

# 二酸化チタンナノ粒子の中樞神経系への生物学的蓄積性

鈴木 健一郎\*1, 長谷川 也須子\*1,2, 久保田 久代\*1

現在、ナノマテリアルは多様な用途に用いられており、それらを扱う労働者の健康影響が懸念されている。これまでに、ナノマテリアルの発がん性を中心とした毒性に関する研究は多方面で行われ、その多くでは発がん性が低いとの結果が示された。一方、体内動態学研究では、ナノマテリアルは呼吸器からのばく露によって、身体のあらゆる臓器に移行することが議論されている。しかし、ナノマテリアルの動態ならびにそれに引き続く慢性影響は未解明な点が多い。そのため、労働衛生管理上、ナノマテリアルの体内動態を解明することは重要な課題である。そこで本研究は、特に慢性ばく露が問題となる二酸化チタンナノ粒子の中樞神経系への生物学的蓄積性について検討した。我々は、独自にナノマテリアルの調製方法を開発し、蛍光顕微鏡や電子顕微鏡を用い、二酸化チタンナノ粒子の体内動態を追跡した。その結果、二酸化チタンナノ粒子が空気血液関門を透過して、脳に到達することが明らかとなった。また、細気管支以遠の管腔表面に存在する肺サーファクタントが、二酸化チタンナノ粒子に対して、初期防御機能としての役割を担っている可能性を発見した。我々の研究は、肺胞における空気血液関門の透過性の決定に、ナノマテリアルの表面に吸着する肺サーファクタントが関与することを示唆している。今後、様々な特性を有するナノマテリアルに対して、肺内における生体分子の吸着性が明らかとなれば、ナノマテリアルのヒト体内動態の予測のための新たな指標として利用が可能である。さらに、ナノマテリアルの中樞神経系への蓄積がどのような疾患に結びつくか、体内動態を考慮した検討が必要であると思われる。

**キーワード:** ナノマテリアル, ナノ粒子, 二酸化チタン, 体内動態, 中樞神経系, 肺サーファクタント.

## 1 はじめに

ナノテクノロジー産業の発展に伴い、新規な物性を有するナノマテリアルの急激な増加によって、世界規模で労働衛生対策の重要性が認識されている<sup>1,2)</sup>。これまで厚生労働省は、化学物質を取り扱う事業者に対して、労働安全衛生法に基づき、ばく露防止のための環境管理及び作業管理、並びに健康管理を義務づけている<sup>3)</sup>。しかし、ナノマテリアルによる健康影響はほとんど解明されていないため、その危険性が疑われているにも関わらず、労働者の健康障害防止のための具体的なガイドラインは設けられていない<sup>4)</sup>。増え続けているナノマテリアルに対して、労働者の健康障害の予防を握る鍵は、ナノマテリアルと健康影響との因果関係を明らかにすることであり、リスク管理のためには、ナノマテリアルの特性を考慮した規制を強化していかなければならない<sup>5)</sup>。現行の規制では、分子的な同一性を基準として判断されるため、粉じんという視点を除けばほとんどが既存化学物質として取り扱われている<sup>6)</sup>。しかし、ナノスケールで見れる物質特有の性質による動態や慢性影響が存在する可能性も考えられ、労働安全衛生法上、今後もどのように取り扱われるべきか、更なる検討が必要である<sup>6)</sup>。したがって、ナノマテリアルに対して、新規化学物質に相当するかどうかを判断できる新たな評価指標を構築することが

重要である。

最新の疫学調査研究によれば、微細粒子状物質による影響は、発がんや心血管疾患のみならず、脳血管疾患や認知機能障害との間に高い相関性があることが明らかとなっている<sup>7-11)</sup>。NIOSH (米国労働安全衛生庁) は、化学物質の約 40%が何らかの神経毒性作用を有していると予想している<sup>12)</sup>。また、国際アルツハイマー病協会は、アジア諸国で認知症の患者が急速に増加していることに警鐘を鳴らし、労働衛生的な側面を懸念している<sup>13)</sup>。実際、パーキンソン症候群や運動ニューロン病等の神経変性疾患の発症は、女性よりも男性に多く、職業要因について、更なる調査研究が求められている<sup>14)</sup>。

