

# 二酸化チタンナノ粒子による脳内アミノ酸・モノアミンへの影響

須田 恵\*1, 北條 理恵子\*1, 三浦 伸彦\*1, 鈴木 哲矢\*1\*2, 柳場 由絵\*1  
長谷川 達也\*3, 王 瑞生\*1

二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子の中枢神経系への取り込みおよび神経系への影響については、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の鼻腔内投与による細胞間移行や経母体ばく露による血液脳関門(BBB)形成以前の胎仔の脳内移行と神経伝達への影響を確認している文献はあるが、BBB 通過についての情報は乏しい。本研究で BBB の通過と神経伝達系への影響の有無を確認するため、尾静脈注射による脳内アミノ酸濃度と脳内神経伝達物質であるモノアミン濃度について調べた。動物は雄性 *gpt-Delta* マウスを用いた。NEDO の方法に準拠して TiO<sub>2</sub> 粉末 (Aeroxide® P25) を 0.2%リン酸水素二ナトリウム (DSP 溶液) に懸濁し、超音波で分散し使用した。この分散液を 0, 2, 10, 50 mg/kg の投与量となるように DSP 溶液で希釈して尾静脈より週 1 回×4 週間投与し、4 回目の投与後 9 日と 3 か月に解剖して脳を取出し、前脳、後脳、中脳、延髄、小脳の 5 部位に分けてクーロアレイ法と OPA 法でモノアミンとアミノ酸を分析した。血液から脳への取り込み率の高いフェニルアラニン (Phe), チロシン (Tyr), ロイシン (Leu), イソロイシン (Ile) の脳内濃度について投与後 9 日で比較すると、ベンゼン環を有する Phe および Tyr の濃度はすべての部位で投与量依存的に減少したが、分枝鎖アミノ酸である Leu や Ile はほとんど変化がなかった。Tyr を前駆体とするモノアミンのドーパミンやノルエピネフリンは小脳では投与量依存的に減少したが、他の部位ではほとんど影響はなかった。また、投与後 3 か月の場合ではアミノ酸の脳内濃度はほぼ回復していた。また、最終投与 3 日後の脳内 Ti 濃度は高用量群では有意に上昇した。これらの結果から、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の投与によって、ベンゼン環を有するアミノ酸の取り込みが一時的に阻害されるものの、アミノ酸およびモノアミンの神経伝達系への影響は軽微であることが示唆された。また、一部の部位でのみ 9 日後や 3 か月後で同じ影響があることから、二酸化チタンが BBB を通過する可能性が示唆された。

**キーワード:** 二酸化チタンナノ粒子, 神経伝達物質, モノアミン, アミノ酸, マウス

## 1 はじめに

二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) ナノ粒子による中枢神経系への影響は、鼻腔内投与による中枢神経系への細胞間移行<sup>1,2)</sup> や経母体ばく露による取り込み<sup>3)</sup> などによってさまざまな影響があると考えられている一方で、脳血液関門 (BBB) を TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が通過できるのかどうかは結論に至っていない<sup>4)</sup>。BBB の通過に関する研究では *in vitro* で検証した結果、BBB の血管内皮細胞に TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が蓄積することを証明したとする報告<sup>5)</sup> もあり、BBB の血管内皮細胞に蓄積するのであれば、能動輸送される神経伝達にかかわるアミノ酸などの脳内への取り込みを阻害する可能性もあると考えた。本研究で、鼻腔を介さない尾静脈注射によって投与された TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が脳内へ移行するのかどうか、また、アミノ酸の脳内への取り込みを阻害するかどうかマウスを用いて検討した。

## 2 方法

動物は *gpt-Delta* マウス 40 匹および C57BL/6J マウス 17 匹を 7 週齢で日本 SLC 株式会社より購入し、1 週間の順化の後に実験に用いた。食餌・水は自由に摂取さ

