

. 分担研究報告

平成29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-

分担研究課題名: ナノマテリアルの病理組織学的評価研究

分担研究者 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

研究協力者 山野 荘太郎 同 病理検査室 主任研究員
梅田 ゆみ 同 理検査室 室長

研究要旨

本研究班では、工業的ナノマテリアル(NM)を貪食した際にみられる3つの反応様式 肺胞マクロファージ(M₁)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」、M₁より小さな粒子による「粒状凝集型」に分類できるという先行研究の知見に基づき、これらの3つの貪食反応を誘発するモデルNMを用い、病理組織学的評価、免疫機能評価、肺負荷量を関連付けすることで、NMのカテゴリー評価に資する情報を3ヵ年で整備を目指す。初年度のH29年度は、 MWCNT のモデル物質として選択したMWNT-7の吸入曝露実験を、高橋祐次分担研究者(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)が実施したマウス、肺に対して病理組織学的解析を実施した。T-CNT7のマウス5日間反復全身曝露吸入実験で得た肺について病理組織学的解析を行った。その結果、T-CNT7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、肺胞領域間質中に存在し、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簇する傾向が認められた。多数のT-CNT7を貪食した肺胞マクロファージは、細胞死に向かうことが示唆されたほか、T-CNT7の曝露に起因した微小な病理組織変化が肺の中で時間経過とともに進行し、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に組織反応が減弱していたことが示唆された。また、これに関連すると考えられる変化が免疫機能評価の分担研究(石丸直澄 徳島大大学院教授)においても示された。H29年度にT-CNT7貪食肺胞マクロファージの追跡にスカベンジャーレセプターのMARCO免疫染色が有用であることが判明した。H30年度は、MARCO免疫染色によるT-CNT7貪食肺胞マクロファージの動態について量反応関係を調べるとともに、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てT-CNT7のカテゴリー評価基盤整備のための情報を収集する。

A. 研究目的

本研究班では、工業的ナノマテリアル(NM)の全身曝露吸入試験を実施し、肺内におけるNMの貪食反応について、病理組織学的評価、免疫機能評価、及び肺負荷量との関係において、NMの生体影響に基づくカテゴリー評価に資する情報を3ヵ年で整備を目指す。本分担研究ではこの目的に沿った、病理組織学的解析の体系を整備する。

H29年度は、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして選択した多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つであるMWNT-7(三井)を吸入曝露した肺について病理組織学的評価病理学的解析を行い、NMのカテゴリー評価に資する情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 吸入曝露実験

吸入曝露実験は、分担研究者・高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)が実施した。MWNT-7にTaquan処理を施し高分散化したものを(以下、T-CNT7)を、Taquan直噴式全身吸入曝露御装置を用いて一群16匹、合計48匹のC57BL/6NcrSlcマウスに曝露した。曝露は対照群(0 mg/m³)、低用量群(1 mg/m³)、及び高用量群(3 mg/m³)、に1日2時間(10:00~12:00)、週1日、5週間、延べ2時間×5回、10時間行った(図1)。

5回目の曝露を終了した日を曝露後0週(0W)とし、0W、1週(1W)、4週(4W)、及び8週(8W)に各群4匹ずつを解剖した(4Wの低用量群はfightingにより1匹が死亡したため解剖動物数は3匹となった)。イソフルラン吸入麻酔下で、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)、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挿入し、腋窩動脈を開放し灌流固定をおこなった。先ず、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。

B-2. 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)、マクロファージのマーカーとして、Macrophage receptor with collagenous structure(MARCO)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ーベンジャーリセプターであり、MWCNTに結合すると報告されている¹。染色条件を以下に示す。

SPC(FL-197): SC-13979、Santa Cruz、
希釈倍率×200、

抗原賦活 Proteinase K 10分

MARCO: LSBio-B15006、

希釈倍率×100、室温1時間

抗原賦活 Target Retrieval Solution(DAKO)、
pH9、10~20分

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。

B-3. 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。

B-3-1. 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する。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する。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。

(引用文献)

1: S. Hirano, S. Kannno, A. Furuyams. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. Toxicology and Applied Pharmacology. 232:244-251, 2008

(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)を遵守した。

C. 研究結果

C-1. 吸入曝露実験

C57BL/6NcrSlc 雄(wild type、12 週齢)マウスに T-CNT7(対照群、低濃度群、高濃度群)の全身吸入曝露を行い、曝露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解剖してサンプリングした 47 匹の肺組織について病理組織標本作製した(図 1、低濃度群 4W ファイティングにより 1 匹が途中死亡したため 3 匹)。

C-2. 病理組織標本作製

B-2 に記した方法により病理組織標本作製した。

C-3 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は、T-CNT7 の肺内沈着以外は認められなかった(表 1)。T-CNT7 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た。貪食マクロファージは終末細気管支から肺胞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胞洞の領域における T-CNT7 沈着の様子を図 2-1-(1)に示した。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胞洞にかけて認めた。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 染色標本で認められなかった。このことは後述の MARCO 免疫染色においても同様であった(図 3-4)。

0W での肺胞域での T-CNT7 貪食マクロファージ

沈着を図2-1-(2)に示した。肺胞域では一本乃至少数の T-CNT7 を貪食した肺胞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胞洞の領域に多くみられた(図2-2-(1)、図2-2-(2))。終末細気管支から肺胞洞の領域に、多数の T-CNT7 が肺胞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(図2-2-(1)、図2-2-(2))。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(図2-2-(2))。肺胞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(図2-2-(3))。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(図2-2-(4))。

