

まとめ

1. マウス肺の遺伝子発現に及ぼすMWCNT吸入曝露の影響を分子レベルで明らかにするため、マイクロアレイ解析を実施し、変動する遺伝子を同定した。
2. IPA解析から免疫系の遺伝発現増加が抽出された。
3. 変動遺伝子中にCircadian rhythm関連遺伝子が含まれていた。この変動は、脂質代謝と関連している可能性が示唆された。
4. 今後、Taquann法処理MWCNTを吸入曝露させ、経時的にマイクロアレイ解析を実施し、肺病変発生と対比させ詳細に検討する予定である。

強制経気道投与方法を用いた 粒子状物質の呼吸器への 生体影響に関する研究

相磯成敏

(日本バイオアッセイ研究センター)

研究の背景

MWCNT原末……様々なサイズの繊維が混在



実際の呼吸による暴露では、**分散した少量のMWCNT**だけが肺胞に到達

⇒ **肺胞内のMWCNT濃度はかなり低いと予想**



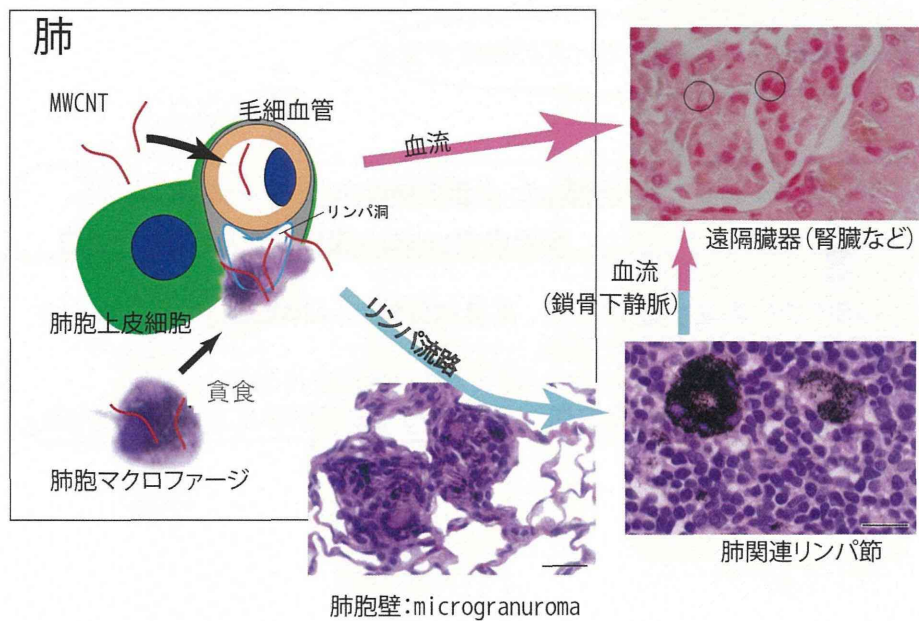
- ヒトの肺胞内に到達する大きさで、**高度に分散したMWCNT(MWCNT-Taq)**を本研究班共通の検体として使用。
- MWCNTの動物実験結果をヒトに外挿、リスク評価を行うには、**低濃度域でのMWCNTの毒性発現のプロファイル**を明確にする必要がある。

2) 研究の目的

- I. 気管内投与したMWCNT-Taqの肺組織内に侵入する経路の解明:
 - 高度に分散したMWCNT-Taqが、どのようにして肺胞から肺組織内に侵入するのか、その侵入経路を明らかにする。
- II. MWCNT-Taqの全身諸臓器への移行について調査:
 - MWCNTは生体内で安定であると考えられており、肺組織に侵入したMWCNTの体内移行による生体影響が懸念されることから、MWCNT-Taqの全身諸臓器への移行について調査を行う。

肺内に注入したMWCNTの推定移行経路

(平成20-22年度厚労科研補助金 化学物質リスク研究事業、
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(福島班))



3) 研究方法

- I. 気管内投与したMWCNT-Taqの肺組織内に侵入する経路の解明
- II. MWCNT-Taqの全身諸臓器への移行について調査

I 気管内投与したMWCNT-Taqの肺組織内に侵入する経路の解明:

- MWCNT-Taq 10 μ g/匹をC57BL/6Jマウスに気管内投与、投与後1日と3日後に肺を採取・固定(平成24年度実施)。
- 昨年度、採取・保存した肺組織からTEM試料を作製して、MWCNT-Taqの肺組織内への侵入をTEMで観察(本年度)。