せ、室温 23±1°C、湿度 55±5%、明期 08:00-20:00、暗期 20:00-08:00 の条件下で飼育した。

二酸化チタン粉末 (Aeroxide® P25) は SIGMA-ALDRICH、リン酸水素二ナトリウム 12 水塩、リン酸、酢酸カリウム、クエン酸一水和物、クエン酸リチウム四水和物、塩化リチウム、水酸化リチウム、ホウ酸、水酸化ナトリウム、O-フタルアルデヒド、2-メルカプトエタノール、メチルアルコール (HPLC 用)、エチルアルコール (HPLC 用)、アセトニトリル (HPLC 用) は和光純薬、EDTA-2Na は同仁化学研究所、1-ヘプタンスルホン酸ナトリウム、二亜硫酸ナトリウムはナカライテスク、濃硝酸 (電子工業用) は関東化学より購入した。

投与液の調製は NEDO の手順書<sup>6)</sup> に準拠し、フィルター処理をした 0.2%リン酸水素二ナトリウム水溶液 (DSP 溶液) で二酸化チタン粉末 (TiO<sub>2</sub>) を 100mg/10ml となるように懸濁し、超音波で 30 分間分散し、散乱強度で二次粒子径のピークが 130-160 nm (100nm 以下の散乱強度が 17-18%, 100nm 以下の個数が 79-83%, 最大頻度 60-70 nm, 100nm 以下の体積が 48-51%, 最大頻度 90-100nm) となったものを用い、濃度が 0, 0.4, 2, 10 mg/ml となるように、同時に超音波処理した DSP 溶液で希釈した。動物に各濃度とも 5 ml/kg の割合で、尾静脈から週 1 回×4 回投与した。

C57BL/6J マウス (*gpt* アッセイを行わないためバックグラウンドの動物を使用) は最終投与後 3 日の時点で解剖し、脳を削出して、Ti 濃度測定に供した。

*gpt-Delta* マウス (*gpt* アッセイを行った既報<sup>7)</sup> と同一の動物) は最終投与後 9 日 (9D: 17 匹) と 3 か月 (3M :

\*1 (独)労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ

\*2 現所属: 広島大学大学院医歯薬保健学研究院核酸分析化学研究室

\*3 山梨県富士山科学研究所

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1

労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ 須田 恵

E-mail: suda@h.jniosh.go.jp

23 匹)の時点で解剖し、脳を削出して前脳、後脳、中脳、延髄、小脳に分画して、液体窒素で凍結してから、分析までの間-80℃で保存した。

Ti 濃度測定は、脳組織約 0.2g を濃硝酸 2ml で溶解し、ICP マススペクトラムで測定した<sup>8)</sup>。

冷凍保存した脳組織は、以前に文献に記述した方法<sup>9)</sup>で処置し、神経伝達物質であるモノアミンとアミノ酸の含有量を測定した。

統計処理は、ANOVA を行った後、Dunnett's multiple *t*-test を行い、 $p < 0.05$  および  $p < 0.01$  を有意水準とした。

### 3 結果

脳内 Ti 濃度は、対照群に対して 50 mg/kg 群では有意に増加したが、2 mg/kg 群と 10 mg/kg 群は対照群と有意な差がなかった (図 1)。

興奮性神経伝達物質であるグルタミン酸やアスパラギン酸の濃度は、最終投与後 9 日目および 3 カ月目の全ての部位、すべての投与量で有意な変化はなかった (データ示さず)。また、抑制性の神経伝達物質である可能性があるタウリンも 9D および 3M の全ての部位、すべての濃度で有意な変化はなかった。同じく抑制性の神経伝達物質であると言われているグリシンは、9D の中脳で投与量依存的に増加したが、50mg/kg 投与群のみ  $p < 0.01$  で有意であった (図 2)。3M では 50mg/kg 投与群のみ  $p < 0.01$  で有意であったが、用量依存の傾向は解消していた (図 2)。

血液から脳への取り込み率が比較的大きい芳香族アミノ酸であるチロシン (Tyr) とフェニルアラニン (Phe) は 9 日目のすべての部位で投与量依存的に減少した。特に後脳と延髄では 2 mg/kg から有意に減少していた (図 3)。それに対して、やはり取り込み率が大きい分枝鎖アミノ酸であるロイシン (Leu) とイソロイシン (Ile) の脳内濃度にはほとんど変化はなかった (図 3)。図 3 に対応する対照群の実測値を表 1 に示す。一方、3M では Tyr, Phe, Leu, Ile は全ての部位で有意な差はなかった。

