

ブロックのトリミング  
↓  
ダイヤモンドナイフ (Nanotome Thick) で左肺の全割組織のセミシン切片を切削 (厚さ 2 $\mu$ m)  
↓  
トルイジンブルー (0.5%) で染色

図3 セミシン切片の作製

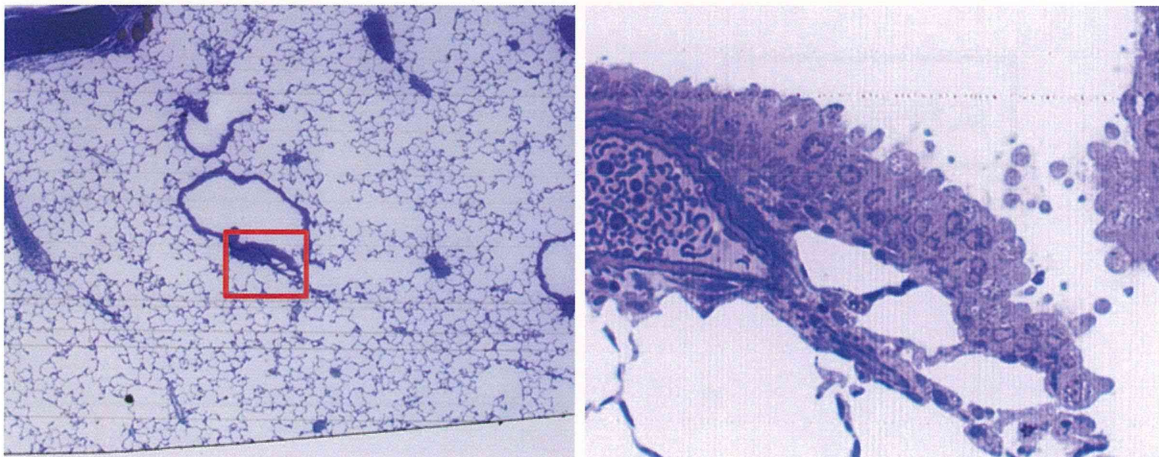
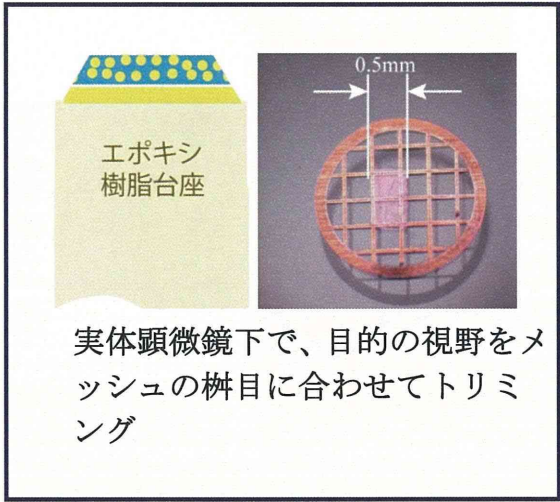
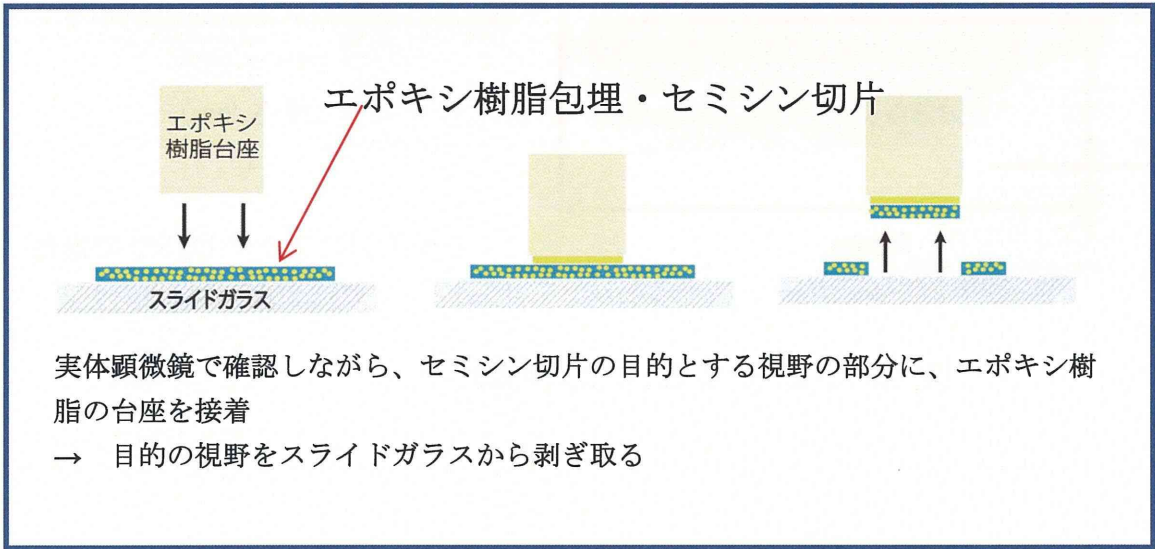


図4 セミシン切片から、電顕検索部位の選定  
(左図の赤枠内を選定、右図は同部の拡大)



