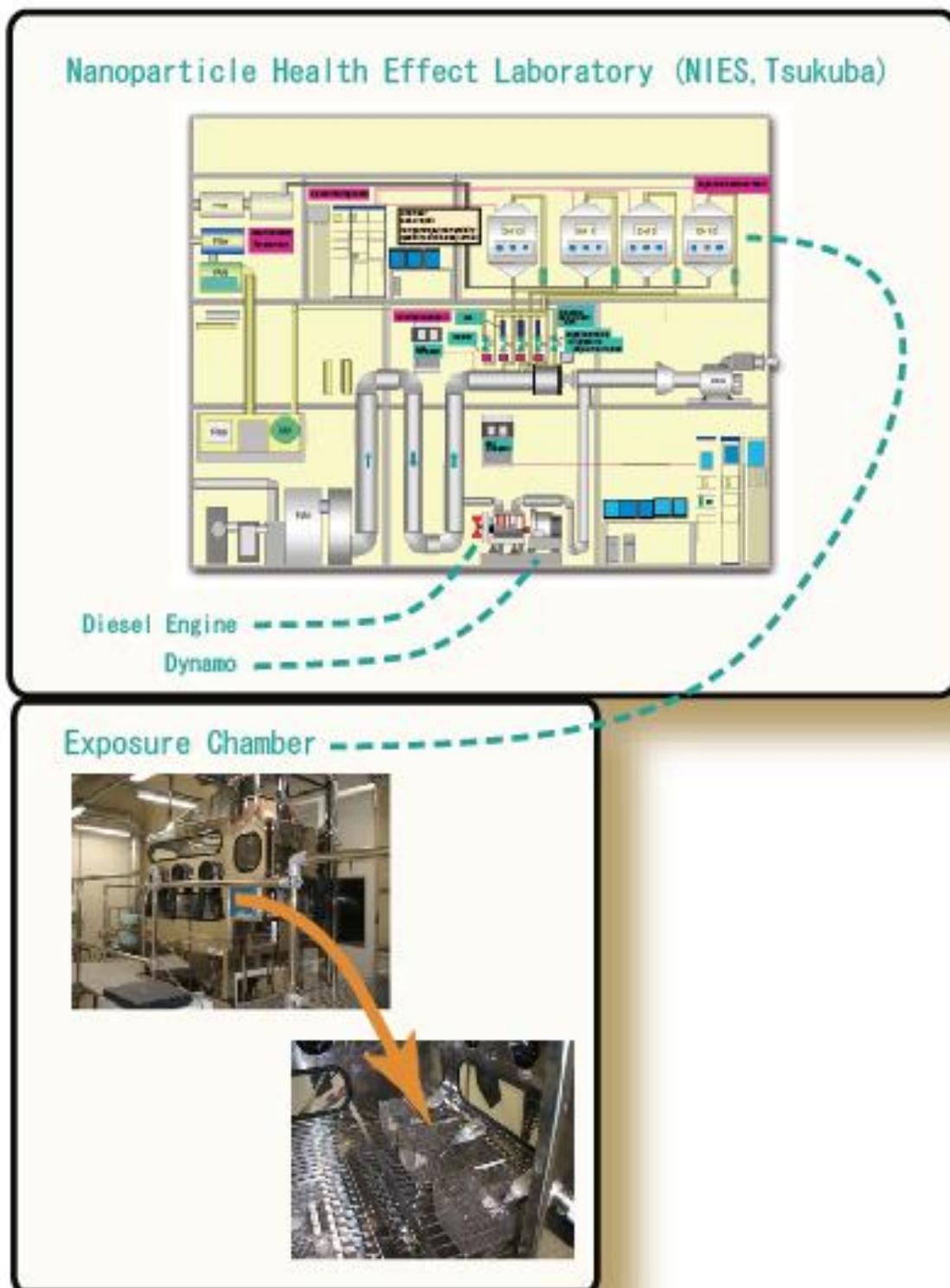
(1) 曝露装置

すべての実験において、実験動物のナノ粒子への曝露は、独立行政法人国立環境研究所のナノ粒子健康影響実験棟内で実施した。

同棟の実験施設（図(1)－1）において、エンジンダイナモメータに接続した状態でディーゼルエンジンを稼動運転し、その排気を清浄空気によって2段階に希釈したのち、動物曝露チャンバーに導入した。曝露空間として幅1.5m、奥行き1.5m、高さ3.5mのチャンバーを独立して4基設置し、その中で最大4条件の同時曝露を行なった。NRDEの生成は、スス粒子（粒径約60～200nm）の発生を極力おさえて発生粒子の個数モード径が20～30nmとなり、かつ排気中のガスが低濃度となるような無負荷高速回転条件でエンジンを駆動することにより行なった。

今回の実験では、①コントロール曝露（新鮮濾過空気）、②中濃度NRDE曝露、③高濃度NRDE曝露、④除粒子曝露の4条件を設定した。除粒子の場合は、高濃度曝露と同じ希釈条件でULPAフィルターをチャンバー前に設置し、粒子のみを除去した曝露を行なった（ただし、初期に行なった一部の実験で低濃度曝露を実施した）。なお、この場合の中濃度曝露の粒子濃度は、2009年に環境省が定めたPM2.5（粒径 $2.5\mu\text{m}$ 以下の微小粒子状物質）の1日平均曝露の環境基準（ $35\mu\text{g}/\text{m}^3$ ）に相当するレベルに設定した。

曝露は基本的に1日のうちの22時から3時の5時間に実施し、同スケジュールを週に5日間実施した。今回の実験では、同曝露を1ヶ月間もしくは3ヶ月間のいずれかで実施した。曝露期間中は、曝露空気質（粒子質量濃度、個数分布、粒径分布、無機ガス濃度）を毎回モニタリングして、曝露条件の安定さを確認した。



図(1) - 1. ナノ粒子曝露実験施設の模式図

(2) 実験動物

すべての実験において、動物は6～8週齢のBALB/cマウスを用いた。1ヶ月曝露では雄マウスを、3ヶ月曝露では雌マウスを用いた。これは、マウスの集団飼育が長期にわたるほど雄では闘争反応が増えることを配慮した結果である。

(3) 曝露方法

1) 曝露スケジュール①

NRDEへの4週間曝露と、細菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸(LTA)の腹腔内投与の組み合わせにより、マウスを4群に分けた。LTAに関しては、マウス1匹あたり50 μ gの腹腔内注射を週に1回、計4回実施した。

2) 曝露スケジュール②

実験群として、コントロール群(新鮮濾過空気)、中濃度曝露群、高濃度曝露群および除粒子曝露群(ガス成分のみ)の4群を設定し、計4台の吸入曝露チャンバーで3ヶ月のNRDE曝露(5時間/日, 5日/週)を行なった。

(4) 行動学的検査

1) モリス水迷路試験

曝露終了より1～2日目に本試験を開始した。本試験では、マウスの遊泳を観察するために直径100cm、高さ30cmの円形の白色プラスチック製プールを用いた。プールに入れる液体としては25℃前後の水道水を用い、プールの底面より高さ20cm程度にまで水を満たし、水の透明性を低下させる特別な処置は行なわなかった。マウスの目標地点としてのプラットフォームを設ける場合は、プールの縁より15cm離れた地点に直径10cmの円形のプレキシグラス製透明板を固定し、水面より1cm沈んだ位置を保たせた。空間的な手がかりとしては、プールの縁に円形のマークを固定し、周辺の壁にさまざまな形のつりさげ式オブジェクトとさまざまな色のカーテンを設置した。

円形プールを4分割して1区画にプラットフォームを置き、残り3区画をマウスの遊泳開始点とした。マウスの遊泳の1単位を最長120秒に設定した。1日目はプラットフォームを置いた状態で練習を行ない、2～4日目の三日間にプラットフォームを同じ位置に保った状態でAcquisition Phase試験を行なった。5日目より1～2日間、プラットフォームを置かない状態でProbe Trial試験を行なった。最後の日にプラットフォームを水面より上にある状態に保ってVisible Platform試験を行なった。それぞれの試験でのマウスの遊泳をプール直上のビデオカメラで記録し、ビデオトラッキング用ソフトウェア(室町機械社製)によってプラットフォームに到着するまでの時間と遊泳速度を解析した。

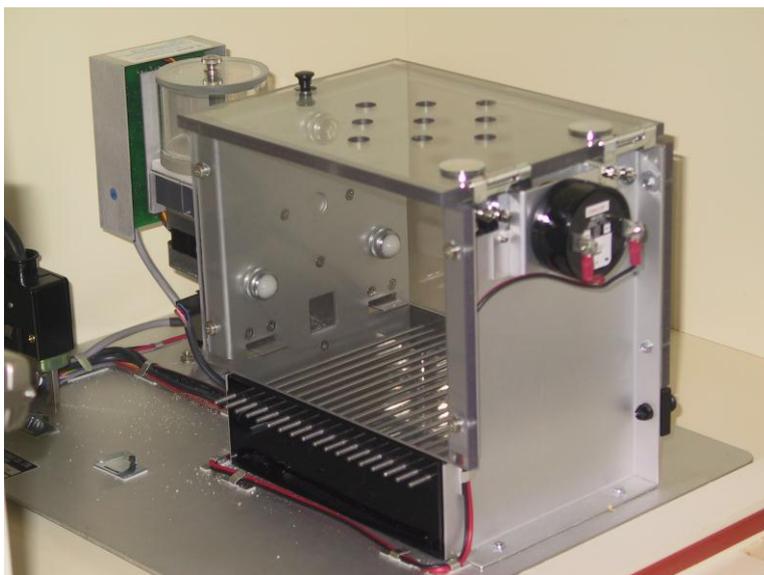
2) 新奇物体探索試験

曝露終了より1～2日目に本試験を開始した。本試験では、マウスの行動を観察するために50×50×40cmの大きさの亚克力製ボックスを使用し、オブジェクトとして6×7×8cm

程度の大きさの2種類の陶器製模型を用いた。最初の2日間は、環境に馴れさせるため、マウスを空のボックスの中に一日あたり15分間だけ放置した。3日目のTraining phaseでは、同じオブジェクト2個をボックス内に配置(壁より最短10cm)して10分間放置した。4日目(Test phase)では、ひとつのオブジェクトを別の種類のオブジェクトと交換して配置して5分間放置し、その間のマウスの動作を直上のビデオカメラで記録し、ビデオトラッキング用ソフトウェア(室町機械社製)によってオブジェクト(見慣れたオブジェクトと新奇なオブジェクト)探索時間を解析した。

3) オペラント試験

すべてのオペラント試験は、マウス用の標準的なオペラント試験箱(図(1)-2)を用いて行なった。オペラント学習のスケジュールとして、2つのメニュー(①ある回数レバーを押せば報酬がもらえるFR(fixed ratio)セッション、②ある一定期間以上のレバー押し抑制ののちのレバー押しで報酬がもらえるDRL(differential reinforcement of low rates)セッション)を効率よく学習することを目標とする試験方式を設定した。1日1セッションを基本とし、2週間の訓練の後、4週間/計21セッションの交替式多元スケジュールFR20-DRL10を1個体あたりの本試験とした(図(1)-3)。各マウスの各セッションごとに、餌獲得効率(2つのメニューを一括したうえでの、1分間あたりの獲得餌数)を算出した。



図(1)-2 マウス用オペラント試験箱

オペラント学習試験のスケジュール

訓練期間(2週間):

1日目: 試験箱に入れるのみ
 2日目: FR1
 3日目: FR1
 4日目: FR3
 5日目: FR5
 6日目: FR10
 7日目: DRL5
 8日目: DRL5

テスト期間(4週間):

交替型多元スケジュール
 FR20-DRL10

1セッション/日
 5~6セッション/週
 計21セッション(4週間)

- FR: **F**ixed **R**atio Schedule (定比率スケジュール)
 FRx: 累積X回のレバー押しに対して、報酬(えさ粒1個)が提示される
- DRL: **D**ifferential **R**einforcement of **L**ow Rates Schedule
 (低反応率分化強化スケジュール)
 DRLx: X秒以上レバー押しを抑制した後のレバー押しに対して、
 報酬(えさ粒1個)が提示される

図(1) - 3 本研究で設定したオペラント学習試験のスケジュール

(4) 分子生物学的・生化学的検査

1) 組織における遺伝子発現レベル、生理活性物質量の評価

曝露および曝露後の行動学的検査がすべて終了した翌日に、マウスをネンブタールで深く麻酔し、すみやかに頭部を切断して大脳を摘出した。さらにその標本よりすみやかに嗅球と海馬を分離し、即座に凍結して -80°C で保存した。後日、解凍した組織をホモジナイズして遠沈し、その上清を用いて、リアルタイムRT-PCR法によるmRNAの定量およびELISA法による生理活性物質の定量を行なった。

mRNAに関しては、嗅球・海馬における以下の物質由来のものを定量した。

- ①記憶に関連したNMDA型グルタミン酸受容体サブユニット (NR1, NR2A, NR2B)
- ②長期記憶関連転写因子のリン酸化に関わるCaMKIV
- ③神経刺激伝達に関連したグルタミン酸トランスポーター (GLT1, EAAT4)
- ④神経伝達物質GABAの合成酵素 (GAD65, GAD67)
- ⑤神経の分化・成長や炎症反応にかかわる神経栄養因子 (NGF, BDNF)

⑥炎症性サイトカイン (TNF- α , IL-6) ・ケモカイン (MCP-1/CCL2, MIP-1 α /CCL3)

⑦酸化ストレスマーカー (HO-1)

(5) 病理組織学的検索

神経損傷・神経新生に関わる神経栄養因子NGFおよびミクログリアについて、その活性化を免疫組織学的検査により調べた。

4. 結果及び考察

(1) 曝露条件ごとの曝露空気質

曝露期間中にモニタリング計測した曝露空気質 (粒子の粒径モード値、重量濃度、およびNOガス/NO₂ガス濃度) では、概ね、曝露空気中のナノ粒子の粒径はモード値にして20数nmであった。またナノ粒子の重量濃度は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群でそれぞれ4~5、40~45、120~150 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であり、除粒子曝露群ではコントロール群と同程度の値が得られていた。またガス成分の濃度に関しては、中濃度および高濃度曝露群では粒子の濃度と同じ傾向の大小関係にあり、さらに除粒子曝露群では高濃度群と同程度であった (表(1)-1)。

表(1)-1 実験に使用したディーゼル排気の組成 (計測結果の1例)

	Nanoparticles		Gaseous compounds				
	Size	Conc.	CO	SO ₂	NO ₂	NO	CO ₂
	(nm)	($\mu\text{g}/\text{m}^3$)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(ppm)	(%)
コントロール曝露	—	10.5	0.29	0.001	0.00	0.01	0.06
中濃度曝露	23.2	47.1	1.25	0.004	0.16	0.32	0.07
高濃度曝露	25.2	128.9	3.15	0.009	0.50	0.93	0.08
除粒子曝露	—	7.2	3.13	0.008	0.49	0.93	0.08

(2) 体重および組織重量

ナノ粒子曝露マウスの体重と臓器重量を測定した。コントロール群と曝露群の間で体重、肝臓、脾臓、腎臓、胸腺および脳の重量の有意な差は見られなかった。

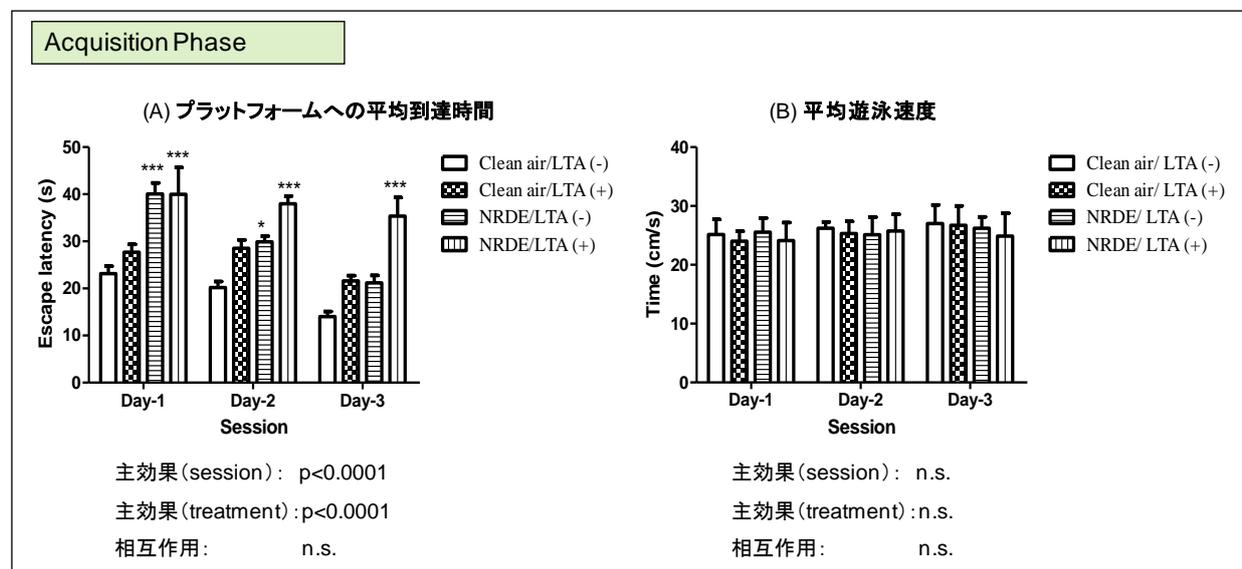
(3) 曝露スケジュール①での結果

ナノ粒子を多く含んだディーゼル排気 (NRDE) への4週間曝露と、細菌の細胞壁成分であるリポタイコ酸 (LTA) の腹腔内投与の組み合わせによりBALB/c雄マウスを4群に分け (コントロール群、ナノ粒子曝露群、LTA群、複合曝露群)、処置後の4群マウスについて以下の計測を行なった。

1) 行動学的検査

a. モリス水迷路試験

モリス水迷路試験において、平均遊泳速度に群間の差は見られなかった（図(1)－4(B)）。いっぽう、水面下に隠れたプラットフォームへの到達において、複合曝露群ではコントロール群に比べて到着に長い時間を要したが、ナノ粒子曝露群ではそれらに影響はみられなかった（図(1)－4(A)）。



図(1)－4. モリス水迷路試験における (A)プラットフォームへの到達時間と (B)遊泳速度。

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs. clean air/LTA(-).

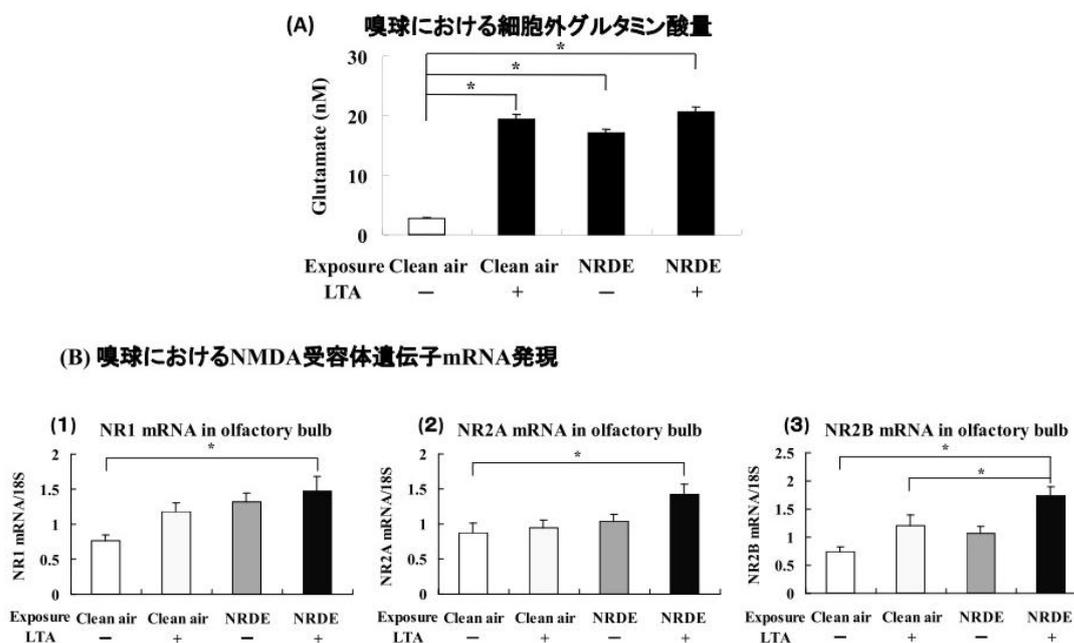
2) 分子生物学的・生化学的検査

a. 組織における遺伝子発現レベル、生理活性物質量の評価

嗅球において、神経伝達物質の変動を調べたところ、高濃度曝露とLTAとの併用、もしくはそれぞれ単独で、グルタミン酸レベルの有意な増加を引き起こした（図(1)－5A）。しかしながら、他の細胞外アミノ酸神経伝達物質について影響は見られなかった。

海馬でのNMDA受容体サブユニット（NR1、NR2A、NR2B）のmRNA発現レベルは、コントロール群に比べて複合曝露群で有意に高かった（図(1)－5B）。また、嗅球におけるNR1、NR2A、NR2BやプロテインキナーゼCaMKIV、転写因子CREB1等のmRNA発現の増加が複合曝露群において観察された。

以上の結果から、NRDEとLTAの共曝露は、空間記憶学習機能、海馬・嗅球における記憶関連遺伝子の発現、および嗅球でのグルタミン酸レベルに影響を及ぼすことが示唆された。



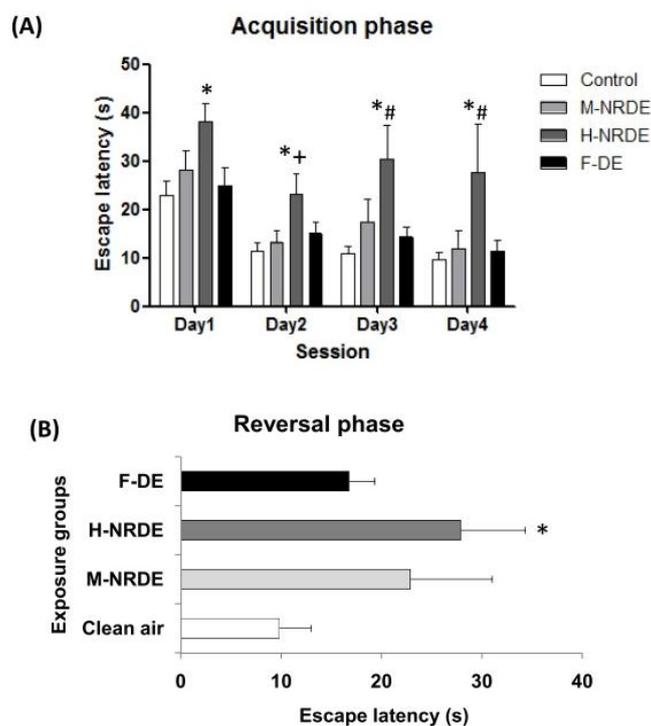
図(1)-5. NRDE曝露したマウスの嗅球における(A)細胞外グルタミン酸量と(B)NMDA受容体サブユニット(1)NR1, (2)NR2A, (3)NR2B mRNA発現量の変化。LTA;リポテイコ酸。平均値±標準誤差(n=6). * $P < 0.05$ vs. clean air/LTA(-).

(4) 曝露スケジュール②での結果

1) 行動学的検査

a. モリス水迷路試験

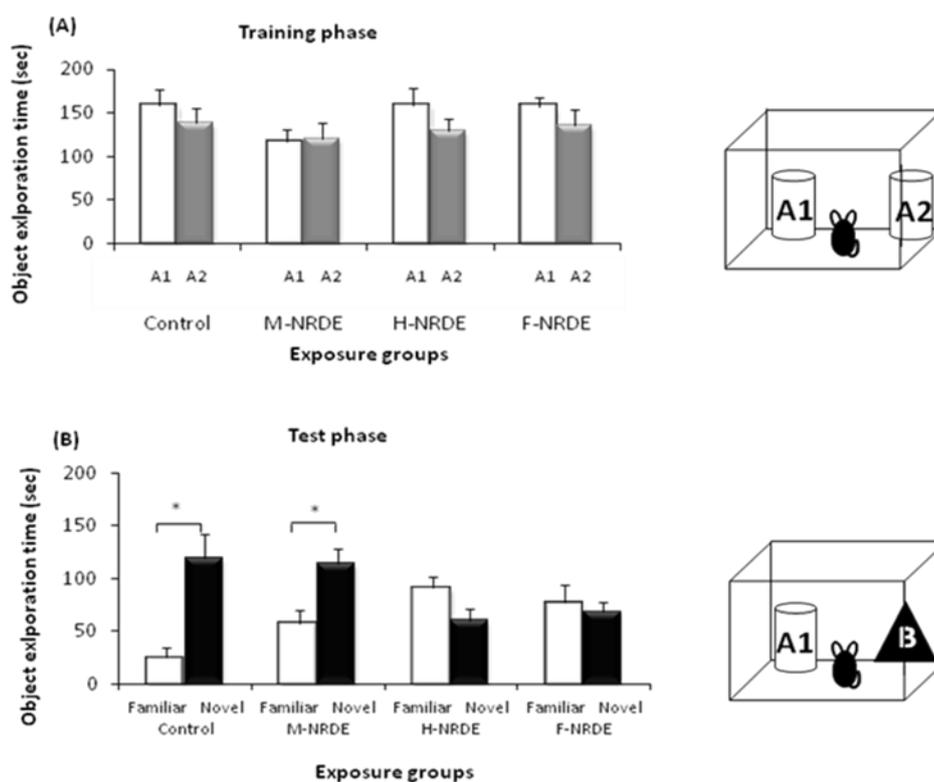
NRDE 3ヶ月曝露後のモリス水迷路試験において、高濃度曝露群では、コントロール群に比べて水面下に隠れたプラットフォームへの到着に長い時間を要した(図(1)-6 A)。他の中濃度曝露群、除粒子曝露群では差はなかった。訓練した場所とは異なる場所への到達時間では、やはり高濃度曝露群で到達時間の遅れが観察された(図(1)-6 B)。これらの結果からNRDEの亜急性曝露はNMDA受容体を介して空間認識記憶学習障害を引き起こすことが考えられた。



図(1)－6. モリス水迷路測定における(A)the acquisition phase(プラットフォームへの到着時間)と(B)reversal phase(プラットフォームを反対側に移したときの到着時間)の結果。平均値±標準誤差(n=6) (* $P < 0.05$ vs. clean air; + $P < 0.05$ vs. M-NRDE; # $P < 0.05$ vs. F-DE).

b. 新奇物体探索試験

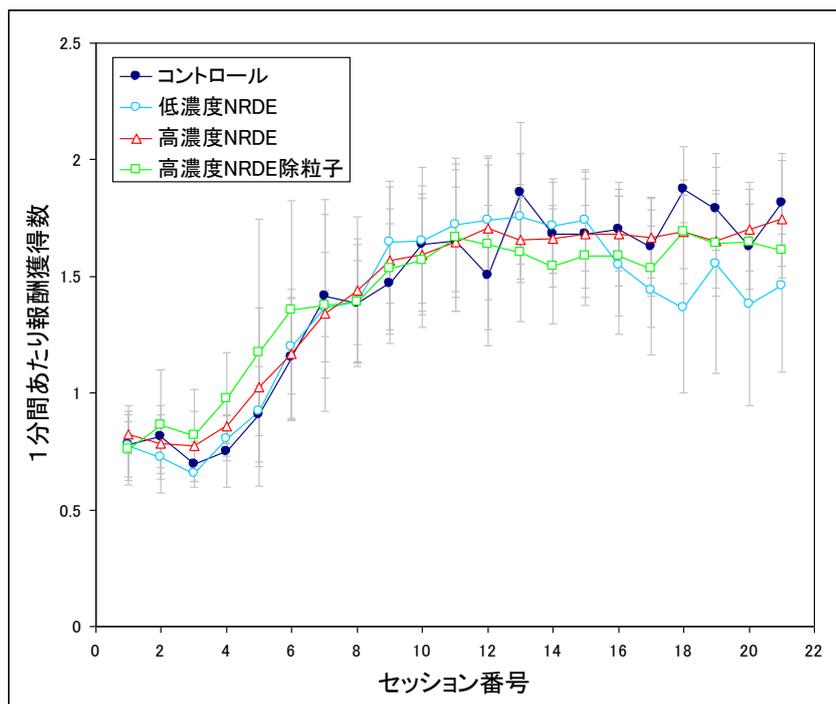
新奇オブジェクト認知テストの結果、training phaseでは、コントロール群と曝露群がオブジェクトに近づく時間はだいたい同じであった。しかし、Test phaseでは、コントロール群、中濃度曝露群では新しいオブジェクトに近づく時間が多いのが認められたが、高濃度曝露群で、コントロール群と中濃度曝露群に比べ、新しいオブジェクトを識別できない傾向が認められた(図(1)－7)。



図(1)－7. 新奇物体探索試験における (A) Training Phase, (B) Test Phase での結果。平均値±標準誤差(n=6) (* $P < 0.05$).

c. オペラント試験

それぞれのマウスの1日ごとの総合的な餌獲得効率(2つのメニューを一括したうえで算出した、1分間あたりの獲得餌数)を算出し、4群でその推移を比較した結果、曝露による有意な差を認めなかった(図(1)－8)。すなわち、オペラント学習(強化学習)に与えるNRDE曝露の影響は否定的であった。



図(1)－8. オペラント試験における1分間あたり報酬獲得数の推移。プロットは、各群の平均値±標準誤差 (n=6) を表す。

2) 分子生物学的・生化学的検査

a. 組織における遺伝子発現レベル、生理活性物質量の評価

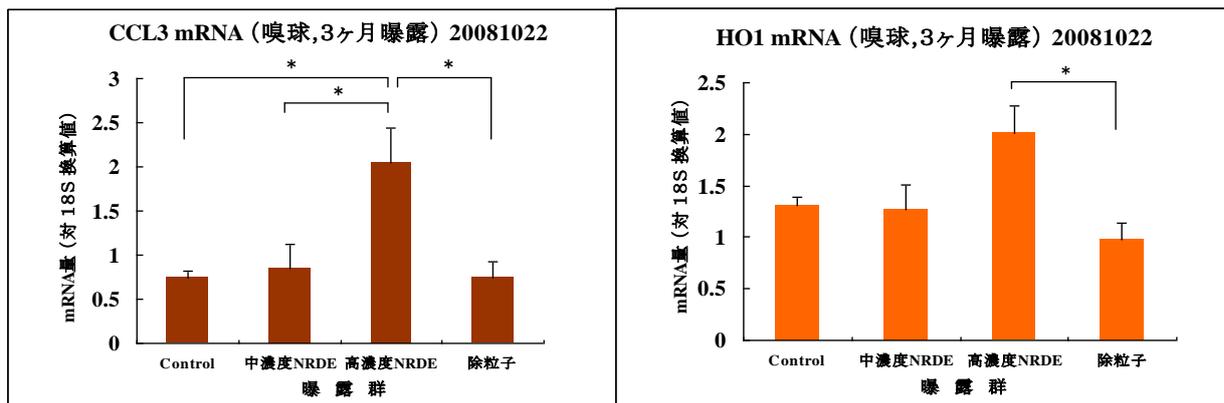
i. 第1回曝露

実験群として、コントロール群（新鮮濾過空気；粒子濃度 $6.6 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）および中濃度NRDE曝露群（ $45.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ，モード粒径 22.6 nm ）、高濃度NRDE曝露群（ $156.3 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ， 24.7 nm ）、除粒子曝露群（ガス成分のみ， $5.1 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）の4群を設定し、3ヶ月のNRDE曝露を行った。

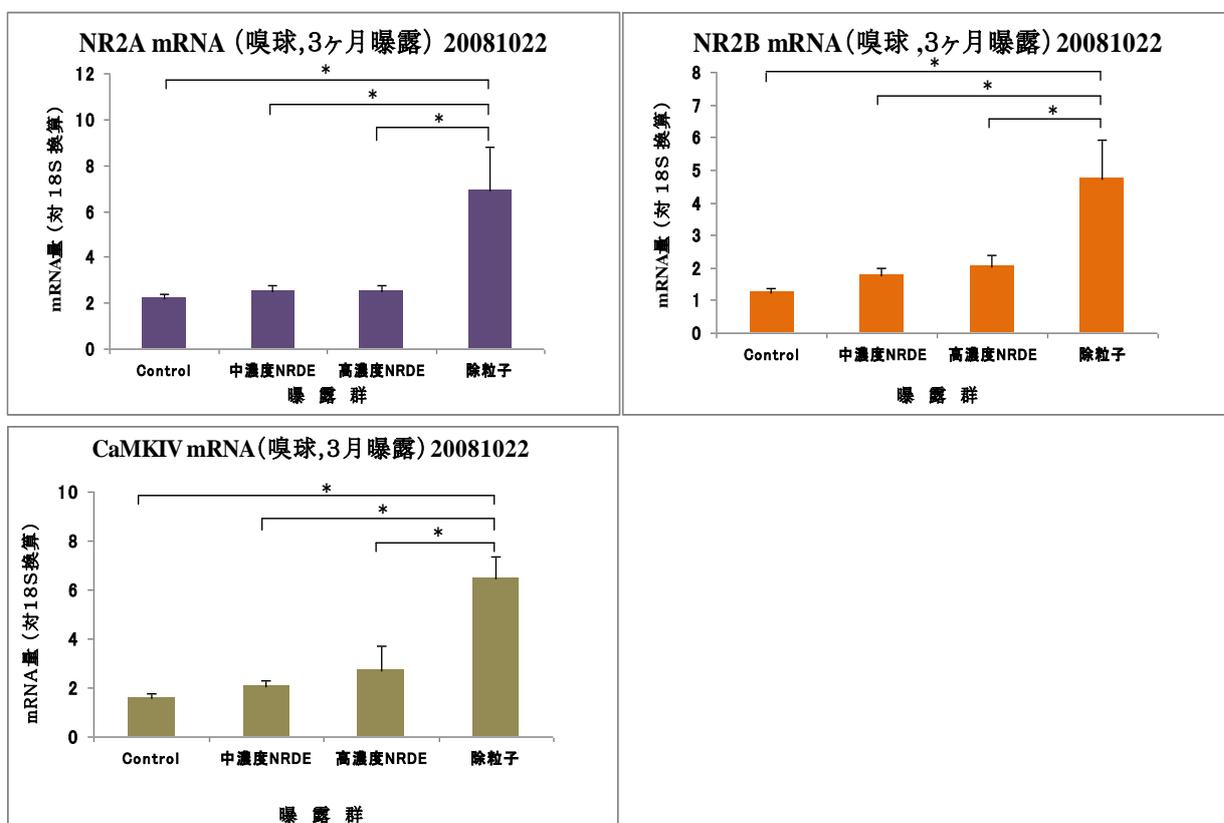
曝露終了後、嗅球・海馬中の酸化ストレスマーカー（HO-1）や炎症性サイトカイン（TNF- α ，IL-6）・ケモカイン（MCP-1/CCL2，MIP-1 α /CCL3）、NMDA型グルタミン酸受容体サブユニット（NR1，NR2A，NR2B）、長期記憶関連転写因子のリン酸化に関わるCaMKIV等のmRNA発現レベルをリアルタイムRT-PCR法によって測定した。

嗅球では、高濃度曝露群でCCL3の増加およびHO-1の増加傾向がみられ（図(1)－9）、また除粒子曝露群でNR2A，NR2BおよびCaMKIV mRNAの増加が示された（図(1)－10）。海馬では、高濃度曝露群でNR2Aの増加がみられ（図(1)－11）、また除粒子曝露群でCCL2が増加傾向を示した（図(1)－12）。

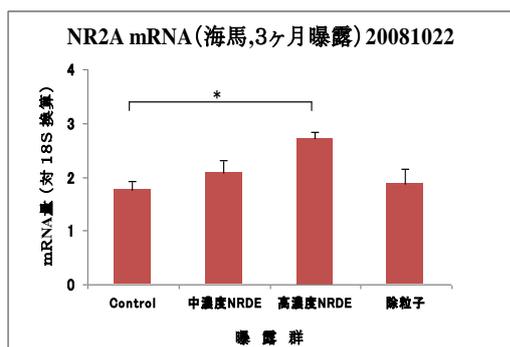
以上の結果から、高濃度NRDEまたは除粒子（ガス成分のみ）の3ヶ月曝露は嗅球や海馬において炎症や酸化ストレス、記憶等に関連する遺伝子発現に影響を及ぼし、ナノ粒子が脳にも移行している可能性が示唆された。



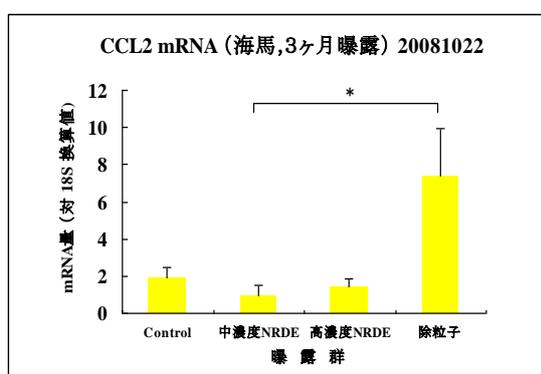
図(1)－9. NRDE 3ヶ月曝露による嗅球での炎症性ケモカインおよび酸化ストレスマーカーHO-1のmRNA発現



図(1)－10. NRDE 3ヶ月曝露による嗅球でのNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットおよびカルモジュリン依存性プロテインキナーゼのmRNA発現



図(1)－11. NRDE 3ヶ月曝露による海馬でのNMDA型グルタミン酸受容体サブユニットのmRNA発現



図(1)－12. NRDE 3ヶ月曝露による海馬での炎症性ケモカインのmRNA発現

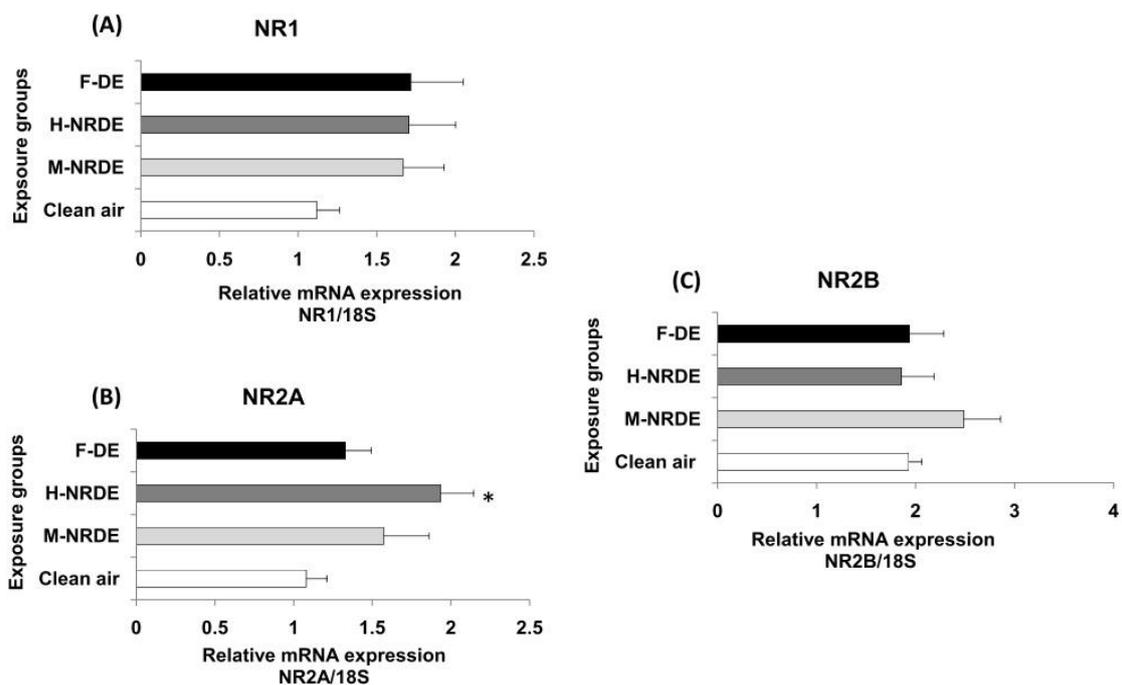
ii. 第2回曝露

コントロール群(清浄空気のみ, 重量濃度 $6.02 \mu\text{g}/\text{m}^3$), 中濃度曝露群(モード粒径 23.06 nm 、重量濃度 $35.48 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度曝露群(モード粒径 25.52 nm 、重量濃度 $122.08 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、除粒子曝露群(重量濃度 $5.50 \mu\text{g}/\text{m}^3$)の4群に分けて、全身吸入曝露チャンバーで3ヶ月(5時間/日, 5日/週)曝露した。

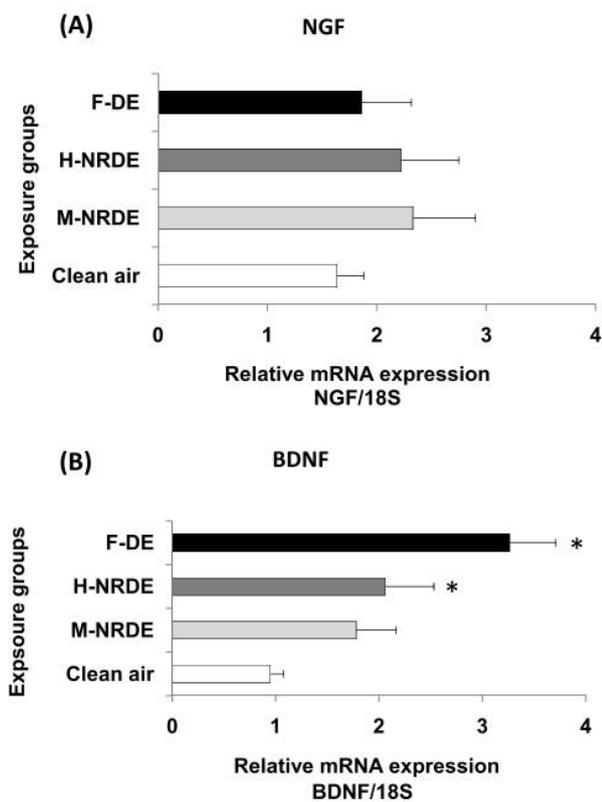
海馬における記憶関連遺伝子、神経栄養因子や転写因子のmRNA発現レベルをリアルタイムRT-PCR法によって解析した。

海馬におけるグルタミン酸受容体遺伝子の発現では、海馬でのNMDA受容体サブユニットNR2AのmRNA発現レベルが、コントロール群に比べて高濃度曝露群で有意に高かった(図(1)－13)。これらの結果からNRDEの亜急性曝露はNMDA受容体を介して空間認識記憶学習障害を引き起こすことが考えられた。

神経の分化・成長や炎症反応にかかわる神経栄養因子の遺伝子発現では、神経成長因子のNGFでは変化がみられなかったが、脳由来神経栄養因子BDNFでは、高濃度曝露群と除粒子曝露群で有意な増加が認められた(図(1)－14)。



図(1)-13. NRDE曝露したマウスの海馬におけるNMDA受容体サブユニット(A)NR1, (B)NR2A, (C)NR2BのmRNA発現量の変化。平均値±標準誤差(n=6) (* $P < 0.05$ versus clean air).



