

蛍光性有機シリカ粒子を用いたマウスパイエル板におけるサイズ依存的取り込みのイメージングと新規経路の同定

Aziz Awaad, MSc^{a,b}, Michihiro Nakamura, MD, PhD^{a,*}, Kazunori Ishimura, MD, PhD^a

^a徳島大学大学院 解剖学・細胞生物学分野 徳島県徳島市

^bエジプト、ソハグ、ソハグ大学理学部動物学科

2011年4月29日受領、2011年8月10日受理

要旨

我々は、蛍光性チオール-有機シリカ粒子のパイエル板 (PP) によるサイズ依存的取り込みについて検討した。単粒子 (95、130、200、340、695、1050nm) の経口投与と、2種類の粒子を用いた2粒子同時投与を行った。組織学的イメージングと定量分析により、PP上皮ドームに取り込まれた粒子はサイズに依存し、より高い取り込みに最適なサイズ範囲が存在することが明らかになった。2種類の粒子を同時に投与した場合の定量分析では、110nmの面積に対する95、130、200、340、695、1050nmの蛍光面積の割合は、それぞれ124.0、89.1、73.8、20.2、9.2、0.5%であった。さらに、蛍光性チオール-有機シリカ粒子を用いたイメージングにより、マウスPP上皮を通過する2つの新規経路 (経細胞経路と傍細胞経路) を検出することができた。最適なサイズ範囲と2つの新規経路に基づくナノ粒子の取り込みは、ワクチン送達とナノメディシン開発のための新しいアプローチを示す可能性がある。

臨床編集者より様々なサイズの蛍光性有機シリカ粒子とそのパイエル板への取り込みを研究し、最適な投与サイズ範囲を決定した。マウスのパイエル板上皮を通過する2つの新しい経路、すなわち経細胞経路と傍細胞経路が検出された。この観察は、将来のワクチン送達やナノ薬物送達に重要な応用が期待される。

© 2012 Elsevier Inc. 無断複写・転載を禁じます。

キーワードチオール-有機シリカ粒子、サイズ依存性取り込み、副細胞経路、経細胞経路、ワクチンデリバリー

ナノ材料を用いたワクチン送達は、ナノメディシン応用の最近のアプローチである。^{1,2} 衰弱させる感染症に対するワクチン接種は、そのような病気を予防する上で顕著であることが証明されており、世界の多くの地域、特に子供たちの平均寿命の伸びに大きく貢献している。³⁻⁶ ワクチンは、多くの病原体による感染を予防したり、その影響を改善したりすることができる。経口投与はワク

チン送達のための最も魅力的な経路である。パイエル板 (PP) を介した経口ワクチン接種は、他の部位よりも効果的である、⁷⁻⁹ というのも、PPは局所的な免疫防御に優れるだけでなく、非経口的に投与されたワクチンと同様の全身反応を引き起こすことが示されているからである。^{1,10,11} ナノ粒子 (NPs) には、ワクチンデリバリーにおいていくつかの利点がある。^{12,13} サイズ、形状、親水性、表面電荷

科学研究省、ミッション部門に感謝する。

★Corresponding author: 解剖学・細胞生物学部門
徳島大学大学院 〒770-8503 徳島県徳島市蔵本3-18-15

電子メールアドレス: michy@basic.med.tokushima-u.ac.jp (M. Nakamura)。

1549-9634/\$ - 前面を見る © 2012 Elsevier Inc.無断複写・転載を禁じます。

や機能化は、動物の状態や腸内の誘導部位に加えて、NPの取り込みに影響を与える可能性がある。¹⁴⁻¹⁸粒子径は、NP、特にPPの消化管への取り込みと経路において最も重要な要因の一つである。¹⁸⁻²⁹より小さなポリスチレン微小球（50nmと100nm）は、より大きな微小球（300nmと3000nm）と比較して、PPと消化管の絨毛を横切ってより容易に吸収される。^{23,27,30}対照的に、より小さい（2.5 nm）ポリリシンデンドリマーNPの吸収は、より大きいポリスチレンデンドリマーNPよりも低い、³¹は、より大きなポリスチレン粒子（100nm、500nm、1 μ m、3 μ m）よりも低い。²⁴しかし、50 nmから500 nmの小さなNPは、500 nm以上の大きなNPよりも容易に取り込まれる。^{22-24,27,30,31}50nmと500nmの間の細胞内への送達に最適なサイズと最適なサイズ範囲はわかっていない。さらに、粒子サイズの影響をより直接的かつ正確に比較する効果的なアプローチが必要である。

さらに、PPを介したNPの経路も重要である。これまでの研究で、PP M細胞は経口免疫におけるNPの一般的な経路であることが示された。^{7,9}NPはM細胞表面に付着し、エンドサイトーシスされ、PP上皮ドームに移動した。^{19,25,32-34}PP濾胞における他の経路

この論文を引用してください: A. Awaad, M. Nakamura, K. Ishimura, Imaging of size-dependent uptake and identification of novel pathways in mouse Peyer's patches using fluorescent organosilica particles. *ナノメディシン: NBM* 2012;8:627-636, doi:10.1016/j.nano.2011.08.009

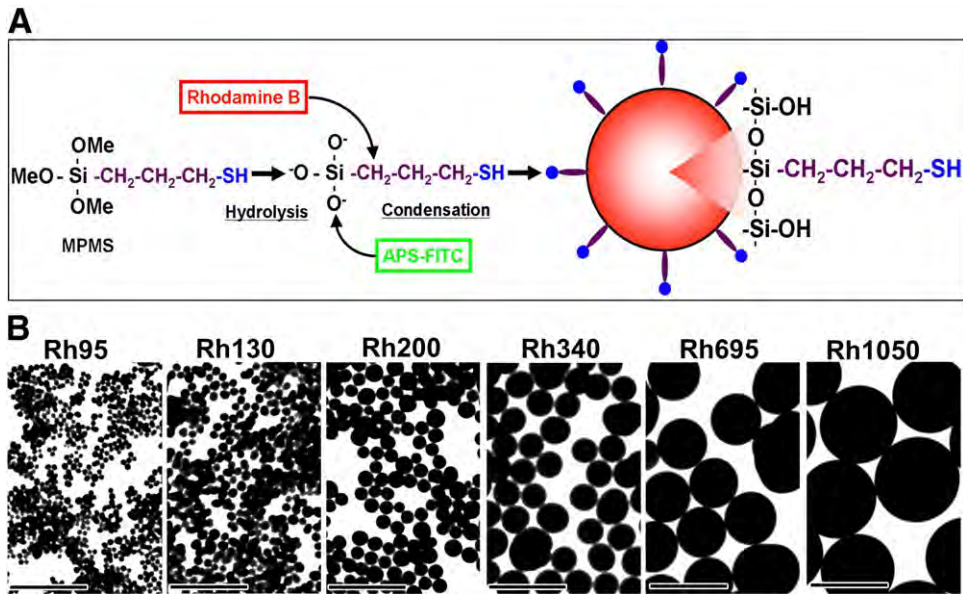


図1 (A) 蛍光性チオール-有機シリカ粒子の合成化学反応のスキーム。蛍光性チオール-有機シリカ粒子は、3-メルカプトプロピルトリメトキシシランを単一のシリカ源として、 NH_4OH による加水分解と縮合を経て合成される。ローダミンBはドーピング法で、APS-FITCはインポジション法で蛍光色素を導入した。粒子は、アルキル鎖を含む表面メルカプトプロピル残基(紫)とチオール残基(青)を有する。(B)異なるサイズの蛍光性チオール-有機シリカ粒子の電子顕微鏡写真。スケールバー=1 μm 。

