

学 位 論 文 要 旨

氏名 Kasem Rattanapinyopituk

題 目 : Pathological study on the possible translocation pathways of the exposed nanoparticles at the air–blood barrier under the inflammatory condition induced by Asian sand dust and at the maternal–fetal barrier during pregnancy in mice.

(黄砂に曝露され炎症状態にある肺の血液空気関門および妊娠マウスの血液胎盤関門におけるナノ粒子の関門突破機序についての病理学的研究)

論文要旨 :

近年、ナノサイズの粒子・繊維を用いたナノテクノロジーが急速に発展し、繊維製品、医療品、化粧品などに広くその技術が適用されるようになったことから、日常の身近な環境下でナノ粒子に曝露される機会が増えている。そのため、ナノ粒子の潜在的毒性についての関心が高まっている。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。

そこで、第 1 章では、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。黄砂粒子および金ナノ粒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、I 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および金ナノ粒子のエンドサイト小胞内の存在が示された。これらの所見から、

(別紙様式第3号)

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。

第2章では、妊娠マウスの血中に金ナノ粒子を投与し、母体ならびに胎児の組織傷害の有無、金ナノ粒子の臓器・組織内での局在を解析した。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・胎児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児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ティングにより、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。これらの所見から、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。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児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。

(和文 2,000 字又は英文 800 語程度)

学位論文審査の結果の要旨

氏 名	KASEM RATTANAPINYOPITUK
審 査 委 員	主 査：鳥取大学 教授 森田剛仁
	副 査：山口大学 教授 林 俊春
	副 査：鳥取大学 教授 山野好章
	副 査：鳥取大学 教授 今川智敬
	副 査：鳥取大学 准教授 杉山晶彦
題 目	英文 Pathological study on the possible translocation pathways of the exposed nanoparticles at the air–blood barrier under the inflammatory condition induced by Asian sand dust and at the maternal–fetal barrier during pregnancy in mice. 和文 黄砂に曝露され炎症状態にある肺の空気・血液関門および妊娠マウスの血液胎盤関門におけるナノ粒子の関門突破機序についての病理学的研究

審査結果の要旨：

近年、ナノサイズの粒子・繊維を用いたナノテクノロジーが急速に発展し、繊維製品、医療品、化粧品などに広くその技術が適用されるようになったことから、日常の身近な環境下でナノ粒子に曝露される機会が増えている。そのため、ナノ粒子の潜在的毒性についての関心が高まっている。ナノ粒子はサイズが 100 nm 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。

そこで、第 1 章では、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。黄砂粒子および金ナノ粒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、肺泡マクロファージ、I 型肺泡上皮細胞、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、肺泡壁の崩壊、I 型肺泡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および金ナノ粒子のエンドサイト小胞内の存在が示された。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。

第 2 章では、妊娠マウスの血中に金ナノ粒子を投与し、母体ならびに胎児の組織傷害の有無、金ナノ粒子の臓器・組織内での局在を解析した。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・胎児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児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ティングにより、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。これらの所見から、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。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児に移行する機序の一端となる可能性があると思われる。

本研究により、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。以上により、本論文は博士（獣医学）の学位論文に妥当なものであると判断された。