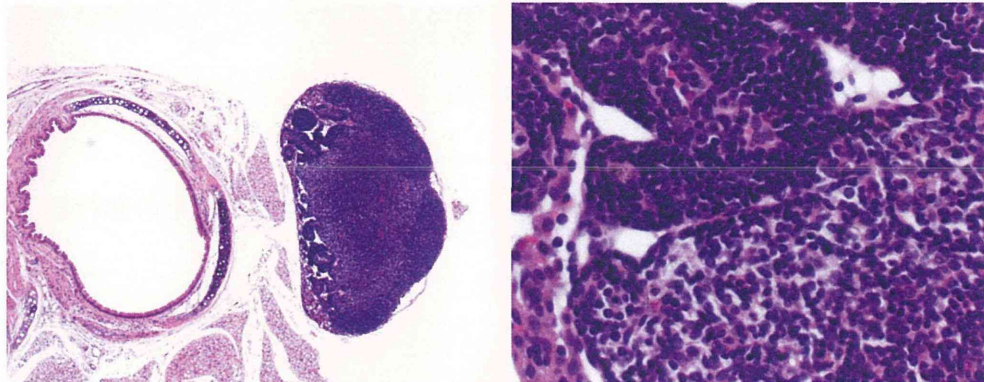
**試料完成**



図5 電子顕微鏡試料作製の流れ



方法：B-2 肺組織内侵入後の T-CNT の遠隔臓器への移行調査

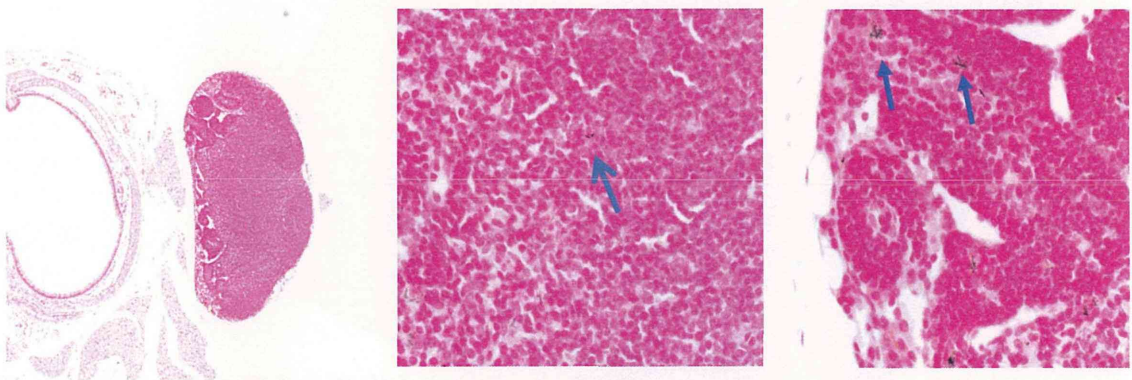


肺関連リン節は気管に隣接したリンパ節を検索

黒色の T-CNT は、ヘマトキシリンで紫色に染まった組織と判別が困難



ケルンエヒトロート染色と偏光装置付顕微鏡を利用

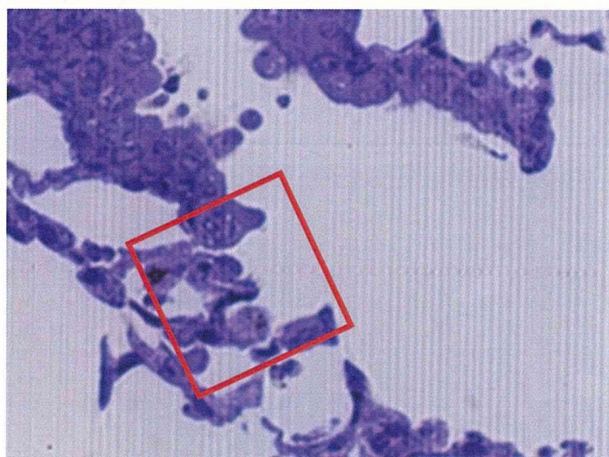


投与後91日の肺  
矢印:MWCNT

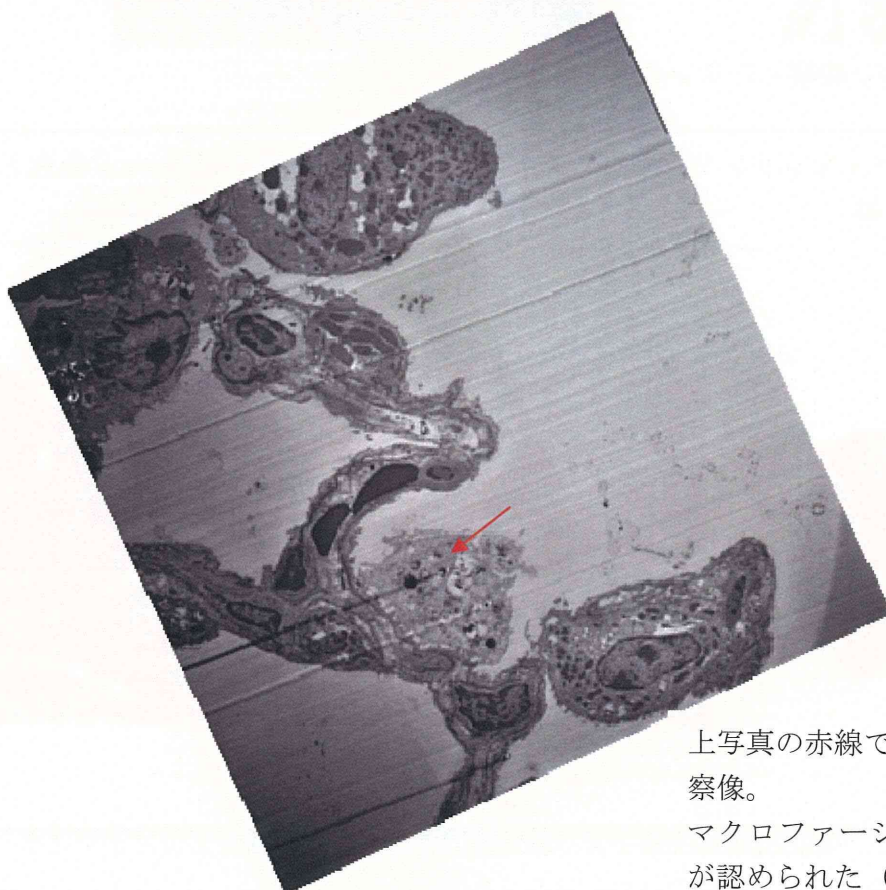
リンパ系組織の肺関連リンパ節と脾臓では T-CNT は主としてマクロファージに貪食された状態で認められる (右図矢印)

