

平成21年3月31日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19390162
 研究課題名（和文） 金属ナノ粒子のマウス経気道曝露による嗅覚系ニューロンを介した体内動態の解明
 研究課題名（英文） Bio-kinetics of Metal Nano Particle via Olfactory Neurons after Inhalation to Mice
 研究代表者
 内山 巖雄（UCHIYAMA IWAO）
 京都大学・大学院工学研究科・教授
 研究者番号：20151897

研究成果の概要：ディーゼル排気中ナノ粒子曝露を行ったマウスを用い、嗅覚系ニューロンを介した大脳辺縁系への曝露経路を形態的に解明することを目的とし、実験を行った。測定は、放射光施設 SPring-8 にて、嗅上皮、嗅球における各種金属（Ca, Cu, Fe, Ni, Zn）の蛍光 X線マッピングをおこなった。その結果、Fe, Ni, Zn の値が、神経の存在する組織層で高い値を示した。粒子の侵入がある可能性が高いことが確認された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	7,800,000	2,340,000	10,140,000
2008年度	5,300,000	1,590,000	6,890,000
年度			
年度			
年度			
総計	13,100,000	3,930,000	17,030,000

研究分野：医歯薬学

科研費の分科・細目：社会医学・衛生学

キーワード：ディーゼル排気，ナノ粒子，嗅覚神経，マッピング，放射光

1. 研究開始当初の背景

嗅覚神経を介した曝露系の検索は、Oberdörster¹⁾らにより進められてきた。Mn ナノ粒子（直径 30nm, 450 μg/m³）を曝露したところ、対照群と比較すると、ラットの嗅球で、約 2.5 倍に増加していることを確認した。さらに、右の鼻を覆って曝露したところ、右の嗅球では対照群と同じレベルであったが、左の嗅球では両鼻曝露時と同量の値の増加を確認した。

さらに彼らは、カーボンナノ粒子経気道曝露をラットにおこない、トレーサー実験をおこなった²⁾。これによると、粒子の多くは肺

に移行するが、時間の経過と共に、嗅球での増加が観察された。嗅覚に着目した曝露経路に関する研究は、他に無く、彼らの近年の研究で明らかになってきている。しかしながら、これらの実験は嗅神経にナノ粒子が侵入し、中枢神経に到達するという経路の解明には到っていない。ナノ粒子はリンパや血液などの様々な体液を介してヒトの体内に侵入する。神経に侵入し、粒子が移動するという事実は、まだ証明されていない。

1) Günter Oberdörster, Eva Oberdörster, and Jan Oberdörster : An Emerging

Discipline Evolving from Studies of Ultrafine Particles, Environmental Health Perspectives, 7(113) : 823-39, 2005

2) Günter Oberdörster, Z. Sharp, V. Atudorei, A. Elder, R. Gelein, W. Kreyling and C. Cox : Translocation of Inhaled Ultrafine Particles to the Brain, Inhalation Toxicology, 16 : 437-445, 2004

2. 研究の目的

本研究では、ディーゼル排気ナノ粒子 (DEP) 曝露をおこなったマウスを用い、嗅覚系ニューロンを介した中枢神経系 (大脳辺縁系) への曝露経路を解明することを目的とする。金属ナノ粒子 (超微小粒子; <100 nm) の嗅覚系ニューロンへの局在を定量的に観察することで、これまで報告されたことのない、嗅覚を介した曝露経路を解明する意義がある。過去の研究報告では、嗅神経にナノ粒子が侵入し、中枢神経に到達するという経路の解明には到っていない。ナノ粒子はリンパや血液などの様々な体液を介してヒトの体内に侵入する。神経に侵入し、粒子が移動するという事実は、まだ証明されていない。

著者らは、以下の仮説を提唱し、これを元の実験を行うこととした。はじめに、鼻粘膜にナノ粒子が付着し、嗅上皮に直接露出している直径数 10 μm の嗅神経にこれが進入する。粒子は、一次ニューロン内の軸索流 (fast anterograde transport) により嗅球系球体へと運搬される。さらに嗅球の系球体部で、シナプスを超え、二次ニューロンへと侵入し、その投射先である扁桃体などの高次脳中枢に運搬される。軸索流の速度は、200~400 mm/day、ヒトの嗅神経の全長が 35~50 mm であることを考慮すると、粒子が神経に侵入してから、2.1~6 時間で中枢に到達すると推測できる。これは、既報の Oberdörster らの結果とも、ほぼ一致する。

