

萌芽的研究支援課題 報告書

肺胞周辺に存在する C 線維の 3D イメージング

Neurological Anatomy: Structure of Wrap-over Sensory Nerve in Alveoli Region by Synchrotron
Micro CT Imaging

坂井伸光（博士後期課程 3 回生）*、塩田憲司、松井康人、米田稔
京都大学大学院工学研究科

Nobumitsu Sakai*, Yasuto Matsui, Minoru Yoneda
Graduate School of Engineering, Kyoto University

*corresponding author: sakai@risk.env.kyoto-u.ac.jp

Abstract : We focus on the lung in which a large number of nanoparticles may remain. It is suggested that the sensory nerves existing on the respiratory epithelium and in the smooth muscle may also exist in the vicinity of the alveolar. First, we make sure that sensory nerves exist on the alveolar epithelium by using synchrotron micro CT imaging. In our recent studies, we showed that nanoparticles can invade olfactory nerves, reaching olfactory bulb. This suggests that olfactory nerve system is a potential pathway for nanoparticles to brain. Following this line of thought, we hypothesize that nanoparticles deposited in the lung may also invade sensory nerves in the lung, and may be translocated, at least in part, via sensory nerve system as an alternative entry to other organs. The study has not clearly confirmed the fact that uptake of nanoparticles to C-fiber or olfactory nerve. In contrast, the vivid 3D neuron images were observed in olfactory bulb and the tiny bronchioles were finely projected despite under a few tens of micrometers.

1. 背景と目的

感覚神経線維の 1 つである C 線維は、外界からの刺激を中枢に伝達する求心性神経線維であり、神経伝達物質として substance P や Calcitonin Gene-Related Peptide (CGRP)、neurokinin などの神経ペプチドや、グルタミン酸が機能しており、損傷時に少し遅れて感じる鈍い痛み（二次痛覚）や、痒みを伝達する。一般に気道や肺において、感覚神経線維は気道上皮の間隙や平滑筋および、細動脈や細静脈などの血管付近に分布するとされ、神経線維が肺胞付近まで達し、肺胞をとりまく肺胞壁に分布することに関しては未知である。Baluk や Lee らの C 線維や感覚神経に関する論文では、肺胞付近に存在する神経線維については触れられていない^{1, 2)}。しかし、渡辺らによると、モルモットの肺において、substance P および

CGRP を有する神経線維が肺胞付近に存在し、これは A δ 線維または C 線維であると示されている³⁾。一般に、A δ 線維において神経伝達物質として主にグルタミン酸が機能しており、substance P や CGRP などが機能している神経線維は主に C 線維である。著者らは、渡辺らの結果をもとに肺胞付近に C 線維が分布している可能性があると考え、実験動物（マウス）をもちいて、C 線維をゴルジ染色法により染色し、肺内に存在する C 線維が肺胞付近にまで達していることを含有金属のイメージングとして確認し、さらに肺胞付近の C 線維の存在部位を観察することを第 1 の目的とした。

気道における神経についても以下の報告がなされている。ラットやモルモットに蛍光色素、および蛍光粒子を気管内投与したところ、蛍光色素や蛍光粒子はともに気道、気管支部分の上皮を通過して、迷走神経節後線維の C 線維に侵入し、とりわけ蛍光色素は神経線維中を逆行輸送され、節上神経節や、頸静脈神経節にまで達していた^{4, 5)}。肺においては、肺内に侵入した微粒子が肺胞マクロファージに取り込まれ、肺胞被覆層から気道粘液層の粘液線毛運動、またはリンパ経路へと移動し、排出される一方で、肺胞マクロファージに貪食されなかった微粒子については、特にナノ粒子を含む粒径 1 μm 以下の粒子において、I 型肺胞上皮細胞や、まれに II 型肺胞上皮細胞に取り込まれ、肺胞間質や毛細血管、リンパ経路へと移動するという報告がなされた⁶⁻⁸⁾。さらに、肺胞間質へ移動した微粒子は、間質内のマクロファージに貪食されて、リンパ経路や血流へと移動するという報告もなされているが、肺のクリアランス機構における、間質マクロファージの役割は不明な部分が多く、間質マクロファージに取り込まれた粒子の移動先についても、詳細は不明である⁷⁾。これらは肺胞内のナノ粒子が肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞を介して、肺胞を通過するというを示唆しており、肺内の C 線維が肺胞付近に存在するならば、嗅神経や、気道での C 線維と同様に、肺胞を通過したナノ粒子が肺胞付近の C 線維に侵入する可能性が考えられる。肺における神経が肺胞上皮細胞の近隣に存在していることが確認できれば、肺内へ侵入、蓄積したナノ粒子が C 線維を介して中枢へ侵入する可能性があると考えられ、粒子物質の C 線維への曝露経路解明が急がれる。

