

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 6 月 11 日現在

機関番号：15101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380181

研究課題名（和文）

ナノ粒子の空気血液関門突破機序および生体への影響

研究課題名（英文）

Mechanism of nano-particle translocation at the air-blood barrier and its effects on health

研究代表者

島田 章則（SHIMADA AKINORI）

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20216055

研究成果の概要（和文）：マウスの気道にナノ粒子（フラーレン，コロイド状ゴールド）を曝露し、ナノ粒子の局在、空気血液関門突破機序、組織傷害の有無、傷害の発生機序を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて解析した。ナノ粒子は肺に組織傷害をもたらさなかったが、肺胞壁の拡散の他に、空気血液関門を構成する肺胞上皮細胞をカベオラを介したエンドサイトーシスによって突破し、循環系に侵入する可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：After exposure of nano-particles (C60 Fullerene, colloidal gold) into the respiratory tract of mice, localization and translocation pathway of the particles, effects of the particles on the tissues were examined with the use of light microscopy, immunohistochemistry and electron microscopy. Nano-particles showed no signs of tissue damage in the respiratory system. Association of diffusion and caveolae mediated endocytosis were indicated as the translocation pathway of the exposed nano-particles.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2010年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2011年度	1,900,000	570,000	2,470,000
総計	5,900,000	1,770,000	7,670,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：畜産学・獣医学、基礎獣医学・基礎畜産学

キーワード：ナノ粒子、空気血液関門、突破機序、エンドサイトーシス、カベオラ、免疫組織化学、免疫電顕

## 1. 研究開始当初の背景

（1）工業型の大気汚染（硫黄酸化物）に比較し、市民型の大気汚染（自動車の排気ガス由来の窒素酸化物、浮遊粒子状物質）は悪化を続けている。大気汚染物質の一種の浮遊粒子状物質（Suspended particulate matter、以下 SPM）には、ディーゼル排気粒子、鉄やカドミウムなどの金属元素、黄砂などが含まれる。都市大気中の SPM と心肺疾患との関係が疫学的に示され世界的な検討課題と

なっている（SPM 研究調査結果報告、米国環境保護局 EPA, 2004 年、9 月）。SPM のうちでも、特に 100 ナノメートル以下の超微細粒子（ナノ粒子）の毒性への関心が世界的に高まっており、ヨーロッパおよび北米ではその規制が始まっている（Nanoscience and Nanotechnologies: opportunities and uncertainties, The Royal Society & The Royal Academy of Engineering, 2004）。

(2) ナノサイズの粒子は、大気汚染物質に限らず、球状の炭素分子フラーレン（直径0.67nm）や筒状のカーボンナノチューブが開発され、IT関連機器やスポーツ用具などの新素材、ナノ粒子配合化粧品などとして日本をはじめ各国で製造され商品化されている。ナノサイズの材料を用いた「ナノテクノロジー」は、わが国においては科学技術基本計画の重点4分野の一つとして位置づけられており今後の発展が期待されている。それだけに同時に「安全点検」も必要という認識が高まっている（朝日新聞社説 07.9.6: 「ナノテク 安全点検しながら育てよ」）。

(3) ナノ粒子の安全性については不明な点が多く、吸入後、肺胞壁の空気血液関門を突破し、血液循環系を介し、脳、免疫系、胎児を含めた生体組織全体へ移行することが示唆されている（ヒト: Nemmar et al. 2006、実験動物: Sugamata 2006）。また、培養細胞を用いた解析（電顕、レーザー走査顕微鏡）により、曝露されたナノ粒子が細胞内に取り込まれ（エンドサイトーシス: カベオラを利用）、核およびミトコンドリアに移行、それぞれに傷害をもたらすことが示唆された（Xia et al. 2008）。しかし、in vivoにおける詳細（侵入機序、生体への影響、影響の発生機序）は不明なまま残されている。

## 2. 研究の目的

ナノ粒子の空気血液関門突破機序、生体への影響、影響の発生機序を解明すること

## 3. 研究の方法

(1) ナノ粒子曝露マウスの呼吸器の光学顕微鏡・免疫組織学的解析

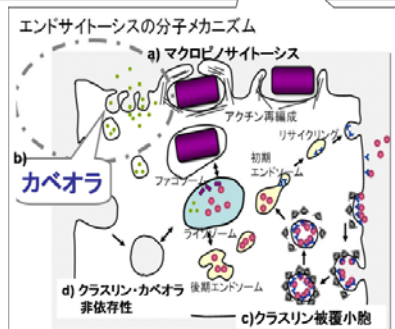
### ①ナノ粒子解析

カーボンナノ粒子蓄積の有無、細胞内局在、粒子径計測

### ②ナノ粒子血管侵入所見解析



ナノ粒子肺胞壁通過メカニズム



### ③ナノ粒子体内移行所見解析

### ④ナノ粒子の組織傷害機序

酸化ストレス起因組織傷害の解析、気腫・線維化機序解析

### ⑤ナノ粒子による生体影響評価

全身諸臓器（脳、心臓）の形態学的変性性諸変化

### ⑥防御系遺伝子（抗酸化ストレスタンパク）

の発現解析(免疫組織化学)

