

# 二酸化チタンナノ粒子が示す精巣機能障害

三浦 伸彦\*1, 大谷 勝己\*2, 長谷川 達也\*3, 北條 理恵子\*1, 柳場 由絵\*1,  
鈴木 哲矢\*1\*4, 須田 恵\*1, 王 瑞生\*1

二酸化チタンナノ粒子(TiO<sub>2</sub> NPs)は肝臓や肺などの主要臓器への障害についての報告が散見されるものの、雄性生殖機能への影響に関する情報は乏しい。本研究では TiO<sub>2</sub> NPs が精巣機能に与える影響を、マウスを用いて検討した。超音波処理でリン酸二ナトリウム液に分散させた TiO<sub>2</sub> NPs を、マウスに 2 または 5 mg/kg 体重の投与量で週 1 回、合計 4 回尾静脈投与し、最終投与 9 日後に精巣及び精巣上体尾部を摘出して精巣への影響を解析した。精巣機能の指標としては、精子数及び精子運動能を用いた。なお精子運動能は、全精子中の運動精子数の割合 (motile percent: MP) 及び運動精子中の良好精子の割合 (progressive percent: PP) の 2 つのパラメーターについて検討した。その結果、TiO<sub>2</sub> NPs の投与は精巣及び精巣上体尾部ともに精子数を有意に減少させた。また、精巣上体尾部から遊出させた成熟精子の運動能は、MP 及び PP の両パラメーターとも有意に低下した。これらの結果から、TiO<sub>2</sub> NPs が精巣機能障害を引き起こす可能性がマウスを用いて示された。

**キーワード:** 二酸化チタンナノ粒子, 精巣機能, 精子数, 精子運動解析システム(CASA)

## 1 はじめに

工業ナノ材料の中でも二酸化チタンナノ粒子(TiO<sub>2</sub> NPs)の使用量は多く、日本ではカーボンブラック、シリカに次いで 3 番目に多い年間約 1,250 トンである<sup>1)</sup>。その用途は日焼け止めや化粧品、白色塗料、食品着色剤、抗菌剤など多岐に渡る<sup>2,3)</sup>。TiO<sub>2</sub> NPs は、従来から用いられてきたチタン微粒子(fine particle)に比べて比表面積が極めて大きく、量子サイズ効果によって物性が大きく異なる<sup>2)</sup>。そのためヒトの健康を損なう可能性が指摘されてきている。ナノテクノロジーの進歩は速く、様々な粒子サイズに加えて新たなナノ材料が導入されていることから、労働者の取り扱うナノ材料が有する健康影響への関心は高まっている。

ヒトにおける TiO<sub>2</sub> NPs のリスク評価を考える場合、TiO<sub>2</sub> NPs の遺伝毒性誘発の有無や、発がんリスク増加の有無が先ず問題となるが<sup>4)</sup>、生殖毒性による次世代影響の有無の解明も大きな課題である。本プロジェクト研究では TiO<sub>2</sub> NPs の遺伝毒性について、*gpt delta* マウス<sup>5)</sup>を用いた検討を行ってきたが、併行して TiO<sub>2</sub> NPs の精巣毒性についても解析を進めてきた。TiO<sub>2</sub> NPs が雄性生殖機能に与える影響に関する情報は乏しいが、TiO<sub>2</sub> NPs はマウス精巣のライディッヒ細胞に取り込まれ、ライディッヒ細胞の生存率を低下させ、また増殖を阻害すること<sup>6)</sup>、さらにチタン化合物(チタノセン塩化物)がマウス精巣の血液精巣関門に障害を与えるとの報告がある<sup>7)</sup>。本稿では、TiO<sub>2</sub> NPs がマウスの精子形成能や精子運動能など、精巣機能に及ぼす影響について本プロジェ

クト研究の一環として検討した結果を示す。なお、本稿の結果は既に学術雑誌に掲載されている<sup>8)</sup>。

## 2 材料と方法

### 1) 試薬及び機器

TiO<sub>2</sub> NPs (Aerioxide<sup>®</sup> P25)は Sigma-Aldrich 社から、リン酸二ナトリウム(DSP)は和光純薬から購入した。なお、Aerioxide<sup>®</sup> P25 は 1 次粒子径約 21 nm、アナターゼ型：ルチル型=80:20 の混合粉末である。精子機能解析には Hamilton Thorone Research 社製の精子運動解析システム(CASA; HTM-IVOS Ver. 12.1M)を用いた。