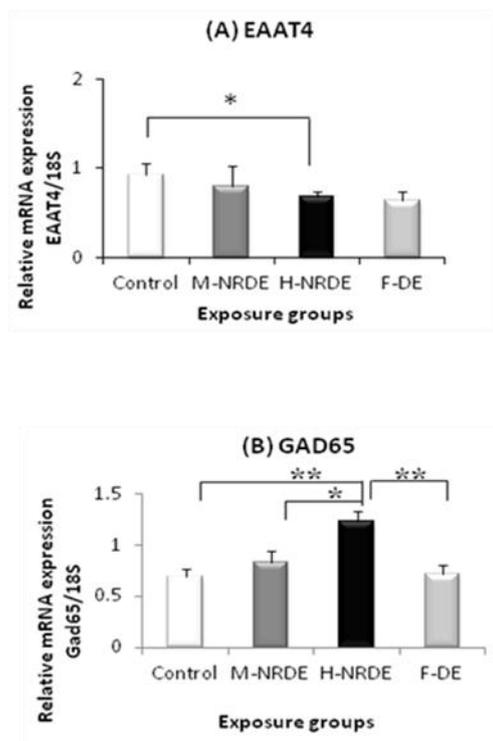
図(1)-14. NRDE曝露したマウスの海馬における神経栄養因子(A)NGF and (B)BDNF遺伝子のmRNA発現量。平均値±標準誤差(n=6) (* $P < 0.05$ versus clean air).

iii. 第3回曝露

コントロール群(重量濃度 $12.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、中濃度曝露群(モード粒径 23.2 nm 、重量濃度 $47.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度曝露群(25.0 nm 、 $129.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、除粒子群($8.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)の4群に分けて、曝露チャンバー内で3カ月(5時間/日、5日/週)曝露した。

神経毒性メカニズムを明らかにするため、海馬における記憶関連遺伝子、神経栄養因子や転写因子、グルタミン酸トランスポーター(GLT1, EAAT4)、GABA合成酵素(GAD65, GAD67)などのmRNA発現レベルをリアルタイムRT-PCR法によって解析した。

海馬におけるグルタミン酸受容体遺伝子の発現をリアルタイムRT-PCR法で調べた結果、記憶関連のグルタミン酸受容体NMDA subunitの発現には各群で差は見られなかったが、CaMKIV 遺伝子発現の低下が高濃度曝露群で認められた。ナノ粒子曝露の脳への影響のメカニズムを解明するため、グルタミン酸トランスポーター、GABA合成酵素も調べた。その結果、神経細胞におけるグルタミン酸トランスポーターGLT1に影響が見られなかったが、アストロサイト細胞におけるEAAT4遺伝子発現の低下が明らかになった(図(1)–15A)。グルタミン酸から抑制性神経伝達物質であるアミノ酸GABAを合成する酵素glutamic acid decarboxylase (GAD) 65では、発現の増加が高濃度曝露群で認められた。この増加は除粒子群では認められず、粒子による影響と考えられた(図(1)–15B)。



図(1)–15. NRDE曝露したマウスの海馬における (A) グルタミントランスポーターEAAT4量、(B) GABA合成酵素GAD65量の変化。平均値±標準誤差(n=6)。* $P < 0.05$ vs. clean air/LTA(-)。

3) 病理組織学的検査

コントロール群(重量濃度 $12.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、中濃度曝露群(モード粒径 23.2 nm 、重量濃度 $47.8 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度曝露群(25.0 nm 、 $129.0 \mu\text{g}/\text{m}^3$)、除粒子曝露群($8.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$)の4群に分けて、曝露チャンバー内で3カ月(5時間/日、5日/週)曝露した。病理組織学的検索で神経成長因子(NGF)やミクログリアの活性化を調べた。

神経新生に関わる神経栄養因子NGFの反応性はコントロール群と曝露群との間に顕著な差は見られなかった。しかし、神経毒性を示すミクログリアの活性化は、高濃度曝露群で有意に増加する傾向が認められた。

4) まとめと考察

4-3の結果から、NRDEとLTAの複合曝露は、空間記憶学習機能、海馬・嗅球における記憶関連遺伝子の発現、および嗅球でのグルタミン酸レベルに影響を及ぼすことが示唆された。

4-4の結果から、3ヶ月NRDE曝露により海馬依存の非空間学習に影響を受けることが明らかとなった。記憶に関連するNMDA受容体のリガンドであるグルタミン酸に関連した神経伝達経路への影響が、記憶・学習能力への影響として現れていると考えられた。そこで、グルタミン酸の代謝に関する遺伝子を調べたところ、グルタミン酸トランスポーターの発現低下やグルタミン酸デカルボキシラーゼの発現増加が認められたことから、NRDEは、グルタミン酸代謝の異常活性化を介した神経損傷を引き起こしながら空間的学習能力に影響することが推察された。さらにこれらの影響は、概して除粒子曝露群では認められない場合が多く、ガス成分よりも粒子成分によってもたらされた変化であることも推察された。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

NRDEの亜急性曝露が海馬におけるNMDA受容体を介して空間的および非空間的な認知・記憶学習の障害を引き起こす可能性が推察され、先行研究で観察されていた海馬や嗅球における炎症反応や記憶等に関連する遺伝子発現の影響を行動レベルで検証することができたと考えられる。

(2) 環境政策への貢献

ディーゼル排ガスの吸入が脳機能に影響をあたえることを示した研究成果であり、今回使った曝露装置は世界でも類を見ない規模・精度のものであるために重要な科学的成果であると考えられる。今回の結果は、今後のさらなる追試が必要であることを強く示すものであると言える。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

- 1) T. T. WIN-SHWE, S. YAMAMOTO, Y. FUJITANI, S. HIRANO and H. FUJIMAKI: *Neurotoxicology*, 29(6), 940-947 (2008).
 “Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust.”
- 2) T. T. WIN-SHWE, D. MITSUSHIMA, S. YAMAMOTO, A. FUKUSHIMA, T. FUNABASHI, T. KOBAYASHI and H. FUJIMAKI: *Toxicol. Appl. Pharmacol.*, 226(2), 192-198 (2008).
 “Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure.”
- 3) T. T. WIN-SHWE, D. MITSUSHIMA, S. YAMAMOTO, Y. FUJITANI, T. FUNABASHI, S. HIRANO and H. FUJIMAKI: *Inhal. Toxicol.*, 21(10), 828-3 (2009).
 “Extracellular glutamate level and NMDA receptor subunit expression in mouse olfactory bulb following nanoparticle-rich diesel exhaust exposure.”
- 4) 藤巻秀和：大気環境学会誌，45，49-55（2010）.
 「健康影響と感受性」
- 5) 藤巻秀和：大気環境学会誌，45，A47-A53（2010）.
 「入門講座 大気環境の健康影響と植物影響—第4講 大気汚染物質による健康影響の分子メカニズム」
- 6) T. T. WIN-SHWE, S. YAMAMOTO, Y. FUJITANI, S. HIRANO and H. FUJIMAKI: *Nanotoxicology*, Jun 13. [Epub ahead of print] (2011)
 “Nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal-dependent spatial learning and NMDA receptor subunit expression in female mice”
- 7) T. T. WIN-SHWE and H. FUJIMAKI: *Int J Mol Sci*, 12, 6267-80 (2011)
 “Nanoparticles and neurotoxicity”
- 8) T. T. WIN-SHWE, Y. FUJITANI, S. HIRANO and H. FUJIMAKI: *Nihon Eiseigaku Zasshi*, 66, 628-633 (2011)
 “Exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust affects hippocampal functions in mice”.

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）
 特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

- 1) 山元昭二、Tin-Tin-Win-Shwe、藤巻秀和：特集 気道暴露（吸入、気管内投与等）法を用いた動物実験モデル ～環境ナノ粒子の気道暴露によるマウス呼吸器系および脳神経系への影響～、*アニテックス*、21(5):16-21 (2009)

(2) 口頭発表（学会等）

- 1) T. T. Win-Shwe, S. Yamamoto, Y. Fujitani, S. Hirano and H. Fujimaki: 79th Annu. Meet. Jpn. Soc. Hygiene (第79回日本衛生学会学術総会), Tokyo, 2009/03. (*Jpn. J. Hyg.*, (日衛誌),

64(2): 291)

“Targeting in nanoparticle-induced neurotoxicity in mice.”

- 2) 山元昭二、Tin-Tin-Win-Shwe、藤谷雄二、平野靖史郎、藤巻秀和：第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月（盛岡）(J. Toxicol. Sci., 34 Suppl.: S86)
「ナノ粒子画分の多いディーゼル排気ガスを曝露したマウスの肺における炎症反応への影響」
- 3) Tin-Tin-Win-Shwe、山元昭二、藤谷雄二、平野靖史郎、藤巻秀和：第36回日本トキシコロジー学会学術年会、2009年7月（盛岡）(J. Toxicol. Sci., 34 Suppl.: S165)
「ナノ粒子画分の多いディーゼル排気ガスを曝露したマウスの脳における記憶関連遺伝子発現」
- 4) 山元昭二、Tin-Tin-Win-Shwe、藤谷雄二、古山昭子、藤巻秀和、平野靖史郎：第50回大気環境学会年会、2009年9月（横浜）(同講演要旨集, 339)
「ナノ粒子画分を多く含んだディーゼル排気ガスの慢性曝露によるマウス呼吸器の免疫・炎症応答に及ぼす影響」
- 5) Yamamoto S., Tin-Tin-Win-Shwe, Mitsushima D., Fujitani Y., Hirano S., Fujimaki H.: 13th Congr. Eur. Fed. Neurol. Soc., Florence, Italy, 2009/09. (Abstracts, 325)
“Analysis of neurotoxic effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on a mouse brain.”
- 6) 山元昭二、Tin-Tin-Win-Shwe、藤谷雄二、平野靖史郎、井上健一郎、藤巻秀和：第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010)、6月16-18日沖縄県宜野湾市
「ディーゼル排ガス由来ナノ粒子の亜急性吸入曝露によるマウス脳への影響」
- 7) 横田俊二、高島宏昌、宮原敬、吉田由香、根倉司、斉藤義明、平林尚之、渡辺卓穂、太田亮、堀内伸二、藤谷雄二、平野靖史郎、藤巻秀和：第37回日本トキシコロジー学会学術年会(2010)、6月16-18日沖縄県宜野湾市
「ラットの中樞神経系に対するナノ粒子を多く含むディーゼル排気粒子点鼻の影響」
- 8) 黒河佳香、北條理恵子、藤谷雄二、平野靖史郎、山元昭二：第33回日本神経科学大会(2010)、9月神戸
「ディーゼル排ガス由来ナノ粒子はマウスの学習機能に影響を与えるか？」
- 9) Y. Kurokawa, R. Hojo, T. Win Shwe, Y. Fujitani, S. Hirano, S. Yamamoto: Neuroscience 2010 (2010), November 12-16, San Diego.
“Influence of sub-acute exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on learning performance in mice”
- 10) S. Yamamoto, T. Win. Shwe, Y. Kurokawa, Y. Fujitani, S. Hirano, K. Inoue: Neuroscience 2010 (2010), November 12-16, San Diego
“Influence of sub-acute inhalation exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on murine brain”
- 11) ティンティンウィンシュエイ、藤谷雄二、平野靖史郎、藤巻秀和：第81回日本衛生学会学術総会(2011)（3月東京の大会が開催されず、誌上発表に変更）.
「ナノ粒子画分の多いディーゼル排気ガスを曝露したマウスの海馬における学習・行動への影響」
- 12) Tin Tin Win Shwe, Yoshika Kurokawa, Yuji Fujitani, Seishiro Hirano, Hiroshi Nitta,

Hidekazu Fujimaki: 第52回大気環境学会 (2011), 9月, 長崎.

“Spatial and non-spatial learning performance in mice exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust particles”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

- 1) 2009年9月にイタリアのフィレンツェで開催された第13回欧州神経学会議におけるポスター発表において優秀賞 (Investigator Award 2009, Substance abuse and neurotoxicology) を受賞

8. 引用文献

- 1) Donaldson K, Stone V.: Current hypotheses on the mechanisms of toxicity of ultrafine particles. *Ann Ist Super Sanita* 39: 405-10, 2003.
- 2) Elder A, Gelein R, Silva V, et al: Translocation of inhaled ultrafine manganese oxide particles to the central nervous system. *Environ Health Perspect* 114: 1172-1178, 2006.
- 3) Oberdörster G, Sharp Z, Atudorei V, et al: Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhal Toxicol* 16: 437-445, 2004.
- 4) Win-Shwe T.T., Yamamoto S, Ahmed S, et al: Brain cytokine and chemokine mRNA expression in mice induced by intranasal instillation with ultrafine carbon black. *Toxicol Lett* 163:153-160, 2006.
- 5) Win-Shwe T.T., Mitsushima D, Yamamoto S, et al: Changes in neurotransmitter levels and proinflammatory cytokine mRNA expressions in the mice olfactory bulb following nanoparticle exposure. *Toxicol Appl Pharmacol* 226: 192-198, 2008.
- 6) Bannerman DM, Good MA, Butcher SP, Ramsay M, and Morris RG. (1995). “Distinct components of spatial learning revealed by prior training and NMDA receptor blockade”. *Nature* 378:182- 186.
- 7) Tsien JZ, Huerta PT, and Tonegawa S. (1996). “The essential role of hippocampal CA1 NMDA receptor-dependent synaptic plasticity in spatial memory”. *Cell* 87:1327- 1338.

- 8) Win-Shwe TT, Yamamoto S, Fujitani Y, Hirano S, and Fujimaki H. (2008). “Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust” . *Neurotoxicology* 29:940- 947.

C-0901 ディーゼル排気ナノ粒子の脳、肝、腎、生殖器への影響**バイオマーカー創出・リスク評価**

(2) ナノ粒子の肝臓、腎臓への影響のメカニズム解析と新たなバイオマーカー創出・リスク評価

名古屋大学大学院

大学院医学系研究科環境労働衛生学

那須 民江、柳場 由絵、林 由美、山岸 希、

ラムダン ドニヒクマツト

名古屋市立大学大学院

大学院医学研究科

上島 通浩、伊藤 由起

平成21～23年度累計予算額：25,000 千円

(うち、平成23年度予算額： 8,000 千円)

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】NRDEの亜急性曝露がマウス・ラットの肝臓・腎臓に与える影響を検証した。中濃度および高濃度NRDEの1カ月曝露により、肝臓に炎症が惹起されていることが明らかとなった。さらに肝臓におけるperoxisome proliferator activated receptor alpha (PPAR α)標的遺伝子の蛋白合成が阻害されていることが判明した。さらに調べると、抗炎症作用を持つPPAR α の変化が肝毒性に関与していることが示唆された。NRDEの曝露、除粒子曝露ともに中性脂肪、総コレステロールの蓄積が観察され、脂質合成の促進が起こっていることが明らかとなった。NRDE曝露後の雄ラット肝臓を用いてDNAマイクロアレイ解析を行なったところ、アラキドン酸カスケードの変化が観察された。また、血漿・肝臓中の脂肪酸分画の測定を行なったところ、血漿中のリノレイン酸量の減少と肝臓中のEPA上昇が見られた。これらの脂質ホメオスタシスの攪乱は粒子成分よりもむしろガス成分によるものと考えられた。腎臓については、明らかな影響は観察されなかった。

【キーワード】ディーゼル排気ガス、全身吸入曝露、ナノ粒子、肝臓、腎臓

1. はじめに

ディーゼル排気微粒子 (DEP : diesel exhaust particle) は大気汚染の主要成分であり、これらの中には粒径が50nm以下のナノ粒子も含まれている。この微粒子は非常に微小なために生体内への移行が容易で、重量あたりの表面積が大きいために生物組織への侵害作用が大きいことが懸念されるが、その生体影響の研究は非常に乏しく、わが国において緊急性の高い課題となっている。この研究の必要性に答えるため、(独) 国立環境研究所では平成18年度よりナノ粒子を多く含むディーゼル排気 (NRDE : nanoparticle-rich diesel exhaust) の曝露実験を開始し、呼吸・循環器系、炎症・免疫系への影響解明に取り組み始めた。このような背景の下、我々は平成19, 20年度の環境技術開発等推進費で、ラットにNRDEを曝露し、生殖器・次世代影響とそのメカニズムに関する研究を行った。本研究では、NRDEに曝露した動物における肝臓・腎臓への影響を評価し、さらにそれにとどまらず影響のバイオマーカーを創出し、それらのマーカーを

NRDEの健康リスク評価、環境基準設定の際に参考となる知見として提唱することをめざした。

2. 研究開発目的

(独) 国立環境研究所に設置されている実験動物用NRDE曝露システムを用いて、マウス・ラットに亜急性にNRDEを全身曝露し、肝臓・腎臓への影響を多角的に調べる。さらに、特に脂質代謝にかかわる各種分子をターゲットとして曝露動物の肝臓標本を用いた分子生物学的検査を行ない、考えられるNRDEの肝臓毒性のメカニズムを明らかにする。

3. 研究開発方法

(1) 曝露装置

すべての実験において、実験動物のナノ粒子への曝露は、独立行政法人国立環境研究所のナノ粒子健康影響実験棟内で実施した。詳細は、サブテーマ(1)の欄に記載した通りである。

(2) 実験動物

ラットへの曝露では、7～8週齢の雄F344ラットを使用した。

マウスへの曝露では、①6週齢雄129/Sv (野生型) マウス・*Ppar α* -nullマウス、および②7週齢の雌BALB/cマウスを用いた。

(3) 曝露方法

1) ラットへの曝露スケジュール

1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月間の曝露を行なった。1群8匹で、次の4群を設定した：コントロール群 (89.8 ± 53.7 nm, 15.5 ± 2.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 3.36 ± 0.93 個/ cm^3)、低濃度曝露群 (23.5 ± 1.0 nm, 23.8 ± 6.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 2.47×10^5 個/ cm^3)、中濃度曝露群 (23.1 ± 1.0 nm, 39.0 ± 4.0 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 5.60×10^5 個/ cm^3)、高濃度曝露群 (27.2 ± 2.0 nm, 137.6 ± 19.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 1.61×10^6 個/ cm^3)。

2) マウスへの曝露スケジュール

マウス①： 2週間、1、2ヶ月間の曝露を行なった。コントロール群、中濃度曝露群 (粒径22～27nm、 31.44 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度曝露群 (128.56 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、除粒子曝露群の4群に分けた。

マウス②： 6ヶ月と12ヶ月の曝露を行なった。コントロール群 (3.6 ± 3.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、中濃度曝露群 (36.35 ± 3.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、高濃度曝露群 (168.34 ± 8.4 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)、除粒子曝露群 (3.1 ± 1.9 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)の4群に分けた。

(4) 摘出臓器の処理

肝臓の一部は、3倍量の0.25 Mスクロースを含む10 mMリン酸緩衝溶液 (pH 7.4) を加え、ホモジネートした。ホモジネートサンプルのタンパク濃度はProtein Assay kit (Bio-Rad社製)を用いて測定した。また、肝臓の一部からCeLYticTM NuCLEARTM Extraction Kit (SIGMA, Tokyo, Japan)を用いて核抽出を行った。

一部の肝臓と腎臓は、4%パラホルムアルデヒドで固定しパラフィン包埋を行った後、切片を作製した。また、一部の肝臓は10%中性緩衝ホルマリン液で固定をした。

(5) 病理組織学的検査

肝臓はHE染色を、腎臓はPAS染色を行い鏡検した。肝臓は壊死、炎症、脂質蓄積を、腎臓はメサンギウム拡大とメサンギウム細胞増殖を中心に観察した。また、1個の腎臓に対して50個の糸球体を無作為に抽出し、メサンギウム拡大の程度により、5段階に分けてスコア化した(0: 0%、1: 0~25%、2: 25~50%、3: 50~75%、4: 75~100%)。

10%中性緩衝ホルマリン液で固定した肝臓は、パラフィン包埋を行った後3 μ m切片を作製し、HE染色を行い鏡検した。肝臓の脂肪滴は、4段階に分けてスコア化した(0: 0%、1: 5~33%、2: 33~66%、3: 66~100%)。

(6) 血液および組織の生化学的検査

1) 血漿アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)

血漿中のAST、ALT値を和光純薬工業のキットを用いて測定した。

2) 血漿中インターロイキン6 (IL-6)

炎症マーカーであるIL-6 をELISAキット(Quantikine ELISA Kits, R&D systems, Inc, MN)で測定した。

3) 血液および肝臓の脂質濃度測定

肝臓の脂質はFolchら (1957) の方法で抽出し、トリグリセライド(TG)、総コレステロール(T-Chol)測定用の試料とした。血漿および肝臓のTG、T-Cholは、トリグリセライドE-テストワコー(WAKO社製)及びコレステロールE-テストワコー(和光純薬工業)を用いて測定した。

4) 肝臓の脂肪酸分画の測定

a. 前処理

肝臓は50mM K_2HPO_4/KH_2PO_4 buffer=1:3の割合でホモジナイズし、肝臓ホモジネートサンプルを作成した。エッペンチューブに肝臓ホモジネート10 μ lと生理食塩水10 μ l、クロロホルム:メタノール=2:1(v/v)溶液100 μ lを入れ、空気相を窒素置換した後、10分間ボルテックスした。20 $^{\circ}$ C、12000rpmで10分間遠心した。クロロホルム層(下層)を70 μ l採取し、ねじ蓋のガラス試験管に入れた。血漿の場合は10 μ lを採取した。窒素気流中でクロロホルムを蒸発させた後、メタノール1.2ml、塩化アセチル75 μ l、10 μ g/100 μ l トリコサンエチル/メタノール(内部標準)25 μ lを入れ、空気相を窒素置換した後蓋をした。それをヒートブロックに置き100 $^{\circ}$ Cで60分間加熱した後、室温まで冷ました。次に試験管内の溶液中にヘキサンを500 μ l加え、30秒間ボルテックスし、3000rpmで2分間遠心した後、上層をバイアルに移し空気層を窒素置換した後蓋をした。試験管に残った溶液にヘキサンを250 μ l加え、30秒間ボルテックスし、3000rpmで2分間遠心した後、上層をバイアルに移し空気層を窒素置換した後蓋をした。得られたヘキサン層1 μ lをGC/MSに供し、脂肪酸メチルエステル、トリ

コサンエチル濃度を測定した。測定対象物質は、飽和脂肪酸のパルミチン酸、ステアリン酸、n-9系不飽和脂肪酸のパルミトレイン酸、オレイン酸、n-6系不飽和脂肪酸のリノール酸、アラキドン酸、n-3系不飽和脂肪酸のリノレン酸、エイコサペンタエン酸(EPA)、ドコサヘキサエン酸(DHA)の計9種とした。

b. GC/MS分析システム

i. カラム

Capillary column 15m×100µm DB-FFAP(Agilent社製、特注品)

ii. 分析条件

初期条件： 注入口温度 150°C, カラム温度 150°C, インターフェース温度 280°C,

分離カラム昇温プログラム： 150°C 0~0.25min, 150~200°C 0.25~1.25 min, 200°C 1.25~5.75min, 200~225°C 5.75~7.75min, 225°C 7.75~16.25min, 225~245°C 16.25~16.5min, 245°C 16.5~18min

キャリアーガス： ヘリウム (流量 0.2mL/min, 圧力 280.6kPa)

サンプル注入量： 1 µl (スプリット比 200:1)

イオン化エネルギー： 70eV

分析モード：SIM m/z67(18:2n-6) m/z74(16:0, 16:1, 18:0, 18:1, 23:0(内部標準))
m/z79(18:3n-3, 20:4n-6, 20:5n-3, 22:6n-6)

(7) 肝臓の分子生物学的検査

1) 定量リアルタイムPCR

RNAは、RNeasy Mini kit (QIAGEN社製)を用いて抽出した。抽出したRNAの量・質をGene Quant II RNA/DNA分光光度計(Pharmacia Biotech社製)で確認した後、バイオアナライザー(Agilent)で電気泳動を行い、不純物や分解のないRNAであることを確認した。

相補的DNA (cDNA)はRNA 1µgからOligo (dT)₂₀ primer、SuperScript IIITM reverse transcriptase (Invitrogen社製)反応溶液20µlを用いて合成した。プライマーは、Ito et al^{3),4)}; Nakamura et al⁵⁾; Yanagiba et al⁶⁾; Ramdhan et al⁷⁾に記載してあるものを用いたほか、一部のプライマーはPrimer Express 2.0.0 (Applied Biosystems)を使用して設計した。

それぞれのmRNA発現量は、ABI PRISM 7000 Sequence Detector (Applied Biosystems Japan 社製)で測定した。PCR反応は1×SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems)、100 nMプライマー溶液を含む反応液25 µl を用いて行った。50°Cで2 min, 95°Cで10 minの反応の後、95°Cで15 sec, 60°Cで1 minのサイクルを40回行った。Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH)をハウスキーピング遺伝子として使用してデータ解析に用いた。すべての遺伝子のmRNA発現量はGAPDH発現量によって補正した。

6ヶ月の肝臓を用いて以下の物質由来のmRNAを調べた。

- PPAR α 、PPAR γ 、PPAR α の標的遺伝子であり脂質代謝に関わるmedium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD)、very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD)
- 脂質合成に関与するfatty acid synthase (FAS)、microsomal triglyceride transporter protein (MTP)、diglyceride acyltransferase (DGAT)1, 2
- コレステロールの動態に関与するLDL receptor (LDL-R)、Sterol Regulatory Element-Binding

Protein (SREBP)

- ・ 過酸化脂質の除去に関与する superoxide dismutase (SOD) 1, 2
- ・ DNAマイクロアレイにおけるパスウェイ解析の結果ランキング上位であったもの(エイコサノイド合成、PG合成・制御、脂肪酸生合成、コレステロール生合成、概日リズム、アンドロゲン受容体シグナル、細胞周期、G1→S期細胞制御、ヘッジホッグシグナル、脂質代謝や毒性に関与する核内受容体、ステロイド生合成経路)のうち、精巣のマイクロアレイの結果でも上位に挙がっていたエイコサノイド合成、PG合成・制御の部分に関わる物質

2) ウェスタンブロット

肝ホモジネートの泳動用サンプルを用い、10%SDS-PAGEを行った後、ニトロセルロース膜0.45 μm (Bio-Rad Laboratories 社製)に転写した。3%スキムミルクでブロッキングした後、各膜をそれぞれ1次抗体でインキュベーションした。50 mM Tris-HCl緩衝溶液 (pH 7.8)、0.05%Tween含有 50 mM Tris-HCl緩衝溶液 (pH 7.8) で洗浄後、2次抗体 (アルカリフォスファターゼ標識goat anti-rabbit IgG (Jackson Immuno Reseach社製))と反応させた。一次抗体はbifunctional protein (hydrase + 3-hydroxylacyl-CoA dehydrogenase) (PH) (Osumi T et al., 1980)、Peroxisomal thiolase (PT) (Furuta et al., 1981)、medium chain acyl-CoA dehydrogenase (MCAD) (Miyazawa et al., 1980)、very long chain acyl-CoA dehydrogenase (VLCAD) (Izai K et al., 1992) を使用しその他の一次抗体はSanta Cruz社より購入した。発色は1-StepTMNBT/BCIP (PIERCE社製)を用いた。それぞれのバンドはLane & Spot Analyzer version 5.0 (ATTO社製)を用いて検出し、数値化した。

3) PPAR α /PPRE 結合試験

PPAR α は核内で peroxisome proliferator-activated receptor response element (PPRE) に結合し、転写が行われる。そこで、肝臓中の PPAR α の PPRE への結合能を PPAR α transcription factor assay kit (Cayman chemical, Ann Arbor, MI) を用いて測定した。20 μg の核タンパクをサンプルとし、マニュアルに従って測定した。

4) DNA マイクロアレイによる網羅的解析

DNAマイクロアレイは東レ株式会社に委託し実施した。高感度DNAチップ3D-Geneを用いて、1色法で解析を行った。ノーマライゼーションによるデータの標準化ののち、変動比2倍を閾値にして発現変動のある遺伝子を同定した。抽出された遺伝子をGenMAPPを用いてパスウェイ解析を、また少なくとも1比較以上で閾値を越えた遺伝子2903個からクラスター解析ソフト(Cluster 3.0)で階層クラスター解析を行った。

(8) 統計解析

脂質蓄積のスコアに関してはFisherの正確検定を行い、定量リアルタイムPCRの結果についてはDunnetの多重比較を行った。それ以外のデータに関しては、一元配置の分散分析の後、Dunnetの多重比較を行った。 $P < 0.05$ を有意とした。

4. 結果及び考察

(1) 曝露条件ごとの曝露空気質

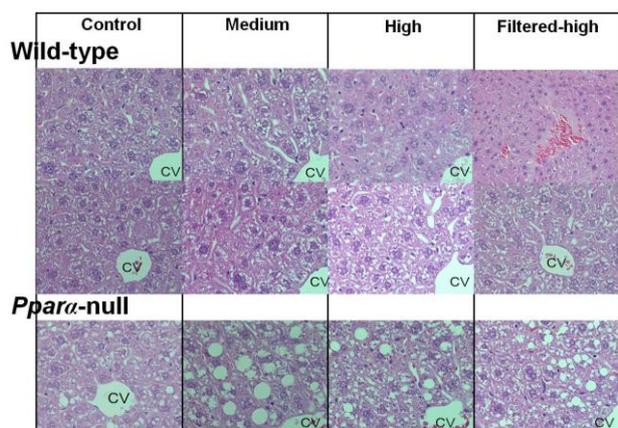
曝露期間中にモニタリング計測した曝露空気質（粒子の粒径モード値、質量濃度、およびNOガス/NO₂ガス濃度）では、概ね、曝露空気中のナノ粒子の粒径はモード値にして20数nmであった。またナノ粒子の質量濃度は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群でそれぞれ4~5、40~45、120~150 μg/m³であり、除粒子曝露群ではコントロールと同程度の値が得られていた。またガス成分の濃度に関しては、中濃度および高濃度曝露群では粒子の濃度と同じ傾向の大小関係にあり、さらに除粒子曝露群では高濃度群と同程度であった。

(2) 病理組織学的検査

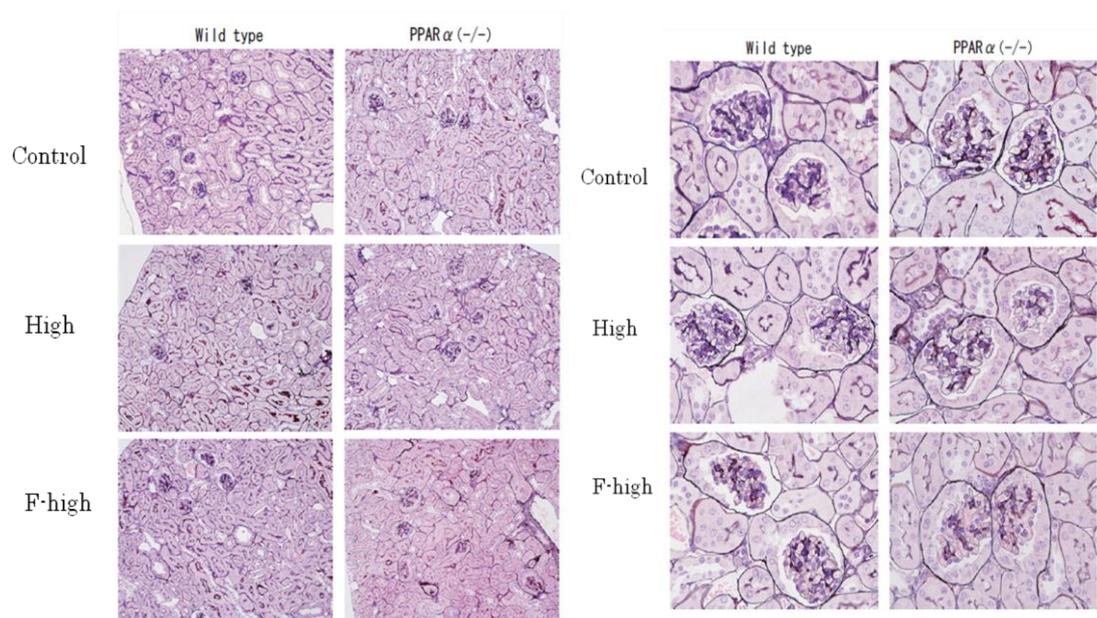
1) 2週~2か月曝露マウス

肝臓では、*Pparα*-nullマウスで曝露により脂質の蓄積が促進している傾向が見られた(図(2)-1)。一方野生型では除粒子曝露群で軽い壊死が観察された他は、曝露依存的な顕著な傾向は見られなかった。

腎臓では、糸球体、尿細管ともに形態学的に顕著な変化は見られなかった(図(2)-2)。高濃度曝露群とコントロール群に関してはメサングイウムの拡大、細胞増殖のスコア化を行ったが、曝露依存的な変化は見られなかった(表(2)-1)。



図(2)-1 野生型と *Pparα*-null マウスの肝臓病理所見。図中の control、Medium、High、Filtered-High はそれぞれ、対照群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



図(2)－2 腎臓の病理組織（弱拡大、強拡大）。図中のcontrol、High、F-Highはそれぞれ、コントロール群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

表(2)－1 腎臓のメサンギウムの病理変化スコア

		個体No.	1	2	3	4	5	スコア			個体No.	1	2	3	4	5	スコア
Wild type Control	PPARα(-/-) Control	1	11	5	5	5	4	1.53	1	5	11	3	2	6	6	1.74	
		2	8	7	4	2	8	1.83	2	10	3	7	7	4	4	1.74	
		3	9	5	8	3	10	2.00	3	9	4	6	4	7	4	1.87	
		4	5	7	7	10	8	2.24	4	6	6	6	6	14	6	2.42	
		5	7	5	10	8	7	2.08	5	6	7	10	8	12	8	2.30	
		6	6	7	4	6	7	2.03	6	7	7	8	20	8	8	2.30	
		7	6	4	4	2	7	2.00	7	1	7	9	4	11	4	2.53	
		8	12	5	9	10	5	1.78	8	3	5	7	8	9	9	2.47	
Wild type High	PPARα(-/-) High	1	8	5	5	11	10	2.26	1	7	7	3	10	12	6	2.33	
		2	12	10	10	5	7	1.66	2	7	5	3	6	7	6	2.04	
		3	12	10	7	7	3	1.46	3	4	4	7	11	5	6	2.29	
		4	2	8	8	7	4	2.10	4	4	4	7	8	6	6	2.28	
		5	7	4	7	4	7	2.00	5	9	3	17	18	5	5	2.13	
		6	8	10	8	4	8	1.84	6	7	5	9	10	6	6	2.08	
		7	3	4	5	5	6	2.30	7	3	7	4	5	4	4	2.00	
		8	6	8	7	6	8	2.06	8	9	4	7	9	3	3	1.78	

2) 6～12カ月曝露マウス

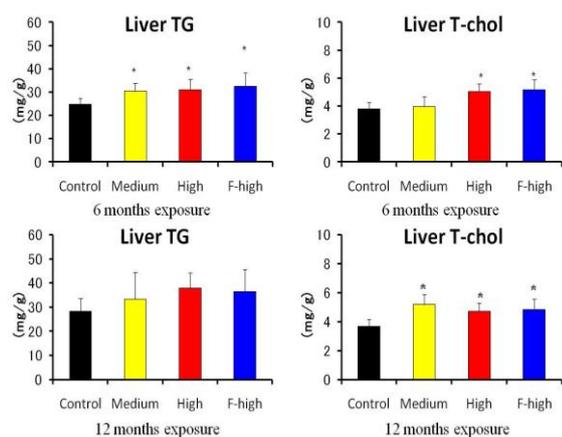
肝臓の病理学的変化を観察したところ、6ヶ月、12ヶ月曝露ともに除粒子曝露をふくめた曝露によって肝臓の脂質の蓄積がおこることが明らかとなった(表(2)－2、Fisher正確検定で $p < 0.01$)。

6ヶ月曝露後の肝臓の中性脂肪濃度はコントロール群に比べて全ての曝露群で上昇していたが、12ヶ月曝露後では高濃度曝露群と除粒子曝露群のみで上昇していた(図(2)－3)。肝臓のコレステロール(T-cho1)濃度は、コントロール群に比べて、6ヶ月曝露後では高濃度曝露群と除粒子群で、12ヶ月曝露後では全ての曝露群で上昇していた。

表(2)－2 NRDE 6、12ヶ月曝露後の肝臓病理組織学的脂質の蓄積。図中のControl、Medium NR-DE、High NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除

粒子曝露群を表す。

		Steatosis		
n		0	1	2
6M	12 Control	75%	25%	0%
	12 Medium NR-DE	58%	33%	8%
	12 High NR-DE	42%	58%	0%
	12 F-DE	75%	17%	8%
n		0	1	2
12M	14 Control	57%	29%	14%
	13 Medium NR-DE	15%	46%	38%
	14 High NR-DE	29%	57%	14%
	14 F-DE	29%	71%	0%



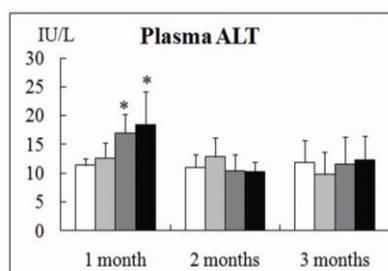
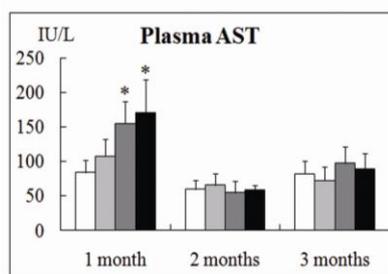
図(2)ー3 NRDE 6、12ヶ月曝露後の肝臓中のトリグリセライド、コレステロール量。図中のControl、Medium、High、F-highはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(3) 血液および組織の生化学的検査

