

自動車排出ナノ粒子のマウス経気曝露による
嗅覚系ニューロンを介在した金属ナノ粒子曝露経路の検索
**Elucidation of the Mechanism Olfactus-mediated
by Exposing Diesel Exhaust Particles to Mice**

松井康人^a、坂井伸光^a、塩田憲司^a、高岡昌輝^a、藤巻秀和^b、内山巖雄^a
Yasuto Matsui^a, Nobumitsu Sakai^a, Kenji Shiota^a, Masaki Takaoka^a,
Hidekazu Fujimaki^b, Iwao Uchiyama^a

^a 京都大学大学院工学研究科、^b 独立行政法人国立環境研究所

^aGraduate School of Engineering Kyoto University, ^bNational Institute for the Environmental Studies

ディーゼル排気ナノ粒子 (DEP: Diesel Exhaust Particles) を曝露したマウスを用い、嗅覚系ニューロンを介在した曝露経路を解明することを目的とした。微小領域分析が可能な放射光蛍光 X 線分析 (SR-XRF) を用い、嗅神経に分布する粒子由来の元素 (Ca, Cu, Fe, Ni, Zn) をマッピングした。著者らはこれまでに、マウスの測定対象器官を固定、摘出し、100 μ m 厚の切片として風乾し、放射光を照射していた。本法では、前処理の過程において、試料を各種溶液に浸す。これにより、組織から、金属元素や曝露粒子の溶出が懸念された。粒子が沈着している可能性の高い、曝露群の鼻腔嗅上皮において、金属元素が高値を示さなかったため、本実験では、新たな前処理方法を開発し、測定をおこなった。その結果、曝露群の嗅上皮において、高い値が検出され、経気道曝露により、粒子がマウスの鼻腔内に侵入し、沈着することが示された。しかしながら、新たな方法では、切片厚は 50 μ m であり、100 μ m 厚の切片と比較すると、蛍光 X 線の感度が著しく減少した。

When we are exposed to the ultra fine particles (DEP), these are translocated to the central nerve system through the olfactory nerve. We used the synchrotron radiation to observed minute area. To use synchrotron radiation X-ray fluorescence (SR-XRF), we measured amount of Ca, Cu, Fe, Ni and Zn at the olfactory epithelium and olfactory bulb. These samples are prepared to the section by using vivratome. The thick of this section was 100 μ m and these sections have high intensity. However, the particles on the olfactory epithelium were lost at the same time because of using some kinds of solution to prepare. We developed the new method to prevent the dissolving and found particles on the olfactory epithelium. On the other hand, the level of X-ray fluorescence decreased dramatically.

過去の研究と目的

本研究では、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在した大脳

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た。嗅覚を介した曝露経路を解明した論文は、これまで報告されていな

い。Oberdörster ら^{1,2)} は、Mn ナノ粒子（直径 30nm、 $450 \mu\text{g}/\text{m}^3$ ）をラットに曝露し、曝露群の嗅球で、約 2.5 倍 Mn が増加していることを確認している。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。しかし、彼らの研究は、神経を介した曝露経路を、直接的に観察している訳ではない。著者らは、微小領域分析が可能な放射光蛍光 X 線分析（SR-XRF）を用い、嗅神経に分布する粒子由来の金属元素を、直接マッピングし、曝露経路の検索をおこなうこととした。

実験方法

測定は、高輝度光科学研究センターの放射光施設 SPring-8、BL37XU に設置した「シンクロトロン放射光励起蛍光 X 線分析」装置²⁾ を利用した。この装置は、ハッチ外で光学顕微鏡により微小領域を決定し、その座標に放射光を照射できる。照射ビームサイズは 1.6 (H) × 2.0 (V) μm である (Fig.1)。

マウスを用いた曝露実験は、独立行政法人国立環境研究所にておこなった。自動車エンジンを曝露チャンバーに接続し、粗粒子を除いたナノ粒子を曝露した。曝露濃度は、 $0.1\text{mg}/\text{m}^3$ であり、4 週間曝露をおこなった。対照群

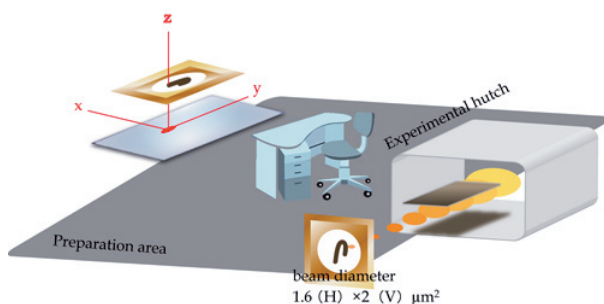


Fig. 1 Devices of the synchrotron radiation excited X-ray fluorescence analysis in the SPring-8/BL37XU