### 2) TiO<sub>2</sub> NPs 懸濁液の調製

TiO<sub>2</sub> NPs 粉末を乾熱滅菌器で 180°C、1 時間滅菌し、10 mg/ml の濃度になるようにガラスバイアル中で DSP (2 mg/ml)に懸濁した<sup>9 10)</sup>。それを Branson 社製の超音波洗浄機 (Bransonic 2510) に浸して 30 分間超音波処理した後、2 mg/ml (10 mg/kg 投与用)及び 0.4 mg/ml (2 mg/kg 投与用)の濃度になるように DSP で希釈して試料とした。また DSP のみを同様に超音波処理したものを分散媒コントロールとして用意した。超音波処理後の TiO<sub>2</sub> NPs の粒子サイズは Malvern 社製の Zetasizer Nano-ZS を用いて測定した。

### 3) ばく露方法

雄性 C57BL/6J *gpt delta* マウス (7 週齢) を日本 SLC 社から購入し、1 週間の馴化後に使用した。動物は、室温 24 ± 1°C、湿度 55 ± 5%、12 時間の明暗サイクル (8:00 に照明点灯) で飼育し、飼料(固型飼料 CE2, 日本クレア社製)及び水 (濾過滅菌水) は自由に摂取させた。

8 週齢の *gpt delta* マウスに TiO<sub>2</sub> NPs を 2 または 10 mg/kg 体重の投与量で週 1 回、合計 4 回尾静脈投与し、最終投与 9 日後に二酸化炭素気流下で屠殺して精巣関連臓器 (精巣, 精巣上体頭部, 精巣上体尾部) を摘出した。それぞれの臓器重量を測定し、体重当たりの割合 (%) として算出した。精子運動能の解析は、右側の精巣上体尾部

\*1 労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ。

\*2 労働安全衛生総合研究所有害性評価研究グループ

\*3 山梨県富士山科学研究所

\*4 現所属：広島大学大学院医歯薬保健学研究院

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 三浦 伸彦

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

を用い、臓器摘出後速やかに解析に用いた（下記“精子運動能解析”に記載）。また精子数は、左側の精巣及び精巣上体尾部を 4℃に保存しておき、下記“精子数の測定”に記載した方法で測定した。

これら一連の実験は、「労働安全衛生総合研究所動物実験指針」及び「労働安全衛生総合研究所組換え DNA 実験安全管理規則」に従って行った。

#### 4) 精子運動能解析

マウスを屠殺後、迅速に精巣上体尾部を摘出して重量を測定し、右側の精巣上体尾部を 2 ml の培地 (0.5% BSA を含む Medium 199, 37℃保温) 中でハサミを用いて細切して精子を培地中に遊走させた。精子懸濁液をキャピラリーマイクロスライド #HTR1099 (100 μm 深, VitroCom 社製) にロードし、HTM-IVOS を用い CASA システムによる精子運動能の解析を行った。精子運動能は、全精子中の運動精子数の割合 (motile percent: MP) 及び運動精子中の良好精子の割合 (progressive percent: PP) の 2 つのパラメーターについて調べた。

#### 5) 精子数の測定

解剖時に 4℃に保存しておいた左側の精巣及び精巣上体尾部を生理食塩水中でホモジナイズした。精子をヘキスト色素 (IDENT STAIN, Hamilton Thorone Research 社製) と混合して精子頭部を染色後、チャンバースライド (CELL-VU, Millennium Science 社製) に滴下し、HTM-IVOS を用いて測定を行った。測定には RAT-IDEN モードを使用し、紫外線ビーム照射で蛍光を発した精子数をカウントした。精子数は、臓器重量から計算した臓器当たりの精子数として示した。

#### 6) チタン定量

精巣中のチタン量は、右側の精巣を湿式灰化後、誘導結合プラズマ質量分析 (ICP-MS) 法を用いて定量した。まず正確に秤量した精巣を、予め硝酸 (関東化学社; 電子工業用) 2 ml を分注した 15 ml 試験管に入れ、ホットプレート上で加熱・乾固させた。次に、硝酸分解した試料の脱炭を行うために、乾固させた試料に過酸化水素水 (関東化学社; 電子工業用) を 2 ml 加え、さらに硝酸を 0.5 ml 加えた後に同様に加熱・乾固させた。ここに内部標準液 (Sc, Y, In の 20 ppb 混合液) を 2 ml 加えてよく攪拌し、このサンプルをフローインジェクション ICP-MS 装置 (ISIS-HP4500, ヒューレットパッカード社) を用いて Ti の定量 (質量数 47 m/z を採用) を行った。