3. 研究の方法

著者らは、既述した仮説を証明するために、2 つの曝露実験系を行った。1 つ目は、ラットを用いた点鼻投与、気管内投与実験である。2 つ目は、実際にディーゼルエンジンを曝露チャンバーに接続し、ディーゼル排気ナノ粒子を、マウスに曝露した。前者により、1) 粒子が神経に侵入してから、中枢神経に到達するまでの時間、2) 曝露する粒子の粒径に

よる、神経への侵入量の変化と、中枢への到達時間の違い、3) 粒子に用いる金属種の違いによる、その違い、4) 肺からの侵入と、鼻からの侵入で、中枢へ達する粒子の量の違い、を確認することができる。後者も同様に、神経に侵入した粒子の、中枢までの到達時間と、粒子の神経層への局在を、シンクロトロン放射光を用いて観察を行った。前者の曝露系と、後者の曝露系の大きな違いは、前者は粒子自体が金属であるナノ粒子を、点鼻、気管内投与するのに対し、後者はディーゼル粒子の核である炭素粒子に金属が付着している状態で、粒子を経気道曝露する。

これまでナノ粒子を用いた曝露実験は、多数報告されている。しかし、体内に侵入することは確認できても、そのナノ粒子がどのような機序で、ヒトの健康に影響しているかを議論している論文は無い。我々は粒子の侵入により、その粒子を媒体に、もしくはその粒子から乖離した金属元素が中枢神経 (扁桃体、梨状葉) に到達することで健康影響が生じていると推測している。両実験から、一般環境において、ヒトの体内で粒子そのものが中枢に達している、もしくは粒子付着元素が別の形で中枢に達しているかが明らかとなるものと考ええる。

4. 研究成果

(1) DEP をマウスに吸入曝露し、嗅粘膜および嗅球における、SR-XRF を用いた金属元素マッピングを行った。これにより、DEP が嗅神経を介して嗅球へ移動するかどうかを検討した。事前の測定において、DEP に付着した金属元素は、Na, Al, Ca, Ti, Zn, Mo が多く含まれていることが分かった。この内、Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br をマッピング対象元素とした。嗅神経の存在する部位にビームを照射するために、測定を行う前に免疫染色を行い、測定対象領域を選定した。嗅神経を免疫染色する抗体を用いることで、嗅粘膜、嗅球に存在する嗅神経の分布像を得ることができた。抗体として、Neuronal nuclei (NeuN) を用いた。染色後に、共焦点レーザー走査型顕微鏡で切片を観察し、マッピング部位を選定した。大型放射光施設 (SPring-8) にて、選定部位にビームを照射し、SR-XRF によるマッピング像を得た。測定後、一般染色 (クリューバー・バレラ染色) を行い、光学顕微鏡で観察した。マッピング画像と、免疫染色

像，一般染色像とを重ね合わせて，イメージングを完了した。この結果から，対照群 (Fig 1) と曝露群 (Fig 2) を比較し，曝露群の嗅粘膜，嗅球で金属が局在しているかどうかを考察した。嗅粘膜のマッピングでは，曝露群の嗅上皮の粘膜層近傍において，Fe, Cu, Zn, Br の増加が見られた。この部位は成熟した嗅神経の細胞体が存在する部位である。また，粘膜固有層に存在する嗅神経束においても，これら 4 元素の count 値は対照群よりも顕著に高くなった。したがって，DEP が嗅神経内に侵入し，一部は細胞体で蓄積し，残りは軸索流により嗅球へ移動した可能性が考えられる。嗅球のマッピングでは，対象としたすべての金属元素において，対照群と曝露群との間で顕著な違いは見られなかった。

