

MWCNT は先行研究と同様に良好な分散検体が得られた。注意点として、良好な分散状態エアロゾルを得るために、吸湿していない TB を用いる必要がある。TB は吸湿性が高く、開封後長時間経った TB を用いた場合に良好な分散状態のエアロゾルが得られなかった。同様の理由で、カートリッジに充填した検体懸濁液を液体窒素で凍結後にデシケーターに格納する際には、カートリッジに霜が付着することを防止するため、予めデシケーター内の空気を窒素で置換してから移動を行った。

(2) 酸化チタン

酸化チタンは、超音波処理により容易に TB に分散した。肉眼的観察では Taquann 処理した検体の原末に比較して嵩高く、走査型顕微鏡像では原末に比較して微細な粒子が多数観察された (図 5)。

C-2. マウスの全身暴露吸入実験

(1) MWCNT

5 回の吸入暴露の平均質量濃度は、低用量群 $1.42 \pm 0.3 \text{ mg/m}^3$ 、高用量群 $3.1 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$ であり、目標濃度に対して低用量群、高用量群共に約 1.5 倍の値であった。CPC の値は低用量群 $798 \pm 92 \text{ 個/mL}$ 、高用量群 $1,815 \pm 172 \text{ 個/mL}$ であった (図 6)。

(2) 酸化チタン

酸化チタンの質量濃度は、 $2.3 \sim 3.3 \text{ mg/m}^3$ 、CPC の値は $1.1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5 \text{ 個/mL}$ 、MMAD は $648 \sim 761 \text{ nm}$ であった (図 7)。走査型顕微鏡観察によるエアロゾルの粒子径は $1 \mu\text{m}$ 程度であった (図 8)。酸化チタンを吸入させたマウスの肺では、肺胞レベルに酸化チタンの粒子が到達していることを確認した (図 9)。

C-3. 肺内のMWCNT沈着量測定

先行研究により Taquann 処理した MWCNT は有効数字一桁の精度で $3 \times 10^6 \text{ 本}/\mu\text{g}$ の繊維数、

平均長 $8 \mu\text{m}$ であることを明らかにしている。1 日 2 時間、週 1 回を 5 回反復した際の平均暴露濃度は 2.5 mg/m^3 であった。MWCNT の肺沈着量は、暴露終了直後では $4.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=3) であった。暴露後 13 週では $1.7 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=3)、26 週では $1.3 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=3)、52 週では $1.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ (N=1) であった。52 週の値を漸近線として計算すると、半減期は約 13 週であった。肺に沈着した繊維長の分布は暴露直後から 52 週後まで変化が見られなかった (図 10)。

D. 考察及び結論

以上のように、H26 年度は、①野生型マウスを用いた Taquann 直噴システムによる MWCNT (MWNT-7、三井物産) と酸化チタンの吸入実験、②先行研究 [H23-化学一般-005] において MWCNT を暴露した p53^{+/-}マウスの肺組織沈着量の測定を実施した。

MWCNT の吸入実験では、目標濃度に対して、実際の暴露濃度が 1.5 倍程度高い値を示した。この原因は、吸入試験中の濃度をモニターしている CPC が、実際の値よりも低値で推移したことが原因と考えられる。本研究で使用している CPC (Model3776, TSI) は対応濃度 $3 \times 10^5 \text{ 個/mL}$ であるため、MWCNT の吸入暴露実験における濃度 ($2 \times 10^3 \text{ 個/mL}$) では十分に対応できる性能である。しかしながら MWCNT は繊維状であるため、CPC が粒子を検出するセル内で粒子が重なり粒子数が過小評価される可能性が考えられる。CPC の前段に希釈装置を接続することにより、その影響が抑制されることを確認しており、今後の改良を検討中である。

酸化チタンの吸入実験では、比較的容易に Taquann 法を適応することが可能であった。本研究で得られた酸化チタンの MMAD (761 nm) は、酸化チタン専用に設計と工夫がされ

た装置による実験で報告されている値と同様である⁴⁻⁶⁾。走査型顕微鏡観察によるエアロゾルの粒子径は1 μm 程度のものが多数観察され、その多くが二次粒子としてエアロゾル化しているものと考えられた。実際に吸入暴露を行ったマウスの肺に酸化チタン粒子が肺胞レベルに到達していることが確認できた。本研究では2 mg/m³を目標濃度としたが、その際のCPC値は約1×10⁵個/mLであり、CPCの対応濃度3×10⁵個/mLに近い値であることから、安定した濃度測定のためにはCPCの前段に希釈機を設置することが必要と考えられた。

MWCNTの肺負荷量測定において、暴露の終了直後では4.2 μg/動物、吸入後52週では約1 μg/動物が残存していた。この値を漸近線として計算すると、半減期が約13週であった。肺に沈着した繊維長の分布は吸入直後から52週後まで変化が見られなかったことから、肺からの除去に際してMWCNTの長さによる選択が認められないという結果となった。胸腔内へ移行したMWCNTの長さの分布については、今後の検討が必要である。

本研究で開発したTaquan法及びTaquan直噴全身暴露吸入システムは、吸入試験に必要な検体量が少ないことから、量産化に至る前の新規ナノマテリアルについての吸入試験の実施が可能である。MWCNTを例にすると、低用量群(1 mg/m³)、高用量群(2 mg/m³)の構成で各群48匹に10時間の吸入試験を行うために必要なTaquan処理検体量は約300 mgである(Taquan法の収率が5%であるためMWCNT原末としては6 g必要)。この条件で、高用量群では肺に4μg/動物の負荷がなされる。

本研究では順次、複数種のナノマテリアルの吸入試験を実施し、効率的にナノマテリアルの毒性評価を進めるとともに、総合的手順

を整え、その普及を目指す。複数の毒性評価施設への導入が促進されれば、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

今後、検体を暴露したマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにし、病変との関係を明らかにする計画である。

謝辞：

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、相原妃佐子氏に深く感謝する。

【引用文献】

- 1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38 (4) :619-28.
- 2) Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. , Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33 (1) :105-16.
- 3) Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats., *J Toxicol Sci.* 2009 Feb;34 (1) :65-76.
- 4) Rossi EM, Pykkänen L, Koivisto AJ, Nykäsenoja H, Wolff H, Savolainen K, Alenius H., Inhalation exposure to nanosized and fine TiO₂ particles inhibits features of allergic asthma

in a murine model., Part Fibre Toxicol. 2010 Nov 25;7:35.

5) Baisch BL, Corson NM, Wade-Mercer P, Gelein R, Kennell AJ, Oberdörster G, Elder A, Equivalent titanium dioxide nanoparticle deposition by intratracheal instillation and whole body inhalation: the effect of dose rate on acute respiratory tract inflammation, Part Fibre Toxicol. 2014 Jan 24;11:5.

6) Landsiedel R, Ma-Hock L, Hofmann T, Wiemann M, Strauss V, Treumann S, Wohlleben W, Gröters S, Wiench K, van Ravenzwaay B, Application of short-term inhalation studies to assess the inhalation toxicity of nanomaterials, Part Fibre Toxicol. 2014 Apr 4;11:16.

