

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（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慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

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 客員研究員  
独立行政法人労働者健康安全機構日本バイオアッセイ  
研究センター 所長  
研究協力者：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長  
研究協力者：新垣理恵子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教  
研究協力者：斎藤 雅子 徳島大学大学院医歯薬学研究部 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、Taquann 処理されたナノマテリアル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。前年度までに、正常マウスあるいは自己免疫疾患モデルマウス（MRL/lpr）への Taquann 処理された多層化カーボンナノチューブ（T-CNT）の腹腔内投与によって、線維化を伴う慢性腹膜炎が誘導された。今年度は、T-CNT に加えチタン酸カリウムの腹腔内投与による免疫系への影響を検討した。腹腔投与 1 年後では、T-CNT 投与群で誘導された腹膜炎は、チタン酸カリウム投与群では誘導されなかった。また、T-CNT 投与群に比較して、チタン酸カリウム投与群では M1 型のマクロファージ分化が亢進していた。さらに、MWCNT 投与群では血清 IgM の濃度が対照群より上昇していた。IgG2a に関してはチタン酸カリウム、MWCNT いずれの投与においても濃度が上昇していた。以上のことから、チタン酸カリウムと MWCNT を比較すると、MWCNT の線維化を伴う腹膜炎の誘導能は高く、両者で腹腔内のマクロファージ分化が異なり、慢性炎症への機転も異なっていることが判明した。

#### 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、ナノマテリアル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27年度までに正常C57BL/6マウスへの Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) の腹腔内投与により、M2マクロファージの集簇が亢進すること、MRL/lprマウスへのT-CNT腹腔内投与により線維化を伴う慢性腹膜炎の病態が亢進することが判明した。平成28年度は、T-CNTに加えて、チタン酸カリウムの腹腔内投与による免疫システムの影響に関して比較検討することによって、ナノマテリアルの暴露と免疫システムとの関係性を明らかにすることを目的とした。

## B. 方法

マウス

8週齢の雌 C57BL/6 (B6) マウス (各群

10匹) に腹腔内に T-CNT、チタン酸カリウムを投与後、1年にて解析した。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、チタン酸カリウム

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 Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) を供与された。Taquann 処理されたチタン酸カリウムについても国立食品衛生研究所・高橋主任研究官より供与された。溶媒として 0.1% Tween80 / 生理食塩水が用いられ、1  $\mu$ g および 10  $\mu$ g の MWCNT が腹腔内に注射された。

### フローサイトメトリー解析

ナノマテリアル投与マウスの脾臓、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 (Ly5.2、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。

#### 免疫細胞の採取

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ー解析を行った。腸間膜リンパ節は、ホモジナイズ後、洗浄、ろ過によってリンパ節細胞を採取した。脾臓に関しては、ホモジナイズ、ろ過、洗浄後、塩化アンモニウム水溶液（0.83%）にて溶血、洗浄、ろ過によって脾細胞を採取した。

#### ELISA 法

血清を用いて、IgG1、IgG2b、IgMをELISA法にて定量化した。各イムノグロブリンサブセットの検出には、HRP標識された二次抗体を用い、通法に従って定量化した。

### C. 研究結果

#### B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウム腹腔投与

8週齢メスB6マウスにT-CNT（10 $\mu$ g）あるいはチタン酸カリウム（10 $\mu$ g）を腹腔内投与した。対照群（溶媒のみ）を含め各群10匹ずつとした。投与後、12ヶ月にて屠殺、解析を行った。投与後3ヶ月ごとの体重変化を検討したところ、各群で有意な変化は観察されなかった（図1A）。投与後12ヶ月での各群の体重（図1B）、脾重量（図1C）、肝重量（図1D）に各群で有意な差は見られなかった（図

1B, C, D）。

#### T-CNT及びチタン酸カリウム腹腔投与による腹腔内所見

T-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後12ヶ月における腹腔内臓器の外表所見では、T-CNT投与群での肝臓の分葉状変化、脾臓表面、肝臓表面、腹膜の白濁化が観察されたが、対照群、チタン酸カリウム投与群では変化は認められなかった（図2）。

