

平成27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

「多層カーボンナノチューブの吸入暴露で誘発された肺毒性のメカニズム研究」

研究分担者 相磯 成敏 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部長

研究協力者 梅田 ゆみ 日本バイオアッセイ研究センター
妹尾 英樹 日本バイオアッセイ研究センター
高信 健司 日本バイオアッセイ研究センター
齋藤 美佐江 日本バイオアッセイ研究センター

研究要旨

日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）で実施したラットを用いたMWNT-7の吸入暴露によるがん性試験で、 $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ 以上で肺癌の発生増加を認めた。しかし、MWNT-7を吸入暴露した肺の気道や肺胞上皮の反応や肺胞壁を経由したMWNT-7のクリアランスなど発がん作用様式（MOA）の上で未解明な点が多い。MWNT-7の肺発がんMOAを解明する一端として、発がん性試験と同一の吸入暴露装置でラットにMWNT-7を曝露し、気道や肺胞の上皮に生じる組織反応と肺胞壁を経由するMWNT-7の体内移行を検討することとした。本年度は病理組織学的検査を中心に検索を実施した。その結果、肺内に吸引されたMWNT-7に対する異物処理機構として細気管支や肺胞表面で幼若上皮細胞の増生と器質化組織中へのMWNT-7の埋め込み、これに伴う増生した2型肺胞上皮細胞から1型肺胞上皮細胞への変化、毛細血管の新生など肺のガス交換機能の確保を目的とした肺胞構造の再構築が示唆された。一般に考えられている肺胞壁を経由するMWNT-7の体内移行が行われている証拠は認められず、肺内に吸引されたMWNT-7の処理機構として新たな仮説を提案した。MWNT-7による肺発がんには、異物処理機構での2型肺胞上皮細胞の増生との係わりが疑われた。

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）のひとつであるMWNT-7がラットに肺を標的とした発がん性を有することが明らかとなった（日本バイオアッセイ研究センター、2015）。MWNT-7は生体内で高い耐久性を有することから、ヒト健康障害へのリスク評価では吸入経路で肺内に吸引されたMWNT-7に対する肺組織の反応と肺内外でのMWNT-7の動態を解明する必要がある。昨年度の本分

担研究では、MWCNTエアロゾルの大規模吸入暴露装置を用いてラットにMWNT-7の全身吸入暴露実験を実施した。MWNT-7の曝露濃度はJBRCによる発がん性試験と同じ 2.0 または $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ とし、曝露期間は最長で4週（6時間/日、5日/週）とした。また実験開始から3ヶ月で屠殺する回復群を併設した。

昨年度は全身吸入暴露の実施と解剖及び肺の採材までを実施し、本年度は、MWNT-7の肺発がんMOAを解明する一端として、昨年

度の吸入曝露実験で採材して保存した肺のサンプルに対して詳細な病理組織学的検査を実施し、気道や肺胞の上皮に生じる組織反応と肺胞壁を經由するMWNT-7の体内移行の実態を調べた。

B. 研究方法

昨年度に実施したラットへのMWCNTの全身吸入曝露方法及び解剖と採材までの方法にの詳細については昨年度報告を参照。実験デザインと供試動物数等について図1と表1に示した。

動物は雄性F344/DuCr1Cr1jラット（清浄度：SPF、生後4週齢）を日本チャールス・リバー（株）から購入した。飼料は30kGy- γ 線照射滅菌済みCRF-1固型（オリエンタル酵母工業（株）を、飲水はフィルターろ過、紫外線照射した市水（神奈川県秦野市水道局供給）をそれぞれ自由摂取させた。

（吸入曝露と動物の飼育管理の詳細については、昨年度の報告を参照）

B-1 病理組織学的検査

今年度は2mg/m³群について詳細な病理組織学的検索を実施してMWNT-7を吸入曝露した肺に起こる病理組織変化のプロファイルを把握することとした。病理組織学的検索以外に詳細な検索が必要な病変について、免疫組織化学的検索や超微細形態学的検索を実施した。

(1) 病理組織学的検索

全動物のパラフィン包埋による肺のHE染色標本を作製して光学顕微鏡による病理組織学的検査を行った。肺組織中のMWNT-7の詳細観察では、背景をマイヤーのヘマトキシリンで淡く染色した免疫染色標本と100倍の対物レンズを多用した他、偏光装置

も利用した。

(2) 免疫組織化学的検索

一次抗体は以下のものを使用した。

- CD-68（ED-1、マクロファージ）
- RM-4（マクロファージ）
- SP-C（2型肺胞細胞）
- CC-10（クララ細胞）
- Vimentin（間葉系細胞）

製造・販売元、希釈倍率等の情報は表2参照。

(3) 超微細形態学的検索

病理組織学的検査に使用した組織標本から目的とする部位のエポキシ樹脂包埋・超薄切切片を作製して、透過型電子顕微鏡によるダイレクト検索を行った。

光顕標本からのダイレクト電顕検索の手順（図2）

- ① 光学顕微鏡下で超微細形態学的に検索する部位を選定。
- ② カバーガラスをはずし、切片をオスミウム酸で固定、切片の上にエポキシ樹脂のせて浸透、重合。
- ③ 実体顕微鏡下で確認をしながら、HE染色標本上の目的の部分にエポキシ樹脂の台座を接着。
- ④ 目的の組織をスライドガラスから剥ぎ取る。
- ⑤ 超薄切、電子染色（酢酸ウラン・鉛）
→ 観察（JEM 1400、加速電圧：80KVolt）

C. 研究結果

C-1 病理組織学的検査

病理組織学的検索の結果を表3に示し

た。MWNT-7 2mg/m³の曝露で、肺に以下の変化が認められた。

- ① MWNT-7の沈着
- ② マクロファージ (MWNT-7 貪食/非貪食)
- ③ 細気管支上皮過形成
- ④ 2型肺胞細胞増生
- ⑤ 限局性線維化
- ⑥ 肉芽腫性変化

なお、炎症性細胞浸潤は認められなかった。

① MWNT-7の沈着

MWNT-7の沈着は3日曝露から実験期間を通して一貫して認められ、4週曝露群と4週曝露一回復群で沈着の程度が増強していた。また、病理組織検査では、肺組織に沈着・定着したMWNT-7は吸入曝露期間に応じて累積されているという所感をもった (表3)。

② マクロファージ (MWNT-7 貪食/非貪食)

- MWNT-7の沈着は3日曝露から実験期間を通して一貫して認められ、1週曝露以降で程度が増強した (表3)。MWNT-7 貪食/非貪食については、貪食されていない MWNT-7についても仔細に観察すると繊維の端にマクロファージが取り付いている様子が認められた (図 3)。このため、MWNT-7 貪食/非貪食を厳密に鑑別することは不可能であり、両者を包括したマクロファージ (MWNT-7 貪食/非貪食) として診断した。
- 対照群の肺胞マクロファージは、3日曝露、1週曝露、2週曝露に相当する時期では抗 CD-68抗体に対して概ね陰性で、4週曝露群及び4週曝露回復群で一部の細胞が陽性になっていた。これに対し

て MWNT-7 2mg/m³曝露群では3日曝露から抗 CD-68抗体陽性であった (図5)。

- MWNT-7曝露動物におけるマクロファージの動態を免疫組織化学的に抗 CD-68抗体で調べた。その結果、肺胞壁内に抗 CD-68抗体陽性マクロファージは認められず、気管支周囲リンパ組織 (BALT) とその周囲の間質に多数の CD-68抗体陽性マクロファージが認められた (図6)。

③ 細気管支上皮過形成

- MWNT-7 2mg/m³曝露群で細気管支上皮に多層化が散在して認められた (図7)。一部に小型で核・細胞質比が大きい裸核状の細胞が密集した症例も見られ、この状態の核は肉芽腫性変化での核が密集した像に類似していた (図7、15、16)。
- 2週曝露群に、既存の細気管支上皮とそこに沈着した黒色繊維状物質が、新生細気管支上皮下に被覆された像が認められた。この黒色繊維状物質が MWNT-7であることを透過型電子顕微鏡による病理組織標本のダイレクト検索で確認した (図4、8)。
- 3日曝露群に細葉中心領域で MWNT-7が増生した上皮組織内に埋没している像が観察された (図9上段)。連続切片を免疫組織化学的に CD-68 (マクロファージ)、CC-10 (クララ細胞)、SP-C (2型肺胞細胞) の抗体で検索した結果、CD-68に陽性反応は見られず、CC-10では周辺部に陽性所見が認められ、クララ細胞由来の可能性も考えられた。
- 1週曝露群に細葉中心領域の肺胞で MWNT-7を貪食したマクロファージが増生した細胞集団に囲まれている像が観察された (図9下段)。連続切片を免疫