また、嗅神経を介したナノ粒子の脳への到達が、Oberdörster¹⁴⁾より報告されており、嗅細胞が外界に接触している嗅神経に、外界からのナノ粒子が侵入し、中枢神経に到達する可能性が考えられている¹⁰⁻¹⁷⁾。本研究においては同時に、鼻腔からの嗅神経の投射先である嗅脳においてもゴルジ染色を施し、高次脳中枢における嗅神経の解剖学的形態観察を行う事を第 2 の目的とした。嗅脳（嗅球）皮質には、嗅神経の軸索が投射している糸球体が同心円状に存在しており、その位置は嗅上皮のゾーンに対応して臭いを識別 (zone to zone low) しているとされている¹⁸⁾。

2. 実験方法

著者らの過去研究では、共焦点レーザー顕微鏡を用いることで、肺や嗅球において肺胞周辺 C 線維の存在を確認している。マウスあるいはラットの肺の切片を作成し、免疫染色に

よりC線維を標識した切片の蛍光を観察した。これに、光学顕微鏡を用いて得られた肺胞像と重ね合わせることで、C線維が肺胞周辺のいずれの組織に多く存在しているかを明らかにしてきている。しかしながら、これらの情報はすべて2次元であり、肺胞周辺に存在するC線維が肺の中でどのように分布しているかは確認できていない。C線維の分布を確認するためには、マクロ的な視点における3次元イメージングを行う必要がある。現在では、MRIやCTなどの3次元イメージング技術の向上により、生体試料を非破壊で容易に観察できるようになった。特にCTにおいては、分解能が10 μm 程度のマイクロCTが開発されている。しかし、C線維の直径は0.5~2 μm であり、一般のマイクロCTでは観察することはできない。

水谷ら¹⁹⁾は、SPring-8のマイクロCTを用いて、ヒト脳皮質の3Dイメージングを行った。神経組織をゴルジ染色することにより、作成した組織ブロック内に存在する神経組織を非破壊でコントラストの良好な画像を取得している。本研究においても、同様にゴルジ染色を施したマウス肺および、嗅球組織の2種の試料を測定対象とした。

2.1 サンプルの概要

ラットの肺，嗅球のゴルジ染色

ラットの肺ブロック（約5 mm^3 ）および嗅球を、Rapid Golgi Stain Kitにて染色した。染色後、1mm角のブロックを作成し、樹脂に包埋した。

背根神経節マイクロインジェクション金コンジュゲート抗体免疫染色

C線維の投射先である第8頸髄～第4胸髄に、順行性神経トレーサーであるビオチン標識デキストランを注入した。速い順行性輸送（200~400 mm/day ）で移動すると仮定し、1~2日後に解剖した。肺、背根神経節を摘出後、1 mm^3 のブロックを作成し、ストレプトアビジン標識金コロイドで免疫染色を行い、神経組織を金粒子で標識した。さらに、肺ブロックはアクチン免疫染色により細胞内のアクチンフィラメントを金粒子で標識し、肺胞の構造（肺胞上皮細胞）を確認できるようにした。免疫染色後、約半数のブロックは銀増感を行い、金粒子を銀粒子で増感した。