#### 腹腔滲出細胞（PEC）、腸間膜リンパ節、脾臓における細胞数の変化

PEC中の全細胞数は対照群に比較して、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群にて有意に増加していた（図3A）。腸間膜リンパ節における細胞数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群にて有意に減少していた（図3B）。脾臓においては、T-CNT投与群にて有意に増加していた（図3C）。

#### PEC中の免疫細胞分画

PEC中のLy5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図4A）。マクロファージ全体の細胞数は対照群に比較して、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意に増加していた（図4B）。CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>分画もチタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意に増加していた（図

4C)。CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup>M1マクロファージはチタン酸カリウム投与群で有意に増加しているのに対し、T-CNT投与群では有意に減少していた（図4D）。CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup>M2マクロファージは、T-CNT投与群では有意に増加していた（図4E）。

PEC中のT細胞及びB細胞に関して検討すると、CD4<sup>+</sup>T細胞における活性化マーカー（CD44/CD62L）では、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群ともにCD44<sup>low</sup>CD62L<sup>+</sup>のナイーブ型T細胞の割合が減少し、CD44<sup>high</sup>CD62L<sup>-</sup>のメモリー型T細胞の割合が増加していた（図5A）。CD4<sup>+</sup>T細胞、CD8<sup>+</sup>T細胞、CD19<sup>+</sup>B細胞数は各群で有意な変化は認められなかった（図5B, C, D）。

#### 腸間膜リンパ節（mLN）の免疫細胞分画

腸間膜リンパ節細胞中のLy5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図6A）。マクロファージ数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で有意な変化はなかった（図6B）。CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>分画もチタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群両者とも有意な変化は認められなかった（図6C）。M1マクロファージは、T-CNT投与群で有意に減少していた（図6D）。さらに、M2マクロファージの細胞数では、T-CNT投与群で有意に増加していた（図6E）。

腸間膜リンパ節細胞におけるT細胞、B細胞分画について検討した（図7A）。CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化状態は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で大きな変化はなかった（図7A）。CD4<sup>+</sup>T細胞数は、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で有意に減少していた（図7B）。CD8<sup>+</sup>T細胞に関して変化はなかった（図7C）。CD19<sup>+</sup>B細胞数はT-CNT投与群で有意に減少していた（図7D）。

#### 脾臓における免疫細胞分画

脾細胞中のLy5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージにおけるCD11c（M1マーカー）/CD206（M2マーカー）分画を検討した（図8A）。マクロファージ細胞数はT-CNT投与群で有意に増加していた（図8B）。CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>分画に変化は見られなかった（図8C）。M1マクロファージは、T-CNT投与群で有意に増加していた（図8D）。M2マクロファージに関してはそれぞれの投与によって変化は観察されなかった（図8E）。

脾臓におけるT細胞、B細胞分画について検討した（図9A）。CD4<sup>+</sup>T細胞の活性化状態は、T-CNT投与群で大きくメモリー型にシフトしていた（図9A）。CD4<sup>+</sup>T細胞数では、変化は見られなかったが（図9B）、CD8<sup>+</sup>T細胞数はチタン酸カリウム投与群で、有意に増加していた（図9C）。一方、CD19<sup>+</sup>B細胞に関して変化は観察されなかった（図9D）。

### 血清イムノグロブリンの変化

チタン酸カリウムおよびT-CNT腹腔内投与による液性免疫への影響を検討するために、ELISAにて、血清中の各種イムノグロブリン分画を検討した。IgMに関しては、対照群に比較して、T-CNT投与群で有意にその濃度が上昇していた（図10A）。IgG1では、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群で変化は見られなかった（図10B）。IgG2aでは、チタン酸カリウム投与群、T-CNT投与群ともに有意に上昇していた（図10C）。

### 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、慢性の腹膜炎が持続することが明らかにされた。また、MRL/lpr マウスへの MWCNT の腹腔内投与により、強い腹膜炎が惹起され、全身の自己免疫性病変は増悪することが判明した（平成 26 年度）。さらに、B6 マウスへの MWCNT 及び Zymosan 投与では、投与後 3 日の初期の段階では、Zymosan による PEC 中の各免疫細胞の増加に加えて MWCNT により、その影響は増強されることが判明し、経時的に観察すると、投与後 60 日では各免疫細胞が減少する一方で、M2 マクロファージの細胞数が MWCNT のみあるいは MXCNT+Zymosan 投与群で増加するこ