#### 7) 統計学的処理

データは平均値±SD として示した。統計解析は分散分析後、Tukey-Kramer 多重比較検定を用いて行い、有意水準は 0.05 とした。

### 3 結果および考察

#### 1) 体重及び臓器重量への影響

TiO<sub>2</sub> NPs のマウスへの静脈内投与は 0.1 ml/20 g 体重のボリュームで行った。すなわち、10 mg/kg 体重の投与量の場合、調製する TiO<sub>2</sub> NPs の濃度は 2 mg/ml となる。この濃度の TiO<sub>2</sub> NPs のサイズを測定したところ、平均粒子径は約 150 d.nm であった (データ示さず)。

調製した TiO<sub>2</sub> NPs を週 1 回、合計 4 回投与して最終投与 9 日後のマウスの体重は、投与群 (2 mg/kg 及び 10 mg/kg) と非投与群 (対照群) の間で有意な変動は認められなかった (表 1)。また精巣関連臓器 (精巣・精巣上体頭部、精巣上体尾部) の重量にも有意差はなく、これは体重当たりの相対重量 (% ; カッコ内に表示) で比較しても有意差を示さなかった (表 1)。従って今回用いた TiO<sub>2</sub> NPs の投与量では、体重や精巣関連臓器重量には変動を与えないことが示された。

表 1 チタン投与後の体重及び精巣関連臓器重量

Group name	Body weight	Testes	Epididymides	Cauda epididymides
Control (DSP) (n=5)	25.7 ± 2.2	0.200 ± 0.012 [0.784 ± 0.100]	0.046 ± 0.010 [0.178 ± 0.031]	0.027 ± 0.005 [0.104 ± 0.019]
TiO <sub>2</sub> NPs (2 mg/kg) (n=4)	24.2 ± 0.9	0.200 ± 0.011 [0.828 ± 0.033]	0.040 ± 0.006 [0.166 ± 0.031]	0.023 ± 0.002 [0.097 ± 0.011]
TiO <sub>2</sub> NPs (10 mg/kg) (n=4)	25.0 ± 1.0	0.205 ± 0.004 [0.819 ± 0.049]	0.050 ± 0.007 [0.201 ± 0.022]	0.025 ± 0.002 [0.102 ± 0.007]

各重量はグラム表示。重量下部のカッコ内の数値は体重当たりの相対重量(%)を示す。文献(8)より。

#### 2) TiO<sub>2</sub> NPs が精子数に及ぼす影響

次に、精巣機能への影響を調べた。まず精巣上体尾部の精子数を測定したところ、TiO<sub>2</sub> NPs の投与により対照群と比較して投与量依存的な顕著な精子数の減少が認められ、10 mg/kg の投与量では対照群の 50%程度にまで減少した (図 1-a)。この減少は精巣でも観察され、精巣中の精子数は同様に投与量依存的に半減した (図 1-b)。なお、この時 50 mg/kg の投与量での検討も行ったが、複数回の実験での再現性が認められなかったため本稿ではこの投与量での結果を省くこととした。

精子は精巣内の精粗細胞で作られ、段階的に分裂・成熟し精巣上体尾部に至る過程で成熟精子となる<sup>14)</sup>。本実験で観察された TiO<sub>2</sub> NPs による精巣及び精巣上体尾部での精子数減少は、TiO<sub>2</sub> NPs がこれら精子形成ステージに影響を及ぼす可能性を示している。

#### 3) TiO<sub>2</sub> NPs が精子数運動能に及ぼす影響

そこでさらに成熟精子の機能への影響について、精子運動能を MP, PP の 2 つのパラメーターを指標に調べた。その結果、TiO<sub>2</sub> NPs の投与により両パラメーターの値は著しく低下し、10 mg/kg の投与量では対照群の 20%程度であった (図 2-a, -b ; なお、control 群の MP, PP それぞれの実測値は、78.6±9.4 及び、22.2±9.9 であった)。