## 2 背景および目的

現在までに、ナノマテリアルは嗅神経を介して脳に移行することが言われているが、血液を介した肺から脳への移行は明確になっていない<sup>15-17)</sup>。そこで本研究は、ナノマテリアルの中樞神経系への移行について検討する(図 1)。その方法として、肺サーファクタントを用いるナノマテリアルの新規調製法を確立する。従来の調製法では、pHの制御がされておらず<sup>18,19)</sup>、また溶媒の表面張力が大きいため、気管内投与により一部細気管支(以降「終末細気管支」「呼吸細気管支」領域を示す)末梢に閉塞が起り、様々な障害は避けられない<sup>20)</sup>。それゆえ、ナノマテリアルの分散性の確保と同時にばく露方法を構築する必要がある。一方、ナノマテリアルと健康影響との因果関係を明確にするためには、ナノマテリアルのヒト体内動態を予測しなければならない。しかし、電子顕微鏡を用いた従来の微細形態観察法は、観察する組織を細切することにより、ナノマテリアルが存在する位置に関する情報の精度が落ちる<sup>21)</sup>。したがって、蛍光顕微鏡や電

\*1 (独)労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ

\*2 現所属: 東京農工大学獣医病理学研究室

連絡先: 〒214-8585 川崎市多摩区長尾 6-21-1 鈴木健一郎

E-mail: suzukike@h.jniosh.go.jp

子顕微鏡を用い、広視野で評価が可能な新しい動態解析技術を開発する。

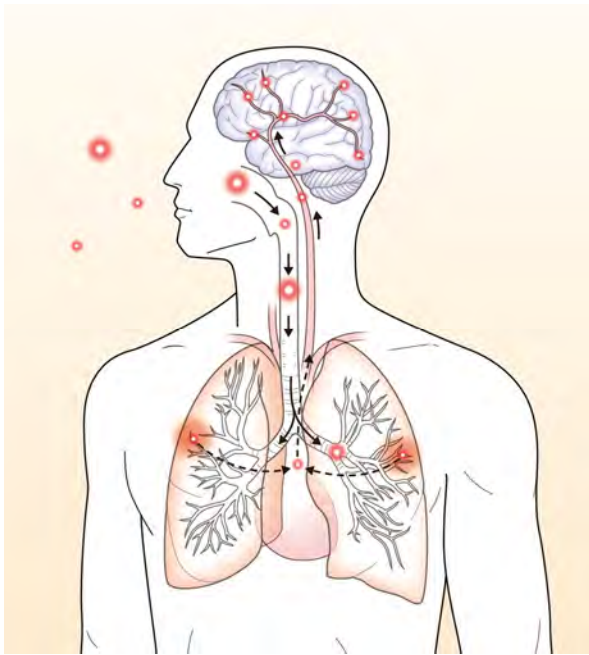


図 1. ナノマテリアルの中枢神経系への移行の予測

### 3 実験方法

#### 1) 二酸化チタンナノ粒子の調製方法

本研究では、金属酸化物粒子である二酸化チタン (Titanium dioxide:  $\text{TiO}_2$ ) のナノ粒子を対象とする。 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子は、光触媒機能のナノ特有の性質を持ち、塗料や化粧品など様々な使用用途があり、年間生産量も数千トン規模と非常に大きいことが知られている<sup>22)</sup>。初めに、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子粉末 (Aeroxide® P25, Sigma-Aldrich 社製) を超純水に懸濁させ、ポルテックスにより攪拌した。攪拌後、マイクロ冷却遠心機 (KOBOTA3780, 久保田商事株式会社製) を用い、1000g で1時間遠心を行った。遠心後、上澄み液を分取し、0.45  $\mu\text{m}$  カットオフ特性を持つフィルター (SLHV033RS, メルクミリポア社製) を通して、ストック溶液とした。次に、医薬品である肺サーファクタント (サーファクテン, 田辺三菱社製) を 1 mg/mL になるように 37°C の超純水に分散させた。 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子水溶液と肺サーファクタント水溶液を 2 対 3 の比率で、必要量を混合し、それらの混合液を 37°C の恒温装置内で一晩攪拌した。 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子に対して、蛍光物質で標識を行うため、1 mg/mL の蛍光物質 (CM-DiI, Life Technologies) を加え、30 分間攪拌した。尚、CM-DiI は、リン脂質のアシル基に特異的に結合する。反応後、14000g で 15 分間遠心し、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子を沈降させた。上澄み液を除き、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子を生理食塩水に再懸濁させた。