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(図2-3-(1)、B)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(図2-3-(1)、D、F)や出現頻度は低いものの、多核異物巨細胞を認めた(図2-3-(2))。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(図2-4-(1))。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(図2-4-(2))。

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。

型細胞の増生の検討: 曝露後 0W、1W および 4W の高用量群における 型細胞の特異的マーカー、surfactant protein-C (SP-C) の免疫染色の結果、型細胞の増生を認めなかった(図2-5)。

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(図2-6)。

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 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。肺負荷量測定結果との比較をもって確認する予定である。

C-3-1 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 0W では対照群と比べ、T-CNT7 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(図3-1)。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 0W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4W と 8W 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。

なお、曝露後 4W と 8W 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(図3-2)。

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(図3-3、3-4)。

D. 考察

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は、T-CNT7 の肺内沈着以外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。経時的に追うと、曝露後 0W から短、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。免疫機能評価(分担研究 石丸直澄教授)で、肺胞洗浄液(BALF)の単核球を集めたフローサイトメトリー解析で曝露後 0W に生細胞の割合が減少し、高濃度、低濃度群ともに肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)の減少が示された。高濃度群の肺胞マクロファージの減少は曝露後 8W まで持続することが示された。免疫機能評価での結果とあわせて、病理形態学的に T-CNT7 貪食マクロファージにみられた胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見は、マクロファージが細胞死に向っていることを示唆する所見であると考えられた。

曝露後 4W に終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織や出現頻度は低いものの、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。本試験の曝露条件下では、曝露後 0W から 8W を通して曝露後 4W の肺に最も多彩な組織像が認められ、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(分担研究 石丸直澄教授)においても、曝露後 8W の BALF 中のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子に対してマルチプレックス解析を実施した結果、VEGF あるいは IL-12 が T-CNT7 の曝露によって増加することが示されたことは、曝露後 8W での病理組織学的変化と関連したものと考えられた。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改変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、間質の構造改変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。

その他の変化として、肺胞に好酸球が認められており、低濃度群の曝露後 0W の写真を提示した。低用量群での好酸球の増加は免疫機能評価(分担研究 石丸直澄教授)においても、曝露後 0W だけに示されており、病理組織学検査と BALF のフローサイトメトリー解析(好酸球:CD11c⁻CD11b⁺)の結果が一致した。

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。先行研究(平成 28 年度、26-化学-一般-003、今井田班報告)で同様の T-CNT の曝露(曝露濃度は 2mg/m³)を行った後、12 ヶ月後に解剖したマウスに気管支周囲に線維化が認められた。今回、免疫機能評価の分担研究においても、線維化に関係するとされる MMP12 が BALF の定量化 PCR で低用量群、高用量群とも有意な上昇が 0W から 8W まで持続的に認められたことから、線維化等の慢性影響についても T-CNT7 のリンパ路を介した肺外に移送に起因した可能性が示唆された。

T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

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

MARCO 陽性マクロファージ数の経時的推移の解析では、MARCO 免疫染色写真から判断した限りではあるが、対照群と T-CNT7 高用量曝露群との比較で曝露後 0W では対照群と比べ、T-CNT 高用量曝露群において 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。一方、免疫機能評価の分担研究における BALF のフローサイトメトリー解析では曝露後 0W に生細胞の割合が減少し、高濃度、低濃度群ともに肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)

が減少したという結果が示された。両者の結果が相反する結果となった理由としては、曝露後 0W における高用量曝露群の T-CNT 貪食マクロファージは MARCO 免疫染色(図 8-5)に示されるような、通常のマクロファージとは染色性や形態が大きく異なるものが増加し、これらの T-CNT 貪食マクロファージはフローサイトメーターでは細胞の形状・大きさから生細胞と認識されなかったものと考えられた。

MARCO 陽性マクロファージの肺内分布の解析では、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 0W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4W と 8W 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 0W 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ことが示された。

こうした肺の病理組織学的変化は免疫機能評価の分担研究で示された結果と密接に関係したものであると考えられた。

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、曝露後 8W 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と考えられた。

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 8W 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、T-CNT7 投与に起因した貪食マクロファージにおける Frustrated phagocytosis としての分子生物学的特徴を示している可能性が考えられる。

今年度、高用量曝露群で MARCO 免疫染色陽性細胞の追跡を試み、この手法が T-CNT 貪食マクロファージの動態解析に有用であることを確認することができた。来年度は低用量群での調査を進めて、量反応関係のデータを取得する。肺の微小環境における組織反応には MARCO 陰性マクロファージが関与している可能性も考えられる。

今後、CD11c、F4/80 などの広域肺胞マクロファージマーカー、及び肺胞マクロファージの主要な役割である余剰サーファクタント処理に係るとされている核内転写因子 PPAR 等の多重免疫染色による解析を予定している。また、曝露後 8W に肺胞や細気管支周囲間質で局所的な組織改編と考えられる組織像が認められた。これらの微小肺病変の成り立ちから予後に至るまでの経過を明らかにし、そこにどのタイプのマクロファージがどのタイミングで係わるのかという点についても可能な限り研究を進めて情報を得る。

E. 結論

今回の T-CNT7 の吸入曝露実験では、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が、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おり、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。これらについては、病理組織変化と免疫機能の変化がどのようにかわるのかを注意深く解析することによって、カテゴリー評価に有意義な事象として選別、拾い上げをすることが可能であると考えられた。

謝辞:

本分担研究は日本バイオアッセイ研究センター病理検査室の齋藤美佐江氏、妹尾英樹氏、高信健司氏 並びに国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の辻昌貴氏、森田紘一氏の技術的支援を得ることで遂行することができた。各位に深く感謝を申し上げます。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) 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