組織化学的にRM-4(マクロファージ)、CC-10(クララ細胞)、SP-C(2型肺胞細胞)の抗体で検索した結果、MWNT-7を貪食したマクロファージにRM-4陽性所見が見られたが、それを取り囲む piled up した増生組織の頂部にCC-10陽性反応が認められたことから、ここで増生した細胞集塊はクララ細胞由来である可能性が示された。

④ 2型肺胞細胞増生

肺胞管とその周囲の肺胞で増生している細胞の集団が見られ、SP-C(2型肺胞細胞)の抗体で検索した結果陽性反応が認められたことから、これらの増生細胞は2型肺胞細胞に由来することが示された(図10、11、12)。グレード1+及びグレード2+とした症例を図10に示した。増生している細胞集団でSP-C陰性の細胞は2型肺胞細胞から1型に分化したものである可能性が考えられた。

⑤ 限局性線維化

軽度な限局性線維化が曝露2週以降に一貫して認められた(表3)。この変化は肺胞管に小結節性病変として認められ(図13)、4週曝露の症例に対して行った透過型電子顕微鏡による検索ではMWNT-7を包埋した線維化が進行した変化であることが示された(図14)。この線維形成病変は肺胞管の一部に限局されたもので肺内に広汎な病変を形成する線維化病変と区別するため、限局性線維化と診断した。

⑥ 肉芽腫性変化

多数のMWNT-7を包み込む異物巨細胞に類似した組織が実験開始から3ヶ月に動物を屠殺した4週曝露一回復群に認められた(表3、図15)。連続切片を免疫組織

化学的にRM-4(マクロファージ)、CC-10(クララ細胞)、SP-C(2型肺胞細胞)、vimentin(間質)の抗体で検索した結果、MWNT-7を囲むように多数の核が集簇した肉芽腫様の組織ではCD-68に対して弱い陽性反応が認められたが、異物巨細胞とする程の強い陽性反応は示されなかった。ここで示された弱いCD-68陽性反応はマクロファージの残渣が反応したものと考えられた。一方、抗vimentin抗体には多くのMWNT-7を包み込む様に広汎な陽性反応が示され、線維状に濃く反応するところも見られた。こうした小結節性病変部ではMWNT-7を包埋する膠原線維の形成が進んでいると考えられた。この肉芽腫性病変を形成する異物巨細胞の核に類似した細胞質に極めて乏しい小型細胞は、2週曝露群での2型肺胞細胞の増生や4週曝露群の細気管支上皮の過形成でも認められた(図16)。肺胞管の部位に生じる肉芽腫性変化の他にも、肺胞壁では上皮の下の均質で透過性のある組織中にMENT-7が埋没する所見(図17)がみられた。さらに2型肺胞細胞の増生とともに毛細血管の分布が通常よりも多い(図18)という所感を抱いたが、HE染色標本で既存の血管と新生血管の区別が困難であるため病理組織学的検査では所見として取り上げなかった。

D. 考察及び結論

吸気の流れに乗って肺内に吸引されたMWNT-7の処理機構として次のような仮説が考えられる。肺細葉の各方向からマクロファージがMWNT-7を貪食しながら肺胞の壁面伝いに肺胞管の周囲の肺胞内に多数集簇し、それらMWNT-7を貪食したマクロファージの一部が終末細気管支から細気管支を粘液線毛運動で肺外に排泄される。終末細気

管支から細気管支を遡上する途上で一部の MWNT-7 貪食マクロファージは細気管支分岐部に存在するリンパ装置 (BALT) からリンパ流路を介して肺外に移行する。肺胞管の周囲の肺胞内に集族した MWNT-7 貪食マクロファージで終末細気管支の粘液線毛運動の流れに乗れずに、肺胞管周囲の肺胞内に留まったものは増生する気道系上皮に覆われると死滅、融解する (アポトーシスに陥ると推定)。その場に残存した多数の MWNT-7 は大量のコラーゲンに埋没、器質化によって処理される。本実験でみられた限局性線維化や肉芽腫性病変はこの過程の一部に相当するものと考えられる (図19)。

こうした病変部の表層では肺のガス交換機能の確保を目的として増生した2型肺胞細胞から1型肺胞細胞への変態、毛細血管の新生などの肺胞構造の改築が行われると考えられる。

MWNT-7による肺発がんには、2型肺胞細胞の増生がベースになっている可能性が高く、上記の異物処理機構で2型肺胞細胞の増生をマクロファージが誘導する可能性が示唆された。MWNT-7曝露群では暴露3日から2型肺胞細胞の増生が認められ、マクロファージに抗 CD-68抗体陽性反応が認められた。一方、暴露3日の対照群には2型肺胞細胞の増生は認められず、マクロファージの CD-68免疫染色も陰性であった。このことから、MWNT-7の曝露によるマクロファージの活性化 (CD-68陰性から陽性への変化) と2型肺胞細胞の増生に何等かの関係があるとする、マクロファージが2型肺胞細胞を標的とする増殖因子を産生する可能性も考えられた。この点について今後の検証が必要である。

本実験で生じた肉芽腫性変化について次のように考える。気道終末部や肺胞管周囲の肺胞の内腔に充満するように

MWNT-7 貪食マクロファージ集族、これを気道終末部の幼若細胞や2型肺胞細胞由来とする上皮系細胞が増生して肺胞内に封じ込める。マクロファージはアポトーシスによる融解を起し (アポトーシスについては今後の検証が必要)、貪食によって集積された多数の MWNT-7 がその場に取り残される。この取り残された多数の MWNT-7 を大量の膠原線維が包み込み、器質化組織内に封じ込めると考えられる。本実験でも限局性の線維化が曝露2週から、肉芽腫性変化が実験開始から3ヶ月を経過した回復群の動物に認められている。また、透過型電子顕微鏡で曝露4週の症例には MWNT-7 の周囲にしっかりとした膠原線維の形成が観察されている。これらの結果は時間経過に沿った線維化、器質化の流れに符合するものであった。

さらに、この限局性線維化病変には線維芽細胞の増生がほとんど認められないことから、増生した上皮系細胞が膠原線維を産生している可能性も考えられ、上皮系細胞による膠原線維の産生についても今後の研究による検証が必要となる。

以上、本分担研究では、MWNT-7を吸入曝露したラットの肺の気道上皮や肺胞上皮に生じる組織反応と肺胞壁を経由する MWNT-7 の体内移行について研究した。その結果として、一般に考えられている異物処理機構とは異なる図19に示すマクロファージと肺の上皮系細胞のコラボレーションによる MWNT-7 の清掃・集積と MWNT-7 の埋め立てという異物処理機構が存在すると考えられた。また、この異物処理機構の中で、肺のガス交換機能の確保を目的とした肺の組織構築の改変が平行して行われていることが示唆された。MWNT-7曝露動物におけるマクロファージ

の動態では、MWNT-7を貪食したマクロファージの一部が終末細気管支から細気管支を粘液線毛運動で肺外に排泄され、その移動の途上で一部の MWNT-7貪食マクロファージは細気管支分岐部に存在するリンパ装置 (BALT) からリンパ流路を介した肺外への移行が示唆された。一方、一般に考えられている肺胞壁を経由する MWNT-7の体内移行が行われている証拠は認められなかった。この異物処理機構の仮説は、その一部を今年度開催された第47回日本臨床分子形態学会学術集会並びに第32回日本毒性病理学会学術集会で発表しながら大枠を組上げてきたが、さらなる研究による証拠の積み上げによる検証が必要とされる。次年度は、今年度提唱した仮説に関して JBRC による MWNT-7のラットを用いた吸入による発がん性試験との比較検討も視野に入れた検証を行い、針状 MWCNT のみならず粒子状異物による肺組織への有害性評価に寄与できる基礎研究を進める。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Tatsuya Kasai, Yumi Umeda, Makoto Ohnishi, Hitomi Kondo, Tetsuya Takeuchi, Shigetoshi Aiso, Tomoshi Nishizawa, Michiharu Matsumoto, and Shoji Fukushima. Thirteen-week study of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology*, Vol. 9, 413-422(2015)