1. 試験デザイン



*: 生後13週齢のC57BL/6Jマウスにイソフルランの吸入による麻酔下、MWCNT-Taq懸濁液0.03mlを気管内に単回投与。

2. 飼育環境

温度: $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度: $55 \pm 15\%$

明暗サイクル: 12時間点灯(8:00~20:00)/12時間消灯(20:00~8:00)

換気回数: 15~17回/時、動物の収容方法: 個別飼育

飼料: CRF-1固型(30kGy- γ 線照射滅菌飼料、オリエンタル酵母工業(株))を自由摂取

飲水: 市水(フィルターろ過、紫外線照射)を、自動給水ノズルで自由摂取

3. 肺の採取保存と固定

- ① ネンブタールi.p.麻酔下、腹大動脈から放血死させて開胸。
- ② 甲状腺の下端で気管を切断、直ちに固定液を高さ20cmの落下圧で気管の断端から肺内に注入。
- ③ 固定液の注入は、肺が胸郭内で生理的に拡張した状態で固定できるように目視で確認しながら慎重に実施。
- ④ 肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケーター内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日。



真空デシケーター

固定液: 2%パラホルムアルデヒド溶液
+ グルタルアルデヒドを0.5%添加
Buffer: インスタント磷酸緩衝液4
(三菱メディエンス(株)、1/15 mol/L、pH 7.2)

4. 試料のリンス~エポキシ樹脂包埋

- リンス
採材・固定の翌日に3%ショ糖添加リン酸緩衝液に交換(昼、夕)、振盪
1週間液交換(毎日1回)、 4°C
- 保存、切り出し
 4°C で3ヶ月保存の後、切り出し
- 後固定、エポキシ樹脂包埋
1%オスミウム酸で90分後固定後、脱水、エポキシ樹脂包埋

5. セミシン標本の作製

- エポキシ樹脂包埋ブロックのトリミング
- セミシン切片の薄切(左肺全体を厚さ $2\mu\text{m}$ で薄切)
- トルイジンブルーで染色

6. 光学顕微鏡によるTEM検索で目的とする視野の選定

7. セミシン切片から目的とする視野の切り出し(スライド硝子から剥がす)
8. 剥がした試料に台座(エポキシ樹脂)の取り付け
9. 超薄切切片を作製、メッシュに貼付
10. TEMで検索(今回は未染色で観察)

セミン切片の作製

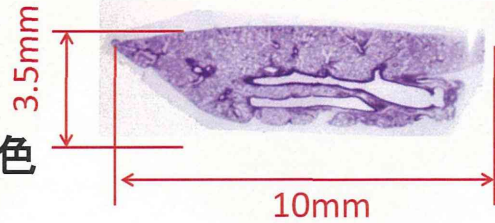
ブロックのトリミング



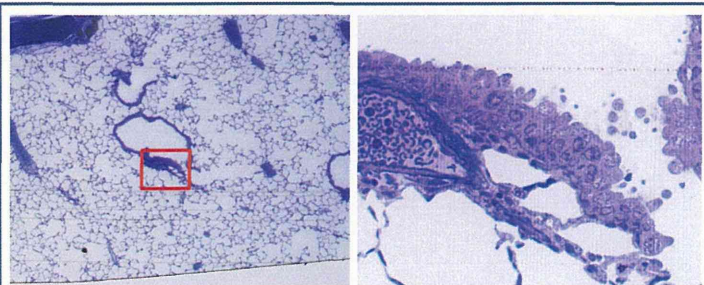
ダイヤモンドナイフ(Nanotome Thick)で
左肺の全割組織のセミン切片を切削
(厚さ2 μ m)



