

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：32701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580425

研究課題名(和文) 黄砂・ナノ粒子の生体影響：多重曝露後のナノ粒子の挙動

研究課題名(英文) Effects of yellow dust (Kosa) and nano-particles on health: localization of nanoparticles in the body after co-exposure of the particles

研究代表者

島田 章則 (SHIMADA, Akinori)

麻布大学・その他部局等・教授

研究者番号：20216055

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：黄砂粒子・金ナノ粒子を気道内に2重曝露されたマウスの肺に、急性炎症性肺組織傷害が観察された。肺胞マクロファージ、I型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞での炎症性サイトカイン(IL-6・TNF-)や酸化ストレスマーカー(Cu/Zn SOD・iNOS)発現を伴っていた。電顕解析では、肺胞壁の崩壊、I型肺胞上皮細胞・血管内皮細胞におけるエンドサイトーシス像の亢進・金ナノ粒子のエンドサイト小胞内の存在が示され、ナノ粒子の空気血液関門突破が示唆された。

金ナノ粒子の妊娠マウスへの曝露により、マウスの血液胎盤関門においてクラスリン・カベオリン小胞による粒子のエンドサイトーシスが亢進することが示唆された。

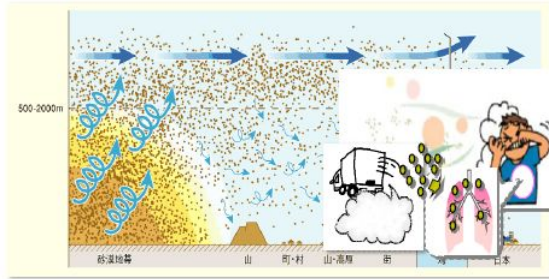
研究成果の概要(英文)：Lungs from mice treated with yellow dust(Kosa) and gold nanoparticles showed inflammation with cytokines (IL-6, TNF-) and oxidative stress markers (Cu/Zn SOD, iNOS) in alveolar macrophages, type I alveolar epithelial cells, and endothelial cells at the alveolar walls. Electron microscopy revealed a destruction of the alveolar walls with an increased number of endocytic vesicles containing nanoparticles in the cytoplasm of both type I epithelial cells and endothelial cells, suggesting that translocation of the nanoparticles may be enhanced in the lung tissues with acute inflammatory changes by Kosa.

An increase of endocytic vesicles in the cytoplasm of clathrin positive syncytiotrophoblasts and caveolin-1 positive fetal endothelial cells in the maternal fetal barrier of pregnant mice treated with gold nanoparticles, suggesting that intravenous administration of nanoparticles may upregulate clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal fetal barrier in placenta.

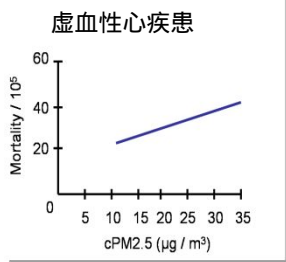
研究分野：獣医病理学

キーワード：黄砂 ナノ粒子 空気血液関門 エンドサイトーシス カベオリン クラスリン 血液胎盤関門

1. 研究開始当初の背景



黄砂の頻度が増加し、人々の健康への影響が懸念されている。また、人為的な大気汚染物質として、自動車排気ガスを由来とする微小粒子（いわゆるPM2.5: 2.5マイクロメートルより小さい粒子。その50%以上は0.1マイクロメートル以下のいわゆるナノ粒子であることが判明している）やナノテクノロジー発展により開発された商品（衣料品や化粧品を含む）の健康影響が注目されるようになってきている。