高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英

樹、齋藤美佐江、片桐卓、伊川直樹、峰多加志、武信、晴佐久満、松本道治、福島昭治. F344/DuCr1Cr1jラットの自然発生腫瘍. *産業衛生学雑誌*, Vol. 57, 85-96(2015)

Shigetoshi Aiso, Makoto Take, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Yumi Umeda, Michiharu Matsumoto and Shoji Fukushima. Inhalation Carcinogenicity of Dichloromethane in Rats and Mice. *Inhalation Toxicology*. Vol. 26, 435-451(2014)

Hideki Senoh, Taku Katagiri, Kenji Takanobu, Yumi Umeda, Shigetoshi Aiso and Shoji Fukushima. Spontaneous Harderian Gland Adenocarcinoma in a Female F344 Rats: A Case Report. *J. Toxicologic Pathology*. Vol. 27, 139-142(2014)

2. 学会発表

齋藤美佐江; 酒井俊男; 笠井辰也; 梅田ゆみ; 相磯成敏; 福島昭治、ラット気道上皮に認められた多層カーボンナノチューブに対する異物反応、第47回日本臨床分子形態学会学術集会、長崎大学医学部、2015.9

相磯成敏、高信健司、片桐卓、妹尾英樹、梅田ゆみ、福島昭治、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の4週間吸入暴露によりラットの肺に沈着した MWCNT 処理に係わる病理組織学的変化、第32回日本毒性病理学会学術集会、かがわ国際会議場、2016.1

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

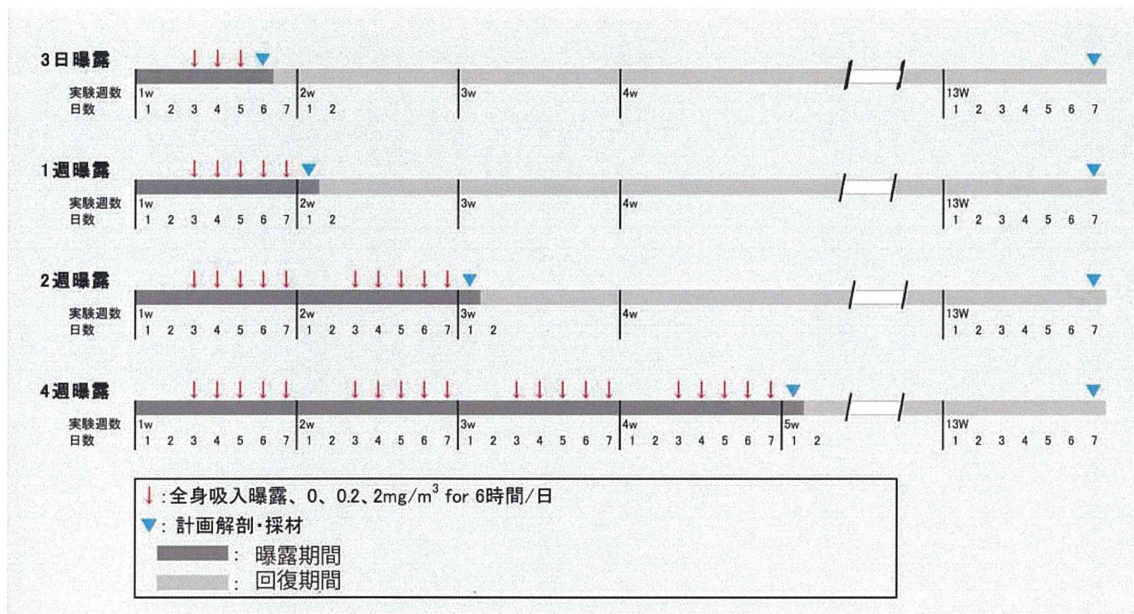


図1 実験デザイン

表1 実験デザイン (詳細)

曝露濃度	曝露	主要目的	解剖・採材	
			曝露翌日	初回曝露後90日
0 mg/m ³ (対照群)	3日 6時間/日 x3日	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	1週間 6時間/日x5日・5日/週	細胞増殖活性・病理	5匹	—
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	2週間 (6時間/日x5日/週)x2週	細胞増殖活性・病理	5匹	—
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	4週間 (6時間/日x5日/週)x4週	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	5匹
総計 155匹				

表 2 免疫組織化学的検査：一次抗体

Primary antibody	Company	Target tissue	Dilution	Antigen retrieval
CD68 (ED-1)	Serotec Product	Macrophage	1:500	Critate buffer Ph6
Macrophage/ Dendritic cell (RM-4)	Trans Genic	Macrophage	1:200	None
Clara cell protein	Bio Vendor	Clara cell	1:1000	None
SP-C (FL-197)	Santa Cruz Biotechnology	Type 2 cell, surfactant protein C	1:100	Proteinnase K