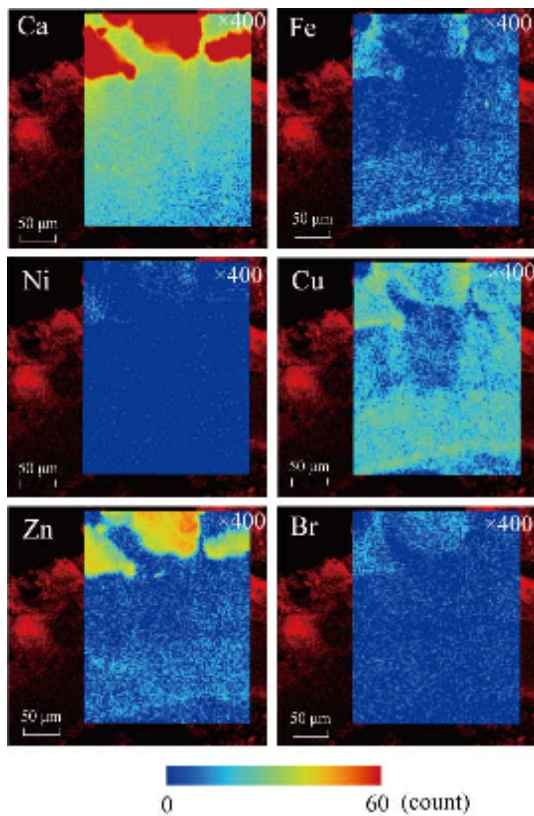


Fig 1 対照群のマウスの嗅粘膜における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br のマッピング像

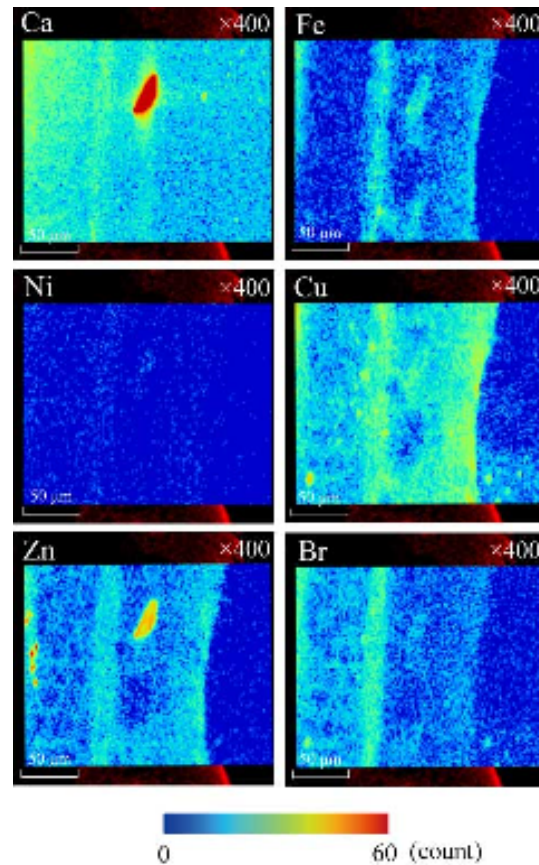


Fig 2 曝露群のマウスの嗅粘膜における Ca, Fe, Ni, Cu, Zn, Br のマッピング像

(2) DEP の懸濁液を作成することで，マウスの左鼻に点鼻投与した。これにより，鼻腔に強制的に高濃度の DEP を曝露することができる。Oberdörster ら (2004) は²⁾，カーボンナノ粒子の吸入曝露により，曝露から 1 日後に嗅球中の炭素量が最大となるとの報告をしている。そこで，本実験でも点鼻投与から 24 時間後にマウスを解剖することとした。凍結切片法により切片を作成し，SR-XRF による金属元素マッピングを行った。その後，嗅神経の免疫染色および一般染色を行い，マッピング像と重ね合わせた。2 つ目は，DEP に付着する多種の金属元素のうち，どの金属がどのような結合型で，中枢神経系まで達しているかを明らかにすることを目的とした。マッピングで高値を示す領域において，Zn の XAFS 分析を行い，対照群と曝露群のスペクトルを比較した。生体内に存在する Zn のスペクトルとの違いを検討し，高値を示した領域の金属が DEP 由来の金属であることを確認した。