嗅球マイクロインジェクション金コロイドコンジュゲート抗体免疫染色

マウスの嗅球に、逆行性神経トレーサーであるフルオロゴールドを注入した。逆行性輸送（50~100 mm/day ）で移動すると仮定し、1日後に解剖した。嗅球、嗅上皮を摘出後、1 mm^3 のブロックを作成し、ストレプトアビジン標識金コロイドで免疫染色を行い、神経組織を金粒子で標識した。免疫染色後、約半数のブロックは銀増感を行い、金粒子を銀粒子で増感した。

金コロイドインハレーション

ラットをアクリル製のチャンバーに入れ、金コロイドをスプレー器でチャンバー内に導入し、吸入曝露を行った。曝露終了後、肺と嗅球を摘出し、1 mm^3 のブロックを作成した。約半数のブロックは銀増感を行い、金粒子を銀粒子で増感した。

2.2 抗体とトレーサー

一次抗体として、アクチン染色用抗体を用いた。ビオチン標識ファロイジン（50 Units/

メタノール 0.5 mL) 0.25 mL を, PBS-BSA 4.75 mL で希釈 (20 倍希釈) して使用した。PBS-BSA は、0.15 M NaCl、0.5 % 牛血清アルブミン (BSA)、0.05 % Triton-X 100、を 0.02 M の PBS で溶解させたものとした。順行性神経トレーサーとしては、ビオチン標識デキストラン (10mg) をブロッキング液 1 mL に溶解して使用した。ブロッキング液の組成は、0.1 M Tris-HCl (pH 7.5 に調整)、0.15 M NaCl と、0.3 % Triton-X-100、1 % BSA を 0.01 M の PBS にて希釈したものを用いた。逆行性神経トレーサーには、ストレプトアビジン標識フルオロゴールド (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、順行性神経トレーサー原液に溶解させて使用した。金コンジュゲート抗体は、ストレプトアビジン標識フルオロゴールド (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) を、PBS-BSA 9.75 mL にて 40 倍に希釈したものを用いた。

2.3 実験手順

免疫染色は、はじめに試料をクリオスタットにて薄片としたものをスライドグラスにのせ、PBS-BSA に浸漬させた (5 分間を 2 回) 後に、アクチン染色用抗体の 1 次抗体 (250 μL) に 1 時間浸漬し、PBS-BSA にて 1 分間、3 回洗浄した。さらに、金コンジュゲート抗体である 2 次抗体 (250 μL) に 1 時間浸漬し、同様に PBS-BSA にて 1 分間を 3 回洗浄後、さらに PBS にて 3 分間、2 回洗浄した。これを、PBS に溶解させた固定用の 1 % グルタルアルデヒドに 10 分間浸漬させ、蒸留水にて 1 分間、3 回洗浄したものを最終試料とした。銀増感は、暗室にて 4 分間 HQ Silver (銀増感用液) に浸漬させたものを、蒸留水で 5 分間、3 回洗浄し、脱水・置換・包埋処理を施した。これらの操作手順を下に示す。

1. 50 % エタノールに浸漬 10 分、2. 70 % エタノールに浸漬 10 分、3. 80 % エタノールに浸漬 10 分、4. 90 % エタノールに浸漬 10 分、5. 95 % エタノールに浸漬 10 分、6. 100 % エタノールに浸漬 15 分、7. 100 % エタノール : プロピレンオキシド = 1 : 1 混合液に浸漬、15 分、8. プロピレンオキシドに浸漬 15 分 2 回、9. プロピレンオキシド : Quetol 812 = 1 : 1 混合液に浸漬 6 時間、10. プロピレンオキシド : Quetol 812 = 1 : 2 混合液に浸漬 6 時間、11. Quetol 812 に浸漬し 37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽で 3 時間静置させる。