図 6 肺関連リンパ節に沈着した T-CNT の検出

結果：C-1 気管内投与した T-CNT の肺組織内侵入する経路解明



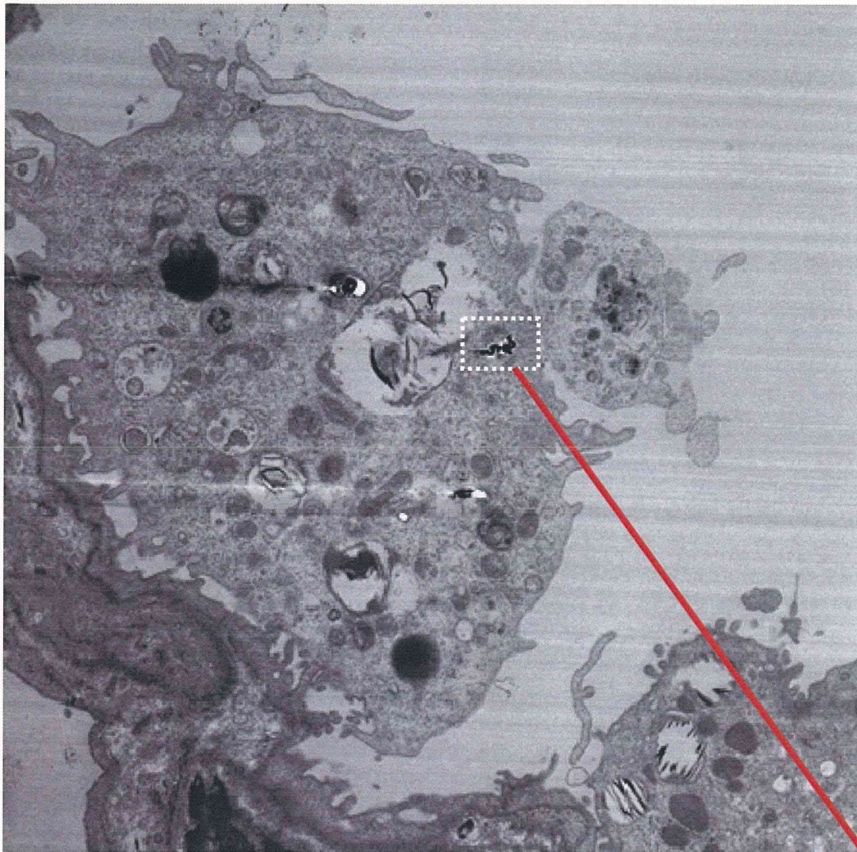
気道終末部と肺泡域との移行部



上写真の赤線で囲んだ枠内の TEM 観察像。  
マクロファージに貪食された T-CNT が認められた (赤色矢印)。

図 7 気道終末部と肺胞壁の電顕像  
T-CNT 10 $\mu$ g 投与後 1 日の肺





肺胞マクロファージの細胞質内に不定形の異物が認められた（白色点線で囲んだ枠内）。

拡大を上げて観察すると、不定形の異物は中空構造（白色矢印）を示す T-CNT であることが確認された。