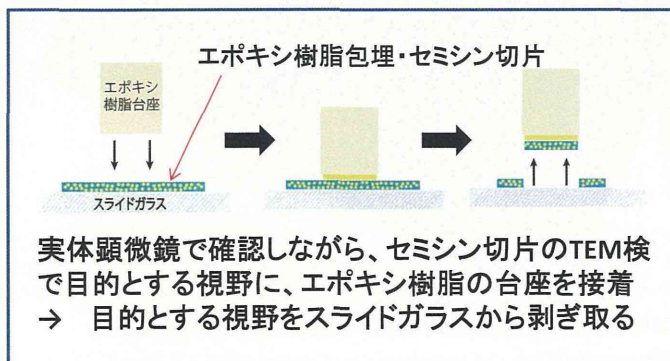
トルイジンブルー(0.5%)で染色



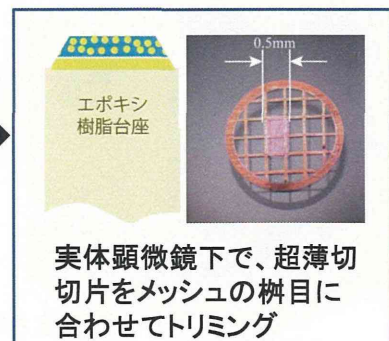
セミン切片からの切り出しと超薄切



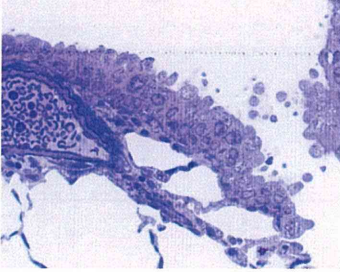
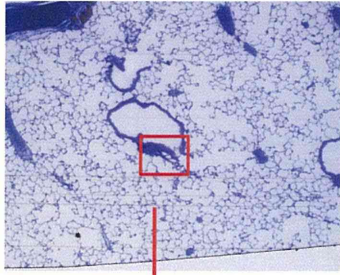
セミン切片から、電顕で詳細に検索する部位を選定(例えば赤枠内)



試料完成
超薄切切片を
メッシュに貼付

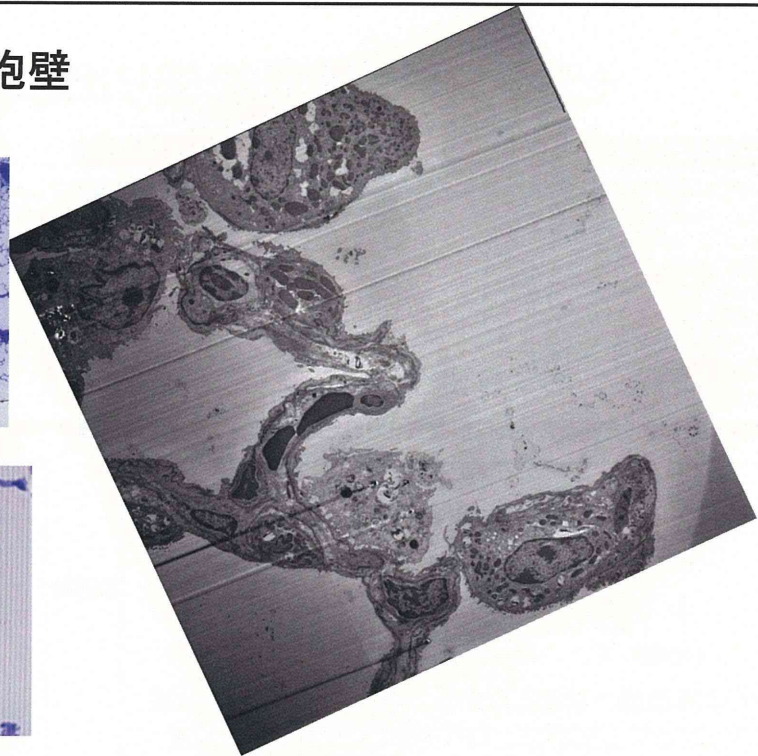
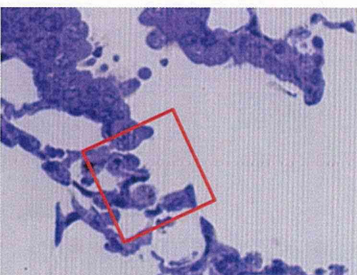
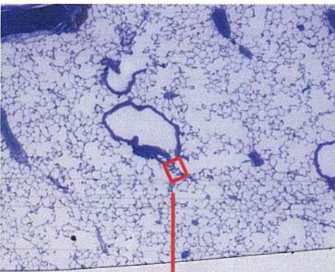