2. 学会発表

- (1) 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 吸入曝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
- (2) 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 吸入曝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
- (3) 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 吸入曝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

(4) 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週間吸入曝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

(5) 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、大津

(6) 妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、菅野純、アクリル酸メチルの104週間吸入曝露によるラットの鼻腔発がんと呼吸器病変、第34回日本毒性病理学会学術集会、2018.7.01.25

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図 1. 実験デザイン

表 1. 病理検査結果

	0 W	1 W	4 W	8 W
1. T-CNT7の肺内沈着	+	+	+	+
2. II 型肺胞細胞の増生	—	—	—	—
3. 急性炎症	—	—	—	—
4. 線維化	—	—	—	—
5. 肉芽腫	—	—	—	—
6. BALTの増加	—	—	—	—

(+ : 当該所見あり : 当該所見なし)

- T-CNT7 の肺内沈着以外に明確な病態は認められなかった
- T-CNT7 の肺内沈着は全期間を通して認められ、肺胞マクロファージに貪食されたものと、貪食されていないものが存在した。
- 気道終末部と肺胞管接合部を中心とした領域には、多量の T-CNT7 を貪食した肺胞マクロファージが多く存在した。

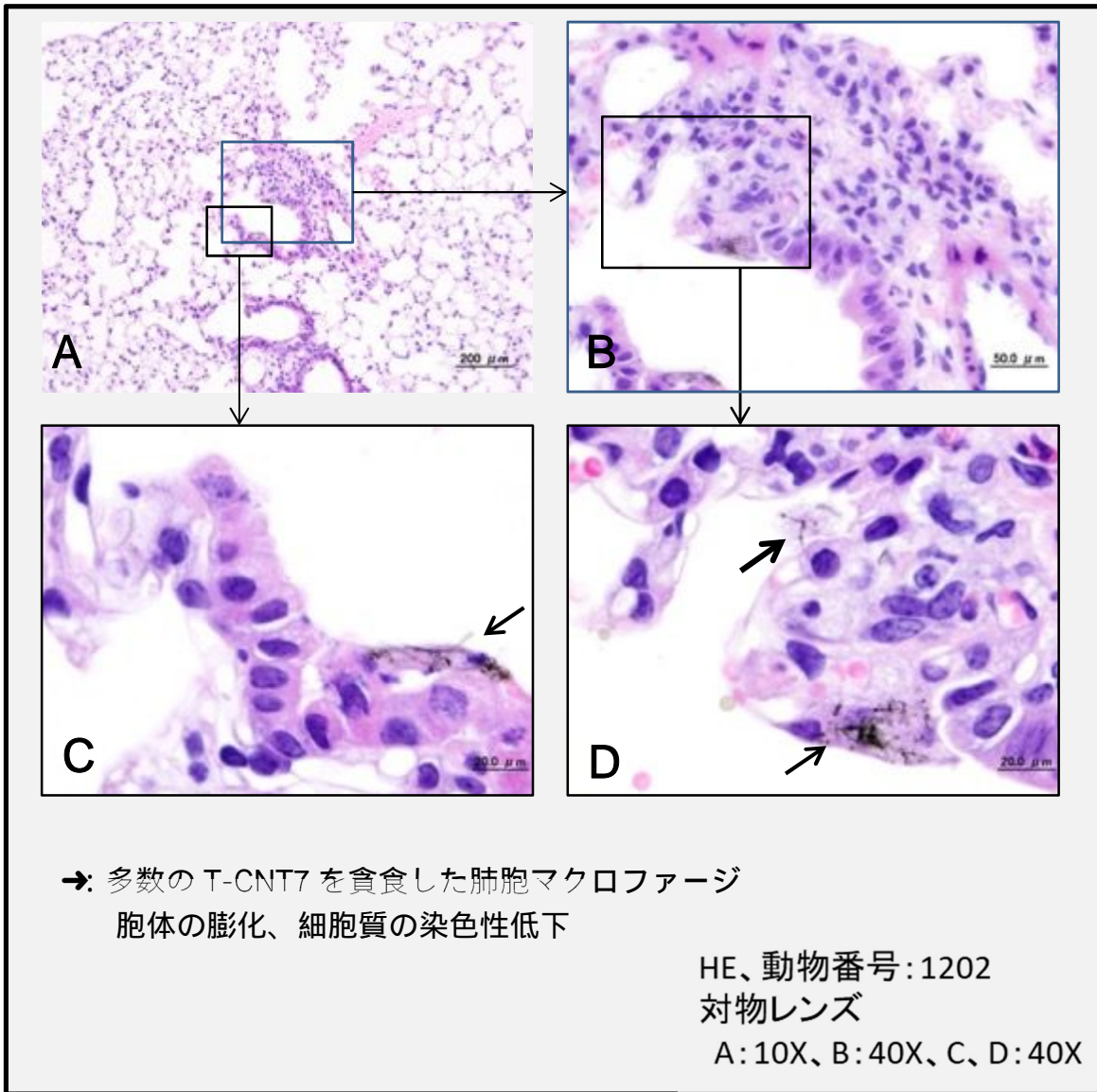


図 2 - 1 - (1). 病理組織学的検査 : 0 W
終末細気管支から肺胞洞の領域

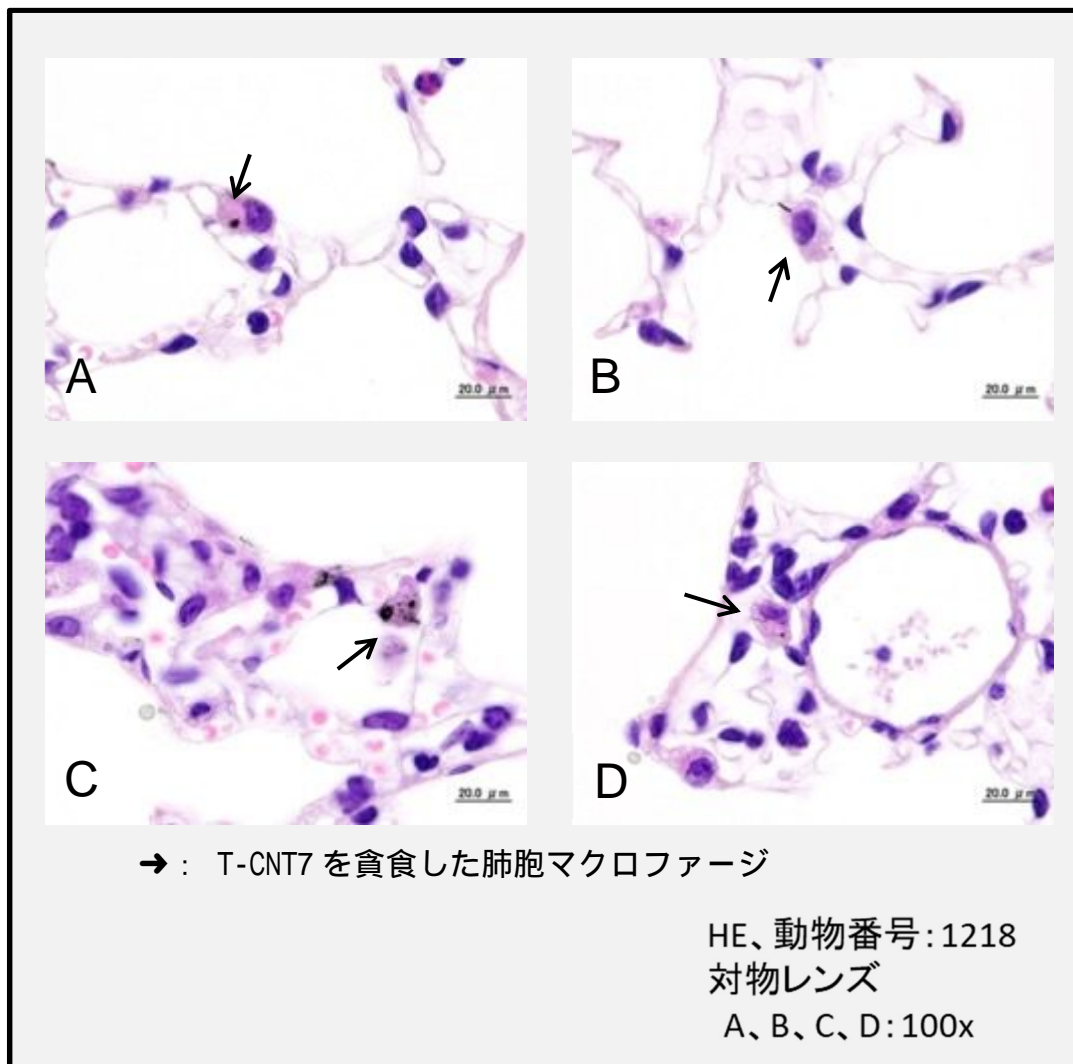


図 2 - 1 -(2). 病理組織学的検査 : 0 W