は、ガス成分のみの曝露をおこなった。供試したマウス (BALB/c, male, 8weeks) は各群 2 匹である。頭部を未固定のまま液体窒素にて凍結し、OCT にて形成した。骨組織を含め、これをクライオスタットにて、切出した。切片厚は 50 μm であり、これを超えると組織が維持されなかった。頭部の冠状面が得られたので、嗅上皮、嗅球において、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。前回の測定では、骨組織より、ターゲット組織を剥離し、測定をおこなっている。

結果・考察

前回の測定では、対象 5 元素中、曝露群の嗅上皮、嗅球において Fe, Ni, Zn の値が、神経の存在する組織層で高い値を示した。今回の測定では、嗅上皮において、Zn, Cu の値が神経の存在する結合組織で、対照群と比較すると高い値を示した。Fig. 2 の右図が曝露群、左図が対照群を示す。曝露群の嗅覚神経層で、スポット的に高い値を示している箇所があるが、Ca においても高値を示しているので、骨組織であると考えられる。しかし、嗅覚神経の表層と、神経束のある結合組織で、対照群と比較すると高い値を示している。粒子の侵入がある可能性が高い。

さらに、測定後の一般染色 (Kluver-Barrera)

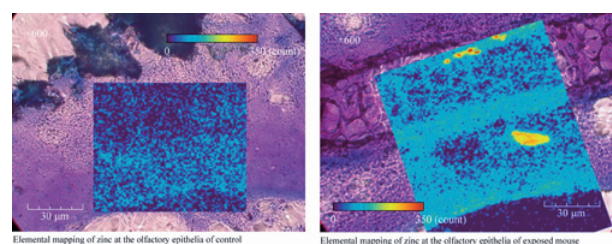


Fig. 2 Elemental mapping image at the olfactory epithelium left: unexposure, right: exposure

像と、測定前の免疫染色 (antibody; NeuN) 像を、SR を用いて得られたマッピングのイメージ像と重ね合わせたところ、各組織において、神経の多い層で Cu が高値を示した。Fig. 3 の A は、鼻中隔の骨組織、B は結合組織、C は嗅覚神経を示す。粒子は、C 組織層の粘膜表層に沈着し、神経に侵入する。B 組織層で神経は束を形成し、この一次ニューロンが嗅球に投射する。一般染色と免疫染色を比較すると、神経（赤く見える部分が神経を示す）が C の表層、B 層全体に分布していることが確認できる。これらの結果をマッピング像と重ね合わせると、神経の多い部分で金属の局在があることが確認できた。これにより、粒子が神経に侵入し、移動している可能性が示唆される。しかし、その元素が粒子に付着している元素なのか、粒子から別の形で溶出した金属なのかは、今回の実験では判別できない。しかし、今後 XAFS 分析などの手法をもちいることで、粒子付着性金属の結合状態を確認していく予定である。

しかしながら、新たな切片作成法では、切片厚は $50 \mu\text{m}$ であり、 $100 \mu\text{m}$ 厚の切片と、得られるシグナルを比較すると、蛍光 X 線の感度は著しく減少した。 $100 \mu\text{m}$ 厚の切片を作成するためには、クライオスタットを用

いた方法では組織の形態が保存されない。したがって、今後ビブラトームで厚い切片を作成後、免疫染色し、シンクロトロンでの測定をおこなう。また、マッピング箇所の特のため、測定後の組織をさらに薄く切り出し、一般染色をする方法を検討している。

キーワード

蛍光 X 線分析、マッピング、ディーゼル排出ナノ粒子

参考文献

- 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

論文発表状況・特許状況

- [1] 松井康人他、第 26 回大気環境学会年会、口頭発表

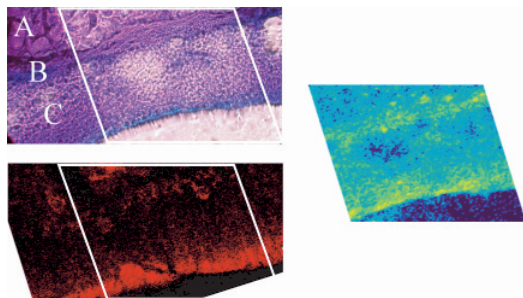


Fig. 3 The mapping of copper at the olfactory epithelium
upper: Kluver-Barrera's staining
lower: Immunohistochemical staining
right: Mapping image of copper by using SR