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, “Taquann” whole body inhalation system for small scale in vivo, toxicity studies to speed up categorization, OECD Nano Categorisation WS (2014.9, Washington D.C)

菅野 純、全身暴露吸入を基軸としたナノ材料の毒性評価体系の構築と MWCNT からの知見、日本学術会議トキシコロジー分科会主催シンポジウム、2014年9月、東京

Jun Kanno、Assessment of chronic inhalation toxicity: “Taquann” system for nanomaterials, The Third Workshop on the Risk Management of Engineered Nanomaterials (2014,8,Tsukuba)

菅野 純、高橋 祐次、高木 篤也、広瀬 明彦、今井田 克己、津田 洋幸、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて、第 41 回 日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸、シンポジウム

高橋 祐次、小川 幸男、高木 篤也、辻 昌貴、森田 紘一、岸 宗佑、今井田 克己、菅野 純、多層カーボンナノチューブの p53+/-マウス全身暴露吸入による肺及び胸膜病変、第 41 回 日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸、一般口演

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Mesotheliomagenesis of micrometer-sized MWCNT: findings from intraperitoneal injection and whole body inhalation studies of highly dispersed “Taquann” treated MWCNT, NanoTOX2014 (2014, 4, Antalya)

G. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得

特許出願: 柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入暴露試験装置」、特願 2012-148848 (2012.7.2)

特許出願: 菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343 (2012.7.17)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

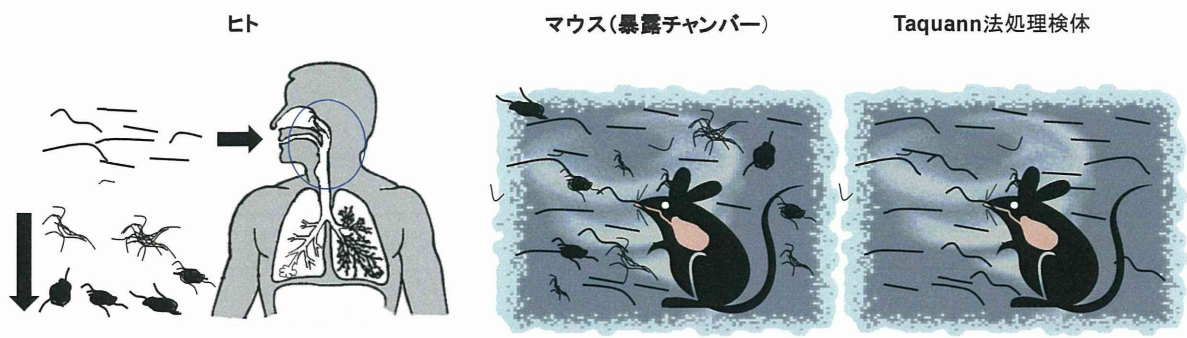


図1 ナノマテリアルのヒトとマウスの暴露状態の比較

ナノマテリアルのヒトの現実の暴露経路のひとつは吸入であり、ヒトへの外挿性の高い動物実験の実施には分散性の高い検体が必要である。ヒトの作業環境では、凝集体・凝固体は比較的速やかに落下する。また、凝集体・凝固体が吸入されたとしても、上気道部で効果的に除去されるため、肺胞に到達するのは、高度に分散された単一繊維と考えられる。一方、マウスの吸入暴露実験においては、ダスト発生装置で発生させたエアロゾルはキャリアエアに混合して暴露チャンバーに送り込まれ、凝集体・凝固体は単離繊維と共に常時攪拌された状態にある。また、上気道部はヒトに比較して短く細いため、凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉され、それよりも末梢の肺胞レベルへの単一繊維の吸入を阻害する可能性がある。Taquann 法処理検体は凝集体・凝固体が除去されているため、実験動物においてもヒトと同様に単離繊維を肺胞レベルに到達させることが可能である。

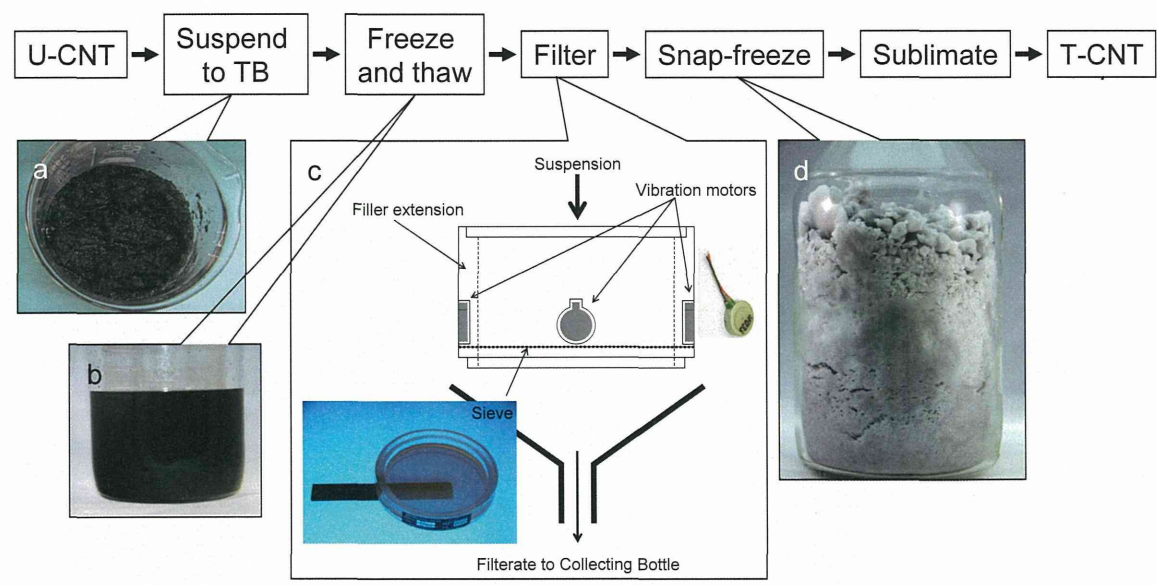


図2 Taquann 法の概要

(a) MWCNT 原末 (U-CNT) を三級ブタノール (TB) に混合して氷冷して TB をシャーベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混和する。(b) -25°C で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター (セイシン企業、目開き $25\ \mu\text{m}$) で濾過し大型の凝集体を除く。濾過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量: $17.6\ \text{m/s}^2$) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶解回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表1 MWCNT 暴露 群構成

群	目標濃度 mg/m ³	暴露時間 h/day	暴露回数	動物数	解剖時期		
					1M	6M	12M
Control	0		1回/週	16	5	5	6
Low Dose	1	2	×	16	5	5	6
High Dose	2		5週間	16	5	5	6

表2 酸化チタン暴露 群構成

群	目標濃度 mg/m ³	暴露時 間 h/day	暴露回 数	動物数	解剖時期			
					D0	D3	D7	
Control	0	2	単回	12	病理	3	3	4
					組織沈着量	2	0	0
TiO ₂	2			12	病理	3	3	4
					組織沈着量	2	0	0

