

平成26-28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
総括研究報告書

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 -
(H26-化学一般-003)

研究代表者 今井田 克己

香川大学 医学部 医学科 病理病態・生体防御医学講座 腫瘍病理学 教授

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアルの毒性評価を人の現実的な暴露経路である全身暴露吸入試験法を用いて実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。ナノマテリアルは多くの産業に貢献する革新的な基盤技術としてその応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害防止のために並行して進められるべき有害性評価は十分ではない。ナノカーボン技術で先駆的役割を果たしている日本において、国際競争力を保持しつつナノマテリアルの継続的な進展のためにも、基礎的定量的な毒性評価の確立が急がれる。本研究班では、先行研究 [H20-化学一般-006] においてマウス腹腔内投与モデルにより中皮腫発癌性を明らかにした多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を事例対象として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化する Taquann 直噴全身吸入装置を独自開発しナノマテリアルの全身吸入暴露の基盤技術を整備した。Taquann 法処理を行った MWCNT を吸入暴露したマウスの肺では、肉芽種性病変を欠き、単繊維による均一で広範囲な病変が誘発され、その一部は胸腔に達し壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。本システムは原理的に他のナノマテリアルに適応可能な汎用性も備え、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。本研究班では、ナノマテリアルの全身暴露吸入試験 (以下、吸入試験) による評価を更に推進するため、Taquann 法及び Taquann 直噴全身吸入装置を用いたマウス吸入試験を MWCNT と酸化チタンについて実施した。並行して、日本バイオアッセイ研究センターにおいて開発された吸入暴露装置を用いたラット吸入試験を実施した。本装置は MWCNT (MWNT-7) の 2 年間ラット発がん性試験を GLP 試験として実施した実績を有する。本研究では、上記二つの吸入暴露装置によりナノマテリアルの中で産業応用が進んでいる MWCNT 及び酸化チタンについて吸入試験を行い、組織負荷量、病理組織学的評価 (光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価にわたり、計画的経時解析により、腫瘍性及び非腫瘍性の組織病変の同定、それらの形成に関連する病態の急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みた。

Taquann 法及び Taquann 直噴全身吸入装置では、MWCNT とは大きく性状が異なる酸化チタンについても、同様の手法により吸入暴露試験が可能であった。マウスの知見からは、分散性の高いナノマテリアルを吸入させた結果、生体内に長期間留まり持続性の炎症反応を

引き起こす可能性を示した。マクロファージが重要な役割を担っており、慢性炎症によって誘発される増殖性の腫瘍性病変の評価をより長期に亘って実施する必要がある。また、マウスの免疫系への影響を調べた結果、MWCNT 暴露後 1 年を経過した肺組織では散在性の肉芽腫病変に加え肺胞壁の肥厚、間質の線維化の亢進が観察された。肺胞マクロファージの M1/M2 比は MWCNT 暴露で有意に上昇していた。M1 マクロファージに関連する遺伝子発現は MWCNT 暴露後、長期間の経過によって変化が見られなかった。MWCNT 暴露によって MMP-12 産生肺胞マクロファージが増加することが判明し、マクロファージを介した肺組織の線維化機構が示唆された。ラットの知見から、MWCNT の長期吸入暴露ではラットの生涯に渡り肺胞上皮の細胞回転が亢進状態にある中で、加齢とともに DNA の修復エラーが累積して II 型肺胞上皮由来の腫瘍化を促進したものと推察された。

本研究において使用した Taquan 法と Taquann 直噴式システムは、ナノマテリアルの吸入試験における課題を克服した吸入試験方法であることが示された。分散性の高いナノマテリアルを用意し、人体にとって重要であると想定される暴露様式に即した全身暴露吸入を実施することで、事前に毒性情報の存在しない新規のナノマテリアルについての、遺漏のない吸入毒性評価が可能になると期待される。

研究体制

研究代表者

今井田克己 香川大学医学部医学科 病態病理
生態防御医学講座 腫瘍病理学 教授

研究分担者

相磯 成敏 中央労働災害防止協会・日本バイオ
アッセイ研究センター・病理検査部
部長

石丸 直澄 徳島大学大学院医歯薬学研究部
教授

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所・安全性
生物試験研究センター・毒性部 室
長

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアル(以下、ナノマテリアル)の毒性評価を、人で想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入毒性試験法(以下、吸入試験)を用いて実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。

ナノマテリアルは多くの産業に貢献する革新的な基盤技術として注目されており、製品開発

への応用が急速に進展している。一方で、製造者及び製品利用者の健康被害防止のために並行して進められるべき有害性評価はそれに比較すると十分ではない。ナノカーボン技術で先駆的役割を果たしている日本において、国際競争力を保持しつつナノマテリアルの継続的な進展のためにも、人へ外挿性の高い基礎的定量的な毒性評価の確立が急がれる。

ナノマテリアルに限らず、従来、粉体の吸入暴露実験は、検体毎に粉塵発生装置の開発と工夫が必要であり、時間と費用を要することから大規模な実験施設に限られてきた。そのため、多種に及ぶナノマテリアルの評価に気管内投与等の簡便法が多く用いられてきた。しかし、人が吸入することが想定されるナノマテリアルの分散状態と異なること、そのために惹起される肺病変の質が異なるとの指摘があった。すなわち、ナノマテリアルは容易に凝集体を形成し、ナノマテリアル原体を投与すると凝集体による毒性病変が誘発され、個々のナノ粒子の毒性を必ずしも反映しないことが指摘されてきた。