気道終末部



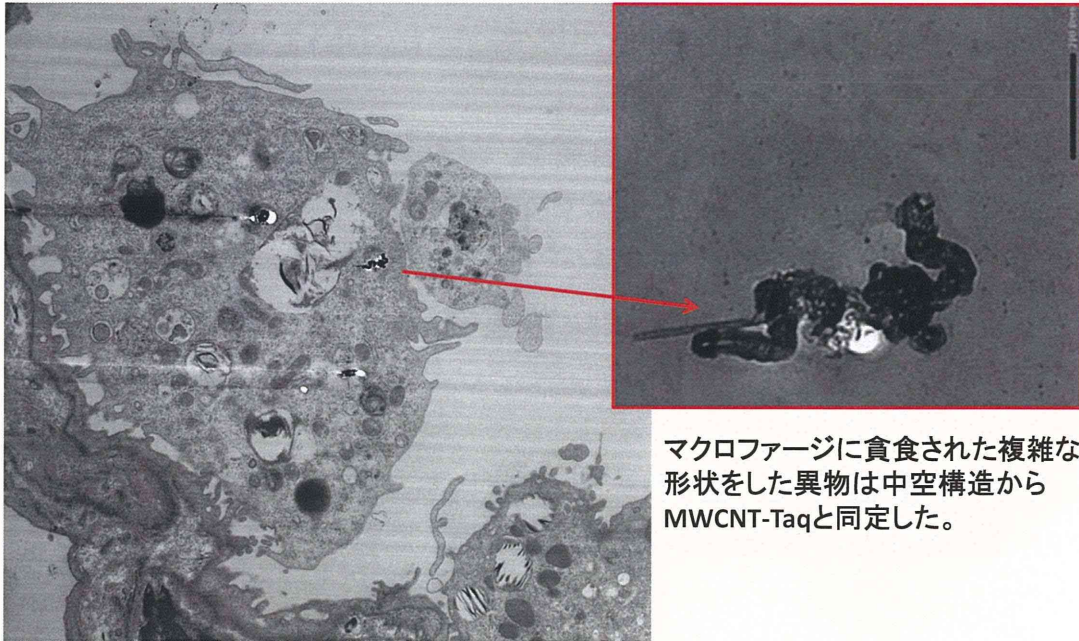
肺組織内に侵入したMWCNT-Taqは認められなかった。

気道終末部と肺胞壁



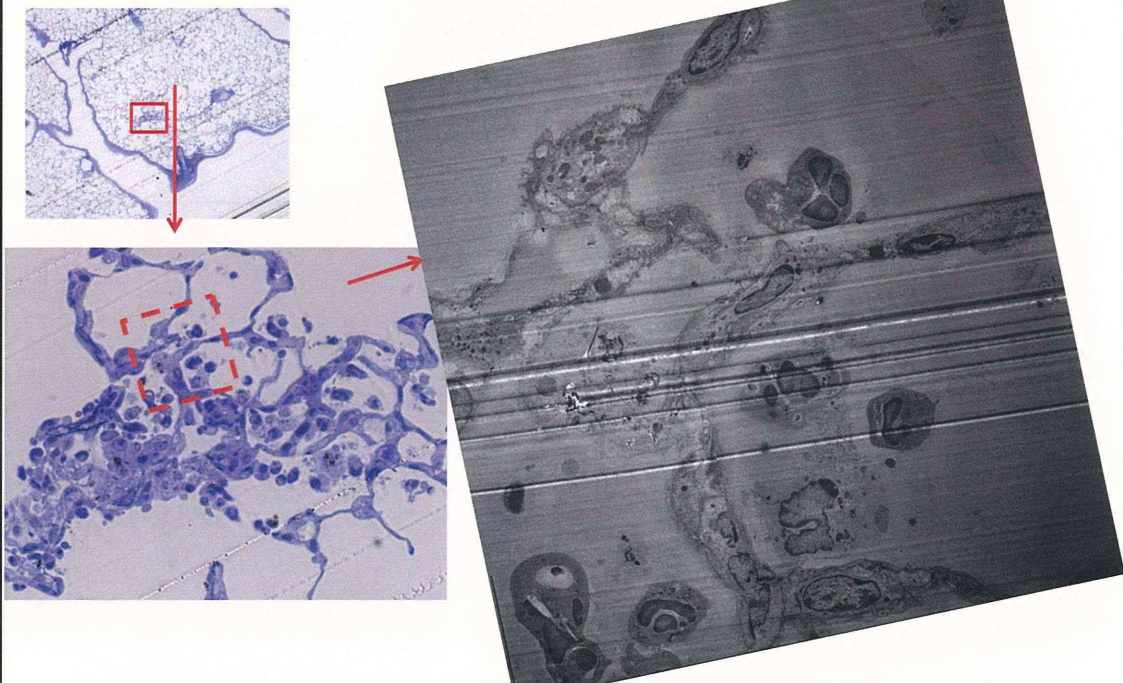
マクロファージに貪食されたMWCNT-Taqは認められるが、肺組織内に侵入したMWCNT-Taqは認められなかった。