#### 2) 二酸化チタンナノ粒子のキャラクタリゼーション

調製直後の  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子水溶液をピペットで分取し、銅グリッド (150 メッシュ, 日新 EM 株式会社) に塗布した。乾燥後、透過型電子顕微鏡 (Transmission

Electron Microscope: TEM) (TECNAI, 日本 FEI 社製) を用い、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の観察を行なった。また、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の表面に吸着した肺サーファクタントを観察するためには、0.1M のココジル酸緩衝液で 1% 四酸化オスミウム水溶液となるよう希釈し、銅グリッドをパラフィルム上で浸漬し 10 分間反応させた。反応後、乾燥させないように注意しながら蒸留水で十分に洗浄し、ろ紙で銅グリッドに残った蒸留水を給水後、1% タンニン酸水溶液に 5 分間浸漬させた。浸漬・洗浄後、ドライヤーで水分を乾燥させた。一方、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の表面に吸着した血清蛋白質の観察のためには、0.1M のココジル酸緩衝液で 2.5% グルタルアルデヒド水溶液になるよう希釈し、銅グリッドをパラフィルム上で浸漬し 10 分間反応させた。その後、上記と同様の行程で作製した。一方、 $\text{TiO}_2$  ナノ粒子水溶液に対して、動的光散乱法 (Nano-ZS, MALVERN 社製) を用い、動力的粒径及び分散性指標 (PDI)、並びに Z-電位を測定した。

#### 3) 二酸化チタンナノ粒子の体内動態評価

8 週齢の雄 Crl:CD (SD) ラットに 30  $\mu\text{g}$  の  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子 (300  $\mu\text{L}$ ) をイソフルラン麻酔下で単回及び 1 週間に 2 回、4 週間反復して気管内に投与した。対照群は生理食塩水を用いた。最終投与後 2 日目に、イソフルラン深麻酔下にて、左心室から採血を行い、安楽死処置を行った後、0.3% のヘパリン入りリン酸緩衝生理食塩水で全身灌流を行った。

蛍光顕微鏡法による観察のため、4% パラフォルムアルデヒドで灌流固定した。また、肺については灌流固定後、同固定液を気管支上部から注入し追加固定を行った。固定された肺や脳を摘出・分割した上で、4% スクロースで 2 日間置換した。次に、ライカ社製クライオスタットで厚さ 30  $\mu\text{m}$  の凍結切片を作製し、免疫組織化学染色法で染色後、蛍光顕微鏡を用い  $\text{TiO}_2$  ナノ粒子の観察を行った。

TEM 観察のため、1.5% グルタルアルデヒドと 1.0% パラフォルムアルデヒド混合固定液で灌流固定を行った。肺については灌流固定後、同混合固定液を気管支上部から注入し追加固定を行った。固定後検索を行う組織を採材し、0.5~1mm 厚に切り出しを行った後、上記と同様の混合固定液で浸漬固定を追加して行った。次に、組織を緩衝液で洗浄後 1.0% オスミウム酸にて後固定を行い、定法に従って脱水、置換を行いエポキシ樹脂にて平板包埋を行った (図 2A)。包埋された肺組織を糸鋸等で切り出し、薄切用ブロックを作製した (図 2B)。ブロックをガラスナイフで約 1.5  $\mu\text{m}$  の厚さに薄切しトルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡による観察を行った (図 2C)。光顕観察後、観察を必要とする部位を特定し、特定された部位が電顕で観察可能になるように厚切り切片上でスーパーインポーズを行った (図 2D)。その後、ブロック上にグリッドを乗せスーパーインポーズした部位を確認しながらメッサ型にトリミングを行い 50~80 nm 厚に