そこで、本研究班では、先行研究[H23-化学一般-005]において凝集体/凝固体を除去し高度に分散した乾燥検体を得る方法(Taquann 法)及

び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置(Taquann 直噴全身吸入装置)を独自に開発し、国立医薬品食品衛生研究所環境保全型動物飼育棟内(26号館)に設置した。この際に事例対象とした検体は、先行研究[H20-化学一般-006]において中皮腫発癌性の検討に用いた多層カーボンナノチューブ(MWCNT)であるが、本システムは原理的に他のナノマテリアルに適用可能な汎用性も備え、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。並行して、日本バイオアッセイ研究センターにおいて開発された吸入暴露装置を用いたラット吸入試験を実施した。本装置はMWCNT(MWNT-7)の2年間ラット発がん性試験をGLP試験として実施した実績を有する。

本研究では、ナノマテリアルの中で産業応用が進んでいるMWCNT及び酸化チタンについて吸入試験を行い、組織負荷量、病理組織学的評価(光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価にわたり、計画的経時解析により、腫瘍性及び非腫瘍性の組織病変の同定、それらの形成に関連する病態の急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みた。

B. 研究方法

B-1. マウス全身暴露吸入試験と組織負荷量の測定

検体は、MWCNT(MWNT-7、三井物産)及び酸化チタン(MT-500B、テイカ)を用いた。検体はTaquann法処理を行い、Taquann直噴全身吸入装置によりマウス(系統;C57BL/6NcrSlc、野生型、p53+/-)に対照群、低用量群(1mg/m³)、高用量群(2mg/m³)の構成で1日2時間、合計10時間の吸入試験を実施した。長期観察と計画的定期解剖を行い各研究分担者に生体試料を供給した。

酸化チタンはテイカ株式会社のMT-500B(一次粒子径35nm、ルチル型、表面処理なし)を使用した。Taquann法による分散方法の検討の後、Taquannシステムによる吸入実験の条件を確立し、

マウスに吸入させた。

MWCNTについては、原末(U-CNT)と、Taquann法処理検体(T-CNT)を、マウスに質量濃度を約2mg/m³の同等の条件で全身暴露吸入し、肺に沈着した繊維の量と長さを経時的に測定し比較した。

並行して、難溶性粒子の反復吸入曝露では経時的に肺沈着量が増加していくため長期間の吸入曝露では過負荷の影響が懸念される。そこで本研究では、MWCNTを事例対象として肺負荷量のC_{max}を一定の範囲にとどめ、曝露期間中のAUCが均一になるプロトコルでの曝露方法を検討した(高橋)。

B-2. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価(マウス)

MWCNTまたは、酸化チタンを吸入させたマウスの肺胞上皮の変化や増殖性病変をInternational Harmonization of Nomenclature and Diagnostic Criteria (INHAND)に従った病理組織学的評価を行った。

病理組織学的評価はHE染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡を用いて行った。極小の針状構造物であるT-CNTは通常の光学顕微鏡では観察しにくく、その存在がと捉えにくいいため、偏光顕微鏡による観察も合わせて行った。さらに、SP-C、CC10、CD68、CD3、calretininによる免疫組織化学染色を行い、HE染色標本の組織構築と免疫組織学的特性について比較検討し、増殖性の腫瘍性病変の発生母地の評価、組織球系細胞の浸潤様態を評価した(今井田)。

B-3. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価研究(ラット)

MWCNTの肺発がん機序についてより詳細な検討を進めるため、ラットの吸入試験を、OECD化学物質テストガイドライン451(がん原生試験)にGLP対応した試験実績がある日本バイオアッセイ研究センター(JBRC)にて実施し、

肺発がんMOAを解明する一端として、吸入暴露実験を実施し、肺の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経由するMWNT-7の体内移行の実態を調べた。

吸入暴露実験は、雄性F344/DuCrjラットを使用し、乾式篩分け分級機構を組み込んだ大規模吸入施設で、JBRCによる発がん性試験と同じ0、0.2、2 mg/m³の濃度で1日6時間の暴露を実施した。暴露期間は最長で4週(6時間/日、5日/週)とした。また実験開始から3箇月で屠殺する回復群を併設した。また、先の発がん性試験でラットの肺に誘発された前腫瘍性及び腫瘍性病変の病理組織学的特徴の詳細検索も実施した。具体的には、定法に従ってパラフィン包埋により肺のHE標本、免疫組織化学染色(CD-68、SP-C、CC-10、E-カドヘリン、TTF-1)、超微細形態学的検索、並びに8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG)を指標とした酸化ストレスの状態の把握を行った(相磯)。