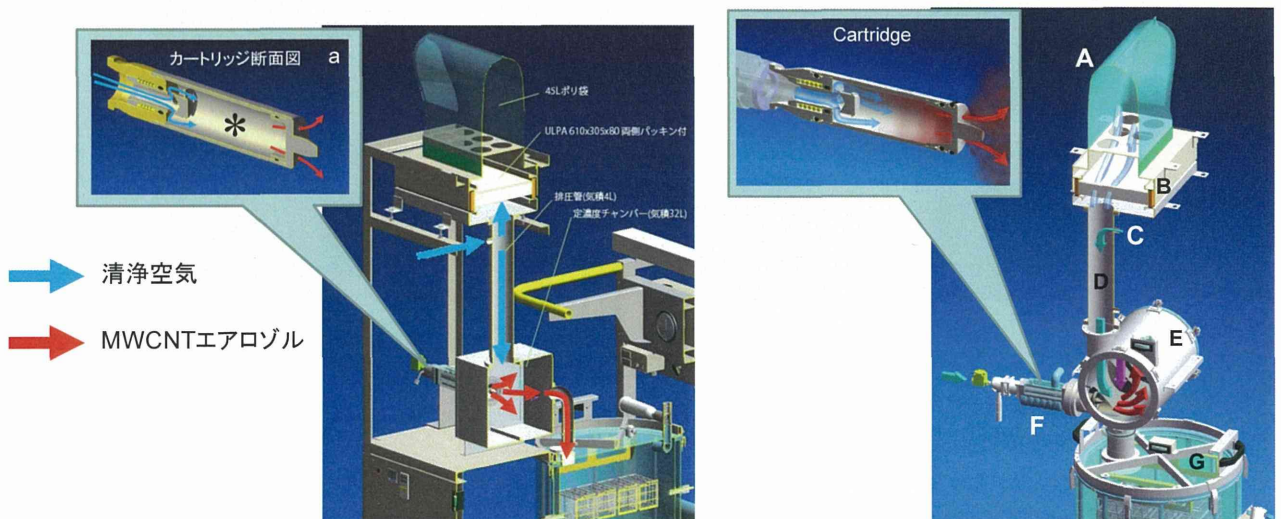


図3 Taquann 直噴全身暴露吸入装置の模式図

左図 Ver2.0、右図 Ver2.5。噴射装置は、サブチャンバーに接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーに煙突を設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターを接続した。煙突部分の上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体はサブチャンバー内で気相に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。

真空デシケーター内で肺を脱気
窒素ガス雰囲気中で密栓する

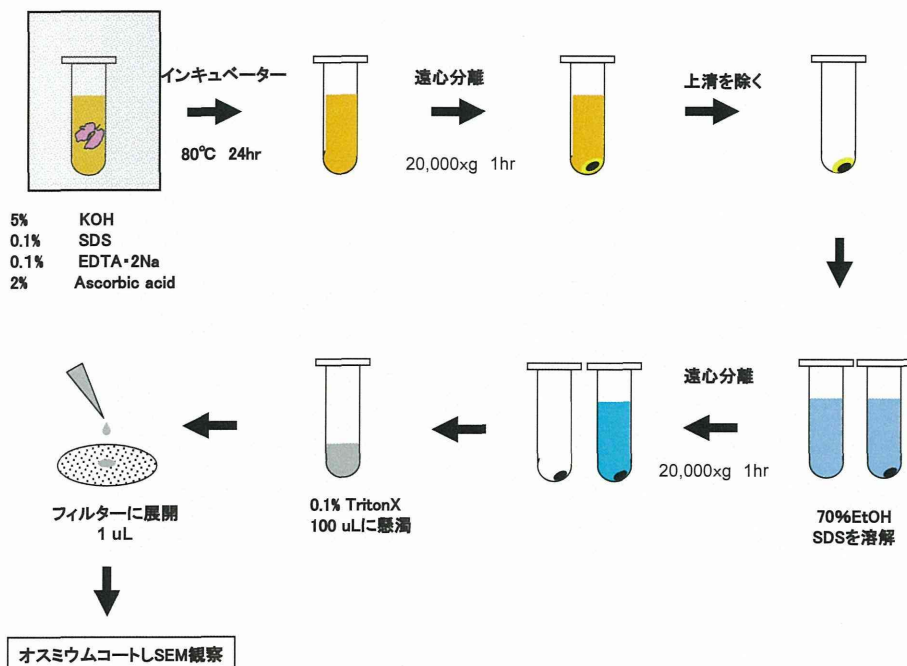


図4 肺からのMWCNT抽出方法の概略図

肺サンプル（約 200 mg）をマイクロチューブ（2 mL）に入れ、80°Cに加熱した肺溶解液（5w/v% 水酸化カリウム、0.1w/v% SDS、0.1 w/v% EDTA・2Na、2w/v%アスコルビン酸ナトリウム）を加える。真空デシケーター内で肺を脱気し、窒素ガス雰囲気中で密栓する。80°Cに設定したインキュベーター内で24時間以上静置して肺を溶解する。高速微量冷却遠心機で25°C、20,000×g、60分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収する。1.5 mLの70%エタノールを添加し、ボルテックスを用いて溶解し、再び20,000×g、25°C、60分の条件で遠心分離し上清を除去しMWCNTのみを回収した。0.1w/v% TritonX 100 μLを添加しMWCNTの懸濁液を得る。懸濁液1 μLを分取し、アルミナ製フィルターに展開し、オスミウムコートして走査型顕微鏡で観察した。