包埋には、内径 1 mm のポリチューブにサンプルを詰め、これを Quetol 812 で満たし、60 $^{\circ}\text{C}$ 恒温槽にて 40 時間重合させた。ポリチューブを破損し、円筒形の樹脂を観察試料とした。試料の種類と概要をまとめたものを、表 1 に示す。

2.4 測定条件

放射光の照射は、財団法人高輝度光科学研究センターの大型放射光施設 (SPring-8) の BL20XU にて行った。測定の条件を表 2 に示す。試料を回転ステージに粘土で固定し、これに Si 111 にて単色光とした放射光を実験ハッチ内にて照射した。X 線画像検出器には CCD 高分解能 X 線カメラを用いた。

表 1 測定試料の概要と種類

Sample Name	Animal Group	Organ	Material	Actine staining	Gold label	Silver intensify	Golgi staining	Gold tracer	Smaple number
1	Control	Lung	-	+	+	+	-	-	7
1-2	Control	Lung	-	+	+	-	-	-	2
2	Control	Lung	-	-	-	+	-	+	2
2-2	Control	Lung	-	-	-	-	-	+	2
2-3	Control	Lung	-	Non-stain	-	-	-	-	2
3	Control	Bulb	-	-	-	+	-	-	4
3-2	Control	Bulb	-	Non-stain	-	-	-	-	2
3-3	Control	Bulb	-	-	-	+	-	+	2
3-4	Control	Bulb	-	-	-	-	-	+	2
4	Control	Epithelium	-	-	-	+	-	-	2
4-2	Control	Epithelium	-	Non-stain	-	-	-	-	2
5	Exp M1	Lung	Dextran	+	+	+	-	+	2
5-2	Exp M1	Lung	Dextran	+	+	-	-	+	2
5-3	Exp M1	Lung	Dextran	-	-	+	-	+	3
5-4	Exp M1	Lung	Dextran	-	-	-	-	+	2
6	Exp M1	Bulb	Fluoro Gold	-	-	+	-	-	5
6-2	Exp M1	Bulb	Fluoro Gold	Non-stain	-	-	-	-	4
7	Exp M1	DRG	Dextran	-	-	+	-	+	4
7-2	Exp M1	DRG	Dextran	-	-	-	-	+	4
8	Exp M2	Lung	Dextran	+	+	+	-	+	5
8-2	Exp M2	Lung	Dextran	+	+	-	-	+	5
8-3	Exp M2	Lung	Dextran	-	-	+	-	+	4
8-4	Exp M2	Lung	Dextran	-	-	-	-	+	5
9	Exp M2	Bulb	Fluoro Gold	-	-	+	-	-	4
9-2	Exp M2	Bulb	Fluoro Gold	Non-stain	-	-	-	-	4
10	Exp M2	DRG	Dextran	-	-	+	-	+	5
10-2	Exp M2	DRG	Dextran	-	-	-	-	+	4
11	Exp Rat	Lung	Colloidal Gold	-	-	+	-	-	3
11-2	Exp Rat	Lung	Colloidal Gold	Non-stain	-	-	-	-	3
12	Exp Rat	Bulb	Colloidal Gold	-	-	+	-	-	5
12-2	Exp Rat	Bulb	Colloidal Gold	Non-stain	-	-	-	-	8
13	Exp Rat	DRG	Colloidal Gold	-	-	+	-	-	4
13-2	Exp Rat	DRG	Colloidal Gold	Non-stain	-	-	-	-	4
14	Exp Rat	Epithelium	Colloidal Gold	-	-	+	-	-	2
14-2	Exp Rat	Epithelium	Colloidal Gold	Non-stain	-	-	-	-	2
15	Golgi Rat	Lung	-	-	-	-	+	-	10
15-2	Golgi Rat	Lung	-	-	-	-	+	-	9
15-3	Golgi Rat	Lung	-	-	-	-	+	-	10
16	Golgi Rat	Bulb	-	-	-	-	+	-	10
Ex1	-	-	Colloidal Gold	-	-	-	-	-	2
Ex2	-	-	Fluoro Gold	-	-	-	-	-	2

