

した後、気管及び目視できる気管支を除去して、肺組織を細切した。

- iv. 激しく振とうした後、牛胎仔血清 (FBS) と溶液 B (4.9.4.2 項参照) を 0.25% トリプシン 20 mL に対して 5 mL ずつ加えて、37°C、30 分間恒温槽内で 5 分間処理した。
- v. ガーゼで濾過した後、000×g、10 分間、心分離して肺細胞 (沈渣) を回収した。
- vi. 遠心後の沈渣を 1~2 mL の生理食塩液に浮遊させ、ercoll の密度勾配 (高密度 1.089 と低密度 1.040) により遠心分離して、じた細胞層を回収した。
- vii. 回収した目的の細胞懸濁液と 10% リン酸緩衝ホルマリン液を混合して固定し (遠心分離と混合を 2 回繰り返した)、量のホルマリン液で細胞浮遊液を調製した。

(5) 標本作製・染色・観察

固定した細胞浮遊液の一部を NBT 染色液で 37°C、10 分間染色した。その後、精製水で洗浄、遠心分離し、メチレングリーン染色液で 5 分間染色した。再度精製水で洗浄、遠心分離した後、DAPI 染色液で染色して顕微鏡下で観察し、AT-II 細胞と Clara 細胞の濃度を算出した。NBT で暗青色に染色されている (NBT 陽性) 細胞を Clara 細胞、染色されていない (NBT 陰性) 細胞を AT-II 細胞として識別した。なお、測定対象は主核及び細胞の形態がともに円形あるいは卵円形の細胞群とし、白血球と識別できる細胞は除外した。AT-II 細胞及び Clara 細胞をそれぞれ 2000 個/匹カウントして、小核を有する細胞の割合を算出した。AT-II 細胞及び Clara 細胞それぞれの小核誘発頻度について、媒体対照群とプレオマイシン投与群との間で、Kastenbaum と Bowman の方法により有意差検定を行った。

C. 研究結果および考察

(1) 体重変化

初回実験および 2 回目実験とも群分けを実

施せずに行ったが、プレオマイシンの 1 mg/kg では平均体重の増加抑制傾向がみられ、3 mg/kg では各個体の体重減少が認められた (Table 1)。

(2) 一般状態

本試験では陰性対照群を含めていずれの動物でも、水あるいはプレオマイシン水溶液の気管内投与によると考えられる呼吸音の異常が投与後 1 時間で認められたが、投与翌日には消失した。

(3) 細胞の識別及び小核の出現頻度

小核をもつ AT-II 細胞及び Clara 細胞の出現頻度を Table 2 に、顕微鏡写真を Fig. 1~4 に示す。本検討試験において、Lindberg らの方法の変法により NBT 陰性細胞及び陽性細胞を分離、識別した。ここでは Lindberg らの方法に従い、NBT 陰性細胞を AT-II 細胞、NBT 陽性細胞を Clara 細胞とした (Fig. 1 及び 3)。なお、初回実験においてプレオマイシンの 1 mg/kg を投与した動物 1 例で、AT-II 細胞及び Clara 細胞がそれぞれ 5.3×10^4 個/mL 及び 3.8×10^4 個/mL の密度で含む細胞懸濁液が約 0.5 mL 調製でき、対照群の 1 例 (それぞれ 5.9×10^4 個/mL 及び 4.1×10^4 個/mL) とほぼ同等の細胞数が得られた。他の動物でも顕微鏡下で同様の細胞密度が得られたためと判断し、十分な細胞数が得られたと考えられた。

初回実験では、プレオマイシンの 1 mg/kg 投与群で小核をもつ AT-II 細胞及び Clara 細胞の有意な増加がみられたが、個体ごとの小核誘発率には個体差が見られた (Table 2)。2 回目実験ではプレオマイシンの 3 mg/kg 投与群で、小核をもつ AT-II 細胞及び Clara 細胞の有意な増加がみられ、いずれの個体でも明らかな高値を示した (Table 2)。以上の結果から、本試験条件下においてプレオマイシンの 1 mg/kg の投与用量では反応性に個体差が生

じたが、3 mg/kg を投与することによって、いずれの個体でも明らかな陽性反応が得られた。従って、本試験条件下で陽性対照物質としてブレオマイシンを使用する場合は、3 mg/kg の投与用量を設定するのが妥当と考えられた。

D. 結論

ラットの肺を用いる小核試験の試験法を確立するためにブレオマイシンをラットに気管内投与し、肺細胞を採取して小核誘発頻度を測定した。雄性 Cr1:CD(SD)ラット(投与時 8 週齢、3 匹/群)にブレオマイシンを 1 または 3 mg/kg の用量(投与液量 0.1 mL/匹)で 1 回気管内投与し、投与後 72 時間後に肺細胞を採取した。媒体対照として注射用水をブレオマイシンと同様に投与して肺細胞を採取した。ニトロブルーテトラゾリウム(NBT)陽性の細胞を Clara 細胞、NBT 陰性の細胞を AT-II 細胞として識別し、それぞれ 2000 個あたりの小核出現頻度を算出した。その結果、1 mg/kg の用量では有意な小核出現被頻度がみられたが、個体差が認められた。3 mg/kg の用量ではいずれの個体でも明らかな小核誘発が認められた。本検討試験によりラットを用いる気管内投与による肺小核試験の基礎的な手技を確立できた。これにより肺小核試験によるナノ物質の遺伝毒性評価への応用が期待できる。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 Body weight changes in the lung micronucleus test of bleomycin in rats

Table 1-1 First experiment

Treatment	Dose level Route Frequency	Animal number	Body weight (g)			
			At receipt (Day -6)	At end of quarantine (Day -1)	Before dosing (Day 1)	Before sampling (Day 4)
Negative control (Water)	0 mg/kg i.t. Once	19001	238	304	312	332
		19002	241	309	319	339
		19003	247	324	330	356
		Mean ± S.D.	242.0 ± 4.6	312.3 ± 10.4	320.3 ± 9.1	342.3 ± 12.3
Test substance (Bleomycin)	1 U/kg i.t. Once	19004	238	309	312	327
		19005	234	300	307	314
		19006	243	302	309	308
		Mean ± S.D.	238.3 ± 4.5	303.7 ± 4.7	309.3 ± 2.5	316.3 ± 9.7