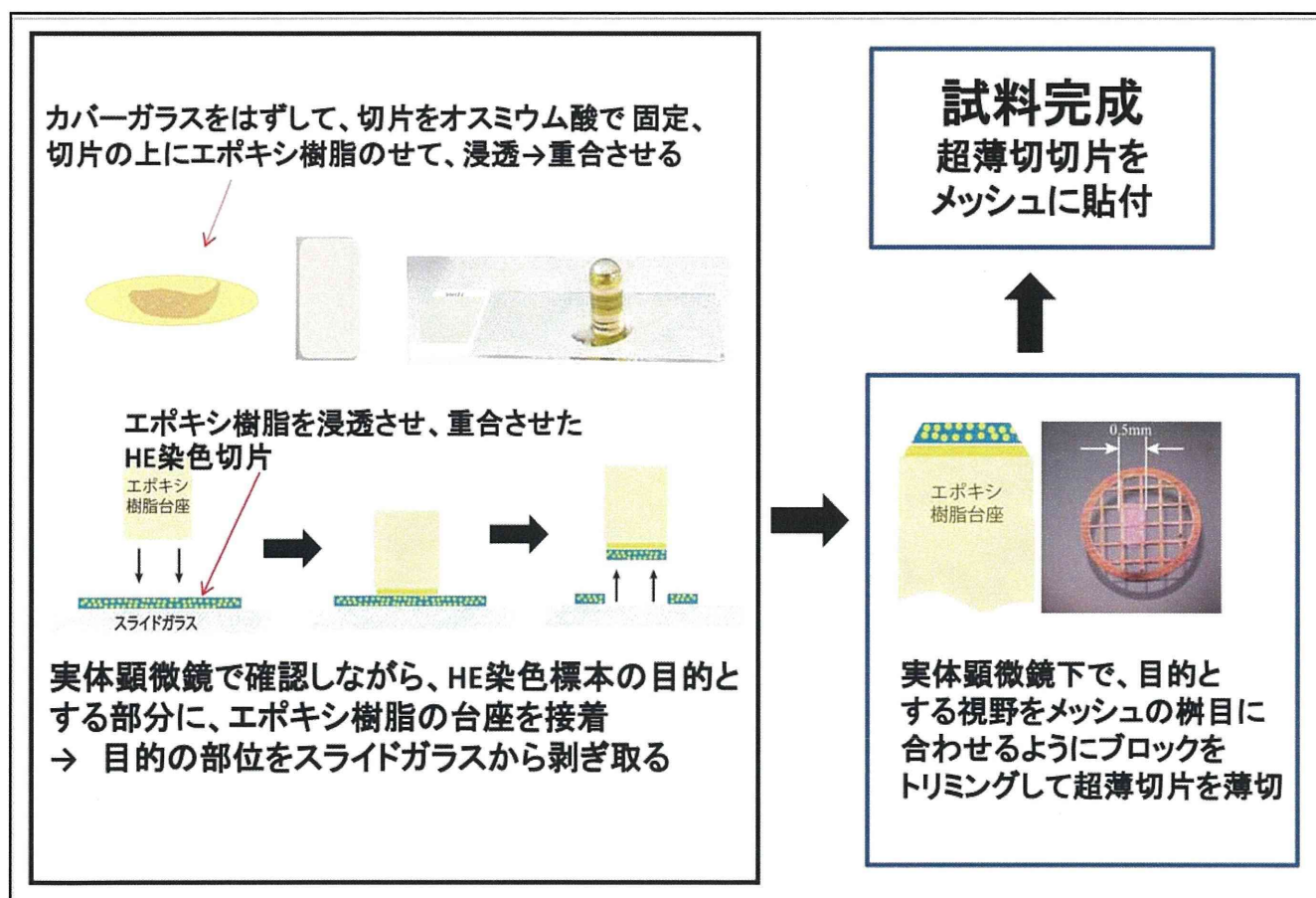


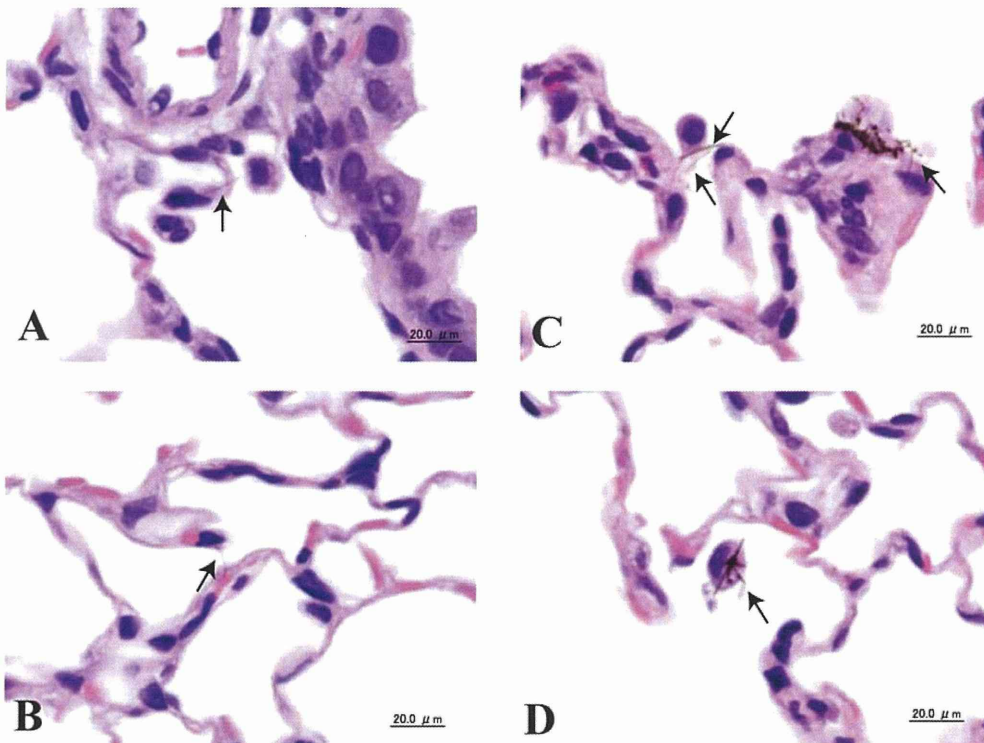
図 2 光顕標本から電顕試料作製法

表 3 病理組織学的検査結果

	3日暴露	1週暴露 (5日)	2週暴露 (5日/週 x 2)	4週暴露 (5日/週 x 4)	4週暴露-回復群*
0mg/m³ 曝露群 (対照群)					
<検索動物数>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
MWNT-7の沈着	0	0	0	0	0
マクロファージ**	0	0	0	0	0
炎症性細胞浸潤	0	0	0	0	0
細気管支上皮過形成	0	0	0	0	0
2型肺胞細胞増生	0	0	0	0	0
肉芽腫性病変	0	0	0	0	0
限局性線維化	0	0	0	0	0
2mg/m³ 曝露群					
<検索動物数>	<5>	<5>	<5>	<5>	<5>
MWNT-7の沈着	5 (1+: 5)	5 (1+: 5)	5 (1+: 5)	5 (2+: 5)	5 (2+: 5)
マクロファージ**	5 (1+: 5)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 3, 2+: 2)
炎症性細胞浸潤	0	0	0	0	0
細気管支上皮過形成	5 (1+: 5)	5 (1+: 5)	5 (1+: 2, 2+: 3)	5 (1+: 4, 2+: 1)	1 (1+: 1)
2型肺胞細胞増生	5 (1+: 5)	5 (1+: 4, 2+: 1)	5 (1+: 3, 2+: 2)	5 (1+: 4, 2+: 1)	2 (1+: 2)
肉芽腫性病変	0	0	0	0	3 (1+: 3)
限局性線維化	0	0	1 (1+: 1)	4 (1+: 4)	4 (1+: 4)

*: 回復群は実験開始3ヶ月後に計画解剖

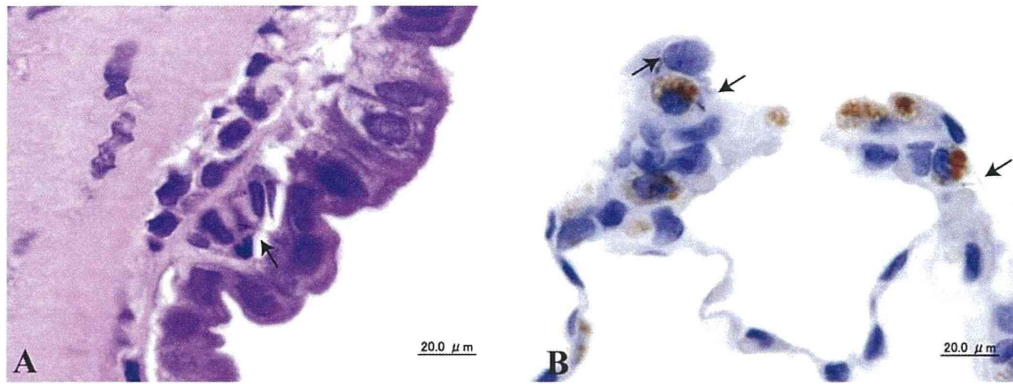
** : マクロファージ: MWNT-7食食/MWNT-7非食食
所見グレードは対照群を基準とした



2mg/m³ 3日曝露群 HE 染色、(動物番号 1201)、対物 100 x,

3日暴露では肺の組織上に載った繊細な MWCNT (矢印) を明瞭に認識できる (A, B, C, D)

図 3 MWNT の沈着: 2mg/m³ 3日曝露群



A 2mg/m³ 1週曝露群、HE染色、対物100x

矢印：既存上皮に沈着したY字状黒色繊維状物質

⇒ 透過型電子顕微鏡による検索でY字状黒色繊維状物質がMWCNTの構造を持つことを確認した。

B 2mg/m³ 2週曝露群、SP-C免疫染色、対物100x

矢印：MWNT-7、⇒ 焦点が合わずMWNT-7は組織中に埋没していると推察。

⇒ 組織に沈着したMWNT-7をHE染色標本で発見するのは困難であるが、マイヤーのヘマトキシリンで細胞質を淡く染色した免疫染色標本を100倍の対物レンズ装着顕微鏡で観察することでMWNT-7を認識することが比較的容易であった。