A



Bulk TiO₂

Taquann TiO₂

B

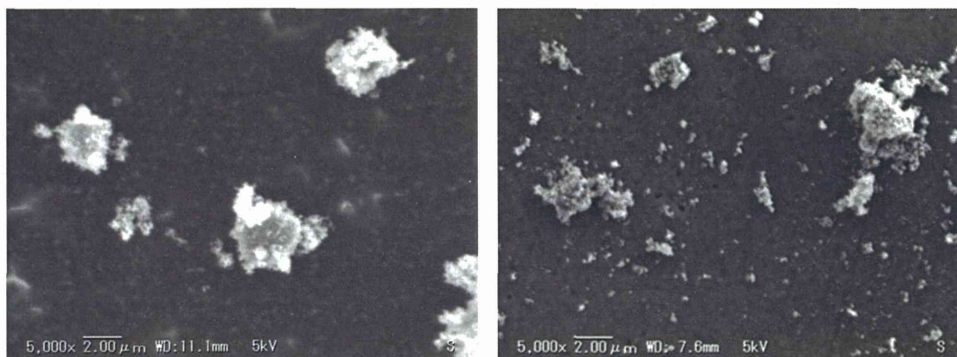


図5 Taquann 処理した酸化チタン

(A) 肉眼的観察では Taquann 処理した検体の原末に比較して嵩高い。(B) 走査型顕微鏡像では原末に比較して微細な粒子が多数観察された

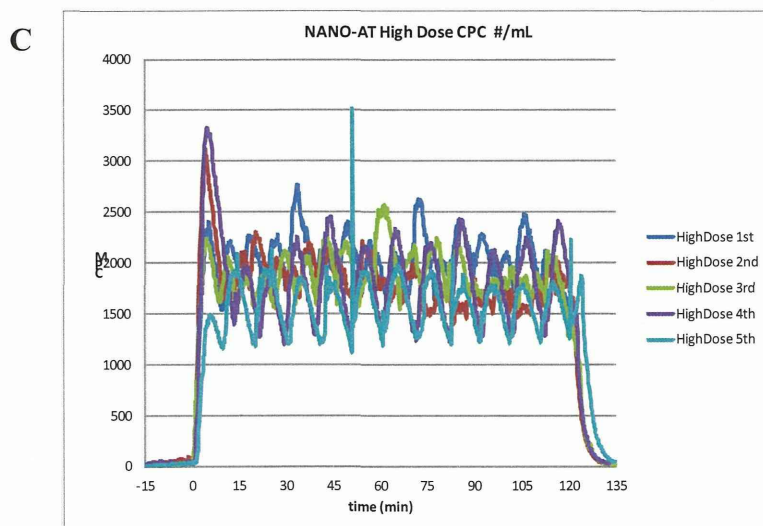
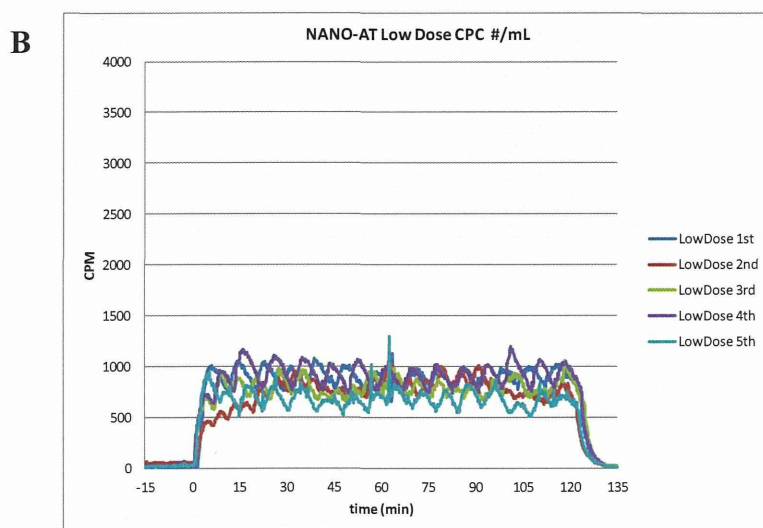
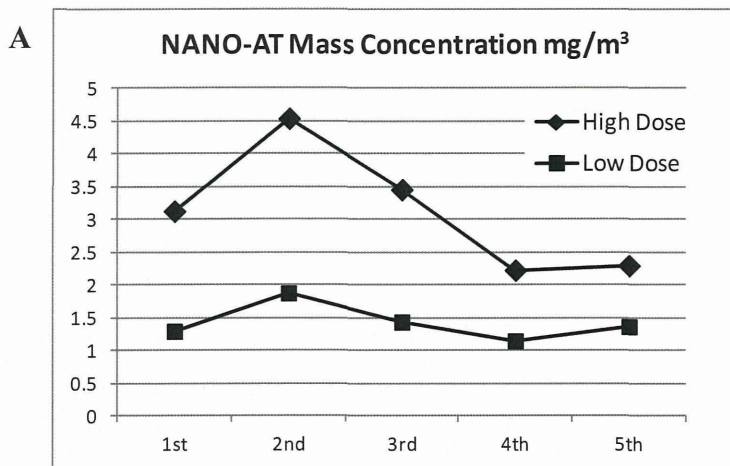
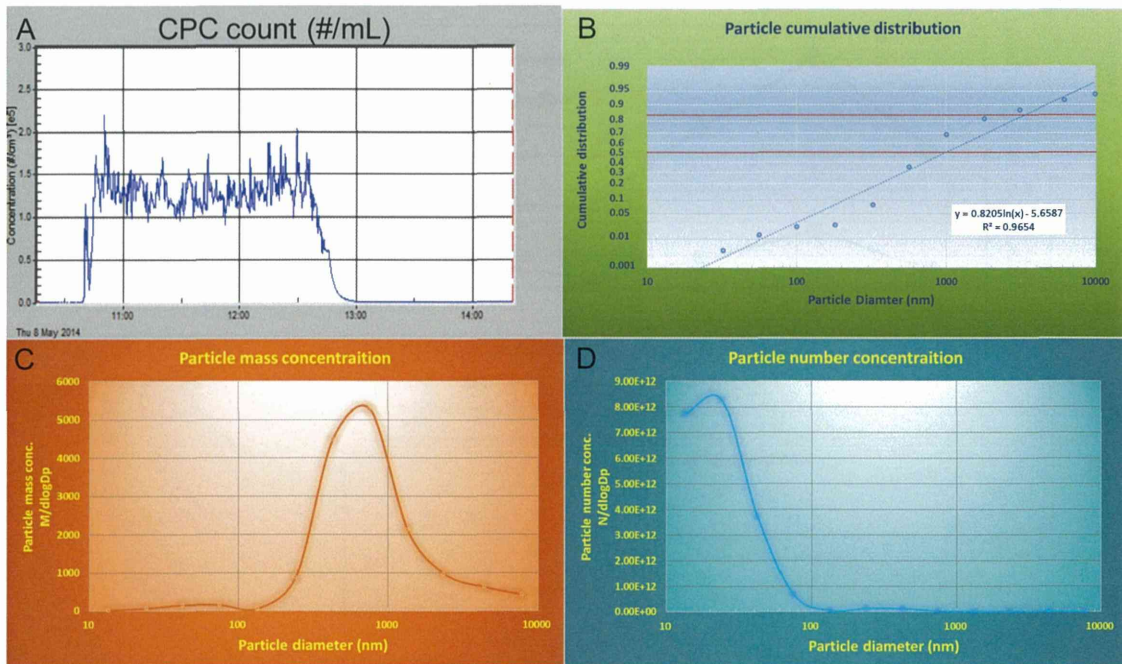


図6 MWCNT 全身暴露吸入データ

(A) 1日2時間、週1回、5週間の反復全身暴露吸入実験の質量濃度推移。(B) 低用量群のCPCデータ。(C) 高用量群のCPCデータ。



Test Date	Concentration (mg/m ³)	MMAD (nm)
140512	3.3	648
140514	2.3	761

図7 酸化チタンの全身暴露吸入データ

酸化チタンの質量濃度は、2.3~3.3mg/m³、CPCの値は $1.1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 個/mL、MMADは648~761nmであった。