1) 血漿アスパラギン酸アミノ基転移酵素(AST)、アラニンアミノ基転移酵素 (ALT)

a. 1～3ヶ月曝露ラット

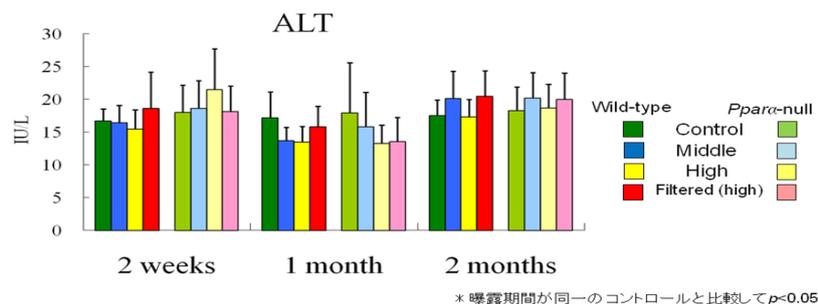
血漿中のAST、ALTは1ヶ月曝露の中濃度曝露群、高濃度曝露群で上昇していた(図(2)ー4)。しかし、2ヶ月、3ヶ月曝露後では変化は見られなかった。



図(2)－4 血漿中の AST と ALT 値。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較)

b. 2週～2ヶ月曝露マウス

血漿 ALT 活性には曝露による変化は見られなかった (図(2)－5)。



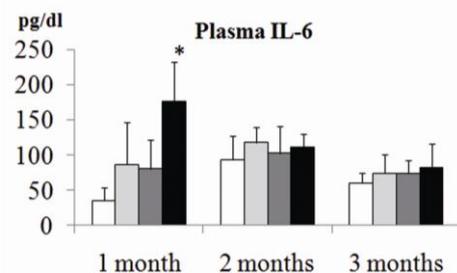
図(2)－5 血漿中の ALT 活性

2) 血漿中インターロイキン6 (IL-6)

a. 1～3ヶ月曝露ラット

血漿中の IL-6 は 1ヶ月曝露後の高濃度曝露群で有意に上昇していた (図(2)－6)。

AST や ALT 同様、2ヶ月、3ヶ月曝露後には変化は見られなかった。



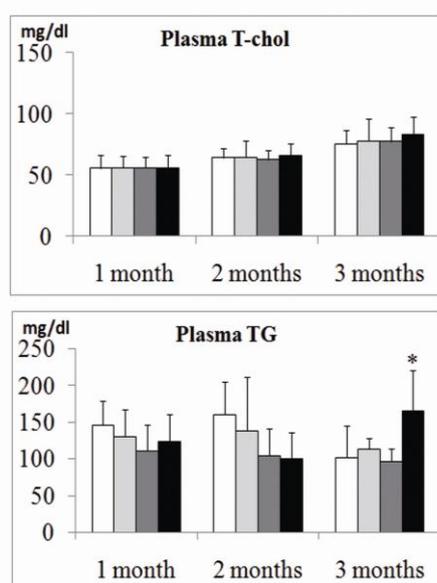
図(2)－6 血漿中IL-6濃度。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較)

3) 血液および肝臓の脂質濃度測定

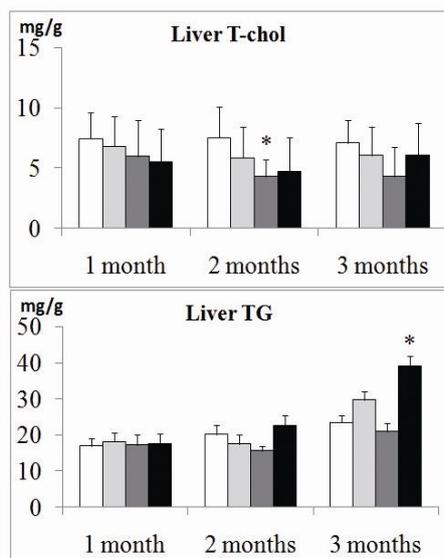
a. 1～3ヶ月曝露ラット

血漿中の T-choI は1ヶ月、2ヶ月、3ヶ月ともに変化が見られなかった (図(2)－7)。血漿中の TG は3ヶ月曝露の高濃度曝露群で有意に増加していたが、1ヶ月、2ヶ月曝露後では変化は見られなかった。

一方、肝臓中の T-choI は2ヶ月曝露の中濃度曝露群のみ有意に低下していたが、曝露濃度依存的な変化は見られなかった (図(2)－8)。肝臓中の TG は血漿中の TG 同様3ヶ月の高濃度曝露群で有意に増加していたが、1ヶ月、2ヶ月曝露後では変化は見られなかった。



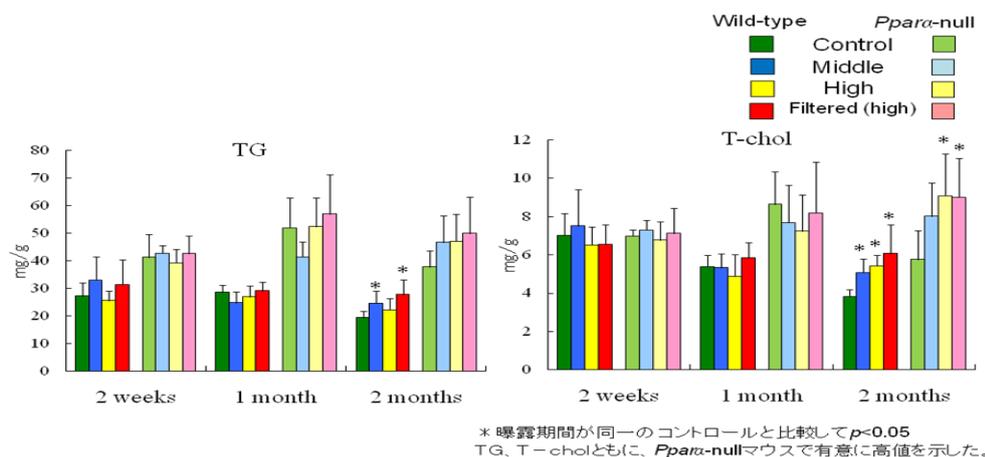
図(2)－7 血漿中T-choIとTG濃度。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較)



図(2)－8 肝臓中T-choとTG濃度。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較)

b. 2週～2ヶ月曝露マウス

肝臓中のTG量、T-cho量ともに *Ppara*-nullマウスの方が野生型マウスに比べ多かったが、NRDE曝露により、TG量は2ヶ月曝露の野生型で上昇し、T-cho量は両遺伝子型で上昇していた(図(2)－9)。



図(2)－9 肝臓のTG、T-cho値

4) 肝臓の脂肪酸分画の測定

a. 1～3ヶ月曝露マウス

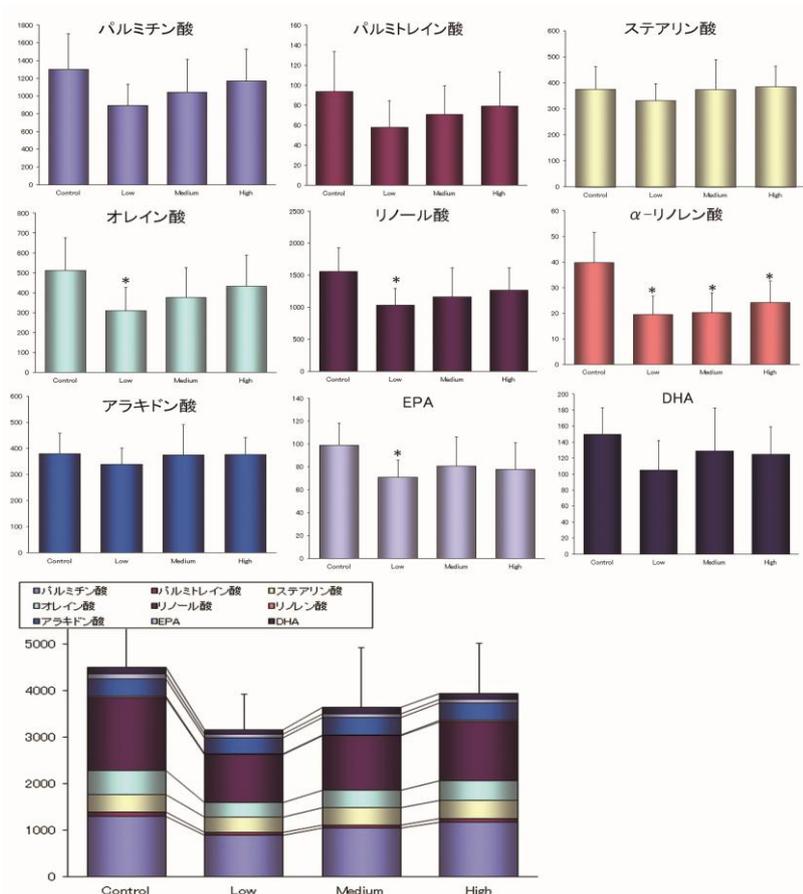
血漿中脂肪酸分画の結果を図(2)－10、肝臓中脂肪酸分画の結果を図(2)－11に示す。

飽和脂肪酸であるパルミチン酸とステアリン酸、パルミチン酸の代謝物である ω -9系不飽和脂肪

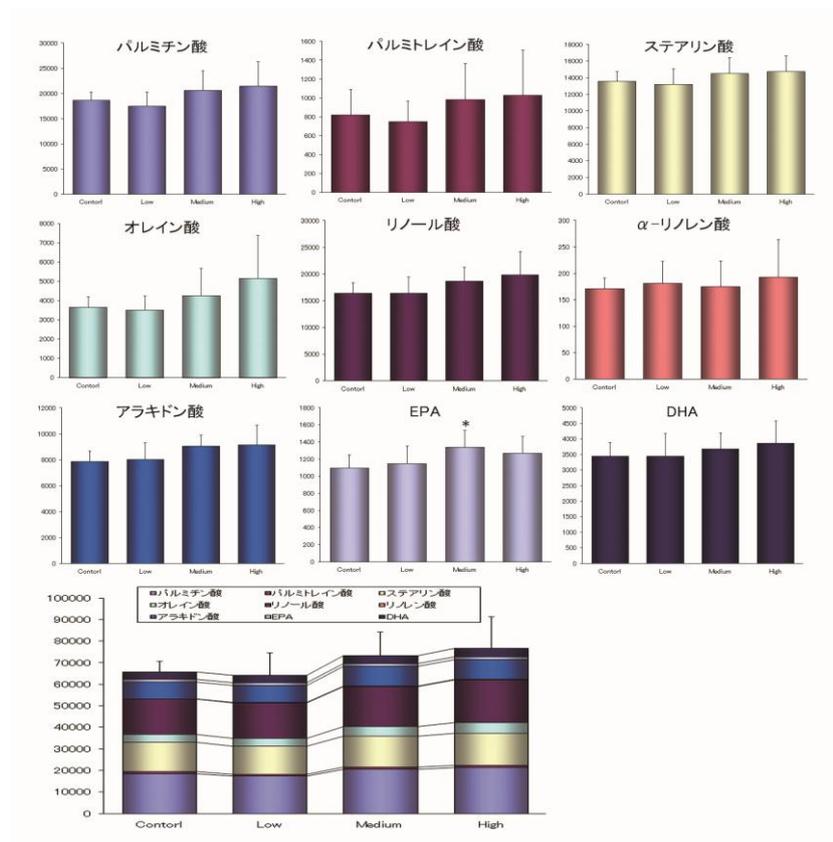
酸のパルミトレイン酸は血漿中、肝臓中ともに統計学的に有意な結果は見られなかった。しかし、低濃度曝露により血漿中のパルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸ともに減少する傾向が見られた。一方、肝臓中では曝露濃度依存的に上昇する傾向が観察された。ステアリン酸の代謝物である ω -9系不飽和脂肪酸オレイン酸の血漿中濃度は低濃度曝露群で有意な減少が観察された。肝臓中のオレイン酸はパルミチン酸、パルミトレイン酸、ステアリン酸同様に曝露濃度依存的に上昇する傾向が見られたが、有意差は見られなかった。

必須脂肪酸の1つである ω -6系不飽和脂肪酸のリノール酸は低濃度曝露群で血漿中の濃度が減少していたが、その代謝物であるアラキドン酸に変化は見られなかった。 ω -3系の必須脂肪酸である α -リノレン酸は血漿において曝露群全てで有意な低下を示したが、その代謝物エイコサペンタエン酸（EPA）は低濃度群のみ低下、ドコサヘキサエン酸（DHA）はどの群でも有意差は見られなかった。一方、肝臓中では、中濃度曝露のEPA群で有意に上昇をしていたが、それ以外有意差は見られなかった。

測定した脂肪酸全ての合計をみると、有意ではないが、血漿中で低濃度曝露群が低下傾向、肝臓中では濃度依存的に増加傾向を示した。



図(2) - 10 血漿脂肪酸分画。平均 \pm 標準偏差 (単位は $\mu\text{g/ml}$) *Significant different from control group ($p < 0.05$)



図(2)-11 肝臓中脂肪酸分画。平均±標準偏差(単位は $\mu\text{g/g}$)*Significant different from control group ($p < 0.05$)

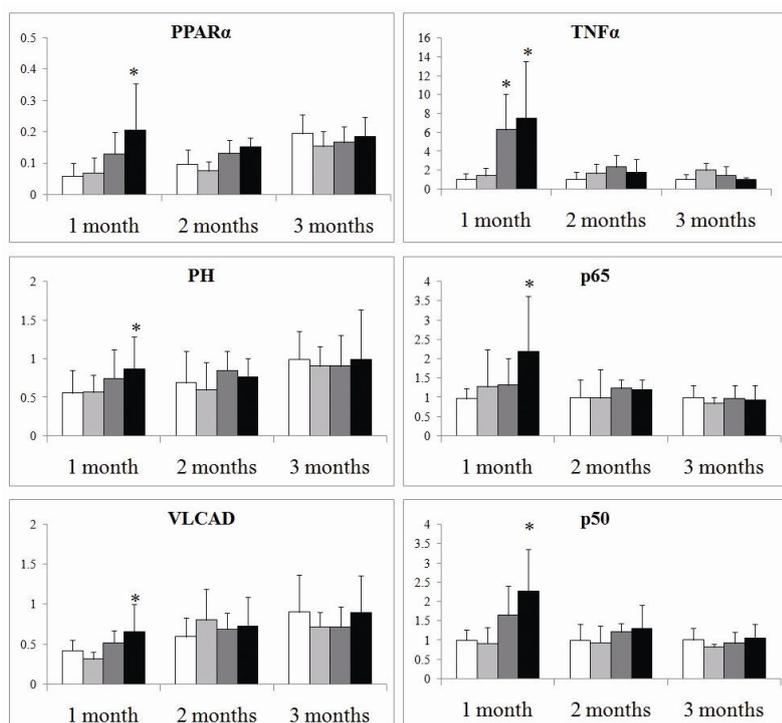
(4) 肝臓の分子生物学的検査

1) 定量リアルタイムPCR

a. 1～3ヶ月曝露ラット

i. 肝臓のPPAR α とその標的遺伝子、およびTNF α のmRNA発現量

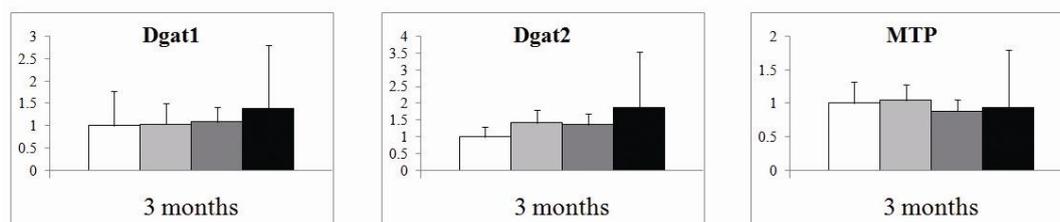
1ヶ月の高濃度曝露群でPPAR α の上昇が認められた。また、PPAR α の標的遺伝子であり、脂質代謝に関与する酵素 VLCAD、PHも同様に1ヶ月の高濃度曝露群で上昇していた。2ヶ月、3ヶ月後は変化が見られなかった。PPAR α による抗炎症作用の標的となるNF κ Bに関しては、p50, p65の両サブユニットともに1ヶ月の高濃度曝露群で上昇が見られたが、2ヶ月、3ヶ月曝露後は変化が見られなかった。炎症マーカーであるTNF α は1ヶ月の中濃度、高濃度曝露群で有意に上昇していたが、2ヶ月、3ヶ月曝露後は変化が見られなかった(図(2)-12)。



図(2)-12 肝臓の PPARα とその標的遺伝子と TNFα の mRNA 発現量。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較)。1ヶ月曝露 Control 群の発現量を 1.0 として表した。

ii. 肝臓の TG 合成と運搬に関わる物質の mRNA 発現量

3ヶ月曝露後に血中ならびに肝臓中の TG 量が増加していることから、TG 合成に関わる Dgat 1, 2 と、TG の運搬に関わる MTP の mRNA 量を 3ヶ月曝露後の肝臓を用いて調べた。いずれも有意な変化は認められなかった (図(2)-13)。

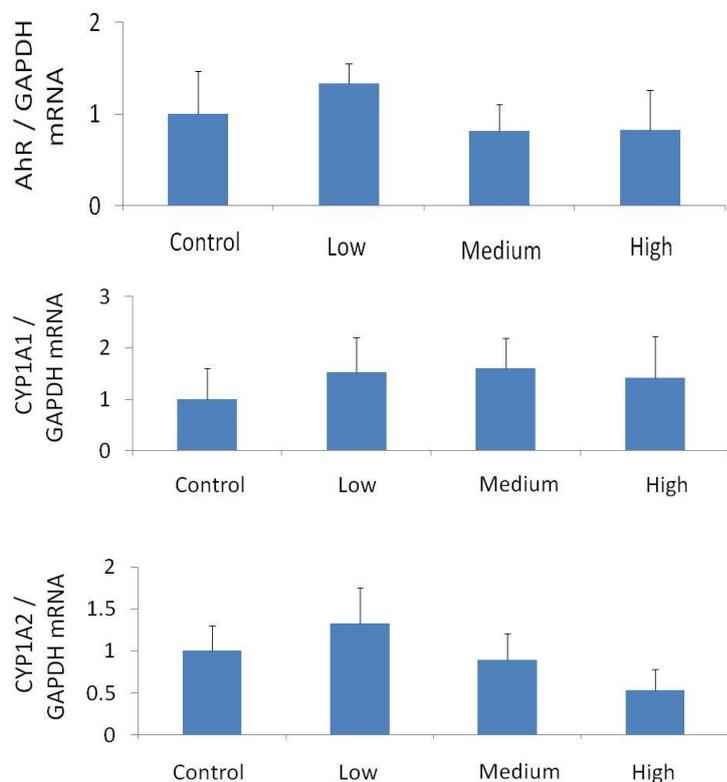


図(2)-13 3カ月曝露ラットの肝臓中の TG 合成と運搬に関わる物質の mRNA 発現量。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。Control 群の発現量を 1.0 として表した。

iii. AhR とその標的遺伝子の mRNA 量

ディーゼル排気ガス中には芳香族炭化水素が多く含まれるため、その標的となる AhR, について炎症の観察された 1ヶ月曝露の肝臓で調べた (図(2)-14)。AhR とその標的となる CYP1A1,

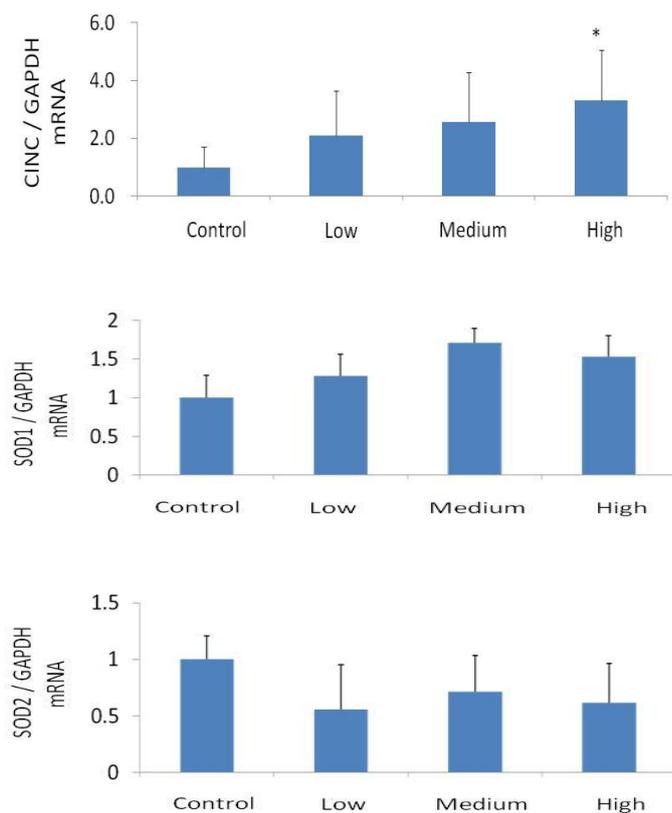
CYP1A2 ともに変化が見られなかった。



図(2)-14 1ヶ月曝露ラットの AhR とその標的遺伝子の mRNA 発現量。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。Control 群の発現量を 1.0 として表した。

iv. 酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 量

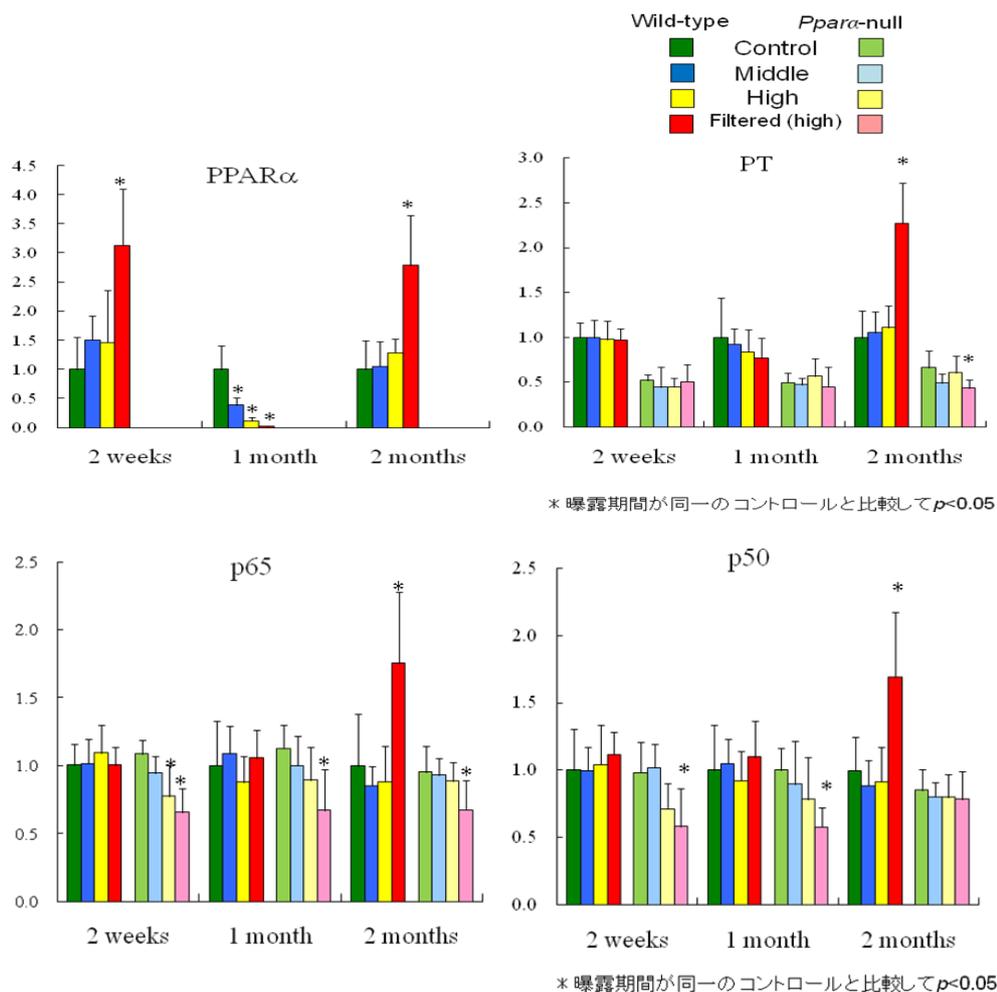
炎症の見られた 1 ヶ月曝露の肝臓で酸化ストレス関連遺伝子について調べた (図(2)-15)。好中球走化因子である CINC が高濃度曝露群で有意に増加していた。スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) 1, 2 については変化が見られなかった。



図(2)–15 一ヶ月曝露ラットの酸化ストレス関連遺伝子の mRNA 発現量。グラフは平均 ± 標準偏差を示す。コントロール群の発現量を 1.0 として表した。* $p < 0.05$ (コントロールと比較)

b. 2週～2ヶ月曝露マウス

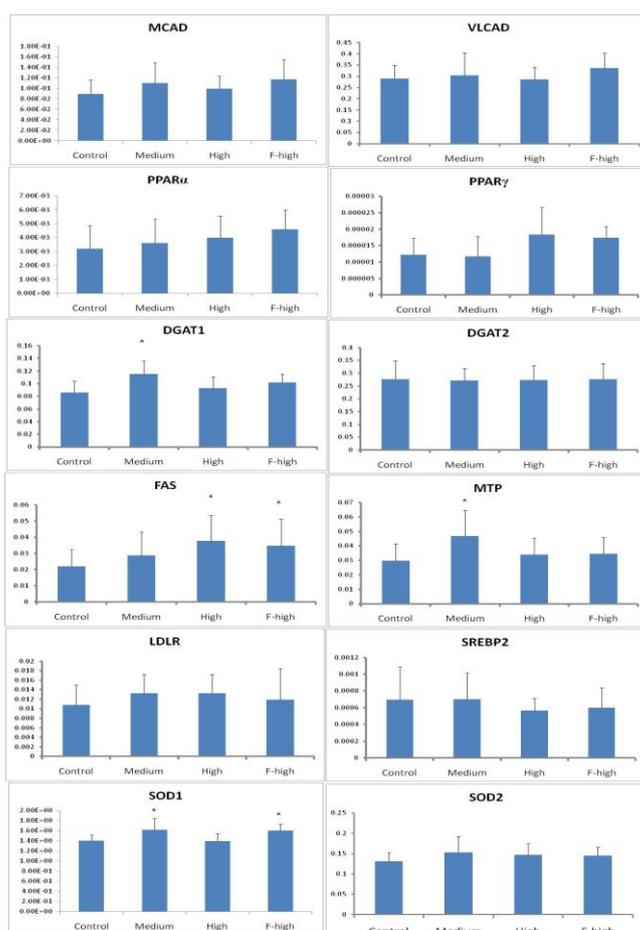
野生型マウスのPPAR α は2週間と2ヶ月の除粒子曝露群で有意に上昇していたが、1ヶ月では有意に減少していた(図(2)–16)。PPAR α の脂質代謝の標的遺伝子であるPTは2ヶ月の除粒子曝露群で上昇し、*Ppar* α -nullマウスの除粒子曝露群では減少していた。炎症に関わるNF κ B p50, p65は2ヶ月曝露の野生型の除粒子曝露群でのみ有意に上昇していた。一方*Ppar* α -nullマウスでは、2ヶ月曝露のp50を除いたすべての曝露期間において、除粒子曝露群でNF κ B p65とp50 mRNAが有意に減少していた。



図(2)－16 2週間～2ヶ月曝露マウスのPPAR α とその関連遺伝子発現の変化

c. 1～3ヶ月曝露マウス

PPAR α 、PPAR γ 、そしてPPAR α の標的遺伝子のMCAD、VLCAD-mRNAはNRDE、F-DE曝露による統計学的に有意な変化は見られなかったが、PPAR α は除粒子曝露群で、PPAR γ は高濃度曝露群、除粒子曝露群で上昇傾向が見られた(図(2)－17)。中濃度、高濃度曝露により脂肪酸合成に関わるFAS-mRNAが上昇し、中濃度曝露群のみで肝臓から血中にTGを排泄するMTPとTGの合成に係るDGAT1-mRNAが上昇していた。LDL-R、SREBPには変化は見られなかった。SOD1は中濃度曝露、除粒子曝露により上昇していたが、SOD2-mRNAは変化が見られなかった。

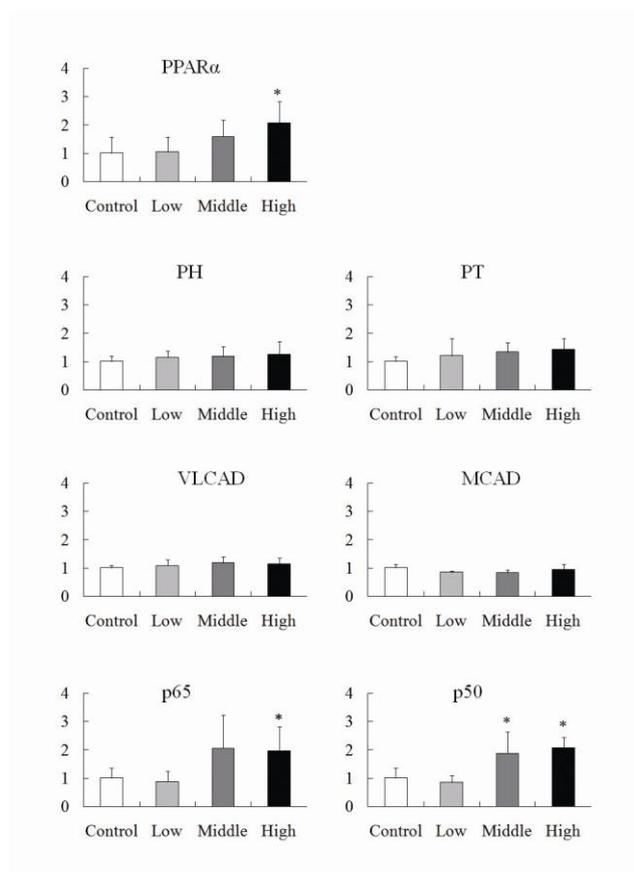


図(2)-17 1ヶ月曝露ラットの定量リアルタイムPCRの結果

2) ウェスタンブロット

a. 1ヶ月曝露ラット

mRNA量に変化のあった1ヶ月曝露後の肝臓を用いてタンパク発現量を測定した。mRNA同様、PPAR α は高濃度曝露群で有意な増加が見られた。また、核内のNF κ B p50, p65の発現に関してもp50では中濃度、高濃度曝露群で、p65では高濃度曝露群で有意な増加が見られた。一方PPAR α の標的遺伝子であり、脂質の β 酸化に関わるPH, PT, VLCADはいずれも変化が見られず、mRNAとは異なっていた(図(2)-18)。

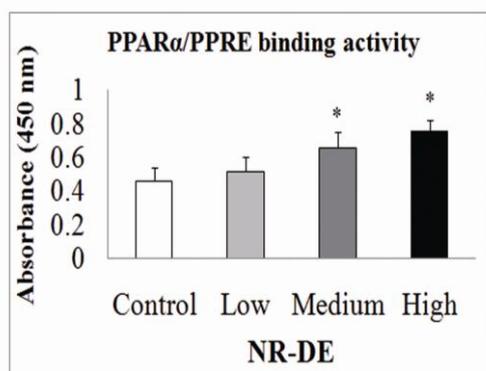


図(2)-18 1ヶ月曝露ラットの肝臓の PPAR α とその標的遺伝子のタンパク発現量。グラフは平均 \pm 標準偏差を示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。* $p < 0.05$ (同曝露期間のコントロールと比較) Control 群の発現量を 1.0 として表した。

3) PPAR α /PPRE 結合試験

a. 1ヶ月曝露ラット

1ヶ月曝露ラットの肝臓中の PPAR α の PPRE への結合を測定した。中濃度、高濃度曝露群で有意に結合が増加していた (図(2)-19)。



図(2)-19 1ヶ月曝露ラットの肝臓中の PPAR α の PPRE 結合能。グラフは平均 \pm 標準偏差を

示す。白がコントロール、薄い灰色が低濃度、濃い灰色が中濃度、黒が高濃度群を示す。 $*p<0.05$ （コントロールと比較）

4) DNAマイクロアレイによる網羅的解析

a. 1～3ヶ月曝露マウス

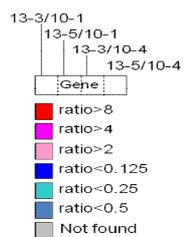
i. パスウェイ解析、クラスター解析

Z score値を基にパスウェイのランキング化を行った結果、エイコサノイド合成、PG合成・制御、脂肪酸生合成、コレステロール生合成、概日リズム、アンドロゲン受容体シグナル、細胞周期、G1→S期細胞制御、ヘッジホッグシグナル、脂質代謝や毒性に關与する核内受容体、ステロイド生合成経路が抽出された(表(2)－3)。脂肪酸やコレステロール、ステロイドの合成、エイコサノイド合成、PG合成・制御、それらに關与する核内受容体といった脂質ホメオスタシスの攪乱が見られていることが注目される(図(2)－20～26)。その他の注目遺伝子としては、これまでにNRDE曝露によって上昇が確認され、脂質代謝や抗炎症作用に關与するペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体(PPAR) α は、本実験の結果は1.2-1.5倍程度の軽度の上昇であった。

表(2)－3 パスウェイ解析により抽出された経路

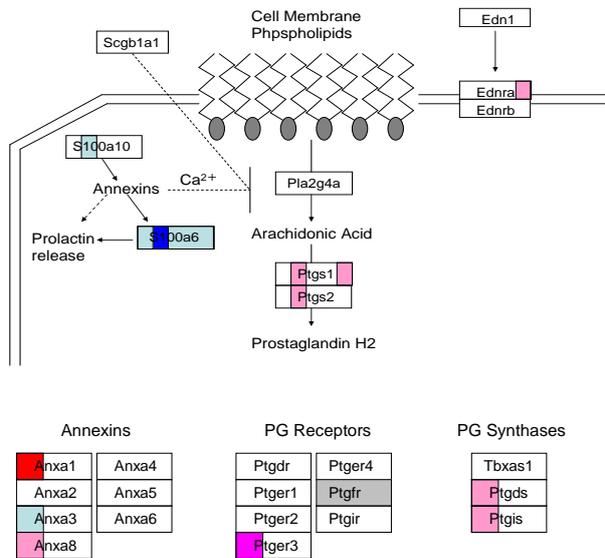
	13-3/10-1	13-5/10-1	13-3/10-4	13-5/10-4
Up	・脂肪酸生合成	・アンドロゲン受容体シグナル ・細胞周期 ・G1→S期細胞制御 ・ヘッジホッグシグナル	・細胞周期 ・ステロイド生合成	なし
Down	・エイコサノイド合成 ・PG合成・制御	・コレステロール生合成 ・概日リズム ・PG合成・制御	・脂質代謝や毒性に關与する核内受容体	・コレステロール生合成

高濃度 NRDE 曝露群 13-3, 5 と対照群 10-1, 4 とを比した結果である。



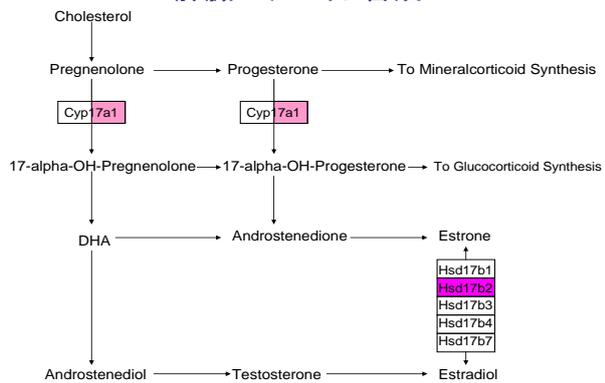
図(2)－20 パスウェイ解析結果の見かた（高濃度曝露群：13-3, 13-5とコントロール群：10-1, 10-4の比）

肝臓プロスタグランジン合成・制御



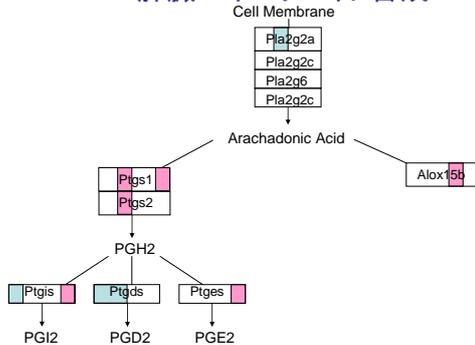
図(2)-21 肝臓PG合成・制御経路

肝臓ステロイド合成

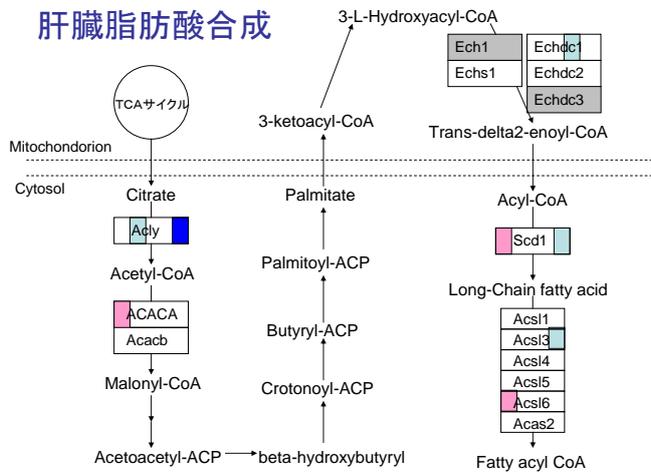


図(2)-22 肝臓ステロイド合成経路

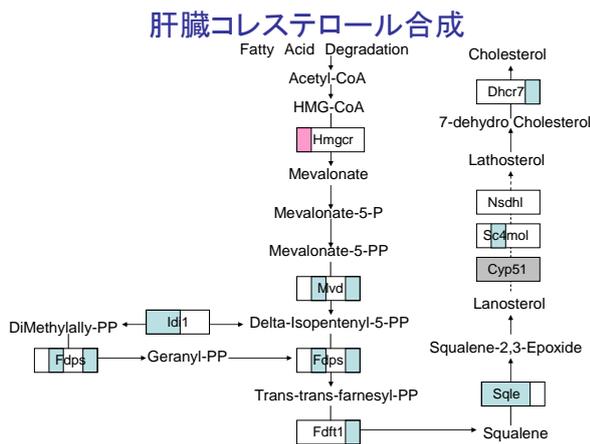
肝臓エイコサノイド合成



図(2)-23 エイコサノイド合成経路

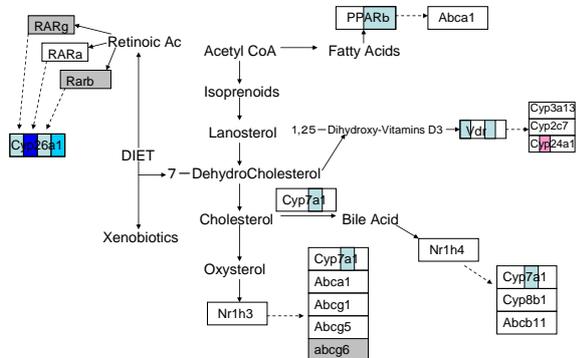


図(2)-24 脂肪酸合成経路



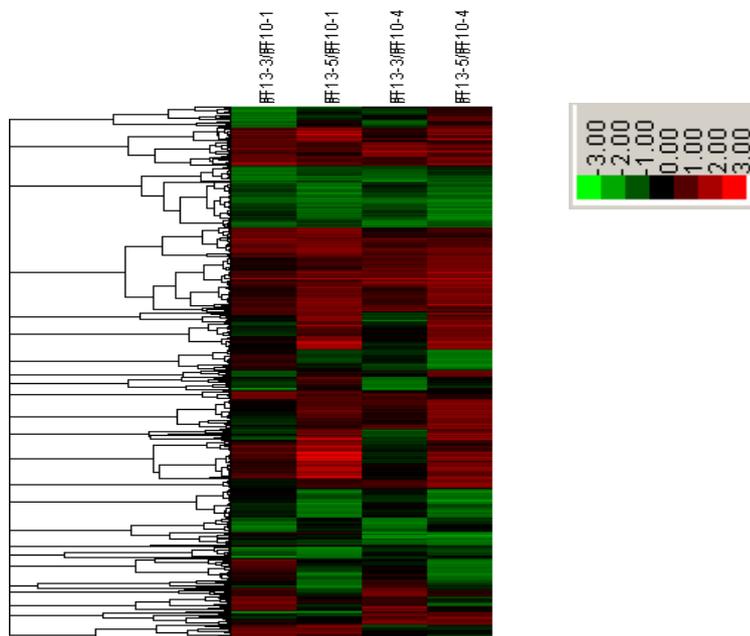
図(2)-25 肝臓コレステロール合成

脂質代謝や毒性に関する核内受容体



図(2)-26 脂質代謝や毒性に関する核内受容体経路

クラスター解析を行い、上昇した遺伝子は3つに、低下した遺伝子は4つに大別された（図(2)－27）。機能がまだ解明されていない遺伝子も含まれているが、クラスタリングされた結果から同じ挙動を示す遺伝子であるとの推測が可能となった。