関連上皮(FAE)を経由する経路のほか、M細胞を経由する経路(transcellular-M pathway)についてはよく知られていない。従って、PPを介した粒子の経路を詳細に調べることは、薬剤やワクチンを含む経口投与されたNPの取り込みの基礎となるメカニズムを理解する上で重要である。我々は最近、ナノメディシン応用のための新しいナノ材料、有機シリカ粒子を開発した。³⁵⁻³⁸様々なサイズの蛍光性チオール-有機シリカ粒子が、狭いサイズ分布、高分散性、ユニークな表面電荷で合成できる。³⁸さらに、様々な蛍光色素を用いて高い蛍光強度を持つチオール-有機シリカ粒子を合成することができる。^{37,38}高感度で多チャンネルの蛍光イメージングが可能になる。本稿で報告する研究では、さまざまなサイズの粒子をマウスに経口投与した。マウスPPにおけるサイズ依存的な取り込み、粒子を含む主要細胞、粒子の経路を組織学的、組織化学的、定量的に調べた。また、2種類の粒子を用いた同時二重粒子投与試験を行い、異なるサイズの粒子の取り込みを新しいアプローチで比較し、単回投与試験と比較した。さらに、より小さな粒子を用いた新たな経路を蛍光下で

PPに導入することを実証した。顕微鏡(FM)と電子顕微鏡(EM)。

方法


材料

ローダミンB、3-メルカプトプロピルトリメトキシシラン(MPMS)、(3-アミノプロピル)トリメトキシシラン(APS)、フルオレセインイソチオシアネート(FITC)およびFITCと結合したレクチンUlex europaeus agglutinin I (UEAI)はSigma-Aldrich Chemical Co.(ミズーリ州セントルイス)から購入した。抗マウスCD11b

(Mac 1 α 鎖) 抗体およびFITCマウス抗ラットIgG二次抗

体は、eBioscience社（日本、神戸市）から購入した。パラホルムアルデヒドはMerck KGaA (Darmstadt, Germany)から購入した。四酸化オスミウムは日新EM株式会社から購入した。（東京、日本）から購入した。使い捨ての動物用給餌針は測上（京都、日本）から購入した。

蛍光性チオール-有機シリカ粒子の調製と特性評価

蛍光性チオール-有機シリカ粒子は、シリカ源として用いたMPMSから調製した。6つの異なるサイズの粒子（直径95、130、200、340、695、1050 nm；)を前述の方法で調製した。³⁸ローダミンBの溶液を、様々な濃度のMPMSと27% NH₄ OHの混合物と混合した。フルオレセイン（F110）を含む粒子は、APS-FITCコンジュゲートを用いて調製した。このコンジュゲートは、250mMのAPSと250mMのフルオレセインイソチオシアネートの混合物を1時間穏やかに攪拌することにより調製した。APS-FITCコンジュゲートの溶液を9 mM MPMSと27% NH₄ OHの混合液と混合した。粒子の平均サイズと係数バリエーションを測定し、[表1](#)にまとめた。粒子をニトロセルロースでコートした400メッシュの銅グリッド上に固定し、日立H500またはH7650電子顕微鏡（東京、日本）でEM像を得た。粒子のサイズと係数変化をEMで測定し、Image-pro plus software, MediaCybernetics, Inc.

蛍光性チオール-有機シリカ粒子の経口投与

マウスを用いた実験はすべて、本学動物実験委員会の同意を得て実施した。

表1

ローダミンB (Rh) とフルオレセイン (F) を含む蛍光性チオール有機シリカ粒子の平均粒子径と分布

チオール-有機シリカ	粒子平均直径(nm)	CV(%)
F110	109.1 ± 7.40	6.7
Rh95	96.1 ± 11.87	12.3
Rh130	131.5 ± 17.73	13.4
Rh200	198.3 ± 18.98	9.5
Rh340	341.1 ± 54.92	16.1
Rh695	695.9 ± 120.04	17.2
Rh1050	1054.5 ± 211.51	20.0

F=フルオレセイン、Rh=ローダミンB。

徳島県動物の正常な生理学的状態を維持するために経口投与を用いた。雌のC57 BL/6Jマウス (6~8週齢) を一晩絶食させ、水を自由に飲めるようにしてから、使い捨ての動物用給餌針で粒子を投与した。この実験のためにマウスの3つの主要グループを準備し、各主要グループは異なるサイズの粒子を与えられた6つのグループから構成された。少なくとも3匹のマウスからなる各群に、ローダミンBを含む単一サイズの粒子 (Rh95、Rh130、Rh200、Rh340、Rh695またはRh1050) を5mg (50mg/mLの100 μ l) 経口投与した。投与後、第1群は1時間、第2群は3時間、第3群は6時間放置した。すべてのマウスは絶食し、実験中は自由に水を飲むことができた。

PPによるサイズ依存的取り込みをより詳細に調べるために、2粒子同時投与試験を行った。2種類の蛍光色素で機能化した2つの異なるサイズの粒子を投与した。フルオレセイン (F110) を含む粒子5mg (50mg/mLを100 μ l) とローダミンB (Rh95、Rh130、Rh200、Rh340、Rh695、Rh1050) を含む粒子5mg (50mg/mLを100 μ l) を同じマウスに同時に投与した。各群が少なくとも3匹のマウスからなる6群のマウスに、以下の組み合わせのいずれかを投与した: F110/Rh1050、F110/Rh695、F110/Rh340、F110/Rh200、F110/Rh130またはF110/Rh95。すべてその後、頸椎脱臼によりマウスを犠牲にし、0.1M PBS (pH 7.4) 中4%パラホルムアルデヒドでドリップ法 (fusion process) を用いて固定した。小腸を解剖し、回腸および空腸領域から5~7個のPPを回収し、固定液中に保存した。回収したPP (各群19~47個) をPBSで注意深く

洗浄し、管腔内容物を注意深く除去した。PBSで洗浄後、粒子を含むPPを0.1M PBS (pH 7.4) 中4%パラホルムアルデヒドで4時間固定し、10、15、20%スクロースを含むPBSで4時間処理した。

4時間後、凍結切片用のOCT包埋液に包埋し、-80°Cで保存した。上皮ドームとFAEを通る連続切片 (7 μ m) を切り出した。

PPのFM観察と蛍光面積の定量分析

数匹のマウスから採取した19~47個のPPから、上皮ドームとFAEを示す連続切片をPBSで洗浄し、PBSで染色した。

0.075 μ g/mL DAPIをカウンターステインとして用い、30%グリセロールを含むトリス緩衝液にマウントし、倒立蛍光顕微鏡 (FM) (TE 2000 Nikon) で観察した、

100W水銀灯を光源とし、CCDカメラ (Digital Sight DS-L1、Nikon、神奈川県) を装着した。) PPの蛍光面積を定量的に解析するために、各群4~9匹のマウスから代表的な3図を選択した。PPs上皮ドームの蛍光面積は、Image-pro plusソフトウェアを用いて測定した。組織学的所見に基づき、蛍光面積と上皮ドーム面積の比を算出した (単粒子投与試験については図2および補足図S1, AおよびS1, B、二粒子投与試験については図3および補足図S2, AおよびS2, B、<http://www.nanomedjournal.com>)。

蛍光性チオール-有機シリカ粒子を含む細胞の組織化学染色

PP切片をPBSで3分間3回洗浄し、2.5% ウシ血清アルブミンで室温 (24±3°C) で30分間ブロックし、PBSで3回洗浄した。切片をFITC標識レクチンUEAI (20µg/mL) と4°Cで4時間インキュベートし、レクチンUEAI⁺ M細胞とM細胞表面のα-L-フコース残基の発現を同定した。CD11b⁺ 細胞を同定するため、切片を抗マウスCD11b抗体 (0.625 µg/mL) と4°Cで一晩インキュベートした。CD11b抗体の切片をPBSで洗浄し、フルオレセインイソチオシン酸マウス抗ラットIgG二次抗体 (10µg/mL) と4°Cで一晩インキュベートした。すべての切片をPBSで洗浄し、カウンターステインとしてDAPI (0.075µg/mL) で染色し、30%グリセロールを含むトリス緩衝液でマウントし、100W水銀灯を光源とし、CCDカメラを備えた倒立型FM (TE2000、ニコン、神奈川県、日本) で観察した。