マクロファージに貪食されたMWCNT-Taq



マクロファージに貪食された複雑な形状をした異物は中空構造からMWCNT-Taqと同定した。

好中球とMWCNT-Taq貪食マクロファージの集簇部



肺組織内に侵入したMWCNT-Taqは認められなかった。

透過型電顕による検索結果

- 気管内投与後1日では、3匹中2匹について検索を終え、以下の所見を得ている。
 - 肺胞腔内にMWCNT-Taq貪食マクロファージを認める。
 - 肺胞壁内には、MWCNT-Taq貪食マクロファージも、貪食されていないMWCNT-Taqも確認されていない。
 - 血管腔内は、MWCNT-Taq貪食マクロファージも、貪食されていないMWCNT-Taqも確認されていない。
-
- 今年度後半で、気管内投与後1日に採材した残り1匹と、投与後2日に採材した個体について検索を進める。

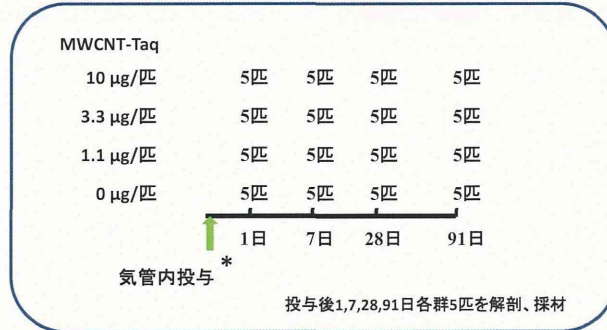
3) 研究方法

- I. 気管内投与したMWCNT-Taqの肺組織内に侵入する経路の解明
- II. MWCNT-Taqの全身諸臓器への移行について調査

II MWCNT-Taqの全身諸臓器への移行について調査:

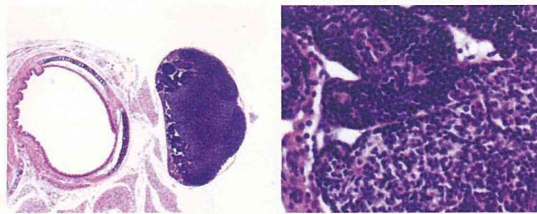
- MWCNT-Taqを雄性C57BL/6Jマウスに気管内投与した亜急性毒性試験(平成23年度実施)のサンプルを利用して、肺関連リンパ節、脾臓、胸腺、肝臓、腎臓、脳へのMWCNT-Taqの移行を検索した。

1. 試験デザイン

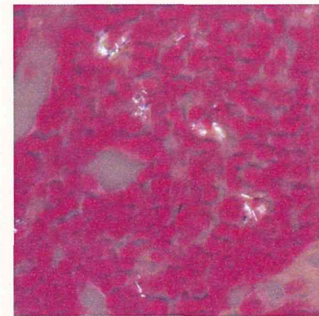


*: 生後12週齢のC57BL/6Jマウスにインフルランの吸入による麻酔下、MWCNT-Taq懸濁液0.03mlを気管内に単回投与。

組織標本中のMWCNT-Taqの検出



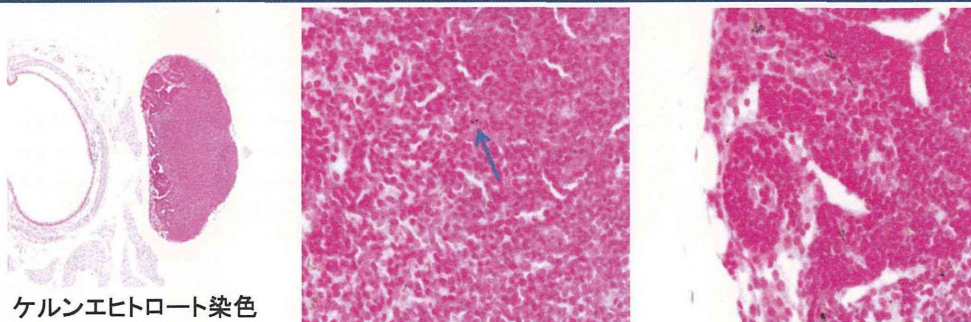
肺関連リンパ節(気管に隣接したリンパ節を検索)



黒色のMWCNT-Taqは、ヘマトキシリンで紫色に染まった組織と判別が困難

MWCNT-Taqの検出

- 偏光装置付顕微鏡 → 光輝性
- ケルンエヒトロート染色 → コントラスト
- 形態 → 黒色繊維状



ケルンエヒトロート染色