図 4 MWCNTの沈着：2mg/m³ 2週曝露群

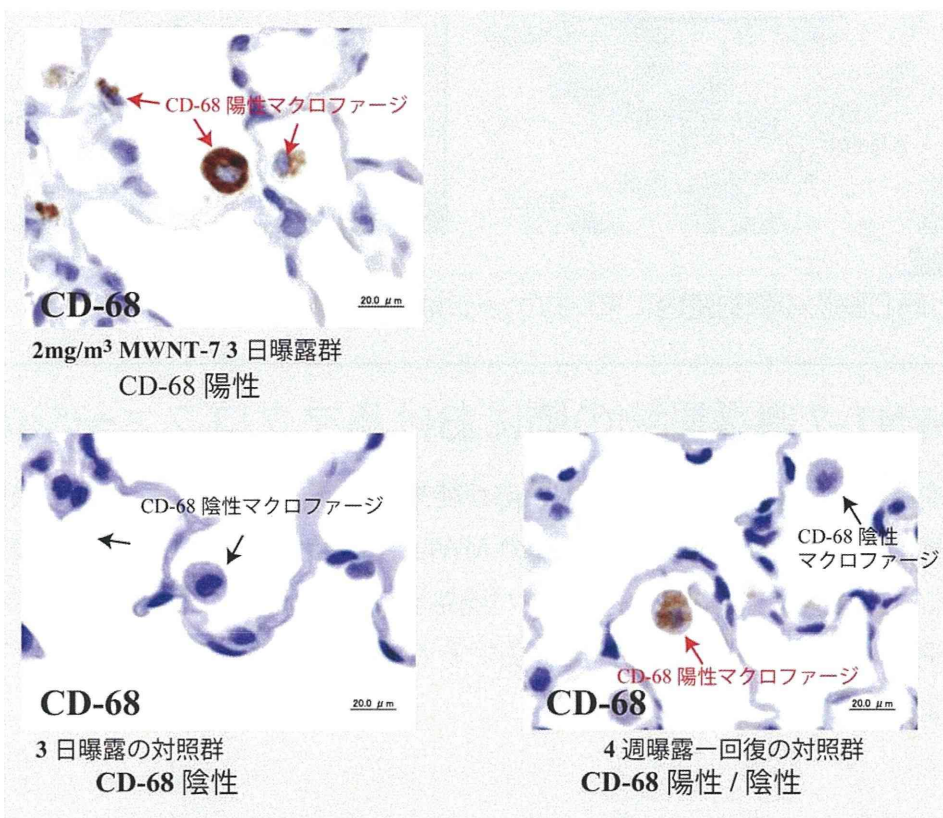


図 5 MWNT-7曝露によるCD-68の誘導

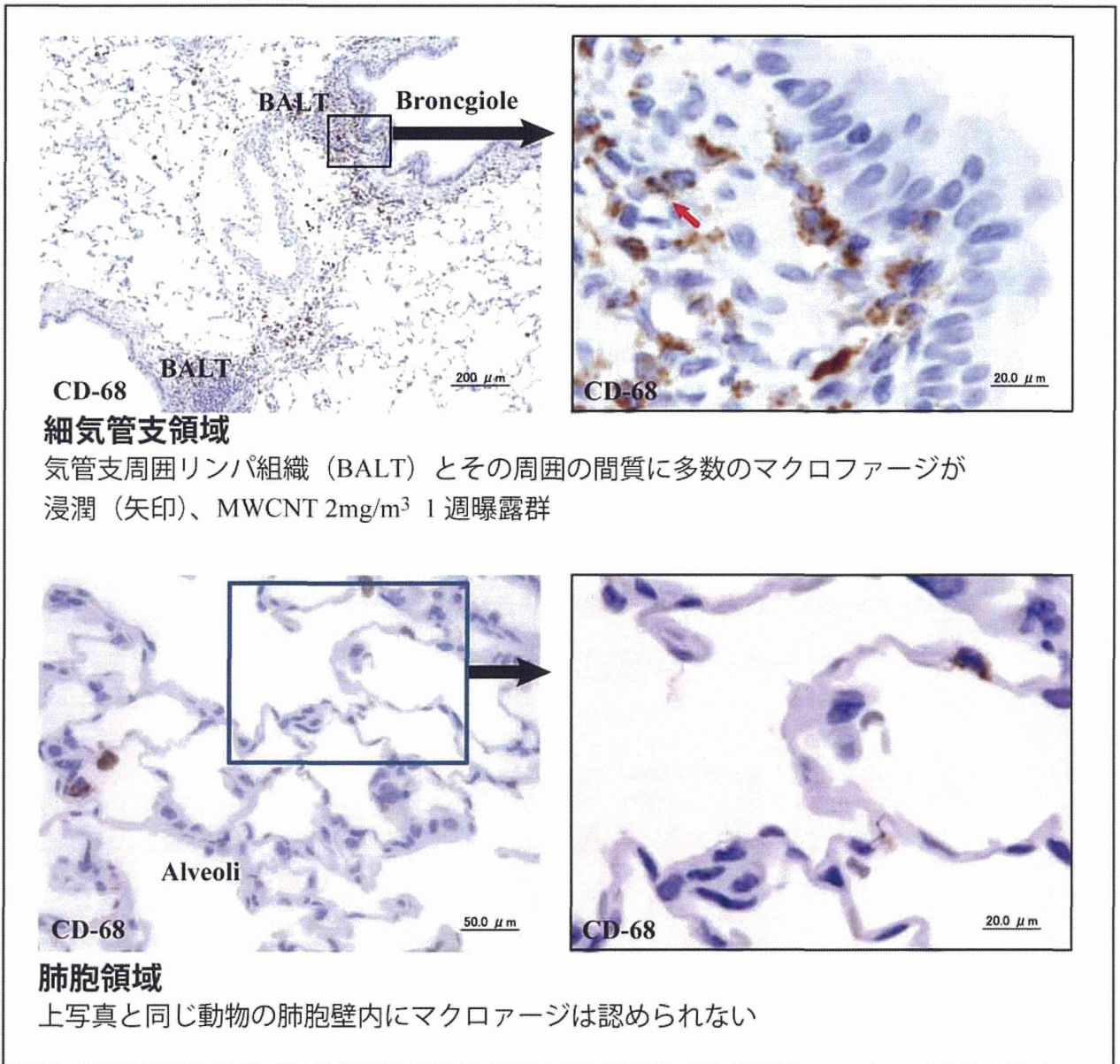


図 6 MWNT-7 曝露動物の肺におけるマクロファージの動態

MWNT-7 を貪食したマクロファージの一部が終末細気管支から細気管支を粘液線毛運動で肺外に排泄され、その移動の途上で一部の MWNT-7 貪食マクロファージは細気管支分岐部に存在するリンパ装置（BALT）からリンパ流路を介した肺外への移行が示唆された。一方、一般に考えられている肺胞壁を経由する MWNT-7 の体内移行が行われている証拠は認められなかった。

