

・ 総括研究報告書

ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究  
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-  
(H29-化学-一般-003)

研究代表者 相磯 成敏

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  
病理検査部長

## 研究要旨

工業的ナノマテリアル(NM)の産業応用が急速に進展し、多様な NM が製造されて市場に出まわる中、健康被害を防止するための規制決定に必要となる基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法の確立に至っていない。NM の毒性発現には異物除去を担うマクロファージが重要な役割を果たしており、NM を貪食したマクロファージが Frustrated phagocytosis (FP) という特殊な反応に陥ることがその起点となる可能性が示唆されている (FP 仮説)。先行研究から、NM を貪食した際のマクロファージの反応を 3 つの様式、M のサイズを超える長い単一の繊維による「長繊維貫通型」、柔軟性に富む繊維による「毛玉状凝集型」、M より小さな粒子による「粒状凝集型」に分類できるという知見を得た。及び については蓄積がある量を超えると、FP を引き起こし、最終的にマクロファージはアポトーシスに至ると考えられるが、そこに至る過程は蓄積物の性状により異なり、曝露量とサイトカインの種類と放出量の間には異なる想定される。本研究班では、モデル NM として二種類の MWNT (長繊維貫通型、毛玉状凝集型) 及び酸化チタン (粒状凝集型) を独自に開発した全身曝露吸入装置 (J Toxcol Sci 2013) を用いてマウスに吸入曝露させ、病理組織学的変化、免疫機能の解析、曝露濃度と肺負荷量に関するデータを取得して、FP 誘発に関連する要因の分類とその強度スケールにより有害性スクリーニングのカテゴリー評価基盤を整備する。

平成 29 年度は、「長繊維貫通型」のモデル NM として MWNT-7 (T-CNT7) を選定した。C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢を使用し、対照群、低用量群及び高用量群の 3 群構成とし、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行った。曝露終了直後(0W)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(8W)に採取した生体材料を用いて、組織負荷量の測定、病理組織学的評価、免疫機能評価を行った。T-CNT7 の吸入曝露を実施できた(高橋)。T-CNT7 肺負荷量は、1 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した(大西)。病理組織学検査では、T-CNT7 は肺泡マクロファージに貪食されて終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇して沈着する傾向が認められた。詳細に観察すると 0W から T-CNT7 投与依存的に、微

小さな組織変化が観察された。曝露後 4W の肺に曝露後 0W から 8W を通して最も多彩な組織像が認められ、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。免疫機能評価においても、対照群と比較し BALF 中における肺胞マクロファージの割合は曝露終了直後の 0W から減少が認められ、M1/M2 比率が経時的に変化することが明らかとなった。また、肺組織における MMP12 mRNA 発現増加及び BALF 中の IL-12、VEGF 蛋白質の上昇が示された。T-CNT7 投与依存的に認めた微小な病理組織変化は、曝露後 4 週を頂点として経時的に進行しており、M2 マクロファージの増加及び BALF 中 MMP12、IL-12、VEGF 発現増加は組織変化に関連する可能性が示唆された。病理組織変化と免疫機能変化の関連付けが示唆される事象を拾い上げ、病理組織学的評価で量・反応関係のデータを得ることにより、一層有用な T-CNT7 のカテゴリー評価基盤整備が可能となる。

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、本研究班の目的とする、生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築で、スケールに相当する曝露濃度と肺負荷量のデータを取得できた。

また、病理組織学的評価、並びに免疫機能評価の分担研究においても有用なデータを取得することができたが、病理組織学的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要である。

平成 30 年度は「粒状凝集型」のモデル NM として選定した酸化チタンを用いて吸入曝露実験を行い計画に沿って研究を進めるとともに、平成 29 年度の病理組織学的評価についても研究を進める。

## 研究体制

研究代表者

相磯 成敏 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  
病理検査部 部長

研究分担者

大西 誠 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  
試験管理部 技術専門役

石丸 直澄 徳島大学 大学院医歯薬学研究部  
口腔分子病態学分野 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  
第三室 室長