PPのEM観察

切片を洗浄し、2%四酸化オスミウムと酢酸ウラニルで処理した後、昇順のエタノール溶液で脱水し、エポン・エポキシ樹脂に包埋した。Reichert Ultracut E ultra microtome (Leica Microsystems, Wetzlar, Germany) を用いて超薄切片 (厚さ80 nm) を切り出し、電子顕微鏡 (EM) で観察した。

結果

マウスPPによる蛍光性チオール-有機シリカ粒子の取り込みのサイズおよび時間依存性

図2は、ローダミンBを含むさまざまなサイズの粒子を経口投与した1、3、6時間後のマウスPPのFMを示したものである。上皮ドームにおけるRh95、Rh130、Rh200の蛍光は、1、3時間後に比べて6時間後に増加していた。Rh340とRh695については、1時間後と3時間後の上皮ドームの蛍光はほぼ同様であったが、6時間後には蛍光が増加した。Rh1050では、上皮ドームの蛍光はほとんど観察されなかった。これらの所見は、上皮ドームにおけるより小さな粒子 (Rh95、Rh130、Rh200、Rh340) からの蛍光が時間によって増加することを示している。より大きな粒子 (Rh695とRh1050) の蛍光の時間依存性は明らかではなかった。

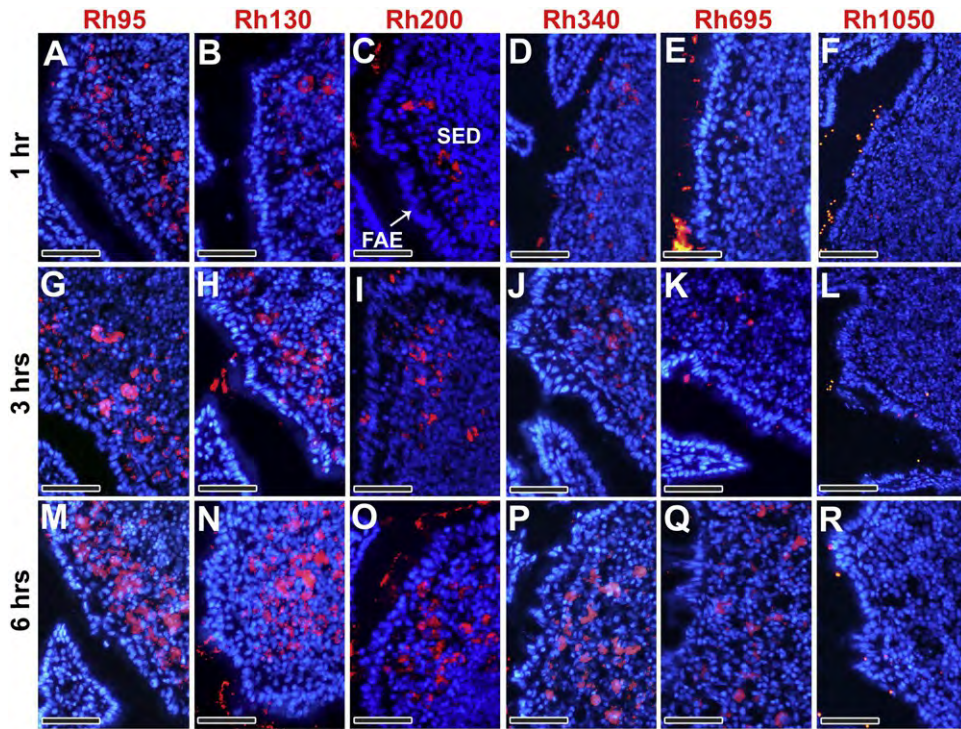


図2. Rh95 (A、G、M)、Rh130 (B、H、N)、Rh200 (C、I、O)、Rh340 (D、J、P)、Rh695 (E、K、Q)、Rh1050 (F、L、R) 投与後の1時間後 (A-F)、3時間後 (G-L)、6時間後 (M-R) の時間依存性、およびサイズ依存性の取り込みを示すマウスPPの上皮下ドーム (SED) とFAEの蛍光顕微鏡像。大きな粒子に比べて小さな粒子がPPのSEDに取り込まれている。スケールバー=50 μ m。

1時間後、上皮下ドームに取り込まれたRh95の蛍光は、Rh130やRh200の蛍光よりも大きく、Rh340、Rh695、Rh1050の蛍光よりもはるかに大きかった (図2、A-F)。さらに3時間後 (図2、G-L)、Rh95の蛍光はRh130、Rh200、Rh340の蛍光よりわずかに多く、Rh695とRh1050の蛍光よりもはるかに多かった。6時間後、Rh95の蛍光はRh130、Rh200、Rh340、Rh695の蛍光と同等かそれ以上であり、Rh1050の蛍光よりもはるかに大きかった (図2、M-R)。これらの結果は、小さい粒子は大きい粒子よりもPP上皮下ドームに取り込まれやすいことを示している。

二粒子同時投与試験

粒子サイズの効果をより直接的かつ正確に比較するため、6~8週齢のマウスを用い、2種類の粒子を用いた二重粒子同時投与試験を行った (図3)。FITCを含む粒子を、ローダミンB (Rh95、Rh130、Rh200、Rh340、Rh695またはRh1050) を含むさまざまなサイズの5mg粒

子とともに経口投与した。蛍光

F110の蛍光は、Rh695やRh1050の蛍光よりもはるかに高いレベルで上皮下ドームで観察された (図3、A、B)。F110の蛍光の局在とRh695やRh1050の蛍光の局在は異なっていた。これらの結果は、単一粒子投与試験の結果を確認し、粒子の大きさによる局在の違いを実証した。上皮下ドームで検出されたF110の蛍光は、Rh340の蛍光よりもはるかに大きかった (図3、C)。F110とRh340の蛍光の共局在がいくつか見られた。

が観察されたが、多くの単一蛍光も存在した。単粒子

投与試験では、Rh340とそれより小さい粒子（Rh95、Rh130、Rh200）の間に明確な差は認められなかったが、2粒子同時投与試験では、各粒子の蛍光の局在に明確な差が認められた。上皮ドームの小さい粒子からの蛍光は、F110の蛍光と共局在していた（図3、D-F）。上皮ドーム内の粒子を含む細胞および細胞分布は、より小さな粒子でも同様であった。これらの研究は、より大きな粒子（Rh340、Rh695、Rh1050）と比較して、より小さな粒子がより多くPPの上皮下ドームに取り込まれたことを示している。さらに、PPによる取り込みにおける小さな粒子と分子の違いを理解するために、蛍光粒子とローダミンB分子の取り込みの比較研究を行った。ローダミンB分子の蛍光は、PPおよび非PP腸絨毛の上皮下ドームおよびFAEで非特異的に観察された（補足図S3）。さらに、蛍光粒子（F110）とローダミンB分子の両方を含む溶液を用いた同時二重投与試験では、NPと分子の間に明確な違いがあることが明らかになった（補足図S4）。

マウスPPによるサイズ依存的取り込みの定量的解析

マウスPPによるサイズ依存性取り込みを定量的に評価するため、組織学的所見上の粒子の蛍光面積を測定した（図4）。単回投与試験の定量的解析により、マウスPPの蛍光面積の