嗅粘膜のマッピングでは，対照群と曝露群

では明らかに異なる結果を得た。曝露群の嗅上皮では、マッピング像右下の粘膜層近傍で6元素ともに count 値が高かった。したがって、DEP が嗅神経内に侵入し、嗅神経の細胞体で蓄積された可能性がある。一方、粘膜固有層では金属種により count 値が高い値を示す領域に差が見られた。Ni, Zn のマッピング像では、嗅粘膜全体で高い count 値を示した。粘膜固有層は嗅神経束の他にも血管やボウマン腺などが存在するため、これらの組織でも Ni, Zn の count 値が増加していることになる。Fe のマッピング像では、基底膜近傍の粘膜固有層で高い count 値を示し、その他の部位では対照群よりやや高い count 値を示した。

一方、Mn, Cu のマッピング像では、ほぼ対照群と変わらなかった。この理由として、DEP が鼻腔に侵入した際、DEP に付着している金属元素の挙動が、金属種により異なるためであると考えられる。曝露群の糸球体層における Cu, Ni, Zn のマッピング像 (Fig 4) において、高い count 値を示すスポットが数点現れた。対照群にはそのようなスポットは存在しない (Fig 3) ことから、DEP 由来の金属元素による count 値の増加である可能性が考えられた。この可能性を検証するために、この領域における XAFS 分析を行った。

その結果、DEP 懸濁液から得られた XAFS スペクトルと、このスポットから得られた XAFS スペクトルの X 線吸収端エネルギーがほぼ一致した。さらに、DEP 懸濁液に含まれる Zn の化学組成とこのスポットにおける Zn の化学組成が類似していることが分かった (Table 1)。この結果から、DEP 由来の金属元素が嗅球まで到達している可能性があった。

これにより、DEP が嗅神経に侵入し、移動している機序が明確になったと断言はできない。しかしながら、スポット状の高値が嗅球で現れている点や、そのスポットが Zn に関しては生体に元来存在しているものとは、異なる化合物であった点、嗅粘膜で DEP 曝露群は対照群と比較すると、すべての金属元素種において顕著に高い値を示している点、嗅球の嗅覚二次ニューロンのある層では、どの金属種も高い値を示さなかったことなどを考慮すると、DEP は嗅神経に侵入し、嗅覚一次ニューロンの終末部 (糸球体) まで到達していることが示唆された。

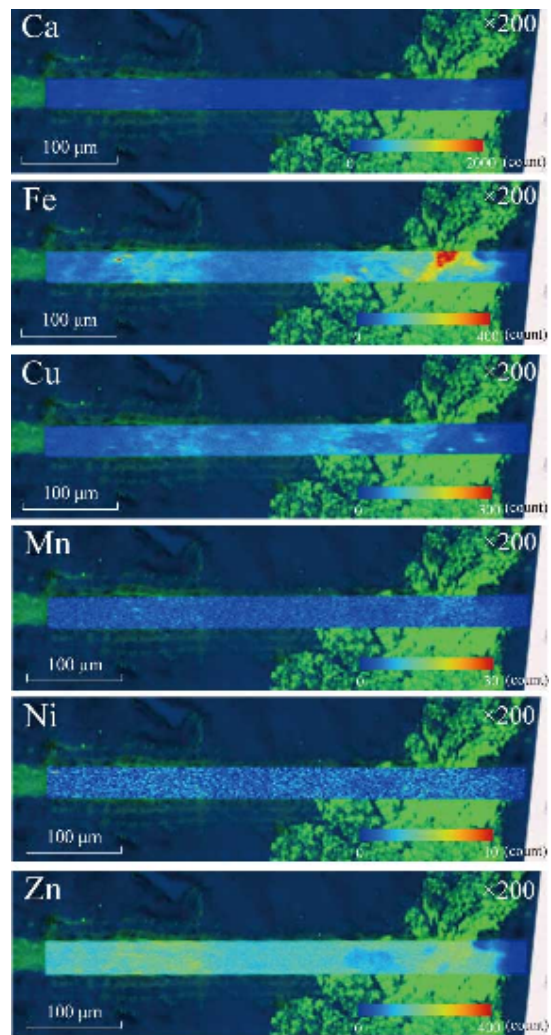


Fig 3 対照群のマウスの嗅球における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn のマッピング像