Tyr が前駆体であるモノアミンを比較すると、9D では、ドーパミン (DA) が中脳、延髄、小脳で投与量依存的に減少する傾向をみせたが、有意差はなかった (図 4)。図 4 に対応する対照群の実測値を表 2 に示す。

DA の代謝物であるホモバニリン酸 (HVA) は全部位で投与量依存的に減少したが、有意差があったのは小脳のみであった (図 5、小脳のみ示す)。同じく DA の代謝物である 3,4-ジヒドロキシフェニル酢酸 (DOPAC) は延髄と小脳で投与量依存的に減少していたが、有意な変化はなかった (図 5、小脳のみ示す)。

DA から合成されるノルエピネフリン (NE) は小脳でのみ投与量依存的な減少傾向を見せ、50 mg/kg では有意に減少した (図 4)。NE の代謝物である 3-メトキシ-4-ヒドロキシフェニルグリコール (MHPG) やノルメタネフリン (NM) の濃度の変化はなかった (図 6)。

3M では DA, NE およびこれらの代謝物は全ての部位で有意な差はなかった。

セロトニン (5HT) については、9D の一部の試料で抽出から測定までの保存時間が長くなってしまったため、定量できなかった。3M では前脳の 5HT、5-ヒドロキシインドール酢酸 (5HIAA : 5HT の代謝物) 濃度と、後脳の 5HIAA 濃度の 10 mg/kg 群にのみ有意差があったが、投与量依存的ではなかった (図 7)。

### 4 考察

Phe, Leu, Ile は必須アミノ酸であり、Brain Uptake Index (BUI)<sup>10)</sup>は Phe で 55%, Leu で 54%, Ile で 40%, Tyr は必須アミノ酸ではないが Phe から合成されるアミノ酸であり、BUI は 50%と、アミノ酸類では取り込み率の大変高いアミノ酸である。これらのアミノ酸は、脳内でタンパク質の合成に使用される他、Tyr は神経伝達物質である DA の前駆体となる。重要なことはこれらのアミノ酸が他のアミノ酸からは合成されないということである。つまり、これらのアミノ酸の変動に対する要因は取り込みやタンパク質合成および代謝に限られるということである。Leu や Ile といった分枝鎖アミノ酸の各部位における含有量に投与量依存的な変動がほとんどみられないことに対し、ベンゼン環を有するアミノ酸は投与量依存的に減少しており (図 3)、脳内への取り込み、または合成、代謝等に何らかの変動が起きていると考えられた。そこで、DA や NE といった Tyr の代謝物に注目すると、9D では一部で Tyr に追従する動きを見せていたが、全体的にみると Tyr ほどの変動は受けていなかった (図 4)。また、HVA や DOPAC の変動は DA の変動に追従し (図 5)、小脳で NE 濃度が減少している (図 4) MHPG, NM は変動しなかったことから (図 6)、DA や NE の変動はシナプスでの放出過剰による減少とは考えられなかった。さらに、タンパク質合成においては Phe や Tyr を特異的に消費することは考えにくいから、Phe や Tyr の脳内濃度の減少は、脳内への取り込みが阻害されたために起きた可能性が高いと思われる。これらの変化は 3 カ月後には解消されたことから、一過性の減少であることが示唆された。脳全体で同じ様な傾向にあるこ

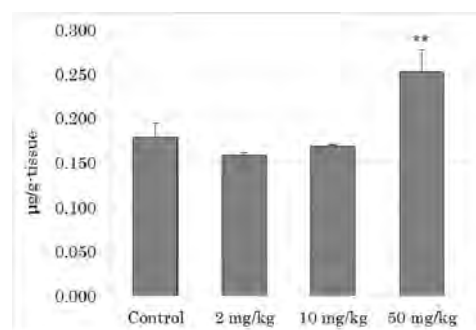


図 1. 最終投与後 3 日目の脳内 Ti 濃度  
棒グラフ：平均値，エラーバー：標準誤差。  
\*\*：  $p < 0.01$  ダネット検定で対照群に対して有意差あり。

とから、BBBの血管内皮細胞に蓄積したTiO<sub>2</sub>ナノ粒子がベンゼン環を有するアミノ酸の取り込みを阻害し、BBBの血管内皮細胞からTiO<sub>2</sub>ナノ粒子が排出されるにつれて、取り込み阻害が解消された可能性がある。