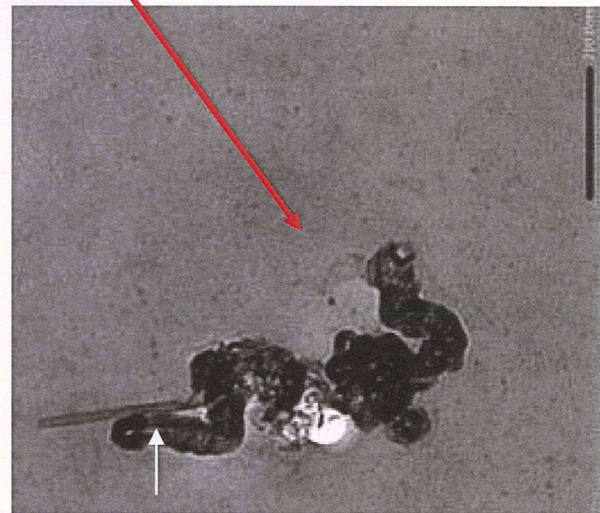
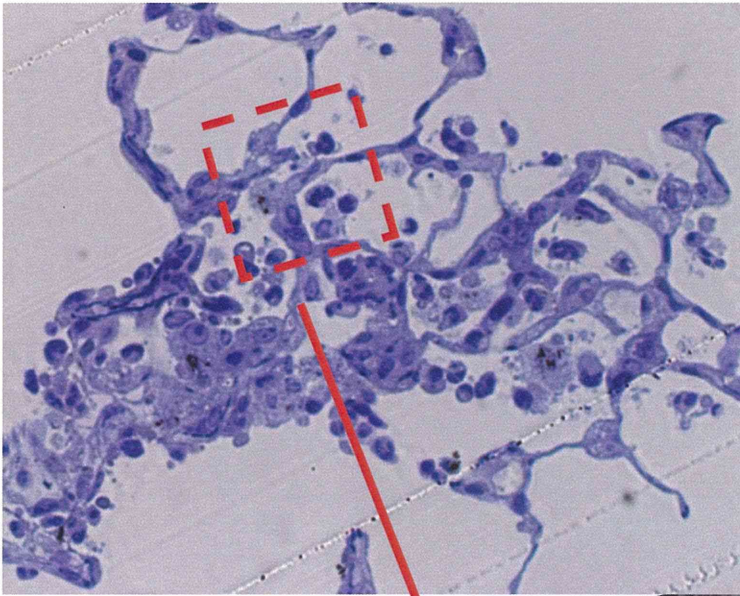


図 8 マクロファージに食食された T-CNT の電顕像  
T-CNT 10 $\mu$ g 投与後 1 日の肺





赤破線で示した枠内を TEM で観察。  
肺胞マクロファージに食食された T-CNT  
(赤色矢印) が認められた。

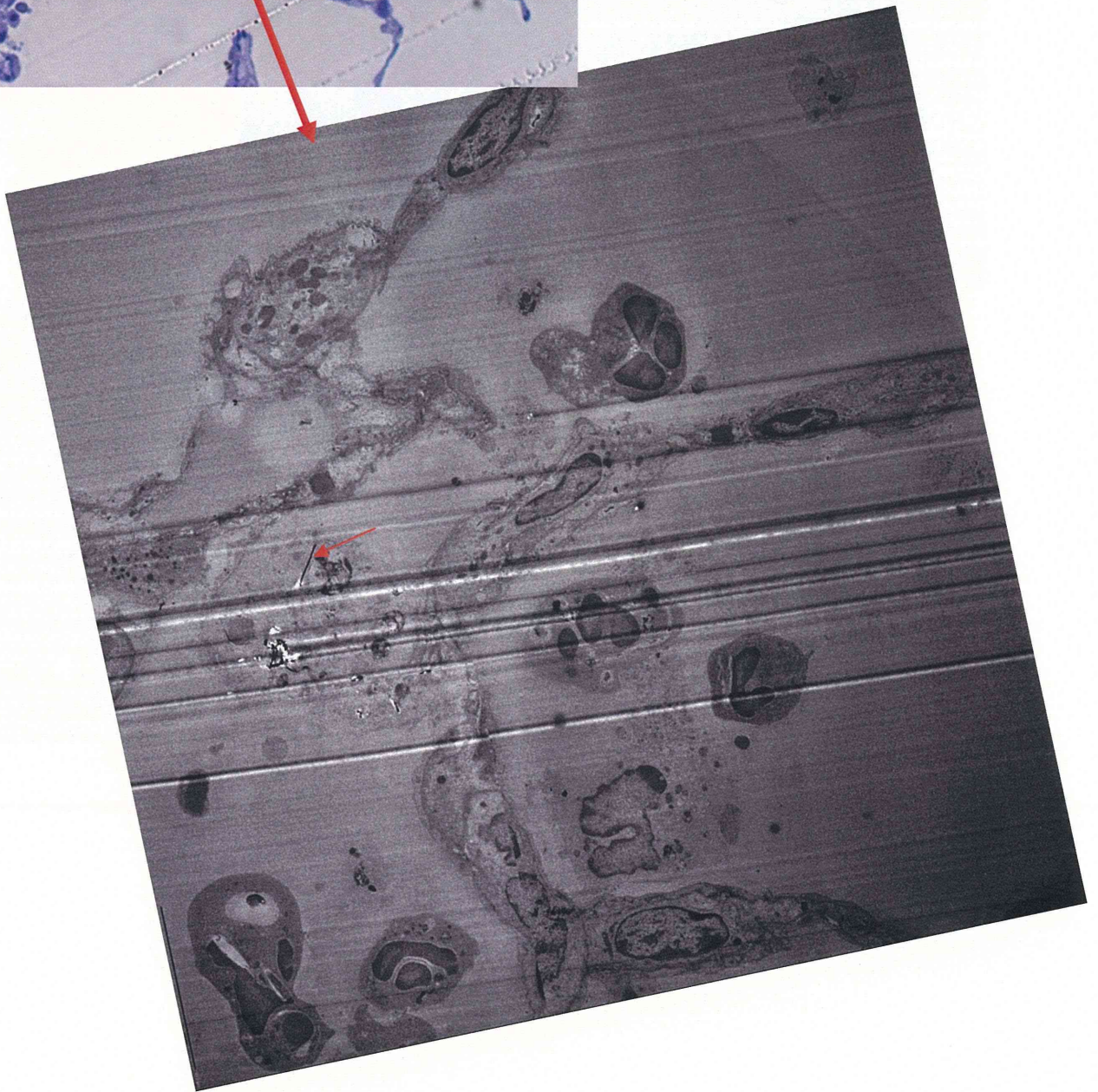
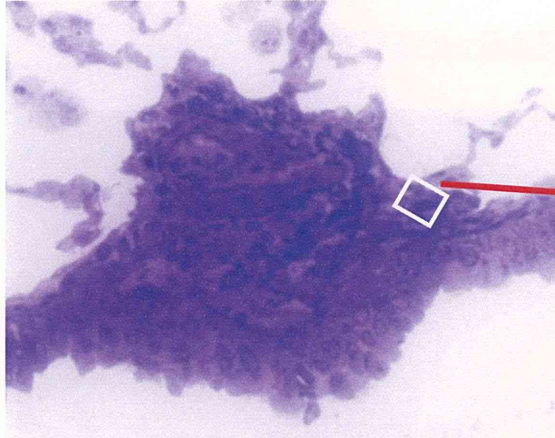
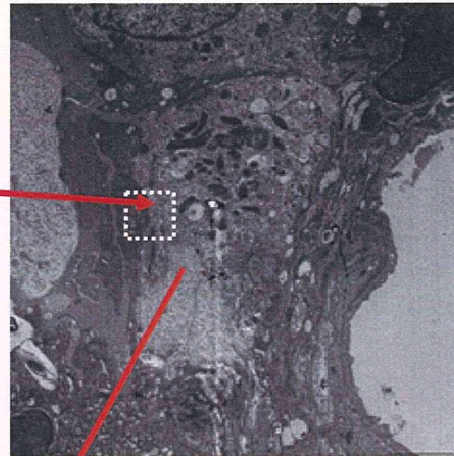