Table 1-2 Second experiment

Treatment	Dose level Route Frequency	Animal number	Body weight (g)		
			At receipt (Day -5)	Before dosing (Day 1)	Before sampling (Day 4)
Negative control (Water)	0 mg/kg i.t. Once	29001	233	300	313
		29002	224	288	302
		29003	239	301	327
		Mean ± S.D.	232.0 ± 7.5	296.3 ± 7.2	314.0 ± 12.5
Test substance (Bleomycin)	3 U/kg i.t. Once	29004	229	281	280
		29005	239	298	285
		29006	234	290	278
		Mean ± S.D.	234.0 ± 5.0	289.7 ± 8.5	281.0 ± 3.6

i.t.: intratracheal intubation

Table 2 Results of the lung micronucleus test of bleomycin in rats

Table 2-1 First experiment

Treatment group	Dose Level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	AT-II cells			Clara cells		
			Number of cells scored	Number of micronuclei (MN)	Incidence of MN (%)	Number of cells scored	Number of micronuclei (MN)	Incidence of MN (%)
Negative control (Water)	0 i.t. Once	19001	2000	1	0.05	2000	1	0.05
		19002	2000	2	0.10	2000	1	0.05
		19003	2000	0	0.00	2000	2	0.10
		Total / Mean ± S.D.	6000	3	0.05 ± 0.05	6000	4	0.07 ± 0.03
Test substance (Bleomycin)	1 i.t. Once	19004	2000	4	0.20	2000	2	0.10
		19005	2000	11	0.55	2000	13	0.65
		19006	2000	6	0.30	2000	4	0.20
		Total / Mean ± S.D.	6000	21	0.35 ± 0.18	6000	19	0.32 ± 0.29

* $p < 0.05$ (Kastenbaum and Bowman's method)

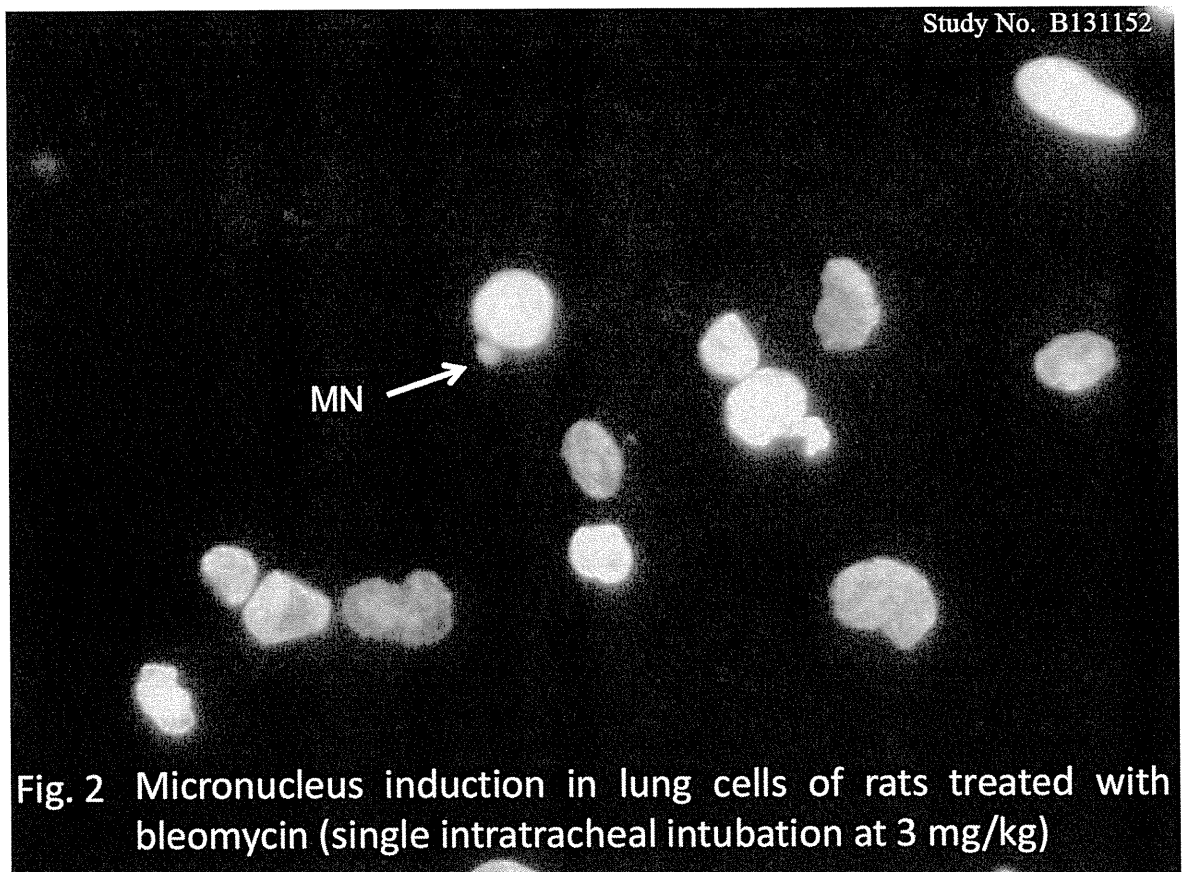
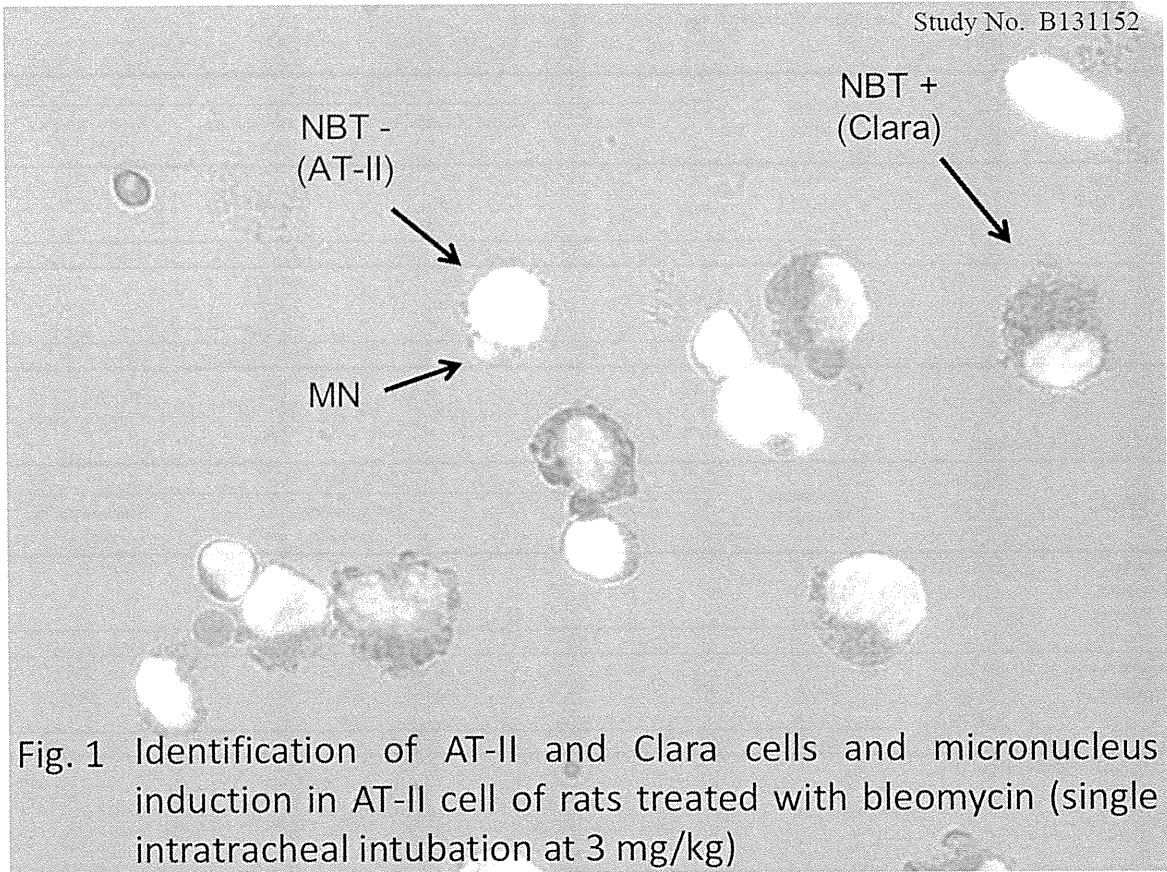
Table 2-2 Second experiment