また、9D、3Mの両方でGly濃度が中脳の50mg/kg群のみ有意な増加を示したことから、Gly濃度の増加は血液から脳への取り込みが影響しているのではなく、BBBを通過したTiO<sub>2</sub>がアミノ酸代謝へ何らかの作用をしたのではないかと考えられた。こちらも3カ月後には2mg/kg群および10mg/kg群で増加傾向が解消しており(図2)、PheやTyrよりは長引くものの、一過性的変動であることが示唆された。

さらに、DAやNEおよびこれらの代謝物の変動も3カ月後には解消していたことから、Tyr濃度の変動による一過性的変化であることが強く疑われた。

TiO<sub>2</sub>投与量はHuらの報告<sup>11)</sup>に酷似していたが、脳内に取り込まれた量は1/1000~1/4000と、大変低かった(図1)。Liらの報告<sup>12)</sup>では、彼らの対照群の値が我々の対照群の値と類似していたことからHuらの図中の単位(mg/g tissue)が誤りで、(μg/g tissue)が正しい単位であったとすると、Huらの投与量5mg/kgの値は、

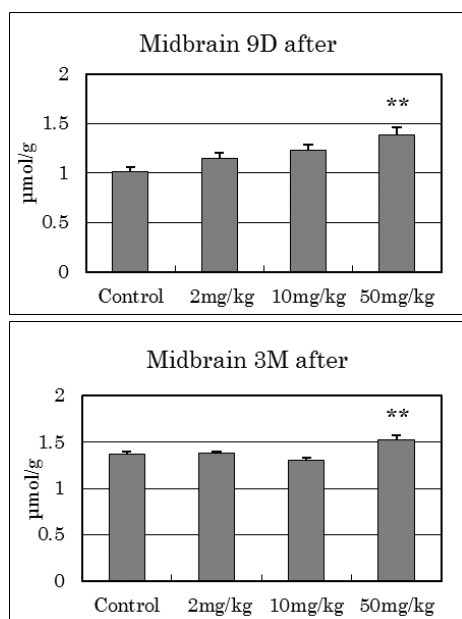


図2. 最終投与後9日目および3か月目の中脳のグリシン濃度

棒グラフ：平均値，エラーバー：標準誤差。

\*\*：p<0.01 ダネット検定で対照群に対して有意差あり。

表1. 図3に対応する対照群の実測値

Mean	Tyr	Phe	Leu	Ile
9D-Forebrain	0.139	0.101	0.102	0.061
9D-Hindbrain	0.169	0.118	0.123	0.069
9D-Midbrain	0.090	0.068	0.076	0.041
9D-Medulla	0.131	0.102	0.098	0.062
9D-Cerebellum	0.163	0.102	0.104	0.059