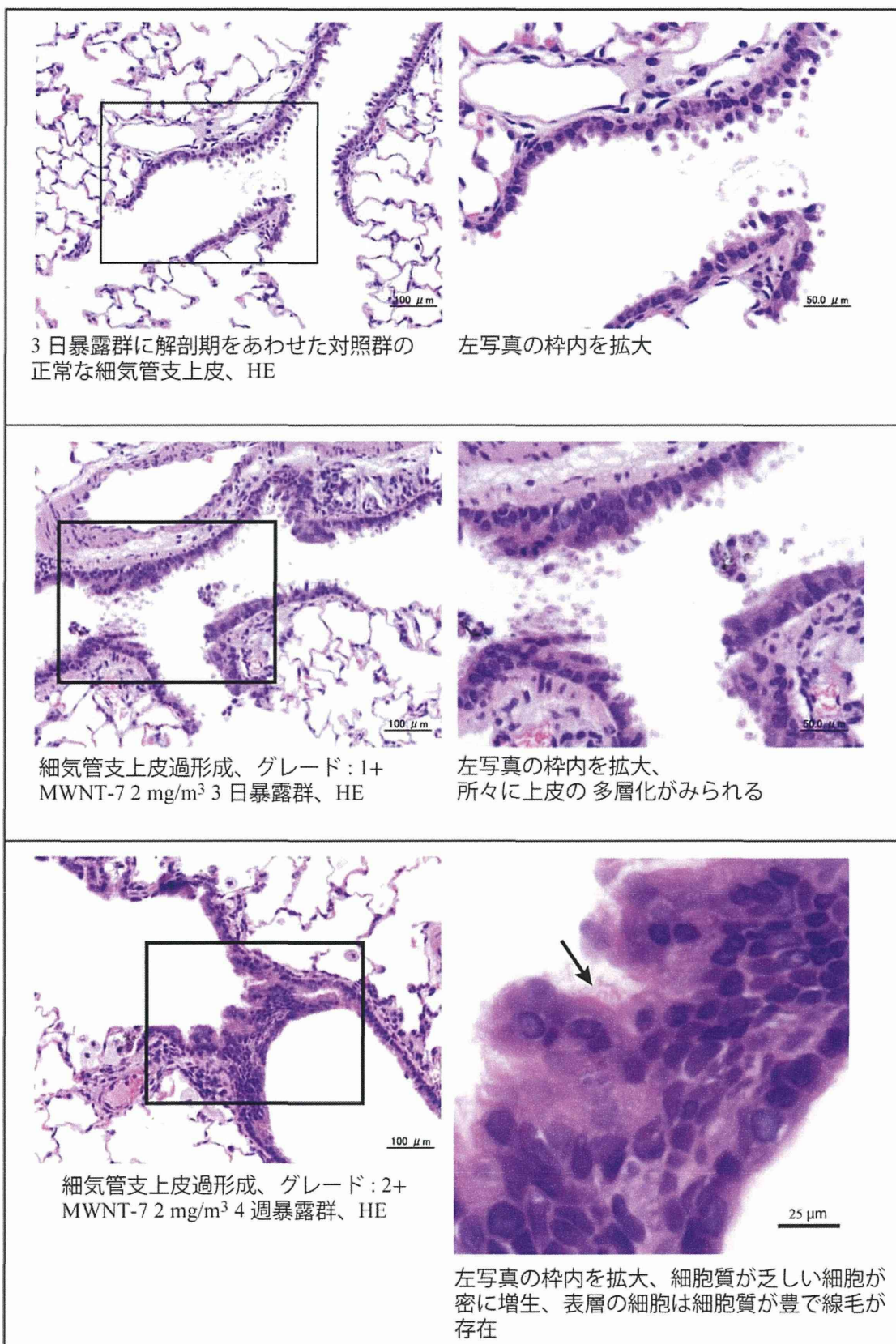


図 7 細気管支上皮過形成：MWNT-7 2 mg/m³ 曝露群

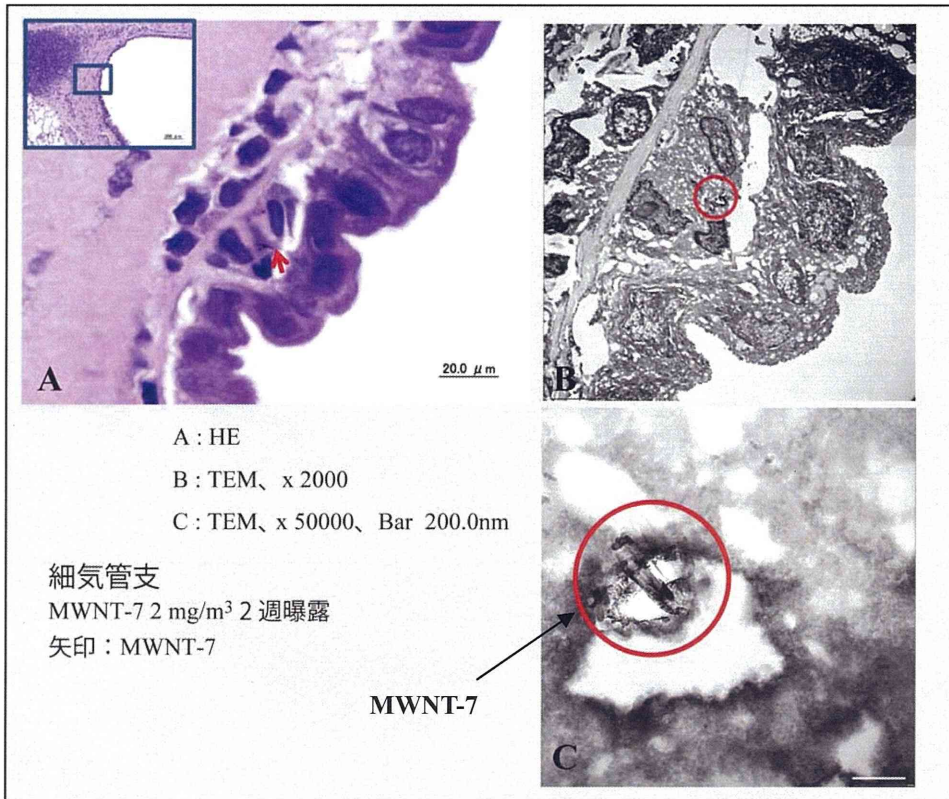


図 8 細気管支の新生上皮による MWNT-7 の被覆

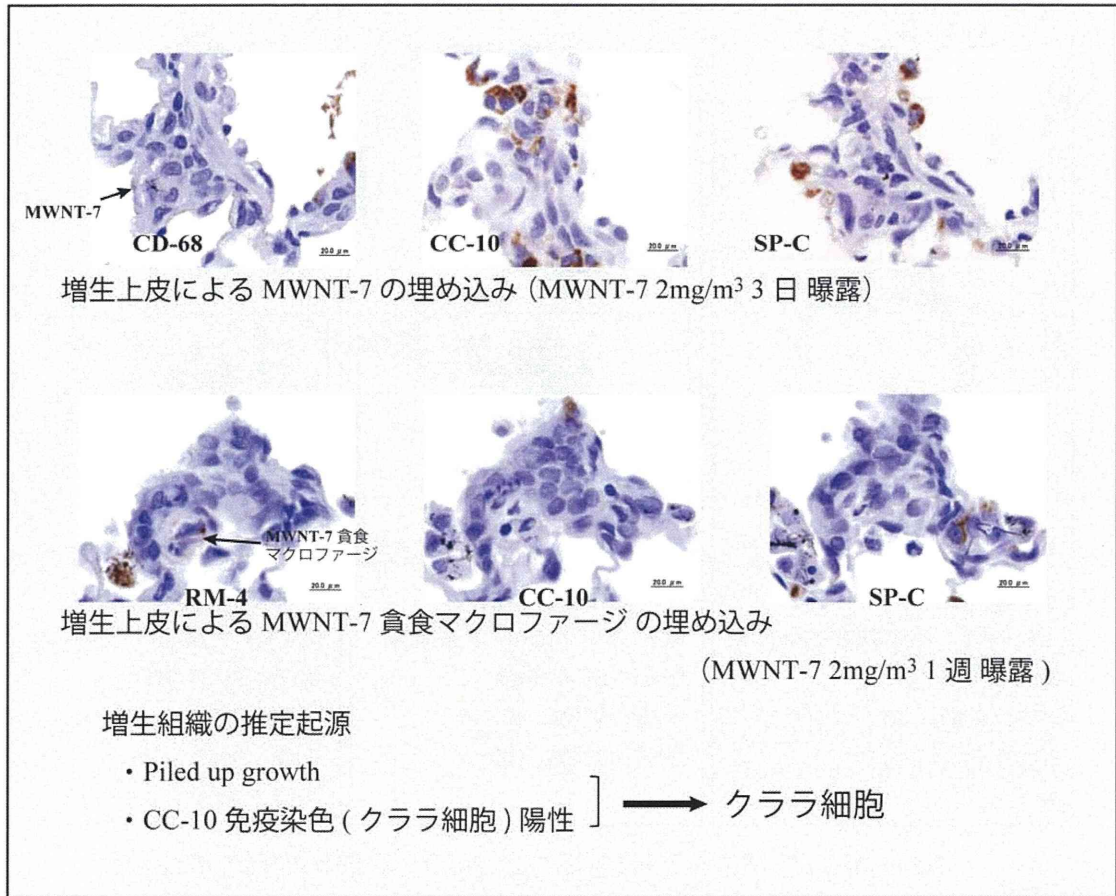


図 9 細葉中心域での増生上皮による MWNT-7 と MWNT-7 貪食マクロファージの埋め込み

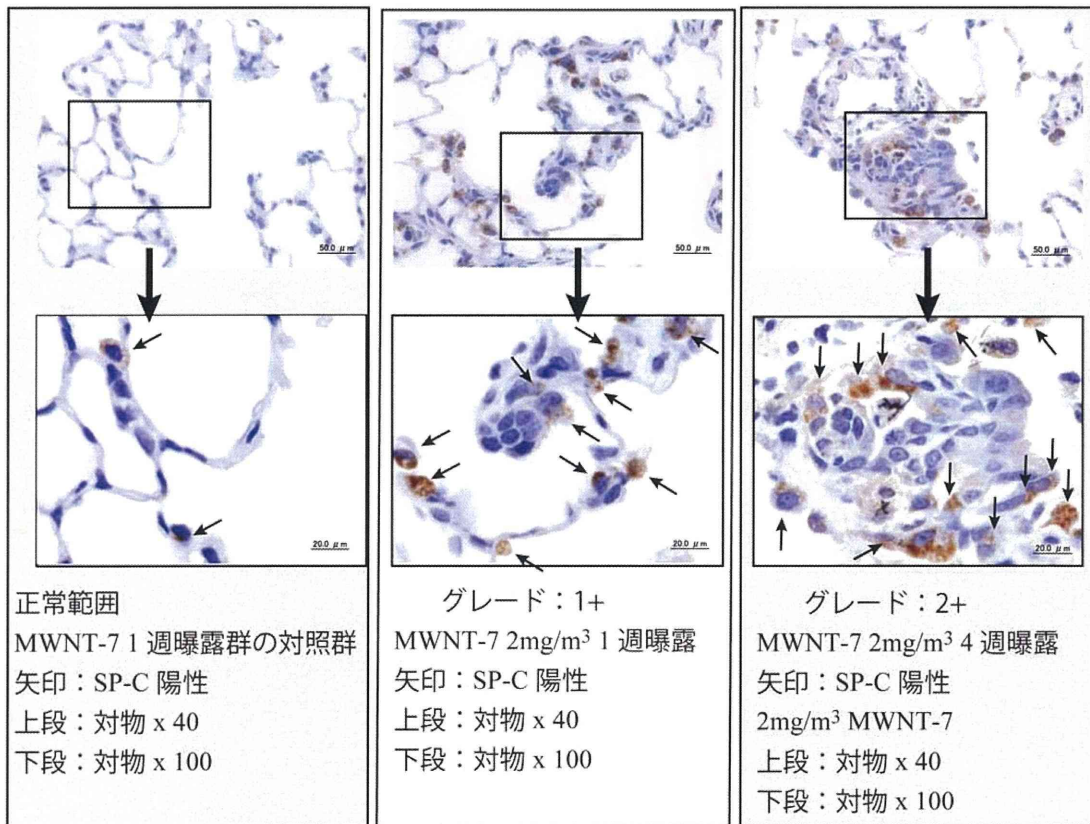


図 10 MWNT-7 の吸入曝露による 2 型肺胞細胞の増生