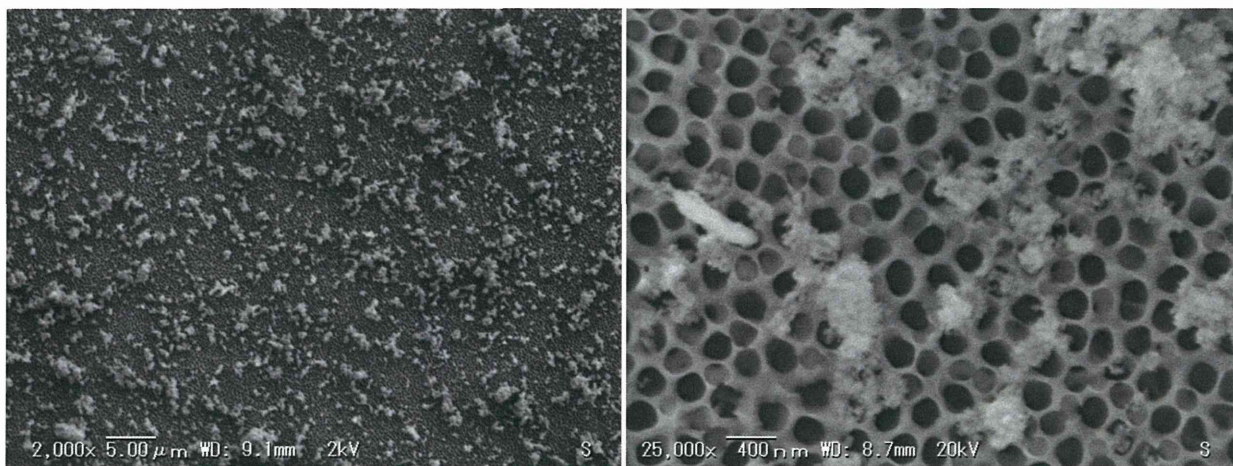


図8 酸化チタンのエアロゾル形状

走査型顕微鏡観察によるエアロゾルの粒子径は1 μ m程度であった。

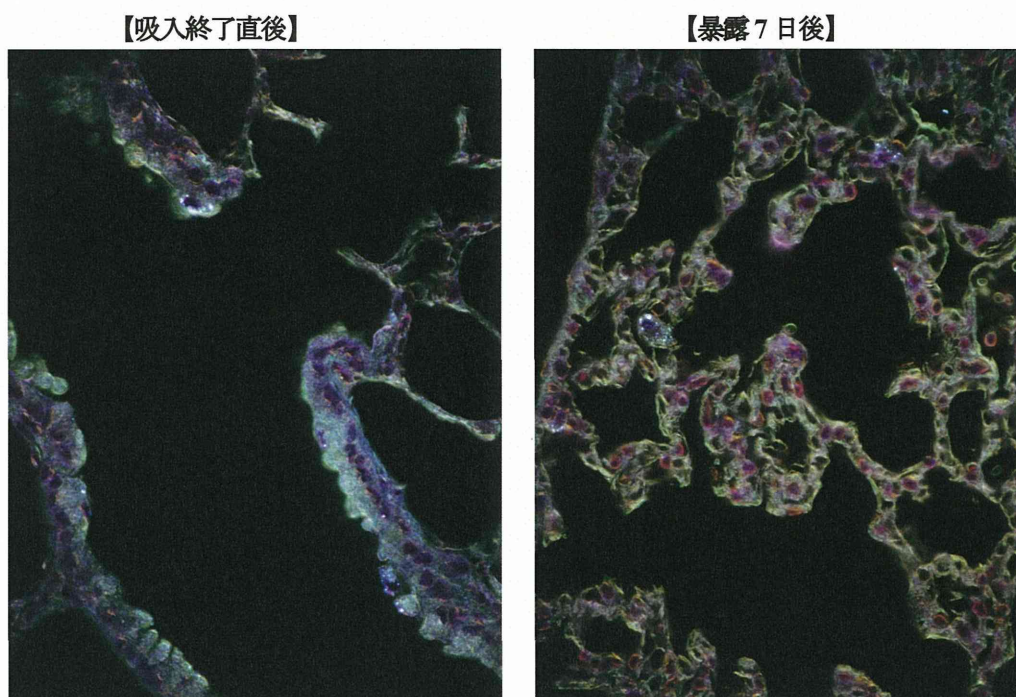
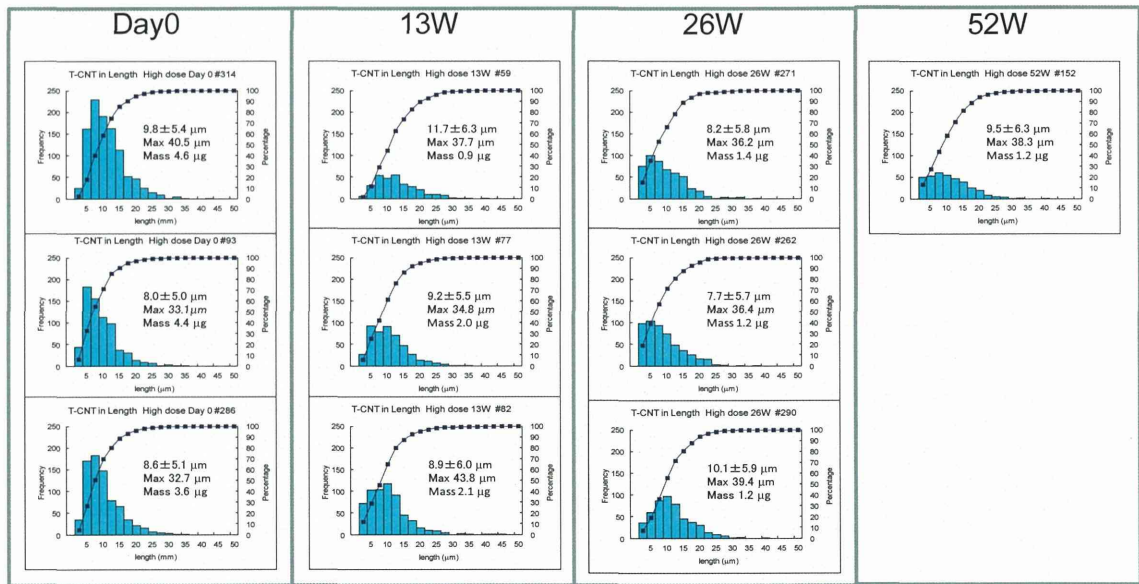
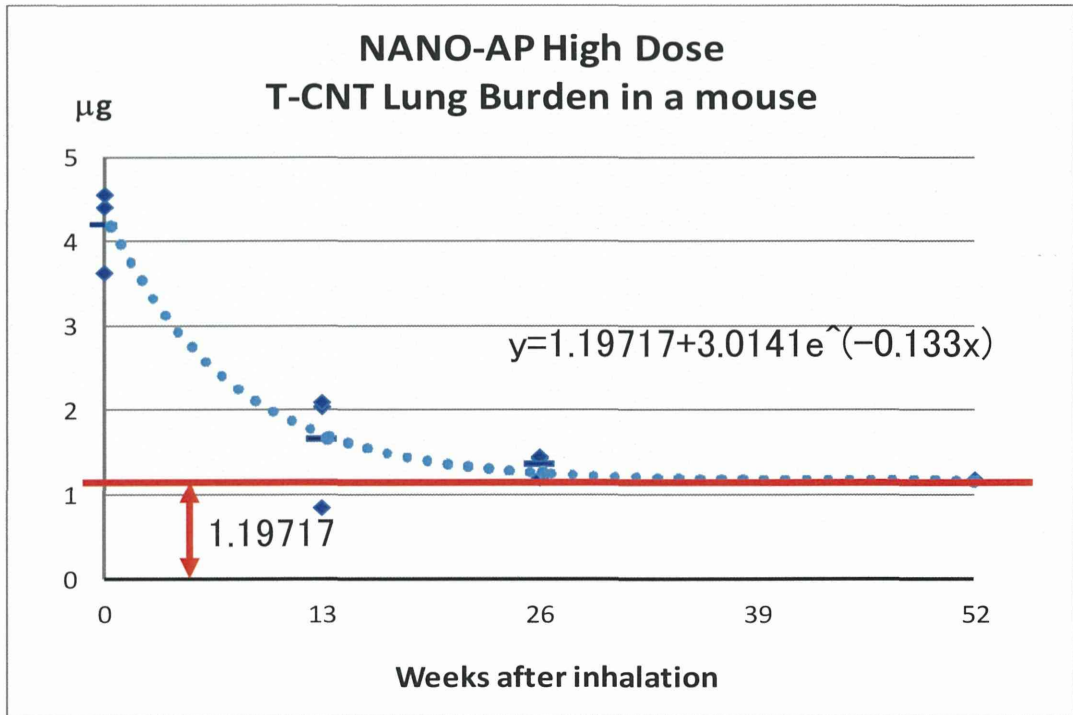