Table 1 XAFS スペクトルによる、Zn 標準試料に対する DEP 懸濁液、対照・曝露群嗅球中の Zn 組成の推測

Sample	Standard Compounds					
	Zn (%)	ZnO (%)	ZnO ₂ (%)	ZnSO ₄ (%)	Zn ₃ (PO ₄) ₂ (%)	Zn(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O (%)
DEP懸濁液					89.51	10.49
XAFS Control	18.892		60.491		20.617	
XAFS 1			17.653		71.641	10.706
XAFS 2		21.341			78.659	
XAFS 3		31.063			68.937	
XAFS 4	31.232		44.835		23.933	
XAFS 5	20.246		57.677		22.077	
XAFS 6	11.797		54.684		33.52	

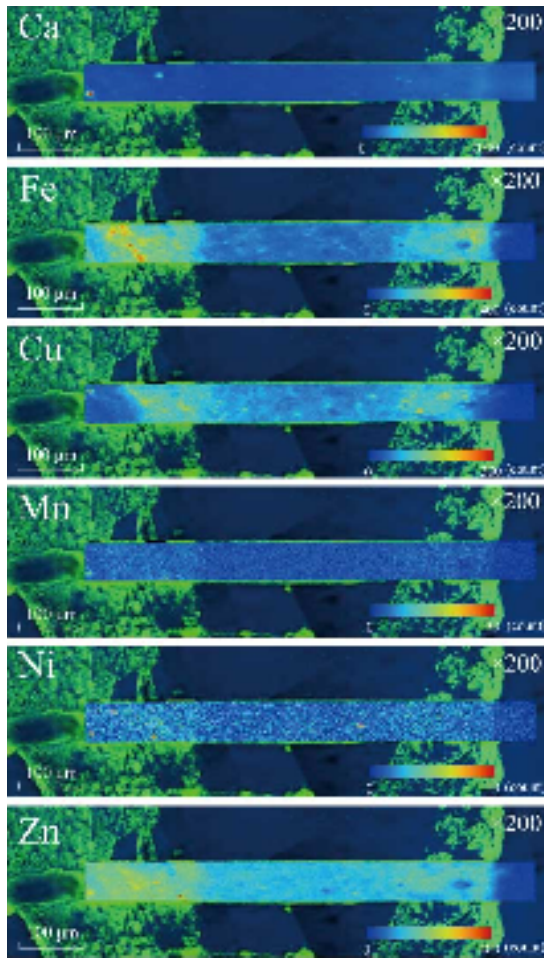


Fig 4 曝露群のマウスの嗅球における Ca, Mn, Fe, Ni, Cu, Zn のマッピング像

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① Y. Matsui, N. Sakai, A. Tsuda, Y. Terada, M. Takaoka, H. Fujimaki, I. Uchiyama, Tracking the Pathway of Diesel Exhaust Particles (DEP) from the Olfactory Bulb to the Central Nervous System by X-ray Fluorescence Analysis, *Spectrochimica Acta Part B*, 有, 29(3), 2007, 428-433

[学会発表] (計 5 件)

① Yasuto Matsui, Tracking a Pathway Diesel Exhaust Particle from Nose to Brain, American Thoracic Society, 2009. 5. 18, San Diego/USA

② Keisuke Kodera, Determination of formaldehyde hemoglobin adducts in mice as a biological exposure index for multiple chemical sensitivity, American Thoracic Society, 2008. 5. 16, Toronto/CANADA

③ Yasuto Matsui, Uptake of Nanoparticles by the Sensory Nerves in the Pulmonary Alveoli of Mice, American Thoracic Society, 2008. 5. 16, Toronto/CANADA

④ Nobumitsu Sakai, Imaging of Olfactory Nerves after Intranasal Administration of Ultrafine Colloidal Gold in Mouse, American Thoracic Society, 2008. 5. 16, Toronto/CANADA

⑤ Yasuto Matsui, Synchrotron imaging of Diesel Exhaust Particles in the Olfactory Nerve, American Thoracic Society, 2008. 5. 16, Toronto/CANADA

[図書] (計 1 件)

① 内山巖雄, 松井康人ほか, 中外医学社, ナノ粒子の生理学的活性・呼吸器, 2009, 296

6. 研究組織

(1) 研究代表者

内山 巖雄 (UCHIYAMA IWAO)
京都大学・大学院工学研究科・教授
研究者番号: 20151897

(2) 研究分担者

高岡 昌輝 (TAKAOKA MASAKI)
京都大学・大学院工学研究科・准教授
研究者番号: 80252485