大気中微小粒子濃度と虚血性心疾患との関連性を報告した (Iwai K. et al. Environ Res 99, 106-117, 2005)。

黄砂およびナノ粒子に同時に曝露（多重曝露）される機会が増えていることから、その健康影響についての社会的関心が高い。

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

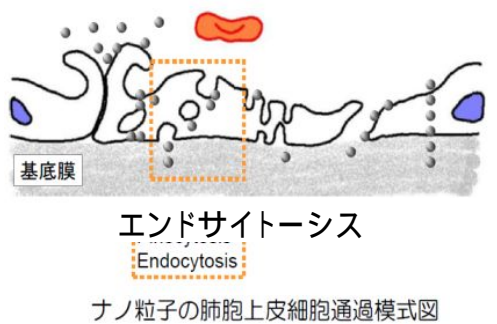
されている。また、培養細胞を用いた解析（電顕、レーザー走査顕微鏡）により、曝露されたナノ粒子が細胞内に取り込まれ（エンドサイトーシス：カベオラを利用）、核およびミトコンドリアに移行、それぞれに傷害をもたらすことが示唆された。しかし、*in vivo*における詳細（侵入機序、生体への影響、影響の発生機序）は不明なまま残されている。

したがって、黄砂・ナノ粒子の生体影響、特に、黄砂曝露の環境下でのナノ粒子の空気血液関門突破機序・生体への影響を解明することが急務である。

ナノ粒子はサイズが100nmよりも小さいことから、気道、消化管、皮膚・粘膜などを介しての生体への容易な侵入、血液空気関門（肺）血液脳関門（脳）や血液胎盤関門（胎盤）などの生物学的な関門（バリアー）の突破・全身循環、および細胞膜突破・細胞内侵入などの危険性が懸念されている。また、マクロファージによるナノ粒子の捕食などの防御系が炎症時のような病態下では破綻し、ナノ粒子の危険性がより増加する可能性があるため、病態下でのナノ粒子の危険性の検証が求められている。特に、近年、地球温暖化を背景とした砂漠化亢進や気候変動による黄砂の頻度および中国からのPM2.5の越境大気汚染の頻度が増加していることから、大気汚染物質を吸入し肺組織に傷害が惹起されること、およびナノテクノロジーの応用による身近な環境からのナノ粒子の曝露が同時に起こること、すなわち、これらの物質の気道での多重曝露による生体影響が懸念されている。また、胎盤では、血液胎盤関門を介して胎児に様々な物質が供給されることから、妊娠母体内に侵入したナノ粒子が、血液胎盤関門を突破し胎児に影響をもたらすことも懸念されている。

2. 研究の目的

黄砂の頻度および車両の交通量増加に伴う浮遊粒子状物質（黄砂、排気ガス中の微細粒子）の健康への影響を検討する目的で、マウスの気道に黄砂およびディーゼル排気粒子に代表されるナノ粒子を曝露（単一、多重）し、それによる肺・生体への影響を病理学的に明らかにする。



特に、黄砂曝露時の急性肺組織傷害下でのナノ粒子多重曝露によるナノ粒子の挙動（肺胞壁通過、全身循環）に注目する。また、妊娠母体内に侵入したナノ粒子が、血液胎盤関門を突破するかについても解析する。

3. 研究の方法

(1) 黄砂単独曝露実験

ICR マウスの気道に黄砂粒子を曝露し、曝露後 24 時間（急性毒性）、1 週間から 3 か月（慢性毒性）にわたり肺の組織傷害像を解析した。

(2) 黄砂・ナノ粒子多重曝露実験

黄砂曝露により惹起された急性炎症性肺組織傷害の病態下で金ナノ粒子を気道に投与し、金ナノ粒子の血液空気関門（肺）における挙動を病理学的に解析し、ナノ粒子の血液空気関門突破機序について検討した。