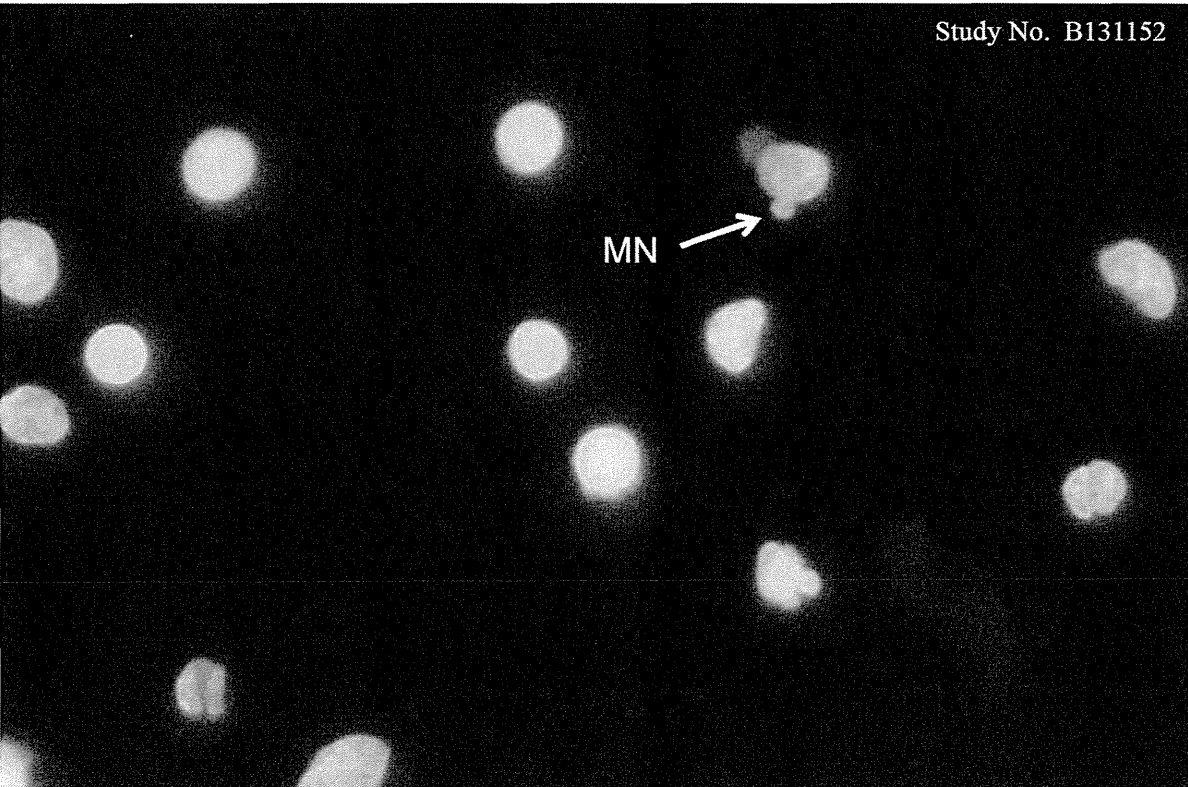
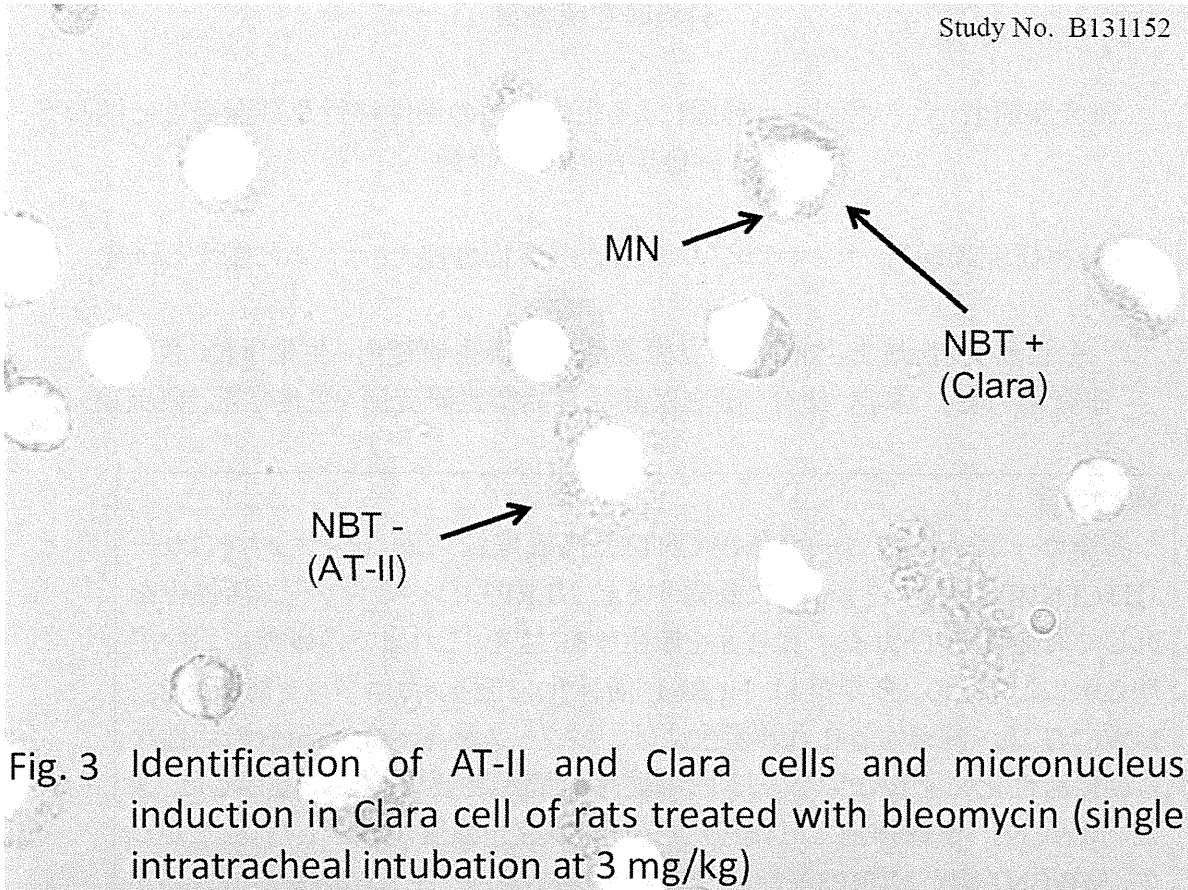
Treatment group	Dose Level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	AT-II cells			Clara cells		
			Number of cells scored	Number of micronuclei (MN)	Incidence of MN (%)	Number of cells scored	Number of micronuclei (MN)	Incidence of MN (%)
Negative control (Water)	0 i.t. Once	19001	2000	2	0.10	2000	1	0.05
		19002	2000	1	0.05	2000	2	0.10
		19003	2000	1	0.05	2000	0	0.00
		Total / Mean ± S.D.	6000	4	0.07 ± 0.03	6000	3	0.05 ± 0.05
Test substance (Bleomycin)	3 i.t. Once	19004	2000	18	0.90	2000	25	1.25
		19005	2000	15	0.75	2000	21	1.05
		19006	2000	22	1.10	2000	16	0.80
		Total / Mean ± S.D.	6000	55	0.92 ± 0.18	6000	62	1.03 ± 0.23