図9 肺胞腔内：T-CNT 食食マクロファージの集簇箇所の電顕像  
T-CNT 10 $\mu$ g 投与後 1 日の肺

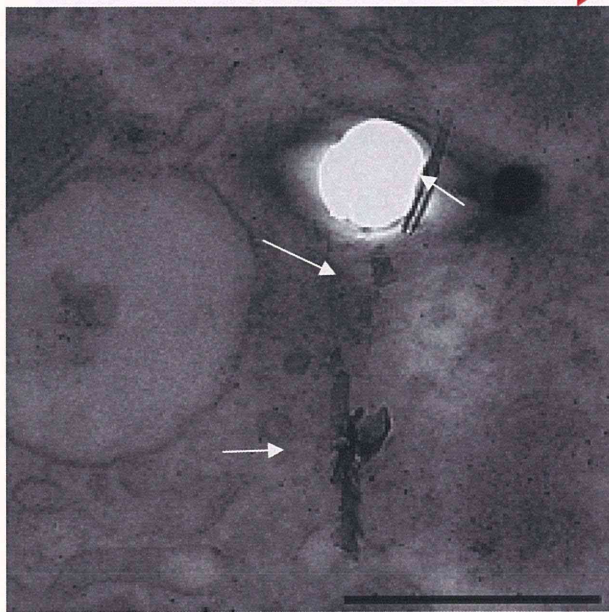




セミン標本（トルイジンブルー染色）  
光学顕微鏡で透過型電顕による検索部位を選  
（白枠で囲んだ部分）



透過型電子顕微鏡による観察像  
マクロファージの細胞質内に T-CNT が存在（白  
点線で囲んだ部分）



右上の観察部位を拡大して観察。  
T-CNTは外径 27.4 nm、内径 11.8nm  
の中空構造を持つ MWCNT であるこ  
とが確認された。

白色矢印：T-CNT、  