(3) ナノ粒子の胎盤での挙動

妊娠マウスの血中に金ナノ粒子を投与し、母体ならびに胎子の組織傷害の有無、金ナノ粒子の臓器・組織内での局在を解析した。

4. 研究成果

(1) 黄砂単独曝露実験：急性期では、肺胞壁の傷害像（電顕レベルでの肺胞上皮細胞の剥離、肺胞上皮細胞間隙形成、血管内皮細胞・肺胞上皮細胞細胞質内の小空胞形成：

物質輸送を示唆）、すなわち空気血液関門の脆弱化を示唆する所見が見られた。黄砂発生時に、野外で排気ガスや越境大気汚染物質（PM2.5）を同時に曝露（多重曝露）されると、黄砂の急性傷害により他の粒子状物質が肺から体循環系に侵入する危険性があることが示唆された。また、慢性期では、肺内に黄砂粒子が蓄積・存続すること、蓄積した粒子周囲にマクロファージが集積し肉芽腫性変化（塵肺症の患者に見られる所見と同質）が起こり肉芽腫性炎症が存続すること、その現象にプロテアーゼ活性化、線維化が時期を変えて関与することが示された。肉芽腫性炎症巣は、主にマクロファージおよびTリンパ球の集簇から構成され、消褪することなく肺組織内に存続することから、塵肺症患者で知られているように、結核に罹患しやすくなることを含め免疫系への影響に注意が必要であることが示唆された。

(2) 黄砂・ナノ粒子多重曝露実験：黄砂粒子および金ナノ粒子を気道内に曝露されたマウスの肺では、急性の限局的な炎症が観察された。その炎症は、肺胞マクロファージ、型肺胞上皮細胞、血管内皮細胞における炎症性サイトカイン（IL-6 および TNF- α ）や酸化ストレスマーカー（Cu/Zn SOD および iNOS）の強い発現を伴っていた。電子顕微鏡的検索では、肺胞壁の崩壊、I 型肺胞上皮細胞および血管内皮細胞におけるエンドサイトーシス像の亢進、エンドサイトーシス内の

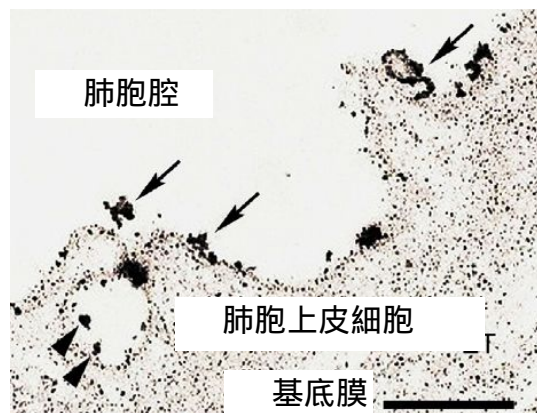


図 2：エンドサイトーシス空胞内のナノ粒子（ \blacktriangleright ）肺胞上皮細胞（電子顕微鏡解析）

ナノ粒子の存在が示された(図2)。これらの所見から、炎症下の肺組織では、気道に曝露されたナノ粒子が血液空気関門を突破しやすくなることが示唆された。

(3) ナノ粒子の胎盤での挙動：組織傷害を示唆する所見は胎盤や肝臓、脳などを含め母体・胎子のどの臓器にも認められなかった。金属分析(ICP-MS：誘導結合プラズマ質量分析)の結果、母体の肝臓および胎盤にのみ金ナノ粒子の蓄積が認められた。検出可能なレベルの金ナノ粒子は胎子の諸臓器からは検出されなかった。しかしながら、電顕解析により、金ナノ粒子を曝露された個体の血液胎盤関門(胎盤)の合胞体性栄養膜細胞および血管内皮細胞にエンドサイト小胞の増加が認められた。免疫組織化学およびウェスタンブロットングにより、エンドサイト小胞の主要な構成蛋白質であるクラスリンおよびカベオリン陽性像が合胞体性栄養膜細胞および血管内皮細胞に認められた(図3a, 3b)。