単位：μmol/g

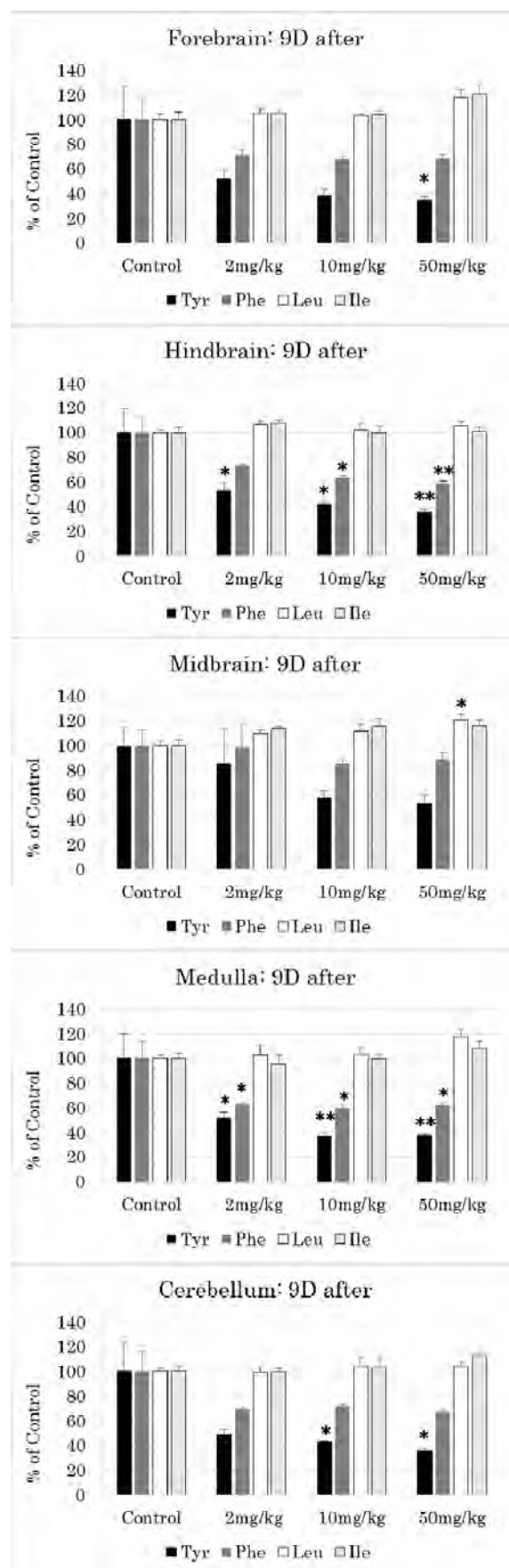


図3. 最終投与後9日目の取り込み率の高いアミノ酸の濃度変化

棒グラフ：平均値，エラーバー：標準誤差。\*：p<0.05，

\*\*：p<0.01 ダネット検定で対照群に対して有意差あり。対照群の実測値については表1を参照のこと。



我々の実験の対照群, 2 mg/kg 群と 10 mg/kg 群に対し

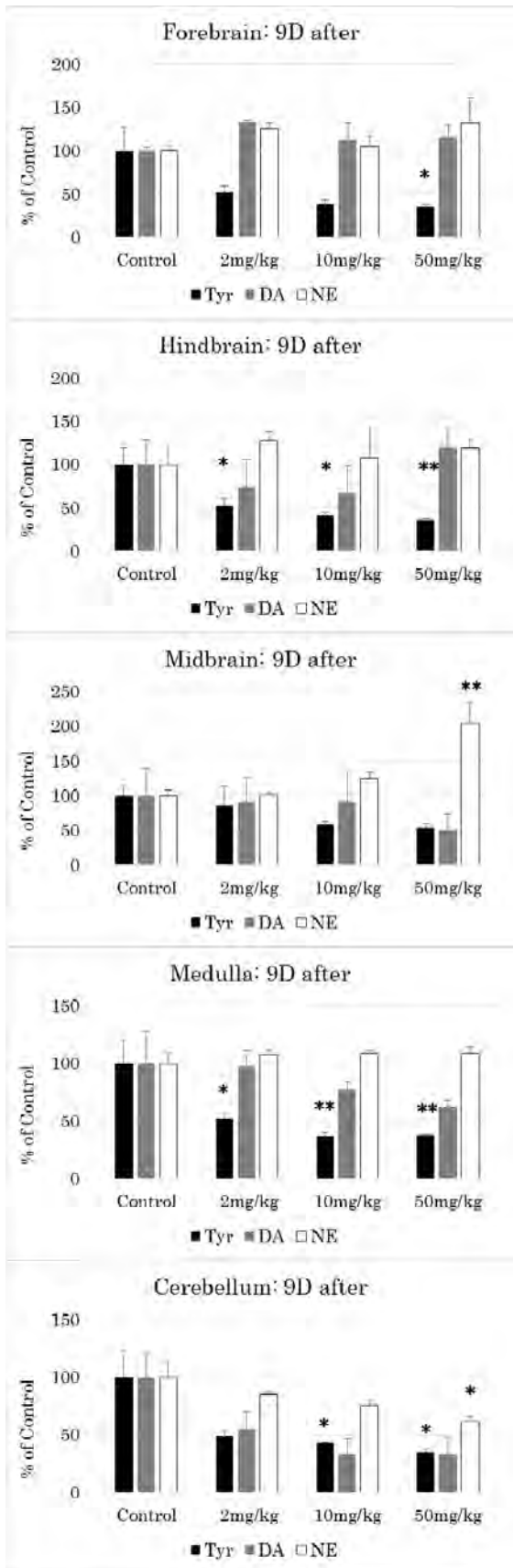


図4. 最終投与後9日目のチロシンとモノアミンの濃度変化  
棒グラフ: 平均値, エラーバー: 標準誤差. \*: p<0.05,  
\*\*: p<0.01 ダネット検定で対照群に対して有意差あり.  
対照群の実測値については表2を参照のこと.