（3本の赤色矢印で示したT-CNTは  
連続していると思われる）  
Bar: 500nm

図 10 細気管支の電顕像  
T-CNT 10 $\mu$ g 投与後 3 日の肺



結果：C-2 肺組織内侵入後の T-CNT の遠隔臓器への移行調査

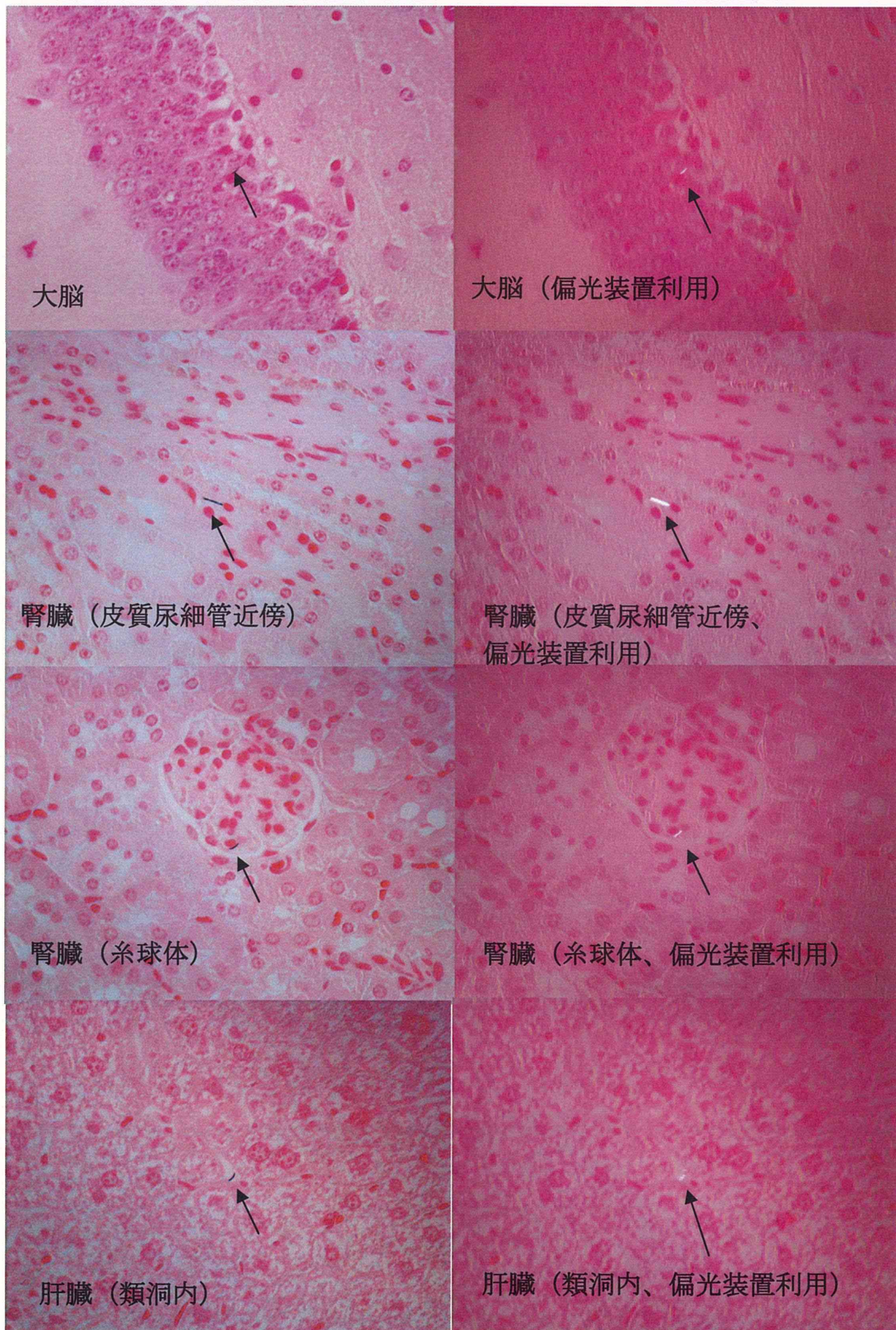
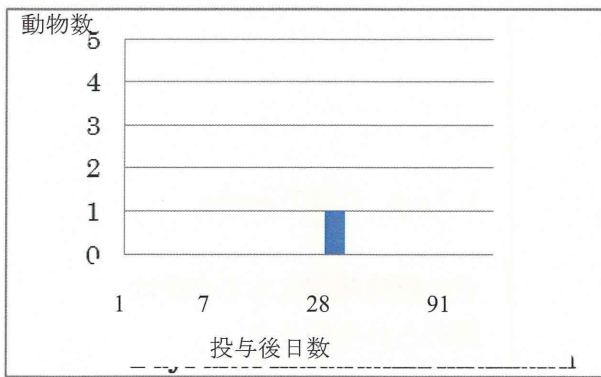


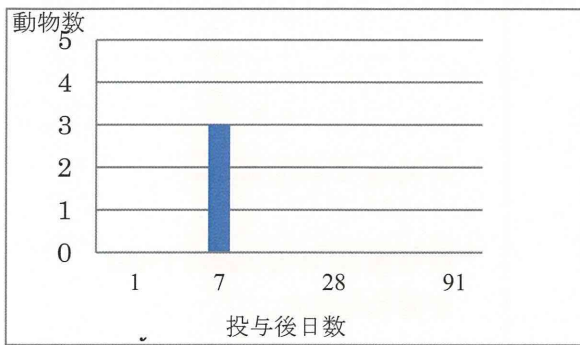
図 11 T-CNT10 $\mu$ g 気管内投与後 91 日のマウスの脳、腎臓及び肝臓で認められた T-CNT