図(2)－27 クラスタ解析の結果

ii. 総合的解析

定量的リアルタイムPCRの結果をDNAマイクロアレイの結果と共に以下、図(2)－28～31に示す。DNAマイクロアレイの結果は、高濃度NR-DE群2匹と新鮮空気群2匹の4通りの組み合わせを示している。

リン脂質からのアラキドン酸産生に關与するホスホリパーゼA2 group 4aは中濃度曝露群で上昇していた（図(2)－28）。同様に、アラキドン酸からPGH₂を合成する*Ptgs-1*は高濃度群で、*Ptgs-2*は中濃度群で上昇していた。一方、アラキドン酸合成酵素を抑制するannexinと相互作用する*s100 protein*は中濃度群で上昇していたが、*Annexin1*は高濃度曝露群で減少していた。

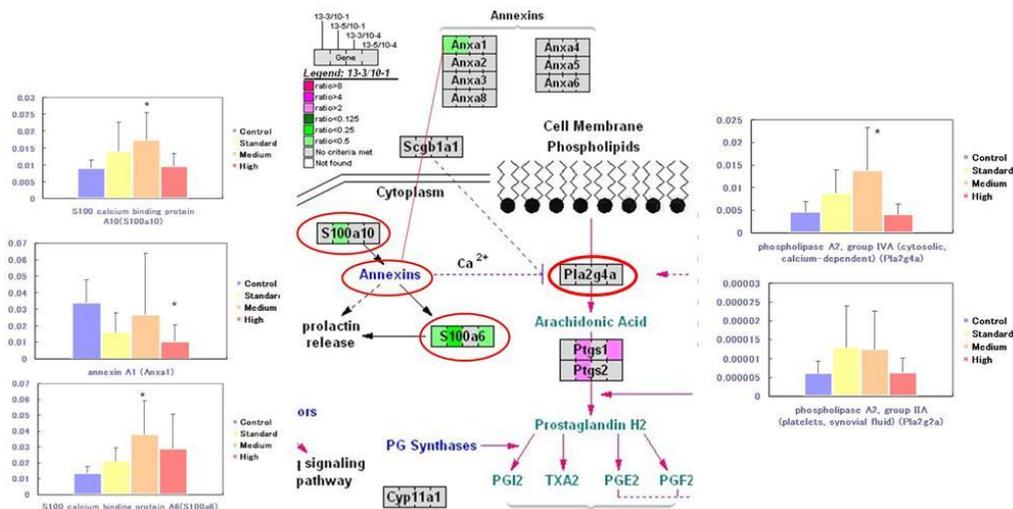
PGH₂からPGI₂, D₂, E₂の合成酵素は、DNAマイクロアレイの結果では一定の結果が見られなかったが、定量的リアルタイムPCRの結果、I₂の合成酵素*Ptgis*、D₂の合成酵素*Ptgds*、E₂の合成酵素*Ptges*ともに有意な変化は見られなかった（図(2)－29）。しかし、PGE受容体サブタイプ3は中濃度曝露群で上昇していた。

アラキドン酸からシクロオキシゲナーゼ系ではなくリポキシゲナーゼへの経路はDNAマイクロアレイの結果、ほとんど動いていなかったが、精巢で変化のあった一部のmRNAの測定を行った（図(2)－30）。*Alox15*, *Tgm2*ともに変化は見られなかった。

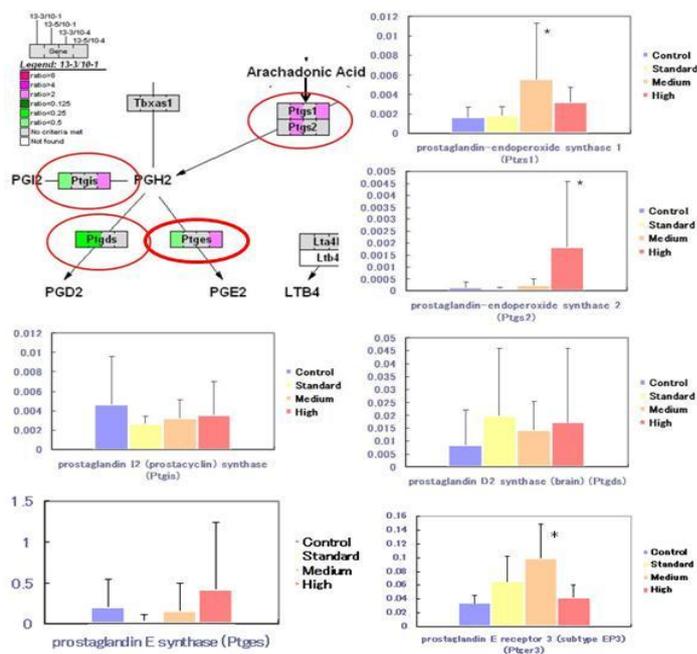
DNAマイクロアレイの結果、NRDE曝露により肝臓で非常に強い変化が見られたのは、*Cyp26a1*と*Hsd17β2*であったため、これらのmRNA発現量の測定を行った（図(2)－31）。*Cyp26a1*はDNAマイクロアレイのように強い減少は観察されなかったが、高濃度群で低下傾向を示した。一方、*Hsd17β2*は、中濃度、高濃度曝露群で有意に上昇していた。また、これまでにNR-DEおよび除粒子曝露で誘導が確認されているペルオキシゾーム増殖剤活性化受容体の、他のサブタイプである*Pparβ*-mRNA

は変化が見られなかった。

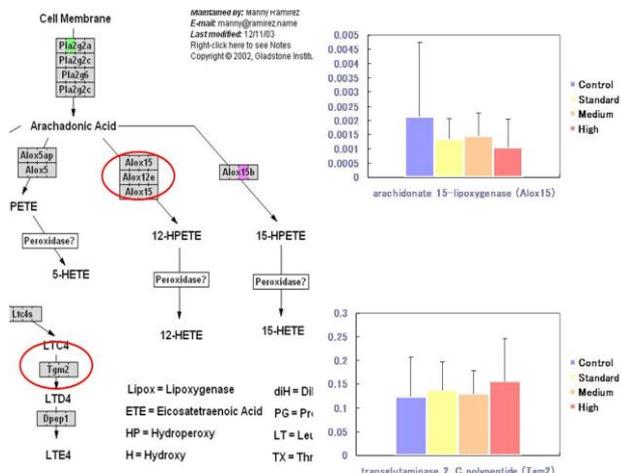
以上をまとめると、定量リアルタイムPCR解析の結果、*Pla2g4a*, *S100a10*, *S100a6*, *Ptgst1*が中濃度群で上昇、*Ptgst2*は高濃度で上昇、*Annexin A1*が高濃度で減少、*Hsd17β2*が中濃度、高濃度で上昇していた。肝臓ではリン脂質からPGH₂の産生する経路が亢進していることが明らかになったが、その下流の明らかな変化は見られなかった。



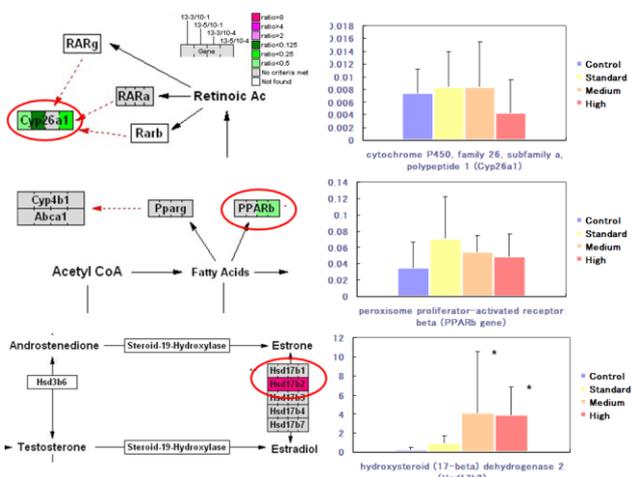
図(2)-28 phospholipase A2とその制御に関わるmRNA



図(2)-29 PG産生に関わるmRNA



図(2)-30 リポキシゲナーゼ経路のmRNA



図(2)-31 その他、注目のmRNA

(5) 全体のまとめと考察

本実験では、NRDE曝露により肝臓の炎症が引き起こされることが明らかとなった。ナノ粒子は大きい粒子に比べ血流に入りやすいことや、表面積が大きく様々な毒性物質を凝縮して運べるという性質¹⁾などから、肝臓などの全身の臓器に影響を及ぼすと考えられている²⁾。しかし、これまでにディーゼル排気ガス曝露により気道や肺で炎症が観察されるという報告は多数みられるが^{8),9)}、肝臓での炎症に着目した論文はほとんどない。その理由の一つは、粒子が凝集しやすくナノ粒子のまま曝露することが難しいことにあると考えられる。国立環境研究所のNRDE曝露施設は、粒子の大部分がナノ粒子の状態では曝露をすることが可能であり¹⁰⁾、それにより肝臓に影響が見られたのではないかと考えられる。

本研究では、肝臓での炎症は中濃度群から観察された。ディーゼル使用車ならびにバスからのPM_{2.5}曝露は73 μg/m³と見積もられている¹¹⁾。中濃度群はその濃度を下回っており、現実的にヒトの曝露が考えられる濃度である。ただし、実際の環境中でナノ粒子は多く観察されるが、一部は凝集しPM₁₀等の比較的大きな粒子も含んだ状態で存在する。したがって、ヒトはナノ粒子として曝露されることは少ないので、今回ラットで観察された肝臓障害がヒトでも観察されるかど

うかは、現時点では結論付けることはできない。しかし重量濃度で現在の環境基準値と同程度のナノ粒子曝露が今まで注目されることがなかった肝障害を誘発するという新たな知見は注目すべきであろう。

本研究の結果から炎症は肝臓の NFκB を介していると考えられる。ディーゼル排気微粒子 (DEP) 曝露後の NFκB の上昇は肝臓では報告されていないが、ヒトの気道等で報告されている¹²⁾。DEP 曝露により肺胞マクロファージでは NFκB を介して TNFα を誘導することが報告されているが¹³⁾、肝臓でも同様に NFκB の誘導により TNFα が上昇したと考えられる。

ディーゼル排気ガス曝露により肝臓中の PPARα が誘導される報告は初めてである。核内受容体 PPARα は NFκB の核内移行を抑制し抗炎症作用を発揮する¹⁴⁾。しかし本研究では PPARα の上昇は見られたが、NFκB も 1 ヶ月曝露時に上昇が見られた。この理由は今のところ不明である。一方ディーゼル排気ガス中には多種類の芳香族炭化水素が含まれているが、今回の結果では芳香族炭化水素の受容体である AhR やその標的遺伝子の発現量には変化は見られなかった。AhR はサイトカインを誘導することによって炎症を引き起こすが¹⁵⁾、PPARα は AhR の発現量を増加させるが、AhR の炎症作用を抑える働きを有している¹⁶⁾。今回の結果では、AhR の発現量も増えておらず、また抗炎症作用も見られていない。このような観点から考えても、PPARα が機能していないかもしれない。ただ、ベンゾピレンなどの芳香族炭化水素によるサイトカイン TNFα の上昇は AhR ではなく Extracellular signal-regulated protein kinase (ERK) を介しているとの報告¹⁷⁾もあり、今後 ERK についても検討が必要である。

PPARα は β 酸化酵素の誘導を介して脂質代謝を亢進させることが知られている¹⁸⁾。また、PPARα の標的遺伝子は mRNA では上昇が見られたが、タンパク量では変化が見られなかった。3 ヶ月曝露後には血中、肝臓ともに TG の上昇が見られたが、TG 合成酵素である Dgat には変化が見られなかった。db/db マウスにディーゼル排気ガスを曝露した実験においても新鮮空気を曝露したものに比べ肝臓中の脂肪肝の程度は上昇傾向にあるが統計的に有意ではなかった¹⁹⁾。この実験では血漿中の TG の上昇は見られていないが、肝臓中の TG は測定しておらず、肝臓中の脂肪肝が TG によるものかどうかはわからなかった。

以上をまとめると、NRDE 曝露により肝臓で炎症と脂質の蓄積が見られた。NRDE 曝露は AhR ではなく PPARα を誘導した。しかし PPARα の抗炎症作用は見られなかった。

続いて、マイクロアレイの結果では、全ての組み合わせで 1.2-1.5 倍程度の軽度の上昇であった。しかし、*Ppar α*-null マウスを用いた実験結果より、NRDE の肝毒性において PPARα は曝露期間により反応が異なる (1 又は 3 か月後は NRDE や F-DE 曝露により誘導しているが、2 か月では抑制されている)。しかしながら、野生型で見られた影響が *Ppar α*-null マウスでは観察されておらず、PPARα は重要であることが示唆される。

今回パスイ解析で抽出されたエイコサノイド合成経路や PG 合成経路、脂肪酸生合成は内因性の PPAR のリガンドの生成経路であり、長鎖脂肪酸やエイコサノイドは PPAR のすべてのサブタイプのアゴニストとして働くことが報告されている⁸⁾。ラットに NRDE を 1, 2, 3 ヶ月曝露したところ、1 ヶ月では炎症が観察されたが、2 ヶ月以降は炎症が抑えられている (22 年度報告書)。今回のマイクロアレイはこの 1 ヶ月の肝臓を用いており、このような内因性の PPAR のリガンドの合成が炎症を抑えるのに働いた可能性がある。今後は NRDE 曝露の内因性のリガンドへの影響を測定を行う必要がある。また、アラキドン酸から PGH₂ の合成が促進していること、アラキドン酸合成酵素

を抑制するannexinが減っていることからアラキドン酸が一つのマーカーになる可能性が考えられる。

F-DE曝露においてもNRDE同様PPAR α が1又は3か月後誘導、2か月後は抑制されていることから、ガス成分にPPAR α に作用する物質が存在することが示唆される。このような外因性のPPARのリガンドに加え、内因性のPPARのリガンド生成の攪乱により、脂質の代謝が抑えられ、長期曝露時の脂質の蓄積につながったと考えられる。

また、血中のテストステロンの上昇の結果と照らし合わせた際、肝臓でのコレステロール合成は低下していたが、プロジェステロンから17 α OHプロジェステロンへの変換酵素CYP17a1の上昇が見られたことが、精巣だけではなく、血中のテストステロン上昇につながっているかもしれない。エストロンとエストラジオールの間の変換酵素であるHSD17 β 2が強く誘導されていたことも注目される。

以上から、NRDE曝露、除粒子曝露ともに脂質ホメオスタシスを攪乱させ、TGやT-chol濃度を上昇させることが明らかとなった。今後マイクロアレイで変化のあった他の経路についても検討が必要である。

DEP曝露によってPGが産生されることは、過去にいくつか*in vitro*での報告がある。ヒト肺胞上皮細胞A549でCox, PGE₂の上昇 (Ahn et al., 2008)、肺のマクロファージでアラキドン酸、PGE₂の産生上昇 (Beck-Speier et al., 2005) というように炎症に関与しているという報告がある一方、ヒトの単球でのPGE₂産生を引き起こしLPS刺激による炎症に対して抗炎症作用を示す (Hofer et al., 2004)との報告もある。PGE₂, PGJ₂はTNF α を抑制する (Spengler et al., 1989; Petrova et al., 1999)ことから、NR-DE曝露1か月では見られた炎症が2、3か月曝露後では見られなかったところにPGが関与しているかもしれない。

このように、DEPとの関係が示唆されているPGは主にPGE₂である。しかし今回はPGE₂の合成酵素のmRNA発現は個体差が大きく、NR-DEによる誘導は観察されなかった。一方、PGEの受容体が中濃度で有意に上昇していた点は注目される。NR-DEによるこれらのPG合成・制御への影響は今後も検討する必要があると思われる。

本研究で高濃度NRDEによる低下が観察された *Annexin 1* は細胞質ホスホリパーゼA2 (cPLA2 α)に直接結合して活性を阻害すると考えられている (Kim et al., 1994)。また、炎症細胞のアポトーシスを促進することが報告されているため (Parente and Solito, 2004)、*Annexin 1*の低下は1か月曝露後に観察された肝臓の炎症に寄与していると思われる。本研究で調べた *Annexin 1* は s100a6 と s100a11 に結合するが、s100a10 は *Annexin 2* に結合することから (Streicher et al., 2009)、*Annexin 2* も変化しているかもしれない。

脂肪酸への影響については、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、 α -リノレン酸、アラキドン酸、**ドコサテトラエン酸**、**ドコサペンタエン酸**とDHAが、1日5時間、週1回、16週間、2mg/m³のDEPを曝露した雄Wistar Kyotoラットの心臓のミトコンドリア画分中で報告されているのみである (Kodavant et al., 2011)。この研究では、酸化ストレスにより心臓ミトコンドリア膜の不飽和脂肪酸の組成が変わったのではないかと考察している。一方、DE曝露により、肺組織のホスファチジルコリンへのパルミチン酸の取り込みが促進することが報告されている (Wright, 1986)。本研究でも、血漿中の脂肪酸はNRDE曝露により低下を示したのに対して、肝臓中での脂肪酸量が増加傾向であったことは、このような肝臓への取り込みの促進によるものかもしれない。

また、DEではないが、DEに含まれる1-ニトロピレンは stearoyl-CoA desaturase 1 の活性を低下させ、脂質ホメオスタシスを攪乱していることが示唆されている (Podechard et al., 2011)。本研究でも、stearoyl-CoA desaturase 1 の代謝物であるオレイン酸は血漿中で低下している。

本研究で最も大きく低下していた脂肪酸は α -リノレン酸であった。 ω -3 系/ ω -6 系の比率が低下すると、アラキドン酸カスケードで炎症に進むことが明らかになっている (Valenzuela and Videla, 2011)。また、魚油摂取による ω -3 系の EPA と DHA の補給が浮遊粒子状物質による心拍変動を予防するということが報告されている (Romieu et al., 2005) ことから、NRDE 曝露による ω -3 系の α -リノレン酸、EPA の低下が、TNF α や IL-6 の上昇をもたらしていたかもしれない。

その他本研究では、*Hsd17 β 2* はマイクロアレイ同様の上昇が中濃度、高濃度で観察された。*Hsd17 β 2* は肝臓や胎盤などに存在し、テストステロンからアンドロステンジオンへ、またエストラジオールからエストロンへ酸化し、性ステロイドを生理的に不活性化させる酵素である (Labrie et al., 1997)。NRDE の曝露による血中のテストステロンの上昇に伴い増加したのではないかと考えられるが、高濃度でも上昇しており、更なる検討が必要である。

以上から、NRDE 曝露は脂質恒常性を攪乱させることが明らかになった。22 年度の研究において、NRDE、F-DE ともに、TG や T-choI 濃度を上昇させることが明らかとなっていることから、ガス成分が脂質恒常性を攪乱することが示唆される。また、血漿中の α -リノレン酸は、NRDE 曝露すべてで低下をしており、NRDE の影響バイオマーカーになる可能性が考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究の結果、これまでほとんど注目されてこなかった、NRDE 曝露による肝臓への影響の一端が明らかになった。今回使った曝露装置は世界でも類を見ない規模・精度のものであるために重要な科学的成果であると考えられる。

(2) 環境政策への貢献

ディーゼル排ガスの吸入が肝臓機能に影響をあたえることを示した研究成果であり、環境基準値よりはるかに低い 15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ の曝露相当の曝露でも肝臓の脂質量に変化をもたらすことが明らかとなった。同濃度は先行研究においてテストステロン濃度の有意な上昇が確認されているものと同じレベルのものであり、また今回の研究では粒子を除去したガス成分のみの曝露においても高濃度 NRDE 曝露群同様に肝臓の脂質の蓄積が観察されている。これらのことから、環境基準値と粒子規制を主とする排気ガス規制の見直しの検討が必要となるかもしれないが、その際の科学的知見として貢献できると考えられる。

6. 国際共同研究等の状況

Dr. Frank J Gonzalez (米国NIH) 核内受容体に関する専門知識の提供

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

< 論文 (査読あり) >

- 1) DH.RAMDHAN, Y.ITO, Y.YANAGIBA, N.YAMAGISHI, Y.HAYASHI, C.LI, S.TANEDA, AK.SUZUKI, G.WATANABE, K.TAYA, M.KAMIJIMA, T.NAKAJIMA: *Toxicology Letters*. 1(2-3):103-8 (2009).
“Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone.”
- 2) N. YAMAGISHI, Y.ITO, DH.RAMDHAN, Y.YANAGIBA, Y.HAYASHI, D.WANG, CM.LI, S.TANEDA, AK.SUZUKI, K.TAYA, G.WATANABE, M.KAMIJIMA, T.NAKAJIMA: *Inhal Toxicol*, accepted
“Effect of nanoparticle-rich diesel exhaust on testicular and hippocampus steroidogenesis in male rats.”
- 3) 伊藤由起、ラムダンドニヒクマツト、柳場由絵、山岸希、上島通浩、那須民江：日本衛生学雑誌 66(4)：638-642 (2011)
「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス曝露による肝臓への影響」
- 4) 山岸 希、伊藤由起、ラムダンドニヒクマツト、那須民江：日本衛生学雑誌 66(4)：634-637(2011)
「ディーゼル排気ナノ粒子のステロイド合成系への影響とメカニズム」

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）

特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>

特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) 伊藤由起、柳場由絵、山岸希、李春梅、種田晋二、鈴木明、上島通浩、那須民江：第79回日本衛生学会学術総会、北里大学、2009.3.29-4.1.
「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気曝露によるPPAR α を介した肝臓への影響」
- 2) Yuki Ito, Yukie Yanagiba, Doni Hikmat Ramdhan, Yumi Hayashi, Yufei Li, Akira K. Suzuki, Michihiro Kamijima, Tamie Nakajima: XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain, 2010.
“Mechanism analysis of nanoparticle-rich diesel exhaust induced liver damage in F344 rats”
- 3) 山岸希、伊藤由起、ラムダン・ドニヒクマツト、柳場由絵、河野泰秀、李春梅、鈴木明、種田晋二、上島通浩、那須民江：第79回日本衛生学会学術総会、北里大学、2009.3.29-4.1.
「ディーゼル排気ナノ粒子の精巣テストステロン合成系への影響 除粒子との比較」
- 4) Ramdhan Doni Hikmat、伊藤由起、柳場由絵、岡村愛、林由美、李春梅、種田晋二、鈴木明、上島通浩、那須民江：第79回日本衛生学会学術総会、北里大学、2009.3.29-4.1.
「成長ホルモンを介したディーゼル排気ナノ粒子のテストステロン合成への影響」
- 5) Doni Hikmat Ramdhan, Yuki Ito, Yukie Yanagiba, Nozomi Yamagishi, Yumi Hayashi, Akira K. Suzuki, Tamie Nakajima: XII International Congress of Toxicology, Barcelona, Spain,

2010.

“Nanoparticle-rich diesel exhaust-disrupted testosterone biosynthesis and metabolism might be mediated by growth hormone”

- 6) 山岸希、伊藤由起、Ramdhan Doni Hikmat、柳場由絵、林由美、内藤久雄、鈴木明、井上健一郎、那須民江：第80回日本衛生学会学術総会 2010/5/9-11（仙台）.
「ディーゼル排気ナノ粒子の海馬ステロイド合成系への影響」
- 7) Ito Y, Yanagiba Y, Ramdhan DH, Hayashi Y, Li Y, Suzuki AK, Kamijima M, Nakajima T: XII International Congress of Toxicology. July 19- 23, 2010. Barcelona, Spain.
“Mechanism analysis of nanoparticle-rich diesel exhaust induced liver damage in F344 rats” .
- 8) 伊藤由起、ラムダン ドニヒクマツト、柳場由絵、山岸 希、上島通浩、那須民江：第81回日本衛生学会総会若手プロジェクト研究助成ミニシンポジウム「ディーゼル排気ガス中のナノ粒子による健康影響－動物実験の知見から－」誌上発表(2011/3/26-28).
「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガス曝露による肝臓への影響」.
- 9) ラムダンドニヒクマツト、伊藤由起、柳場由絵、山岸 希、山元昭二、藤巻秀和、那須民江：第81回日本衛生学会総会 誌上発表(2011/3/26-28)
「ナノ粒子を含んだディーゼル排気ガスのマウス脂質恒常性への影響」.
- 10) Ramdhan DH, Ito Y, Yanagiba Y, Yamagishi N, Hayashi Y, Suzuki AK, Nakajima T: XII International Congress of Toxicology. July 19- 23, 2010. Barcelona, Spain.
“Nanoparticle-rich diesel exhaust-disrupted testosterone biosynthesis and metabolism might be mediated by growth hormone.”

(3) 出願特許

特に記載すべき事項はない。

(4) シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

(5) マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

(6) その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Akiyama K, et al. 1991. Particle size distribution of carbon component airborne particulate matter and estimation of source contribution in Tokyo. Annual Report of the Institute of Environmental Sciences. Tokyo: 71-77.
- 2) Baulieu EE. 1997. Neurosteroids: of the nervous system, by the nervous system, for the nervous system.

Recent Prog Horm Res 52:1-32.

- 3) De-Rosa M, et al. 2003. Traffic pollutants affect fertility in men. *Hum Reprod* 18:1055-1061.
- 4) Finkelstein M, Verma D. 2001. Exposure estimation in the presence of nondetectable values: another look. *Am Ind Hyg Assoc* 62:195-198.
- 5) Fujieda S, et al. 1998. Combined nasal challenge with diesel exhaust particles and allergen induces *In vivo* IgE isotype switching. *Am J Respir Cell Mol Biol* 19:507-512.
- 6) Fujitani Y, Hirano S. 2008. Health effects of nanoparticles and nanomaterials (II) methods for measurement of nanoparticles and their presence in the air. *Nippon Eiseigaku Zasshi* 63:663-669.
- 7) Fujitani Y, et al. 2009. Characterization of dilution conditions for diesel nanoparticle inhalation studies. *Inhal Toxicol* 21:200-209.
- 8) Gavett SH, et al. 2003. Met al., composition of ambient PM_{2.5} influences severity of allergic airways disease in mice. *Environ Health Perspect* 111:1471-1477.
- 9) Ghio AJ, et al. 2000. Concentrated ambient air particles induce mild pulmonary inflammation in healthy human volunteers. *Am J Respir Crit Care Med* 162:981-988.
- 10) Goh EH, Heimberg M. 1976. Effect of oleic acid and cholesterol on the activity of hepatic hydroxymethylglutaryl coenzyme A reductase. *FEBS Lett* 63:209-210.
- 11) Gong H Jr, et al. 2003. Controlled exposures of healthy and asthmatic volunteers to concentrated ambient fine particles in Los Angeles. *Inhal Toxicol* 15:305-325.
- 12) Gurgueira SA, et al. 2002. Rapid increases in the steady-state concentration of reactive oxygen species in the lungs and heart after particulate air pollution inhalation. *Environ Health Perspect* 110:749-755.
- 13) Hojo Y, et al. 2009. Comparison between hippocampus-synthesized and circulation-derived sex steroids in the hippocampus. *Endocrinology* 150:5106-5112.
- 14) Hutchison JS, Goldman BD. 1975. The relationship between the rate of testosterone infusion and gonadotropin secretion. *Endocrinology* 97:725-730.
- 15) Kimoto T, et al. 2001. Neurosteroid synthesis by cytochrome p450-containing systems localized in the rat brain hippocampal neurons: N-methyl-D-aspartate and calcium-dependent synthesis. *Endocrinology* 142:3578-3589.
- 16) Kimoto T, et al. 1997. Digital fluorescence imaging of elementary steps of neurosteroid synthesis in rat brain glial cells. *J Pharm Biomed Anal* 15:1231-1240.
- 17) Kittelson DB, et al. 2006. On-road and laboratory evaluation of combustion aerosols. Part 1: Summary of diesel engine results. *J Aerosol Sci* 37:913-930.
- 18) Li C, et al. 2007. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the suppression of adrenocortical function in immature male rats. *Biol Pharm Bull* 30:2376-2380.
- 19) Li C, et al. 2009. Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rats. *Inhal Toxicol* 21:803-811.
- 20) Mauderly JL. 2001. Diesel emissions: is more health research still needed? *Toxicol Sci* 62:6-9.
- 21) Ministry of the Environment, Government of Japan. Environmental Quality Standards in Japan—Air Quality. Available at: <http://www.env.go.jp/en/air/aq/aq.html>.
- 22) Miyabara Y, et al. 1998. Diesel exhaust enhances allergic airway inflammation and

- hyperresponsiveness in mice. *Am Respir Crit Care Med* 157:1138-1144.
- 23) Payne AH, 1990. Hormonal regulation of cytochrome P450 enzymes, cholesterol side-chain cleavage and 17 alpha-hydroxylase/C17-20 lyase in Leydig cells. *Biol Reprod* 42:399-404.
- 24) Ramdhan DH, et al. 2009. Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone. *Toxicol Lett* 191:103-108.
- 25) Riediker M, et al. 2004. Particulate matter exposure in cars is associated with cardiovascular effects in healthy young men. *Am J Respir Crit Care Med* 169:934-940.
- 26) Sakamoto H, et al. 2001. Effects of progesterone synthesized de novo in the developing Purkinje cell on its dendritic growth and synaptogenesis. *J Neurosci* 21:6221-6232.
- 27) Sakamoto H, et al. 2003. Dendritic growth and spine formation in response to estrogen in the developing Purkinje cell. *Endocrinology* 144:4466-4477.
- 28) Samet JM, et al. 2000. Fine particulate air pollution and mortality in 20 U.S. cities, 1987-1994. *N Engl J Med* 343:1742-1749.
- 29) Schumacher M, et al. 2003. Steroid hormones and neurosteroids in normal and pathological aging of the nervous system. *Prog Neurobiol* 71:3-29.
- 30) Smith SS, et al. 1987. Sex steroid effects on extrahypothalamic CNS. I. Estrogen augments neuronal responsiveness to iontophoretically applied glutamate in the cerebellum. *Brain Res* 422: 40-51.
- 31) Society of Toxicology in USA. 2008. Guiding Principles in the Use of Animals in Toxicology. Available at: <http://www.toxicology.org/ai/air/air6.asp>
- 32) Sydbom A, et al. 2001. Health effects of diesel exhaust emissions. *Eur Respir J* 17:733-746.
- 33) United States Environmental Protection Agency. 2006. United States Environmental Protection Agency, National Ambient Air Quality Standards (NAAQS) Available at: <http://www.epa.gov/air/criteria.html>
- 34) Watanabe N, Kurita M. 2001. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect* 109:111-119.
- 35) West LA, et al. 2001. Steroidogenic acute regulatory protein and peripheral-type benzodiazepine receptor associate at the mitochondrial membrane. *Endocrinology* 142:502-505.
- 36) Win-Shwe TT, et al. 2008. Spatial learning and memory function-related gene expression in the hippocampus of mouse exposed to nanoparticle-rich diesel exhaust. *Neurotoxicology* 29:940-947.
- 37) Yoshida S, Sagai M, et al. 1999. Exposure to diesel exhaust affects the male reproductive system of mice. *Int J Androl* 22:307-315.
- 38) Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74(1):1-8 (2001)
- 39) Delfino RJ et al. Potential role of ultrafine particles in associations between airborne particle mass and cardiovascular health. *Environ Health Perspect* 113(8):934-46 (2005)
- 40) Ito Y, et al: Di(2-ethylhexyl)phthalate induces hepatic tumorigenesis through a peroxisome proliferator-activated receptor α -independent pathway. *J Occup Health* 49, 172-182 (2007)
- 41) Ito Y, et al: Induction of peroxisome proliferator-activated receptor alpha (PPARalpha)-related enzymes by di(2-ethylhexyl) phthalate (DEHP) treatment in mice and rats, but not marmosets. *Arch*

Toxicol 81, 219-226 (2007)

- 42) Nakamura T, et al. Microgram-order ammonium perfluorooctanoate may activate mouse peroxisome proliferator-activated receptor α , but not human PPAR α . *Toxicology*, 265(1-2): 27-33 (2009)
- 43) Yanagiba Y, et al. Styrene trimer may increase thyroid hormone levels via down-regulation of the aryl hydrocarbon receptor (AhR) target gene UDP-glucuronosyltransferase. *Environ Health Perspect* 116(6):740-5 (2008)
- 44) Ramdhan DH, et al. Molecular mechanism of trichloroethylene-induced hepatotoxicity mediated by CYP2E1. *Toxicol Appl Pharmacol* 231: 300-307 (2008)
- 45) Desvergne B, Wahli W. Peroxisome proliferator-activated receptors: nuclear control of metabolism. *Endocr Rev.* 1999, 20(5):649-88.
- 46) Kittelson, D. B. Engine and nanoparticles: A review. *J. Aerosol Sci.* 29, 575-588 (1998)
- 47) Oberdörster G. Pulmonary effects of inhaled ultrafine particles. *Int Arch Occup Environ Health* 74(1):1-8 (2001)
- 48) Dong Z, et al. Secretory phospholipase A2-IIa is involved in prostate cancer progression and may potentially serve as a biomarker for prostate cancer. *Carcinogenesis*. 31(11):1948-55
- 49) Dix CJ, et al. Inhibition of steroid production in Leydig cells by non-steroidal anti-inflammatory and related compounds: evidence for the involvement of lipoxygenase products in steroidogenesis. *Biochem J.* 15;219(2):529-37.
- 50) Dias JA. Effect of transglutaminase substrates and polyamines on the cellular sequestration and processing of follicle-stimulating hormone by rat Sertoli cells. *Biol Reprod.* 35(1):49-58.
- 51) Miwa N, et al. S100-annexin complexes--biology of conditional association. *FEBS J.* 275(20):4945-55.
- 52) O'Connell PA, et al. S100A10 regulates plasminogen-dependent macrophage invasion. *Blood.* 19;116(7):1136-46
- 53) Surette AP, et al. Regulation of fibrinolysis by S100A10 in vivo. *Blood.* 118(11):3172-81
- 54) Leśniak W, Słomnicki ŁP, Filipek A. S100A6 - new facts and features. *Biochem Biophys Res Commun.* 390(4):1087-92
- 55) Langton S, Gudas LJ. CYP26A1 knockout embryonic stem cells exhibit reduced differentiation and growth arrest in response to retinoic acid. *Dev Biol.* 315(2):331-54.
- 56) Gupta. The role of prostaglandins in masculine differentiation: modulation of prostaglandin levels in the differentiating genital tract of the fetal mouse. *Endocrinology.* 1989, 124: 129-133
- 57) Zerani M, et al. In vitro effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on Leydig cells of adult alpaca (*Lama pacos*) testis: GnRH receptor immunolocalization, testosterone and prostaglandin synthesis, and cyclooxygenase activities. *Domest Anim Endocrinol.* 2011, 40(1):51-9.
- 58) Söderström M, et al. Novel prostaglandin D(2)-derived activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma are formed in macrophage cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1631(1):35-41.
- 59) Kowalewski MP, et al. Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in gonadal steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Reprod Fertil Dev.*

2009;21(7):909-22.