B-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

マウスを用い、ナノマテリアルを吸入後の各種免疫担当細胞の分画の変化を経時的に観察するとともに、吸入後長期間での免疫システムへの影響を多角的なアプローチにより解析した。具体的には、対照群、低用量群(1 mg/m³)、高用量群(2 mg/m³)の構成で1日2時間、合計10時間の吸入試験を実施した野生型C57BL/6マウスを対象に、経時的なフローサイトメトリー解析、病理組織解析、蛍光色素標識抗体による共焦点顕微鏡解析及び定量化RT-PCR法による解析を実施した。組織のサンプリングは吸入暴露後1箇月、6箇月及び12箇月に実施した。

フローサイトメトリー解析では、末梢血並びに、頸部リンパ節、脾臓、肺胞洗浄液から採取した単核球を対象に実施した。

末梢血では、リンパ球表面マーカーとしてCD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44及びCD62Lを対象に解析を行った。

頸部リンパ節、脾臓、肺胞洗浄液から採取した単核球に対しては、リンパ球表面マーカーとしてCD45.2、CD11b、F4/80、CCR2(CD192)、CD206を対象として解析した。

病理組織解析では、パラフィン包埋標本のHE染色、アザン染色標本並びにcollagen type IV抗体による免疫染色を行い観察した。また、肺組織の凍結切片を作成し、F4/80、MMP-12に対する抗体染色及びDAPIにて核染色を行い、共焦点顕微鏡により解析した。

定量化RT-PCR法解析では、肺、脾臓から抽出したmRNAを対象とし、MCP-1、iNOS、Arginase-1、IL-1 β 、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、IL-10、IL-13、IL-5、TGF- β 1、Col3A、Col IV、MMP-2、MMP-9、MMP-12、TIMP-2、TIMP-3及び β -actinの発現を調べた(石丸)。

倫理面への配慮

本研究における動物実験の使用は、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成19年6月1日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)及び所属の研究機関が定める規定;香川大学では香川大学動物実験委員会が定める香川大学動物実験規則(平成19年2月1日)、国立医薬品食品衛生研究所では国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成19年4月1日)、日本バイオアッセイ

研究センターでは日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会が定める動物実験等に関する規定（平成 24 年 4 月 25 日）、徳島大学では徳島大学動物実験管理規則（平成 24 年 3 月 21 日）を遵守した。動物実験については、動物愛護に関する法律、基準、指針及び所属研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を遵守した。

C. 研究結果

C-1. 全身暴露吸入試験と組織負荷量の測定

先行研究により Taquann 処理した MWCNT は有効数字一桁の精度で 3×10^6 本/ μg 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。p53 \pm マウスに 1 日 2 時間、週 1 回を 5 回反復した際の平均暴露濃度は $2.5 \text{ mg}/\text{m}^3$ であった。MWCNT の肺沈着量は、暴露終了直後では $4.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ であった。暴露後 13 週では $1.7 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、26 週では $1.3 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、52 週では $1.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ 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

凝集体が肺負荷量に与える影響を調べるため U-CNT と T-CNT を質量濃度が約 $2 \text{ mg}/\text{m}^3$ の同等の条件で暴露を行ったが、MWCNT の肺負荷量の平均値は、T-CNT 群では Day0、Day7 及び 13W においてそれぞれ $8.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $4.4 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.4 \mu\text{g}/\text{動物}$ であるのに対し、U-CNT 群では $4.3 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.6 \mu\text{g}/\text{動物}$ 、 $1.2 \mu\text{g}/\text{動物}$ と、肺に到達する量が U-CNT 吸入では半減していた。これに呼応し、鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着が U-CNT 吸入マウスに多く観察された。肺負荷量が半減した原因の一つとして、U-CNT では鼻腔内に多く補足された可能性が考えられることから、鼻腔内に捕捉された MWCNT の定量的な解析及び形状の観察を行った。

その結果、電子顕微鏡観察では繊維数として計測できない凝集体成分が数多く認められ、測定可能な繊維数からは算出した鼻腔沈着量からは肺負荷量の差異の全てを説明することはできなかった。肺の病理組織評価において大きな差異を見出すことはできなかった。

肺負荷量の C_{max} を一定の範囲にとり、暴露期間中の AUC が均一になるようなプロトコルでの暴露方法の検討では、これまでの研究で得られた肺負荷量の経時変化から暴露条件を計算し、2 時間/日の暴露を 5 日間実施し、その後 13 週毎に暴露を 1 回繰り返すプロトコルで実施した。26 週の時点における実測値は、予測値の約半分であった。

酸化チタンの吸入暴露では、質量濃度は、 $2.3 \sim 3.3 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、CPC の値は $1.1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5$ 個/mL、MMAD は $648 \sim 761 \text{ nm}$ であった。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。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

C-2. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価（マウス）

T-CNT 全身暴露後の 52 週のマウスの壁側胸膜側に、リンパ球浸潤を伴う小肉芽様病変が認められた。同部位の中心部には、偏光で白色に輝く針状物質が確認され、投与した T-CNT の周囲に発生した病変と考えられた。肺の胸膜直下の肺実質から、胸腔内にかけてリンパ球の強い集簇像が認められたが、悪性リンパ腫などで認められるリンパ球の monoclonality は認めなかった。

酸化チタンの全身吸入暴露直後のマウス肺には、細気管支の気管支上皮に接するように、微細な粒状物質を貪食したマクロファージを認めた。CC-10 の免疫染色で CC-10 陽性のクララ細胞の増殖を伴い、粒状物質は CD68 陽性の活性化マクロファージに貪食されていることを確