とが明らかになった。したがって、PEC 中では MWCNT の暴露で M2 マクロファージが活性化することが判明し、その活性化シグナルは TLR との協調作用がある可能性が示された（平成 27 年度）。

今年度は、T-CNT に加えて Taquann 処理済みのチタン酸カリウムの腹腔内投与と実験を実施し、MWCNT とチタン酸カリウムの免疫系への影響を比較検討した。これまで T-CNT の腹腔内投与で観察されていた肝臓の分葉状変化や腹膜の白濁化は、投与後 1 年にてチタン酸カリウム投与群では観察されなかった。このことは、T-CNT の物性の特徴、慢性炎症の持続性、免疫システムへの影響の違いなどが要因と考えられる。腹腔マクロファージへの影響では、T-CNT、チタン酸カリウム投与群ともに、細胞数は増加していたが、チタン酸カリウム投与群では M1 マクロファージへの分化、T-CNT 投与群では M2 マクロファージへの分化が亢進していた。

腸間膜リンパ節の解析では、T-CNT 投与群の M2 マクロファージへの分化促進が観察され、T-CNT、チタン酸カリウム投与群ともに CD4<sup>+</sup>T 細胞数の減少が見られた。また、T-CNT 投与群で CD19<sup>+</sup>B 細胞数も減少していた。脾臓での変化は、T-CNT 投与群で M1 マクロファージ数が増加し、チタン酸カリウム投与群で CD8<sup>+</sup>T 細胞数が増加していた。このことは、腹腔内へのナノマテリアル投与によって、腸間膜リンパ節への炎症の波及、

獲得免疫系への影響が考えられた。

炎症の遷延化の指標として、ナノマテリアル暴露による抗体産生への影響が挙げられる。T-CNT 投与群では IgM、IgG2a の濃度が高くなっていた。また、チタン酸カリウム投与群で IgG2a の濃度が高くなっていた。T-CNT の暴露では腹膜での炎症の慢性化が持続することと関連がある可能性が考えられた。IgG2a 分画は Th1 型の免疫反応と関係していることが知られているので、T-CNT の暴露は Th1 型の炎症反応を誘導している可能性が考えられた。

T-CNT の長期暴露によって腹膜炎の遷延化が観察され、チタン酸カリウム暴露と異なった影響が存在することが明らかとなった。今後、T-CNT の暴露と慢性炎症、線維化などの機転に焦点を当てて、さらなる検討が必要である。

## E. 結論

4. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後1年での腹腔内所見として、投与では、T-CNT投与で観察される肝臓の分葉状変化はチタン酸カリウム投与では観察されなかった。
5. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、それぞれM1、M2マクロファージ分化に大きな相違があった。
6. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与で、腸間膜あるい

は脾臓への炎症の影響が確認された。

7. B6マウスへのT-CNT及びチタン酸カリウムの腹腔内投与後1年で、Th1型の免疫反応あるいは抗体産生が亢進する可能性が示された。
8. ナノマテリアルの種類によって免疫システムへの影響は異なっており、T-CNTの暴露は炎症の遷延化につながる可能性が高いことが示唆された。

## F.健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- (1) 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
- (2) 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* 7:1-8, 2017 2017
- (3) 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

- (4) 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
- (5) Kudo Y, Yada H, Fujiwara N, Tada Y, Tsunematsu T, Miyake Y, Ishimaru N. Oral environment and cancer. *Genes Environ.* 38:13, 2016
- (6) 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
- (7) 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
- (8) Qi G, Kudo Y, Tang B, Liu T, Jin S, Liu J, Zuo X, Mi S, Shao W, Ma X, Tsunematsu T, Ishimaru N, Zeng S, Tatsuka M, Shimamoto F. PARP6 acts as a tumor suppressor via downregulating Survivin expression in colorectal cancer. *Oncotarget* 7:18812-18824. 2016
2. 学会発表
- (1) 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
- (2) 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
- (3) 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
- (4) 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