## A. 研究目的

本研究の目的は、工業的ナノマテリアル(NM)の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの in vivo 生体内反応に着目した生

体影響を数種類のモデル NM を用いて評価し、曝露濃度、肺負荷量及び肺病変の連関の情報を整備することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

NM の産業応用が急速に進展している中、健康被害を防止するための規制決定に必要となる基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法が必要とされているが、具体的な手法の確立に至っていない。その理由として、NM の多様な特性(素材、粒子径、イオン化傾向並びに表面活性等)が複雑に影響して有害性を発現すること、難分解性のため一般に急性毒性は弱く長期沈着による発がんや線維化といった慢性的な影響が問題となること、最も懸念される吸入曝露は他の曝露経路に比較して技術的難易度とコストが高いこと、が挙げられる。多様な NM の効率的な有害性評価方法として、国際的には比較的情報取得が容易である「物理化学的特性」を基盤としたカテゴリー評価が提案されている。

本研究班では「生体内反応特性」からのカテゴリー評価を試みる点を特色としている。すなわち、NM の

毒性発現には異物除去を担うマクロファージが重要な役割を果たしており、NMを貪食したマクロファージが Frustrated phagocytosis (FP) という特殊な反応に陥ることがその起点となることが広く知られている (FP 仮説)。申請者らは、先行研究及び多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の発がん性実験 (Part Fibre Toxicol, 2016) の成果から、NM の種類によって 3 種類の FP の誘発様式 (長繊維貫通型、毛玉状凝集型及び粒状凝集型) を見出し、FP 誘発の型及び程度に着目した独創的なカテゴリー評価を試みる。

具体的には、モデル NM として二種類の MWCNT (長繊維貫通型、毛玉状凝集型) 及び酸化チタン (粒状凝集型) を独自に開発した全身曝露吸入装置 (J Toxcol Sci 2013) を用いてマウスに吸入曝露を行い、病理組織学的変化、免疫機能の解析、曝露濃度と肺負荷量に関するデータを取得し、FP 誘発に関連する要因の分類とその強度スケールにより有害性スクリーニングのカテゴリー評価基盤を整備する。

## B. 研究方法

### B-1. ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の一つである MWNT-7 (三井) を選択した。MWNT-7 は、先行研究で開発した Taquann 法処理により、凝集体・凝固体を含まない高分散検体として実験に供した (以下 T-CNT7 と記載)。MWCNT の曝露には既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 を使用した。曝露チャンパー内の T-CNT7 の濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 測定を並行して行った。動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。群構成は、対照群、低用量群 (目標濃度  $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ )、高用量群 (目標濃度  $3 \text{ mg}/\text{m}^3$ ) の 3 群構成とした。各群 48 匹のマウスを使用し、病理組織用に 16 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 20 匹を割り当てた。曝露終了直後 (0W)、1 週後 (1W)、4 週後 (4W) 及び 8 週後 (8W) に定期解剖を行い、生体材料を採取して病理組織評価、免疫組

織評価及び肺負荷量測定に供した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7 の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した (高橋)。

### B-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

肺組織中への T-CNT7 の負荷量を分担研究者の大西等が開発したベンゾ [ghi] ペリレンをマーカーとした MWCNT の微量定量法を用いて測定、解析を行った。その原理は MWCNT を構成している炭素原子の 6 員環に相補的に結合するベンゾ [ghi] ペリレン (BgP) (試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社) を吸着させ、T-CNT7 に相補的に吸着させた BgP を回収し、HPLC (Acquity UPLC、ウォーターズ) で回収した BgP の吸光度を測定した。BgP の吸光度強度に相当する T-CNT7 の量を検量線から読み取った値から算出する方法で行った。検量線は 6 点 (T-CNT7 濃度  $0.2 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$  (公比 2)) の吸光度の値を求めて直線を引いた。

測定に用いた肺は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次 (国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長) から提供された。吸入曝露後の定期解剖における肺の採材は、イソフルラン吸入麻酔下で、腋窩動脈を開放して安楽死させて開胸、T-CNT7 の混入防止のため、被毛に付着した T-CNT7 が開胸部に付着しないように留意して肺を摘出、肺重量を測定後した後に 10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬固定、組織負荷量の測定に供した。