C-0901 ディーゼル排気ナノ粒子の脳、肝、腎、生殖器への影響

バイオマーカー創出・リスク評価

(3) ナノ粒子曝露のホルモン系への影響と新たなバイオマーカーの創出・リスク評価

東京農工大学

共生科学技術研究院

田谷 一善、渡辺 元

名古屋大学大学院

大学院医学系研究科環境労働衛生学

那須 民江

名古屋市立大学大学院

大学院医学研究科

伊藤 由起

平成21～23年度累計予算額：12,499 千円

(うち、平成23年度予算額：4,001 千円)

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】 二十数nm付近の粒径のナノ粒子を多く含んだディーゼル排気 (Nanoparticle-rich Diesel Exhaust Particle: NRDE) の垂急性および3～12カ月曝露がマウス・ラットの生殖・内分泌系に与える影響を検証した。NRDEは、実験動物の精巣ライディヒ細胞・下垂体前葉細胞のホルモン分泌機能に影響する内分泌攪乱作用を有することがうかがわれた。またナノ粒子と除粒子ガス成分では、ステロイドホルモン分泌細胞と蛋白質ホルモン分泌細胞への作用が異なるものと推察された。NRDEに曝露された雄マウスで精巣ライディヒ細胞からのテストステロン分泌量が増加するメカニズムを調べた結果、分泌増加作用は下垂体からの性腺刺激ホルモン分泌を介するものではなく、精巣のライディヒ細胞への直接作用であると推察された。いっぽう、ライディヒ細胞からのテストステロン分泌抑制メカニズムは不明であった。さらに、NRDE曝露後の雄ラット精巣を用いてDNAマイクロアレイ解析を行なったところ、アラキドン酸カスケードの変化が観察された。

【キーワード】 ディーゼル排気ガス、全身吸入曝露、ナノ粒子、性腺、副腎

1. はじめに

ディーゼル排気微粒子 (DEP) は大気汚染の主要成分であり、これらの中には粒径が50nm以下の粒子も含まれている。これらのナノ粒子は非常に微小なために生体内への移行が容易で、重量あたりの表面積が大きいために生物組織への侵害作用が大きいことが懸念されるが、その生体影響の研究は非常に乏しく、わが国において緊急性の高い課題となっている。この研究の必要性に 대응するため、(独) 国立環境研究所では平成18年度よりナノ粒子を多く含むディーゼル排ガス (Nanoparticle-rich Diesel Exhaust: NRDE) DEの曝露実験を開始し、呼吸・循環器系、炎症・免疫系への影響解明に取り組み始めた。このような背景の下、我々は平成19, 20年度の環境技術開発等推進費で、ラットにNRDEを曝露し、生殖器・次世代影響とそのメカニズムに関する研究を行った。本研究では、これまで研究してきた生殖・次世代影響の研究をさらに深めるための詳細な内分泌学的・分子生物学的検査を実施し、さらにそれにとどまらず影響のバイオマーカー

一を創出し、それらのマーカーをNRDEの健康リスク評価、環境基準設定の際に参考となる知見として提唱することをめざした。

2. 研究開発目的

マウス・ラットを中濃度～高濃度NRDEに亜急性に曝露させて、雌雄別に内分泌・生殖器系機能への影響を調べる。階層的な支配関係にある内分泌・生殖器系の機能変化を系統だてて検証するために、マクロ観察から分子生物学的手法にいたるまでの各種検査を行なう。

3. 研究開発方法

(1) 曝露装置

すべての実験において、実験動物のナノ粒子への曝露は、独立行政法人国立環境研究所のナノ粒子健康影響実験棟内で実施した。詳細は、サブテーマ(1)の欄に記載した通りである。

(2) 実験動物

1) マウス

6週令のマウスを用いた。雄マウスはC57BL/6Jc1マウス(Charles River Japan、東京、日本)、雌マウスはBALB/cマウス(SLC)を使用した。

2) ラット

雌ラットは、妊娠したFischer系ラット(F344/DuCrIcRli)と離乳直後の21日齢の雌ラット(Wistar今道系)を使用した。

雄ラットは、7～8週齢のFischer系ラット(F344)を使用した。

(3) 曝露方法

1) マウス

マウスは、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群の4つの群に分けた。

a. 雄マウス

8週間の曝露を行なった。各群、8～9匹を用いた。

b. 雌マウス

曝露期間は3ヶ月、6ヶ月、12ヶ月とした。3か月曝露実験では、各群12匹(計48匹)、6か月曝露では各群12匹(計48匹)、12か月曝露では各群14匹(計56匹)を用いた。

2) ラット

a. 妊娠ラット

発情前期の夜に雄と交配して、膣スミア内に精子を認めた日を妊娠0日として、Iと同様の条件で、妊娠0日から20日間曝露を行なった。コントロール群、高濃度曝露群、除粒子曝露群の3群に分け、各群6匹のラットを使用した。

b. 仔ラット(雌)

1ヶ月の曝露を行なった。コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群の4つの群に分け、各群15匹ずつ用いた。Room control群は、チャンバーには入れずに同条件下で飼育した。曝露終了1日後に、東京農工大学に輸送した。輸送後は、プラスチックケージ（日本クレア、大阪、日本）に移動し、餌（日本農産工業、神奈川、日本）と水は自由摂取として飼育を継続させた。東京農工大学に到着後4日目～8日目で動物の処理を行なった。

c. 雄ラット

ラットはランダムにコントロール群（新鮮空気）、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群の4群に分け（8又は9匹/群）、1、2、3カ月の曝露を行った。

（4）生体試料の処理

1）臓器の摘出および処理

曝露終了後、ペントバルビタール麻酔下で心臓採血し、肝臓、脾臓、腎臓、副腎を採取し、重量を測定した。さらに雄動物の場合は、精巣、精巣上部、前立腺、精嚢腺を採取して重量を測定した。雌動物の場合は、卵巣、子宮、副腎、膣を採取し、重量を測定した。

採取した血液は、1700×gで15分、4℃の条件で遠心分離し、ホルモンアッセイまでの間-20℃で保存した。精巣、卵巣と子宮は、重量測定後、10%ホルマリン液に保存した。下垂体は、生理食塩水1mlが入ったプラスチックチューブに入れ、ホルモンの測定まで-20℃で保存した。一部のラットでは海馬を摘出し、冷凍保存した。

副腎細胞および精巣ライディヒ細胞、下垂体前葉細胞は、直ちに初代細胞培養を行った。

2）膣スメアおよび性周期判定

仔ラット（雌）の場合は、解剖前に膣スメアを採取した。膣スメアは、2000倍希釈をしたオスバン液を用いて、採取した。ステージの分類は、休止期は、上皮細胞の数が減り白血球があるもの、発情前期は、有核で円形の上皮細胞と角化細胞が存在し白血球がないもの、発情期は、多くの不整で核がない角化上皮細胞が多くあるものとした（Armenti et al.2008）。発情周期は、正常周期、持続発情、持続休止期、発情周期の延長したものに分類した（Franczak et al.2006）。正常発情周期は、休止期2日間と発情前期1日間と発情期1日間の4日間で周期が回帰するもの、持続発情は、発情期が5日間以上続くもの、持続休止期は休止期が5日間以上続くもの、発情周期の延長は、持続発情や持続休止期でなく5日間以上で1周期になるものとした。

（5）ホルモン・アッセイ

コルチコステロン及びプロジェステロン濃度の測定は、¹²⁵Iで標識したリガンドを使用した二抗体ラジオイムノアッセイ法を用いて行った。ステロイドホルモン、黄体形成ホルモン（LH）・卵胞刺激ホルモン（FSH）の測定は、¹²⁵I標識ホルモンを用いた二抗体法ラジオイムノアッセイ、もしくはEIAキット（Cayman社製）により行った。血清中のインヒビン測定には、当研究室で開発したbovine インヒビンのラジオイムノアッセイ系を用いて測定した。海馬中のプレグネノロン、プロジェステロン、17OH-プロジェステロン、アンドロステンジオン、テストステロン、エストラジオールは、あすか製薬に測定を依頼し、液体クロマトグラフィータンデムマススペクトロメトリ（LC/MS/MS）によって定量した。

(6) 初代細胞培養

副腎細胞の培養は、Jaroenporn ら (2007) の方法によった。培養副腎細胞に、副腎皮質刺激ホルモン (adrenocorticotropic hormone ; ACTH) を 0 、 10^{-15} ~ 10^{-10} M 加えた培養液を添加し、4 時間培養した後、培養液を回収し、コルチコステロンとプロジェステロンのアッセイまで -20°C で保存した。

ライディヒ細胞と下垂体前葉細胞の初代細胞培養は、常法に従って行った。

(7) 生殖器系の検査

1) 精子数の測定

片側精巣を生理食塩水中でホモジナイズし、スパームヘッドカウント法により精子数を測定した。

2) 卵管・卵巢の検査

発情期で採材した個体の卵管を、2枚のスライドガラスで挟み、実体顕微鏡を用いて、卵管内の卵の数を確認した。

常法でパラフィン包埋した卵巢は、回転式マイクロトーム (大和光機工業、埼玉、日本) で、厚さ $10\mu\text{m}$ で薄切し、スライドガラス (松浪硝子工業、大阪、日本) に載せ、連続切片を作製し、一晚 37°C で伸展させた。

発情前期で採材した個体の卵巢を各群 3 匹分 (計6卵巢) ずつ使い、1 個体が所有する胞状卵胞、閉鎖卵胞を観察した。各卵胞は、卵の核が見られたところで、長径と短径を測定し、その平均値をその卵胞の大きさとした。卵胞は、 $100\mu\text{m}$ 以上の二次卵胞、胞状卵胞、閉鎖卵胞を数えた。直径 $400\mu\text{m}$ 以上の卵胞を大型卵胞とした。また、閉鎖卵胞は、過去の研究 (Anne et al. 1978, Fernanda et al. 2008, Quinto et al. 1983, Andreu et al. 1998) を参考に、顆粒層細胞と卵細胞が残っているもので、 $200\mu\text{m}$ 以下で卵胞腔があるもの、卵胞が早期黄体化を起しているもの、卵胞腔内に5個以上の単独の顆粒層細胞が落下しているもの、顆粒層細胞層がうすくなっているもの、卵細胞が変形もしくは変性しているものとした。

休止期で採材した個体の卵巢を各群2匹分ずつ使い、1 個体が所有する二次卵胞、胞状卵胞、閉鎖卵胞、黄体の数を観察した。各卵胞は、卵の核が見られたところで、長径と短径を測定し、その平均値をその卵胞の大きさとした。

卵胞の分類は、原始卵胞は卵母細胞のみで周りを囲む上皮細胞がないもの、一次卵胞は卵母細胞を一層の卵胞上皮細胞が囲んでいるもの、二次卵胞は上皮細胞が重層化し、卵胞腔が形成されていないもの、胞状卵胞は卵胞腔が形成されているもの、成熟卵胞は卵丘が形成されているものとした。閉鎖卵胞は、顆粒層細胞と卵細胞が残っているもので、卵胞が早期黄体化を起しているもの、卵胞腔内に10個以上の単独の顆粒層細胞が落下しているもの、顆粒層細胞層がうすくなっているもの、卵細胞が変形もしくは変性しているものとした。

3) 胎子の検査

妊娠20日 (分娩前日) に摘出した胎子について、体重、体長およびペニス (雄) あるいはクリトリス (雌) から肛門までの距離を計測した。

(8) 精巣の分子生物学的検査

1) 定量的リアルタイムPCR

以下の物質のmRNAを定量した。

- 精巣内コレステロール生合成に関与する①3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) と②HMG-CoA reductase
- 精巣細胞内のコレステロール輸送に関与し、HDLとLDLの取り込みに重要な③Scavenger receptor class B type1 (SR-B1)、④LDL receptor (LDL-R)、⑤Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)、⑥ StAR
- テストステロン生合成に関与する⑦cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450_{scc})、⑧3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-4-isomerase (3 β -HSD)、⑨cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase (P450 17 α)、⑩17 β -HSD
- エイコサノイド合成系で始めに細胞膜脂質二重層のリン脂質にエステル結合したアラキドン酸を遊離させるphospholipase A2, group IIA (platelets, synovial fluid) (Pla2g2a)
- エイコサノイド系のシクロオキシゲナーゼ経路に関わる遺伝子である、prostaglandin-endoperoxide synthase 1 (Ptgs1)、prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (Ptgs2)、prostaglandin D2 synthase (brain) (Ptgds)、prostaglandin I2 (prostacyclin) synthase (Ptgis)
- エイコサノイド系のリポキシゲナーゼ経路に関わる遺伝子であるtransglutaminase 2, C polypeptide (Tgm2)、arachidonate 15-lipoxygenase (Alox15)
- プラスタグランジン合成・制御系に関わる遺伝子である、S100 calcium binding protein A10 (S100a10)、S100 calcium binding protein A6 (S100a6)、phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent) (Pla2g4a)、annexin A1 (Anxa1)、prostaglandin E receptor 3 (subtype EP3) (Ptger3)
- 肝臓のマイクロアレイ解析で変化が認められたhydroxysteroid (17-beta) dehydrogenase 2 (Hsd17b2)、peroxisome proliferator-activated receptor beta (PPAR β gene)、cytochrome P450, family 26, subfamily a, polypeptide 1 (Cyp26a1)

2) ウェスタンブロット

タンパク濃度はプロテインアッセイキット(Bio-Rad社)を用いて行った。10%か12%のポリアクリルアミドゲルで電気泳動を行った後、PVDF膜に転写をした。3%スキムミルクに1時間室温でインキュベーションした後、それぞれStAR (Santa Cruz Biotechnology, CA, USA), CYP11A (Chemicon Int., Temecula, CA, USA), CYP17 α , and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) (Santa Cruz Biotechnology)に対する一次抗体に 4°Cで一夜反応をさせた。膜はTBSやTBSTバッファーで洗浄後、アルカリフォスファターゼ結合の抗ウサギ又は抗ヤギ抗体(Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA, USA)を用いて反応させた。その後膜は再度TBSやTBSTバッファーで洗浄をし、1-StepTM NBT/BCIP (Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA)で可視化した。Lane and Spot Analyzer version 5.0 (ATTO Corporation, Tokyo, Japan)でバンドの濃度測定を行い、内部標準のGAPDHで補正した。

3) RNA 抽出

RNeasy Mini kit (QIAGEN)を用いて行った。抽出したRNAは、ナノドロップで収量、波形を確認した後、バイオアナライザー(Agilent)で電気泳動を行い、不純物や分解のないRNAであることを確認した。

4) DNA マイクロアレイによる網羅的解析

東レ株式会社に委託して実施した。高感度DNAチップ3D-Geneを用いて、1色法で解析を行った。ノーマライゼーションによるデータの標準化ののち、対照群と全ての曝露群を比較し、変動比2倍を閾値にして発現変動のある遺伝子を同定した。抽出された遺伝子をGenMAPPを用いてパスウェイ解析をし、さらに少なくとも1比較以上で閾値を越えた遺伝子2903個からクラスター解析ソフト(Cluster 3.0)で階層クラスター解析を行った。

(9) 統計解析

統計処理は、Graph Pad Prism5 (San Diego, CA, USA) もしくはJMPバージョン5.0 (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA)を用いて行なった。

臓器重量、血清中の各ホルモン濃度の群間の平均値の有意差検定には一元配置分散分析(one way ANOVA)を使用し、各曝露群と対照群との有意差検定にはDunnetの多重比較検定もしくはTukeyの多重検定を用いた。

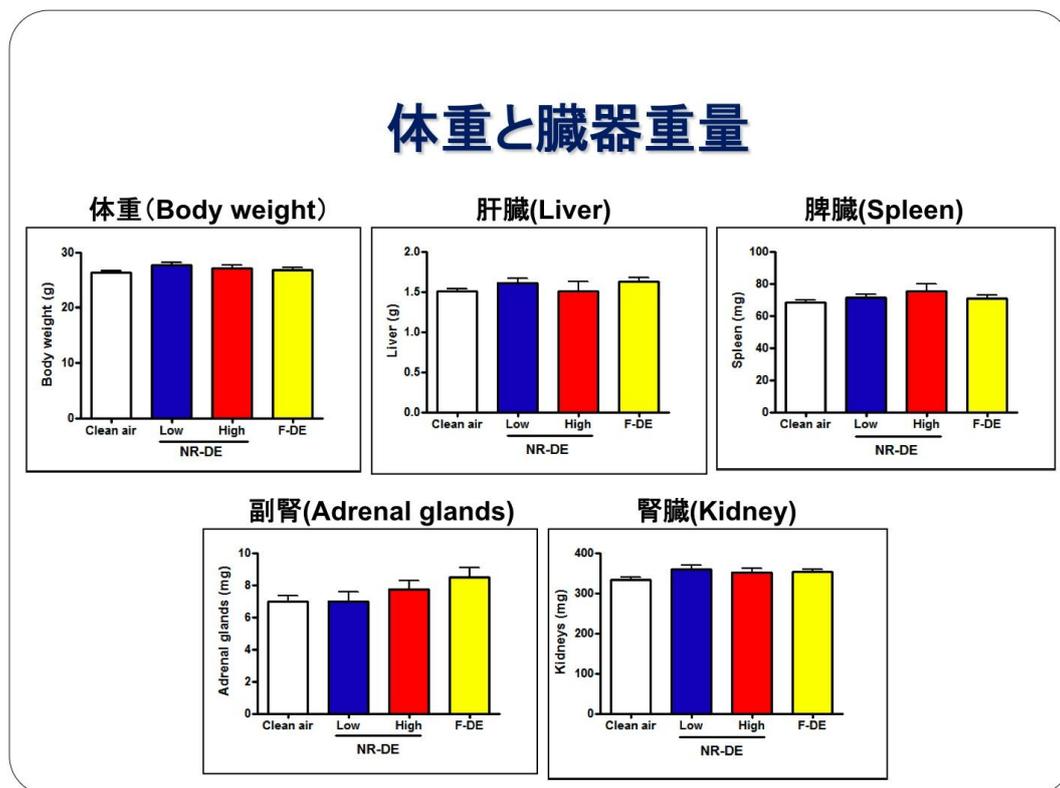
培養液中のホルモン濃度については、群間の平均値の有意差検定には二元配置分散分析(two way ANOVA)を使用し、各曝露群と対照群との有意差検定にはBonferroniの多重比較検定を用いた。また、ACTH添加群と、非添加群との有意差検定にはDunnetの多重比較検定を用いた。

4. 結果及び考察

(1) 体重および臓器重量

1) 雄マウスの8週間曝露

図(3)-1に体重、肝臓、脾臓、腎臓、副腎の重量を示した。いずれも各曝露群とコントロール群との間で有意な差は認められなかった。



図(3)－1 雄マウスへの8週曝露の体重、肝臓、脾臓、副腎、腎臓重量に及ぼす影響。図中のControl、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

2) 雌マウスの3～12カ月曝露

a. 3ヶ月目

体重、肝臓重量、右腎重量、左肺重量、脾臓重量は、コントロール群と比較して、各曝露群に有意な差は認められなかった。卵巣重量、子宮重量、膈重量の結果は、膈スミアの観察から、休止期と判断した個体のデータを用いて、検討した。卵巣重量、子宮重量、膈重量は、コントロール群と比較して、各曝露群で有意差は認められなかった。

b. 6ヶ月目

体重と副腎重量は、コントロール群と比較して各曝露群に有意な差は認められなかった。腸管の長さは、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で、それぞれ 52.02 ± 1.52 cm、 51.75 ± 0.98 cm、 48.76 ± 0.82 cm、 47.78 ± 0.34 cm (Mean \pm SEM) で、除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意な低値を示した ($p < 0.05$)。卵巣重量、子宮重量、膈重量は、膈スミア観察の結果により、休止期と発情期に分けて比較したが、コントロール群と各曝露群との間に有意な差は認められなかった。

c. 12ヶ月目

体重は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $25.24 \pm 0.92\text{g}$ 、 $27.01 \pm 0.69\text{g}$ 、 $26.34 \pm 0.42\text{g}$ 、 $28.00 \pm 0.76\text{g}$ であり、除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

肝臓の重量には、コントロール群と比較して、有意な高値が認められなかった。

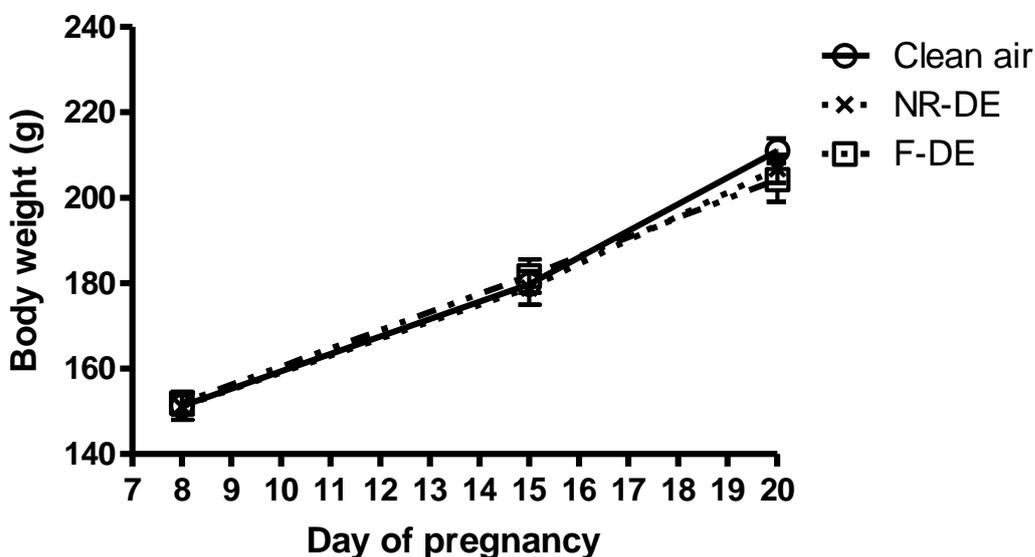
腎臓重量は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $368.9 \pm 7.0\text{mg}$ 、 $387.2 \pm 8.3\text{mg}$ 、 $375.7 \pm 9.0\text{mg}$ 、 $406.7 \pm 10.6\text{mg}$ であり、除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意な高値を示した。副腎重量は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $10.29 \pm 0.63\text{mg}$ 、 $8.29 \pm 0.47\text{mg}$ 、 $8.29 \pm 0.29\text{mg}$ 、 $7.93 \pm 0.56\text{mg}$ であり、コントロール群と比較して中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で有意な低値を示した ($p < 0.05$)。腸管の長さ、膣スメアで休止期と判断した個体の卵巣重量および子宮重量は、コントロール群と比較して有意差は認められなかった。

体重の有意差が認められたため、各臓器重量を体重あたりで比較した。どの臓器においても、コントロール群と比較して各曝露群に有意な差は認められなかった。

3) 妊娠ラットの20日間曝露

妊娠期間中に、妊娠8日、15日および20日に体重測定を行ったが、いずれの日でも3群間で体重に差は認められなかった (図(3)-2)。また、妊娠期間中に流産する個体も認められなかった。

肝臓重量と脾臓重量が高濃度曝露群と除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意な低値を示した。副腎、子宮および卵巣重量には差が認められなかった。



図(3)-2 妊娠ラットへの20日間NR-DE曝露による体重増加に及ぼす影響。図中のClean air、NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

4) 仔ラット(雌)の1ヶ月曝露

体重の変化は、全曝露期間においてコントロール群と曝露群の間に有意差はなかった。

肝臓、脾臓、胸腺、腎臓、副腎の重量に、コントロール群と曝露群で有意差は認められなかった。肺重量は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $1.151 \pm 0.058\text{g}$ 、 $0.9755 \pm 0.017\text{g}$ 、 $1.027 \pm 0.026\text{g}$ 、 $0.9895 \pm 0.029\text{g}$ 、 $1.032 \pm 0.063\text{g}$ (Mean \pm SEM) であり、正常空気群と比較して中濃度曝露群および除粒子曝露群で有意な低値を示した ($p < 0.05$)。しかし、体重あたりの重量で比較すると、コントロール群と曝露群の間に有意な差は認められなかった。

子宮重量は、休止期で採材した個体で、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $0.1988 \pm 0.014\text{g}$ 、 $0.2668 \pm 0.016\text{g}$ 、 $0.2380 \pm 0.018\text{g}$ 、 $0.2154 \pm 0.0081\text{g}$ (Mean \pm SEM) であり、コントロール群と比較して中濃度曝露群で有意な高値を示した ($p < 0.05$)。発情前期と発情期で採材した個体の比較では、子宮重量に有意差は認められなかった。卵巣重量は、休止期で採材した個体、発情前期で採材した個体、発情期で採材した個体ごとの比較において、コントロール群と各曝露群との間で有意差は認められなかった。

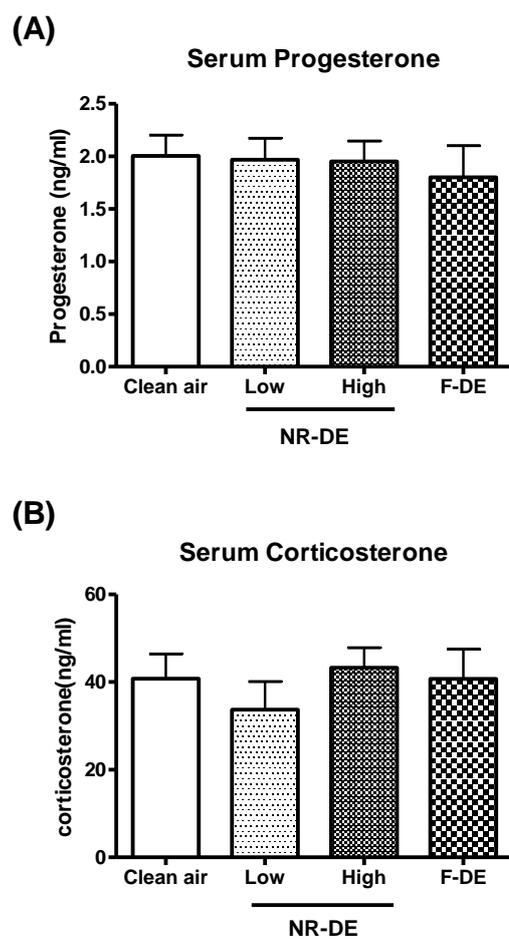
雄ラットの1～3ヶ月曝露

(2) 血中ホルモン濃度

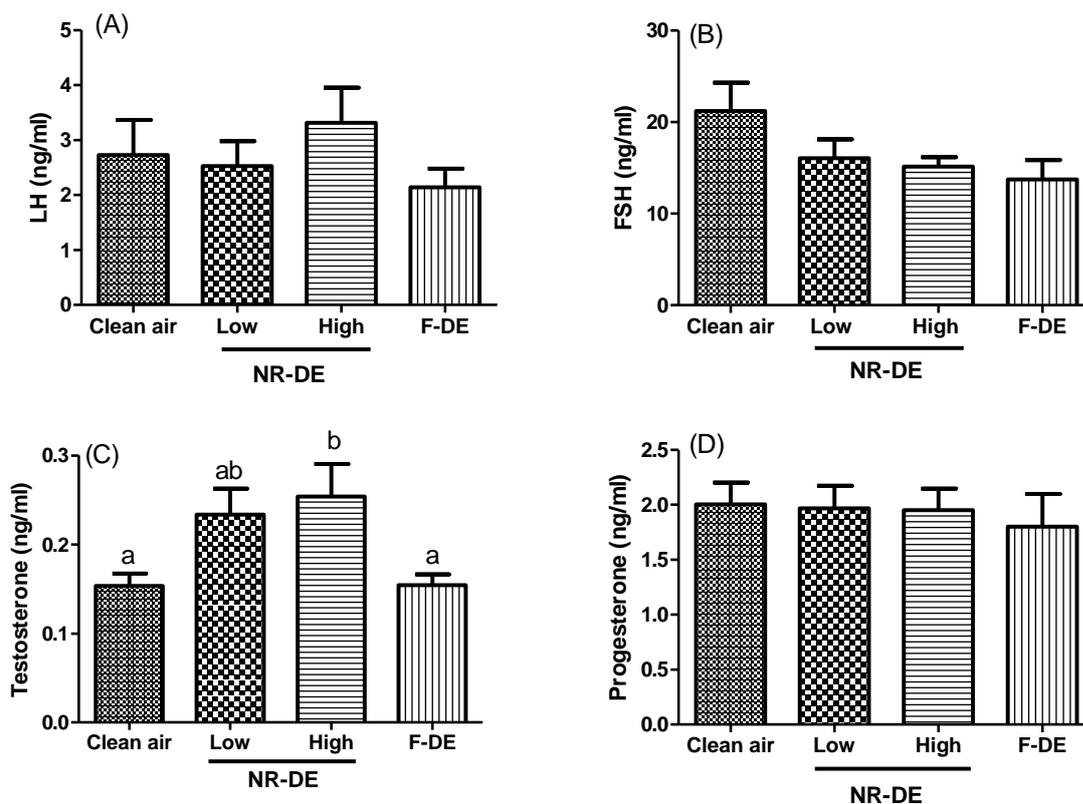
1) 雄マウスの8週間曝露

図(3)－3に血中プロジェステロン及びコルチコステロンの濃度を示した。血中コルチコステロン及びプロジェステロンの濃度は、いずれも各曝露群とコントロール群との間で有意な差は認められなかった。

図(3)－4に血中FSH、LH、テストステロン及びプロジェステロン濃度を示した。血中テストステロン濃度は、ナノ粒子曝露群がコントロール群に比べて高値を示した。その他のホルモン濃度は各曝露群とコントロール群との間で有意差は認められなかった。



図(3)－3 雄マウスへのNR-DE 8週曝露の血清中のプロジェステロン (A) 及びコルチコステロン (B) 濃度に及ぼす影響。図中のClean air、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



図(3)－4 雄マウスへのNR-DE 8週曝露の血中卵胞刺激ホルモン(FSH)、黄体形成ホルモン(LH)、テストステロンおよびプロジェステロン濃度に及ぼす影響。図中のClean air、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

2) 雌マウスの3～12カ月曝露

a. 3ヶ月目

プロジェステロン及びインヒビン濃度は、コントロール群と比較して各曝露群に有意な差は認められなかった。

b. 6ヶ月目

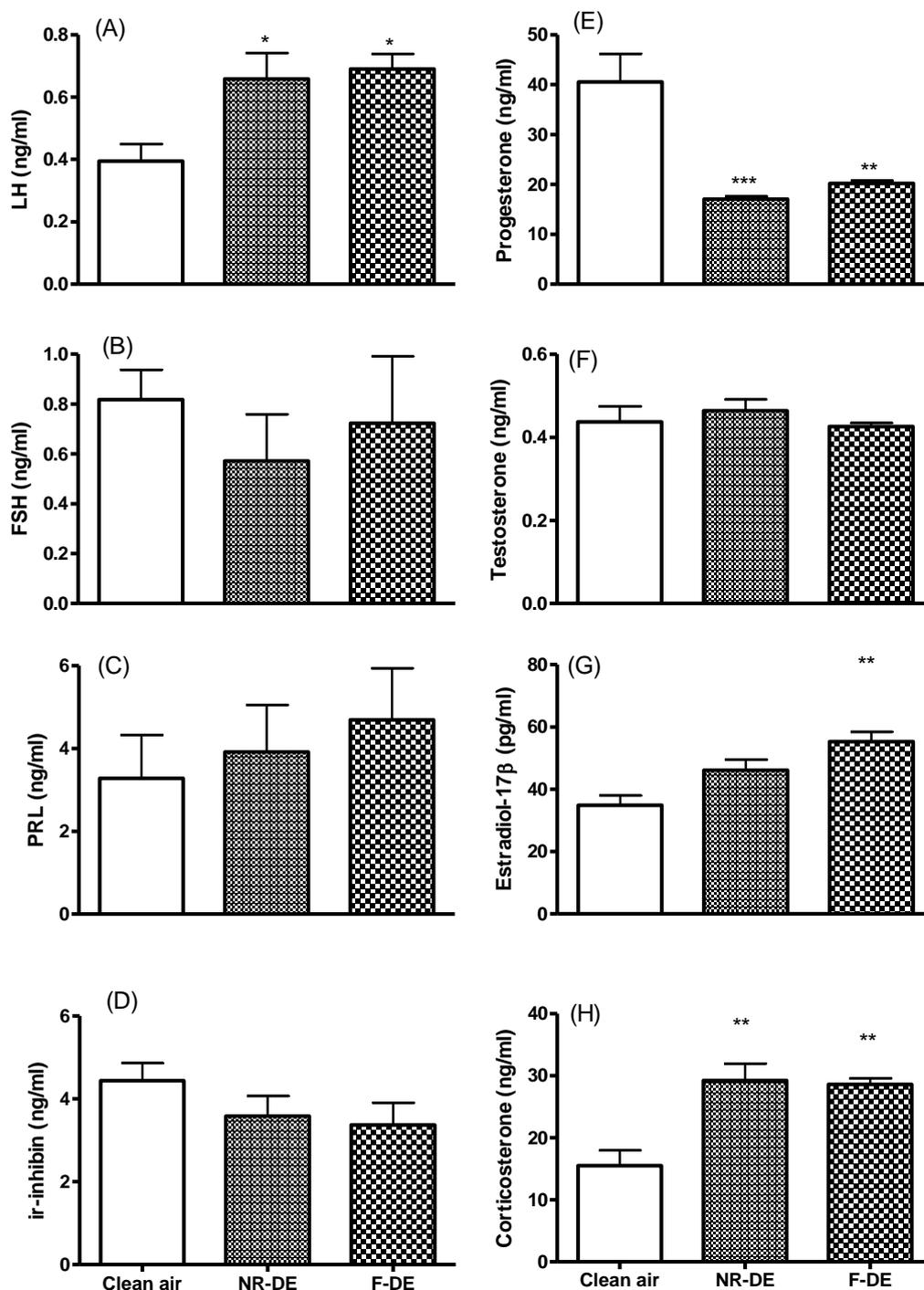
エストラジオール-17 β 、プロジェステロン、インヒビン濃度のすべてにおいて、コントロール群と比較して各曝露群に有意な差は認められなかった。

c. 12ヶ月目

プロジェステロン濃度は、コントロール群と比較して各曝露群に有意差は認められなかった。インヒビン濃度は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ 2.16 ± 0.51 ng/ml、 2.31 ± 0.25 ng/ml、 3.79 ± 0.26 ng/ml、 2.55 ± 0.30 ng/ml (Mean \pm SEM) であり、コントロール群と比較して中濃度曝露群で有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

3) 妊娠ラットの20日間曝露

血中LHとコルチコステロン濃度が高濃度曝露群と除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意に上昇し、血中プロジェステロン濃度は逆に有意に低下した。血中エストラジオール濃度は、高濃度曝露群ではコントロール群と比較して高値を示したが、差は有意ではなかった。除粒子曝露群では、コントロール群よりも有意な高値を示した（図(3)－5）。



図(3)－5 妊娠ラットへの20日間NR-DE曝露の血中各種ホルモン濃度への影響。図中のClean air、NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

4) 仔ラット（雌）の1ヶ月曝露

血清中のプロゲステロン濃度は、休止期、発情前期、発情期ともに、コントロール群と各曝露群で有意差は認められなかった。しかし、高濃度曝露群の休止期と発情期で、コントロール群と比較して高い傾向を示した。また、除粒子曝露群の発情前期と発情期で、コントロール群と比較して低い傾向を示した。

血清中のエストラジオール-17 β 濃度は、発情前期で採血した個体において、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ 157.40 \pm 15.57pg/ml、105.00 \pm 14.93 pg/ml、80.51 \pm 8.88 pg/ml、130.50 \pm 29.52 pg/ml (Mean \pm SEM) であり、コントロール群と比較して高濃度曝露群で有意な低値が認められた ($p < 0.05$)。休止期および発情期では、コントロール群と各曝露群において有意差は認められなかった。

血清中のFSH濃度は、休止期、発情前期、発情期において、コントロール群と各曝露群との間に有意差は認められなかった。

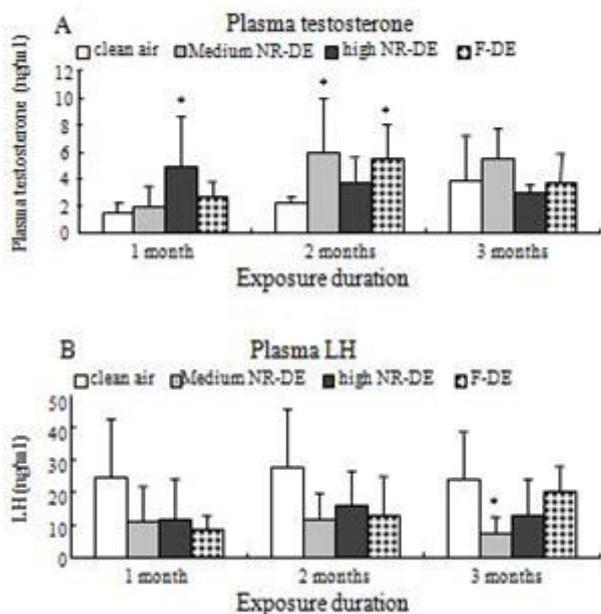
血清中LH濃度は、休止期ので採血した個体において、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ 0.0760 \pm 0.021ng/ml、0.3128 \pm 0.071 ng/ml、0.1910 \pm 0.060 ng/ml、0.04775 \pm 0.012ng/ml (Mean \pm SEM) であり、中濃度曝露群で、コントロール群と比較して有意な高値を示した ($p < 0.05$)。発情前期では、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかったが、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群は低い傾向を示した。発情期では、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかったが、高濃度曝露群で低い傾向を示した。

血清中プロラクチン濃度は、休止期、発情前期、発情期において、コントロール群と各曝露群との間に有意差は認められなかった。

5) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

2か月の曝露後、以前の研究(Li et al., 2009)同様に中濃度曝露群はコントロール群に比べて有意に血漿中のテストステロン濃度を上昇させた(図(3)–6 A)。高濃度曝露群は1か月曝露後血漿中テストステロン濃度を上昇させたが、2、3か月後はこのような変化は見られなかった。除粒子曝露群は2か月後血漿テストステロン濃度を上昇させた。高濃度曝露群と除粒子曝露群間には差は見られなかった。

LHはライディッヒ細胞内でのテストステロン生合成の重要な調節因子であり、テストステロンの上昇によりLH放出が抑制される(Hutchison et al., 1975)。中濃度の3か月曝露によりコントロール群と比較してLH濃度を有意に減少した(図(3)–6 A B)。他の群はコントロール群との間に有意な変化は見られなかった。また高濃度曝露群と除粒子曝露群間にも差は見られなかった。



図(3)－6 雄ラットへの1～3ヶ月NR-DE曝露の血中テストステロン濃度に及ぼす影響。図中の clean air、Medium NR-DE、high NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(3) 組織中のホルモン含有量

1) 仔ラット(雌)の1ヶ月曝露

a. 下垂体中のFSH、LH及びプロラクチン

下垂体中のFSH含有量は、休止期、発情前期、発情期において、コントロール群と各曝露群との間に有意差は認められなかった。しかし、発情前期の中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群、および発情期中濃度曝露群で、コントロール群と比較して低い傾向が認められた。

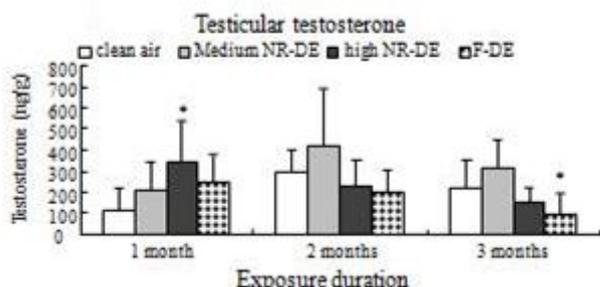
下垂体中のLH含有量は、休止期で採材した個体において、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $578.2 \pm 80.78 \text{ ng/ml}$ 、 $1131 \pm 157.5 \text{ ng/ml}$ 、 $893.6 \pm 109.0 \text{ ng/ml}$ 、 $967.3 \pm 59.77 \text{ ng/ml}$ (Mean \pm SEM) であり、中濃度曝露群がコントロール群と比較して有意な高値を示した ($p < 0.05$) (血清中LH濃度の結果と一致)。発情前期では、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかった。発情期においても、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかったが、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で、低い傾向を示した。

下垂体中のプロラクチン含有量は、休止期、発情期において、コントロール群と各曝露群との間に有意差は認められなかった。発情前期で採材した個体において、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ $505.2 \pm 54.0 \text{ ng/ml}$ 、 $480.0 \pm 43.6 \text{ ng/ml}$ 、 $993.1 \pm 150.6 \text{ ng/ml}$ 、 $716.6 \pm 62.7 \text{ ng/ml}$ (Mean \pm SEM) であり、コントロール群と比較して、高濃度曝露群が有意な高値を示した ($p < 0.05$)。

2) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

a. 精巣中のテストステロン

精巣のテストステロン濃度(重量濃度)は血漿中(体積濃度)に比べてかなり濃度が高かった(図(3)ー7)。高濃度1か月曝露により精巣中のテストステロン濃度はコントロール群に比べて有意に上昇していた。3か月曝露では除粒子曝露群の精巣テストステロン濃度はコントロール群に比べて有意に低下していた。高濃度曝露群と除粒子曝露群間には差は見られなかった。

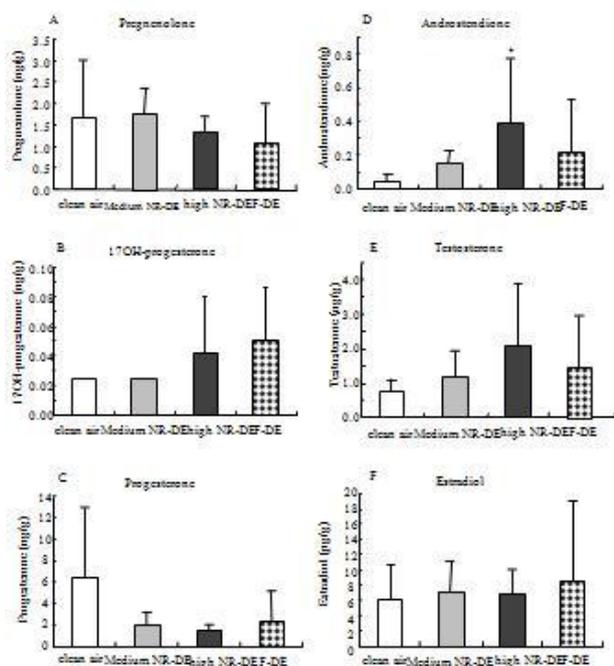


図(3)ー7 1～3か月曝露雄ラット精巣のテストステロン濃度(Mean±SEM, *: P<0.05)。図中のclean air、Medium NR-DE、high NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

b. 海馬中のステロイド・ホルモン

1ヶ月曝露ラットの海馬中の濃度は血漿中と同程度であり、精巣中よりも少なかった。1か月の高濃度曝露や除粒子曝露によりプレグネノロン、17OH-プロジェステロン、プロジェステロン、テストステロン、エストラジオール濃度に変化は見られなかった(図(3)-8)。コントロール群に比べ高濃度の曝露のみでアンドロステンジオン濃度が上昇した(図(3)ー8)。

Figure 4



図(3)ー8 雄ラット海馬中のステロイドホルモン濃度。図中のclean air、Medium NR-DE、high NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(4) 初代培養細胞におけるホルモン分泌能

1) 雄マウスの8週間曝露の場合

a. 副腎細胞

i. コルチコステロン

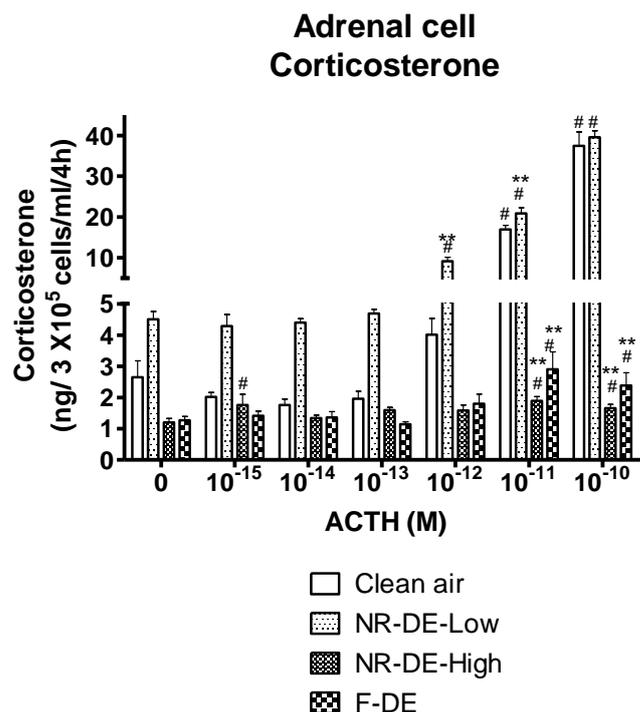
図(3)－9に副腎細胞の培養液中のコルチコステロン濃度を示した。コントロール群のACTH刺激に対するコルチコステロン分泌は、ACTH非添加群から 10^{-13} M添加群までは変化が認められなかったが、 10^{-12} から 10^{-10} Mにかけては濃度依存的上昇を示し、ACTHを 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では、非添加群と比較して有意な高値を示した。

コントロール群と中濃度曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-12} 、 10^{-11} M添加した群ではコルチコステロンの分泌量は中濃度曝露群が有意な高値を示した。ACTHを 10^{-15} 、 10^{-14} 、 10^{-13} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では高い傾向を示したが、有意差は認められなかった。ACTHを 10^{-10} M添加した群の中濃度曝露群と高濃度曝露群では、ACTHで刺激したにもかかわらず、コルチコステロン分泌に変化が認められなかった。

コントロール群と高濃度曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では、コルチコステロンの分泌量は高濃度曝露群で有意な低値を示し、 10^{-12} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では低値を示したが有意差は認められなかった。 10^{-15} 、 10^{-14} 、 10^{-13} M添加した群では各群間に差は認められなかった。

コントロール群と除粒子曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では、コルチコステロンの分泌量は有意な低値を示し、 10^{-12} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では低値を示したが有意差は認められなかった。 10^{-15} 、 10^{-14} 、 10^{-13} M添加した群では各群間に差が認められなかった。

また、ACTH刺激に対するコルチコステロン分泌反応性は、中濃度曝露群ではACTH非添加群から 10^{-13} M添加群までは変化が認められなかったが、 10^{-12} から 10^{-10} Mにかけては濃度依存的上昇を示し、非添加群と比較して有意な高値を示した。高濃度曝露群は、ACTH 10^{-15} M添加群では有意な高値を示したが、その他の群では変化が認められなかった。除粒子曝露群ではACTH非添加群から 10^{-12} M添加群までは有意な変化が認められなかったが、 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では非添加群と比較して有意な高値が認められた。