AT-II: Alveolar type II

i.t.: Intratracheal intubation

*, ** $p < 0.05, 0.01$ (Kastenbaum and Bowman's method)





平成 25 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)
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる
評価手法の開発研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究

分担研究者: 最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長
研究協力者: 曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 研究員

研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)や高温焼結フラーレンナノウィスカー(HTCFNW)をマクロファージに曝露すると、NLRP3 インフラマソーム活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 β を産生することを、これまでの研究において明らかにしている。今年度は NLRP3 活性化に至るメカニズムを解析した。MWCNT 類が誘導する IL-1 β 産生には、リソソーム酵素 cathepsin B の活性化ならびに活性化に必要なリソソーム内の酸性環境が必要であることを示した。また、MWCNT 曝露細胞では染色リソソームの蛍光強度が減少した。したがって、MWCNT 類が NLRP3 を活性化する過程には、リソソーム破壊ならびにリソソーム酵素が重要な役割を持つことが示唆された。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは、特異な物理化学特性から未知の生理作用を有する可能性があり、とりわけ多層カーボンナノチューブ(MWCNT)はアスベストと似た形状を持つことから、ヒトへの健康影響が懸念されている。

気道曝露などにより体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の貪食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応である。本研究ではナノマテリアルの貪食系細胞内での挙動を追跡し、インフラマソーム活性化を介した炎症の慢性化機構を明らかにし、慢性影響の評価につなげることを目的とする。

昨年度までの研究において、針状の多層カーボンナノチューブ MWCNT-M および-SD1、また高温焼結したフラーレンナノウィスカー

(HTCFNW)をマクロファージに曝露すると炎症性サイトカイン IL-1 β の産生が亢進すること、またこの応答には NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3)を含む インフラマソームが関与することを明らかにした。IL-1 β は免疫細胞の活性化や炎症応答の誘導などの多彩な役割を有していることが知られる。引き続き検討を進め、MWCNT-M および-SD1 がマクロファージから IL-6 および IL-1 α の放出を促進すること、これらの応答も NLRP3 に依存していることを示した。今年度はマクロファージに取り込まれた MWCNT が NLRP3 インフラマソーム活性化に至るプロセスにおいて、リソソームの役割を解明した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)はカ

ーボンナノテクノロジー社より提供された MWCNT-M(平均長 3.3 μ m、径 40-50 nm)、昭和電工より提供された MWCNT-SD1(長さ 8 μ m、径 150 nm)を用いた。高温焼結フラーレンナノウイスキー(HTCFNW)-L(長さ 7.6 \pm 4.5 μ m、径 586 nm)は 900 $^{\circ}$ C熱処理したフラーレンナノウイスキーであり、独立行政法人物質・材料研究機構の宮沢薫一博士が作成したものである。サイトカイン測定にはミリポア社の MILLIPLEXTM MAP アッセイキットを用いた。