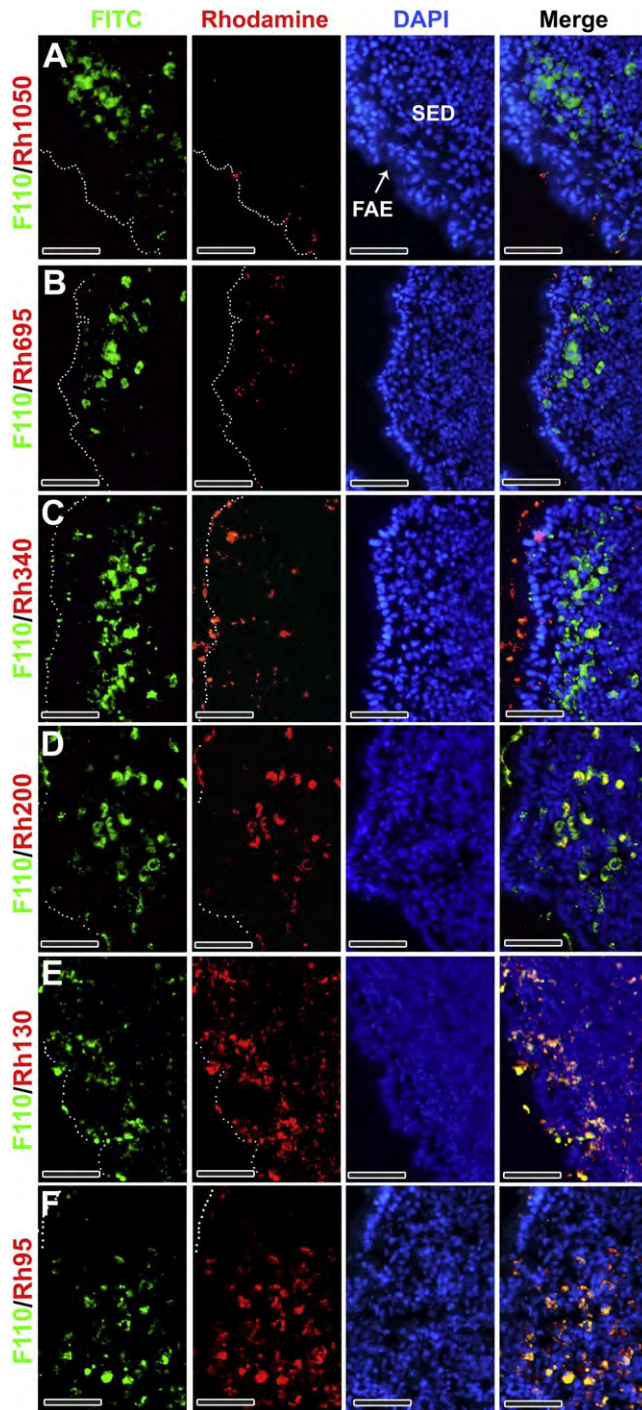


図3.二粒子同時投与試験における蛍光性チオール-有機シリカ粒子経口投与4時間後のマウスPPのSEDとFAEの蛍光顕微鏡像。F110を経口投与し、Rh1050 (A)、Rh695 (B)、Rh340 (C)、Rh200 (D)、Rh130

(E) またはRh95 (F)。F110からの蛍光は、Rh1050、Rh695、Rh340よりもはるかに高いレベルでSEDに観察された (A、B、C)。SED中の小さな粒子 (Rh200 (D)、Rh130 (E) またはRh95 (F)) からの蛍光は、F110の蛍光とよく似ており、F110の蛍光とよく共在していた。スケールバー = 50 μ m。

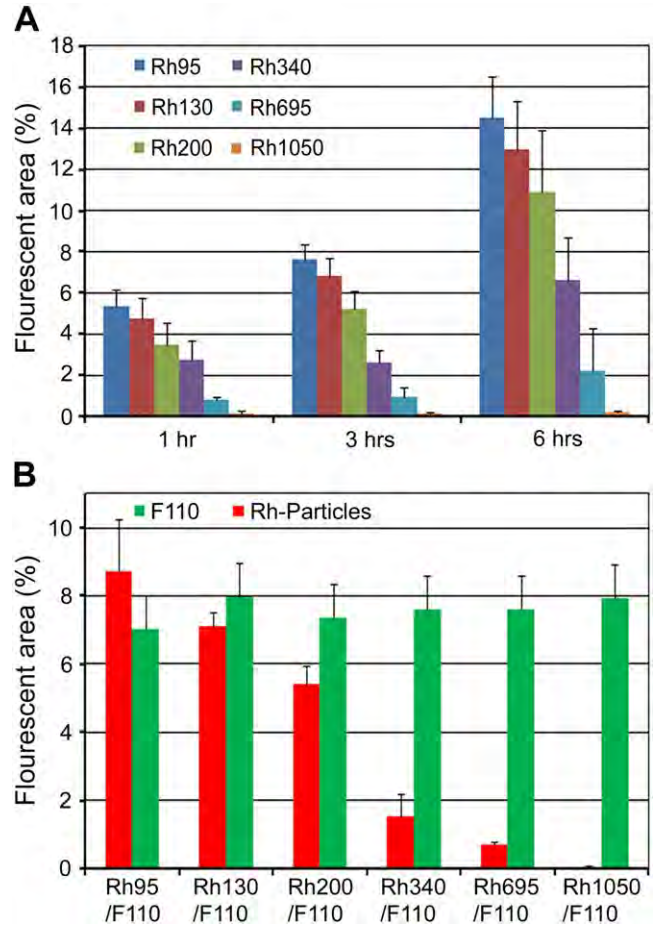


図4.PP SEDによる蛍光性チオール-有機シリカ微粒子のサイズおよび時間依存的取り込みの定量分析。各サイズの蛍光面積とSED面積を測定し、蛍光面積とSED面積の比を算出した。(A) 1粒子投与。(B) 二重粒子投与。

6時間後のRh95面積に対するRh130、Rh200、Rh340、Rh695およびRh1050の蛍光面積の割合は、それぞれ89.7、75.1、45.7、15.4および1.4%であった。しかし、2粒子同時投与と試験の場合、4時間後のF110面積に対するRh95、Rh130、Rh200、Rh340、Rh695およびRh1050の蛍光面積の割合は、それぞれ124.0、89.1、73.8、20.2、9.2および0.5%であった。二粒子同時投与試験における大粒子と小粒子の差は、一粒子投与試験における差よりも大きかった。

FMおよびEMを用いた蛍光性チオール-有機シリカ微粒子のPPへの移行経路の同定

FMとEMを用いて、粒子がPPに入る経路を検出した。PP FAE上のM細胞を同定するために、M細胞表面の糖鎖

の一種である α -Lフコース残基の特異的マーカーであるクノロジー、生物学、医学8(2012)627-636

レクチンUEAIによる組織化学染色を行った。FITC標識
レクチンUEAIによる組織化学染色の結果、PP FAEに染
色細胞が散在していることが判明した(図5、AおよびB
)。陽性に染色されたM細胞は表面と細胞質上部に蛍
光を示した。いくつかのM細胞は