図9 酸化チタンを暴露したマウス肺

高解像度暗視野顕微鏡像 (CytoViva®) により、酸化チタンを吸入させたマウスの肺では、肺胞レベルに酸化チタンの粒子が到達していることを確認した。



#93: 694/52 fields
#286: 764/55 fields
#314: 1031/59 fields

#59: 305/70 fields
#77: 471/53 fields
#82: 606/51 fields

#262: 516/78 fields
#271: 494/62 fields
#290: 500/74 fields

#152: 372/59 fields

図10 p53[±]-マウスにおけるMWCNTの肺沈着量の推移

平均質量濃度 2.5 mg/m³ × 10 時間暴露の終了直後では 4.2 µg/動物、暴露後 52 週では 1.2 µg/動物、半減期は約 13 週であった。肺に沈着した繊維長の分布は暴露直後から 52 週後まで変化が見られなかった。

平成26年度厚生労働科学研究費補助金 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総合研究

・ 全身暴露吸入による毒性評価研究-

分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究」

研究分担者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部主任研究官
	山田 耕一	徳島大学大学院医歯薬学研究部 大学院生
	新垣理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授

研究要旨

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本研究では、多層化カーボンナノチューブ（MWCNT）の吸入暴露による免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。MWCNTの吸入には Taquann 法処理による MWCNT（T-CNT）を用いて、全身吸入暴露装置による吸入を行った。正常 C56BL/6 マウスに低濃度、高濃度の T-CNT の暴露を実施し、1 ヶ月後の肺組織での免疫細胞の動態、全身免疫末梢血の免疫担当細胞の分画を検討すると、気管支あるいは肺胞内にマクロファージの集簇が見られ、肺あるいは脾臓においてマクロファージ関連遺伝子の発現が T-CNT 暴露により亢進していた。さらに、暴露後 3 ヶ月での末梢血における免疫担当細胞分画の割合にも変化は見られなかった。今後、12 ヶ月まで全身の免疫システムへの影響を病理学的あるいは免疫学的手法にて検討す

る予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの暴露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られているが、長期暴露による肺を含めた全身の免疫システムへの影響については知られていない。さらに、カーボンナノチューブの吸入暴露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ暴露により抑制されることが報告されている。これまでに報告されてきた*in vivo*の研究は暴露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの暴露から慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。本研究では、カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫システムへの影響を長期間観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価することを目的としている。

B. 方法

マウス

2ヶ月齢のC57BL/6（雌）を用い、各群10匹ずつで多層化カーボンナノチューブを吸入暴露装置（国立医薬品食品衛生研究所）により吸入を実施し、吸入終了0、3、5、7、9ヶ月で末梢血を採取す

る。吸入後、2ヶ月、6ヶ月、12ヶ月で適切に屠殺後解析を行う。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

MWCNT

多層化カーボンナノチューブはMWCNT-7（保土ヶ谷化学）を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官によりTaquan処理されたMWCNT（T-CNT）を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。低濃度群は $1\text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間（週1回×5）の計10時間吸入した。高濃度群は $2\text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間（週1回×5）の計10時間の吸入とする。

フローサイトメトリー解析

吸入マウスの末梢血を尾静脈から50 μl 採取し、ヘパリン含有PBSに懸濁後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、遠心後、蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー（CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44、

CD62L) に対する抗体にて染色、0.5%-PFA-PBS で固定後に、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を検討した。また、頸部リンパ節、脾臓に関しても単核球を採取後、染色し解析を行った。

病理組織解析

全身臓器を 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬、パラフィン包埋後、4 μ m に薄切した標本をヘマトキシリン・エオジン溶液で染色した。

免疫蛍光染色法

肺組織の凍結切片を用いて、蛍光標識した F4/80、CD206、CD11c に対する抗体で免疫蛍光染色を行った。解析は共焦点顕微鏡 (Carl Zeiss, Jena, Germany) を用いた。

定量化 RT-PCR 法

肺、脾臓からトライゾールを用いて通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

TGF-beta ; F-GACCGCAAC AACGCCATCTAT, R-GGCGTATCA GTGGGGGTCAG, F4/80; F-CTTTGG CTATGGGCTTCCAGTC, R-GCA AGGAGGACAGAGTTTATCGTG, TNF; F-CCTCCTGGCCAACGG CATG, R-GCAGGGGCTCTTGAC GGCAG, Col3A; F-AACGGAGCT

CCTGGCCCCAT, R-CCATCACTG CCCCAGCACC

C. 研究結果

吸引暴露後1ヶ月での肺での変化

T-CNTの最終暴露後1ヶ月で、マウスを解析すると、それぞれの群で体重の変化への影響は観察されなかった。肺組織の病理組織学的検討では、高濃度暴露群で気管支粘膜表層部での上皮の変性及びマクロファージの集簇像、肉芽腫様の変化、肺胞マクロファージの集簇像などが認められた (図1)。低濃度暴露群、対象群では大きな変化は認められなかった (図1)。

肺組織での免疫蛍光染色では、高濃度暴露群の肺胞マクロファージが集簇している部分ではF4/80陽性CD206陰性マクロファージが大部分を占め、F4/80陽性CD206陽性マクロファージがわずかに認められた (図2上段)。低濃度暴露群、対象群では肺胞内のF4/80陽性CD206陰性マクロファージが散在性に見られた (図2上段)。さらに、T-CNT高濃度暴露群で、F4/80とCD11cの二重染色により、F4/80陽性CD11c陰性のマクロファージが多く見られ (図2下段)、F4/80陽性CD11c陽性のマクロファージはわずかであったことから (図2下段)、T-CNT吸入暴露により肺胞腔内に集簇しているマクロファージはM1あるいはM2への分化の見られない細胞が主であることが判明した。