2. MWCNT および HTC FNW の分散

MWCNT-M、SD1 は 0.5%Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、1~5 分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティング、25G シリンジ通過により分散した。HTCFNW は、0.1%Tween 80 を含む PBS に懸濁・超音波処理し、最終濃度を HTC FNW-L (0.58 mg/mL) に調整されたものを用いた。

3. マクロファージ系細胞からのサイトカイン放出の測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M PMA と 10%FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化し、さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、各種阻害剤あるいは溶剤で 30 分前処理し、引き続き分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し各種阻害剤の存在下・非存在下で 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.002%とした。培養上清を回収後、MILLIPLEXTM MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

4. フローサイトメトリーによるリソソーム染色細胞の測定

PMA 分化した THP-1 細胞を MWCNT SD-1 濃度 10 μ g/mL(Tween 20 を最終濃度 0.002%として分散)に 6 時間暴露した。細胞を洗浄後、リソソーム染色試薬 Lysotracker Red

DND-99 (Life technologies)70 nM 含有培地で 30 分間培養した。細胞洗浄後、トリプシン処理し、回収した後に 100 μ m ナイロンメッシュで濾過した。Paraformaldehyde で細胞を固定した後、ナノチューブの細胞への取込及びリソソームの染色をフローサイトメーター(BD accuri C6、BD Biosciences)で測定した。解析には、解析ソフト FlowJo を用い、FSC(前方散乱光)の強度 3,000,000 以上の細胞をゲーティングした。結果は、SSC(側方散乱光)強度でナノチューブの取り込みを、Lysotracker 染色強度でリソソーム崩壊度合いを評価し、双方の相関を解析した。

C.研究結果

1. MWCNT-M, -SD1 および HTC FNW-L による IL-1 β 産生はリソソーム酵素 cathepsin B 阻害により抑制される

MWCNT-M、-SD1 および HTC FNW-L を 3.3 ~6.6 μ g/mL の濃度でマクロファージに暴露すると、濃度依存的な IL-1 β の培地への放出促進が認められた。リソソーム加水分解酵素 cathepsin B の膜透過型阻害剤である CA-074-Me(10 μ M)で細胞を前処理したのちに、共存下でナノファイバー類に 6 時間曝露すると、IL-1 β 放出は約 90~95%抑制された。また MWCNT-M による IL-1 β の放出はリソソーム酸性化を阻害する Bafilomycin A1(200 nM)で細胞を 30 分前処理し、引き続き共存下で MWCNT-M を 3.3~6.6 μ g/mL の濃度でマクロファージに暴露すると、IL-1 β 産生は約 60%低下した。一方、ATP(3 mM)による IL-1 β 産生の低下は約 20%にとどまった。

2. 蛍光染色リソソームへの MWCNT 曝露の影響

THP-1 マクロファージに MWCNT-SD1 を曝露したのち、酸性リソソームを Lysotracker Red で蛍光染色し、フローサイトメトリーを用いて解析を行った。MWCNT-SD1 曝露により、側方

散乱光(SSC)値の増加が認められ、貪食による細胞内への取り込みが示された。リソソームを Lysotracker で染色すると、蛍光強度は vehicle 処理細胞の 6250 ± 971 に比較し、MWCNT-SD1 処理細胞では 4666 ± 675 に低下していた ($p < 0.05$)。またリソソーム蛍光染色の度合いの高い細胞の割合は、vehicle 処理では 35%であったが、MWCNT-SD1 曝露細胞では 22%に低下していた。

D. 考察

昨年度までの研究において、各種多層カーボンナノチューブ MWCNT および高温焼結フラーレンナノウィスカーHTCFNW をマクロファージに暴露すると、針状の形状と長さに依存して炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6 および IL-1 α の放出を促進することを明らかにした。さらにこれらのナノチューブ類は細胞に貪食された後、Nod 様受容体 NLRP3 を含むインフラマソームを活性化することを、NLRP3 の siRNA によるノックダウンおよび caspase-1 阻害剤を用いて明らかにした(表1)。

今年度はこれらのナノチューブ類が NLRP3 インフラマソーム活性化に至るメカニズムを明らかにするために、リソソームの関与を検討した。昨年度までの研究において、MWCNT や HTCFNW は分化 THP-1 細胞に貪食されることを、フローサイトメトリーでの SSC 増加ならびに貪食阻害剤を用いて示した。貪食された異物は、エンドソームに取り込まれ、リソソームと融合して消化分解されることが知られている。コレステロール結晶などの針状の異物は分解されずにリソソームを破壊し、リソソーム酵素が細胞質に漏出することが報告され、このことが NLRP3 活性化をもたらす可能性が提唱されている。

今年度の研究において、細胞のリソソームを Lysotracker で選択的に染色したところ、MWCNT 曝露することにより蛍光強度の低下が認められ、リソソーム崩壊を示唆する結果を

得た。また、cathepsin の活性化に必須であるリソソーム内の酸性環境、ならびにリソソーム酵素 cathepsin B の活性が MWCNT による IL-1 β 産生に必要であることを示す結果を得た。したがって、貪食された MWCNT がリソソームを破壊し、放出された cathepsin B の活性が NLRP3 活性化をもたらす可能性が示唆される。

NLRP3 を含むインフラマソームは内外の危険因子により活性化され、IL-1 β および IL-18 の切断による成熟を促進し、炎症応答の中心として様々な疾患の病態に関わることが明らかにされている。MWCNT が排除されずに細胞組織に滞れば、炎症が慢性化することが懸念される。今年度の研究により、MWCNT ならびに HTCFNW が NLRP3 を活性化する過程にリソソームならびにその破壊が重要な役割を持つことが示された。リソソーム破壊には、ナノマテリアルの形状が重要な役割を持つことが推測される。今後はその関係を明らかにすることが、ナノマテリアルが引き起こす炎症の慢性化遷延化の予測につながる可能性があると考えられる。