超薄切した。超薄切した切片をウランと鉛の二重染色を行い、TEM 観察及びX線分析を行なった。

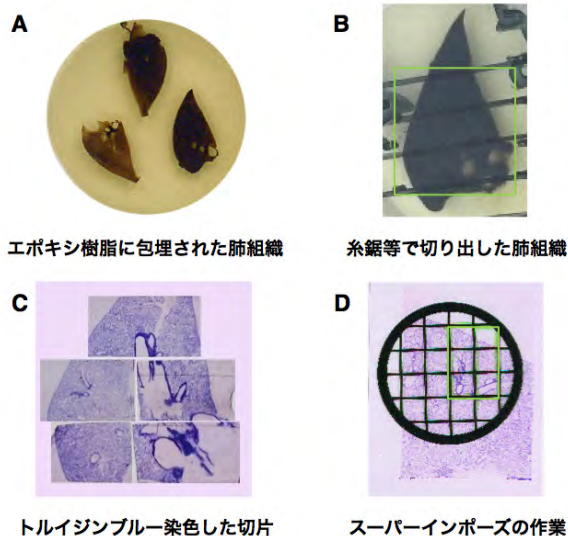


図 2. 広視野の TEM 観察のための試料作製の手順

#### 4 結果

TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の調製方法について、従来法と比較・検討した (表 1)。粒径及び PDI の結果から、本法で調製した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は、生理食塩水中においても良好な分散性を確保できることが解った。純水に分散させた TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は、生理食塩水中において凝集性を示した (結果省略)。さらに、ヒト血清における TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の安定性を検討したところ、肺サーファクタントで分散させた TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は、肺サーファクタント水溶液中の分散状態と比較して、血清中において凝集性を示さなかったが (図 3A)、純水に分散させた TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は、血清中において凝集性を示した (図 3B)。

表 1. 二酸化チタンナノ粒子の調製: 本法と従来法の比較

	分散媒	分散剤	pH (25°C)	粒径 [nm]	PDI [%]	Z-電位 [mV]
本法	肺サーファクタント	生理食塩水	5.0-7.0	97.4	0.216	-10.2
従来法①	リン酸二水素ナトリウム	超純水	8.35	74.7	0.125	-54
従来法②	なし	超純水	3.54	61.8	0.101	38.6

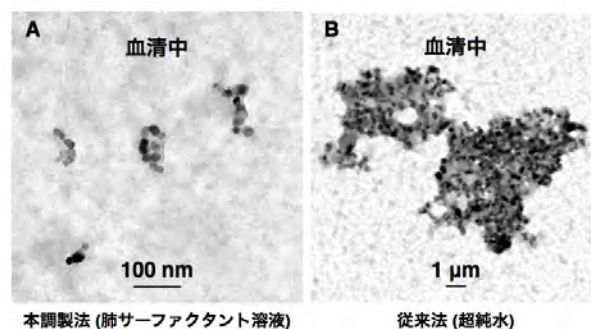
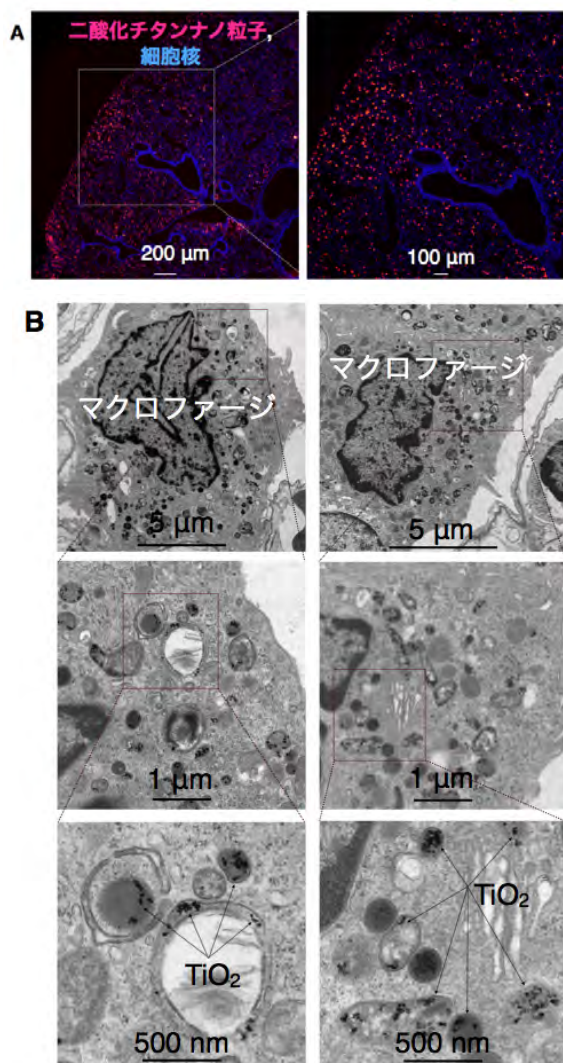