以上の結果より、TiO<sub>2</sub> NPs の投与によって精子数・精子運動能の値が共に減弱することから、TiO<sub>2</sub> NPs が精巣機能に対して量・質共に有害影響を及ぼすことが示された。

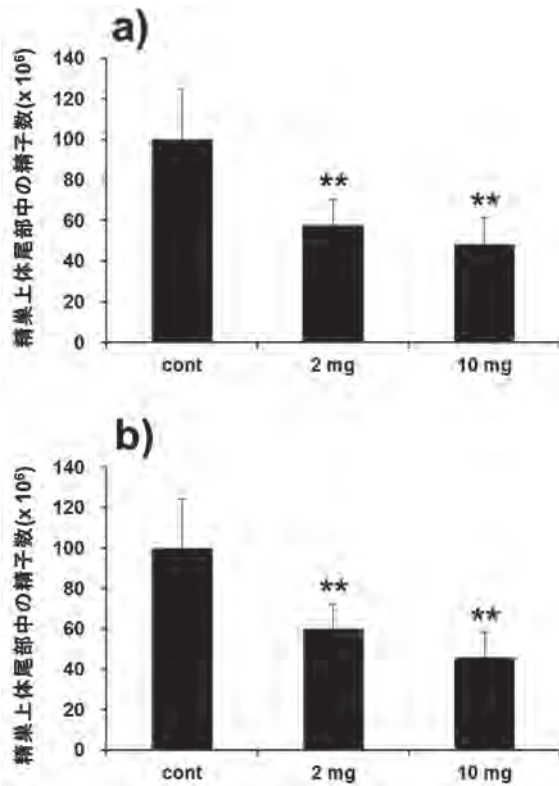


図1 チタン投与後の精巣上体尾部(a)及び精巣(b)中の精子数. チタン最終投与9日後の測定値を示す.  
\*\*対照群に対する有意差( $p < 0.01$ ).

#### 4) 精巣中チタン濃度

TiO<sub>2</sub> NPs による精子数の減少が、精巣に取り込まれたチタンによって誘発されている可能性がある。そこで精巣(右側を使用)中のチタン濃度を ICP-MS を用いて測定した。その結果、10 mg/kg の投与量で対照群に比べて若干の上昇が認められたものの有意差はなく、いずれの値もほぼバックグラウンドレベルであった(図3)。

#### 4 まとめ

TiO<sub>2</sub> NPs の投与により、体重や精巣関連臓器の重量に変動が認められない投与量で(表1)、精巣機能が量・質共に阻害されることが示された(図1及び図2)<sup>8)</sup>。この結果は、TiO<sub>2</sub> NPs が血中に入れば精巣機能に有害影響を与えることを示す。

労働衛生学における「衛生」分野では毒性学的な視点が重要であり起点である。本稿では静脈内投与を TiO<sub>2</sub> NPs の投与経路としたが、これは先ず血中に取り込まれた TiO<sub>2</sub> NPs の生体影響を把握するという毒性学的順位による。今後、気管内投与や吸入ばく露による検討による。

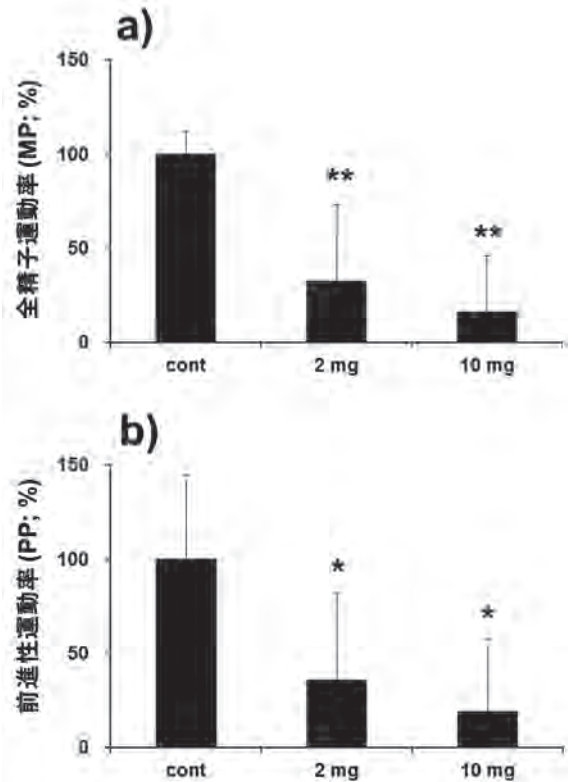


図2 チタン投与後の精子運動能(全精子運動率(a)及び前進性運動率(b)). チタン最終投与9日後の測定値を示す. 文献(8)より.  
\*\*\* 対照群に対する有意差(\*\* $p < 0.01$ , \* $p < 0.05$ ).