認した。暴露終了後13週目の肺では肉眼的に顕著な変化は見られず、また、病理組織学的にも変化に乏しく、酸化チタンの全身吸入暴露による影響はほとんど認めなかったが、限局的に肺胞の線維化を伴うリンパ球の集簇像を認め、小肉芽腫様変化と考えた。同部位はCC-10陽性の細胞に変化は見られず、SPC陽性の二型肺胞上皮細胞増生が見られた。また、CD68陽性の活性化マクロファージの集簇像も認めた。ただし、これらの変化はごく限局的に認められたのみであり、酸化チタンの全身吸入暴露後13週での変化としては極軽微な変化であった。

C-3. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価研究(ラット)

暴露終了直後ではII型肺胞上皮細胞の増生がみられたが、2箇月の回復期間後では減少していた。線維化は2週暴露から認められ、4週暴露群と4週暴露後の回復群は同様の線維化であった。肉芽腫様変化は4週暴露群に1匹、4週暴露後の回復群では3匹に増加していた。

肺胞内でMWNT-7貪食マクロファージを囲むように増生する細胞はSP-C陽性の型肺胞上皮細胞と、CD68及びSP-C陰性の細胞であった。SP-Cに弱い陽性反応を示す細胞も認められ、これらは、TTF-1とE-カドヘリンの二重免疫染色の結果、TTF-1陽性細胞、陰性細胞いずれもE-カドヘリン陽性であったことから、上皮系細胞であることが示された。TTF-1陽性・E-カドヘリン陽性細胞は型肺胞上皮細胞、TTF-1陰性・E-カドヘリン陽性細胞は型肺胞上皮細胞であることが示された。CD68及びSP-C陰性の細胞は未熟な型肺胞上皮細胞または、型肺胞上皮細胞から型肺胞上皮細胞に移行した細胞である可能性が考えられた。

TTF-1免疫染色標本で認めたランゲハンス型巨細胞に類似した花環状の核配列がみられる肉芽腫様病変部をTEMで検索して、この病変がマクロファージ由来か、上皮細胞由来かを調べた。花環状に配列する核の外側には細

胞境界と思われる構造の一部が認められ、発達したライソゾームの存在は確認できなかった。肺胞壁に接する最外層にはコラーゲン線維束が認められたことから、増生した上皮系細胞と既存の肺胞壁の間に線維化が起こっていることが示された。内層で核が花環状に配列する部分では、核と核の間に細胞境界と考えられる構造物は認められなかった。

これらのラットの脾臓におけるマクロファージサブタイプを調べたところ、1週間暴露群では $2\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で、TNF- α mRNA発現が有意に増加した。4週間暴露群では、全ての炎症系ケモカイン/サイトカインで用量依存的な増加が認められたが、有意差は認められなかった。回復群では、1週間暴露でTNF- α , IL-1 β , MIP-1 α , MCP-1 mRNA発現が有意に低下したが、4週間暴露群では変化は認められなかった。脾臓のマクロファージ数は、1週間暴露群の0.2及び $2\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度においてM1マクロファージ数が有意に増加した。4週間暴露群ではM1及びM2マクロファージの数に差はなかった。回復群では、1週間暴露群の0.2及び $2\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度と4週間暴露群の $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で対照群よりM2マクロファージが有意に増加した。

発がん性試験でラットの肺に誘発された前腫瘍性及び腫瘍性病変の病理組織学的特徴を詳細に検索したところ、雄の $0.2\text{mg}/\text{m}^3$ 以上の群と雌の $2\text{mg}/\text{m}^3$ 群で肺腫瘍の発生が増加した。肺腫瘍は細気管支肺胞上皮癌及び同腺腫が大多数であり、腺扁平上皮癌、扁平上皮癌及び低分化腺癌が少数発生した。細気管支肺胞上皮癌は肉芽腫等の背景病変を巻き込む浸潤性増殖を示していた。前腫瘍性変化として細気管支肺胞上皮過形成、肺胞上皮過形成及び異型過形成を認めた。これらの腫瘍性及び前腫瘍性病変ではSP-Cに陽性反応を示した。また、また、細気管支—肺胞上皮癌では腫瘍組織内に線維化を伴うことが多く、線維化を起こした部位の上皮成分もSP-C陽性を示した。

MWNT-7 2mg/m³群暴露したラットの肺で8-OHdG形成は対照群と比較して有意ではないが、3日から4週までの暴露期間に応じた僅かな増加を認めた。回復群でのMWNT-7暴露による8-OHdG形成の増加は対照群のレベル以下となった。

2年間の発がん性試験について、詳細に解析を行った。その結果、雄 2mg/m³暴露群で肺腫瘍と過形成の初発例は88週であるが、過形成は100週以降、肺腫瘍は105週に集中していた。雌 2mg/m³暴露群では、肺癌の初発例は99週、過形成の初発例は42週であった。肺腫瘍及び過形成は105週に集中していた。雄 2 mg/m³群で非腫瘍性肺病変では、43週から肉芽腫形成、66週から肺胞壁の線維化による限局性肥厚を認め、85週以降程度が増強した。これらの所見は、終末細気管支肺胞管接合部(BADJ)とその近傍の肺胞に多く見られた。臓側胸膜の肥厚を45週から認め105週の計画屠殺を含めた38%の動物に認めた。