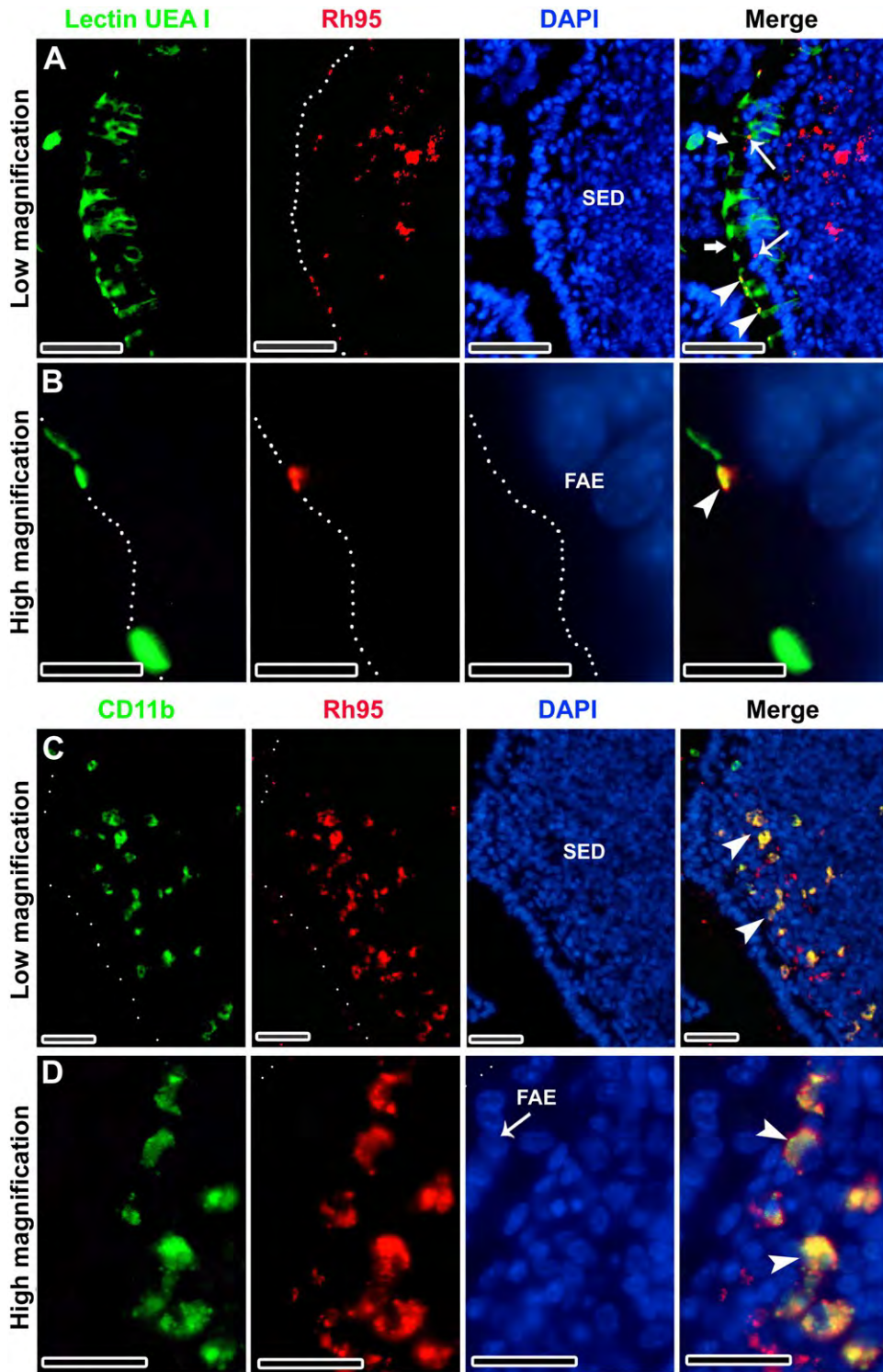


図5.蛍光チオール-有機シリカ粒子経口投与4時間後のマウスPP FAEのレクチンUEAI染色およびPP SEDのCD11b⁺細胞の蛍光顕微鏡写真。(A) M細胞表面(矢印)およびM細胞(矢印)およびPP腸細胞(太矢印)の細胞質内への粒子の取り込みと共局在を示す低倍率写真。(B) M細胞表面での粒子の共局在を示す高倍率写真(矢頭)。(C)、(D)粒子からの蛍光を含むPP SEDのCD11b⁺細胞を示す低倍率および高倍率写真(矢印の頭)。スケールバー=(A); (C) 50 μ m、(B) 10 μ m、(D) 25 μ m。

Rh95の蛍光(図5、A)。Rh95とレクチンUEAIの蛍光は局在した。Rh95の表面(図5、B、矢印)と細胞質(図5、B、矢印)に共

PP M細胞。これらの所見は、経口投与後、Rh95が経細胞-M経路を利用したことを示している。PPの経細胞-M経路に加えて、Rh95の経細胞-M経路でも線状蛍光が検出された。

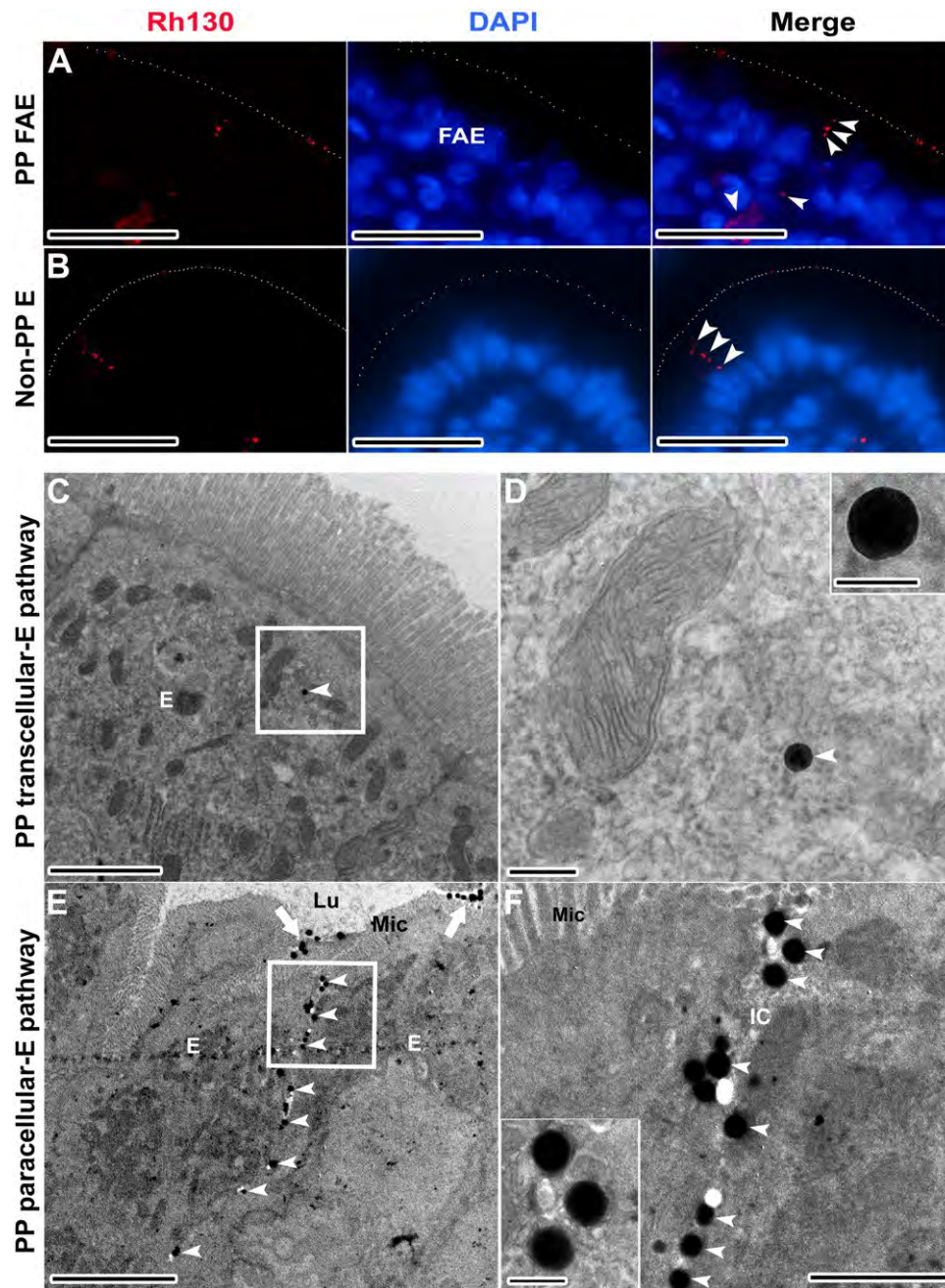


図6 (A)、(B) 蛍光性チオール-有機シリカ粒子経口投与4時間後のマウスPP FAEおよび非PP上皮のFM画像およびEM。(A) 2つのPP腸細胞 (E) の間に調整された粒子 (矢印) からの線状蛍光。(B) 2つの非PP腸細胞 (E) の間に調整された粒子 (矢印) からの線状蛍光。(CおよびD) 3つのPP腸細胞 (E) と細胞質内の蛍光性チオール-有機シリカ粒子 (矢印) (白粋 (C) と拡大 (D))。(EおよびF) 内腔 (Lu) 内、微絨毛 (Mic) 間 (太矢印)、および2つの腸細胞 (E) 間の細胞間腔 (IC) 内の1列に並んだ粒子 (白粋 (E) および拡大 (F))。スケールバー= (A) および (B) 25 μ m; (C) 2 μ m; (D) 200nm、100nm拡大; (E) 5 μ m; (F) 1 μ m、200nm拡大。