表 2 放射光を用いたイメージング測定条件

X-ray energy (keV)	12.25 - 12.35 keV
Pixel size (μm)	0.496 μm
Spatial resolution (μm)	1.0 μm
Viewing field (mm)	1.0x0.65 mm
Rotation/frame (degree)	0.1
Exposure/data (ms)	300
Frame/data set	1800
Data set acquisition (min)	33

3. 結果と考察

肺におけるC線維の観察では、すべての種類の試料において神経の観察はできなかった。我々の過去の研究においても、肺胞周辺C線維は太さが約数マイクロであり、放射光を用いたイメージングでは検出限界以下であった可能性が高い。また、神経に侵入したコロイダルゴールドの量も、検出に大きく関与しており、個数濃度とイメージングの限界を調査する必要がある。一方で、細気管支を鮮明に観察することができ、細気管支が終末で分岐

している様子が確認できた。横断面（transverse section）を作成し、図 1 中の a から順に下に（inferior）切片を見ていくと、図 a、図 b において（図中心部の黒い穴）繋がっていた細気管支が図 c においては分岐（二つの穴に分かれる）していることが分かる。マウスにおける肺胞や細気管支は、サイズが数十マイクロ以下であり、これを三次元的に観察した研究報告は少ない²⁰⁾。

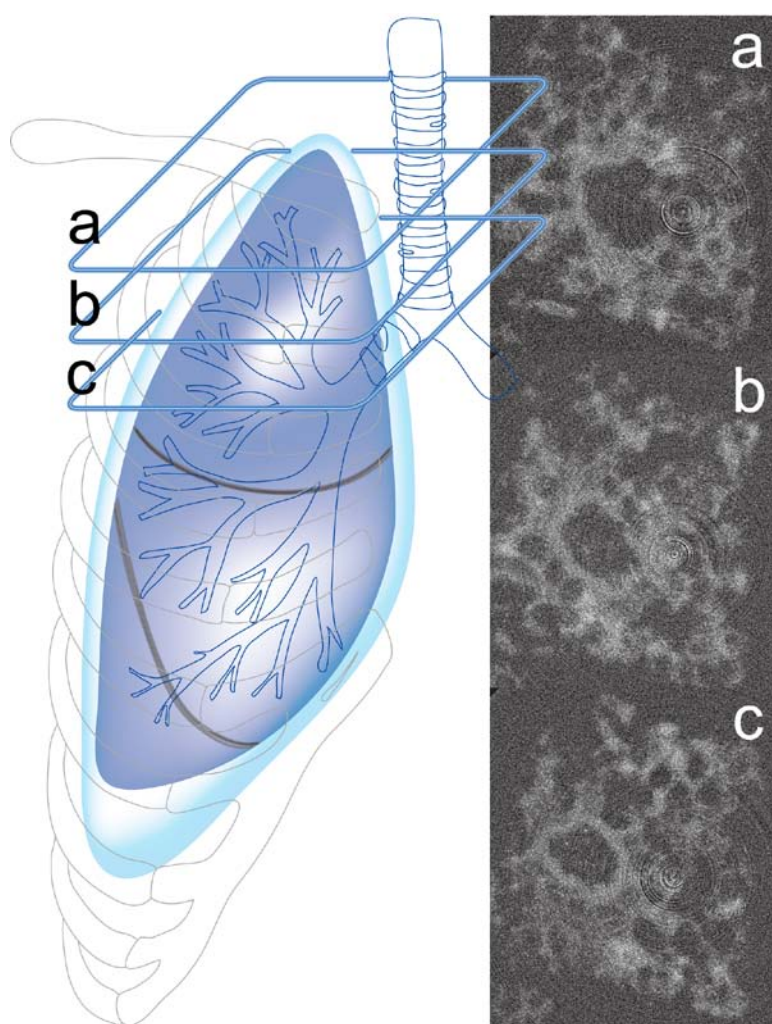


図 1 細気管支のマイクロ CT イメージング

嗅脳の観察では、肺と同様に横断面切片を作成したところ、嗅神経の高次ニューロン細胞体が、正中（median）から遠位にかけて同心円状に分布している像が得られた（図 2-a、黄色矢印部）。図 2-a 中の赤色矢印部は、血管が走査している像である。また、図 2 の細胞体が集まる領域は、シナプス形成部であり糸球体と呼ばれている。糸球体における神経の走査を捉えた像も得られ（図 2-b）、高次嗅神経の軸索が、糸球体周辺に投射している像を鮮明に得ることができた。肺における観察と同様に、マウス嗅球における神経細胞に対し、三次元イメージングしている報告は少なく、形態学的に意義がある。サイズが数十マイク

ロオーダーの神経が、放射光を用いたマイクロ CTにおいて鮮明に観察されることが確認された。今後、金ナノ粒子をマウスに全身曝露した個体において、これらの部位を観察することで、ナノ粒子の神経細胞への侵入と移動を明らかにして行く計画である。