図 3. 血清中における二酸化チタンナノ粒子の電顕像

蛍光顕微鏡を用い、肺組織の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を観察したところ、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は肺胞腔に分布していた (図 4A)。また、TEM 観察により、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が肺胞マクロファージのリソソーム内に存在していることが解った (図 4B)。しかし、肺胞上皮細胞内には TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が確認されなかった。次に、細気管支の TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を観察した結果、投与 1 時間後では TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が線毛上皮細胞表面に確認された (図 4C)。さらに、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は細気管支の表面で、肺サーファクタントと相互作用して、血液中へ移行することが解った (図 4D、移行結果は省略した)。



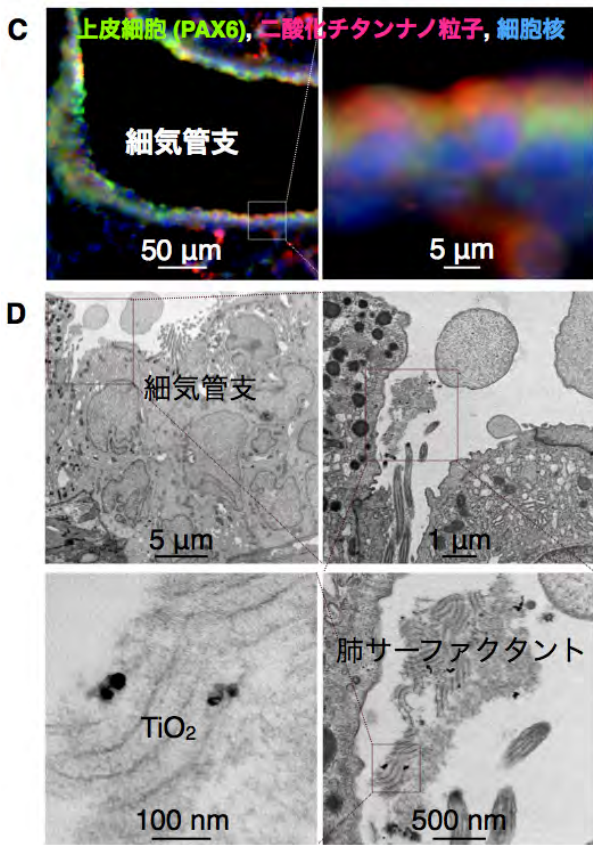


図 4. 肺組織 (肺泡や細気管支) の観察結果

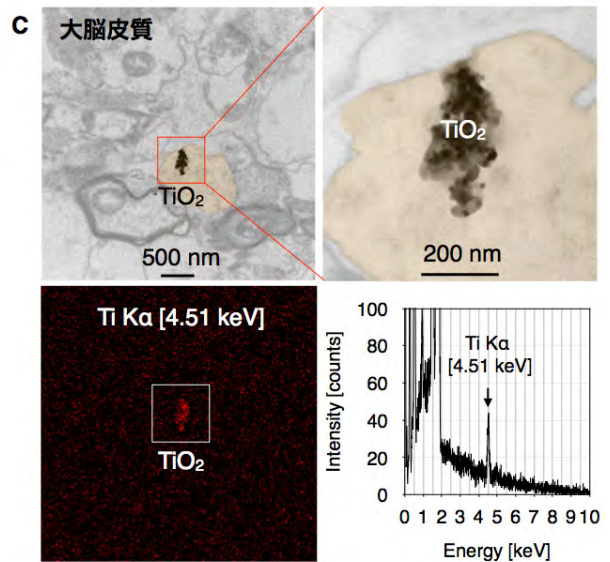
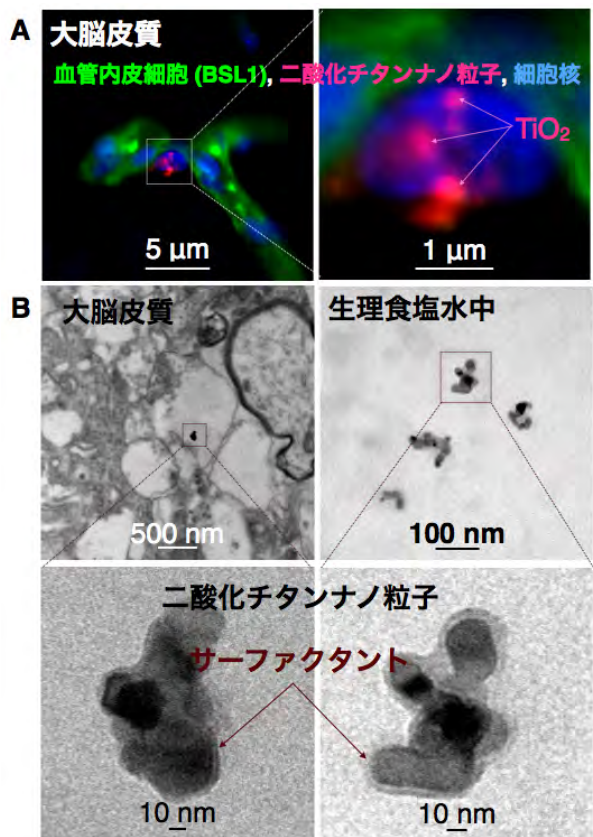


図 5. 脳実質内に蓄積したナノ粒子の観察と同定

脳組織についても検討を行なったところ、脳内毛細血管近傍に存在する神経系細胞に取込まれていることが解った (図 5A)。さらに、TEM より脳実質に存在していると思われる TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を検索した結果、調製粒子と類似した構造体を有するナノ粒子が観察された (図 5B)。また、それらのナノ粒子に対して、X線分析を行った結果、チタン元素のピークが確認された (図 5C)。