PP FAEではRh130 (図6、A、矢印) が観察された。これらの所見は非PP腸管細胞でも観察され (図6、B、矢印)、PP腸管細胞での観察と同様であった。したがって、これらの所見は、2つの腸細胞間のPP副細胞経路 (副細胞-E経路) を示している可能性があり、EMによって確認さ

れた。また、PP FAEのUEAI陰性染色腸管細胞質内にRh95の蛍光が検出され (図5、A、太矢印)、PPのtranscellular-E経路を示した。

経路 (transcellular-E経路) で腸細胞を通過した。一方

、Rh95の蛍光はUEAI⁺ M細胞と共局在していた (図5、A、矢印)。これらの所見も、PP上皮ドームへの経細胞-E経路を示している。粒子の蛍光はPP上皮ドーム細胞で観察された。マクロファージと樹状細胞の特異的マーカーである抗CD11b抗体を用いて、Rh95を含む細胞を免疫組織化学的に同定した。その結果

図5のCとDに示すように、PP上皮下ドームのRh95を抗CD11b抗体で染色したところ、抗CD11b抗体では染色されずにRh95の蛍光が認められた。これらの免疫組織化学的所見から、上皮下ドームでRh95を含む主な細胞はCD11b⁺細胞であり、Rh95は別の種類の細胞または細胞外腔に局在していることが示された。

Rh95およびRh130経口投与後のPPのEM検査の結果を図6のC-Fに示す。他の腸細胞に挟まれた腸細胞では、細胞質内にRh95 (図6、CおよびD、矢頭) が観察され、PP上皮下ドームへの経細胞-E経路が示された。さらに、Rh130 (図6、EおよびF、太矢印) はPP腸細胞の内腔および微絨毛の間で観察された。粒子の一部 (図6、EおよびF、矢頭) はPP腸細胞間の細胞内空間に入り込んでおり、PP上皮下ドームへのPP傍細胞-E経路を示している。観察された粒子は、細胞内腔でPP腸細胞の間に一列に並んでいた。Rh95は、PP M細胞の細胞質内でもEMによって観察され、PP上皮下ドームへの経細胞-M経路を示した (データは示さず)。これらのFMおよびEM所見は、PP細胞外-M経路に加え、PP細胞外-E経路およびPP上皮下ドームへの粒子の傍細胞-E経路の存在を示している。

ディスカッション

本研究では、様々なサイズの蛍光性チオール-有機シリカ粒子を経口投与し、PPを介したサイズ依存的な取り込みを研究した。粒子はポリスチレンと同様の方法でPPに取り込まれた、^{15,23,39}キトサン⁴ポリDL-ラクチド-コ-グリコリド (PLAGA) と同様の方法でPPに取り込まれる可能性がある、⁴⁰二酸化チタン粒子⁴¹などの粒子と同様である。^{19,22,24-29}NPのいくつかの物理的特性は、M細胞や他の細胞内での相互作用に影響を与える。¹⁴⁻¹⁸NPの表面電荷がプラスまたは帯電していない場合、表面は疎水性相互作用によって吸着性腸細胞に親和性を持つが、マイナスに帯電した親水性表面は吸着性腸細胞やM細胞に対してより大きな親和性を示す。¹⁸サイズ、表面電荷、親水性の組み合わせが、M細胞の取り込み親和性に大きな役割を果たしている。^{18,19,24}ナノマテリアルの細胞への取り込み

は、水素結合や疎水性相互作用のような静電的な力による細胞表面への非特異的な物理的吸着によって開始されることが、以前に研究者らによって証明されている。¹⁸⁻²⁴チオール-オルガノシリカ粒子は、サイズや表面電荷 (約-50mV) が制御可能で、水への分散性が高いなどの特徴を持つ、³⁵⁻³⁸このチオール-有機シリカ粒子は、ワクチンデリバリーや、粒子とPPのM細胞のような腸管細胞との相互作用の研究に最適かもしれない。チオール-オルガノシリカ粒子は、アルキル鎖とチオール残基を含む表面メルカプトプロピル残基を有する。アルキル鎖はタンパク質との疎水性相互作用に、チオール残基は負電荷にそれぞれ寄与すると考えられる。^{37,38}疎水性相互作用は、生体分子や粒子の結合において重要な役割を果たすことが知られている。チオール残基は、吸着だけでなく静電的相互作用によっても生体分子との結合を可能にする可能性がある。レセプターに基づくメカニズムは提案されていないが、チオール-有機シリカ粒子はそのユニークな表面特性により取り込まれる可能性がある。

粒子径は、PPへのNPの取り込みにとって最も重要な要因のひとつである。^{18-20,22-29}100nmの生分解性粒子のラット腸内への取り込みは、1 μ mや10 μ mの大きな粒子と比較して有意に高いことが報告されている。²⁶より小さなポリスチレン粒子（50 nmと100 nm）は、より大きな粒子（300 nmと3000 nm）と比較して、消化管のPPと絨毛を横切って高度に吸収され得る。^{20,23,27,30}100nmのカルボキシル化ポリスチレン粒子のPPおよび正常絨毛への取り込みは、より大きな粒子（500nm、1 μ m、3 μ m）と比較して大きかった。^{22,24}PLAGA粒子も主にPPの部位で腸粘膜を通過する；粒子b 5 μ mは3時間後にPPに出現し、粒子N 5 μ mは3時間後にPPに出現する。は回腸内腔に留まっている。時折、より小さな粒子が上皮細胞で観察される。⁴⁰これらの報告は、PPによる効率的な取り込みには、大きな粒子よりも小さな粒子の方が優れていることを示しているが、粒子径50~300 nmと500 nmのPP取り込み効果の差は明らかではなかった。一方、蛍光色素のような小さな分子はPPに特異的に取り込まれず、小腸の様々な細胞に吸収されることが示された。したがって、分子はより小さな粒子と比較して、PPへの特異的なターゲティングに関連する欠点がある。超微細なポリリジンデンドリマーNP（2.5 nm）の取り込みは、より大きなポリスチレン粒子（100 nm、500 nm、1 μ m、3 μ m）の取り込みよりも低いことが報告されており、小さな粒子が常に大きな粒子よりも優れているわけではないことを示している。³¹PPによる効率的なワクチンの送達と取り込みには、最適な粒子サイズの範囲が存在するかもしれない。薬剤やワクチンのデリバリーという観点からは、小さな粒子は個々の粒子において大きな粒子よりも多くの機能性分子を含むことはできない。したがって、PPを介した効率的な経口ワクチン送達のためには、最適な粒子サイズの範囲を調査・決定することが必要である。我々の組織学的イメージングでは、時間の関数として、より大きな粒子（Rh340、Rh695、Rh1050）と比較して、より小さな粒子（Rh95、Rh130、Rh200