てほぼ同等であった. Hu らの投与量 10 mg/kg 時の Ti 濃度において我々の結果との差は約 3.5 倍, 投与量 50 mg/kg では約 4 倍, Hu らの報告の方が高かった. 我々は尾静脈注射であり, Hu らは胃内投与ということで, 胃内に投与された TiO<sub>2</sub> が 100% 血液中に取り込まれない限り, 1 回の投与で血液中に取り込まれた量が彼らの実験よりも多かったはずであるが, 週 1 回で 4 週間と, 少ない投与回数だったため, Hu らの 60 日間連続投与の方が脳内への蓄積に大きく貢献したと思われる. Hu らは, また, グルタミン酸塩の有意な増加と NE とその代謝物質 DOPAC, 5HT とその代謝物質 5HIAA のようないくつかのモノアミン神経伝達物質の有意な減少を報告したが<sup>9)</sup>, グルタミン酸や 5HT とその代謝物質 5HIAA については同様の結果は得られなかった. この違いについては, 脳内に取り込まれた TiO<sub>2</sub> の量によるのかもしれない.

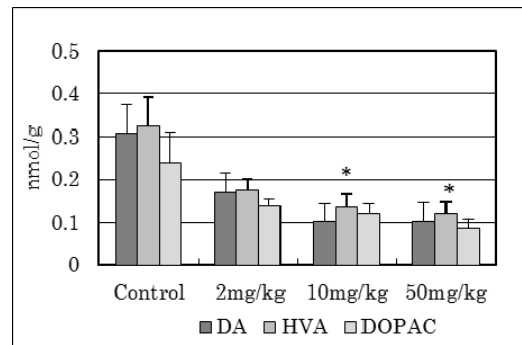


図5. 最終投与後9日目の小脳の DA と HVA および DOPAC 濃度

棒グラフ: 平均値, エラーバー: 標準誤差.

\*: p<0.05 ダネット検定で対照群に対して有意差あり.

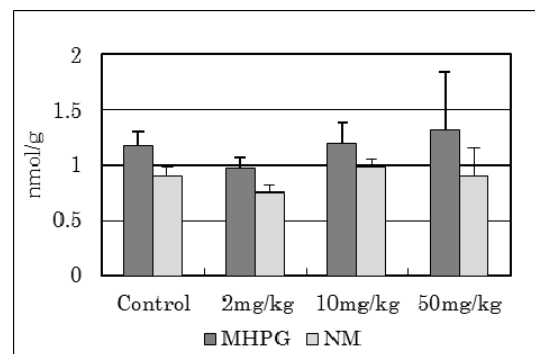


図6. 最終投与後9日目の小脳の MHPG および NM 濃度  
棒グラフ: 平均値, エラーバー: 標準誤差.

表2. 図4に対応する対照群の実測値

Mean	Tyr	DA	NE
9D-Forebrain	138.8	30.1	4.81
9D-Hindbrain	168.6	8.11	4.89
9D-Midbrain	90.1	5.00	4.83
9D-Medulla	131.3	0.301	6.97
9D-Cerebellum	163.3	0.307	5.34

単位: nmol/g

Hu らとは Ti の脳内濃度は数倍違うが、50 mg/kg では Ti の脳内濃度が有意に増加したこと、また、Gly や 5HT 濃度などでは一部の部位にのみ変動があることにより、BBB を通過した TiO<sub>2</sub> の影響の可能性が示唆されたことにより、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は BBB を通過すると考えられた。また、9D で濃度が変動した神経伝達物質や前駆体等も 3M では対照群と同様の濃度に回復していたことから、TiO<sub>2</sub> による神経伝達に関わるアミノ酸・モノアミンへの影響は軽微であることが示唆された。