#### 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

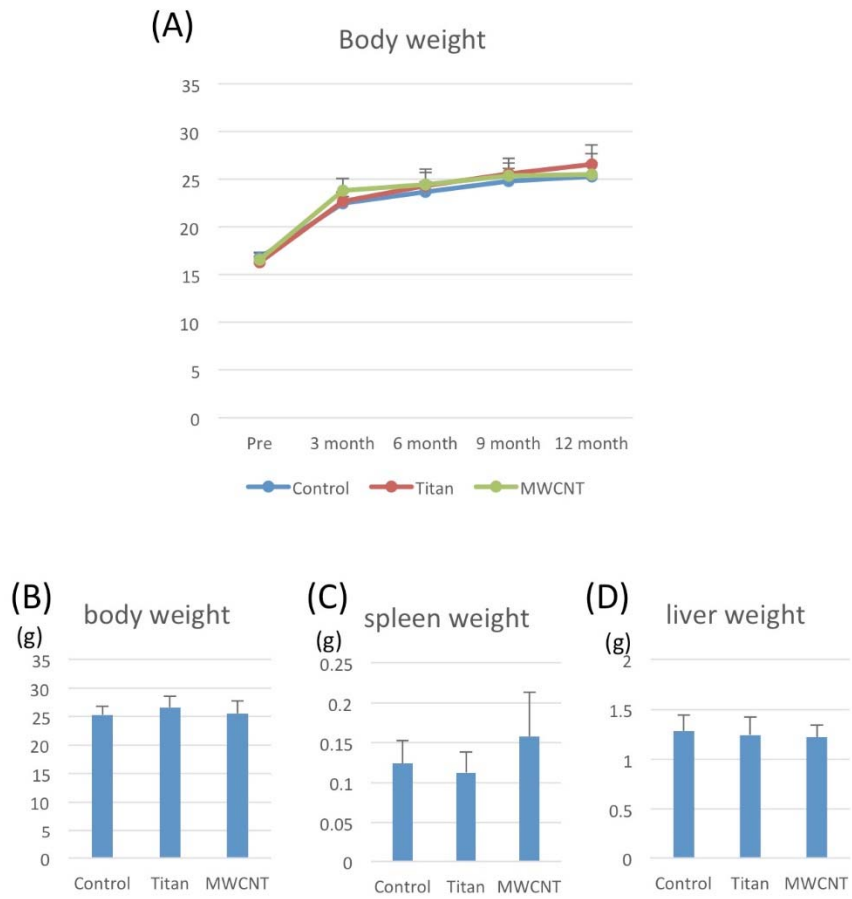


図1.T-CNT及びTiO<sub>2</sub>投与による体重、脾重量、肝重量の変化  
(A)体重の経時的変化 (B)投与後12ヶ月での体重 (C)脾重量 (D)肝重量  
データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図2