肺胞域

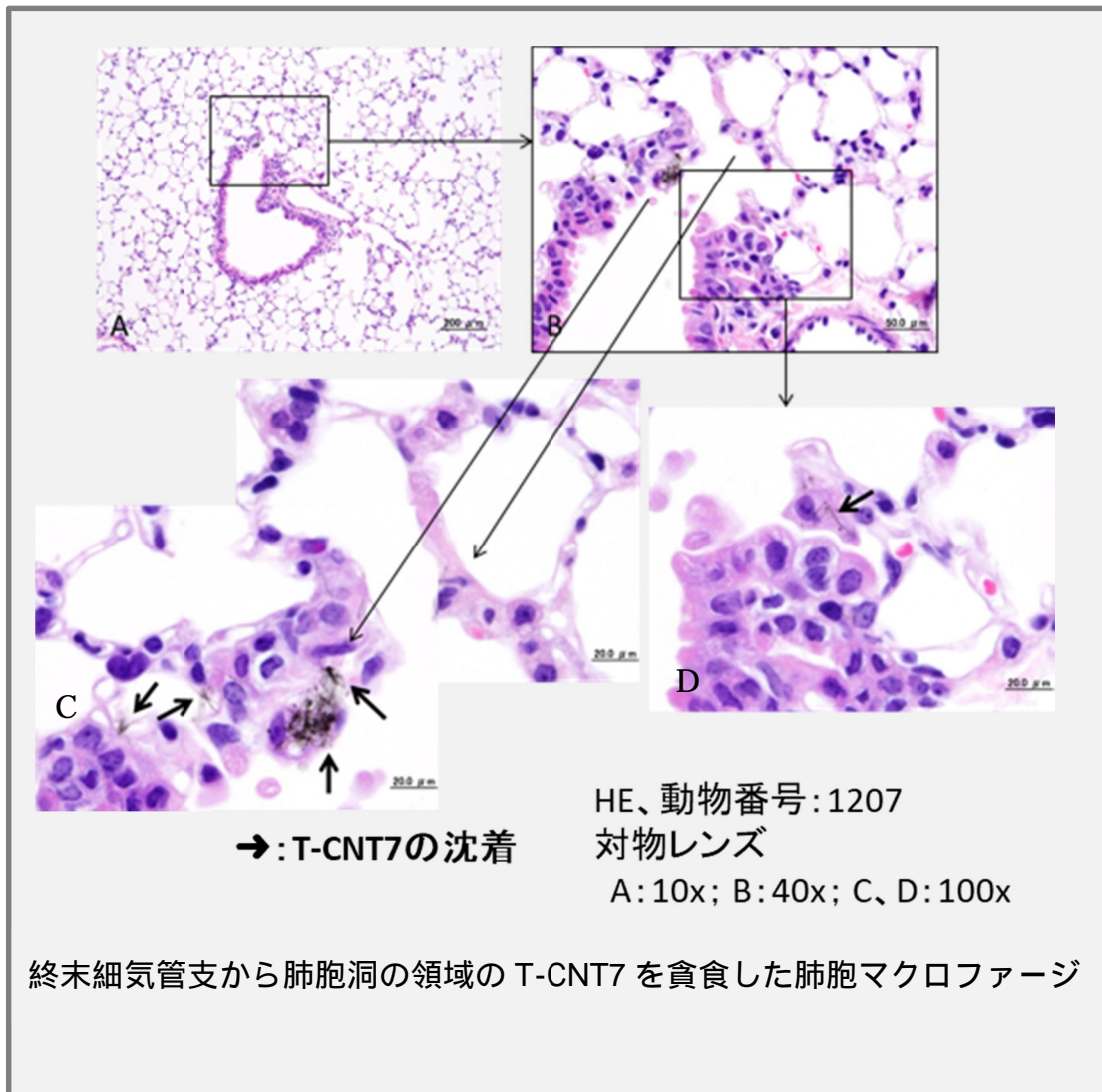


図 2 - 2 -(1). 病理組織学的検査 : 1 W

終末細気管支から肺胞洞の領域

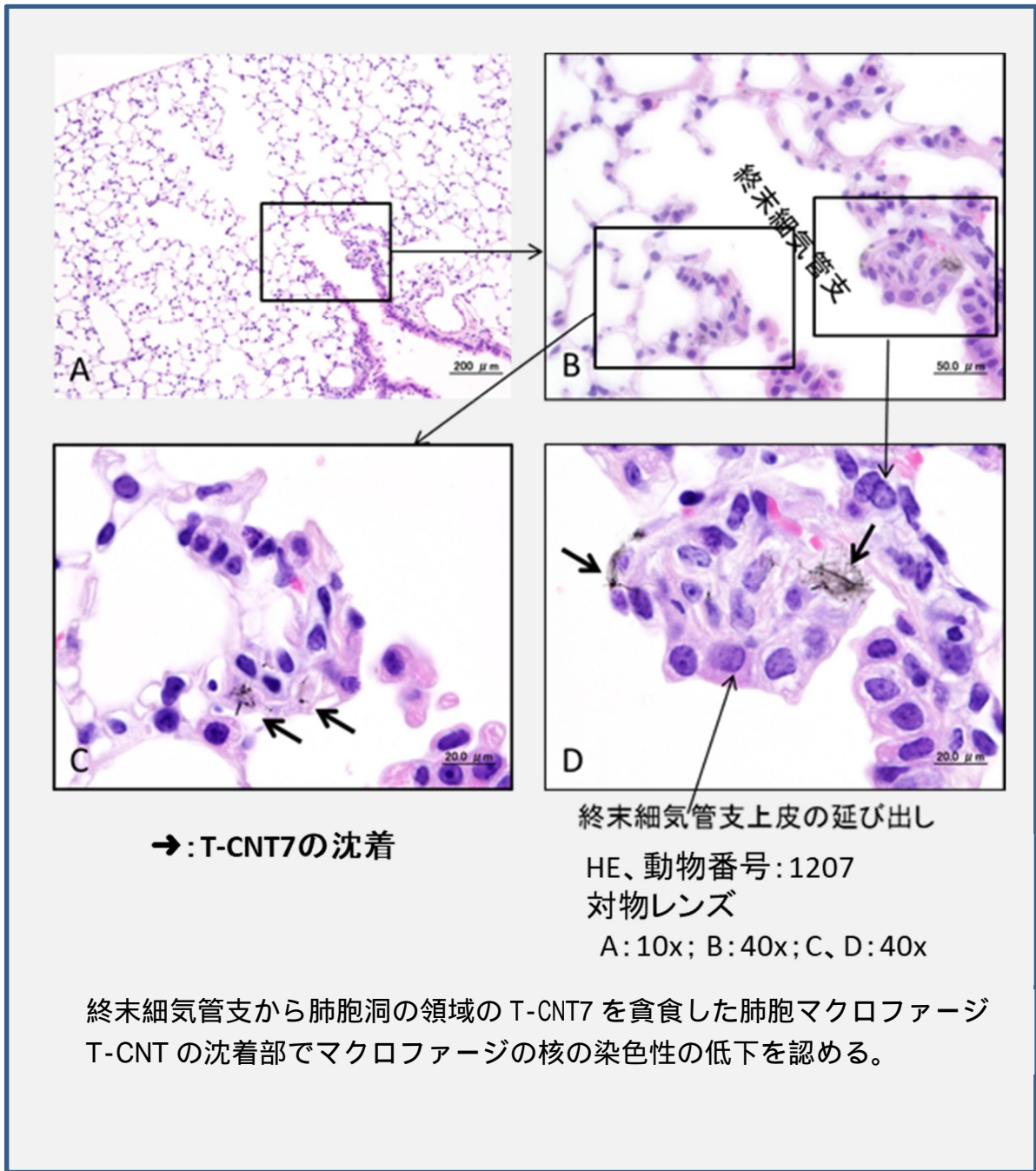


図 2 - 2 - (2). 病理組織学的検査 : 1 W

終末細気管支から肺胞洞の領域

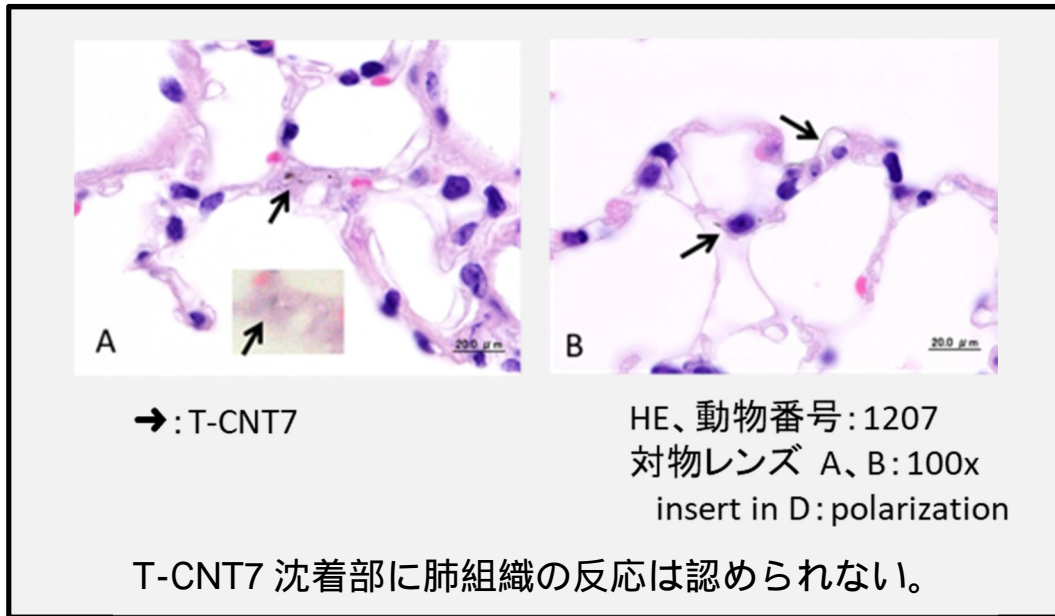


図 2 - 2 - (3). 病理組織学的検査: 1 W
肺胞域

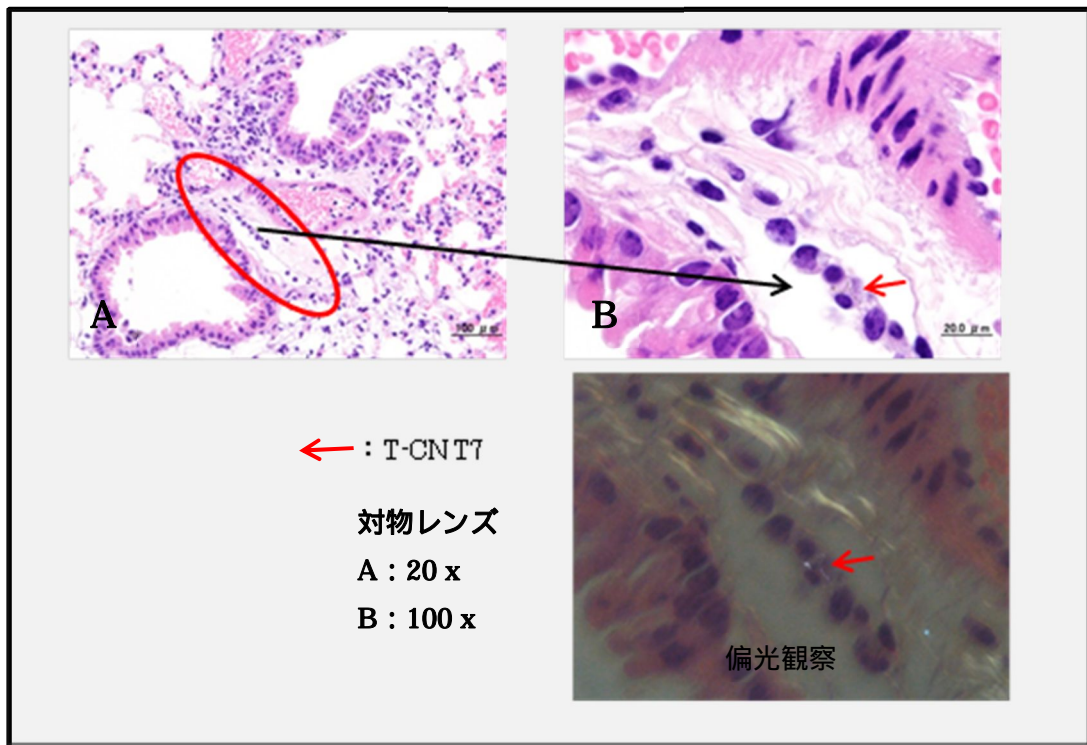