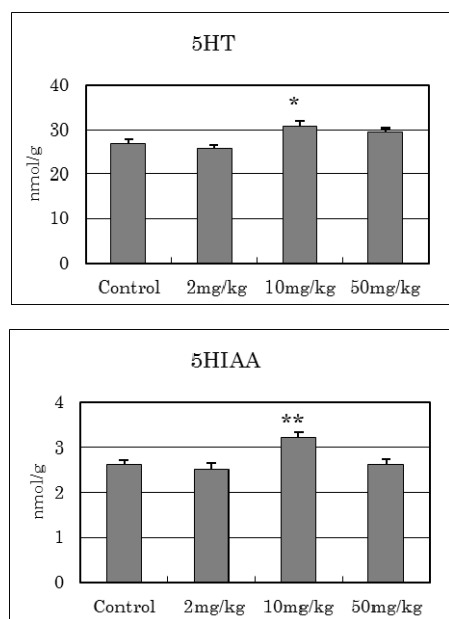


図 7. 最終投与後 3 か月目の前脳の 5HT および 5HIAA 濃度

棒グラフ：平均値，エラーバー：標準誤差。\*：p<0.05，

\*\*：p<0.01 ダネット検定で対照群に対して有意差あり。

### 参 考 文 献

- 1) Wang J, Liu Y, Jiao F, Lao F, Li W, Gu Y, Li Y, Ge C, Zhou G, Li B, Zhao Y, Chai Z, Chen C. Time-dependent translocation and potential impairment on central nervous system by intranasally instilled TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Toxicology* 2008; 254: 82-90.
- 2) Ze Y., Zheng L., Zhao X., Gui S., Sang X., Su J., Guan N., Zhu L., Sheng L., Hu R., Cheng J., Cheng Z., Sun Q., Wang L., Hong F. Molecular mechanism of titanium dioxide nanoparticles-induced oxidative injury in the brain of mice. *Chemosphere*. 2013; 92(9): 1183-1189.
- 3) Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K. Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Part. Fibre Toxicol.* 2009; 29: 6-20.
- 4) Shi H, Magaye R, Castranova V, Zhao J. Titanium dioxide nanoparticles: a review of current toxicological data. *Particle and Fibre Toxicology* 2013; 10:15. <http://www.particleandfibretoxicology.com/content/10/1/15>.
- 5) Brun E, Carriere M, Mabondzo A. In vitro evidence of dysregulation of blood-brain barrier function after acute and repeated/long-term exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials*. 2012; 33: 886-896.
- 6) 国立研究開発法人新エネルギー・産業技術総合開発機構 (NEDO). ナノ材料有害性試験のための試料調製方法及び計測方法 (手順書), 2011.9.15 暫定版, <http://www.aist-riss.jp/assessment/11911/>.
- 7) 鈴木哲矢, 三浦伸彦, 北條理恵子, 柳場由絵, 須田 恵, 長谷川達也, 宮川宗之, 王 瑞生. 二酸化チタンナノ粒子を尾静脈投与したマウスにおける遺伝毒性. *労働安全衛生総合研究所特別研究報告* 2015; SRR-No.45: 93-99.
- 8) 三浦伸彦, 大谷勝己, 長谷川達也, 北條理恵子, 柳場由絵, 鈴木哲矢, 須田 恵, 王 瑞生. 二酸化チタンナノ粒子が示す精巣機能障害. *労働安全衛生総合研究所特別研究報告* 2015; SRR-No.45: 115-118.
- 9) Suda M, Honma T, Miyagawa M, Wang RS. Alteration of brain levels of neurotransmitters and amino acids in male F344 rats induced by three-week repeated inhalation exposure to 1-bromopropane. *Ind. Health*. 2008; 46: 348-359.
- 10) Oldendorf WH. Brain uptake of radiolabeled amino acids, amines, and hexoses after arterial injection. *Am. J. Physiol.* 1971; 221: 1629-1639.
- 11) Hu R, Gong X, Duan Y, Li N, Che Y, Cui Y, Zhou M, Liu C, Wang H, Hong F. Neurotoxicological effects and the impairment of spatial recognition memory in mice caused by exposure to TiO<sub>2</sub> nanoparticles. *Biomaterials*. 2010; 31: 8043-8050.
- 12) Li Y, Li J, Yun J, Li W, Kang C, Huang Q, Li Q. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *J Nanosci. Nanotechnol.* 2010; 10: 8544-8549.