）の上皮ドームにおける蛍光が優勢であることが示された。新たなアプローチとして、サイズ依存性をより正確に調べ、単一サイズ投与による結果と比較するために、2粒子同時投与試験を行った。F110を実験内および実験間の標準として用い、様々なサイズの粒子のPP取り込みを定量的に分析した。二粒子同時投与試験では、粒子のPP吸収のサイズ依存性の違いがより明確に示された。二粒子同時投与試験は、より蛍光の強い写真を評価用に選択するヒューマンエラーが発生する可能性があるため、より大きな粒子のような蛍光の弱い所見の過大評価を減らす効果があるかもしれない。また、2粒子同時投与試験の定量分析では、小さい粒子（Rh95、Rh130、Rh200）と大きい粒子（Rh340、Rh695、Rh1050）の間に有意な差が認められた。95 nmから200 nmの粒子は、より大きな粒子よりもPPに取り込まれやすかった。しかし、Rh95の蛍光面積は、F110、Rh130、Rh200の蛍光面積よりも大きかった。粒子を含む細胞の分布における優勢な違いは、より小さな粒子では見られなかった。F110を含む細胞もまた、より小さな粒子を含んでいた。これらの所見から、送達効力は以下の粒子でほぼ同じであることが示された。

より小さな粒子である。したがって、95 nm~200 nmの粒子サイズがPPによる効率的なワクチン送達と取り込みに最適であると結論した。PPによる効率的な取り込みのために、50 nm~500 nmの5種類の粒子サイズを用いて、最適なサイズと最適なサイズ範囲の両方を示した報告はない。二粒子同時投与研究は、精密なナノメディシン開発のためのNPのサイズ依存性研究に有用であろう。ワクチン接種には、PPによる高い取り込みと、細胞への高レベルの抗原の送達が必要であるため、これらの結果は、NPを用いた経口ワクチン送達の開発において非常に重要である。PPによるNPの取り込みは重要なステップであるが、経口免疫の有効性を決定する唯一の要因ではない。NPのサイズを大きくすることは、抗原容量を増加させる簡単なアプローチである。200nmのNPsは、より小さな粒子よりも抗原の装填および運搬能力が高く、PPによる取り込み効果もより大きな粒子よりも優れているため、利点があると考えられる。我々は最近、有機シリカ粒子に加えて有機シリカカプセルを開発した。⁴²95 nmから200 nmのサイズの有機シリカ粒子とカプセルを用いた経口ワクチン送達研究は、経口ワクチン送達の効果に関する重要な情報を提供する。さらに、有機シリカ粒子およびカプセルからの抗原および薬剤の放出様式の開発は、ナノメディシン開発のための新たな機会を提供する。

蛍光性チオール-有機シリカ粒子を用いて、よく知られている経細胞-M経路に加えて、PPにおけるさらに2つの新規経路、経細胞-E経路と傍細胞-E経路を同定した。そして、上皮ドーム、Rh95を含む主な細胞がCD11b⁺細胞であることを証明した。従来の理論では、粒子の取り込みはM細胞のみによって達成され、M細胞は粒子を内腔から下層組織へと連続的に輸送し、そこで粒子成分の一部が免疫反応を引き起こすとされている。本研究では、経口投与されたNPがPP FAEの腸細胞に付着し、粒子が腸細胞間を通過するか（paracellular-E経路）、あるいは腸細胞に取り込まれる（transcellular-E経路）ことを示した。FAEを通過した粒子は、主にCD11b⁺細胞（マクロファージと樹状細胞）に取り込まれた。本研究は、経

口投与後のNPのPPにおけるtranscellular-E経路とparacellular-E経路の存在を証明した最初の研究である。NPの経口投与を用いたこれまでの研究では、非PP上皮を介した経細胞-E経路が詳細に報告されているが、PP上皮を介した経路は報告されていない。^{15,16,25,44,45}ラテックス粒子（1.66 μ m）は、経口投与後、PP腸細胞と比較して非PP腸細胞により容易に吸収された。¹⁶非PP腸細胞によるコロイド状金粒子（4、10、28または58 nm）の取り込みもEMで観察され、粒子サイズ依存性であることが判明した。小さい粒子（4 nm）は大きい粒子（10、28または58 nm）と比較して、より容易に取り込まれた。コロイド状金粒子の取り込みは、クリプトやPPのM細胞を通しては見られなかった。⁴³キトサン、デンプン、ポリ（アクリレート）などのポリマーを用いると、非PP上皮における高分子の細胞間透過性を高めることができる。^{18,25}さらに、ポリスチレンNP（220 nm）がラットの空腸非PP腸細胞の経細胞-E経路で観察されている¹。

時間後に胃チューブで投与した。粒子はまた、非PP上皮の傍細胞-E経路で検出されたが、PP上皮では検出されなかった。⁴⁴研究者らはまた、非PP上皮の経細胞-Eおよび傍細胞-E経路が、より大きな粒子 (1 μ m以上) の腸への取り込みの主要なメカニズムであることも報告している。⁴⁵しかし、PP上皮のtranscellular-Eおよびparacellular-E経路に関する記述はない。本稿で報告する研究では、蛍光性チオール-有機シリカ粒子を用いて、PP上皮における経細胞-E経路と傍細胞-E経路という2つの新規経路を同定した。これらの結果は、高感度蛍光性NPを用いた組織学的イメージングが、体内におけるナノ物質の経路の新たな発見と、ナノメディシンの新たな戦略を考案するための有用な情報を提供する可能性を示している。NPは、M細胞を通してだけでなく、経細胞-Eおよび傍細胞-E経路を使用して、PP上皮ドームからPPに侵入する可能性がある。これらの新しい経路は、経口ワクチンデリバリーへの利用を含む、ナノメディシン開発の新しいアプローチを提供する可能性がある。オクルディン、ZO-1、シングリンなど、PP上皮タイトジャンクションを標的とする特異的分子を表面機能化したNPは、PP傍細胞-E経路をより効率的に利用できる可能性がある。⁴⁶効率的なワクチン送達のためには、各経路を通じてPPに抗原を送達するためのNPの表面機能化の研究が必要である。さらに、各経路にはPPへの取り込みに最適なサイズがあるかもしれない。この2つの新規経路の重要性を理解することは、PPを介した効率的なワクチン送達のためのナノメディシンの開発に新たなアプローチを提供する可能性がある。各新規経路に対するNPの最適なサイズと表面機能化は、PPへのワクチン送達とその効果を最適化するであろう。

謝辞

本研究の一部は、科学研究費補助金若手研究(中村雅人)、独立行政法人新エネルギー・産業技術総合開発機構(NEDO)科学研究費補助金(C)(中村雅人)マッチングファンド方式大学研究開発成果実用化研究事業(中村雅人)

、エジプト高等教育・科学研究省ミッションセクター(A. Awaad)の財政支援により行われた。

本報告に関して、著者による利益相反の報告はない。

付録A.補足データ

本論文の補足データは、オンライン版 doi:10.1016/j.nano.2011.08.009に掲載されている。

参考文献

1. Freitas Jr RA. ナノテクノロジー、ナノ医療、ナノ手術。Int J Surg 2005;3:243-6.
2. ザマンM、スクワルツィンスキーM、マルコムJM、ウルバニCN、ジアズ、バツロフMR、他。A群溶血性連鎖球菌 (GAS) ワクチンの自己接着性ポリアクリルナノ粒子送達システム。Nanomedicine 2011;7:168-73.