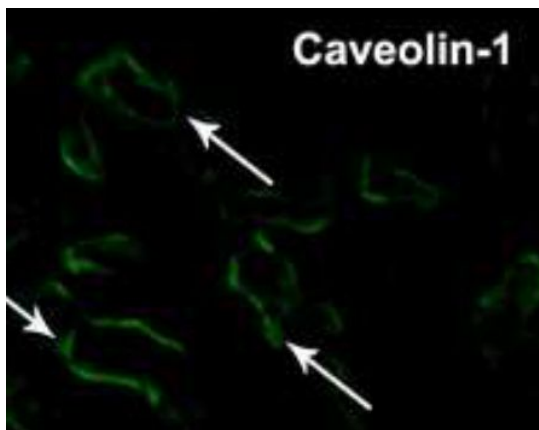


図3a:胎盤の血管内皮細胞に一致したカベオリン陽性像() (免疫組織化学)

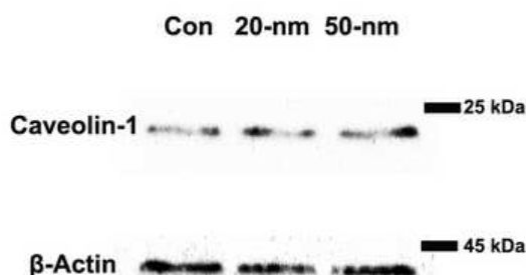


図3b:胎盤ホモジネートにおけるカベオリン発現(ウェスタンブロットング)

これらの結果から、妊娠マウスの血液胎盤関

門においてクラスリンおよびカベオリン小胞によるエンドサイトーシスが亢進することが示唆された。エンドサイトーシス亢進は、妊娠母体に取り込まれたナノ粒子が胎子に移行する機序の一端となる可能性があると思われる。

すなわち、1. 炎症下の肺組織では、気道に曝露されたナノ粒子が血液空気関門を突破しやすくなること、2. 金ナノ粒子の曝露により、妊娠マウスの血液胎盤関門においてクラスリンおよびカベオリン小胞によるエンドサイトーシスが亢進することが示唆された。

今回得られたこれらの所見は、環境中のナノ粒子の生体影響、特に、呼吸器系の炎症性疾患に罹患した状態下あるいは妊娠状態下のヒトへのナノ粒子の生体影響を評価する上で有用と思われる。

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3件)

Rattanapiyopituk K, Shimada A, Morita T, Sakurai M, Asano A, Hasegawa T, Inoue K, Takano H. Demonstration of the clathrin- and caveolin-mediated endocytosis at the maternal-fetal barrier in mouse placenta after intravenous administration of gold nanoparticles. *Journal of Veterinary Medical Science*, 査読有、76 巻、2014、377-387

Rattanapiyopituk K, Shimada A, Morita T, Togawa M, Hasegawa T, Seko Y, Inoue K, Takano H. Ultrastructural changes in the air-blood barrier in mice after intratracheal instillation of Asian sand dust and gold nanoparticles.

Experimental and Toxicologic
Pathology 65 卷、2013、1043-1051

Naota M, Shiotsu S, Shimada A, Kohara
Y, Morita T, Inoue K, Takano H.
Pathological study of chronic
pulmonary toxicity induced by
intratracheally instilled Asian sand
dust (Kosa). Toxicologic Pathology, 41
巻、2013、48-62

〔学会発表〕(計 1 件)

Rattanapinyopituk Kasem、島田章則、森
田剛仁. Ultrastructural changes in the
air-blood barrier in mice after
intratracheal instillations of Asian
sand dust and gold nanoparticles. 第
155 回日本獣医学会学術集会, 2013 年 3
月 28 日, 東京大学(東京都・渋谷区)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

<https://sites.google.com/site/azabuenvironmentalpathology/jiao-yuan-gou-cheng/jiao-shou>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

島田 章則 (SHIMADA, Akinori)
麻布大学・生命・環境科学部・教授
研究者番号: 20216055

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

Rattanapinyopituk Kasem
(RATTANAPINYOPITUK, Kasem)