T-CNT暴露による肺組織でのマクロファージ関連遺伝子の変化を検討すると、T-CNTの高濃度吸入暴露によりF4/80、MCP-1 mRNA発現の亢進、CCR2のmRNA発現の上昇傾向が観察された(図3)。iNOS、CD206、arginaseのmRNA発現に関しては、T-CNT暴露による変化は観察されなかった(図3)。

吸入暴露後1ヶ月でのリンパ組織の変化

T-CNT吸入暴露後1ヶ月経過した時点での脾臓及び頸部リンパ節における免疫担当細胞分画をフローサイトメーターで解析したところ、マクロファージ分画(全マクロファージ；CD11b陽性、M1マクロファージ；CD11b陽性CD11c陽性)では対象群と暴露群で割合及び細胞数に差は見られなかった(図4)。樹状細胞(CD11b陰性CD11c陽性)に関しても暴露による影響は認められなかった(図4)。また、CD8陽性T細胞、CD4陽性T細胞、B220陽性B細胞に関しても対象群と暴露群とで割合、細胞数ともに有意な差は観察されなかった(図4)。さらに、Foxp3陽性CD4陽性制御性T細胞に関しても、割合及び細胞数で両者に差は見られなかった。加えて、ROR γ t陽性CD4陽性Th1細胞の割合、細胞数ともに暴露による影響は見られなかった(図4)。

頸部リンパ節でのマクロファージ、樹状細胞、CD4陽性T細胞、CD8陽性T細胞、B220陽性B細胞、Foxp3陽性CD4陽性制御性T細胞、ROR γ t陽性CD4陽性Th1細

胞に関して、割合及び細胞数にT-CNT暴露の影響は観察されなかった(図5)。なお、T-CNT暴露群は低濃度暴露群で脱毛が見られたため実験群から除外したため、対象群と高濃度暴露群の解析結果を示す。脱毛の原因は不明である。

脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子発現を検討すると、高濃度群でF4/80、MCP-1、CCR2、iNOSの発現の亢進が見られた(図6)。CD206のmRNA発現には暴露による影響はなく、arginaseのmRNA発現は吸入暴露群で減少することが判明した(図6)。

暴露後3ヶ月での末梢免疫細胞への影響

最終吸入後3ヶ月での各群の末梢血を採取し、単核球を分離後、フローサイトメーターでT細胞分画、単球分画に関して、各種抗体を用いて検討したところ、吸入暴露によってそれぞれの免疫細胞分画の割合に変化は認められなかった。B細胞分画では対象群のB細胞の割合が通常より低い値を示していたことから、実験手法のエラーが考えられる。

D. 考察

本年度の研究では正常 B6 雌マウスに T-CNT を吸入暴露することによる免疫システムへの影響を検討した。吸入後1ヶ月では、肺組織において気管支上皮の軽度の変性及び肺泡マクロファージの集簇が見られた。またマクロファージ関連の遺伝子発現が高濃度群で上昇し

ていたが、M1 あるいは M2 マクロファージの明瞭な分化が確認できなかった。初期の変化として未熟な単球、マクロファージが集簇していたものと考えられ、今後暴露後長期での観察が必要である。

リンパ組織においてもそれぞれの免疫担当細胞の割合及び細胞数に関しては T-CNT 吸入暴露で影響は確認できなかったが、長期観察での影響を確認する必要がある。また、暴露後 3 ヶ月での末梢血内の単核球の解析では、T-CNT 吸入暴露によって各免疫担当細胞分画への影響は観察されなかった。

肺組織、脾臓において T-CNT 暴露 1 ヶ月でマクロファージ関連遺伝子(F4/80、MCP-1、CCR2、iNOS)の発現が亢進していたことから、マクロファージを中心とした自然免疫系の活性化が進んでいることが示唆された。今後、吸入暴露後 6 ヶ月、12 ヶ月での免疫システム全体への影響を観察する予定である。

これまで、ナノマテリアルの吸入暴露に関しては肺の変化が報告されてきたが、免疫システム全体への影響に関してはほとんど知られていなかった。本研究では、均一な吸入暴露を可能とした Taqaunn 法による処理により、肺組織に一定量が暴露できるようになった。また、吸入装置に関しても、研究協力者の開発した自動吸入装置を用いることにより、従来のスプレー式の噴霧暴露に比較して、実験精度が高くなっているものと考えられる。

E. 結論

1. C57BL/6マウスへのT-CNT吸入暴露により、暴露後1ヶ月では気管支、肺胞内にマクロファージの集簇がみられた。
2. 暴露後1ヶ月で肺胞内に集簇していたマクロファージの大半はM1、M2へ分化していない状態であった。
3. 暴露後1ヶ月での肺組織、脾臓ではマクロファージ関連遺伝子の発現亢進が見られた。M1、M2への分化を示す遺伝子発現の偏りは見られなかった。
4. 暴露後3ヶ月での末梢血中の免疫担当細胞の分画に対象群と比較して有意な差は認められなかった。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A, Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N. Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2014 185(1):151-61.

2. Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto KI, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N, Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn*. 2014 244(3):488-96.
 3. Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol*. 2014;34(4):301-14.
 4. Arakaki R, Eguchi H, Yamada A, Kudo Y, Iwasa A, Enkhmaa T, Hotta F, Mitamura-Aizawa S, Mitamura Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Anti-inflammatory effects of rebamipide eyedrop administration on ocular lesions in a murine model of primary Sjögren's syndrome. *PLoS One*. 2014 9(5):e98390.
 5. Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y, Watanabe M, Ichikawa T, Hayashi Y, Ishimaru N. A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice. *J Immunol*. 2014 192(9):4025-31.
 6. Iizuka S, Ishimaru N, Kudo Y. Matrix metalloproteinases: the gene expression signatures of head and neck cancer progression. *Cancers* (Basel). 2014 6(1):396-415.
 7. Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. *Eur J Immunol*. 2014 44(2):561-72.
2. 学会発表
 - (1) 新垣理恵子、山田安希子、工藤保誠、林良夫、石丸直澄：ニッケルアレルギー発症における Thymic Stromal Lymphopoietin の重要性 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号:268 2014. 4 広島
 - (2) 工藤保誠、常松貴明、近藤智之、黒澤実愛、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：癌細胞におけるペリオスチンのスプライシングバリエーションの発現と EMT との関連 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：273 2014. 4 広島
 - (3) 山田安希子、新垣理恵子、黒澤実愛、近藤智之、常松貴明、工藤保誠、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群の発症における制御性 T 細胞の役割 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号:274 2014. 4 広島
 - (4) 常松貴明、工藤保誠、近藤智之、黒澤実愛、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：ユビキチン分解による複製前複合体形成因子 CDT1 の発現制御機構の解析 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1

号 : 353 2014.4 広島

(5) 近藤智之、黒澤実愛、常松貴明、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 : 自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫制御機構の解析 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号 : 353 2014.4 広島

(6) Arakaki R, Ushio A, Yamada K, Kurosawa M, Saito S, Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Kudo Y, Ishimaru N: Influence of multi-wall carbon nanotubes on immune system in normal mice and MRL/lpr mice. 第43回日本免疫学会総会 第43巻 : 44 2014.12 京都