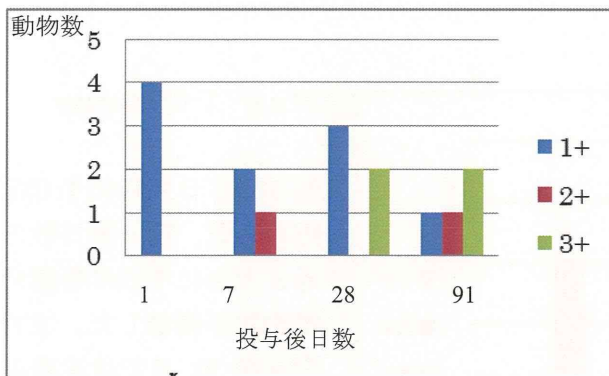
1.1  $\mu$ g T-CNT /mouse

投与後 28 日に 1 匹に T-CNT が認められた。



3.3  $\mu$ g T-CNT /mouse

投与後 7 日に 1 匹に T-CNT が認められた。

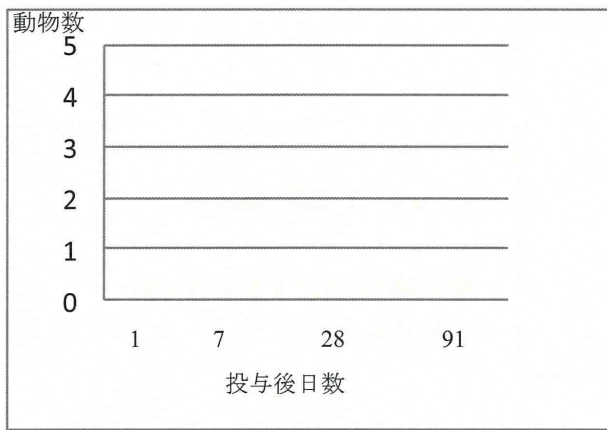


10  $\mu$ g T-CNT/mouse

投与後 1 日から T-CNT が認められ、投与後日数の経過とともに沈着のグレードが増加した。

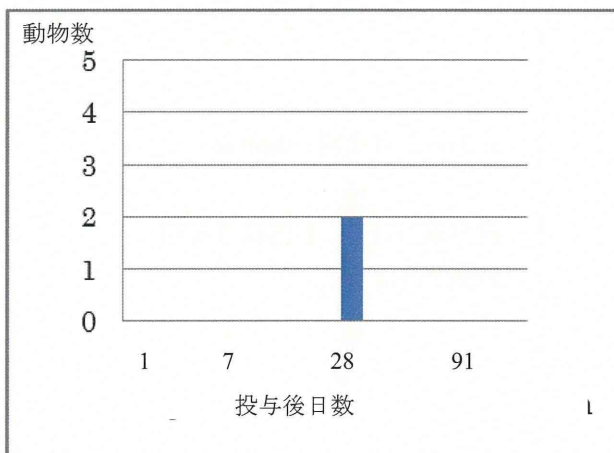
図 12 肺関連リンパ節への T-CNT の移行

1+: 1-10 Spots of T-CNT  
 2+: 11-20 Spots of T-CNT  
 3+: 21-50 Spots of T-CNT



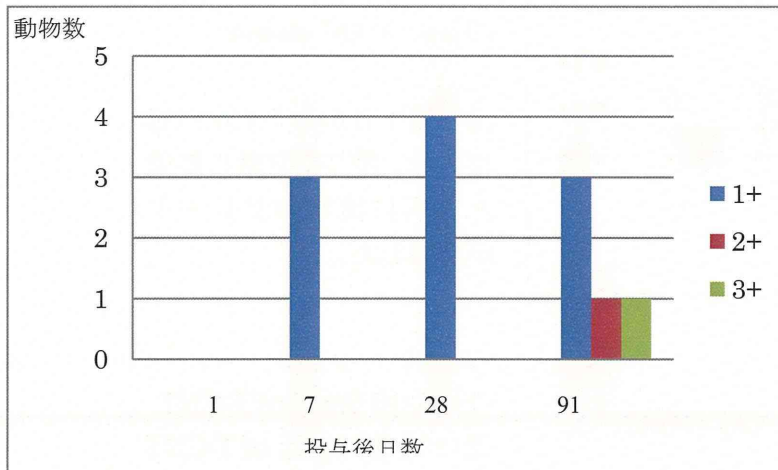
1.1  $\mu$ g T-CNT/mouse

どの観察時期にも T-CNT は認められなかった。



3.3  $\mu$ g T-CNT/mouse

投与後 28 日で 2 匹に T-CNT が認められた。



10  $\mu$ g T-CNT/mouse

投与後 7 日以降に T-CNT が認められ、投与後日数の経過とともに T-CNT を認めた動物数が増加した。また、投与後 91 日では沈着のグレードが増加した。