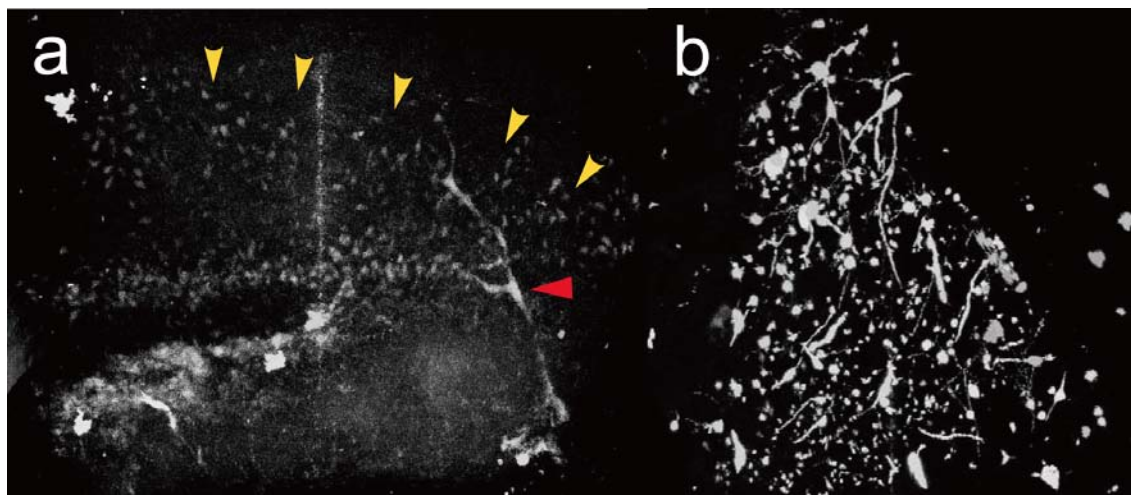


図2 嗅球における嗅神経の観察像

参考文献

1. Lee, L. and Pisarri, T. E.: Afferent properties and reflex functions of bronchopulmonary C-fibers, *Respiration Physiology* **125**:47-65 (2002)
2. Balu.k, P., Nadel, J. A., and Mcdonald, D. M.: Substance P-Immunoreactive sensory axons in the rat respiratory tract: A quantitative study of their distribution and role in neurogenic inflammation, *The Journal of Comparative Neurology* **319**: 586-598 (1992)
3. Watanabe, N., Horie, S., Michael, G. J., Keir, S., Spina, D., Page, C. P., and Priestley, J. V.: Immunohistochemical co-localization of transient receptor potential vanilloid (TRPV)1 and sensory neuropeptides in the guinea-pig respiratory system, *Neuroscience* **141**: 1533-1543 (2006)
4. Kwong, K. and Lee, L.: PGE₂ sensitizes cultured pulmonary vagal sensory neurons to chemical and electrical stimuli, *Journal of Applied Physiology* **93**: 1419-1428 (2002)
5. Hunter, D. D. and Udem, B. J.: Identification and substance P content of vagal afferent neurons innervating the epithelium of the guinea pig trachea, *American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine* **159**: 1943-1948 (1999)
6. Kyono, H.: Morphological characters controlling the biological effects of inhaled particles, *エアロゾル研究* **11 (3)**: 211-217 (1996)
7. Lauweryns, J. M. and Baer, J. H.: Alveolar clearance and the role of the pulmonary lymphatics, *American Review of Respiratory Disease* **115 (4I)**: 625-683 (1977)
8. Heppleston, A. G.: Relationship of lipid secretion and particle size to diffuse interstitial change in pneumoconiosis: A pathogenetic perspective, *American Journal of Industrial Medicine* **15**:

427-439 (1989)

9. Henriksson, J., Tallkvist, J., and Tjälve, H.: Transport of manganese via the olfactory pathway in rats: Dosage dependency of the uptake and subcellular distribution of the metal in the olfactory epithelium and the brain, *Toxicology and Applied Pharmacology* **156**: 119-128 (1999)
10. Evans, J. and Hastings, L.: Accumulation of Cd(II) in the CNS depending on the route of administration: Intraperitoneal, intratracheal, or intranasal, *Fundamental and Applied Toxicology* **19** (2): 275-278 (1992)