(7) Kurosawa M, Yamada A, Arakaki R, Kondo T, Tsunematsu T, Kudo Y, Saito S, Ushio A, Ishimaru N: A novel role of CXCR7 in memory T cells of a murine model for Sjögren's syndrome. 第43回日本免疫学会総会 第43巻 : 66 2014.12 京都

(8) Ushio A, Arakaki R, Kurosawa M, Kondo T, Saito S, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N: Analysis of macrophages in the pathogenesis of murine model for Sjögren's syndrome. 第43回日本免疫学会総会 第43巻 : 103 2014.12 京

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

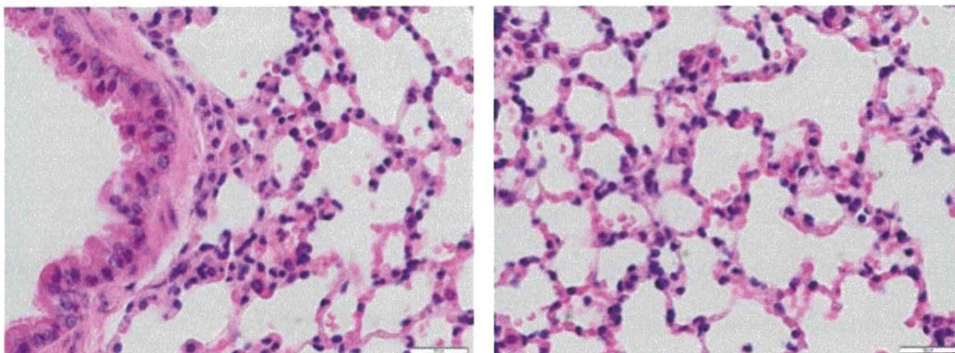
なし

3. その他

なし

図1

Control



T-CNT exposure (high dose)

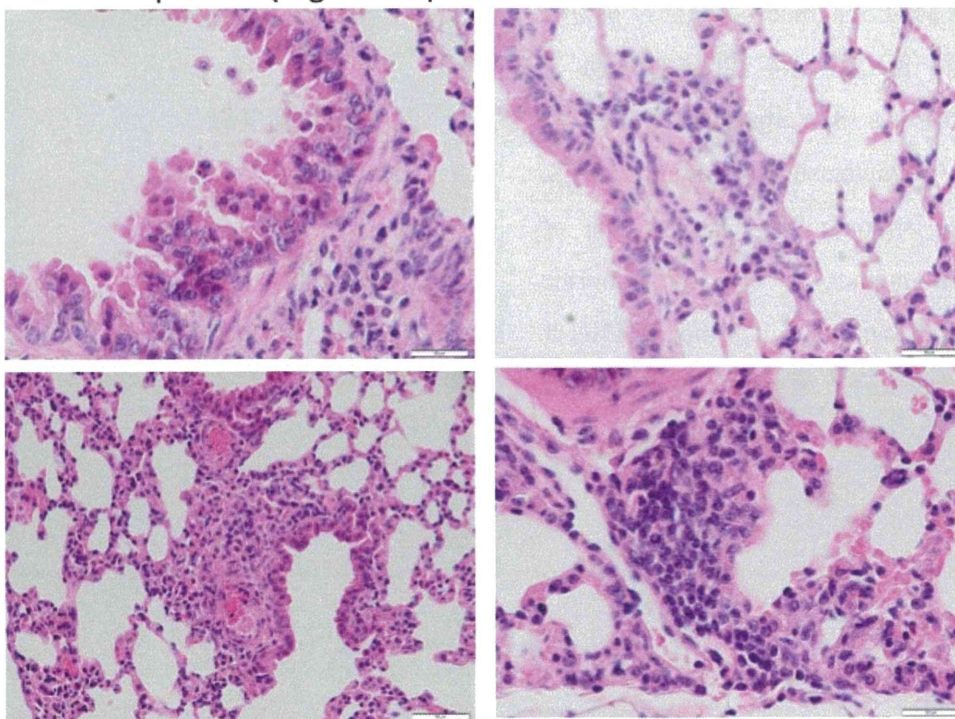


図1 T-CNT吸引暴露マウスの肺病理組織学的変化

図2

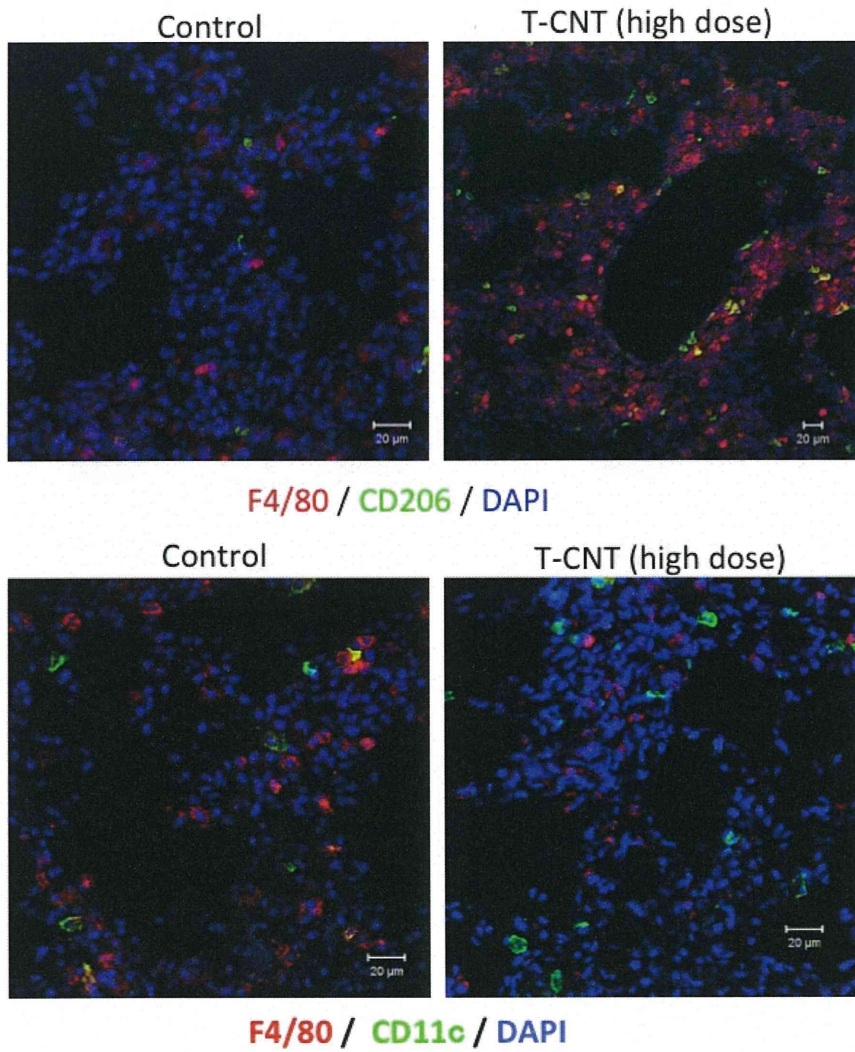


図2 T-CNT暴露による肺胞マクロファージ