## 5 考察

近年の論文を精査すると、2000 年頃から肺サーファクタントを分散剤に用いる試みが報告されている<sup>23)</sup>。この調製方法の基本的な考え方は、呼吸により肺内に侵入したナノマテリアルが、呼吸細気管支や肺胞管あるいは肺胞壁の表面に沈着して、そこで、肺サーファクタントを吸着する生理現象を利用することである<sup>24,25)</sup>。しかし、肺サーファクタントを用いない気管内投与の場合、気管や気管支の表面に存在している粘液成分等がナノマテリアルに先に吸着するため、その後の体内動態や細胞認識機構が異なることが考えられる。現在では、ナノ毒性学の先駆者の一人であるロチェスター大学のオーバードスター教授らが、(米国環境健康科学研究所のナノプロジェクトにおいて、肺サーファクタントの調製方法を採用して、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の呼吸器系への影響評価研究を進めている<sup>23)</sup>。また、最近では、カーボンナノチューブ等の調製にも応用されている<sup>26)</sup>。このように、肺サーファクタントの分散方法は、ナノマテリアルの分散性確保の目的だけでなく、生理的ばく露影響評価の目的においてもコンセンサス (合意) が得られつつある。今後、従来の気管内投与で得られた結果や吸入ばく露の結果と比較することで、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の体内動態情報を総合的に理解することが可能となるとと思われる。

本研究により、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子に対して、細気管支の表面に存在する肺サーファクタントが初期の防御システムとして働いている可能性が見出された。一般的に、

細気管支に沈着した微細粒子状物質は、線毛上皮細胞の線毛エスカレーターで除去されることが知られている。我々の研究では、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子のばく露によって、肺サーファクタントと TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の相互作用並びに TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の血液中への移行が認められたことから、ナノマテリアルと肺サーファクタントの相互作用が、空気血液関門の透過性に関与する可能性が考えられた。他方、肺の生理機能に関する報告によれば、気流速度は細気管支近傍で著しく減少するため、吸入気が細気管支までしか到達しないことが議論されている<sup>20)</sup>。これは、細気管支が、ナノマテリアルの沈着を受けやすいことを示唆している。