図(3)－9. 雄マウスへのNR-DE8週間曝露の副腎細胞の培養液中のコルチコステロン濃度に及ぼす影響。それぞれの群に対して0、 10^{-15} ～ 10^{-10} MのACTHで刺激した。*は各曝露群とコントロール群との有意差を示し(** $p < 0.01$)、#はACTHで刺激した群と、刺激しなかった群との有意差を示す(# < 0.05)。図中のClean air、NR-DE-Low、NR-DE-High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

ii. プロジェステロン

図(3)－10に副腎細胞の培養液中のプロジェステロン濃度を示した。

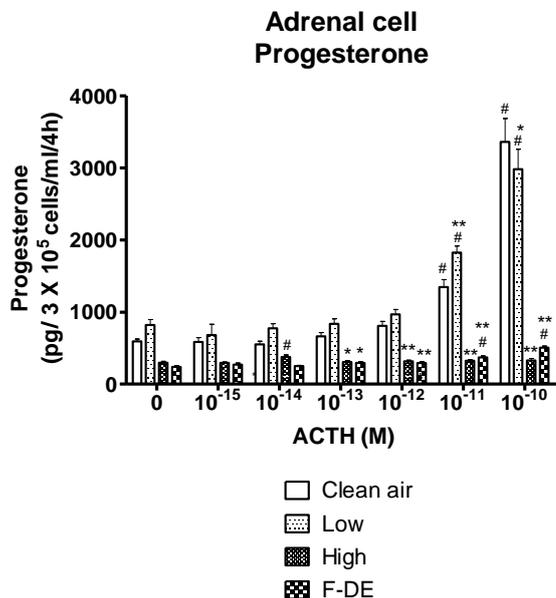
コントロール群と中濃度曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-11} M添加した群では、プロジェステロンの分泌量は中濃度曝露群が有意な高値を示し、ACTHを 10^{-15} 、 10^{-14} 、 10^{-13} 、 10^{-12} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では有意差は認められなかった。ACTHを 10^{-10} Mを添加した群では非添加群と比較して有意な低値を示した。

コントロール群と高濃度曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-13} 、 10^{-12} 、 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では、プロジェステロンの分泌量は中濃度曝露群が有意な低値を示し、 10^{-15} 、 10^{-14} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では低値を示したが有意差は認められなかった。

コントロール群と除粒子曝露群を比較すると、ACTHを 10^{-13} 、 10^{-12} 、 10^{-11} 、 10^{-10} M添加した群では、プロジェステロンの分泌量は除粒子曝露群が有意な低値を示し、 10^{-15} 、 10^{-14} M添加した群と、ACTH刺激を行わなかった群では低値を示したが有意差は認められなかった。

また、ACTH刺激に対するプロジェステロン分泌反応性は、コントロール群ではACTH非添加群から 10^{-12} M添加群までは変化が認められなかったが、 10^{-11} から 10^{-10} Mにかけては濃度依存的上昇を示し、 10^{-11} 、 10^{-10} Mでは非添加群と比較して有意な増加が認められた。中濃度曝露群では、ACTH非添加群から 10^{-12} M添加群までは変化が認められなかったが、 10^{-11} から 10^{-10} Mにかけては濃度依存的上昇を示し、 10^{-11} 、 10^{-10} M添加群では非添加群と比較して有意な高値を示した。高濃度曝露群では、

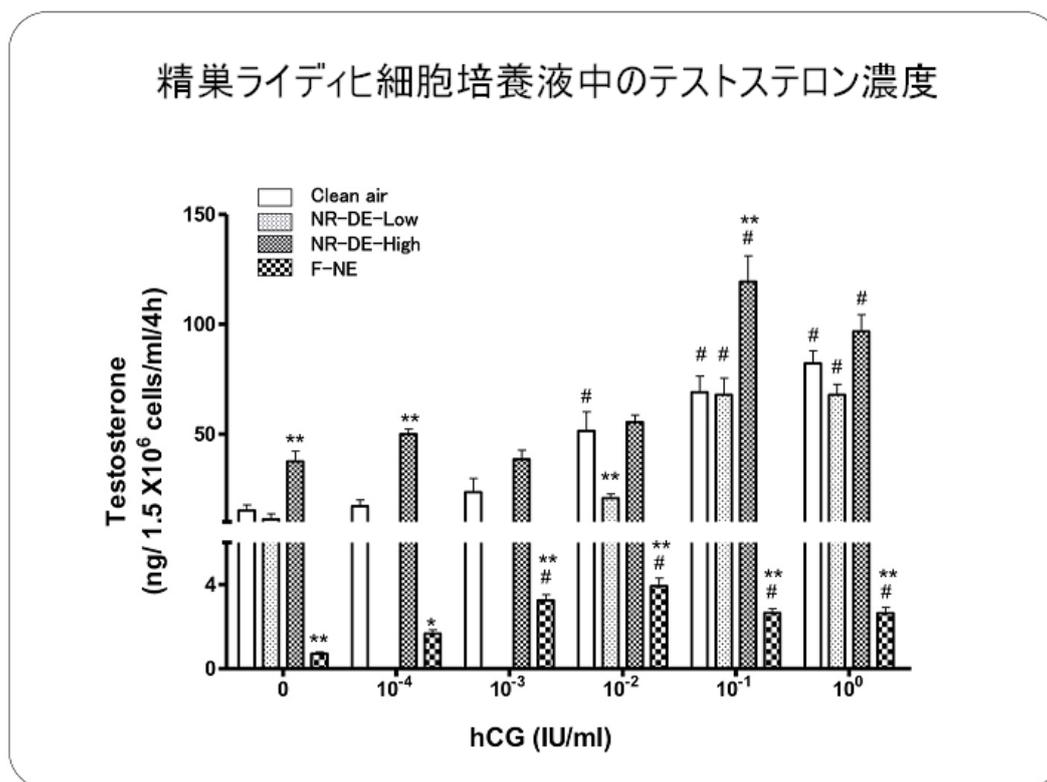
ACTH 10^{-14} M添加群では、有意な高値が認められたが、その他の群では変化が認められなかった。除粒子曝露群では、ACTH非添加群から 10^{-12} M添加群までは変化が認められなかったが、 10^{-11} から 10^{-10} Mにかけては濃度依存的上昇を示し、 10^{-11} 、 10^{-10} Mでは非添加群と比較して有意な高値が認められた。



図(3)－10 雄マウスへのNR-DE8週間曝露の副腎細胞の培養液中のプロゲステロン濃度に及ぼす影響。それぞれの群に対して0、 10^{-15} ～ 10^{-10} MのACTHで刺激した。*は各曝露群と対照群との有意差を示し(* $p < 0.05$ 、** $p < 0.01$)、#はACTHで刺激した群と、刺激しなかった群との有意差を示す(# < 0.05)。図中のClean air、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

b. 精巣ライディヒ細胞

図(3)－11に精巣ライディヒ細胞の培養液中のテストステロン濃度を示した。基礎分泌量については、高濃度曝露群がコントロール群と比較して有意に高く、除粒子曝露群が有意に低い値を示した。ヒト絨毛性ゴナドトロピン(hCG)に対するテストステロン分泌反応性は、コントロール群ではhCG 10^{-2} モル投与群から有意な上昇が認められたのに対して、中濃度曝露群と高濃度曝露群ではhCG 10^{-1} モル投与群から有意な上昇が認められた。除粒子曝露群では、hCG 10^{-3} モル投与群から有意な上昇が認められた。一方培養液中のテストステロン分泌量を比較すると高濃度曝露群において、hCG 10^{-1} モル投与群では、コントロール群と比較して有意な高値を示した。除粒子曝露群では、いずれのhCG投与群においても培養液中テストステロン分泌量はコントロール群と比較して有意な低値を示した。

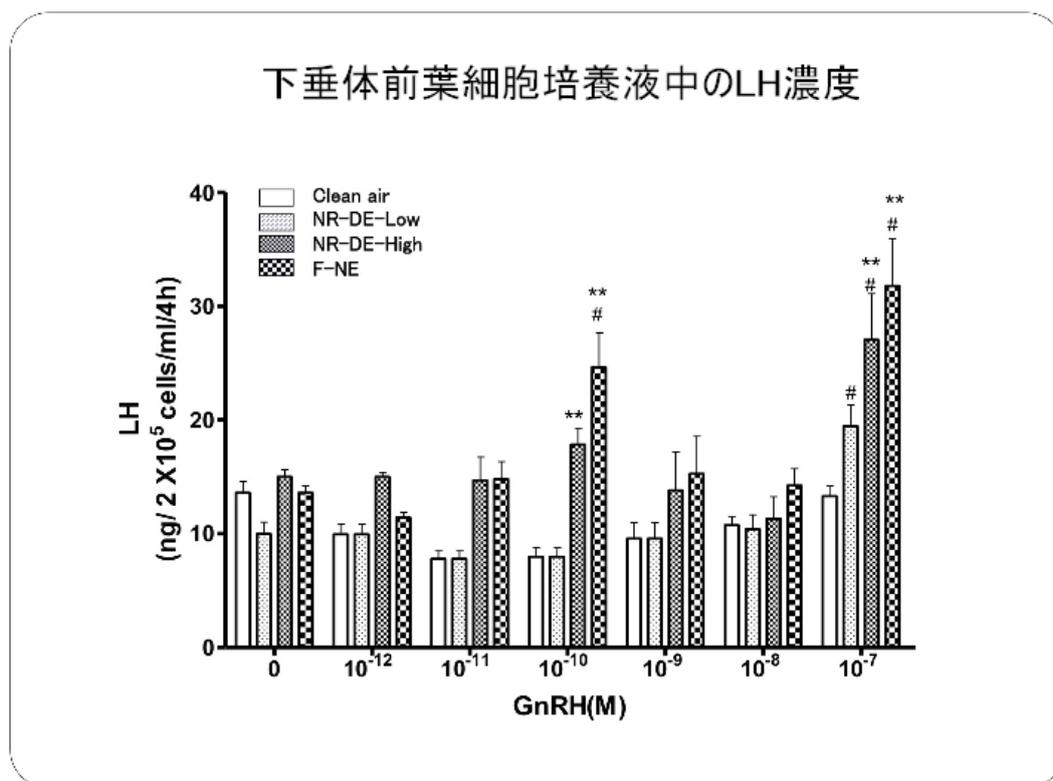


図(3)-11 雄マウスへのNR-DE8週間曝露の精巣ライディヒ細胞の培養液中のテストステロン濃度に及ぼす影響。図中のClean air、NR-DE-Low、NR-DE-High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

c. 下垂体前葉細胞

図(3)-12に下垂体細胞の培養液中のLH濃度を示した。

LHの基礎分泌量は、各曝露群とコントロール群で差が認められなかった。コントロール群では、ゴナドトロピン放出ホルモン（GnRH）の容量依存的なLH分泌量の増加が認められなかったが、高濃度曝露群では、GnRH 10^{-10} モルでLH分泌量がコントロール群よりも有意な高値を示した。また、GnRH 10^{-7} モル投与群では、中濃度曝露群、高濃度曝露群及び除粒子曝露群がコントロール群と比較してLH分泌量が有意な高値を示した。



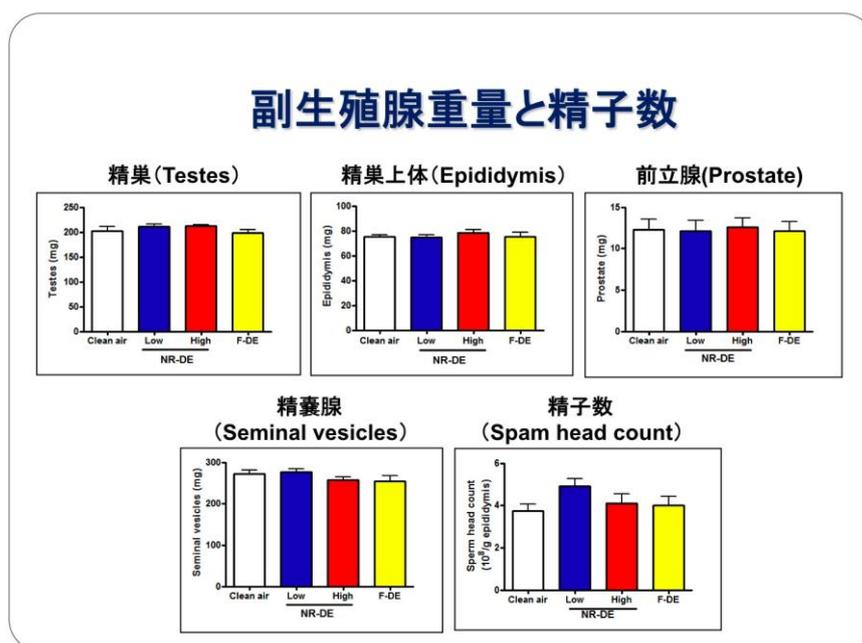
図(3)－12 雄マウスへのNR-DE8週間曝露の下垂体前葉細胞の培養液中の黄体形成ホルモン (LH) 濃度に及ぼす影響。図中のClean air、NR-DE-Low、NR-DE-High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(5) 生殖器系の検査

1) 雄マウスの8週間曝露の場合

a. 精巣・副生殖腺の重量と精子数の測定

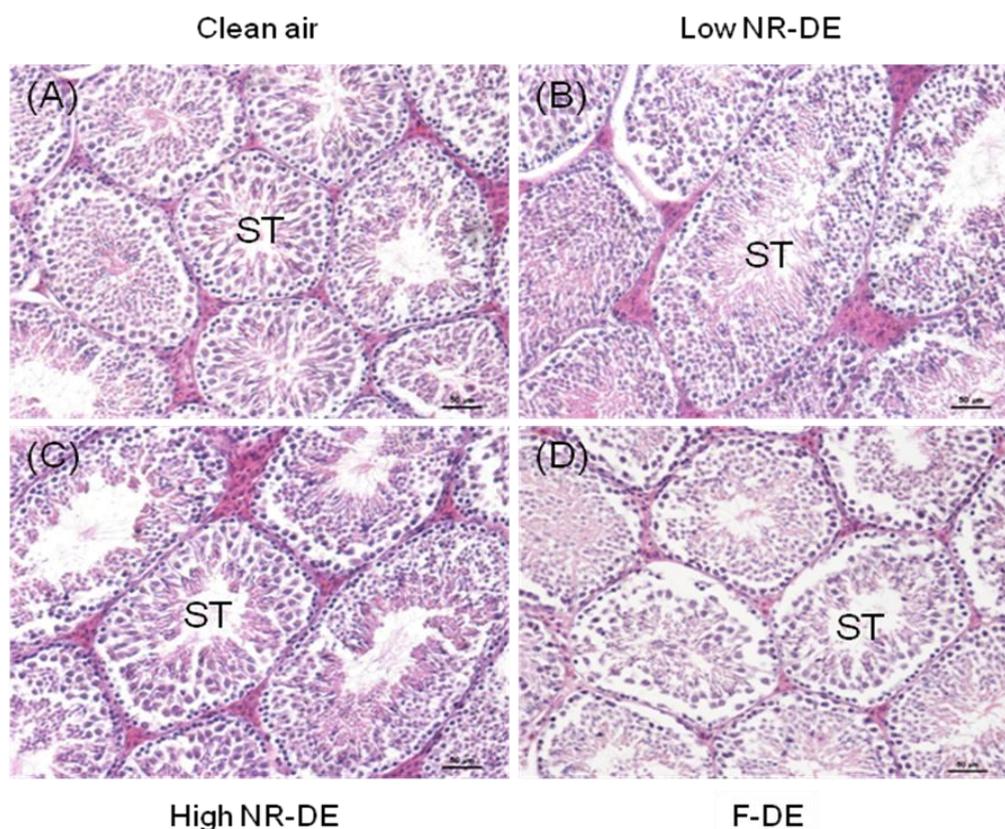
図(3)－13に精巣と副生殖腺(精巣上部、前立腺、精囊腺)重量と精子数を示した。精巣、精巣上部、前立腺、精囊腺重量は、いずれも曝露群とコントロール群の間で有意差は認められなかった。精子数は、いずれの曝露群でもコントロール群との間で有意差は認められなかった。



図(3)－13 雄マウスへのNR-DE8週間曝露の精巣、精巣上体、前立腺、精嚢腺重量と精子数に及ぼす影響。図中のClean air、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

b. 精巣の検査

中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群では、精細管内における始原生殖細胞の欠落が認められた(図(3)－14)。



図(3)－14 各曝露群と対照群マウスの精巣組織像。図中のClean air、Low NR-DE、High NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

2) 雌マウスの3～12カ月曝露

a. 膣スメア

採材時の膣スメアの結果を、表(3)－4に示した。3ヶ月曝露実験では、全ての群で、66.67%が休止期であった。6ヶ月曝露実験では、コントロール群、中濃度曝露群では55.33%、高濃度曝露群では66.67%、除粒子曝露群では、45.45%が休止期を示した。12ヶ月曝露実験では、コントロール群、中濃度曝露群では71.43%、高濃度曝露群では92.86%、除粒子曝露群では100%の動物が休止期を示した。

表(3)－4 各曝露実験の採材時の膣スメアの結果。表中のclean air、NR-DE-M、NR-DE-H、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

3ヶ月曝露

	clean air	NR-DE-M	NR-DE-H	F-DE
休止期	8	8	8	8
発情前期	3	4	2	4
発情期	1	0	2	0
休止期の割合	66.67%	66.67%	66.67%	66.67%

6ヶ月曝露

	clean air	NR-DE-M	NR-DE-H	F-DE
休止期	7	7	8	5
発情前期				1
発情期	5	5	4	5
不明				1
休止期の割合	58.33%	58.33%	66.67%	45.45%

12ヶ月曝露

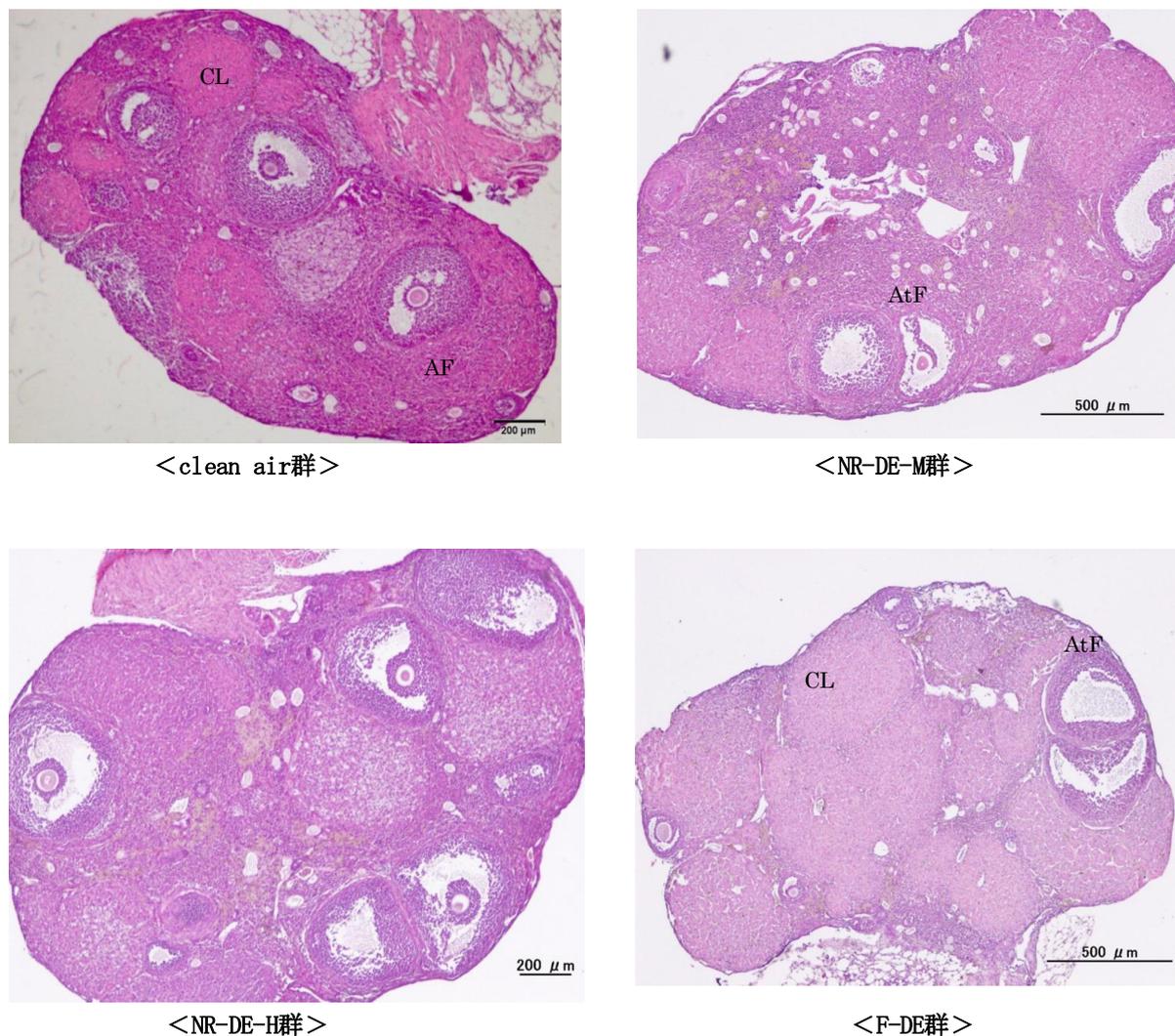
	clean air	NR-DE-M	NR-DE-H	F-DE
休止期	10	10	13	14
発情前期	2		1	
発情期	2	4		
休止期の割合	71.43%	71.43%	92.86%	100%

b. 卵管・卵巣の検査

表(3)－2に、卵巣の組織学的観察の結果を示した。二次卵胞数および直径100～300 μ mの小型の胞状卵胞数に有意な差は認められなかった。直径300 μ m以上の胞状卵胞数は、除粒子曝露群で2個体とも少なく、高濃度曝露群においても、非常に少ない個体が認められた。直径300 μ mまでの大きさの閉鎖卵胞数は、コントロール群と比較して大きく増加している曝露群はなかった。直径300 μ m以上の大きさの閉鎖卵胞数は、中濃度曝露群の2個体で多く、高濃度曝露群と除粒子曝露群にも多い個体が認められた。黄体は、コントロール群と比較して除粒子曝露群で多くの黄体が観察された。図(3)－15に、各群の卵巣の全体像を示した。

表(3)－2 12ヶ月曝露のマウスの卵巣観察結果。図中のclean air、NR-DE-M、NR-DE-H、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

曝露群\数	正常卵胞			閉鎖卵胞		黄体
	二次卵胞	100～300 μ mの胞状卵胞	300 μ m以上の胞状卵胞	300 μ mまでの閉鎖卵胞	300 μ m以上の閉鎖卵胞	
clean air 1	37	16	6	5	2	23
clean air 2	38	19	14	4	4	35
NR-DE-M 1	39	18	11	8	9	42
NR-DE-M 2	49	37	12	2	10	25
NR-DE-H 1	28	22	11	4	4	19
NR-DE-H 2	17	13	1	4	7	24
F-DE 1	29	19	6	3	1	50
F-DE 2	29	22	5	1	7	54



図(3)-15 コントロール群と各曝露群の卵巢組織像(×40) AFは正常な胞状卵胞、AtFは閉鎖卵胞、CLは黄体を示した。図中のclean air群、NR-DE-M群、NR-DE-H群、F-DE群はそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

3) 妊娠ラットの20日間曝露

a. 胎子の検査

妊娠20日(分娩前日)に摘出した胎子の体重、体長およびペニス(雄)あるいはクリトリス(雌)から肛門までの距離を測定した。体重は、高濃度曝露群と除粒子曝露群で雌雄胎子共にコントロール群よりも有意な高値を示した。体長は、高濃度曝露群と除粒子曝露群で雌雄胎子共にコントロール群よりも有意な低値を示した。雌胎子では、クリトリスから肛門までの距離が除粒子曝露群でコントロール群よりも有意に長かった。雄胎子では、3群間に差は認められなかった。

4) 仔ラット(雌)の1ヶ月曝露

a. 採材個体数

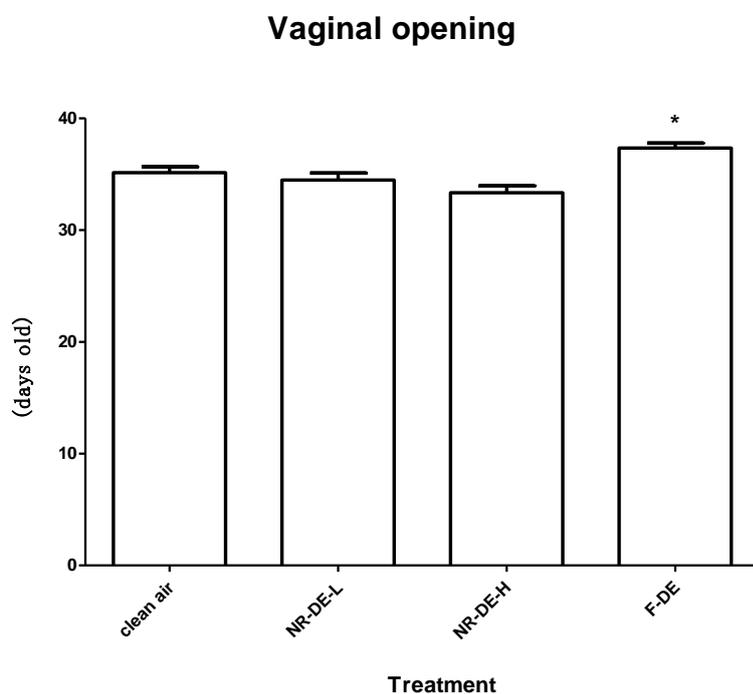
各曝露群での休止期、発情前期、発情期に採材した個体数を表(3)－3に示した。

表(3)－3 各群での各発情周期の採材個体数。表中のClean air、NR-DE-L、NR-DE-H、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

	Clean air	NR-DE-L	NR-DE-H	F-DE	room control
休止期1日目	4	4	5	5	
発情前期	5	6	5	5	5
発情期	5	5	3	4	
除外個体	1		2	1	1

b. 膣開口日齢

膣開口日齢は、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群でそれぞれ、 35.13 ± 0.52 日、 34.47 ± 0.62 日、 33.33 ± 0.61 日、 37.33 ± 0.43 日 (Mean \pm SEM) で、コントロール群と比較して、除粒子曝露群で膣開口日齢が有意に遅れた ($p < 0.05$) (図(3)－16)。



図(3)－16 清浄空気群と各曝露群の膣開口日齢。図中のclean air、NR-DE-L、NR-DE-H、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

c. 排卵数

発情期の卵管内の観察では、全ての群の全個体で排卵が確認できた。コントロール群と各曝露群で、有意差は認められなかったが、高濃度曝露群で多い傾向が認められた。

d. 膣スメア

50日齢からの膣スメアの観察で、休止期2日間、発情前期1日、発情期1日の4日間以外の異常周期を示した個体は、コントロール群で33.33%、中濃度曝露群で13.33%、高濃度曝露群で26.67%、除粒子曝露群で20.00%、room control群で33.33%であった。コントロール群では、連続休止期が1個体、延長周期が4個体で認められた。延長周期が中濃度曝露群では1個体、高濃度曝露群では4個体、除粒子曝露群では1個体、room control群では2個体で見られた。

e. 卵巣の組織学的観察

発情前期の卵巣の観察による直径100 μ m以上の正常な卵胞数と閉鎖卵胞数は、コントロール群と比較して、各曝露群に有意差は認められなかった。

直径100~200 μ m及び直径200~400 μ mの二次卵胞数と閉鎖卵胞数は、コントロール群と比較して各曝露群に有意差は認められなかった。また、400 μ mの胞状卵胞数と閉鎖卵胞数も、コントロール群と比較して各曝露群に有意差は認められなかった。

(6) リアルタイムPCR

1) 雄マウスの8週間曝露

a. 精巣内ステロイドホルモン生合成酵素

i. コレステロール生合成

精巣内コレステロール生合成に関与する①3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) と②HMG-CoA reductase mRNA量を定量した。いずれも高濃度曝露群でコントロール群よりも有意な高値を示した (図(3)-17)。中濃度曝露群と除粒子曝露群は、コントロール群と差が認められなかった。

ii. コレステロール輸送

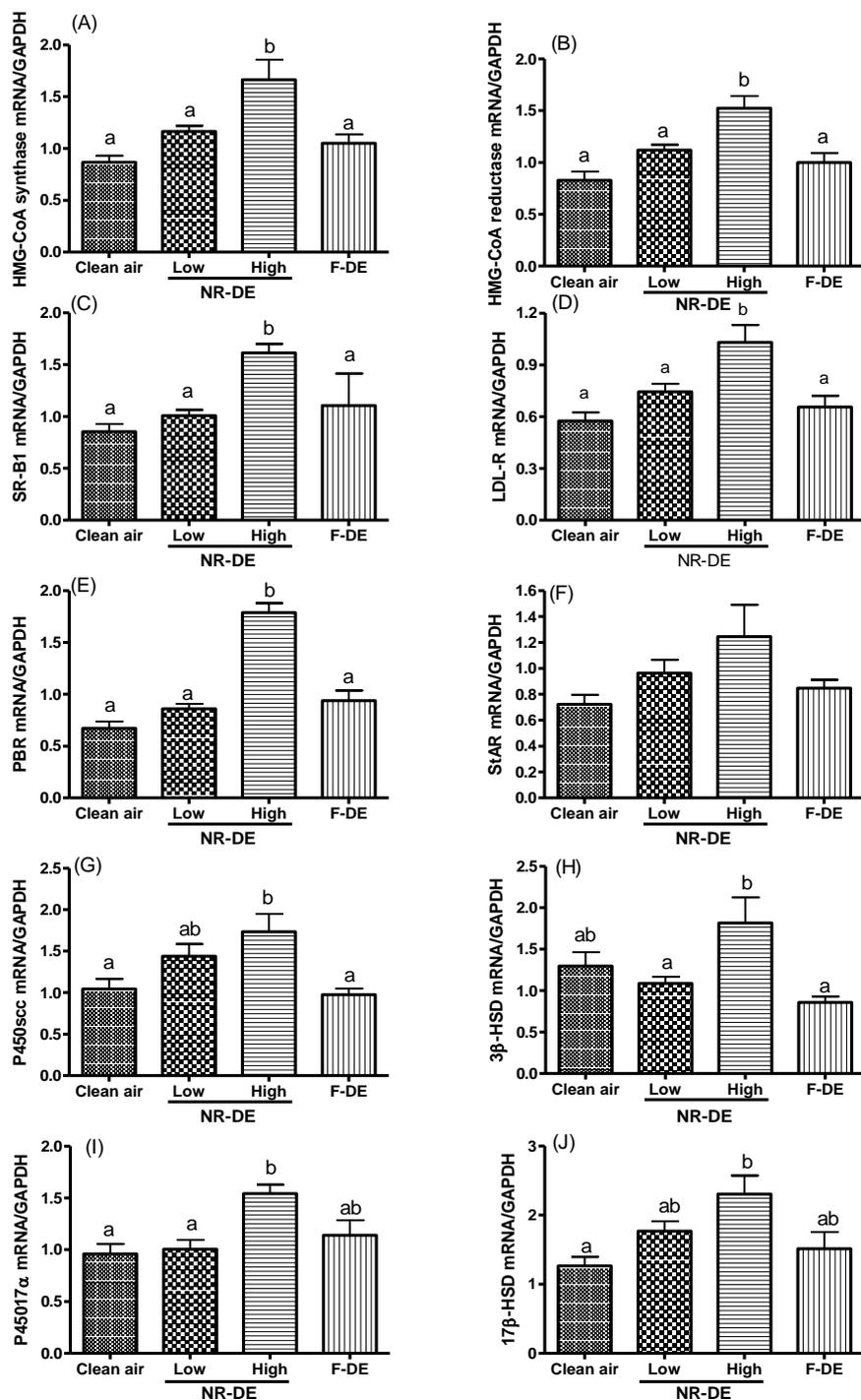
精巣細胞内のコレステロール輸送に関与し、high-density lipoprotein (HDL) と low-density lipoprotein (LDL) の取り込みに重要な③Scavenger receptor class B type1 (SR-B1) と④LDL receptor (LDL-R)、⑤Peripheral benzodiazepine receptor (PBR)、⑥ StARのmRNA量を定量した。

SR-B1、LDL-R、PBR共に高濃度曝露群でコントロール群と比べて有意な高値を示した (図(3)-17)。StARは、高濃度曝露群がコントロール群よりも高値を示したが有意差は認められなかった。中濃度曝露群と除粒子曝露群においては、SR-B1、LDL-R、PBR、StAR mRNA量共にコントロール群と差は認められなかった。

iii. テストステロン生合成

テストステロン生合成に関与する⑦cytochrome P450 side-chain cleavage enzyme (P450scc)、⑧3 β -hydroxysteroid dehydrogenase/5-4-isomerase (3 β -HSD)、⑨cytochrome P450 17 α -hydroxylase/C17-20 lyase (P450 17 α)、⑩17 β -HSD mRNA量を定量した。P450scc、3 β -HSD、

P450 17 α 、17 β -HSDの全てにおいて、高濃度曝露群がコントロール群に比較して有意な高値を示した。中濃度曝露群では、P450 $_{17\alpha}$ と17 β -HSD mRNA量がコントロール群よりも高値を示したが有意差は認められなかった。除粒子曝露群では、全ての項目においてコントロール群と差が認められなかった (図(3)-17)。



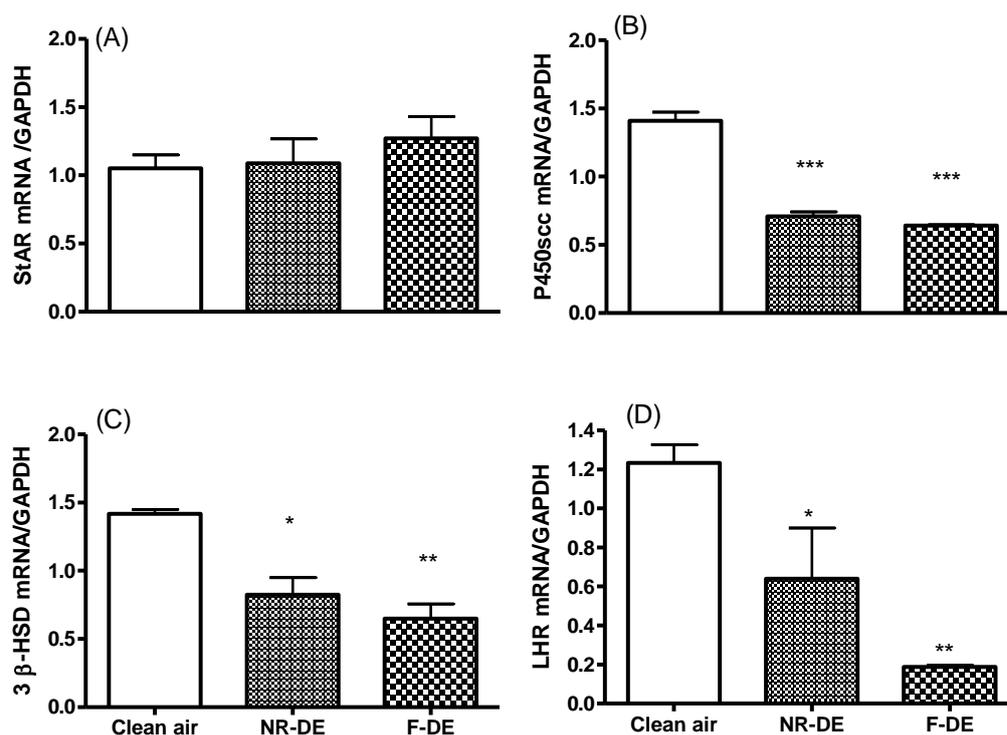
図(3)-17 雄マウスへのNR-DE8週間曝露のの精巣テストステロン生合成酵素および関連因子 mRNA発現に及ぼす影響。図中のClean air、Low、High、F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃

度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

2) 妊娠ラットの20日間曝露

a. ステロイドホルモン合成関連因子およびLHリセプター

黄体中 3β -HSDとP450SCC mRNAは、高濃度曝露群と除粒子曝露群でコントロール群よりも有意な低値を示したが、StAR mRNAは、3群間で差が認められなかった。LHリセプター mRNAは、高濃度曝露群と除粒子曝露群がコントロール群よりも有意な低値を示した (図(3)-18)。



図(3)-18 妊娠ラットへのNR-DE20日間曝露のステロイドホルモン合成関連因子mRNAとLHレセプターmRNA発現に及ぼす影響。図中のClean air、NR-DE、F-DEはそれぞれ、コントロール群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

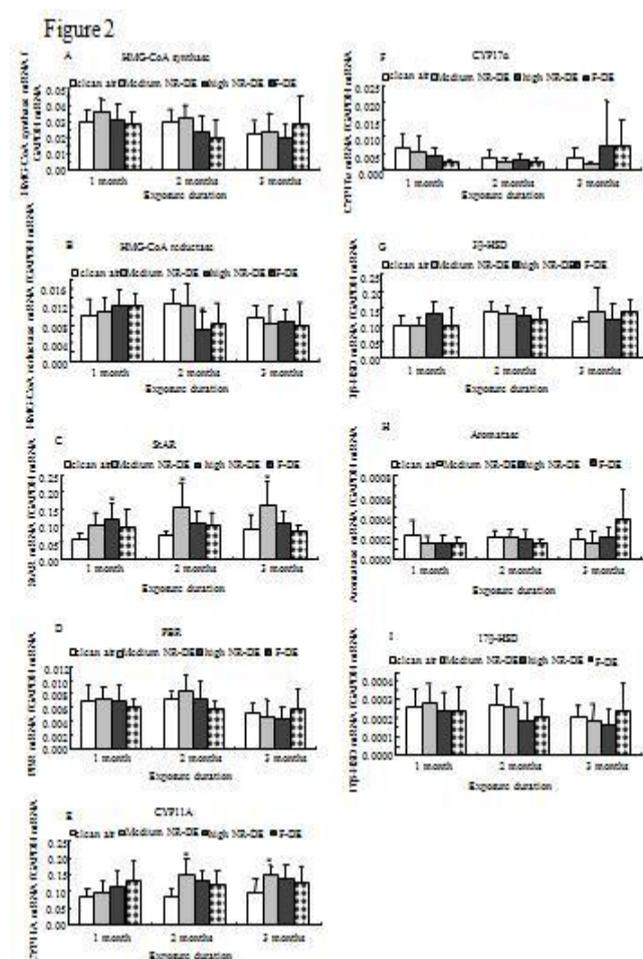
3) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

a. 精巣のステロイド合成関連物質

ライディッヒ細胞のテストステロン合成は2つのステップ (コレステロールの合成およびミトコンドリアへの輸送のステップとテストステロンやエストラジオールの生合成のステップ) に分けられる。最初のステップでは、コレステロールはHMG-CoA synthase and HMG-CoA reductaseの触媒反応によって合成され、これがコレステロール生合成の律促段階と考えられている (Goh and Heimberg, 1976)。2か月高濃度曝露群によりHMG-CoA reductaseが低下したほかは、NR-DEやF-DEによるこれらの合成酵素、還元酵素への影響は見られなかった (図(3)-19A、B)。フリーのコレステロールはミトコンドリア膜にあるStARやPBRによって運ばれる (West et al., 2001)。1か月高濃度曝露や2、3か月中濃度曝露はコントロール群と比べてStAR mRNAを上昇させたが、除粒子曝露群

では変化が見られなかった(図(3)－19C)。PBR mRNA濃度はいずれの条件下でも変化が見られなかった(図(3)－19D)。

2番目のステップでは、コレステロールの側鎖がミトコンドリアのCYP11Aにより切断される(Payne, 1990)。その後3 β -HSDやCYP17 α の作用を受けて、プロジェステロンやdehydroepiandrosterone (DHEA)からアンドロステンジオンに変換される。その後17 β -HSDによってアンドロステンジオンからテストステロンが合成される。アンドロステンジオンはアロマターゼによってエストラジオールに変換される(Payne, 1990)。中濃度の2, 3か月曝露によりCYP11A mRNA濃度は上昇したが、高濃度曝露や除粒子曝露による変化は見られなかった(図(3)－19E)。いずれの条件下でもCYP17 α , 3 β -HSD, 17 β -HSD mRNAは変化が見られなかった(図(3)－19F, G, H, I)。