C-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

<暴露後1箇月における検討>

暴露後1箇月の肺では、高用量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などが認められた。低濃度暴露群、対照群では大きな変化は認められなかった。

高用量群の肺胞マクロファージが集簇巣では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。低用量群、対照群では肺胞内のF4/80陽性CD206陰性マクロファージが散在性に見られた。さらに、高用量群では、F4/80陽性CD11c陰性のマクロファージが多く見られ、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、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。

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、高用量群においてF4/80、MCP-1 mRNA発現の亢進、CCR2のmRNA発現の増加傾向が観察された。iNOS、CD206、arginaseのmRNA発現に関しては影響はみられなかった。

頸部リンパ節及び脾臓における免疫担当細胞をフローサイトメータで解析したところ、マクロファージ、樹状細胞、CD8陽性T細胞、CD4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細胞及びROR γ t陽性CD4陽性Th17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。

脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子発現の解析では、高濃度群でF4/80、MCP-1、CCR2、iNOSの発現の亢進がみられた。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明らかとなった。

<暴露後6及び12箇月における検討>

脾臓での免疫細胞分画への影響を確認したところ、CD8⁺T細胞、B細胞には変化は見られなかった。暴露後12箇月での脾臓における高用量群のF4/80⁺マクロファージの割合が減少していた。また、肺胞洗浄中の免疫細胞では、6箇月ではCD8⁺T細胞が増加したが、B細胞の割合は12箇月まで影響は認められなかった。

一方、F4/80⁺マクロファージは暴露後6箇月では影響は認められなかったが、12箇月後ではF4/80⁺マクロファージは加齢変化として減少する中で、高用量群では有意に増加していた。さらに、正常な肺胞マクロファージのマーカーとして知られているF4/80⁺CD11b^{low}分画は加齢的に減少する一方で、12箇月後では高用量群で有意に増加していた。加えて、通常観察されないF4/80⁺CD11b^{high}分画が高用量群において12箇月後に有意に増加していた。また、暴露後12箇月におけるM1 (CD192⁺) あるいはM2マクロファージ(CD206⁺)への分化を確認すると、高用量群では肺胞洗浄液中の発現パターンは脾臓やリンパ節での発現と大きく異なり、M2マクロファージが有意に減少していた。

肺組織における各種マクロファージ関連遺伝子発現への影響を調べたところ、F4/80 mRNA、MCP-1 mRNA、Arg1 mRNA発現は暴露6箇月及び12箇月において影響は見られなかった。CCR2 mRNA発現は暴露後6箇月において上昇した。iNOS mRNA発現に関しては6箇月、12箇月ともに上昇傾向にあった。さらに、CD206 mRNA発現は暴露6か月で上昇したが、12か月では変化が見られなかった。

脾臓における各種マクロファージ関連遺伝子発現に関しては、暴露後6箇月では、各遺伝子発現に影響は認められなかったが、暴露後12箇月でF4/80 mRNA、MCP-1 mRNA、CCR2 mRNA、Arginase-1 mRNAの発現の低下、iNOS mRNAの発現の上昇がみられた。

肺胞マクロファージの細胞数への影響を確認したところ、F4/80⁺マクロファージの割合は高用量群では有意に上昇していた。CD11b^{low}分画は高用量群で有意に増加し、CD11b^{high}分画は、低用量及び高用量群で有意に増加した。肺胞マクロファージでは、高用量群でM1マーカーの上昇に加えM2マーカーの低下が確認され、M1/M2比では、M1マクロファージの割合が増加した。脾臓ではM2マクロファージが増加した。気管支周囲のリンパ節ではM1/M2マクロファージの割合に変化は見られなかった。

肺組織における各種マクロファージ関連遺伝子発現を検討したところ、MCP-1、iNOS、Arginase-1のmRNAの発現レベルに影響はみられなかった。

さらに、肺組織における各種サイトカインについて検討したところ、IL-10、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、IL-10、IL-13に影響は認められなかった。

病理組織学的検索により、暴露後6箇月の肺では、マクロファージの集簇像が低用量群、高用量群で散在性に見られた。暴露後12箇月ではマクロファージの集簇像、肺胞壁の肥厚に加え、アザン染色により気管支周囲の間質における線維化の亢進が認められ、線維化領域の面積を計測すると、有意に増加していた。そのため、肺組織における線維化関連遺伝子の発現レベルを検討したところ、

IL-5、TGF- β 1、ColA2、Col3AのmRNA発現に変化は認められなかったが、Col IV、MMP-12、TIMP2、TIMP3は高用量群で有意に上昇した。Collagen type IVのタンパク発現は免疫組織化学染色により、高用量群の肺胞壁あるいは間質において発現が亢進していることが明らかとなった。肺の線維化に関与するMMP-12の発現細胞を確認したところ、F4/80陽性マクロファージにMMP-12の発現が確認され、MMP-12産生マクロファージ数は有意に増加することが明らかになった。