E. 結論

MWCNT 類によるマクロファージからの IL-1 β 産生にはリソソーム酵素 cathepsin B 活性ならびに活性化に必要な酸性環境が必要とされ、MWCNT 暴露によりリソソーム染色強度が低下した。リソソーム崩壊による cathepsin B の放出が NLRP3 活性化をもたらす可能性が示唆された。

F. 研究発表

1. 学会発表

1. Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long

needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 : 593-599. (2014)

表1. 各種MWCNTおよび焼結フラーレンナノウiskerによる細胞・炎症応答への阻害剤の影響 (H24-26年度成果のまとめ)

プロセス	評価方法	MWCNT-M	MWCNT-SD1	HTCFNW-L	HTCFNW-S
Phagocytosis	FACS SSC	増加	増加	増加	増加
lysosome酸性化	阻害剤 Bafilomycin A1	60%阻害			
cathepsin B	阻害剤 CA-074Me	阻害	阻害	40%阻害	
NLRP3	siRNA	阻害	阻害	阻害	阻害
caspase-1	zYVAD-fmk	阻害	阻害	阻害	阻害
IL-1β	immunoassay	+++	+++	++	+
IL-1α	immunoassay	++	++	-	
IL-6	immunoassay	+++	+++	++	

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)

分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者: 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者: 吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

研究協力者: 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究要旨

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) について、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて感染病態を指標に影響評価を行った。MWNT-7 を複数回曝露(感染 5, 3, 1 日前)後、RSV をマウスに感染させた。感染 5 日後の肺病理組織像では、RS ウイルス肺炎の増悪化が用量に依存して認められた。抗 RS ウイルス抗体を利用した免疫染色法により、MWNT-7 粒子の周囲ではウイルス抗原の発現が少ないことが判明した。さらに MWNT-7 曝露マウスでは、感染 1 日後の肺胞洗浄液中の MIP-1 α レベルの低下が顕著であった。一方、感染 14 日後の回復期における比較検討では、非曝露群では炎症が終息しているのに対して、曝露群では MWNT-7 の凝集塊とリンパ球の浸潤が見られた。この様に、MWNT-7 は初期感染免疫系に作用し、病態を持続的に増悪化させることが明らかとなった。

A. 研究目的

多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)は、その物理的特性からIC基盤の材料などに汎用されている。その一方でマウス腹腔内投与により中皮腫を誘導するなど、アスベスト様の生物災害を引き起こす危険性が多方面から指摘されている。

本研究では、MWCNTの免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響を

respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行っている。このモデルではマウスにおけるウイルス由来の肺炎病態の変動を通じて、臭素化難燃剤や有機リン系農薬など化学物質の免疫毒性が評価できることが知られている。

今年度は、MWNT-7の複数回曝露によるRSウイルス感染病態の変動について、感染影響の持続性や感染組織の局在性などについて

て、肺の病理組織学的な観点から検討することを目的としている。

B. 方法

RSV マウス感染実験

高度分散化 MWNT-7 (Taquann サンプル) を実験に用いた。これらの MWCNT について、秤量後に超音波破碎機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02% Tween 20 -phosphate buffered saline (PBS) に均一懸濁した。ウイルス感染 5、3、1 日前に MWNT-7 (0.01 および 0.1 mg/mL) を 50 μ L ずつ BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g, 筋注) で経鼻投与した。なお、対照には 0.02% Tween 20-PBS を投与した。MWNT-7 曝露後、RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1、5 および 14 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。その後に肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

BALF 中のサイトカインの定量

MIP-1 α の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットシリーズを用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

RS ウイルス量の測定

凍結保存した肺組織を氷冷しながらホモジネートを作成した。480 x g, 4°C で 15 分間遠心後、上清について HEp-2 細胞を

用いたプラーク法によりウイルス量を測定した。

肺組織の病理組織学的解析

肺の病理組織学的検討を行う際は BALF を取得せず、麻酔下で摘出した肺を中性緩衝ホルマリンで一晩固定した。なお、標本作成は (有) ヴィペック社に委託し、評価は HE 染色下で実施した。

免疫染色法

肺組織切片について、定法により脱パラフィンやアンマスキング等を実施後、ヤギポリクローナル抗 RSV 抗体 (1:250) を用いて免疫染色した。なお検出はベクスタチン ABC 検出キットを利用し、対比染色はヘマトキシリン染色を用いた。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

HE染色による肺の病理組織評価

RSV感染5日後に摘出した肺の病理組織学的検討を行った。ウイルス感染マウスの肺組織では、肺胞への炎症細胞の浸潤による中隔の肥厚や肺動脈周辺の巣状リンパ球の浸潤など典型的なウイルス性の間質性肺炎が認められた。そしてMWNT-7曝露群では用量 (0.025 および 0.25 mg/kg) に依存して間質性肺炎が増悪化していた。一方、非感染マウスではそのような変化は認められなかった。

RSV感染14日後では、非曝露群では炎症

がほぼ終息しているのに対して、MWNT-7曝露群ではMWNT-7の凝集塊とリンパ球の浸潤が散見された。

免疫染色法による肺の病理組織評価

MWNT-7曝露によりRSウイルス肺炎の増悪化が確認されたため、感染5日後の肺組織中のウイルス感染量を測定した。その結果、曝露による明確なウイルス量の変動はなかった。そこで、MWNT-7曝露群ではウイルス感染の質的な変化があるのかを検討するため、抗RSV抗体による免疫染色を実施した。その結果、曝露群の肺組織のうち、強い炎症が誘導されているMWNT-7の周囲では抗体陽性細胞は見いだされなかった。一方、弱い炎症が誘導されている領域では、抗体陽性細胞が確認されたがMWNT-7と離れて存在していることが判明した。

ケモカイン産生への影響

MWNT-7曝露によりRSウイルス感染の初期に強い炎症が誘導されている可能性が示されたため、感染1日後のBALF中のMIP-1 α レベルを測定した。その結果、MWNT-7曝露によりMIP-1 α の産生が強く抑制されていることが判明した。

D. 考察

MWNT-7を複数回曝露することにより、肺胞中隔の肥厚やリンパ球の浸潤などRSウイルス感染による肺炎の増悪化が認められ、このマテリアルが感染病態を増悪化させることが判明した。そしてその作用はウイルス量の増加を伴わず、単なる免疫抑制効果によるものではないことが示唆された。また、ウイル