図(3)－19 雄ラットへのNR-DE 1～3ヶ月曝露の精巣のステロイド合成関連物質への影響。図中のまとまった四色のバーはそれぞれ、(左より)コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

b. 海馬のステロイド合成関連物質

1か月の時点において、コントロール群の海馬と精巣のテストステロン合成に関わる因子の発現量を比較した。海馬のHMG-CoA synthaseと17 β -HSD mRNA量は精巣に比べ約4分の1であったが、HMG-CoA reductase濃度は約2倍であった(表(3)－4)。海馬のアロマターゼ、StAR, CYP11A,

CYP17 α , and 3 β -HSD mRNA量は精巣に比べてそれぞれ約1/30, 1/75, 1/2000, 1/3500, 1/35000であった。海馬のPBR mRNAは精巣と同程度であった。興味深い事に、高濃度曝露と除粒子曝露は海馬におけるこれらのmRNA発現量に全く影響を与えなかった(data not shown)。

表(3)－4. .清浄空気に曝露されたラットの精巣・海馬中のmRNA発現レベル

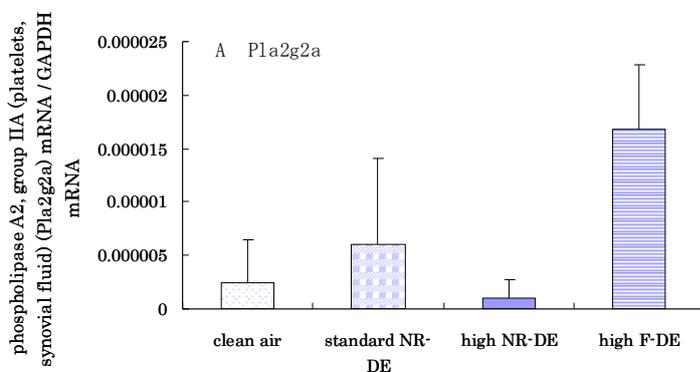
Gene	Testis	Hippocampus
HMG-CoA reductase (x10 ⁻³)	10 ± 3	20 ± 20
HMG-CoA synthase (x10 ⁻³)	30 ± 8	8 ± 5
StAR (x10 ⁻³)	60 ± 10 0	0.8 ± 0.6
PBR (x10 ⁻³)	7 ± 2	9 ± 8
CYP11A (x10 ⁻³)	80 ± 20	0.04 ± 0.02
CYP17 α (x10 ⁻³)	7 ± 4	0.002 ± 0.0006
3 β -HSD (x10 ⁻³)	70 ± 30	0.002 ± 0.001
17 β -HSD (x10 ⁻³)	0.3 ± 0.1	0.07 ± 0.07
Aromatase (x10 ⁻³)	0.2 ± 0.1	0.006 ± 0.006
GAPDH (x10 ⁵)	7 ± 3	40 ± 20

c. 精巣のエイコサノイド合成関連物質

エイコサノイド合成系において、Pla2g2aは最初に生体膜リン脂質からアラキドン酸の遊離させる酵素である。また、別の生理活性脂質であるリゾリン脂質の産生反応や、生体膜構成成分としてのリン脂質分子の再編成 (remodeling) でも中心的に働く。Pla2g2aでは、除粒子曝露群のmRNA発現量に有意な増加が認められた。(図(3)－20)。Ptgs1は構造型の酵素、Ptgs2は誘導型の酵素で、それぞれエイコサノイド合成系のシクロオキシゲナーゼ経路で働き、アラキドン酸からのPGの合成に関与する。これらのmRNA発現量に、曝露による影響はみられなかった(図(3)－21 A, B)。PtgisはPGからPGI2の合成に、PtgdsはPGからPGD2の合成に関与し、それぞれシクロオキシゲナーゼ経路で働く酵素である。これらのうち、Ptgisの高濃度曝露群のmRNA発現量に有意な減少が認められた。(図(3)－21 C, D) Alox15とTgm2はエイコサノイド合成系のリポキシゲナーゼ経路で働く。Alox15はアラキドン酸に1分子の酸素を添加してヒドロペルオキシドを合成する酵素である。このうち、中濃度曝露群、除粒子曝露群のmRNA発現量に有意な増加が認められた(図(3)－22 A)。Tgm2はロイコトリエンC4からのロイコトリエンD4の合成に働く酵素である。このうち、中濃度曝露群と除粒子曝露群のmRNA発現量に、有意な減少が認められた(図(3)－22 B)。S100a10、S100a6、Pla2g4a、Anxa1、Ptger3はPG合成・制御系で働く酵素である。S100a6はCa²⁺依存性インスリン分泌の刺激やプロラクチン分泌の刺激、開口分泌において機能すると考えられている酵素であり、S100a10は開口分泌と飲食作用において機能すると考えられている酵素である。これらのmRNA発現量において、中濃度曝露群と除粒子曝露群のmRNA発現量に、有意な減少が認められた(図(3)－23 A, B)。Pla2g4aはPla2g2aと同様に生体膜リン脂質からアラキドン酸の遊離させる酵素である。また、別の生理活性脂質であるリゾリン脂質の産生反応や、生体膜構成成分としてのリン脂質分子の再編成

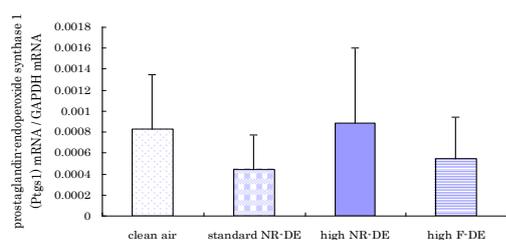
(remodeling)でも中心的に働く。Pla2g4aのmRNA発現量に曝露による影響はみられなかった(図(3)–23 c)。Anx1は、ホスホリパーゼA2阻害活性を示す酵素である。このmRNA発現量に、曝露による影響はみられなかった(図(3)–23 D)。Ptger3はPGE2に関して特定されている4つの受容体の1つであり、消化系、神経系、腎臓の再吸収、子宮収縮活性にかかわる多くの生物学的機能があると考えられている。このうち、除粒子曝露群のmRNA発現量に有意な増加が認められた(図(3)–23 E)。

Hsd17b2は、ステロイド系で働く酵素であり、アンドロステンジオンからエストロンへの合成や、テストステロンからのエストラジオール合成に関与している酵素である。このmRNA発現量に、曝露による影響はみられなかった(図(3)–24)。また、PPAR β は生体内に広く分布し脳内脂質代謝、HDL代謝や脂肪生成、前脂肪細胞分化を調節する酵素である。このうち、除粒子曝露群のmRNA発現量に有意な減少が認められた(図(3)–25 A)。Cyp26a1は生体内の脂質代謝に関与する酵素である。このmRNA発現量では、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群において有意な減少が認められた(図(3)–25B)。

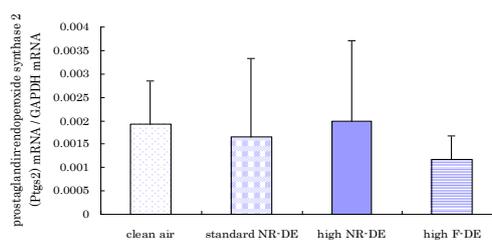


図(3)–20 エイコサノイド合成系の遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

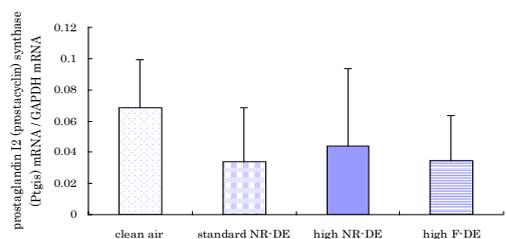
A Ptg1(COX-1)



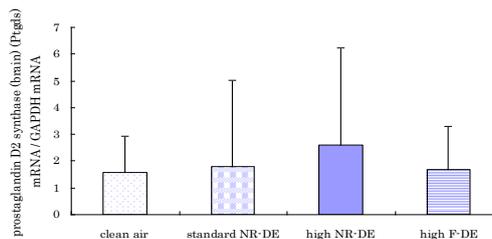
B Ptg2(COX-2)



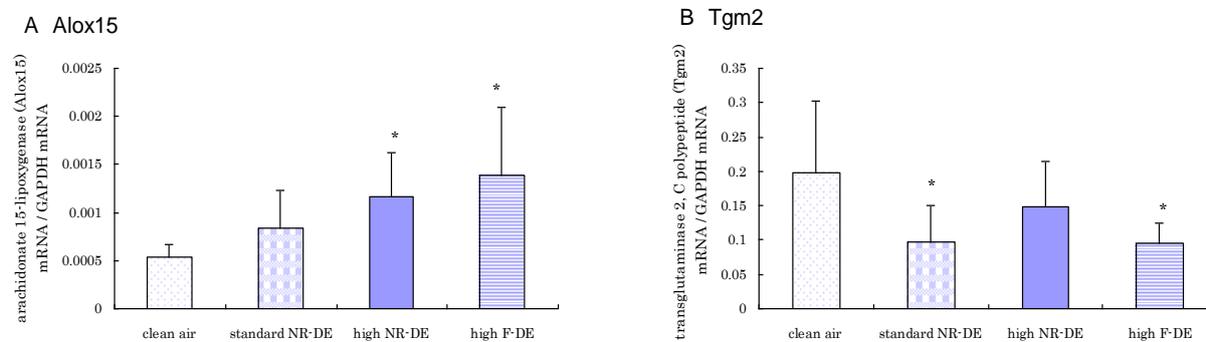
C PGIS



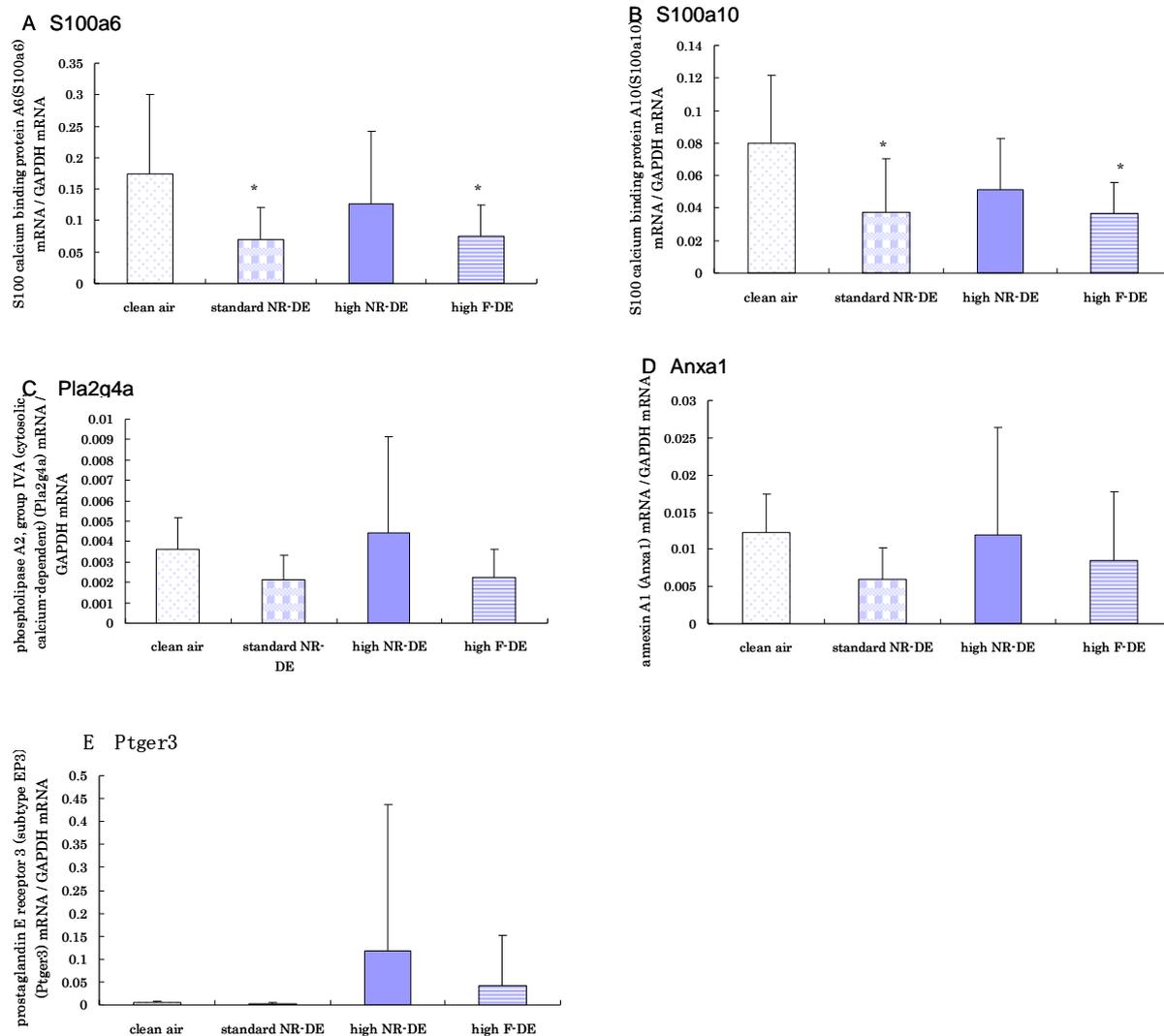
D Ptgds



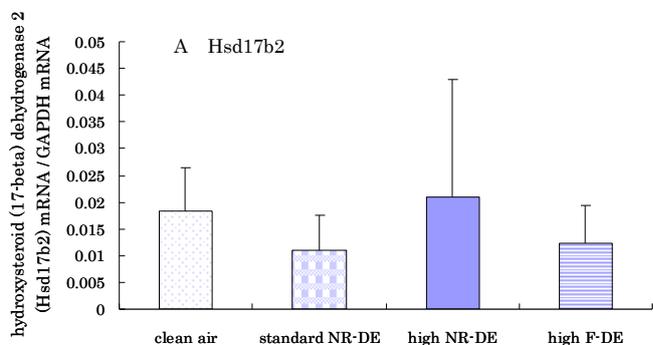
図(3)-21 エイコサノイド合成系・シクロオキシゲナーゼ経路の遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



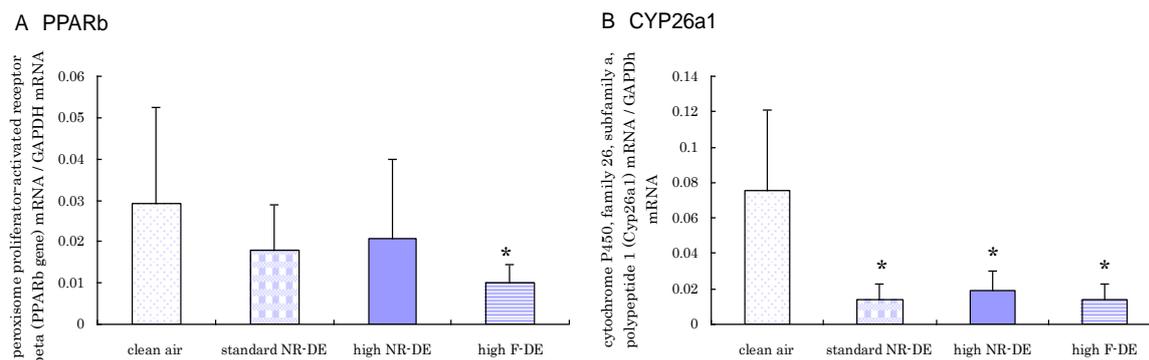
図(3)-22 エイコサノイド合成系・リポキシゲナーゼ経路の遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



図(3)-23 PG合成・制御系の遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



図(3)-24 ステロイド系の遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。



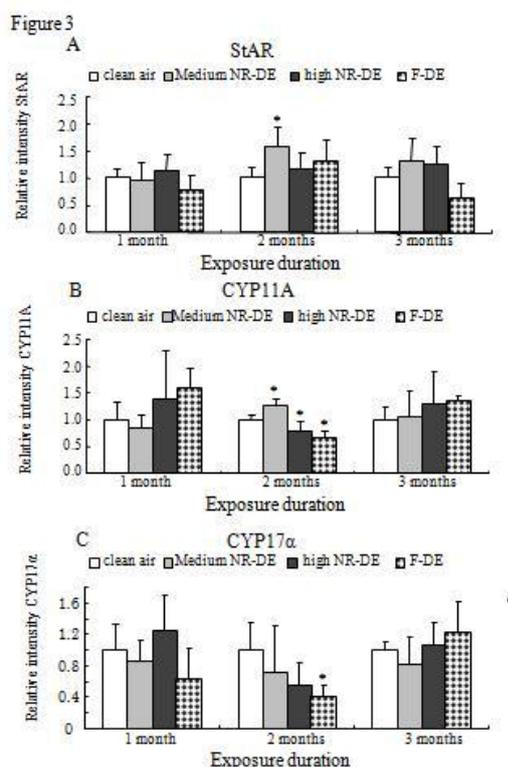
図(3) -25 PPAR、CYPの遺伝子発現。図中のclean air、standard NR-DE、high NR-DE、high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(7) ウェスタンブロット

1) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

a. 精巣中タンパクのウェスタンブロット解析

前述の通り、2か月後中濃度の曝露によりコントロール群と比較してStARとCYP11A mRNAが上昇したが、CYP17 α mRNAには変化が見られなかった。そこで、ウェスタンブロットでタンパクレベルを確認した。2か月後中濃度のNR-DE曝露はStARとCYP11Aのタンパク量を有意に増加させた(図(3) -26 A,B)。2か月曝露後ではコントロール群に比べて有意にCYP11Aタンパク量が減少したが、高濃度曝露群と除粒子曝露群間には差は見られなかった。コントロール群に比べて除粒子曝露群ではCYP17 α 量が有意に減少していた(図(3) -26C)。



図(3) -26 精巣中タンパクのウェスタンブロット解析。図中のclean air、Medium NR-DE、high NR-DE、

high F-DEはそれぞれ、コントロール群、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群を表す。

(8) DNA マイクロアレイによる網羅的解析

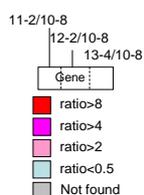
1) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

a. パスウェイ解析結果

Z score値を基にパスウェイのランキング化を行った結果、ヘッジホッグシグナル、ヌクレオチドGタンパク質共役受容体、脂質生成、補体活性化、エイコサノイド合成、接着斑、炎症反応、PG合成・制御、ペプチドGタンパク質共役受容体経路が抽出された。過去のテストステロンの結果同様、中濃度曝露群でのみ変化している遺伝子が多数抽出された。肝臓で変化の見られたエイコサノイド合成、PG合成・制御が精巣でも変化が見られた点が注目される。これまでに曝露によって精巣での上昇が確認されていたStARは本実験の結果では2.6倍の上昇がみられた(表(3)－5、図(3)－27～29)。

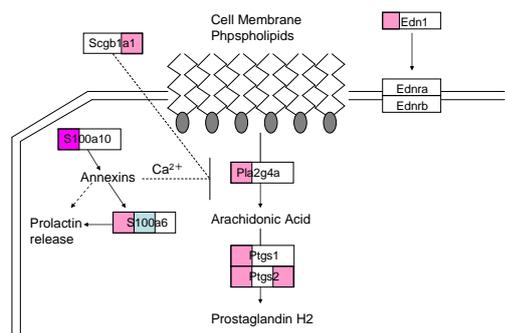
表(3)－5 パスウェイ解析により抽出された経路

	11-2/10-8	12-2/10-8	13-4/10-8
Up	<ul style="list-style-type: none"> ・脂質生成 ・補体活性化 ・エイコサノイド合成 ・接着斑 ・炎症反応 ・PG合成・制御 	<ul style="list-style-type: none"> ・ペプチドGタンパク質共役受容体 	<ul style="list-style-type: none"> ・ペプチドGタンパク質共役受容体 ・ロドプシン様クラスAGタンパク質共役受容体
Down	<ul style="list-style-type: none"> ・ヘッジホッグシグナル ・ヌクレオチドGタンパク質共役受容体 	<ul style="list-style-type: none"> ・脂質生成 	<ul style="list-style-type: none"> ・炎症反応



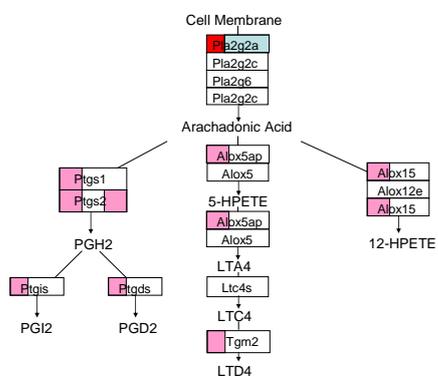
図(3)－27 パスウェイ解析結果の見かた(標準濃度曝露群:11-2、高濃度曝露群:12-2、高濃度除粒子群13-4とコントロール群:10-8の比)

精巣プロスタグランジン合成・制御



図(3)-28 精巣PG合成系

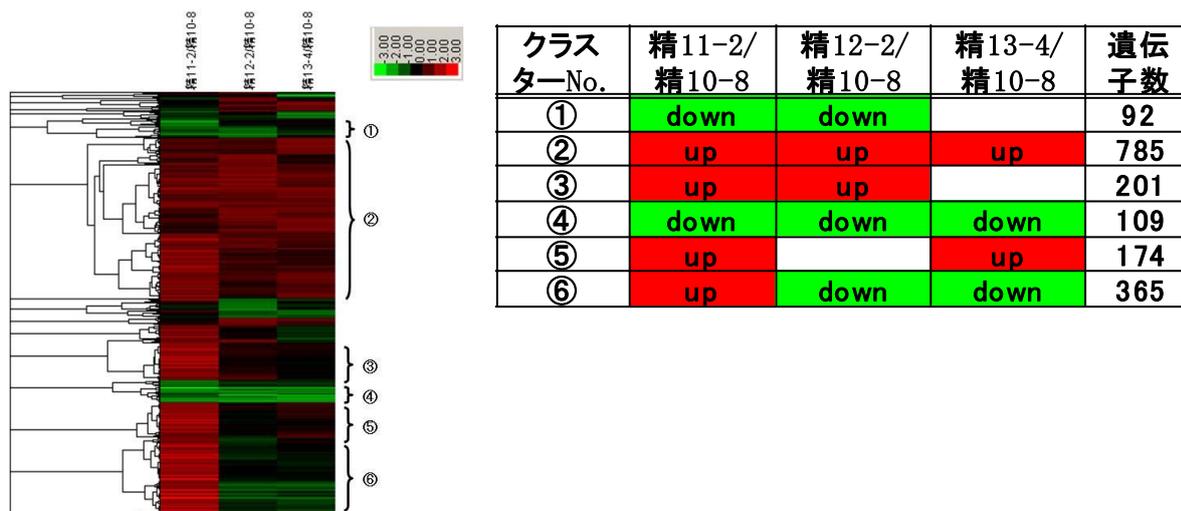
精巣エイコサノイド合成



図(3)-29 精巣エイコサノイド合成系

b. クラスタ解析結果

クラスタ解析を行い、6つに大別された(図(3)-30)。機能がまだ解明されていない遺伝子も含まれているが、クラスタリングされた結果から同じ挙動を示す遺伝子であるとの推測が可能となった。



図(3)－30 クラスター解析結果

c. マイクロアレイのまとめ

マイクロアレイ解析の結果、精巢のエICOSAノイド合成に関与するPl1a2g2aでは中濃度曝露群で増加、高濃度曝露群と除粒子曝露群では減少が見られた。また、Ptgds、Alox15、Ptgis、Tgm2、Ptgs1では中濃度曝露群で増加、Ptgs2では中濃度曝露群と除粒子曝露群で増加が見られた。

精巢のPG合成・制御に関与するS100a10で中濃度曝露群で増加、Pl1a2g4aでは中濃度曝露群で増加、S100a6では中濃度曝露群での増加と高濃度曝露群での減少が見られた。

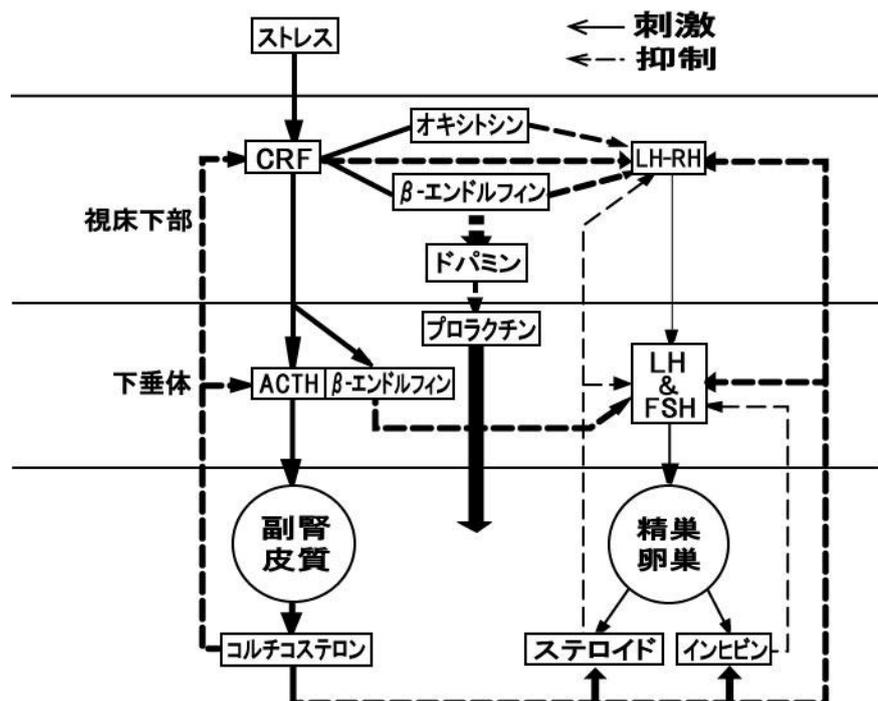
また、Anxa1、Ptger3では中濃度曝露群で増加が見られた。

(9) 全体のまとめと考察

1) 雄マウスの8週間曝露

体重および臓器重量(肝臓、脾臓、腎臓、副腎)については、コントロール群と各曝露群との間で有意な差は認められなかった。血清中のホルモンについては、プロジェステロン、コルチコステロンは、いずれもコントロール群と曝露群との間で有意な差は認められなかった。ペントバルビタール麻酔下での採血がマウスにストレス様刺激(図(3)－31)を与え、すべての群で血中コルチコステロンとプロジェステロン濃度が上昇し、各群間の基底レベルの比較が困難であったものと推察される。

副腎細胞からのコルチコステロンとプロジェステロン分泌量は、全体的な傾向として中濃度曝露群で上昇した。この結果より、NRDEには中濃度で副腎機能を促進することが推察される。しかし、高濃度曝露群と除粒子曝露群ではいずれの群のACTH添加でもこれらのホルモンの分泌量が低下したことから、高濃度のディーゼル排気には、粒子の存在にかかわらずガス成分に副腎皮質機能を抑制する効果があるものと推察される。以前の我々の研究から、ディーゼル排気中から単離したニトロフェノール類に副腎機能を強く抑制する作用があることから^{8,6)}、ディーゼル排気のガス成分中に含有するニトロフェノール等の化学物質が副腎機能を抑制した可能性が示唆された。



図(3)-31 ストレス負荷時における生体の内分泌変化。CRF：副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン、ACTH：副腎皮質刺激ホルモン、LH-RH：性腺刺激ホルモン放出ホルモン、LH：黄体形成ホルモン、FSH：卵胞刺激ホルモン

精巣重量や副生殖腺（精巣上部、前立腺、精のう腺）重量については、コントロール群と各曝露群との間では有意な差が認められず、精子数についても同様の結果であった。

血中ホルモン濃度については、主として精巣から分泌されるテストステロン、下垂体前葉から分泌されるFSHとLH、副腎から分泌されるコルチコステロンとプロジェステロン濃度にもコントロール群と各曝露群との間で有意差は認められなかった。本研究では、マウスをペントバルビタール麻酔下で採血した後に臓器を摘出していることから一定のストレスがかかっていると推察されるが、血中コルチコステロン濃度の結果から、そのストレスの程度は各群間で差は無いものと解釈された。

精巣のライディヒ細胞からのテストステロンの基礎分泌量は、コントロール群と比較して高濃度曝露群では高く、除粒子曝露群では低い結果となった。hCGの刺激に対する反応性については、中濃度曝露群でhCG 10^{-1} モルの投与によりコントロール群よりもテストステロン分泌量が多く、hCGに対する反応後の上昇が認められた。一方、除粒子曝露群では、hCGの刺激に対してはテストステロン分泌反応性は、コントロール群に比較して著しく低く、基礎分泌においても著しく低いことから、テストステロン分泌が著しく抑制されているものと推察された。

下垂体前葉細胞の培養結果については、LHの基礎分泌量には、コントロール群と各曝露群で差は認められないが、GnRH 10^{-7} モル投与群でいずれの曝露群でもコントロール群よりもLH分泌量が有意に高く、反応性は増加したと解釈された。除粒子曝露群においても反応性の低下は認められず、精巣ライディヒ細胞と対照的な結果であった。

平成21年度に行った副腎細胞の培養結果では除粒子曝露群において、コルチコステロンとプロ

ジェステロン分泌が著しく抑制される結果となったことから、本年度の精巣ライディヒ細胞の結果と類似した結果であった。前年度と本年度の結果を統合して考察するとナノ粒子の曝露濃度により差はあるが、ステロイドホルモン分泌細胞においては、低濃度で促進、高濃度で抑制し、除粒子曝露は著しく抑制作用を有すると解釈された。一方、蛋白ホルモンを分泌する下垂体前葉細胞では、除粒子曝露により分泌抑制は認められないことから、ガス成分には、ステロイドホルモン分泌細胞と蛋白質分泌細胞で明らかに異なった作用があるものと解釈された。

今回曝露実験に用いたガス成分については、現時点においては明らかでは無いが、これまでの研究でガス成分中にニトロフェノール類の含有が確認されている。また、ニトロフェノール類には、ステロイドホルモンの分泌抑制作用や肝臓機能を抑制する作用が認められていることから、ガス成分の中でニトロフェノール類が有力な候補成分の一つと推察される¹⁻²²⁾。

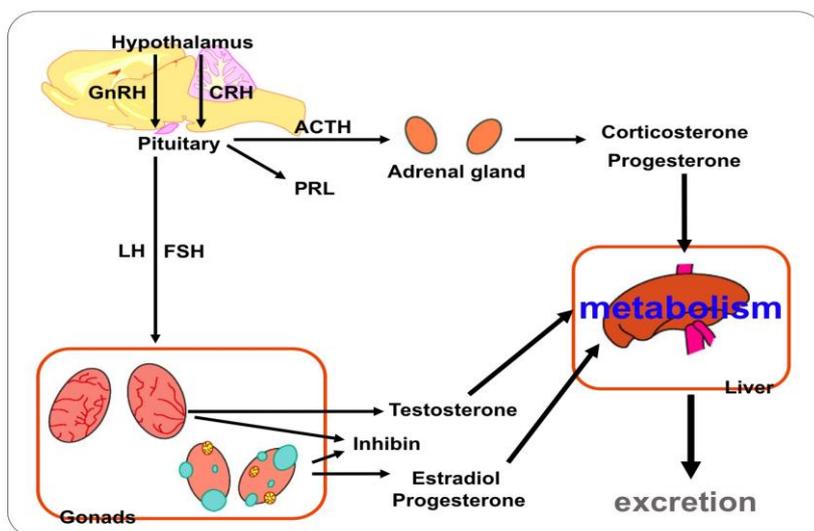
図(3)-32に各種ホルモン分泌と代謝調節に関する模式図を示した。視床下部で神経分泌されたペプチドホルモン(GnRHや副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH))が下垂体門脈を通過して下垂体前葉に到達しそれぞれの分泌細胞から蛋白質あるいは糖蛋白ホルモンの分泌を刺激し、これらの刺激ホルモンが精巣や副腎に作用してステロイドホルモンの分泌を刺激する。分泌されたステロイドホルモンは、各臓器で作用した後、肝臓で最終的に代謝され尿や糞中に排泄される。

今回のナノ粒子曝露のマウスから得られた結果を考察すると、次のような仮説が提唱される。

「ナノ粒子の全身曝露により視床下部・下垂体前葉系の機能に抑制作用はないが、精巣のライディヒ細胞からのテストステロン分泌が著しく抑制される。しかし、血中テストステロン濃度には差がないことから、ナノ粒子が肝臓でのステロイドホルモンの代謝機能を低下させ、結果としてテストステロンが血中に長期間残存したものと推察される。

7週齢の雄マウスを8週間ディーゼル排気ナノ粒子に曝露すると、高濃度曝露群において、(1)血中テストステロン濃度が上昇し、精巣ライディヒ細胞からのテストステロン基礎分泌量およびhCG刺激分泌量の増加が明らかとなった。さらに、精巣内のステロイドホルモン生合成に関連する10個の酵素や関連因子についてPCR法によりそれぞれのmRNA量を定量した結果、高濃度曝露群において9個の関連因子が有意な増加を示すことが明らかとなった。これらの結果を総合すると、ディーゼル排気中に含有されるナノ粒子は、高濃度になると精巣ライディヒ細胞からのテストステロン分泌量を増加させることが判明した。このナノ粒子のテストステロン分泌増加作用は、下垂体からの性腺刺激ホルモン分泌を介するものではなく、精巣のライディヒ細胞に直接作用してステロイドホルモン生合成酵素や関連因子の発現量を増加させることによると判明された。また、平成22年度の研究において、除粒子曝露群において初代培養ライディヒ細胞からのテストステロン分泌量が基礎分泌量、hCG刺激分泌量共にコントロールよりも低下することが判明した。しかし、除粒子曝露群においては、血中のLH、FSH、テストステロン濃度に精巣のステロイドホルモン分泌関連因子のmRNA発現量にもコントロールとの間で有意差が認められなかった結果から、メカニズムは不明であるがライディヒ細胞からのテストステロン分泌に何らかの抑制作用を有しているものと推察された。

なお、今回明らかにした結果は、8週間のディーゼル排気ナノ粒子曝露による結果であり、曝露期間がさらに長期に渡った場合の影響については、不明である。



図(3)-32 視床下部・下垂体・性腺（精巣・卵巣）軸と視床下部・下垂体・副腎軸におけるホルモン分泌調節と代謝の関係

2) 妊娠ラットの20日間曝露

妊娠期間中にディーゼル排気ナノ粒子曝露を受けた妊娠ラットでは、血中プロジェステロン濃度の低下、血中LH、エストラジオールおよびコルチコステロン濃度の上昇が認められた。また、黄体中の2種類ステロイドホルモン生合成酵素(3 β -HSDとP450SCC)とLHリセプター数の低下が認められた。これまでの研究から、妊娠中のラットでは、妊娠を維持するための(1)プロジェステロンは、妊娠黄体から分泌され、胎盤はプロジェステロンを分泌しないこと、(2)妊娠中期(15日頃)には、胎盤がテストステロンを分泌し、このテストステロンが妊娠黄体に移行して、エストラジオールに変換され血中に分泌されるが妊娠末期の20日では、エストラジオールの分泌源は、卵胞の顆粒層細胞が主体であること、(3)妊娠黄体からのホルモン分泌は、LH、プロラクチン及び胎盤性ラクトージェンが促進することが明らかになっている。本研究においては、血中LHが高濃度曝露群と除粒子曝露群で上昇していること及び血中プロラクチンは中濃度曝露群と除粒子曝露群で上昇傾向にあることから、中濃度曝露群と除粒子曝露群の妊娠20日の黄体は、プロジェステロン分泌能が低下したと推察される。血中プロジェステロン濃度の低下により、視床下部・下垂体への負のフィードバック作用が減弱して下垂体前葉からのLH分泌が上昇したと推察される。この血中LH濃度の上昇を受けて後分娩排卵に向かう卵胞の成熟が促進された結果血中エストラジオール濃度が上昇したものと推察される。一方、黄体では、LHリセプターの減少により、血中LH濃度が上昇してもプロジェステロン分泌量の増加は認められなかったと推察される。これまでの研究から、エストラジオールは、妊娠後半期には、分娩に備えて子宮筋や膈のオキシトシンリセプターとリラキシンリセプターの発現を促進する事実が明らかにされている。これらの事実と本研究における結果を総合して考察すると、ディーゼル排気ナノ粒子が長期間に渡り妊娠動物に曝露された場合には、流産率が増加する可能性が示唆される。また、本研究の結果から、黄体からのプロジェステロン分泌低下は、ナノ粒子や除粒子ガス成分が視床下部や下垂体前葉に作用するのではなく、卵巣の黄体に直接作用してプロジェステロン分泌に関与する因子の発現を抑制した結果で

あろうと推察された。

一方中濃度曝露群と除粒子曝露群で血中コルチコステロン濃度が上昇したことについて考察すると、両群では副腎皮質機能の上昇が考えられる。本研究では、血中ACTHと副腎皮質刺激ホルモン放出ホルモン(CRH)濃度を測定していないことから、ナノ粒子や除粒子ガス成分が直接副腎皮質に直接作用した結果かあるいは視床下部・下垂体前葉にも作用した結果かについても考察できない。いずれにしても、妊娠ラットの血中コルチコステロン濃度が上昇する結果として雄胎子の脳の性分化への影響が懸念される。これまでの研究から哺乳類の脳の性分化は、性的二型核が基本的には雌型であり、雄では、胎子期に雄胎子自身の精巣から分泌されるテストステロンが脳の性的二型核に移行し、アロマターゼの作用によりエストラジオールに変換され、このエストラジオールが性的二型核の細胞を増殖して雄性化(脱雌性化)を誘導すると解釈されている。また、この脱雌性化の起こる時期は、臨界期と呼ばれ動物種により異なるが、この臨界期の時期に妊娠中の母親に強いストレスがかかり、母親の副腎から多量のグルココルチコイドが分泌されると、そのグルココルチコイドが胎子の体内に移行し胎子精巣からのテストステロン分泌を抑制する結果として、雄胎子の性的二型核の脱雌性化が阻害されることが実験動物や人で報告されている。これらの事実を勘案すると妊娠中の動物が多量のナノ粒子や除粒子ガスに曝露された場合、胎子が雄である場合には、性的二型核の脱雌性化が阻害される可能性が示唆される。

本研究では、胎子については、体重、体長およびペニス(雄)あるいはクリトリス(雌)から肛門までの距離を測定したのみであるが、体重は、中濃度曝露群と除粒子曝露群で雌雄胎子共にコントロール群よりも有意な高値を示し、体長は、中濃度曝露群と除粒子曝露群で雌雄胎子共にコントロール群よりも有意な低値を示した。また、雌胎子では、クリトリスから肛門までの距離が除粒子曝露群でコントロール群よりも有意に長い結果が得られた。これらの変化は、ディーゼル排気ナノ粒子が長期間に渡り妊娠動物に曝露された場合には、母動物に起こった内分泌学的変化が、胎盤を通して、胎子の発達にも影響するものと解釈できる。この点については、今後胎子の脳や様々な臓器の機能への詳細な研究が必要である。

3) 雌マウスの3～12ヶ月間曝露

本研究では、雌マウスを用いて、3ヶ月、6ヶ月および12ヶ月のナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガスの吸入曝露を行った。

3ヶ月曝露では、各臓器、各ホルモン濃度において、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかった。また、採材当日のみではあるが、膣スメアの観察結果は、休止期の割合がほぼ同率であることから、本実験の曝露濃度の3ヶ月間の曝露では卵巣には際立った影響は起こらなかったと推察された。

6ヶ月曝露では、体重と副腎重量、卵巣重量、子宮重量および膣重量は、コントロール群と比較して各曝露群に有意差は認められなかったが、腸管の長さは、除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意に減少していた。膣スメアの結果においても、曝露の影響は認められなかった。腸管の長さの短縮は、潰瘍性大腸炎などが考えられるが、原因は不明である。

12ヶ月曝露では、体重と腎臓重量が、除粒子曝露群でコントロール群と比較して有意に増加していた。副腎重量は、コントロール群と比較して、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で有意な低値が認められた。しかし、各臓器重量を体重あたりに換算して比較すると、どの臓

器においても、コントロール群と比較して、各曝露群に有意差は認められなかった。プロジェステロン濃度は、コントロール群と比較して各曝露群に有意な差は認められなかったが、各曝露群ともに上昇傾向であった。インヒビン濃度は、コントロール群と比較して、中濃度曝露群で有意な高値を示した。

このことより、本実験の曝露濃度によって、成長に差がでることが判明したが、この影響は、多くの化学物質の曝露によって生じるような体重減少ではなく、体重の増加であった。この体重増加は、ディーゼル排気除粒子ガス自体が成長に毒性を示したというより、卵巣切除をマウスで行うと体重が増加することに類似した、卵巣周期の異常により、エストロゲンなどのホルモンに影響が出て、脂肪蓄積が起りやすくなったことが原因と考えられる。また、TBTのような脂肪細胞への分化を誘導する働きがある可能性も考えられる。