肺組織中の T-CNT7 の測定 (組織負荷量の測定) は次のように行った。

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で浸漬固定した肺のサンプルを C99 (Clean99-K200、クリーンケミカル株式会社) で溶解し、セルロース沈殿硬化液 (日本バイオアッセイ研究センターによる研究開発) を添加し、遠心分離 (12000rpm、10 分間) 後、上澄み液を除去し、0.1% Tween 溶液 (TWEEN 80、富士フィルム和光純薬株式会社) を加えて遠心分離した。その上澄み液を除去、濃硫酸の添加により残渣を分解し、マーカー溶液を添加し  $0.8 \mu\text{m}$  のフィルター (ワットマ

ン:GE Healthcare UK Ltd)でろ過した。フィルター上に残った T-CNT7 を、フィルターごとポンチ(8 mm )で打ち抜いて採取し、アセトニトリル(HPLC 用、富士フィルム和光純薬株式会社)を添加、抽出し、HPLC (Acquity UPLC、ウォーターズ)で抽出液の蛍光吸光度を測定した。

T-CNT7 の検量線で、6ポイント(C1~C6)の目標濃度と面積値から直線回帰式を求め、HPLC で測定した肺試料の面積値を直線回帰式に代入し、T-CNT7 の測定濃度を求めた。その値に希釈倍率を乗じて、T-CNT7 の肺個体当りの肺内沈着量(単位:  $\mu\text{g}$ )と、それらの3匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、解剖時に測定した肺の重量で除することにより肺 g 当りの値(単位:  $\mu\text{g/g}$ )及び、それらの平均値と標準偏差を求めた。

### **B-3. 病理組織学的評価研究**

分担研究に用いた肺は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)から提供された各群 16 匹から採取した。但し、曝露後 4W に解剖した低用量群の 1 匹が fighting により死亡したため、この群の解剖動物数は 15 匹となった。解剖の際の肺の採取は、イソフルラン吸入麻酔下で、開胸、その際、T-CNT7 の混入防止のため、被毛に付着した T-CNT7 が開胸部に付着しないように留意した。また、肺の虚脱を防ぐ目的で気管を結紮した後、左心房にカニューレションし、腋窩動脈を開放し灌流固定をおこなった。まず、約 40cm 水柱の静水圧条件下で、生理食塩水を灌流し腋窩動脈開放部から透明の生理食塩水が流出することを確認し、次いで 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(4% PFA、和光純薬工業、組織固定用、用事調整)を同静水圧で約 3 分灌流した。結紮した気管と共に肺を虚脱させないように注意しつつ摘出し、さらに同組成固定液(4%PFA)にて一晚浸漬固定(冷蔵)した。その際、脱脂綿により肺の固定液面からの浮上を防いだ。翌朝、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(ナカライテスク)に交換して保存、切り出しを行った。その他の臓器は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に浸漬固定した。

なお、被毛と消化管内容物に含まれる T-CNT7 の固定時の混入を防ぐため、皮膚と消化管は検査対象から除外した。

#### **・ 病理組織標本作製**

定法に従いパラフィン包埋し、HE 染色標本、及び線維化の観察にマッソントリクローム染色(Masson trichrome stain)を作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織検査を行った。

型肺胞上皮細胞(型細胞)のマーカーとして surfactant protein C (SP-C、SC-13979、Santa Cruz)、マクロファージのマーカーとして、Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO、LSBio-B15006)に対する一次抗体を用いて免疫染色を行った。MARCO はマクロファージのスカベンジャーレセプターであり、MWCNT に結合すると報告されている<sup>1)</sup>。

二次抗体にはシンプルステインマウス組織用(ニチレイ)を用い、DAB 発色した。

(引用文献)

<sup>1)</sup>S. Hirano, S. Kannno, A. Furuyama. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. Toxicology and Applied Pharmacology. 232:244-251, 2008