ス感染の回復期での炎症の持続化から、MWNT-7曝露の影響が一過性でないことが明らかとなった。一方、免疫染色法によるウイルス感染の質的な相違の検討から、炎症の程度が強い局所ではウイルス抗原の発現が少なく、かつMWNT-7チューブの凝集などが確認され、さらに弱い局所でもMWNT-7チューブと抗原が離れて存在していることが分かった。これは感染初期に免疫担当細胞が集積することによるものと考えられた。さらに、感染初期のMIP-1 α 産生量の低下などマクロファージ類の感染応答の不具合も示され、この分子が今後の標的細胞としての免疫機能への指標になると思われる。

今後、抗MIP-1 α 抗体により免疫染色を行い、ケモカイン産生細胞の局在化を検討していきたい。そしてこれらの結果を総括してナノマテリアルの感染影響の標的細胞が明らかになると考えている。

E. 結論

1. MWNT-7曝露マウスでは、RSウイルスによる肺炎が増悪化していた。
2. MWNT-7の影響は持続することが明らかとなった。
3. 免疫染色により、MWNT-7曝露では初期の炎症誘導が強いことが示唆された。
4. MIP-1 α の産生減少から、マクロファージの応答不具合の可能性が示された。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886. Doi:10.1016/j.etap.2015.02.017

Yoshida, H., Watanabe, H., Ishida, H., Watanabe, W., Narumi, K., Atsumi, T., Sugita, C., Kurokawa, M. Naringenin suppresses macrophage infiltration into adipose tissue in an early phase of high-fat diet-induced obesity. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* (2014) 454, 95-101.

Takeda, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Tsend-Ayush, C., Bumbein, D., Kawahara, S., Muguruma, M., Watanabe, W., Kurokawa, M. Anti-allergic activity of probiotics from Mongolian dairy products on type I allergy in mice and mode of anti-allergic action. *J. Func. Foods* (2014). doi: 10.1016/j.jff.2014.04.013

2. 学会発表

米本敬司、橋口誠子、吉田裕樹、上田智之、明石敏、紺野克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 多層型カーボンナノチュ

ーブ曝露のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜、ポスターP2-022

上田智之、橋口誠子、吉田裕樹、明石敏、米本敬司、紺野克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子曝露のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜、ポスターP2-023

橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子の曝露はRSウイルス感染病態を悪化させる 日本薬学会第135年会、2015.3.27, 神戸、口頭27D-pm18

Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe. Effects of titanium dioxide nanoparticles on the pneumonia in respiratory syncytial virus infected-mice. *EUROTOX2014*, (2014.9.8) (Edinburgh, UK), poster P3-141

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

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)

分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究

分担研究課題名：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	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授
研究協力者：菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長
研究協力者：高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所 毒性部主任室長
研究協力者：山田 耕一	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部大学院生
研究協力者：新垣理恵子	徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部助教

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)の長期におけ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。自己免疫疾患モデルMRL/lprマウスへのMWCNTを腹腔内に投与することにより、慢性的な腹膜炎の状態が継続していることがわかり、腹腔内のマクロファージはM2マクロファージが中心で、各種サイトカインの産生亢進が認められた。自己免疫病変に対してはMWCNT投与により病態が悪化することが明らかとなった。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝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。さらに、カーボンナノチューブの吸入曝露により、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曝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*

の研究は曝露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの曝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投与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。平成24、25年度には、カーボンナノチューブの長期曝露により、末梢でのT細胞分化

(CD4、CD8、Th17)に影響が及ぼされている可能性、サイトカイン分泌に変化が生じる可能性が示された。今年度は自己免疫疾患モデルマウスにカーボンナノチューブを投与することによる免疫制御機構への影響を検討した。

B. 方法

マウス

2ヶ月齢の MRL/*lpr*(雌) (チャールスリバー)を用い、各群 10匹ずつで多層化カーボンナノチューブを腹腔内に投与し、投与後6ヶ月で解析した(図1)。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 を供与された。溶媒として 0.1% Tween80/生理食塩水が用いられ、1 μ g および 10 μ g の MWCNT が腹腔内に注射された。

フローサイトメトリ解析

MWCNT の投与マウスの脾臓、腸間膜リ

ンパ節、腹腔内滲出細胞から単核球を採取し、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後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を経時的に検討した。

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・エオジン溶液あるいはアザン溶液で染色した。

腹腔滲出細胞の解析

マウスの腹腔内を 5ml の PBS で洗浄し、採取した滲出細胞を用いて、フローサイトメトリ解析を行った。さらに、滲出細胞 (5×10^5) を 96 穴プレートにて Lipopolysaccharide (LPS; 0-10 μ g/ml) を用いて 24 時間培養後、培養上清中の各種サイトカイン、ケモカインに関してマルチプレックスキット (Mouse Cytokine 20-Plex Panel, Invitrogen) にて定量化した。

定量化 RT-PCR 法

肝組織から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
CCCCGAGCACC

ELISA 法

血清を用いて、リウマチ因子 (RF)、
ssDNA、dsDNA 抗体を ELISA 法にて定量
化した。測定にはレビス リウマチ因子
IgG 型-マウス ELISA KIT (シバヤギ) を
用いた。ssDNA 及び dsDNA 抗体の検出に
は、ssDNA (Deoxyribonucleic acid, single
stranded from calf thymus Product No;
D8899 Sigma), dsDNA (Deoxyribonucleic
acid form calf thymus Sigma Product
No;D1501 Sigma)を抗原として、プレートに
固相化後、血清を一次抗体、抗マウス
IgG-HRP を二次抗体として通法に従って
自己抗体を定量化した。

C. 研究結果

MWCNT投与による肝臓への影響

8週齢雌MRL/lprマウスに0、1、10 μ g量
のMWCNTを腹腔内投与後、体重は投与
6月までそれぞれの群で有意な差は観察さ
れなかった。

MWCNTの投与による肉眼的変化として、
腹膜の粗造な肥厚、脾臓および腎臓被
膜の白濁に加えて、肝臓の分葉状変化
(図2)が10 μ g投与群5で認められた。また、
肝臓に辺縁部被膜を組織学的に観察する