Peritoneal finding of  $\text{TiO}_2$  and MWCNT-injected mice

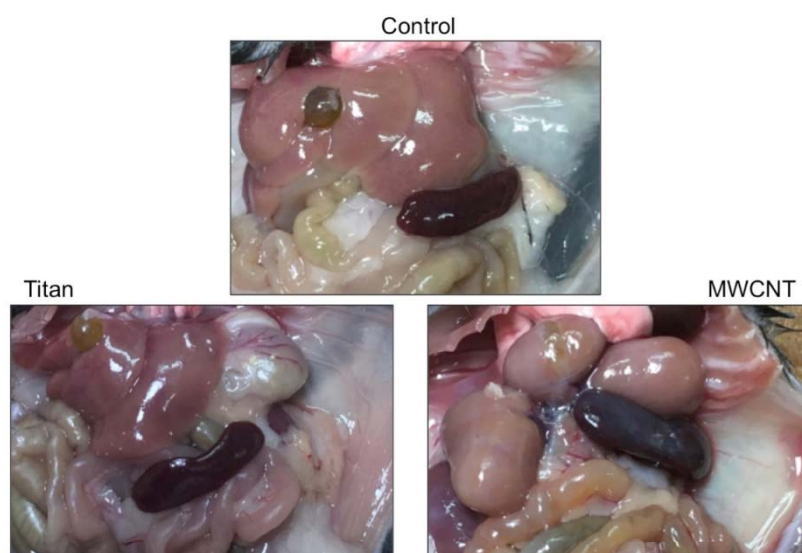


図2.  $\text{TiO}_2$  (Titan)、T-CNT (MWCNT)腹腔内投与後の腹腔内の所見

図3

### Total cell number of PECs, mLN, and spleen

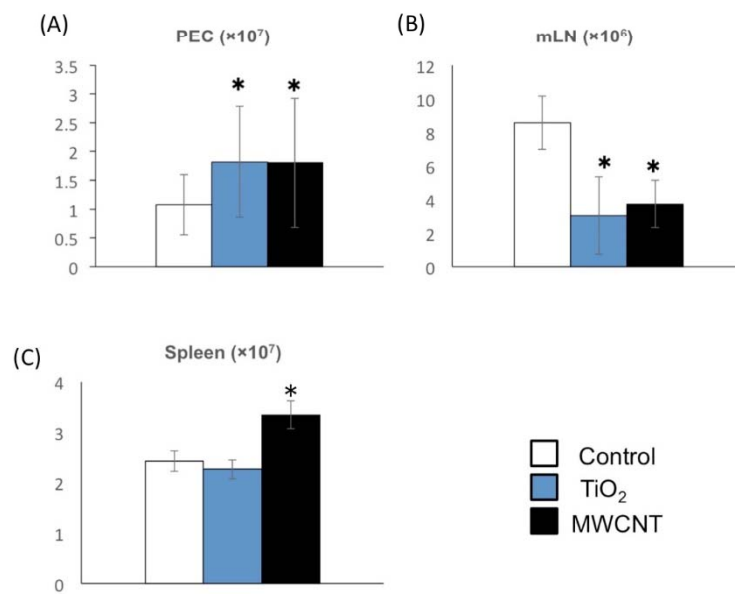
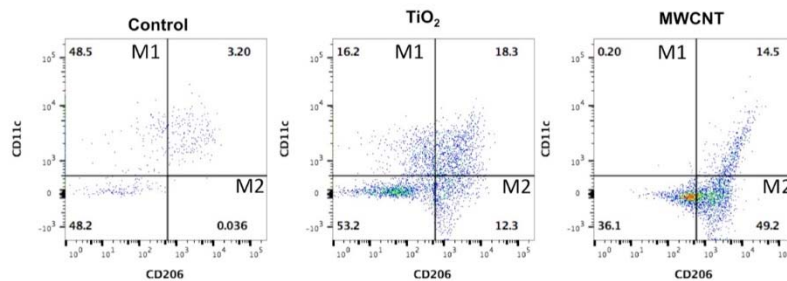


図3. 腹腔滲出細胞、腸間膜リンパ節、脾臓における細胞数データ=平均値 $\pm$ SD (各群N=8-10)

図4

(A) Analysis of macrophage in PECs

Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>-gated



Cell number of macrophages in PECs

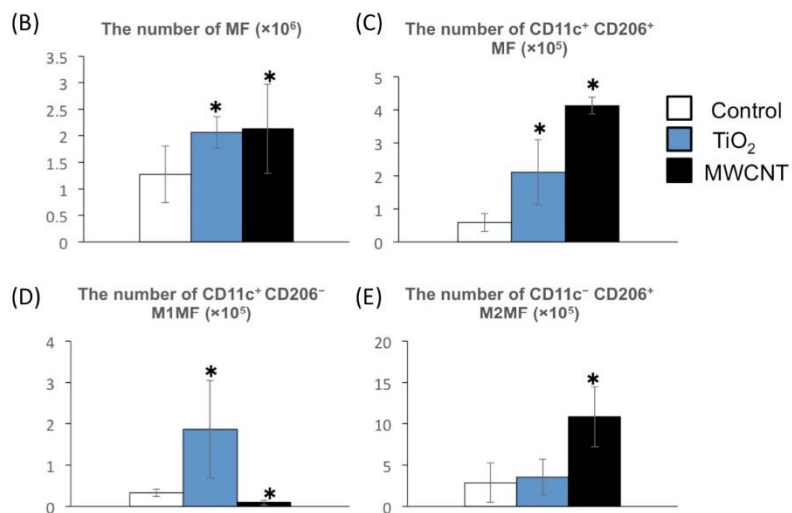
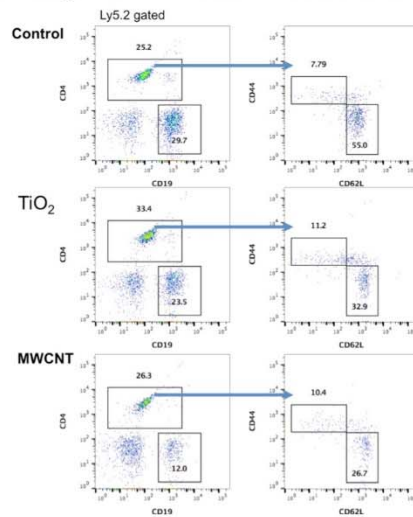