#### **・ 病理組織学的検査**

曝露後 0W、1W、4W、8W の肺について肺内の T-CNT7 の沈着と組織反応の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。

#### **・ T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析**

非分解性である MWCNT を貪食あるいは貪食しようとした肺胞マクロファージは Frustrated phagocytosis に陥りアポトーシスに至り、貪食していた MWCNT を放出し、放出された MWCNT は次の肺胞マクロファージに補足され同様のサイクルが繰り返されると理解されている。この現象が T-CNT7 を吸入曝露した本実験で起きていることが、先行研究により明らかとなっていることから、MARCO 陽性細胞を追跡することで、

肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析した。

MWNT-7 が複屈折性を示すことを利用し、その局在を偏光観察により捕捉し、MARCO 陽性細胞との関係を明らかにした。今年度報告では、まだ対照群と高用量群について MARCO 免疫染色結果を視覚的な判断を行った予備調査の段階であるが、今後、数値データ化して量反応関係を求める。

#### **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**

分担研究に用いた肺、頸部リンパ節、脾臓は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)から提供された各群 20 匹から採取した。

肺胞洗浄液、脾臓、頸部リンパ節の免疫細胞について免疫細胞分画の変化のフローサイトメトリー解析、肺組織におけるスカベンジャー受容体などの mRNA を定量 RT-PCR 法による解析、肺胞洗浄液中の各種サイトカイン、ケモカインのマルチプレックス解析を実施した。

##### ・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C, TERUMO)を留置し、1ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に 1ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin: APC, APC-Cy7) された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置

(FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

##### ・定量化 RT-PCR 法

肺組織の一部を RNAlater に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。プライマーセット(分担研究報告を参照)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。

##### ・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を-80 にて保存した。各サンプルから 5 μL を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット(Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、IL-1 , IL-1 , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, , IL-17, GM-CSF, IFN- , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 , TNF- , VEGF, FGF basic とした。

(倫理面への配慮)

本分担研究における動物実験は、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 日日本学会会議)、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: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における動物実験等に関する規程(平成 28 年 4 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)、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。

また、ナノマテリアルの吸入曝露実験に際しては、国立医薬品食品衛生研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従って実験を実施し、曝露・漏洩を防止する対策については万全を期した。日本バイオアッセイ研究センターと徳島大学においても、それぞれの運用規則に従い実施しており、ナノマテリアル曝露した動物から採取した臓器・組織からの実験施設の汚染や実験従事者への曝露を防止する対策については万全を期した。

## C. 研究結果

### C-1. ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-CNT7 の 5 日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値 ± SD)は、低用量群、高用量群それぞれ  $1.4 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3.2 \pm 0.3 \text{ mg/m}^3$  であった。平均 CPC カウント(平均値 ± SD)はそれぞれ、 $960 \pm 80/\text{cm}^3$ 、 $2340 \pm 238/\text{cm}^3$  であった。2 時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低用量群、高用量群それぞれ 4.3 mg 及び 8.5 mg であった。2 時間の曝露チャンバーの総換気量が  $1.2 \text{ m}^3$  であることから名目上の濃度は、低用量群、高用量群それぞれ  $3.5 \text{ mg/m}^3$  及び  $7.1 \text{ mg/m}^3$  と計算される。実際に測定した濃度から、エアロゾル化効率を計算するとそれぞれ 40%及び 45%であった。本実験において定期解剖した全ての個体に剖検所見に肉眼的異常は認められなかった。

### C-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

$1 \text{ mg/m}^3$  曝露群のマウスの肺当りの T-CNT7 負荷量は、曝露後 0W、1W、4W、8W でそれぞれ 6.30、4.59、5.42、5.39  $\mu\text{g/g}$  であった。 $3 \text{ mg/m}^3$  曝露群のマウスの肺当りの T-CNT7 負荷量は曝露後 0 週、1 週、4 週、8 週でそれぞれ 10.15、9.98、10.84、10.25  $\mu\text{g/g}$  であった。 $1 \text{ mg/m}^3$  曝露群の沈着量はやや減少傾向