3. Aliasgar S, Tushar KV, Mansoor MA. Nanocarriers for systemic and mucosal vaccine delivery. *Recent Pat Drug Deliv Formul* 2007;1:1-9.
4. デ・マジストリスMT. 遺伝子組換えコレラ毒素および大腸菌熱傷性エンテロトキシン誘導体の粘膜アジュバント効果. *Res Immunol* 1998;149:33-5.
5. 粘膜ワクチン接種のためのアルギン酸コーティングキトサンナノ粒子のラットパイエルパッチにおける取り込み試験、細胞毒性および放出試験. *J Control Release* 2006;114:348-58.
6. Shalaby WSW. 粘膜および全身性免疫を刺激する経口ワクチンの開発: 障壁と新規戦略. *Clin Immunol Immunopathol* 1995;74:127-34.
7. テトラガロイルリジン dendriマーによる霊長類M細胞への免疫原ターゲットデリバリー. *J Immunol* 2009;182:6061-70.
8. 生分解性ナノ粒子による粘膜ワクチン接種の強化. *J Control Release* 2009;138:113-21.
9. Shukla A, Katara OP, Singh B, Vyas SP. コレラ毒素Bサブユニットを結合させたピロソームを用いた組換えB型肝炎表面抗原のM細胞標的デリバリー. *Int J Pharm* 2010;385:47-52.
10. Stertman L, Strindelius L, Sjöholm I. 免疫におけるアジュバントとしてのデンブレン微粒子: マウスにおける免疫応答に及ぼす投与経路の影響. *Vaccine* 2004;22:2863-72.
11. Vladioianu IR, Dimache G, Antohi S, Vladioianu C, Zarma O. 腸チフスおよびパラチフスA・Bに対する幼児への経口ワクチン接種の有効性に関する臨床試験.
12. Salman HH, Irache JM, Gamazo C. 経口ワクチン接種におけるフラジェリンおよびマンノサミン被覆ポリ(無水物)ナノ粒子の免疫アジュバント能力. *Vaccine* 2009;27:4784-90.
13. Salman HH, Gamazo C, Agüeros M, Irache JM. チアミン被覆ナノ粒子の生体接着能と免疫アジュバント特性. *Vaccine* 2007;25:8123-32.
14. Andreas G, Steinmetz I, Susanne F, Karl-Heinz W. 抗原輸送パイエル板への侵入は、一定数のM細胞による取り込みを増加させた。 *Am J Pathol* 2004;164:65-72.
15. Hodges GM, Carr EA, Hazzard RA, Carr KE. 小腸における微粒子の取り込みと移動: 粒子分布の形態学と定量化. *Dig Dis Sci* 1995;40:967-75.
16. Hodges GM, Carr EA, Hazzard RA, O'reilly C, Carr KE. 消化管粘膜を通過する微小粒子移動の形態学および定量的側面に関する解説. *J Drug Target* 1995;3:57-60.
17. McMinn LH, Hodges GM, Carr KE. ストレプトゾトシン糖尿病ラットにおける微小粒子の消化管への取り込みと移動. *J Anat* 1996;189:553-9.
18. ナノ粒子-総説. *Trop J Pharm Res* 2006;5:561-73.
19. Florence AT, Hussain N. ナノ粒子と dendriマーのトランスサイトシス デリバリーシステム: 進化する展望. *Adv Drug Deliv Rev* 2001;50:69-89.
20. フローレンスAT. マイクロ粒子およびナノ粒子の経口吸収: 例外でも異常でもない. *Pharm Res* 1997;14:259-66.
21. フローレンスAT, ヒラリーAM, フサインN, ジャニPU. ポリスチレンナノ粒子の経口摂取と移動に影響する因子: 組織学および分析的証拠. *J Drug Target* 1995;3:65-70.
22. Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. パイエル板を介したナノスフィアおよびマイクロスフェアの取り込み: 単回経口投与後のラットにおける取り込み速度の観察. *Int J Pharm* 1992;86:239-46.
23. Jani PU, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. ラット消化管粘膜によるナノ粒子の取り込み: 定量と粒子径依存性. *J Pharm Pharmacol* 1990;42:821-6.
24. Jani PU, Halbert GW, Langridge J, Florence AT. ラットに経口投与したラテックスナノスフィアおよびマイクロスフェアの取り込みと転移. *J Pharm Pharmacol* 1989;41:809-12.
25. Jung T, Kamm W, Breitenbach A, Kaiserling E, Xiao JX, Kissel T. ペプチドの経口デリバリーのための生分解性ナノ粒子: 役割はあるか?

- 高分子が粘膜への取り込みに影響するか? *Eur J Pharm Biopharm* 2000;50: 147-60.
26. マニシャPD、ヴィノッドL、ゴードンLA、ロバートJL。生分解性微粒子の消化管への取り込み: 粒子径の影響。 *Pharm Res* 1996; 13:1838-45.
27. ミラFF、マリアナC、フランソワーズMW。経口薬物送達のための高分子ミセル: なぜ、どのように? *Pure Appl Chem* 2004;76:1321-35.
28. Sass W, Dreyer HP, Seifert J. 腸管における小粒子の急速な吸収。 *Am J Gastroenterol* 1990;85:255-60.
29. Sass W, Dreyer HP, Bockeler W, Hamelmann H, Seifert J. 消化管における粒子再吸収の原理。 *Z Gastroenterol* 1987; 25:306-15.
30. Jani PU, Florence AT, McCarthy DE. ラットにおけるポリスチレンナノスフェアの消化管吸収に関するさらなる組織学的証拠。 *Int J Pharm* 1992;84:245-52.
31. 脂質表面を持つポリリジンデンドリマーの経口摂取と移動。 *J Control Release* 2000;65: 253-9.
32. 肺炎連鎖球菌R36aの曝露によるパイエル濾胞上皮を介した微小球輸送のアップレギュレーション。 *FASEB J* 1999;13:611-9.
33. Pappo J, Ermak TH. ウサギのパイエル板濾胞上皮による蛍光ラテックス粒子の取り込みと移動: M細胞取り込みの定量的モデル。 *Clin Exp Immunol* 1989;76:144-8.
34. Smith MW, Thomast NW, Jenkinst PG, Miller NGA, Cremaschit D, Porta C. マウスおよびラットのパイエル板濾胞関連m細胞を介した微小粒子の選択的輸送。 *Exp Physiol* 1995;80: 735-43.
35. 正のゼータ電位を有するエポキシ有機シリカ微粒子のサイズ制御、ワンポット合成、キャラクタリゼーション、および生物学的応用。 *Langmuir* 2008;24:12228-34.
36. 3種類のチオール-有機シリカナノ粒子のワンポット合成と特性評価。 *Langmuir* 2008;24: 5099-108.
37. 3-メルカプトプロピルトリメトキシシランを単一シリカ源として調製した有機シリカナノ粒子の合成と特性評価。 *J Phys Chem C* 2007;111:18892-8.
38. チオール-有機シリカ微粒子のサイズ制御合成、表面機能化および生物学的応用。 *Colloids Surf B Biointerfaces* 2010;79:19-26.
39. Shreedhar VK, Kelsall BL, Neutra MR. コレラ毒素は、上皮下ドーム領域からパイエル板のT細胞およびB細胞領域への樹状細胞の遊走を誘導する。 *Infect Immun* 2003;71:504-9.
40. Damge' C, Aprahamian M, Marchais H, Benoit JP, Pinget M. ラットにおけるPLAGAマイクロスフェアの腸管吸収。 *J Anat* 1996; 189: 491-501.
41. Jani PU, McCarthy DE, Florence AT. 二酸化チタン (ルチル) 粒子経口投与後のラット消化管からの取り込みと全身臓器への移行。 *Int J Pharm* 1994;105:157-68.
42. 有機シリカナノカプセルのin situ合成と光応答性破裂。 *Chem Commun* 2011;47:1518-20.
43. Hillyer JF, Albrecht RM. 異なるサイズのコロイド状金ナノ粒子の消化管吸収と組織分布。 *J Pharm Sci* 2001;90:1927-36.
44. サンダースE、アッシュワースCT。ポリスチレンラテックス微粒子の腸管吸収と肝細胞への取り込みに関する研究。 *Exp Cell Res* 1961;22:137-45.
45. ナノ粒子の経口投与。 *Adv Drug Deliv Rev* 1991;7:71-6.
46. Wu P, Gong H, Richman R, Fredro TF. ウサギ毛様体上皮と虹彩血管内皮におけるオクルディン、ZO-1、汎カドヘリンの局在。 *Histochem Cell Biol* 2000;114:303-10.