(2) ナノ粒子気管内曝露パラホルムアルデヒド固定肺、全身組織を用いての

### ①ナノ粒子沈着分布パターン観察 ← HE 染色標本

### ②肺胞壁(肺胞上皮、基底膜、血管内皮細胞)の電顕解析

### ③ナノ粒子の細胞内局在(核、細胞質内小器官: ミトコンドリア、輸送小胞、ライソゾーム、ペロキシゾーム)

(3) 粒子突破機序 ←透過型電子顕微鏡による解析: 細胞内エンドサイトーシス(カベオラ)に注目

### ①電顕解析: カベオラ構造とナノ粒子の関連

### ②免疫電顕解析: カベオラ特異蛋白(カベオリン)

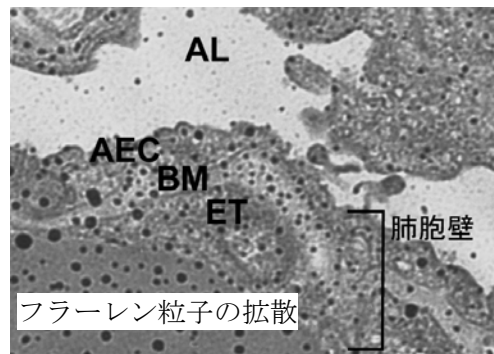
### ③免疫組織化学: カベオラ特異蛋白(カベオリン)

### ④ウェスタンブロットティング: カベオラ特異蛋白(カベオリン)

## 4. 研究成果

(1) マウスの気道にナノ粒子(フラーレン, コロイド状ゴールド)を曝露し、ナノ粒子の局在、空気血液関門突破機序、組織傷害の有無、傷害の発生機序を光学顕微鏡および電子顕微鏡を用いて解析した。

### ① 曝露直後から肺胞壁を拡散の機序により慢性に通過する。

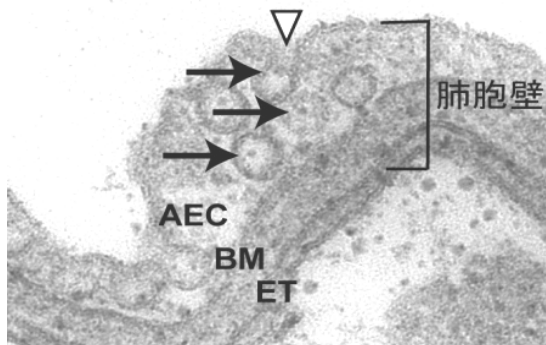


②肺胞上皮細胞内の微小空胞内に粒子が認められた。微小空胞は、抗カベオリン抗体陽性(免疫組織化学、免疫電顕)を示した。よって、ナノ粒子は、拡散の他に、空気血液関

門を構成する肺胞上皮細胞にカベオラを介したエンドサイトーシスによって取り込まれ、循環系に侵入する可能性が示唆された。

③フラレン、コロイド状ゴールドは肺胞壁構成細胞に傷害および炎症性変化を引き起こさない。

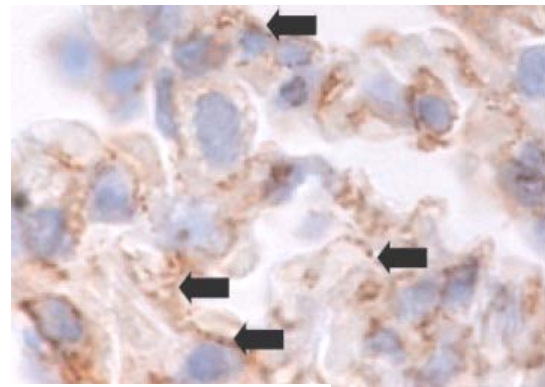
④肺胞上皮細胞および肺胞マクロファージ内の核および細胞内小器官（ミトコンドリア）内に侵入する所見が見られた。



カベオラ（矢頭）内のゴールド粒子（矢印）

また、粒子を含有しマクロファージが肺胞壁血管内に認められた。これは、肺胞壁に曝露された粒子がマクロファージを介して全身に移行することを示唆するものであると考えられた。また、肺胞壁における軽度から中等度の急性炎症が認められたが、他の臓器組織に傷害像は確認されなかった。これらの結果に曝露されたナノ粒子のサイズによる明らかな差は認められなかった。