であったが、 $3 \text{ mg/m}^3$  曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。

### C-3. 病理組織学的評価研究

**病理組織学的検査：**本試験では、通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見として、T-CNT7 の肺内沈着を認めた。T-CNT7 は気道及び肺泡マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺泡領域の細胞外の間質に存在した。貪食マクロファージは終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇する傾向を認めた。以下、継時的に詳細を記載した。

**0W：**終末細気管支から肺泡洞の領域に、長短、数十本～百本以上の T-CNT7 繊維を貪食したマクロファージを終末細気管支上皮面から肺泡洞にかけて認めた。T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、細胞死に向かう過程にある事を示唆する像であると考えられた。また、これら細胞死に向かう過程にある事が示唆される T-CNT7 貪食マクロファージの近傍には、貪食していた T-CNT7 を受け継ぐと思われるマクロファージは HE 染色標本、MWCNT のスカベンジャーレセプターと考えられている MARCO に対する免疫染色標本で認められなかった。

0W での肺泡域では、一本乃至少数の T-CNT7 を貪食した肺泡マクロファージが散在性に認められた。

**1W：**T-CNT7 貪食マクロファージの肺内分布は曝露後 0W と同様、終末細気管支から肺泡洞の領域に多くみられた。終末細気管支から肺泡洞の領域に、多数の T-CNT7 が肺泡マクロファージに貪食された状態で肺の組織に沈着したもののほか、マクロファージに貪食されていない T-CNT7 の沈着も認められた。また、T-CNT7 沈着部に向かって近傍の終末細気管支からの上皮の伸び出しと考えられる所見も認められた。肺泡域にはマクロファージに貪食されない T-CNT7 が散在性に沈着するが、肺の組織反応は認められなかった。さらに、細気管支周囲の間質で、

リンパ管内に T-CNT7 肺胞マクロファージが列をなしている所見が認められた。このことから、肺内に入った T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された。

**4W:** 終末細気管支から肺胞洞の領域で肺の組織に細胞死に向かう過程にあると示唆される多数の T-CNT7 を貪食したマクロファージを認めたほか、終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織に、終末細気管支上皮の伸び出しや出現頻度は低いものの、多核異物巨細胞を認めた。ただし、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも 8W までの期間内には、認められなかった。

**8W:** 終末細気管支から肺胞洞の領域に型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認め、この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していることから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な組織変化の可能性が示唆された。また、末梢気道周囲間質のリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージと、それに起因したと考えられる単核球の出現が認められた。この所見においても、末梢気道周囲間質において局所的な組織変化が行われた可能性が示唆された。

T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、局所的な組織変化の可能性を示唆する H&E 像を得たことから、今後、免疫染色による細胞種の同定、間質の構造変化の特定を行う事とする。その際、膠原繊維の増加が証明されれば、小型線維化病変に移行する可能性が高くなると思われる。

**肺線維化の検討:** HE 染色では、肺に明確な線維化は認められなかった。このことは、マッソントリクローム染色においても確認された。

**その他の変化:** 肺胞に好酸球を認めたが、その数は多くなかった(図 2-7)。

以上、曝露後 4 週の肺は、曝露後 0 週から 8 週を通して最も多彩な組織像が認められたことから、本試験の曝露条件下では、4 週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆され、肺負荷量測定結果との比較をした結果、8 週では器質化が始まっていると考えられた。

#### ・T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

以下の結果を得た。

#### ・MARCO 陽性マクロファージ数の経時的推移:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、対照群と T-CNT7 高用量曝露群との比較で曝露後 0 W では対照群と比べ、T-CNT 高用量曝露群で MARCO 陽性の肺胞マクロファージ数の明らかな増加が示された。4W 及び 8W において差は認められなかった。

#### ・MARCO 陽性マクロファージの肺内分布:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。

T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布について経時的推移をみると、曝露後 0 W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4 W と 8 W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中する様子が認められた。

なお、曝露後 4 W と 8 W での T-CNT 貪食マクロファージの MARCO 免疫染色の DAB 発色は減弱し、び漫性を呈したり、痕跡程度となったものが多く認められた。