膣スメアの観察から、高濃度曝露群および除粒子曝露群の休止期の割合が非常に高く、卵巣周期の停止が考えられる。これに加え、プロジェステロン濃度の上昇傾向は、主な分泌源が黄体であることから、黄体退行に働くプロラクチンの分泌が低下している可能性を示唆している。

高濃度曝露群のインヒビン濃度の上昇は、同時期のFSHの低下を示唆しており、これより顆粒層細胞の増殖など、卵胞の成長が促進されていることが考えられる。高インヒビンは、すでにインヒビンを高濃度で分泌する卵胞の存在を示しており、ある程度成長した卵胞が残った状態で維持されていると考えられる。また、インヒビン濃度の上昇は、高濃度群のみで、除粒子群では起こっていないことから、ナノ粒子自体の影響、もしくはナノ粒子存在下での高濃度のガス成分の影響である可能性が示唆された。

卵巣の組織学的観察では、直径300 μ m以上の胞状卵胞数が、高濃度曝露群、除粒子曝露群で少ないことが確認された。これはFSH、LHなどの卵胞の発育に関与するホルモンの低下がGnRH濃度の低下により引き起こされた可能性が考えられる。中濃度曝露群では、直径300 μ m以上の正常な胞状卵胞数には、大きな変化がないが、閉鎖卵胞数は多かった。これは、ある程度の大きさまで卵胞を発育させるには十分なFSH、LHなどの性腺刺激ホルモンが分泌されているが、排卵前に閉鎖するか、LHサージを受けたあとに排卵されない卵胞が多い可能性が考えられ、上記と同様にGnRH、FSH、LHの濃度低下や、エストラジオールの分泌濃度が低く十分なLHサージが起こっていない可能性が考えられる。

黄体数は、除粒子曝露群で増加しており、黄体の退行が遅れていることが示唆された。この原因としては、プロラクチンの分泌の低下による可能性が挙げられる。一部の個体は、これにより周期が停止していることが予想される。これらの多くの黄体が存在することより、周期が停止している個体であったとしても曝露終了に比較的近い時期まで排卵が行われていた可能性が考えられる。

これらの卵巣の組織学的観察結果から、前述した膣スメア像の休止期の増加は、除粒子群で多くの黄体が観察されたことより、PRL分泌が関係している可能性がより支持された。しかし、高濃度群での血清中インヒビン濃度の増加につながる卵巣の組織学的変化は認められなかった。

以上の結果より、ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガスの曝露は6ヶ月曝露まではマウスの卵巣機能に目立った影響を及ぼさないが、12ヶ月の曝露では、卵巣機能へ大きな影響があると推察された。

4) 仔ラット（雌）の1ヶ月曝露

本研究では、外部因子の影響を受けやすい離乳直後のラットを用いて、NR-DEの曝露実験を行った。

本研究の結果から、1か月間のNR-DE曝露期間で、曝露による体重増加への影響は認められなかった。しかし、膣開口日齢が、除粒子曝露群で有意に遅延した。これより、除粒子曝露群のラットでは、性腺刺激ホルモン分泌の低下が起きていることが推察された。除粒子曝露群のガス成分の中に含まれるいかなる化学物質が原因であるかは、不明であるが、抗エストロゲン作用を持つ成分が含まれている可能性が示唆された。作用機序としては、エストロゲンレセプターに結合能を有する外部因子がエストロゲンレセプターを塞ぎ、内因性のエストロゲンの作用を妨害している可能性、視床下部や下垂体に影響を及ぼしている可能性、核内受容体ではなくGPCR（G protein coupled receptor）の一種のGPR30などの細胞膜上レセプターを介して抗エストロゲン作用を及ぼしている可能性が考えられる。GPR30を介した反応としては、抗エストロゲン作用をもつタモキシフェンの投与によりエストロゲン作用が阻止されたという報告がある(Thomas et al.2005)。また、tributyltin (TBT) で見られるようなステロイドホルモン合成に関わる酵素（アロマターゼなど）の活性を下げている可能性もある。

本研究で抗エストロゲン作用を起こした物質として、ニトロフェノール類が有力と考えられる。DEPから抽出したニトロフェノールのPNMC、PNMPPは、組み換え酵母スクリーンアッセイと未成熟雌ラットを用いた実験で、エストロゲン作用があること(1)や、PNMC、PNMPP、PNP、PNOCは、human androgen receptor(hAR)-yeast screen assayにより、抗アンドロゲン作用を持つなどの内分泌攪乱物質が確認されている²⁾。日本ウズラにPNMCを筋肉注射した研究では、LH濃度と濃エストラジオール-17 β 濃度の減少が確認されている³⁾。本研究では、除粒子群で膣開口が遅れたことより、内因性のエストラジオール-17 β が出ていないことが考えられ、これはエストラジオール-17 β を分泌する卵胞が少ないことと推察される。卵胞の発育に影響を及ぼすものとして、GnRHによるLHの分泌が抑制されていることが考えられるため、前述のウズラの研究のようにLHの分泌にニトロフェノールが影響した可能性が考えられる。

また、エストロゲン受容体を発現させた組み換えイースト菌を用いた実験で、ある種の多環芳香族炭化水素（PAHs）はエストロゲン受容体を介した遺伝子発現に影響を与えることが報告され、ベンゼン、ジクロロメタンおよびメタノールにより抽出されたDEP抽出物が抗エストロゲン様作用を有していることも報告されている²⁾。PaHの一つである、ベンゾピレンは、子宮のER α に変化を与え、子宮の機能を変化させる抗エストロゲン作用も確認されている。しかし、本研究では除粒子群と同濃度の高濃度ガス成分が含まれている高濃度群では、膣開口の遅延は見られず、早まる傾向を示していることから、高濃度のガス成分には抗エストロゲン作用があることが示唆されるが、ナノ粒子自体にはエストロゲン作用がある可能性、もしくはナノ粒子存在下では除粒子曝露群で膣開口の遅延を引き起こした成分が異なる挙動を示す可能性が考えられる。近年、除粒子中に、多量のPNPが含有されていることを示すデータがあることから、ガス成分に混在するニトロフェノール類が原因の1つとして考えられる。

50日齢から観察した膣スメアは、4~7日間のみ観察であったが、コントロール群に比べ、曝露群で異常周期が増えたという結果はなく、春機発動の指標である膣開口時に見られたような内

分泌への影響は、性成熟後には回復して発情周期に影響を及ぼすレベルではなくなっていると考えられる。

肝臓、胸腺、腎臓、副腎、脾臓の重量においては、曝露による影響は認められなかった。肺の重量は、中濃度曝露群と除粒子曝露群で有意な減少が認められたが、体重あたりの重量に換算して比較すると、有意差はなかったことと、肉眼的な異常はなかったことより、肺に対しても大きな影響は認められないといえる。

子宮重量は、休止期1日目の中濃度曝露群で有意な増加が見られたが、他の発情周期で採材した個体については、有意差は認められなかった。また、卵巣重量においても、有意な差は認められなかった。

血中プロジェステロン濃度についても、コントロール群と曝露群の間に有意な差は認められなかった。休止期での高濃度群の上昇傾向および発情期での高濃度曝露群の上昇傾向や、除粒子曝露群の低下傾向は、排卵数の影響を受けていると考えられる。

血中エストラジオール-17 β 濃度については、発情前期の高濃度曝露群でコントロール群と比較して有意な低下が認められた。この発情前期でのエストラジオール-17 β 濃度の低下は、十分な数と十分な大きさの卵胞が発育していないことによると予想されたが、後に述べる卵巣組織の観察の結果から、胞状卵胞の成長はコントロール群と差がないことから、卵胞の成熟度が低いことからエストラジオール-17 β を分泌する能力が低い可能性が考えられる。

血清中FSH濃度は、コントロール群と曝露群の間に有意差は認められなかった。下垂体FSH含有量は、曝露による有意な影響は認められなかったが、発情前期の中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で低下傾向であった。

血清中LH濃度は、休止期で採血した個体の中濃度曝露群で、有意な上昇が認められた。また、発情前期の中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群では減少傾向であった。下垂体中LH含有量は、休止期の中濃度曝露群でコントロール群と比較して有意な増加があり、発情期では、中濃度曝露群、高濃度曝露群、除粒子曝露群で低下傾向であった。これより、休止期の中濃度曝露群では、エストラジオール-17 β およびGnRHの濃度が低く、LHのパルス状分泌の幅が大きいことが考えられる。

血清中PRL濃度は、コントロール群と各曝露群の間に有意差は認められなかった。下垂体中PRL含有量は、コントロール群と比較して、発情前期の高濃度曝露群で有意な上昇が認められた。この高値は、発情期や休止期で高濃度曝露群でプロジェステロン濃度が上昇傾向であったため、黄体退行を促すPRLが多く作られたと考えられる。

排卵数は、高濃度曝露群で増加傾向が見られたが、コントロール群と曝露群との間に有意差は認められなかった。また、卵胞数の結果では、100 μm 以上の総正常卵胞数および総閉鎖卵胞数も、コントロール群と曝露群で有意差はなかった。100~200 μm 、200~400 μm 、400 μm 以上の卵胞に分けて、正常卵胞数と閉鎖卵胞数を確認しても、有意差はないことから、曝露による卵胞発育には影響はないと考えられる。卵胞数が変化する原因としては、エストラジオール-17 β 、LH、FSH、インヒビンなどの濃度変化が考えられ、前述のように本研究でもこれらのホルモンにいくつかの変化は認められたが、これらの変化が卵胞の発育を阻害するレベルには至っていないと推察された。他の研究では、ディーゼル排気ガスに胎生7日目から曝露された雌胎仔の卵巣では、原始卵胞の形成が阻害されたという報告や(23)、胎仔期に高濃度の排出ガス(粒子状物質1.71mg/m³、NO

濃度は0.79ppm) もしくは除塵排出ガス(粒子状物質0.01mg/m³以下で50μm以上の粒子を除去、NO₂濃度は0.80ppm)に曝露されたラットの生後28日後の卵巢で、原始、一次、二次卵胞が少なく、退化した卵胞が多く見られ、胎仔期・哺乳期に高濃度ガスおよび除塵排出ガス曝露を受けた個体の生後90日後の卵巢では、発育段階にある卵胞が少なく、閉鎖卵胞と大きな黄体が目立ったという報告がある(24)。これらの研究は、本研究のナノ粒子とは粒径などに違いはあるが、曝露時期や曝露期間によっては卵巢機能に大きく影響する可能性を示唆している。

5) 雄ラットの1～3ヶ月曝露

研究目的の1つは、NRDE曝露がラットにおいて精巣だけではなく、海馬のステロイド合成に影響を与えるのかを明らかにすることである。1か月の高濃度曝露(149±8μg/m³)と2か月の中濃度曝露により有意に血漿及び精巣のテストステロン濃度の上昇が見られた。この結果はLiら(2009)の同一条件で曝露を行った時の結果に似ている。1か月高濃度曝露の海馬において、コントロール群に比べ有意なアンドロステンジオンの上昇と、統計的に有意ではないがテストステロンの上昇傾向が見られた。高濃度の1か月曝露後、海馬ではStAR mRNAやタンパク量に変化は見られなかったが、精巣ではmRNAの若干の上昇がみられたことから、NRDEは精巣のステロイド合成に影響を与えるが、海馬のステロイド合成に影響を与えないかもしれない。実際、Hojoら(2009)は海馬のテストステロンはほぼすべて精巣に由来することを報告している。以上から、血漿中と海馬中のテストステロンは直線関係にあり、これらはNRDE曝露ラットの精巣でのステロイド合成を反映していることが示唆される。

Wistarラットの海馬細胞のステロイド合成酵素の発現量は、17β-HSDが精巣の1/100、アロマターゼとCYP17αが1/500、3β-HSDとCYP11Aが1/5000、StARが1/100～1/1000であることが報告されている(Kimoto et al., 2001)。今回の研究ではStAR mRNA量は前述の論文と同程度であるが、CYP11A, aromatase, and 17β-HSD mRNA量は約2.5-から20-fold高く、CYP17αは1/10であった。ステロイド合成酵素はグリア細胞にも存在することが報告されている(Kimoto et al., 1997)。そのため、この違いは動物の系統の違いか、サンプルの細胞種の違いによると思われる。以上から、海馬のステロイド合成分子の発現量は精巣に比べてかなり低いと言える。このことから海馬のテストステロンは精巣での産生に依存していることが示唆される。

今回の実験のNRDE群にはガス成分と粒子成分の両方が含まれる。そこで、本研究のもう1つの目的はどちらの成分が精巣や海馬のステロイド合成に影響を与えるかを明らかにすることである。1か月の高濃度曝露群はコントロール群に比べて精巣中のテストステロン濃度が高いが、除粒子曝露群はこのような変化が見られない。高濃度NRDE曝露は海馬においてアンドロステンジオンを上昇させているが、除粒子曝露では影響が見られない。一方、2,3か月の除粒子曝露はそれぞれ血漿中のテストステロンの上昇または精巣中のテストステロンの減少を引き起こしているが、高濃度NR-DEではこれらの変化は見られていない。加えて、どの項目においても中濃度曝露群と除粒子曝露群間には有意な変化は認められていない。サンプル数による統計の検出力の問題があるが、ガスと粒子の両方がNRDEによるステロイド合成の影響をもたらしていると思われる。この点に関してはさらなる研究が必要である。

PM10に比べて小さい粒子の方がより有害影響をもたらす可能性があることから、2009年9月にPM2.5の環境基準値は設定された(Ministry of the Environment, 2009; USEPA, 2006)。この環境基準値

は平均15 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ /年、平均35 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ /日以下である。本研究の中濃度NR-DEは38 $\mu\text{g}/\text{m}^3$, 5 時間/日, 5 日/週で行ったものである。この濃度は日本のPM2.5の環境基準値とほぼ同程度であり、24時間平均にすると9.3 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ と明らかに環境基準値よりも低い濃度となる。興味深い事に、さらに低い低濃度NRDE曝露(推定24時間平均値: 5.1 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)でも精巣中と血漿中のテストステロン濃度を上昇させている(Ramadhan et al., 2009; Li et al., 2009)。このことから、本研究はPM2.5の環境基準値の見直しの必要が示唆される。

DNAマイクロアレイの結果、ヘッジホッグシグナル、ヌクレオチドGタンパク質共役受容体、脂質生成、補体活性化、エイコサノイド合成、接着斑、炎症反応、PG合成・制御、ペプチドGタンパク質共役受容体経路が抽出された。特に、PG合成・制御、エイコサノイド合成は肝臓でも変化しておりNR-DEによる影響マーカーとして注目される。

PGは一般的に、男性生殖器の雄性化に関わるとされている⁸⁾。GnRHのライディッヒ細胞のテストステロンへの直接の上昇作用に、PGF₂やシクロオキシナーゼ1が必要との報告があり⁹⁾、ライディッヒ細胞でのテストステロン合成亢進に加え、PG合成が促進したことがテストステロンの上昇につながっていた可能性が考えられる。さらに、PGの中にはPPAR γ のリガンドとなるものが存在する¹⁰⁾。PPAR γ はStARの発現を上昇させることが報告されており¹¹⁾、この内因性のPGの合成亢進が精巣のStARの発現上昇をもたらす精巣のテストステロン合成を促進させていた可能性もある。

その他ピックアップされた経路のうち、補体の活性化は肺胞での報告がある¹¹⁾。標準濃度曝露群では炎症反応経路も促進されており、好中球を遊走させるケモカインとして作用している可能性がある。その他の経路はディーゼル排気ガスとの関連に関する報告は乏しく、また精巣での役割ははっきりしないため、今後の検討課題である。

今回個々の遺伝子のmRNA発現量の測定を行ったが、上記のマイクロアレイ解析の結果と個々の遺伝子のmRNA解析の結果には相違があった。理由としては、マイクロアレイ解析では各群から1匹ずつを選出し、コントロールとの比で値を出しているのに対し、定量リアルタイムPCRでは各群8匹全てを解析して、平均の値を用いていることから、個体差によるばらつきが大きかったことが考えられる。今回は、肝臓と精巣双方に変化の見られたエイコサノイド合成系について特に注目して解析を行った。Pla2g2aはエイコサノイド系において最初に生体膜リン脂質からアラキドン酸の遊離させる酵素である。今回はhigh F-DEでのみmRNA発現量に有意な増加が認められたので。Pla2g2aの発現量の増加に関与するのは粒子ではなくガス成分であるのかもしれない。Pla2g2aはホスホリパーゼA2の中でも分泌型であり、前立腺癌のバイオマーカーとしても知られている⁶⁾。しかし、グループII型のホスホリパーゼA2の体内作用は未だに明らかにされていないため、今後の検討課題である。エイコサノイドのシクロオキシゲナーゼ経路で働くPGISにおいては中濃度曝露で顕著な減少が認められたが、アラキドン酸からPGD₂を経由し、PGI₂が合成される間のCOX-1には有意な差は認められなかったため、経路全体ではなくPGISが単独で減少しており、PGISの減少に関与するのは粒子成分であるのかもしれないと考えられる。PGISは、炎症のメディエーターとして働くこと、血管平滑筋の増殖抑制作用や虚血障害からの心筋保護に関与することなどが報告されている。しかし精巣でのPGISの役割については、未だ報告が少ない。また、エイコサノイドのリポキシゲナーゼ経路で働くAlox15のmRNA発現量において高濃度曝露群、除粒子曝露群で上昇が確認された。中濃度曝露群でも増加していたが有意ではなかった。アラキドン酸代謝酵素の一つであるリポキシゲナーゼには、アラキドン酸への酸素添加部位の違いによって、5-LOX・8-LOX・

12-LOX・15-LOXなど多くのアイソフォームが知られている。リポキシゲナーゼ産物が、ライディッヒ細胞のステロイド合成に強く関与することが報告されている⁷⁾。昨年度までの研究で、2ヶ月間曝露のラットで精巣テストステロンが有意に増加していたのは中濃度曝露群のみだったが、今回PCR解析の結果で高濃度曝露群・除粒子曝露群でAlox15の発現量の増加が見られたことから、少なくともAlox15に対してはNR-DEが容量反動的に作用していること、また両者に有意差がなかったことから、Alox15の発現量に影響するのは粒子成分でなくガス成分であるかもしれないこと、テストステロン以外のステロイド合成系の新たなバイオマーカーになるかもしれないことなどが考えられた。Alox15と同様に、エイコサノイドのリポキシゲナーゼ経路で働くトランスグルタミナーゼ (Tgm2) においてもstandard NR-DEとhigh F-DEで有意な減少が認められているが、これも経路全体ではなくTgm2が単独で減少しており、Tgm2の発現減少に関わるのは粒子成分ではなくガス成分であるかもしれない。トランスグルタミナーゼは全組織に存在し、セルトリ細胞での卵胞刺激ホルモン抑制に関与することが指摘されている⁸⁾他、細胞膜の修復や死細胞の処理、細胞外マトリクスの強化などにも関与していることが知られている。また、PG合成・制御系で働くS100a6とS100a10のmRNA発現量は、ともにstandard NR-DEとhigh F-DEで減少していた。このことから、S100A6とS100A10の発現量に影響しているのは、粒子成分ではないかもしれない。S100A6とS100A10はともに10-14kDaの小さなカルシウム結合タンパクで、さまざまな細胞内外のプロセスに関与することが知られている⁹⁾。特にS100A10はマクロファージ上の重要なプラスミノゲン結合部位であり、S100A10減少マクロファージではプラスミノゲン依存性侵襲能力が減退し、プラスミン生成やMMP-9活性化を減退させるという報告もある^{10・11)}。S100A6については細胞周期や細胞骨格形成に関与しているという報告もある¹²⁾。また、S100aA10、S100A6はAnnexin A2に結合することが知られている。今回の実験ではAnnexin A2のmRNA量は測定していないので断定できないが、中濃度曝露と除粒子曝露がAnnexin A2とS100A6、S100A10の複合体の減少に関与しているのかもしれない。中濃度曝露によってS100A10の減少が引き起こされ、マクロファージ侵襲能力の減退による免疫能の低下が起こっている可能性がある。また、CYP26A1ではコントロール群と比較して中濃度曝露、高濃度曝露、除粒子曝露のいずれにおいても著大な減少が認められた。このことから、CYP26a1の発現量にはガス成分であると考えられる。CYP26A1は細胞内のRA (retinoic acid) 濃度や細胞増殖、主要RA標的遺伝子の転写規制、体腔内内胚葉へのES細胞の分化の調節に関わると報告されている¹³⁾。CYP26A1の低下による生殖毒性が生じる可能性が示唆されたこと、また中濃度のNR-DE曝露によって精巣内でCYP26A1の低下が生じたことは重要であり、今後更なる研究が必要であると考えられる。PPAR γ はStARの発現を上昇させることが報告されている¹⁷⁾。そのため、内因性のPGの合成亢進が精巣のStARの発現上昇をもたらす精巣のテストステロン合成を促進させていた可能性を考え、PG合成・制御系の中のPPAR γ (PPAR β) の測定を行ったが、PPAR β はhigh F-DEでむしろ減少していた。このことからPPAR β の発現量の減少に関与するのは、粒子ではなくガス成分であるかもしれないと考えられた。また、昨年度の研究から、2ヶ月曝露のラットの除粒子曝露群ではテストステロン・StARの著大な変化は認められなかったが、PPAR β の減少がStARの発現量減少・精巣テストステロン濃度減少を引き起こしていた可能性も考えられ、更なる研究が必要であると言える。以上をまとめると、PCR解析の結果から、エイコサノイド系で最初に働くPla2g2a、エイコサノイドのシクロオキシゲナーゼ経路で働くPGIS、エイコサノイドのリポキシゲナーゼ経路で働くAox15・Tgm2、PG合成・制御系で働くS100a6・S100a10の他、CYP26a1

でNR-DE、F-DEによる発現量の変化が認められたことから、テストステロン以外のバイオマーカーになる可能性が考えられた。しかし、各々の精巣での役割が未だ明確にされていないため、今後の更なる研究が必要であると考えられる。

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

本研究により、NRDEの亜急性曝露によるテストステロンの上昇が精巣への直接作用（精巣ライディヒ細胞におけるステロイドホルモン生合成酵素と関連因子の活性上昇、エイコサノイド合成系の関与）である可能性が示唆された。また、妊娠ラットの高濃度NRDE曝露により黄体機能の低下が認められることから、曝露による流産率増加の可能性が示唆された。さらに妊娠ラットのคอร์チコステロン分泌が増加することから、雄胎子の脳の脱雌性化が阻害される可能性も示唆された。

(2) 環境政策への貢献

ディーゼル排ガスの吸入が生殖器系機能に影響をあたえることを示した研究成果であり、今回使った曝露装置は世界でも類を見ない規模・精度のものであるために重要な科学的成果であると考えられる。曝露により雄の精巣機能に影響のあることが判明したことから、本研究は、ヒトを含めた都市部で生活する雄動物の生殖機能への作用メカニズムをさらに研究する必要性を提示した。また、ナノ粒子曝露により妊娠動物の卵巣機能が抑制されることが判明したことから、本研究は、都市部で生活する妊婦への影響について新たな研究を実施する必要性を提示した。

6. 国際共同研究等の状況

特に記載すべき事項はない。

7. 研究成果の発表状況 ※【別添】H23研究等報告書作成要領 参照

(1) 誌上発表

<論文（査読あり）>

1) CM. LI, S.TANEDA, K.TAYA, G.WATANABE, Y.FUJITANI, T.NAKAJIMA & AK.SUZUKI.

Toxicology Letters 185, 1-8, 2009.

“Effects of in utero exposure to nanoparticle diesel exhaust on testicular function in immature male rats.”

2) CM.LI, S.TANEDA, K.TAYA, G.WATANABE, Y.FUJITANI, Y.ITO, T.NAKAJIMA & AK.SUZUKI.

Inhalation Toxicology 21, 803-811, 2009.

“Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in male rats.”

3) CM.LI, X.LI, AK.SUZUKI, Y.FUJITANI, J.JIGAMI, K.NAGAOKA, G.WATANABE & K.TAYA.

Toxicology Letters 209,277–281, 2012

“Effects of exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust on adrenocortical function in adult male mice.”

<査読付論文に準ずる成果発表>（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）
特に記載すべき事項はない。

<その他誌上発表（査読なし）>
特に記載すべき事項はない。

（２）口頭発表（学会等）

- 1) Li XZ, Li CM, Suzuki AK, Watanabe G, Fujitani Y, Nakajima T, Taya K. The 3rd Asia-Pacific Forum on Andrology, 10-13 October 2009, Nanjing, China.
“Exposure to inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust disrupts regulation of testicular function in adult male rats.”
- 2) Li CM, Suzuki AK, Li XZ, Taneda S, Fujitani Y, Watanabe G, Nakajima T, Taya K. The 3rd Asia-Pacific Forum on Andrology, 10-13 October 2009, Nanjing, China.
“Prenatal exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust suppressed testicular function in immature male rats.”
- 3) 地紙順子、李春梅、潘玲梅、李雪征、曹文、種田晋二、鈴木明、渡辺元、田谷一善. 第12回環境ホルモン学会、2009年12月7日（東京）
「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気(NR-DE)が雄マウスの精巣・副腎皮質・下垂体前葉機能に及ぼす影響.」
- 4) Xuezheng Li, ChunMei Li, Lingmei Pan, Junko Jigami, Wen Cao, Akira K. Suzuki, Gen Watanabe, Tamie Nakajima, Kazuyoshi Taya, 14th International Congress of Endocrinology, Kyoto, 2010.3
“Effects of nanoparticle-rich diesel exhaust on adrenal and testicular steroid secretion in male mice”
- 5) 長谷川千紗、李春梅、鈴木明、渡辺元、田谷一善. 第13回日本畜産学会、2011年3月27日（神奈川）
「ナノ粒子を多く含むディーゼル排気ガスが 雌マウスおよび雌ラットの卵巣機能に及ぼす影響に関する研究.」

（３）出願特許

特に記載すべき事項はない。

（４）シンポジウム、セミナーの開催（主催のもの）

特に記載すべき事項はない。

（５）マスコミ等への公表・報道等

特に記載すべき事項はない。

（６）その他

特に記載すべき事項はない。

8. 引用文献

- 1) Furuta, C., Suzuki, A.K., Taneda, S., Kamata, K., Hayashi, H., Mori, Yoki, Li, C., Watanabe, G. & Taya, K. Estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. *Biology of Reproduction* 70, 1527-1533, 2004.
- 2) Furuta, C., Li, CM., Taneda, S., Suzuki, A. K., Kamata, K., Watanabe, G. & Taya, K. Immunohistological study for estrogenic activities of nitrophenols in diesel exhaust particles. *Endocrine* 27, 33-36, 2005.
- 3) Li, CM., Takahashi, S., Taneda, S., Furuta, C., Watanabe, G., Suzuki, A.K. & Taya, K. Impairment of testicular function in adult male Japanese quail (*Coturnix japonica*) after a single administration of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Journal of Endocrinology* 189, 555-564, 2006.
- 4) Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Anti-androgenic activity of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *European Journal of Pharmacology* 543, 194-199, 2006.
- 5) Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Estrogenic and anti-androgenic activities of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles. *Toxicology and Applied Pharmacology* 217, 1-6, 2006.
- 6) Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles on the regulation of testicular function in immature male rats. *Journal of Andrology* 28, 252-258, 2007.
- 7) Li CM, Takahashi S, Taneda S, Furuta C, Watanabe G, Suzuki AK & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol in diesel exhaust particles on the regulation of reproductive function in immature female Japanese quail (*coturnix japonica*). *Journal of Reproduction and Development* 53, 673-678, 2007.
- 8) Li CM, Taneda S, Suzuki AK, Furuta C, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the suppression of adrenocortical function in immature male rats. *Biol.Pharm.Bull.* 30, 2376-2380, 2007.
- 9) Izawa H, Watanabe G, Taya K & Sagai M. Inhibitory effects of foods and polyphenols on activation of aryl hydrocarbon receptor induced by diesel exhaust particles. *Environmental Science* 14, 149-156, 2007.
- 10) Mi Y, Zhang C & Taya K. Quercetin protects spermatogonial cells from 2,4-D-induced oxidative damage in embryonic chickens. *Journal of Reproduction and Development* 53, 749-754, 2007.
- 11) Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K & Sagai M. Diesel exhaust particle toxicity on spermatogenesis in the mouse in arylhydrocarbon receptor dependent. *Journal of Reproduction and Development* 53, 1069-1078, 2007.
- 12) Izawa H, Kohara M, Watanabe G, Taya K & Sagai M. Effects of diesel exhaust particles on the male reproductive system in strains of mice with different aryl hydrocarbon receptor responsiveness. *Journal of Reproduction and Development* 53, 1191-1197, 2007.
- 13) Izawa H, Kohara M, Aizawa K, Suganuma H, Inakuma T, Watanabe G, Taya K & Sagai M.

- Alleviative effects of quercetin and onion on male reproductive toxicity induced by diesel exhaust particles. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 72 (5), 1235-1241, 2008.
- 14) Furuta C, Suzuki AK, Watanabe G, Li CM, Taneda S & Taya K. Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles promote the growth of MCF-7 breast adenocarcinoma cells. *Toxicology and Applied Pharmacology* 230, 320-326, 2008.
 - 15) Li CM, Suzuki AK, Takahashi S, Taneda S, Watanabe G & Taya K. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the reproductive toxicity in female Japanese quail (*Coturnix japonica*). *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 31(11), 2158-2161, 2008.
 - 16) Li X, Li CM, Suzuki AK, Taneda S, Watanabe G & Taya K. 4-nitrophenol isolated from diesel exhaust particles disrupts regulation of reproductive hormones in immature male rats. *Endocrine* 36, 98-102, 2009.
 - 17) Li X, Li CM, Suzuki AK, Watanabe G, Taneda S & Taya K. Endocrine disruptive effect of 3-methyl-4-nitrophenol isolated from diesel exhaust particles, in Hershberger assay using castrated immature rats. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry* 73 (9), 2018-2021, 2009.
 - 18) Mi Y, Zhang C, Li CM, Taneda S, Watanabe G, Suzuki AK & Taya K. Quercetin protects embryonic chicken spermatogonial cells from oxidative damage intoxicated with 3-methyl-4-nitrophenol in primary culture. *Toxicology Letters* 190, 61-65, 2009.
 - 19) Furuta C, Noda S, Li CM, Suzuki AK, Taneda S, Watanabe G & Taya K. Nitrophenols isolated from diesel exhaust particles regulate steroidogenic gene expression and steroid synthesis in the human H295R adrenocortical cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 229, 109-120, 2008.
 - 20) Mi Y, Zhang C, Li CM, Taneda S, Watanabe G, Suzuki AK & Taya K. Protective effect of quercetin on the reproductive toxicity of 4-nitrophenol in diesel exhaust particles on male embryonic chickens. *Journal of Reproduction and Development* 56, 195-199, 2010.
 - 21) Taneda S, Hayashi H, Sakushima A, Seki K, Suzuki AK, Kamata K, Sakata M, Yoshino S, Sagai M, Mori Y. Estrogenic and anti-estrogenic activities of two types of diesel exhaust particles. *Toxicology*.2002;170 : 153-161.
 - 22) Taneda S, Mori Y, Kamata K, Hayashi H, Furuta C, Li C, Seki K, Sakushima A, Yoshino S, Yamaki K, Watanabe G, Taya K, Suzuki AK. Estrogenic and anti-androgenic activity of nitrophenols in diesel exhaust particles (DEP). *Biol Pharm Bull.* 2004;27(6):835-7.
 - 23) Watanabe N, Kurita M. The masculinization of the fetus during pregnancy due to inhalation of diesel exhaust. *Environ Health Perspect.* 2001;109(2):111-9.
 - 24) Watanabe, N., Nishinaka, A., Tamada T., Ohsawa M. ディーゼル車排気ガス曝露が雌ラットの生殖機能に及ぼす影響 *Ann, Rep. Tokyo. Metr. Inst. P. H.* 2003;54 : 332-336.
 - 25) Kittelson, D. B. Engine and nanoparticles: A review. *J. Aerosol Sci.* 29, 575-588 (1998)
 - 26) Li C, et al. Effects of inhaled nanoparticle-rich diesel exhaust on regulation of testicular function in adult male rat. *Inhal Toxicol.* 21 (10):803-11. (2009)
 - 27) Ramdhan DH, et al. Nanoparticle-rich diesel exhaust may disrupt testosterone biosynthesis and metabolism via growth hormone. *Toxicol Lett.* 191(2-3):103-8 (2009)

- 28) Li C, et al. Effects of 3-methyl-4-nitrophenol on the suppression of adrenocortical function in immature male rats. *Biol Pharm Bull.* 30(12):2376-80 (2007)
- 29) Hansen C, et al. The effect of ambient air pollution on sperm quality. *Environ Health Perspect.* 2010, 118(2):203-9.
- 30) Boggia B, et al. Effects of working posture and exposure to traffic pollutants on sperm quality. *J Endocrinol Invest.* 2009, 32(5):430-4.
- 31) Hammoud A, et al. Decreased sperm motility is associated with air pollution in Salt Lake City. *Fertil Steril.* 2010, 93(6):1875-9.
- 32) Gupta. The role of prostaglandins in masculine differentiation: modulation of prostaglandin levels in the differentiating genital tract of the fetal mouse. *Endocrinology.* 1989, 124: 129-133
- 33) Zerani M, et al. In vitro effects of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on Leydig cells of adult alpaca (*Lama pacos*) testis: GnRH receptor immunolocalization, testosterone and prostaglandin synthesis, and cyclooxygenase activities. *Domest Anim Endocrinol.* 2011, 40(1):51-9.
- 34) Söderström M, et al. Novel prostaglandin D(2)-derived activators of peroxisome proliferator-activated receptor-gamma are formed in macrophage cell cultures. *Biochim Biophys Acta.* 2003, 1631(1):35-41.
- 35) Kowalewski MP, et al. Involvement of peroxisome proliferator-activated receptor gamma in gonadal steroidogenesis and steroidogenic acute regulatory protein expression. *Reprod Fertil Dev.* 2009;21(7):909-22.
- 36) Kanemitsu H, et al. Complement activation by diesel exhaust particles (DEP). *Biol Pharm Bull.* 1998, 21(2):129-32.

Study for finding the effect biomarkers of diesel exhaust nanoparticles on brain, liver, kidney and reproductive organs, and for the risk assessment

Principal Investigator: Yoshika KUROKAWA

Institution: National Institute for Environmental Studies (NIES)
16-2, Onogawa, Tsukuba, Ibaraki Japan
TEL 029-850-2518, FAX 029-850-2870
Email fujimaki@nies.go.jp

Cooperated by: NIES, Nagoya University, Tokyo University of Agriculture and Technology

Key Words: Diesel exhaust, Nanoparticles, Inhalation exposure, Effect biomarker

[Abstract]

Although a lot of nano-sized particles are contained in the diesel vehicle exhaust emission, the effect of such particles on living system is not clear yet. We aimed to investigate the biological effect of subacute exposure to nanoparticle-rich diesel exhaust (NRDE) in mice and rats.

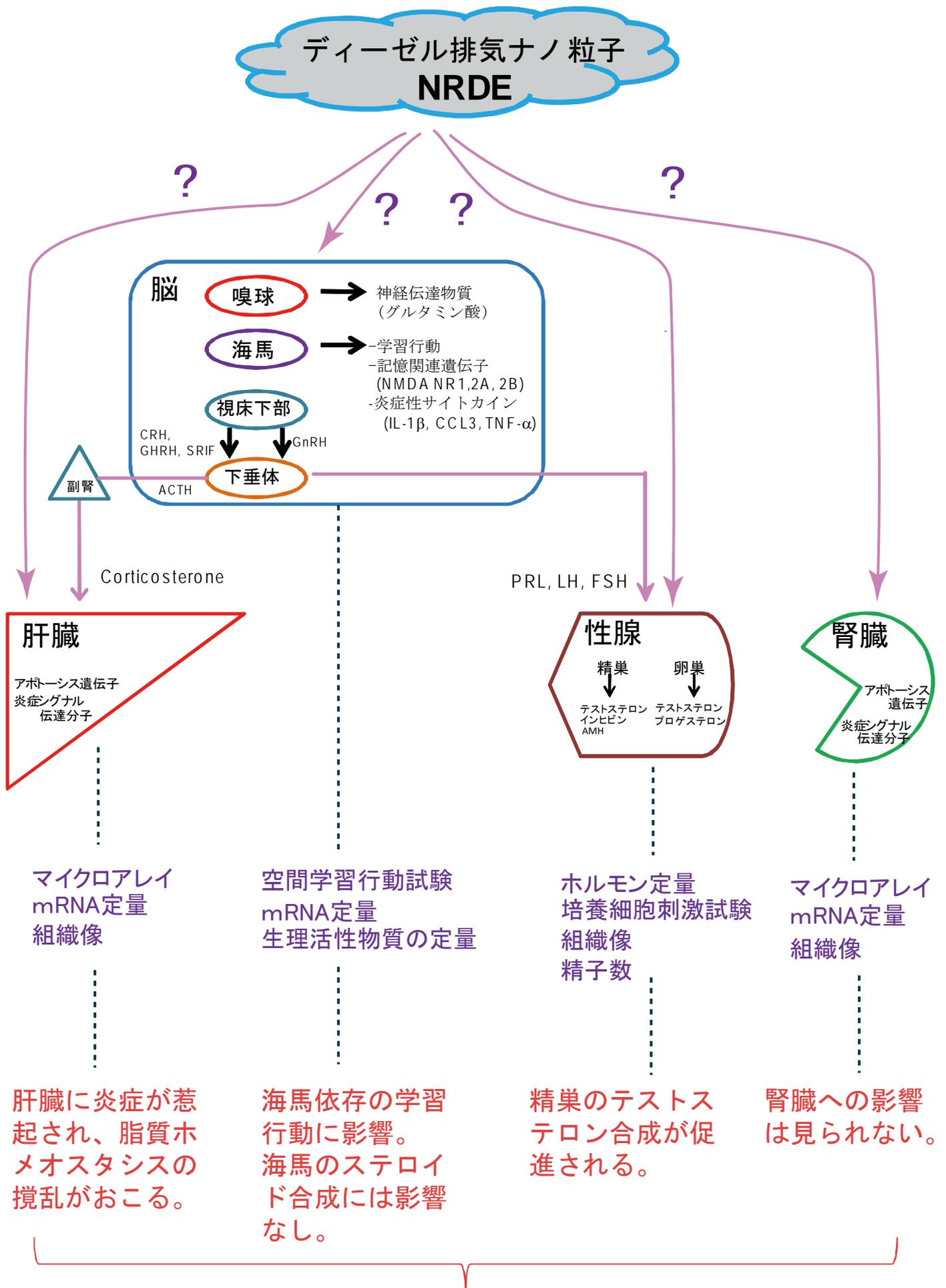
First, we investigated the influence of a few months exposure to NRDE on the function of recognition and learning in mice. After the exposure we did not find any effect of NRDE on the reinforcement learning ability by using operant task box. However, we detected the change in the results of spatial learning ability evaluated by Morris water maze test and of non-spatial memory evaluated by novel object recognition test. Moreover, we found the change in memory function-related gene expressions in the hippocampus after exposure to NRDE. These results suggest the effect of subacute NRDE exposure on the function of hippocampus in mice.

Our previous studies clarified that NRDE exposure causes fat infiltration and PPAR α activation in the liver of rats. Thus, in the present study, we investigated possible role of PPAR α in the hepatotoxicity of NRDE or filtered DE using 129/Sv (wild type) mice and Ppar α -null mice. Our results suggested that something like the ligand of PPAR α are contained in filtered DE and it causes an increase of NF κ B as inflammatory marker in liver. The results obtained after two months exposure to filtered DE in the wild-type mice indicated that PPAR α has an anti-inflammation action and induced hepatotoxicity. In addition, our results of microarray and pathway analyses using the liver of rats exposed to NRDE for a month are consistent with above findings that indicated that NRDE disturbs lipid homeostasis.

Lastly, we investigated the effects of NRDE on the testicular and pituitary function in mice. Serum level of FSH, LH, testosterone, corticosterone and progesterone did not change significantly. To determine the effects of NRDE on testicular testosterone production, isolated interstitial cells were incubated with and without hCG. The testosterone production was significantly increased in both with and without hCG in the cells of high NRDE exposed groups, and significantly decreased in the cells of filtered DE exposed groups. To determine the effects of NRDE on pituitary LH production, isolated pituitary cells were incubated with and without GnRH. The LH production with GnRH was significantly increased in the cells of dense NRDE or filtered DE exposed groups. These results demonstrated that exposure to NRDE leads to disruption on testicular and pituitary endocrine function, and also suggest that effects of NRDE are different in cells producing steroid hormones and those producing protein or peptide hormones.

ディーゼル排気ナノ粒子の

脳、肝、腎、生殖器への影響・バイオマーカー創出・リスク評価



可能なバイオマーカー：血漿中のテストステロン、 α -リノレン酸など