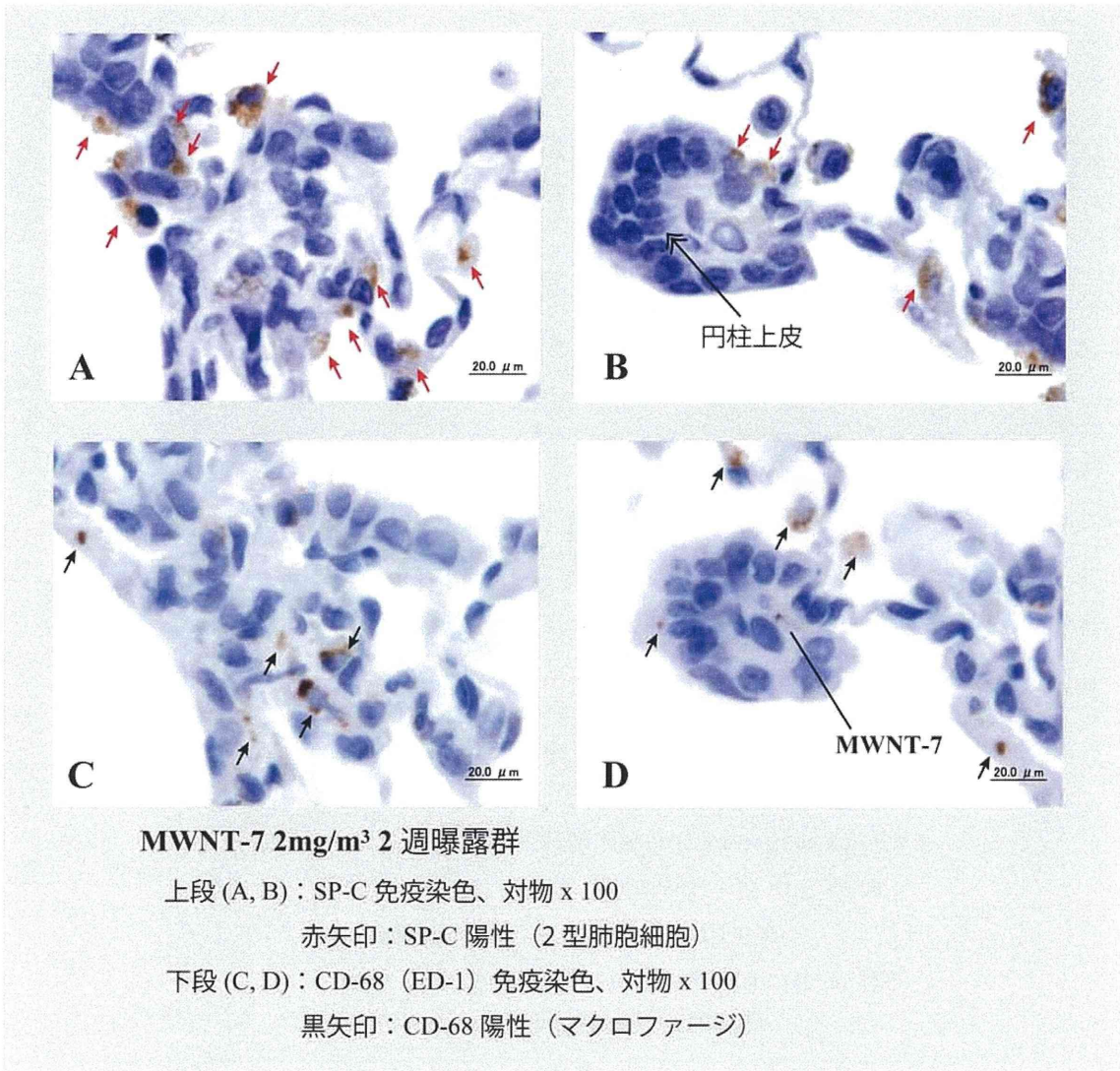


図 11 MWNT-7 2mg/m³ 曝露群に認められた増生組織の 免疫組織化学的検討：増生細胞の種類の特定

増生している細胞の種類を特定することを目的として、連続切片に抗 SP-C (2型肺胞細胞) と抗 CD-68 (ED-1、マクロファージ) 抗体で免疫染色を行った。

⇒ 一部の細胞が2型肺胞の特異抗体である SP-C に陽性を示し (上段 A, B)、円柱上皮の配列をとるなど上皮性の特徴が認められた。CD-68 陽性に反応を示したのは細胞残渣のみ (下段 C) あるいはほぼ陰性 (下段 C) であることから、2型肺胞細胞が増生している細胞の起源と考えられた。