と、線維の増生がアザン染色により確認さ
れた(図2)。肝臓の重量に関しては
MWCNT投与による変化は観察されなか
った(図2)。

MWCNT投与による肝細胞への影響は
被膜直下では肝細胞の変性、萎縮が認め
られた(図3)。さらに、10 μ g投与群の中に、
胆嚢上皮の増生を伴っているものも見られ
た(図3)。肝臓組織における遺伝子発現の
変化では、MWCNT投与によりTGF- β 、
Col3A、F4/80のmRNA量の有意な上昇が
観察された(図4)。

MWCNT投与によるPECへの影響

MWCNTの腹腔内投与による腹膜炎の
状態を病理組織学的に検討すると、横隔
膜の腹腔側では炎症性細胞浸潤が目立っ
た(図5)。また、MWCNTの腹腔内投与に
よるPECの細胞数は投与により増加するこ
とが分かり(図6上段)、PEC中のマクロファ
ージに着目すると、F4/80陽性CD11b陽性
細胞に変化はないが、その中でCD11c陽
性CD206陰性のM1マクロファージの細胞
数が10 μ g投与群で有意に減少する一方
で、CD11c陰性CD206陽性M2マクロファ
ージが有意に増加することが判明した(図6
上段)。さらに、PECの機能変化を明らかに
するために、PECを24時間LPSで刺激した
ときの培養上清中の各種サイトカイン及び
ケモカインを検討すると、MWCNT投与に
よるMIP-1 α 、KC (CXCL-1)、TNF- α 、IL-6、
IL-12の産生が有意に亢進することが明ら
かとなった(図6下段)。一方で、PEC中のT

細胞及びB細胞分画に関しては、10 μ g投与群でCD8の中で、CD44^{high}CD62L陰性のメモリー型の分画の有意な減少が認められる以外は、大きな変化は観察されなかった(図7)。

MWCNT投与による自己免疫病変への影響

MWCNT投与による各臓器での自己免疫病変への影響を病理組織学的に検討すると、肝臓のグリソン鞘域内の胆管あるいは脈管周囲でのリンパ球浸潤はMWCNT投与により大きな変化は観察されなかった(図8)。腎臓に関しては、間質の脈管周囲へのリンパ球浸潤では10 μ g投与群で病態の増悪が確認された(図9)。さらに、肺の病変でも、10 μ g投与群で、気管支あるいは脈管周囲へのリンパ球浸潤が増悪する傾向があることが判明した(図10)。

自己抗体の変化に関しては、MWCNT投与後3ヶ月での血清中のリウマチ因子(RF)の有意な上昇が観察された(図11)。屠殺時(投与後6ヶ月)でのRF値、ssDNA抗体、dsDNA抗体に関してはMWCNT投与で上昇する傾向にあったが、対象群との有意な差は認められなかった(図11)。

MWCNT投与による免疫系への変化

MWCNT投与による免疫系への影響を検討すると、10 μ g投与群で対象群に比較して、脾重量、脾細胞数が有意に減少していた(図12)。脾臓におけるマクロファージ

の分化を検討すると、CD11b陽性F4/80陽性細胞におけるM1/M2マーカーに関しては、ほとんどの細胞がM1 (CD11c陽性CD206陰性)マクロファージであり、MWCNT投与によりCD206陽性CD11c陽性のM1とM2両方のマーカーを有するマクロファージへの分化が確認された(図13)。また、脾臓におけるT細胞、B細胞分画に関しては、MWCNTの投与により、CD8陽性T細胞の割合、10 μ g投与によりCD19陽性B細胞の割合が増加していた(図14)。また、細胞数ではMWCNT投与によりCD4陽性T細胞数が有意に減少し、CD19陽性B細胞数は、10 μ g投与群で有意に増加していた(図14)。

D. 考察

昨年度までの研究で、正常 B6 マウスへのMWCNT腹腔内投与による長期暴露によって、腹膜および腹腔臓器表層部に反応性の変化が観察され、腸間膜リンパ節の細胞数が減少していた。B6 マウスへのMWCNT長期暴露によってT細胞への影響は確認されなかったが、末梢でのM1マクロファージへの分化が促進していることが判明した。また、末梢でのT細胞のTh17への分化がMWCNT投与で促進することが明らかとなった。これらの結果を踏まえ、今年度は自己免疫疾患モデルであるMRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与を行った。免疫システムが偏った状態のマウスへのMWCNT投与の影響が検討できた。腹膜、腹腔内臓器の被膜での炎

症反応が持続し、慢性腹膜炎の状態であった。高濃度の MWCNT 投与群では肝被膜での線維化、胆嚢上皮の過形成などの病理所見が観察された。腹腔滲出細胞の解析では、MWCNT 投与の影響が、サイトカイン、ケモカイン産生亢進、M2 マクロファージ分化促進に関与していた。

MRL/lpr マウスの自己免疫病変への MWCNT 投与による影響は、肝臓では変化がなかったが、腎臓、肺での炎症性病変を悪化させる傾向にあった。また、自己抗体は投与後 3 ヶ月経過した時点で、RF 値が有意に上昇していたが、5ヶ月から6ヶ月後では有意な差は観察されなかった。MRL/lpr マウスは多彩な自己免疫性病変を呈することが知られており、それぞれの臓器で病態の発症時期が異なっており、自己免疫病態への MWCNT の長期暴露がどの時点で影響しているのかはまだ不明な点が多く、今後更なる検討が必要と考える。

E. 結論

5. MRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与により持続的な腹膜炎が観察された。
6. MWCNTの腹腔内投与により肝臓の被膜での線維化が認められた。
7. MWCNTの腹腔内投与によってPECでのマクロファージはM1への分化が確認された。
8. PECのケモカイン、サイトカインの産生は

MWCNTの腹腔内投与により亢進していた。

9. MRL/lprマウスの腎臓、肺の自己免疫病変はMWCNT暴露で、増悪することが判明した。
10. リウマチ因子はMWCNT暴露後3ヶ月で有意に上昇していた。
11. MRL/lprマウスへのMWCNTの腹腔内投与により脾臓においてCD4T細胞、B細胞数に影響があった。

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.* 2015 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.* 2015 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.
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
都

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