#### ・T-CNT7 貪食による MARCO 陽性マクロファージの形態学的変化:

T-CNT7 高用量曝露群で T-CNT7 を多量に貪食した肺胞マクロファージは胞体が膨化して MARCO 免疫染色の発色が減弱することが示された。また、著しく膨化して MARCO 免疫染色の発色が著しく減



弱した肺胞マクロファージには萎縮したものや、MARCO 免疫染色陽性反応が痕跡程度のものが認められた。

#### **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**

T-CNT の吸入曝露により、8 週まで肺胞マクロファージの割合は有意に減少するのに対し、好酸球、単球は増加することがわかった。また、T-CNT の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT 曝露により肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体が関係していることが示唆された。肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT の曝露で有意に増加することが示された。さらに、T-CNT 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の BALF 中での上昇が確認された。脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、T-CNT 曝露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認められなかった。加えて、BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメータによる解析結果から、細胞の大きさを評価すると、T-CNT 曝露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった。

#### **D. 考察**

T-CNT7 の吸入曝露の分担研究(高橋)では、設定濃度どおりに安定した吸入曝露を実施した。また、肺内負荷量の分担研究(大西)では、1 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m<sup>3</sup> 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。これら二つの分担研究が正確に実施されたことにより、本研究班の目的とする、生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築で、スケールに相当する曝露濃度と肺負荷量のデータを取得できた。

また、病理組織学的評価、並びに免疫機能評価の分担研究においても以下のように有用なデータを

取得することができた。

病理組織学的検査では、T-CNT7 の肺内沈着以外に通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は認められなかった。T-CNT7 の肺内沈着は気道及び肺胞マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺胞領域の細胞外の間質に存在し、貪食マクロファージが終末細気管支から肺胞洞の領域に集簇する傾向が認められた。この結果は、先行研究での知見と一致するものであった。

曝露後 0W から 8W までを経時的に追うと、曝露後 0W から短く、数十本～百本以上の T-CNT7 繊維を貪食したマクロファージが終末細気管支上皮面から肺胞洞にかけて認められたが、これらの T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められた。これらの T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、細胞死に向かう過程にあると考えられた。曝露後 4W では、終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織や多核異物巨細胞を認められたが、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも 8W までの期間内には、認められなかった。

曝露後 8W に、終末細気管支から肺胞洞の領域に型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認めた。この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していたことから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な肺胞構造が改変されている可能性が示唆された。

また、細気管支周囲の間質では、曝露後 1W と曝露後 8W にリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージが認められた。このことから T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された。

以上、曝露後 4W の肺は、曝露後 0W から 8W を通して最も多彩な組織像が認められたことから、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。

マクロファージのスカベンジャーレセプターの中で MARCO は MWCNT に結合すると報告されている。

MARCO 陽性細胞を追跡することで、肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析を試みた。

その結果、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布の経時的推移は、曝露後 0 W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4 W と 8 W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中してくる様子が認められた。

これらの結果から T-CNT7 曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージは、曝露終了直後の 0 W から終末細気管支から肺胞洞の領域に集中しているのではなく、T-CNT7 曝露が終了した後に 1ヶ月以上の時間をかけて終末細気管支から肺胞洞の領域に集まると考えられた。

T-CNT7 の肺内負荷量の測定では、肺内に沈着した T-CNT7 の量は低用量、高用量群とも、0 W から 8 W までほぼ一定に推移し、曝露終了後、肺内から肺外に移行あるいは排泄される T-CNT7 はほとんど無く、肺内に留まることと考えられた(大西)。すなわち、今回の実験条件では、肺内に呼吸によって肺内に吸引された T-CNT7 はマクロファージに貪食されて曝露後 0 W から 4 W に終末細気管支から肺胞洞の領域に集まり、大部分がその場にとどまると考えられた。病理組織学的検査で、曝露後 4 W の肺は、曝露後 0 W から 8 W を通して最も多彩な組織像が認められ、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。この4週を頂点とした組織反応の減弱については、T-CNT7 は4週と8週で同じ量(質量)が肺内に含有されるが、病理学的には炎症の最盛期にあたる4週を過ぎて、8週は一時的に増生した組織が器質化に向かっている時期にあったと考えられた。