図4. PEC中のマクロファージ分画

- (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージのCD11c/CD206分画
  - (B) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの細胞数
  - (C) CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>マクロファージの細胞数
  - (D) CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> (M1)マクロファージの細胞数
  - (E) CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> (M2)マクロファージの細胞数
- データ=平均値±SD (各群N=8-10) \*p < 0.05

図5

(A) Analysis of T and B cells in PECs



Number of T and B cells in PECs

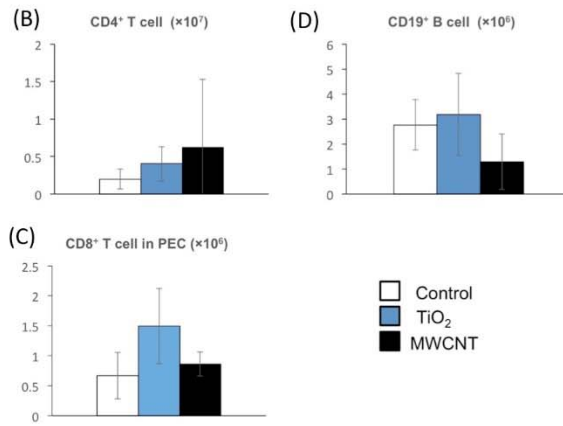
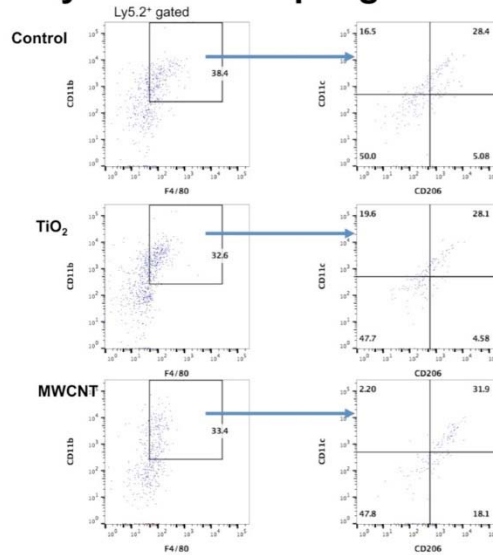


図5. PEC中のT細胞、B細胞分画  
 (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD4/CD19分画及びCD4<sup>+</sup>CD44/CD62L分画  
 (B) CD4<sup>+</sup>T細胞数  
 (C) CD8<sup>+</sup>T細胞数  
 (D) CD19<sup>+</sup>B細胞数  
 データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図6

(A)

### Analysis of macrophages in mLN



### Cell number of macrophages in mLN

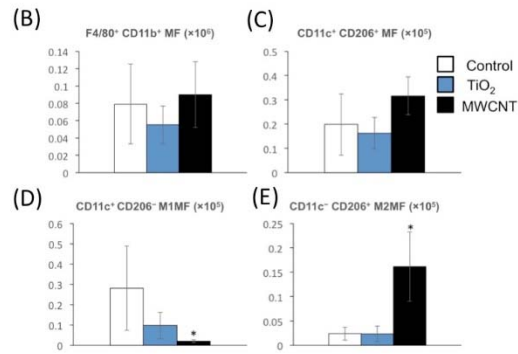


図6. 腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画  
 (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージのCD11c/CD206分画  
 (B) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの細胞数  
 (C) CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>マクロファージの細胞数  
 (D) CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>-</sup> (M1)マクロファージの細胞数  
 (E) CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> (M2)マクロファージの細胞数  
 データ=平均値±SD (各群N=8-10) \*p < 0.05