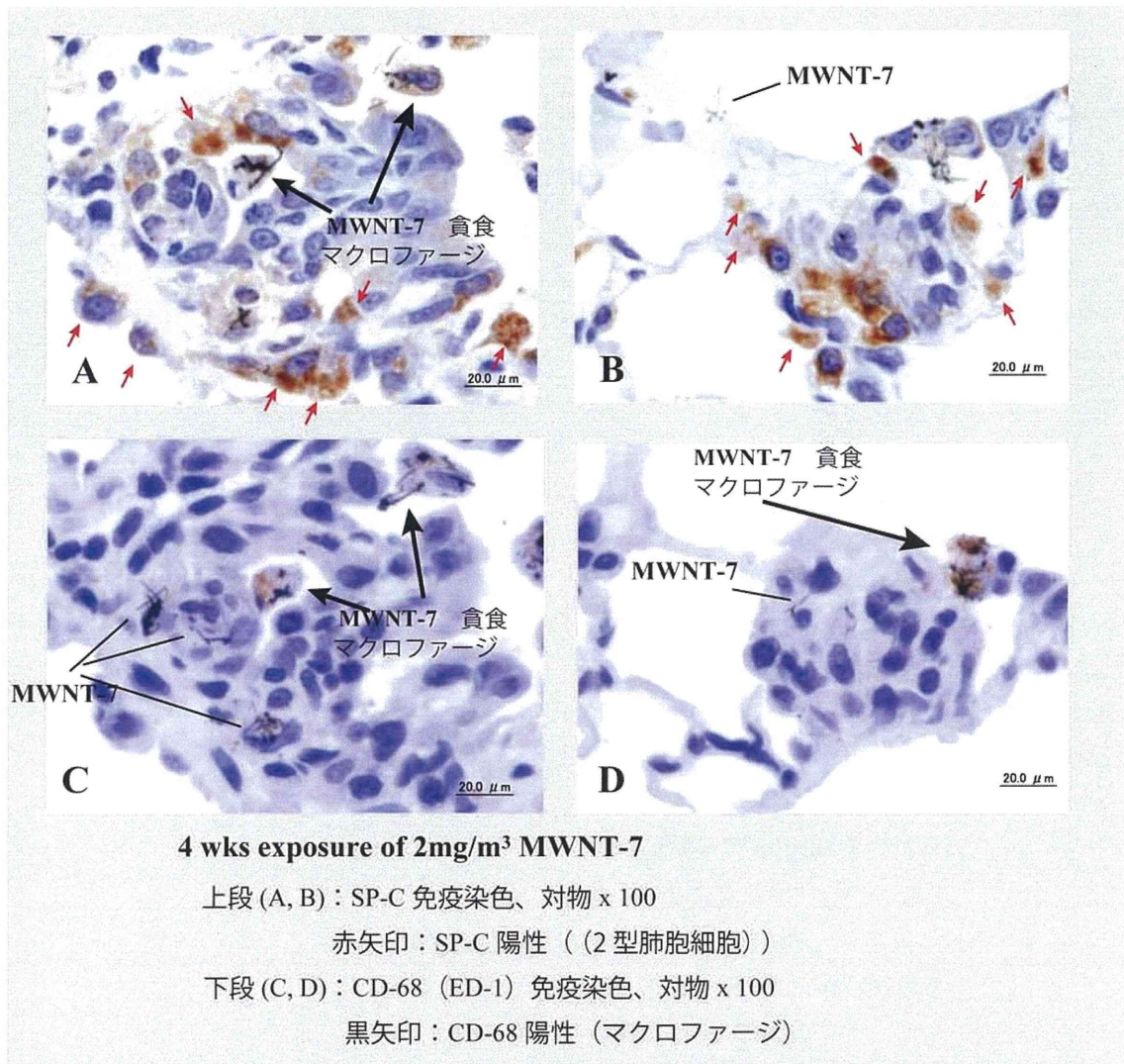


図 12 MWNT-7 2mg/m³ 4 週曝露群に認められた増生組織の免疫組織化学的検討：増生細胞の種類の特定

増生している細胞の種類を特定することを目的として、連続切片に抗 SP-C (2 型肺胞細胞) と抗 CD-68 (ED-1、マクロファージ) 抗体で免疫染色を行った。

⇒ 多くの細胞が 2 型肺胞の特異抗体である SP-C に陽性を示した (上段 A, B)、マクロファージの CD-68 陽性反応は弱く痕跡程度 (下段 C, D) であることから、MWNT-7/MWNT-7 貪食マクロファージの周囲で増生している細胞は 2 型肺胞細胞起源であり、増生組織中の MWNT-7 貪食マクロファージは壊死・融解 (アポトーシスと推定) に陥っていると考えられた。

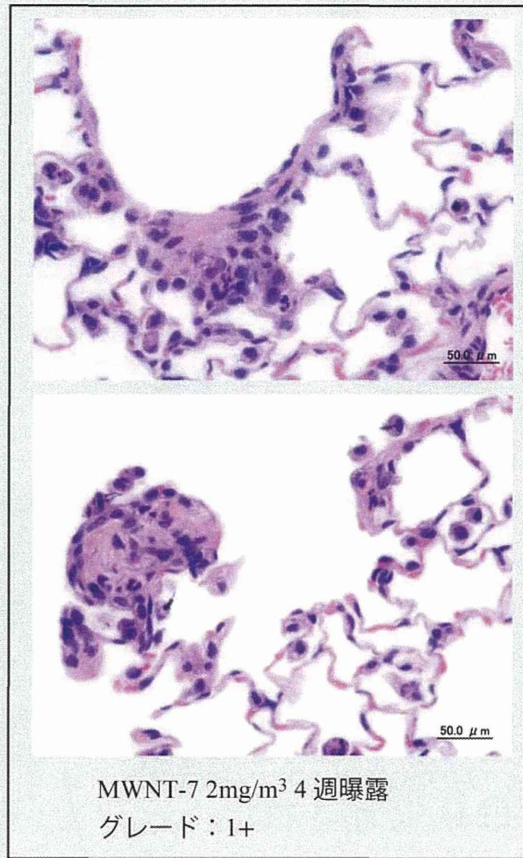
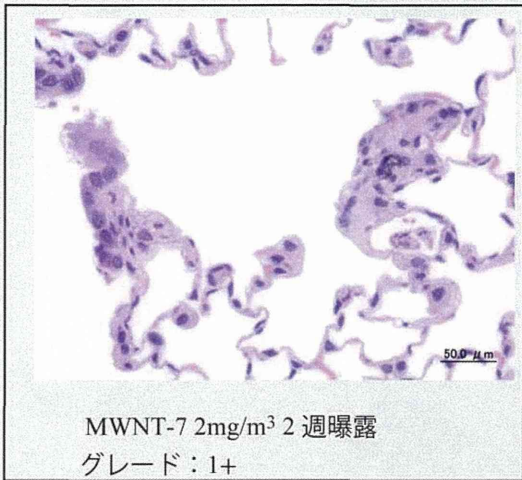


図 13 限局性線維化 (線維形成)

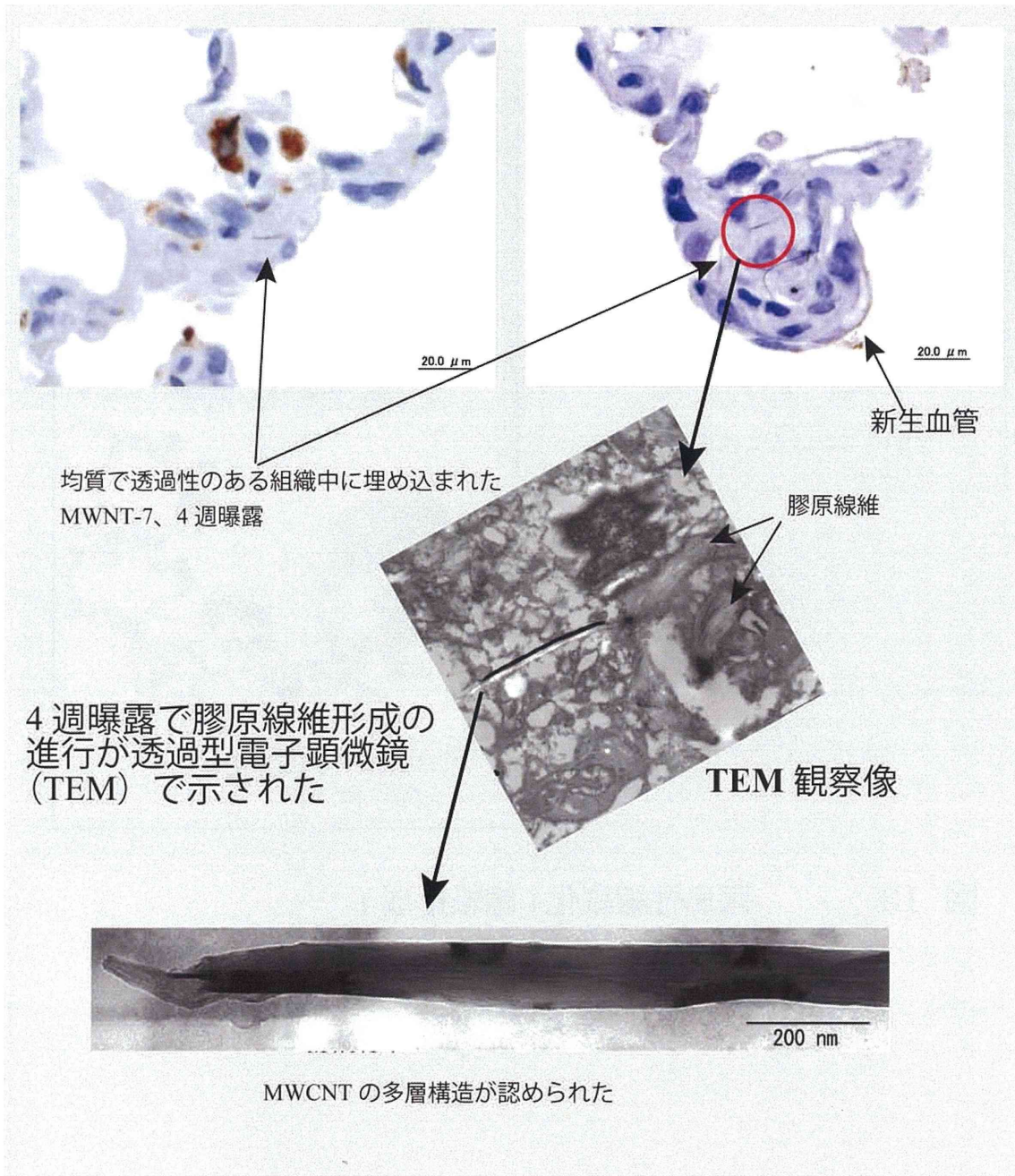


図 14 線維形成による MWNT-7 の埋め込み