一方、肺胞においては、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が肺胞マクロファージに取り込まれているにも関わらず、その近傍において、炎症細胞の浸潤や肺胞上皮細胞の障害像はほとんど認められなかった。この病理学的現象は、肺胞マクロファージや肺胞上皮細胞は、細気管支を通過した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子を異物として認識していないことを示唆している。それゆえ、細気管支の認識機構が明らかとなれば、空気血液関門の透過性を考慮したナノマテリアルの新たな評価指標を構築することが可能となると思われる。

本プロジェクト研究の推進により、肺サーファクタントを吸着した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が、空気血液関門を透過して、脳にまで到達することが初めて明らかとなった。過去の気管内投与実験において、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の脳への移行が証明できなかったことを鑑みると、細気管支における認識機構の違いが考えられる。すなわち、従来の調製方法は、溶媒の pH や表面張力を考慮していないため、細気管支の障害を引き起こし、空気血液関門の透過性が低下していた可能性がある。この問題点に関して、ドイツ・ヘルムホルツ研究所の Kreyling 教授らが、ナノ粒子の吸入ばく露と気管内投与（従来法）で、肺において、ナノ粒子のクリアランス速度に顕著な違いがあることを指摘している<sup>28, 29)</sup>。一方、脳実質で TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の存在が確認されたことから、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子は血液脳関門を透過した可能性が考えられる。しかしながら、血液脳関門の物質透過機構は未だ十分に解明されていない<sup>30)</sup>。ただし、リン脂質や脂肪酸等の脂溶性物質は血液脳関門を透過することが知られているため、TiO<sub>2</sub> ナノ粒子の表面に吸着した肺サーファクタントが関係している可能性がある。今後は、細気管支の物質選択性の解明と共に、脳に蓄積した TiO<sub>2</sub> ナノ粒子が及ぼす影響を明らかにする必要がある。

## 6 おわりに

現在は、ナノテクノロジー産業の黎明期であり、様々な特性を有するナノマテリアルが急激に増加している。しかし、未だ健康影響が明らかとなっておらず、ナノマテリアルのリスクに関する科学的な知見の獲得に向けた継続的な努力が研究機関に求められている。他方、規制機関は、国際協力体制を強化し、緊密な連携のもと、労働者の健康の確保に向けたロードマップの作成が必要で

ある。加えて、行政機関は、労働安全衛生領域の重要性を理解してもらえよう国民や社会に発信していくことが大切である。わが国の労働衛生学は歴史と伝統があり、その流れを未来へ繋げることが課題であると思われる。

## 参考文献

- 1) Nel A., Xia T., Mädler L., Li N. Toxic potential of materials at the nanolevel. *Science* 2006; 311: 622-627.
- 2) Oberdörster G., Oberdörster E., Oberdörster J. Nanotoxicology: an emerging discipline evolving from studies of ultrafine particles. *Environmental Health Perspective* 2005; 113: 823-839.
- 3) 中央労働災害防止協会. 労働衛生のしおり. (株)光邦; 2013: 63-70.
- 4) 厚生労働省労働基準局 (松井孝之). 健康障害防止のためのリスク評価と制度的規制. 化学物質のリスク評価に係る意見交換会資料. 2013
- 5) Savolainen K., Backman U., Brouwer D., Fadeel B., Fernandes T., Kuhlbusch T., Landsiedel R., Lynch I., Pyllkkänen L. Nanosafety in Europe 2015-2025: towards safe and sustainable nanomaterials and nanotechnology innovations. 2013; 1-218.
- 6) 福島昭治 他 12 名. ナノマテリアルの安全対策に関する検討会 報告書. 2009; 12-13.
- 7) Elissa H. *et al.* Long-term exposure to fine particulate matter, residential proximity to major roads and measures of brain structure. *Stroke* 2015; 46: 1161-1166.
- 8) Ljungman L. P., Mittleman A. M. Ambient air pollution and stroke. *Stroke* 2014; 45: 3734-3741.
- 9) Wellenius A. G. *et al.* Ambient fine particulate matter alters cerebral hemodynamics in the elderly. *Stroke* 2013; 44: 1532-1536.
- 10) Weuve J., Puett C. R., Schwartz J., Yanosky D. J., Laden F., Grodstein F. Exposure to particulate air pollution and cognitive decline in older women. *Arch. Intern. Med.* 2012; 172(3): 219-227.
- 11) Power C. M., Weisskopf G. M., Alexeeff E. S., Coull A. B., Spiro III A., Schwartz J. Traffic-related air pollution and cognitive function in a cohort of older men. *Environmental Health Perspectives* 2011; 119: 682-686.
- 12) Feldman G. R. Clinical syndromes associated with neurotoxicity. *ILO Encyclopedia of Occupational Health and Safety* 1998; 7: 17-20.
- 13) Alzheimer's disease international. *World Alzheimer Report 2014-Dementia and risk reduction*. Alzheimer's Disease International, London; 2014
- 14) Pearce N., Kromhout H. Neurodegenerative Disease: The Next Occupational Disease Epidemic? *Occupational and Environmental Medicine* 2014; 71(9): 594-595.