D. 考察

酸化チタンの吸入実験では、MWCNTで用いた手法を変更することなくエアロゾル化が可能であった。従来、吸入暴露試験では、検体毎に粉塵発生装置の開発と工夫が必要であり、時間と費用を要することから大規模な実験施設に限られてきたが、本研究で確立した手法はこれらの問題を克服し、多種に及ぶナノマテリアルの評価に適用できる基盤技術として利用可能であることが示された。

p53⁺-マウスのMWCNTの肺負荷量測定において、暴露の終了直後では4.2 μ g/動物、吸入後52週では約1 μ g/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。

凝集体・凝固体が吸入暴露に影響を調べるため、MWCNTの原末と、凝集体・凝固体を除去し高分散化処理を行った検体の吸入暴露実験において、質量濃度が同等の条件で暴露を行ったがMWCNTの肺負荷量の平均値はU-CNT吸入では半減していた。これに呼応し、鼻腔粘膜に実体顕微鏡で観察可能な黒色の凝集体・凝固体の沈着がU-CNT吸入マウスに多く観察された。鼻腔内に沈着したMWCNTの繊維長の分布及び沈着量に差異は認められなかった。一方、凝集体とし

て観察される MWCNT の出現頻度は U-CNT 群において高かった。本研究における組織沈着量測定は、単繊維として計測可能な繊維数を基に算出しているため、差が見いだせなかった可能性が考えられる。13 週後における肺組織像においても T-CNT 群と U-CNT 群に大きな差異を認められなかった。しかしながら、肺から除去される MWCNT の量は T-CNT が多いため、トランスロケーションによる慢性影響は T-CNT が強く発現する可能性がある。これまでの研究で、吸入した MWCNT の一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認している。長期間の観察によりその影響を捉えられるかもしれない。

肺負荷量一定となる間欠吸入暴露実験では、初期の肺負荷量はこれまでの実験と同様であったが、13 週後に吸入曝露を 1 回繰り返す条件における 26 週後の肺負荷量は予測値よりも低値であった。本実験の予測モデルでは p53^{+/+} マウスを用いた吸入曝露実験の肺負荷量推移の実験データを基にしているが、野生型マウスでは肺からの MWCNT の除去が速いのもかもしれない。本研究結果を解析し肺負荷量一定となる予測モデルを再考する必要がある。

マウスの吸入試験の肺病理組織評価においては、繊維状のナノ物質である MWCNT、粒状のナノ物質である酸化チタンの全身吸入曝露実験を行い、形状の異なるナノマテリアルによる全身吸入曝露による肺への影響を検討した。その結果、酸化チタンと思われる微細物質を貪食したマクロファージを細気管支上皮に認め、全身吸入曝露実験による有用性を確認した。更に、投与後 13 週の肺に限局的ながらもマクロファージの集簇像を伴う小肉芽様病変の発生を確認し、酸化チタンによる影響と考えられたが、極限同姓で軽微な変化であった。

ラットの吸入試験の肺病変についての検討の結果、MWCNT の連続吸入曝露では MWCNT の肺内沈着が不断に起こるため肺胞内での上皮の再生・MWCNT 貪食マクロファージの崩壊・肉芽形成・線維化組織中への MWCNT の封じ込め

が繰り返し起こると考えられた。肺胞内腔は MWCNT を大量に含む肉芽・線維化組織で充満されるが、その表層は再生型肺胞上皮細胞で被覆され直すため、ガス交換能(肺機能)は維持され、肉芽・線維化組織中に封じ込められた大量の MWCNT は病巣部の陳旧化により沈着部位に固定されて長く肺内に留まると考えられた。また、MWCNT の長期吸入曝露ではラットの生涯に渡り肺胞上皮の細胞回転が亢進状態にある中で、加齢とともに DNA の修復エラーが累積して型肺胞上皮由来の腫瘍化を促進したものと推察された。

免疫システムへの影響においては、肺胞洗浄液より採取した単核球の解析では、曝露後 6 箇月での結果と同様に、肺胞マクロファージの細胞数は MWCNT 曝露により増加していた。肺胞マクロファージは F4/80+CD11b^{low} を示すことが知られ、加齢的に減少することが知られているが、MWCNT 曝露によってその分画は増加することが判明し、さらに、F4/80+CD11b^{high} を示す異常なマクロファージが増加することが明らかになった。加えて、M1 及び M2 マクロファージ分化パターンを CD192 および CD206 を用いて検討すると、M1 マクロファージへの分化シフトが確認された。マクロファージ関連遺伝子では、MWCNT 曝露によって大きな影響がなく、サイトカイン遺伝子についても影響が確認できなかった。細胞表面上のマーカーでは M1 マクロファージへの分化が促進されていたが、遺伝子発現、機能分化を反映する結果が観察されなかった。肺組織におけるレジデントマクロファージの分化、活性化の機序に関しては不明な点が多く、今後更なる検討が必要であると考えられる。一方、MMP-12 産生肺胞マクロファージの増加と肺組織の線維化促進が明らかにされた。MMP-12 産生肺胞マクロファージが線維化に関連することは知られており、MWCNT の曝露、貪食により MMP-12 産生が亢進する詳細な分子メカニズムの解析が今後の大きな課題となるものと考えられる。