1+: 1-10 Spots of T-CNT

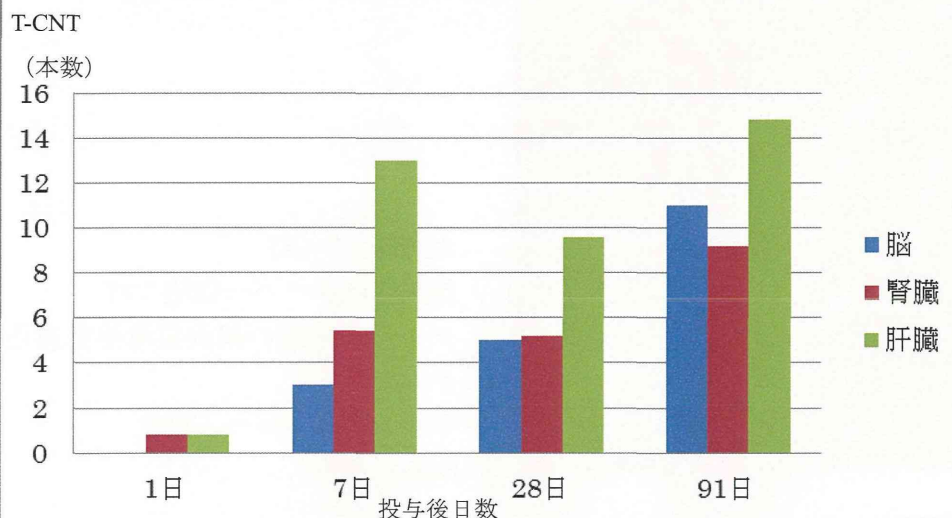
2+: 11-20 Spots of T-CNT

3+: 21-50 Spots of T-CNT

図 13 脾臓への T-CNT の移行

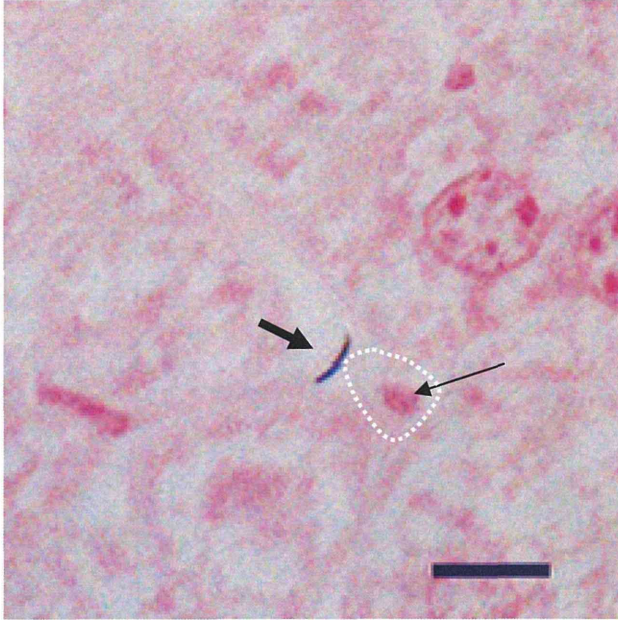


## 気管内投与後に脳、腎臓、肝臓で認められたT-CNT数の経時的推移



		T-CNT 数			
投与後日数		1日	7日	28日	91日
脳	平均値	0	3	5	11
	標準偏差	0	1	3	8
腎臓	平均値	0.8	5.4	5.2	9.2
	標準偏差	0.84	3.21	2.17	4.97
肝臓	平均値	0.8	13	9.6	14.8
	標準偏差	0.84	8.06	7.02	10.57

図 14 気管内投与後に脳、腎臓、肝臓で認められた T-CNT 数の経時的推移



太矢印：T-CNT  
細矢印：クーパー細胞の核  
クーパー細胞の細胞質境界を白色点線で示した。  
ケルンエヒトロート染色  
Ber：10 $\mu$ m

図 15 肝臓での T-CNT の沈着状況  
T-CNT 10 $\mu$ g 気管内投与後 91 日  
(図 11 の最下段左列の写真を拡大)



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

本年度該当なし。



## IV. 研究成果の刊行物・別刷

本年度該当なし。



V. 班會議資料  
(2013年10月18日開催)

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究  
全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究

# ナノマテリアル吸入暴露による 肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変)

香川大学医学部腫瘍病理学 今井田 克己

2013.10.18

## はじめに

- 香川大学は分担研究として、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNTの気管内投与による慢性毒性や肺病変の検討を行う。
- 気管内投与実験(52w)による肺での炎症性腫瘍性病変の発生についても検討を行う。
- 昨年度の分担研究者からの報告から、低用量での検討を新たに行っている。



## 1. MWCNTの気管内投与による慢性毒性の検討

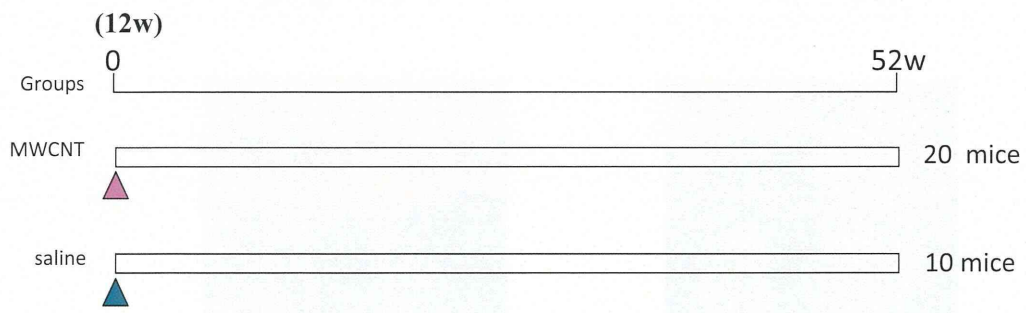
- C57BL6/Jマウスへの単回気管内投与実験 (52週間)
- F344ラットへの単回気管内投与実験 (52週間)

## 2. 低用量 MWCNT の気管内投与による慢性毒性の検討

- C57BL6/Jマウスへ低用量濃度 (0.4 $\mu$ g/mouse, 2.0 $\mu$ g/mouse, 10.0 $\mu$ g/mouse) による単回気管内投与実験 (52週間)

雄性C57BL6/J マウスにおける  
MWCNT単回気管内投与実験(52w)

2012.06.06.~ 2013.05.30.



Animals: C57BL6/J male mouse, 12-week-old

▲ : MWCNT, 10 $\mu$ g/0.02ml 0.1% Tween 80/mouse, i.t.

▲ : 0.02ml 0.1% Tween 80

**Total 30 rats**

Experimental design:

雄性 C57BL6/J マウスにおける MWCNT 気管内投与実験

### MWCNT-Taq (10 $\mu$ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