- 15) Oberdörster G., Sharp Z., Atudorei V., Elder A., Gelein R., Kreyling W., Cox C. Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain. *Inhalation Toxicology* 2004; 16: 437-445.
- 16) Oberdörster G., Elder A., Rinderknecht A. Nanoparticles and the brain: cause for concern? *J Nanoscience Nanotechnology* 2009; 9: 4996-5007.
- 17) 坂井伸光, 松井康人, 山元昭二, 世良耕一郎, 藤巻秀和, 内山巖雄. 酸化チタンナノ粒子期間内投与後の体内動態. *J UOEH (産業医科大学雑誌)* 2008; 30(1): 27-38.
- 18) Li Y., Li J., Yin J., Li W. Kang C., Huang Q., Li Q. Systematic influence induced by 3 nm titanium dioxide following intratracheal instillation of mice. *Nanoscience and nanotechnology* 2010; 10: 8544-8549.
- 19) 遠藤茂寿 他 15名. ナノ材料有害性試験のための試料調製方法と計測方法. NEDO プロジェクト報告書 (P06041) 2011; 129-132.
- 20) 吉川清, 吉田清一, 佐竹辰夫. 肺表面活性—その基礎と臨床—. 真興交易株式会社医書出版部 1976: 39-80.
- 21) Kreyling G W., Geiser M. Deposition and biokinetics of inhaled nanoparticles. *Particle and Fibre toxicology* 2010; 7(2): 1-17.
- 22) 高機能光触媒創製と応用技術研究会. 高機能な酸化チタン光触媒～環境浄化・材料開発から規格化・標準化まで～. NTS. 2004
- 23) Bonner C. J. *et al.* Interlaboratory evaluation of rodent pulmonary responses to engineered nanomaterials: the NIEHS Nano GO Consortium. *Environmental Health Perspectives* 2013; 121: 676-682.
- 24) Gehr P., Heyder J. *Particle-Lung interactions.* Marcel Dekker Inc. 2000: 291-321.
- 25) Maier M., Hannebauer B., Hollorff H., Albers P. Does lung surfactant promote disaggregation of nanostructured titanium dioxide? *JOEM* 2006; 48: 1314-1320.
- 26) Gasser M. *et al.* Pulmonary surfactant coating of multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) influences their oxidative and pro-inflammatory potential in vitro. *Particle and Fibre Toxicology* 2012; 9: 1-17.
- 27) Kiburn K. H. Particle causing lung disease. *Environmental Health Perspectives* 1984; 55: 97-109.
- 28) Kreyling G. W. *et al.* Air-blood barrier translocation of tracheally instilled gold nanoparticles inversely depends on particle size. *ACS NANO* 2014; 8(1): 222-233.
- 29) Driscoll, K. E. *et al.* Intratracheal instillation as an exposure technique for the evaluation of respiratory tract toxicity: uses and limitations. *Toxicological Sciences* 2000; 55: 24-35.
- 30) Abbott N. J., Rönnbäck L., Hansson E. Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nature Reviews Neuroscience* 2006; 7: 41-53.