E. 結論

マウスの知見からは、分散性の高いナノマテリアルを吸入させた結果、生体内に長期間留まり持続性の炎症反応を引き起こす可能性を示した。マクロファージが重要な役割を担っており、慢性炎症によって誘発される増殖性の腫瘍性病変の評価をより長期に亘って実施する必要がある。また、マウスの免疫系への影響を調べた結果、MWCNT 暴露後 1 年を経過した肺組織では散在性の肉芽腫病変に加え肺胞壁の肥厚、間質の線維化の亢進が観察された。肺胞マクロファージの M1/M2 比は MWCNT 暴露で有意に上昇していた。M1 マクロファージに関連する遺伝子発現は MWCNT 暴露後、長期間の経過によって変化が見られなかった。MWCNT 暴露によって MMP-12 産生肺胞マクロファージが増加することが判明し、マクロファージを介した肺組織の線維化機構が示唆された。

ラットの知見から、MWCNT の長期吸入暴露ではラットの生涯に渡り肺胞上皮の細胞回転が亢進状態にある中で、加齢とともに DNA の修復エラーが累積して II 型肺胞上皮由来の腫瘍化を促進したものと推察された。

本研究において使用した Taquan 法と Taquann 直噴式システムは、ナノマテリアルの吸入試験における課題を克服した吸入試験方法である。分散性の高いナノマテリアルを用意し、人体にとって重要であると想定される暴露様式に即した全身暴露吸入を実施することで、事前に毒性情報の存在しない新規のナノマテリアルについての、遺漏のない吸入毒性評価が可能になることが期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

Senoh H, Kano H, Suzuki M, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S, Fukushima S: Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *Journal of occupational health* (2017), in press.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S: Lung carcinogenicity of inhaled multi-wall carbon nanotube in rats. *Particle and Fiber Toxicology* (2016), 13:53.

妹尾英樹、加納浩和、鈴木正明、近藤ひとみ、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治: 気管支肺胞洗浄液検査における三種混合麻酔の問題点. *産業衛生学雑誌* (2016), 58:21-4.

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、石川寛明、峯多加志、武信、晴佐久満、松本道治、福島昭治.: F344/DuCrI CrIj ラットの自然発生腫瘍. *産業衛生学雑誌* 2015, 57:85-96.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Kondo H, Takeuchi T, Aiso S, Nishizawa T, Matsumoto M, Fukushima S: Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats. *Nanotoxicology* (2015), 9:413-22.

Senoh H, Katagiri T, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S, Fukushima S: Spontaneous harderian gland adenocarcinoma in a female f344 rat: a case report. *Journal of toxicologic pathology* (2014), 27:139-42.

Aiso S, Take M, Kasai T, Senoh H, Umeda Y, Matsumoto M, Fukushima S: Inhalation carcinogenicity of dichloromethane in rats and mice. *Inhalation toxicology* (2014), 26:435-51.

Saito M, Otsuka K, Ushio A, Yamada A, Arakakai R, Kudo Y, Ishimaru N. Unique phenotypes and functions of follicular helper T cells and regulatory T cells in Sjögren's syndrome. *Curr Rheumatol Rev*, in press 2017

- Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Dual role of Fas/FasL-mediated signal in peripheral immune tolerance. *Front in Immunol* in press 2017
- Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Crucial roles of macrophages in the pathogenesis of autoimmune disease. *World J Immunol*, in press 2017
- Izawa T, Arakaki R, Mori H, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Ishimaru N. The nuclear receptor AhR controls bone homeostasis by regulating osteoclast differentiation via the RANK/c-Fos signaling axis. *J Immunol* 197:4639-4650. 2016
- 石丸直澄 ナノマテリアルと免疫システム 医学のあゆみ 259:241-246 , 2016
- Kudo Y, Yada H, Fujiwara N, Tada Y, Tsunematsu T, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ.* 38:13, 2016
- Tsunematsu T, Fujiwara N, Yoshida M, Takayama Y, Kujiraoka S, Qi G, Kitagawa M, Kondo T, Yamada A, Arakaki R, Miyauchi M, Ogawa I, Abiko Y, Nikawa H, Murakami S, Takata T, Ishimaru N, Kudo Y. Human odontogenic epithelial cells derived from epithelial rests Malassez possess stem cell properties. *Lab Invest.* 96:1063-1075, 2016
- Saito M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Molecular mechanism of metal allergy. *Int J Mol Sci* 2015 17:e202, 2016
- Yamada A, Arakaki R, Saito M, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. A role of regulatory T cell in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol* 22:2195-2205, 2016
- Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Arakaki R, Saito M, Otsuka K, Kujiraoka S, Ushio A, Kurosawa M, Kudo Y, Ishimaru N. Acceleration of tumor growth due to dysfunction in M1 macrophages and enhanced angiogenesis in an animal model of autoimmune disease. *Lab Invest* 96:468-480, 2016
- Kanie S, Yokohira M, Yamakawa K, Nakano-Narusawa Y, Yoshida S, Hashimoto N, Imaida K. Suppressive effects of the expectorant drug ambroxol hydrochloride on quartz-induced lung inflammation in F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 2016 in press.
- Yokohira M, Nakano-Narusawa Y, Yamakawa K, Hashimoto N, Yoshida S, Kanie S, Imaida K. Chronic mesothelial reaction and toxicity of potassium octatitanate fibers in the pleural cavity in mice and F344 rats. *Cancer Sci.*, 107(7):1047-54, 2016.
- Yamakawa K, Yokohira M, Nakano Y, Kishi S, Kanie S, Imaida K. Activation of MEK1/2-ERK1/2 signaling during NNK-induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Cancer Med.*, 5(5):903-913, 2016 .
- Yokohira M, Hashimoto N, Nakagawa T, Nakano Y, Yamakawa K, Kishi S, Kanie S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Long-term chronic toxicity and mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers(TISMO) in the left thoracic cavity in A/J female mice. *Int. J. Toxicol.*, 34(4):325-35, 2015.
- Nakano Y, Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Saoo K, Imaida K. Rat strain differences in levels and effects of chronic inflammation due to intratracheal instillation of quartz on lung tumorigenesis induced by DHPN. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66(8):391-401, 2014.
- Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant

proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 27(3-4):175-182, 2014.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. Exp. Toxicol. Pathol., 66:117-123, 2014

2. 学会発表

相磯成敏; 梅田ゆみ; 笠井辰也; 妹尾英樹; 高信健司; 齋藤美佐江; 福島昭治; 菅野純, MWNT-7 吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第31回発癌病理研究会、2016.08、松代

齋藤美佐江; 相磯成敏; 梅田ゆみ; 妹尾英樹; 高信健司; 笠井辰也; 酒井俊男; 福島昭治; 菅野純, MWNT-7吸入暴露したラットに認めた肺上皮細胞ならびに肺固有組織への分化を欠く上皮様細胞の増生、第48回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2016.09、熊本

相磯成敏; 梅田ゆみ; 妹尾英樹; 高信健司; 片桐卓; 福島昭治; 菅野純, MWNT-7吸入暴露したラットの末梢気道並びに肺胞に於ける上皮の挙動、第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017.01、堺

梅田ゆみ; 高信健司; 片桐卓; 妹尾英樹; 相磯成敏; 福島昭治; 菅野純, 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の104週間吸入暴露により誘発されたラットの肺癌と過形成病変、第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017.01、堺

新垣理恵子; 山田耕一; 牛尾綾; 黒澤実愛; 大塚邦紘; 齋藤雅子; 常松貴明; 工藤保誠; 石丸直澄: Immunological and toxicological effect of multi-wall carbon nanotubes by whole body inhalation exposure

in B6 mice. 第45回日本免疫学会総会学術集会、2016年12月 沖縄

齋藤雅子; 大塚邦紘; 新垣理恵子; 山田耕一; 石丸直澄: Toxicological effect of peritoneal exposure to multi-walled carbon nanotubes on immune system. 第45回日本免疫学会総会学術集会、2016年12月 沖縄

石丸直澄; 山田耕一; 齋藤雅子; 新垣理恵子; 高橋祐次; 菅野純: ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響 第43回日本毒性学会シンポジウム(ナノマテリアルの実用化に呼応した有害性評価の進捗) 2016年6月 名古屋

新垣理恵子; 山本安希子; 常松貴明; 工藤保誠; 菅野純; 石丸直澄: 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの免疫システムへの影響 第105回日本病理学会総会 2016年5月 仙台

針状粒子TISMO(胸腔内投与)の長期的影響におけるマウス系統差。横平政直, 成澤裕子, 山川けいこ, 橋本希, 吉田翔太, 蟹江尚平, 今井田克己。第33回日本毒性病理学会、2017.01.26

DHPN 誘発ラット肺腺癌におけるERK1/2 活性化の関与。山川けいこ, 横平政直, 成澤裕子, 橋本希, 蟹江尚平, 吉田翔太, 竿尾光祐, 今井田克己。第75回日本癌学会学術総会、2016.10.6

気管支肺胞上皮過形成におけるnapsin A の潜在腫瘍化マーカーとしての可能性。横平政直, 成澤裕子, 山川けいこ, 蟹江尚平, 橋本希, 今井田克己。第75回日本癌学会学術総会、2016.10.6

Keiko Yamakawa, Masanao Yokohira, Yuko Narusawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida. Activation of ERK1/2 on DHPN-induced lung carcinogenesis in F344 rats. 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan.28, 2016, Takamatsu

The expression of S100A4 in the DHPN-induced lung tumors of rats. Yuko Narusawa, Masanao Yokohira, Keiko Yamakawa, Shohei Kanie, Shota Yoshida, Kousuke Saoo, Katsumi Imaida, 32th Annual Meeting of Japanese Society of Toxicologic Pathology. Jan.28, 2016, Takamatsu.

body inhalation studies.

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻 昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNTのマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体 (Taquam法) の肺沈着量の比較、第34回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題 (口演)

Yuhji Taquahashi¹, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

柴田真利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、特願 2012 - 158343 (2012.7.17)、登録番号：第 5899592 号 (2016.3.18)

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、登録番号：第 6051427 号 (2016.12.9)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3 Nanotechnologies – Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies. 6.5 Liquid Phase Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection System for whole