図7

(A) Analysis of T and B cells in mLN

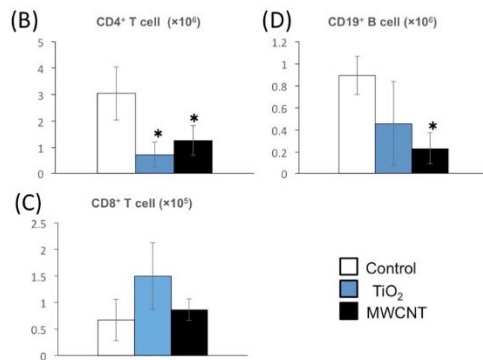
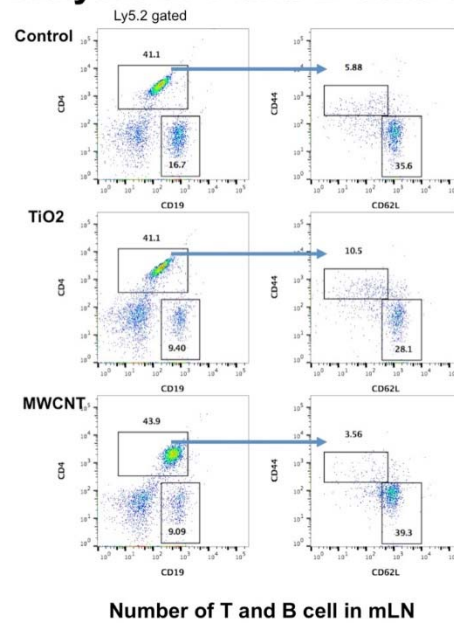
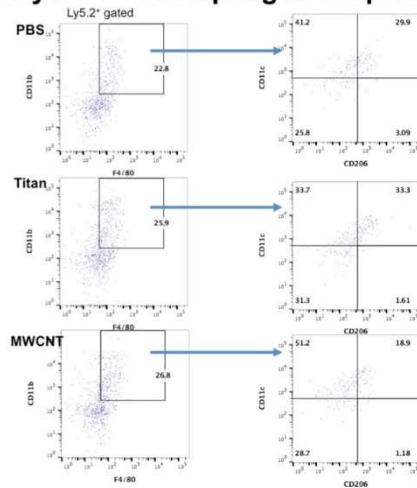


図7. 腸間膜リンパ節のT細胞、B細胞分画  
 (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD4/CD19分画及びCD4<sup>+</sup>CD44/CD62L分画  
 (B) CD4<sup>+</sup>T細胞数  
 (C) CD8<sup>+</sup>T細胞数  
 (D) CD19<sup>+</sup>B細胞数  
 データ=平均値±SD (各群N=8-10)

(A) Analysis of macrophages in spleen



Cell number of macrophages in spleen

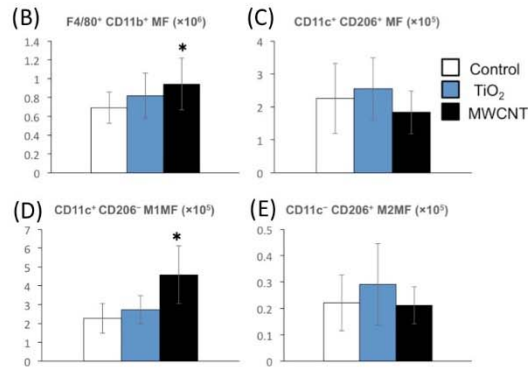
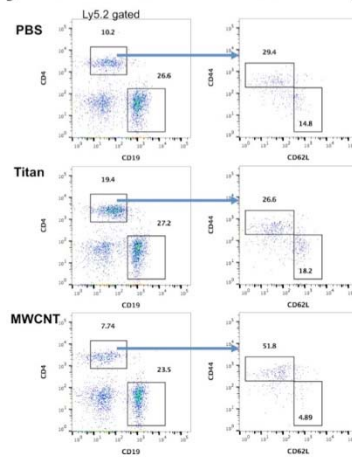