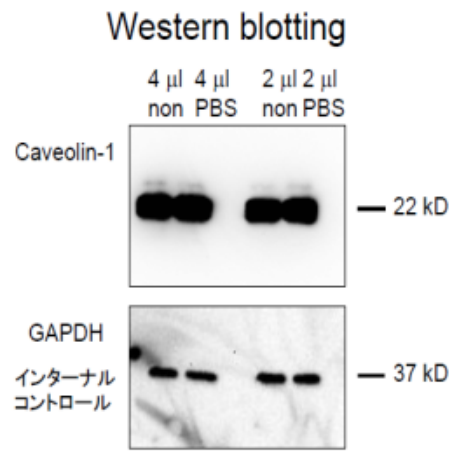
(3) 粒子の取り込み（エンドサイトーシス）におけるカベオラ蛋白の関与の解析  
粒子曝露個体の肺組織を用い、カベオラ蛋白に対する免疫組織化学（光学）を実施したところ、肺胞上皮細胞に陽性所見が認められ、カベオラを利用した細胞内への取り込みが関与することが示唆された。



カベオリン蛋白陽性像

(4) ナノ粒子の細胞内での挙動、特にエンドサイトーシス小胞におけるエンドサイトーシス関連蛋白（カベオリン、クラスリン）の発現の有無に注目し、2重免疫染色、ウエスタンブロッティング法および免疫電顕の手法を導入した。

①ナノ粒子曝露肺におけるエンドサイトーシス関連蛋白の発現 粒子投与群、コントロール群および無処置群肺においてエンドサイトーシス関連蛋白に対する免疫染色を行った。カベオラ構成蛋白であるカベオリンは全ての群において血管内皮細胞および1、2型肺胞上皮細胞に陽性を示した。また、クラスリン構成蛋白であるクラスリン重鎖は全ての群において2型肺胞上皮細胞およびマクロファージに陽性を示した。肺のホモジェネートを用いたウエスタンブロッティング法では、全ての群においてカベオリンの発現量に有意な差は認められなかった。

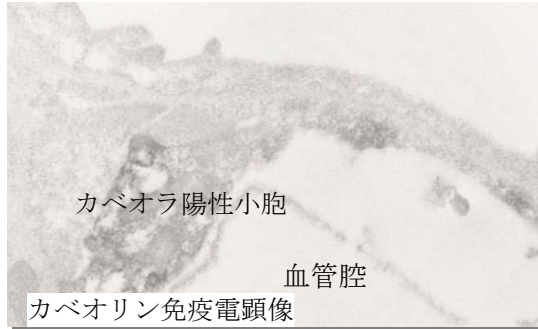


ウエスタンブロットの結果

②肺胞壁におけるカベオラ蛋白の局在  
無処置群の肺において肺胞上皮細胞のマーカーであるサイトケラチン抗体とカベオリン抗体を用いて蛍光二重免疫染色を行ったところ、サイトケラチン陽性を示す肺胞上皮

細胞にカベオリン陽性像が認められた。

③エンドサイトーシス小胞の同定  
エンドサイトーシスが見られた肺胞上皮細胞内の小胞の同定を目的に、無処置群の肺においてカベオリンに対する免疫電子顕微鏡学的検索を行った。免疫組織化学的検索の結果と同様にカベオラ陽性小胞は血管内皮細胞および肺胞上皮細胞に認められた。



以上より、気管内に投与された金ナノ粒子は空気血液関門を構成する肺胞上皮細胞にカベオラを介したエンドサイトーシスによって取り込まれる可能性が示唆された。

#### 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2件)

①Naota M, Shimada A, Morita T, Yamamoto Y, Inoue K, Takano H. Caveolae-mediated endocytosis of intratracheally instilled gold colloid nanoparticles at the air-blood barrier in mice. *Toxicologic Pathology*, 査読有、2012 in press

②Naota M, Shimada A, Morita T, Inoue K, Takano H. Translocation pathway of the intratracheally instilled C60 Fullerene from the lung into the blood circulation in mouse: possible association of diffusion and caveolae mediated pinocytosis. *Toxicologic Pathology*, 査読有、Vol. 37, 2009, pp. 456-462

[学会発表] (計2件)

①Naota M. Pathological study on the pulmonary toxicity induced by the intratracheally instilled Asian sand dust in mice. 4th Asian Society of Veterinary Pathologists Conference, 2009年11月19日, Chulalongkorn University, Bangkok, Thailand

②直田みさき、気管内投与黄砂粒子の急性肺毒性についての病理学的研究、第148回日本獣医学会学術集会、2009年9月26日、鳥取

市

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

島田 章則 (SHIMADA AKINORI)

鳥取大学・農学部・教授

研究者番号：20216055

##### (3) 連携研究者

高野 裕久 (TAKANO HIROHISA)

独立行政法人国立環境研究所・環境健康領域・領域長

研究者番号：60281698