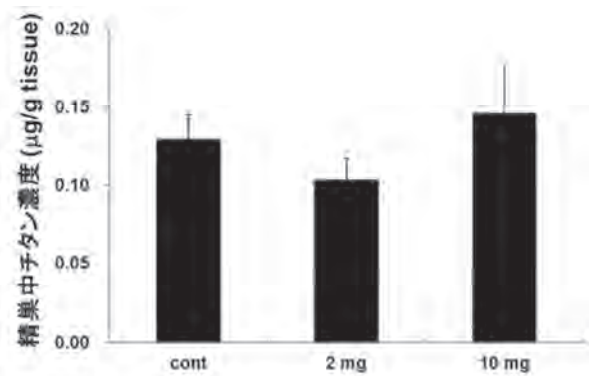


図3 チタン投与後の精巣中チタン濃度. チタン最終投与9日後の測定値を示す. 文献(8)より.

り、TiO<sub>2</sub> NPs が示す精巣機能障害を明確にしていく予定である。このような基礎実験を駆使した毒性評価を蓄積することにより、工業ナノマテリアルの種類や取り扱い量の増加、粒子サイズ変化が予測される今後の労働現場において、労働者の健康を維持するための基礎的な科学的知見を集積することができる。

なお、著者ら(三浦・大谷)は TiO<sub>2</sub> NPs が示す精巣機能障害について、本プロジェクト研究を基に科研費基盤研究(B)を申請し平成27年度から採択されたことから、さらなる知見の集積が期待できることを付記する。

参 考 文 献

- 1) (独)物質・材料研究機構「NIMS レアメタル・レアアース特集」.  
<http://www.nims.go.jp/research/elements/rare-metal/study/index.html> (2015年6月17日)
- 2) Dastjerdi R, Montazer M. A review on the application of inorganic nano-structured materials in the modification of textiles: focus on anti-microbial properties. *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010; 79: 5-18.
- 3) Tsuji JS, Maynard AD, Howard PC, et al. Research strategies for safety evaluation of nanomaterials, part IV: risk assessment of nanoparticles. *Toxicol Sci* 2006; 89: 42-50.
- 4) Klien K, Godnic-Cvar J. Genotoxicity of metal nanoparticles: focus on in vivo studies. *Arh Hig Rada Toksikol* 2012; 63: 133-145.
- 5) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, et al. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi<sup>-</sup> and 6-thioguanine selections. *Environ Mol Mutagen* 1996; 28: 465-470.
- 6) Komatsu T, Tabata M, Kubo-Irie M, et al. The effects of nanoparticles on mouse testis Leydig cells in vitro. *Toxicol In Vitro* 2008; 22: 1825-1831.
- 7) Pereira ML, Garcia e Costa F. The blood-testis barrier as a target of some chemotherapeutic agents. *Chemotherapy* 2007; 53: 446-448.
- 8) Miura N, Ohtani K, Hasegawa T, et al. Hazardous effects of titanium dioxide nanoparticles on testicular function in mice. *Fund Toxicol Sci* 2014; 1: 81-85.
- 9) Kobayashi N, Naya M, Endoh S, et al. Comparative pulmonary toxicity study of nano-TiO<sub>2</sub> particles of different sizes and agglomerations in rats: different short- and long-term post-instillation results. *Toxicology* 2009; 264: 110-118.
- 10) Naya M, Kobayashi N, Ema M, et al. In vivo genotoxicity study of titanium dioxide nanoparticles using comet assay following intratracheal instillation in rats. *Regul Toxicol Pharmacol* 2012; 62: 1-6.
- 11) Seligman J, Kosower NS, Shalgi R. Effects of caput ligation on rat sperm and epididymis: protein thiols and fertilizing ability. *Biol Reprod* 1992; 46: 301-308.