図8. 脾臓におけるマクロファージ分画  
 (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージのCD11c/CD206分画  
 (B) Ly5.2<sup>+</sup>CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの細胞数  
 (C) CD11c<sup>+</sup>CD206<sup>+</sup>マクロファージの細胞数  
 (D) CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>-</sup> (M1)マクロファージの細胞数  
 (E) CD11c<sup>-</sup>CD206<sup>+</sup> (M2)マクロファージの細胞数  
 データ=平均値±SD (各群N=8-10) \*p < 0.05



(A)

**Analysis of T and B cells in spleen**



**Number of T and B cells in spleen**

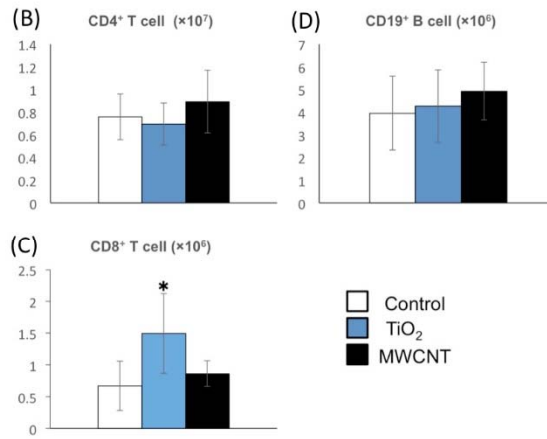


図6. 脾臓におけるT細胞、B細胞分画  
 (A) Ly5.2<sup>+</sup>CD4/CD19分画及びCD4<sup>+</sup>CD44/CD62L分画  
 (B) CD4<sup>+</sup>T細胞数  
 (C) CD8<sup>+</sup>T細胞数  
 (D) CD19<sup>+</sup>B細胞数  
 データ=平均値±SD (各群N=8-10)

図10

TiO<sub>2</sub>及びMWCNT腹腔投与1年後の血清中のIgM、IgG2a、IgG1濃度の比較

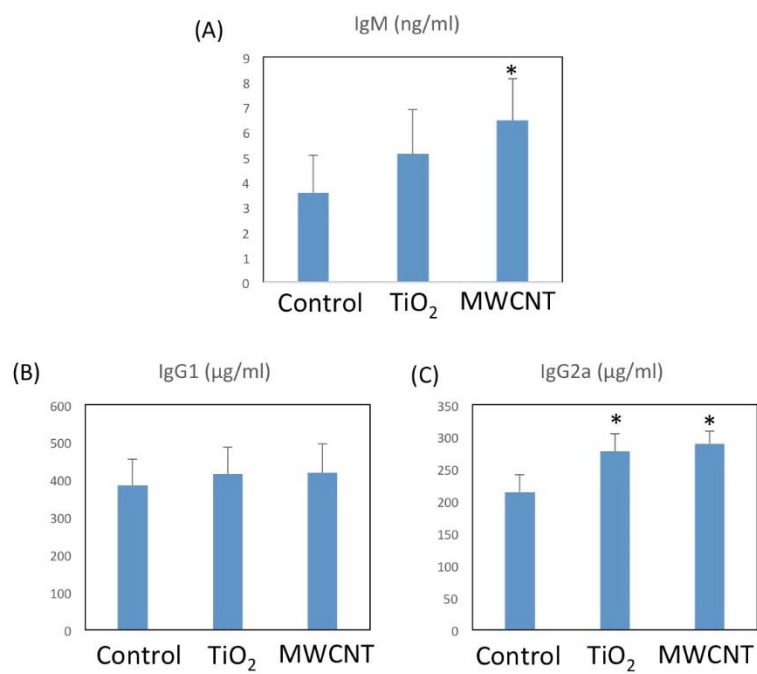


図10. 血清中のイムノグロブリンCD4<sup>+</sup>T細胞数

(A) IgM濃度

(B) IgG1濃度

(C) IgG2a濃度

データ=平均値±SD (各群N=8-10)