11. Henriksson, J. and Tjälve, H.: Uptake of inorganic mercury in the olfactory bulbs via olfactory pathways in rats, *Environmental Research Environmental Research* **77** (2): 130-140 (1998)
12. Persson, E., Henriksson, J., and Tjälve, H.: Uptake of cobalt from the nasal mucosa into the brain via olfactory pathways in rats, *Toxicology Letters* **145** (1): 19-27 (2003)
13. Henriksson, J., Tallkvist, J., and Tjälve, H.: Uptake of nickel into the brain via olfactory neurons in rats, *Toxicology Letters* **91** (2): 153-162 (1997)
14. Oberdörster, G., Oberdörster, E., and Oberdörster, J.: Nanotoxicology: An emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles, *Environmental Health Perspectives* **113** (7): 823-839 (2005)
15. Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., Elder, A., Gelein, R., Kreyling, W., and Cox, C.: Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain, *Inhalation Toxicology* **16** (6-7): 437-445 (2004)
16. Cass, G. R., Hughes, L. A., Bhave, P., Kleeman, M. J., Allen, J. O., and Salmon, L. G.: The chemical composition of atmospheric ultrafine particles, *Philosophical Transactions of the Royal Society A: Mathematical, Physical and Engineering Sciences* **358** (1775): 2581-2592 (2000)
17. Kreyling, W. G., Semmler-Behnke, M., and Möller, W.: Health implications of nanoparticles, *Journal of Nanoparticle Research* **8** (5): 543-562 (2006)
18. Buck R., Axel R. : A novel multigene family may encode odorant receptors: a molecular basis for odor recognition, *Cell* **65** 175-187 (1991)
19. Ryuta Mizutani, Akihisa Takeuchi, Kentaro Uesugi, Susumu Takekoshi, R. Yoshiyuki Osamura and Yoshio Suzuki: Microtomographic analysis of neuronal circuits of human brain, *Cerebral Cortex* **20**(7), 1739-1748 (2010)
20. A. Tsuda, N. Filipovic, D. Haberthür, R. Dickie, Y. Matsui, M. Stampanoni and J. C. Schittny: Finite element 3D reconstruction of the pulmonary acinus imaged by synchrotron X-ray tomography, *J Appl Physiol* **105**, 964-976 (2008)