病理組織学的評価でみられた肺の組織変化に対応した変化が、免疫機能評価においても示された。具体的には T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少、M1 と M2 マクロファージの比率の経

時的な変動 が T-CNT 曝露群で示されたことや、曝露後 8 W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇が該当する。免疫機能評価での T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少については、病理組織学的検査で T-CNT7 貪食マクロファージに胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、これらのマクロファージが細胞死に向かう過程にあると考えられたことと符合する。M1 と M2 マクロファージの比率の経時的な変動が T-CNT 曝露群で示されたことや、曝露後 8 W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇については、終末細気管支から肺胞洞の領域に集まった T-CNT7 に対する肺組織反応に関連した変化である可能性が示唆された。

以上、T-CNT7 の肺内沈着以外に通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は認められなかった今回の実験においても、4週を頂点とした微小な病理組織変化が肺の中で時間の経過とともに進行していることが示された。

こうした微小な病理組織変化の推移に関連した可能性がある免疫機能の変化も起きていたことが示唆された。病理組織変化と免疫機能変化の関連付けが示唆される事象を拾い上げ、病理組織学的評価で量・反応関係のデータを得ることにより、一層有用な T-CNT7 のカテゴリー評価基盤整備が可能となる。

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、各分担研究でカテゴリー評価基盤を整備するためのデータを取得することができたが、病理組織学的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要とである。

## E. 結論

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、各分担研究でカテゴリー評価基盤を整備するためのデータを取得することができたが、病理組織学

的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要とである。

平成 30 年度は「粒状凝集型」のモデル NM として選定した酸化チタンを用いて吸入曝露実験を行い計画に沿って研究を進めるとともに、平成 29 年度の病理組織学的評価についても研究を進める。

## F. 研究発表

### 1. 発表論文

Senoh H, Kano H, Suzuki Masaaki, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S and Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J Occup Health*. 59: 112-121, 2017

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. *J Toxicol Sci*. 2017;42(2):121-128

Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. *J. Occup. Med. Toxicol*. 11:44 2016.

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

Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora

Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 in press

Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M. Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 in press

Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203

Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10

Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- $\kappa$ B2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. (2017) 69(11):2193-2202.

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune tolerance. *J Clin Cell Immunol*. (2017) 8(4):1000512

Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru

N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. J Exp Med. (2017) 214:1925-1935.

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. J Cytokine Biol. (2017) 2:1-5

Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Autoimmunity: Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. Handbook of Immunosenescence 1-11, 2017

石丸直澄 口腔免疫とその異常 CLINICAL CALCIUM 27(10):21-26, 2017

## 2. 学会発表

相磯成敏, 梅田ゆみ, 大西誠, 齋藤美佐江, 近藤ひとみ, 笠井辰也, 妹尾英樹, 高信健司, 福島昭治, 菅野純. 経気道曝露された多層カーボンナノチューブのリンパ路による肺外移送. 第32回発癌病理研究会. 2017/8/24

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

大西 誠、笠井辰也、東久保一郎、荒木明宏、福島昭治、新開発の粉塵発生装置(N-SHOT Cyclone)による多種類の多層カーボンナノチューブのエアロゾルの観察及びマーカー法に

よる微量定量の検討、第89回日本産業衛生学会学術年会(2016.5.27)

大西誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、平井繁行、福島昭治、N-SHOT Cycloneによるナノ酸化チタンの浮遊係数の提案、第43回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純、N-SHOT Cycloneによる多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7)

新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層カーボンナノチューブ長期曝露による免疫システムへの慢性毒性 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

石丸直澄 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～ 第59回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジウム 2018年9月18日 松本

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A,

Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren 's Syndrome. 第 46 回日本免疫学会  
総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N : A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren 's syndrome 第 46 回日本免疫学会

総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

#### **G. 知的所有権の取得状況**

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他