図 2 - 2 - (4). 病理組織学的検査: 1 W
細気管支周囲間質のリンパ管

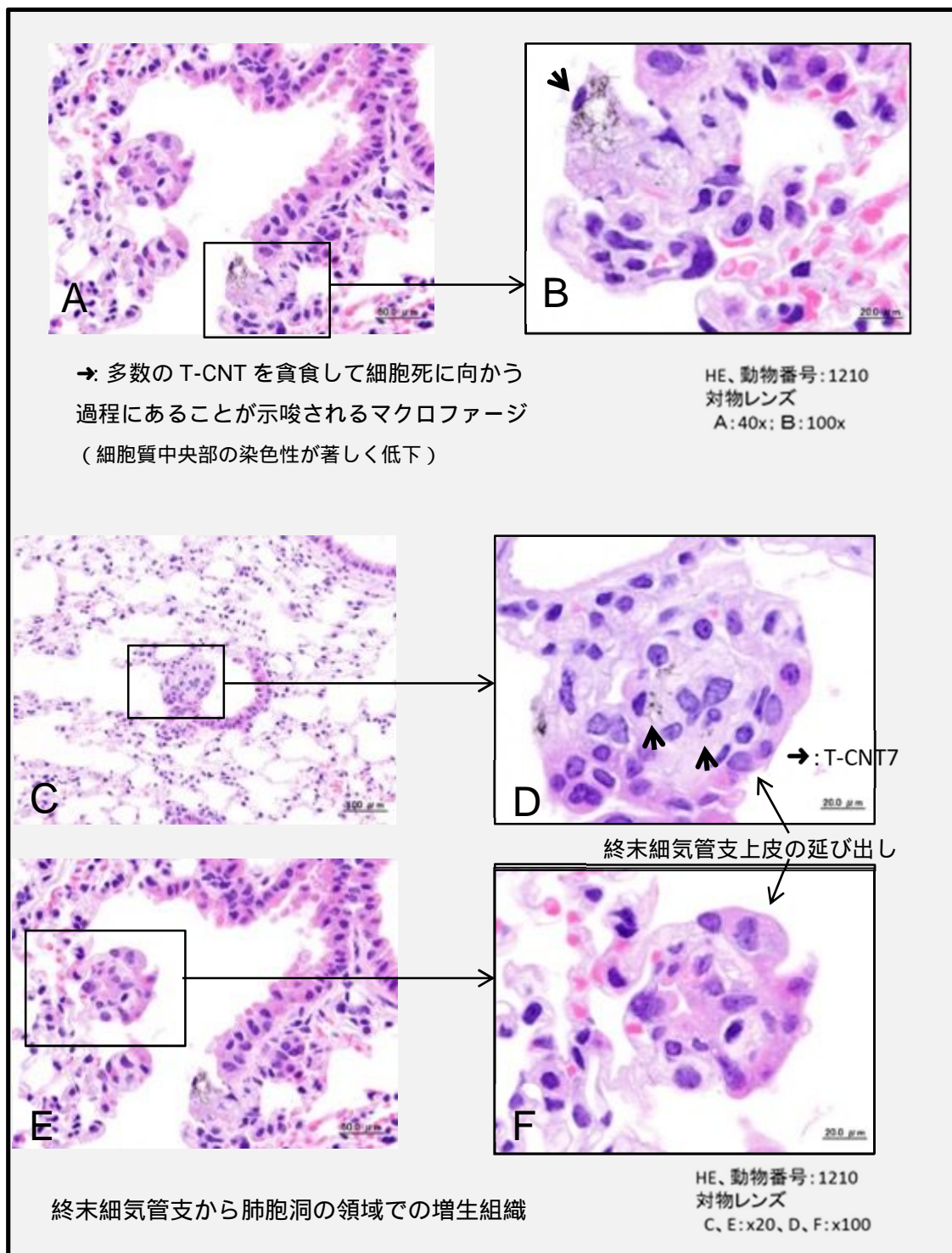


図 2 - 3 -(1). 病理組織学的検査 : 4 W
終末細気管支から肺胞洞の領域

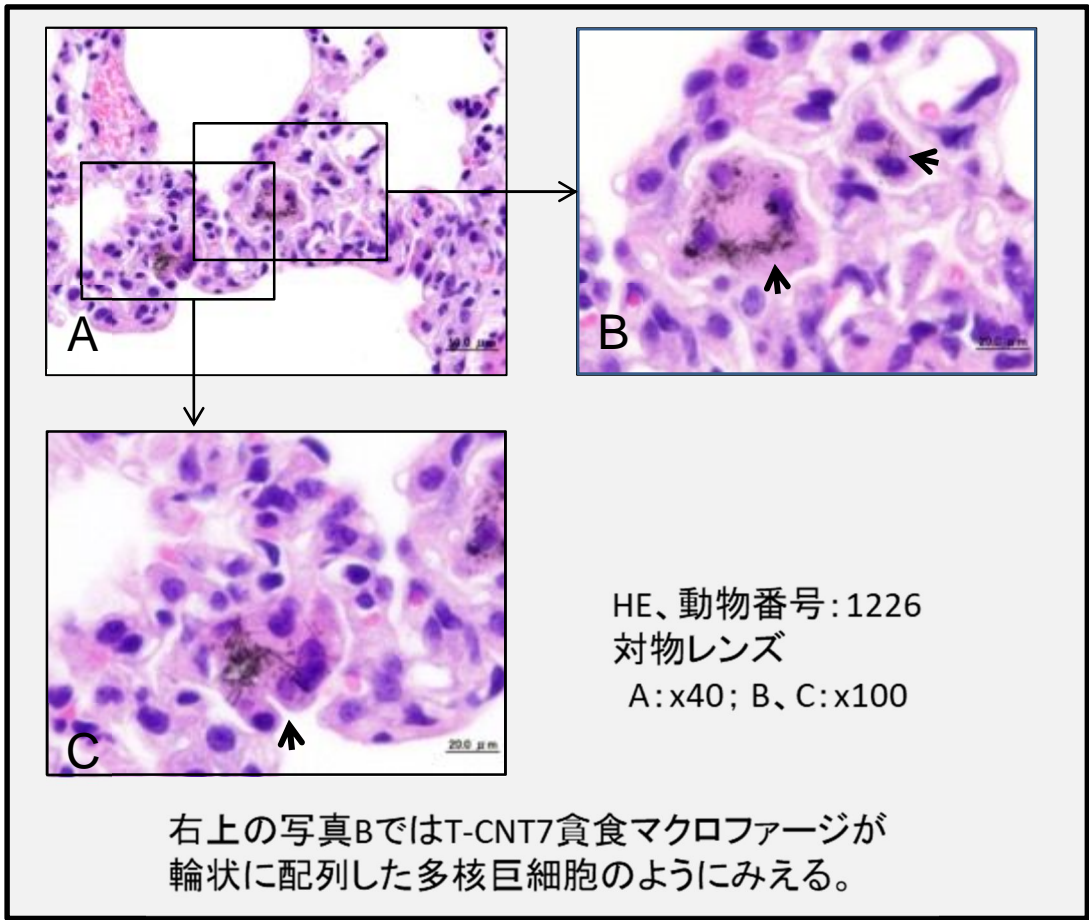


図 2 - 3 - (2). 病理組織学的検査 : 4 W

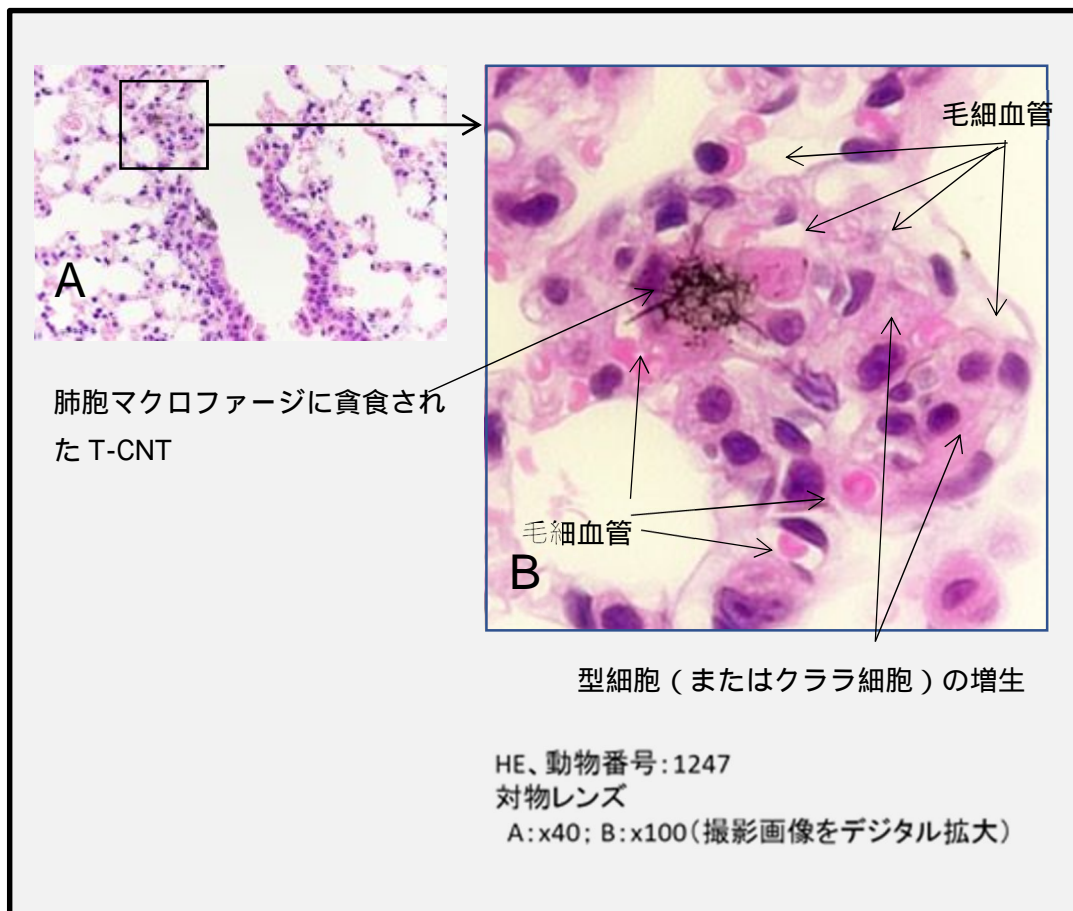
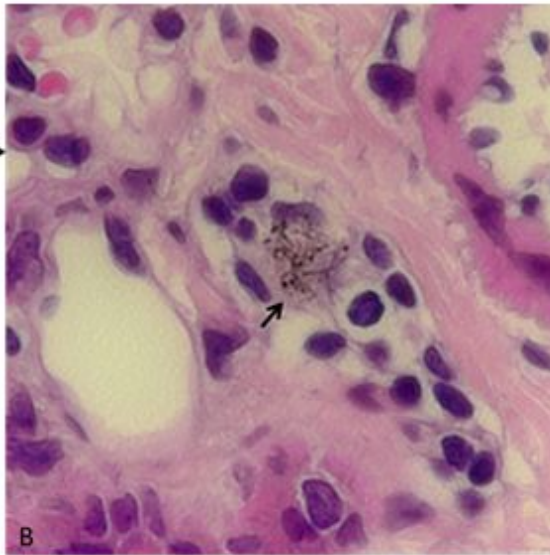
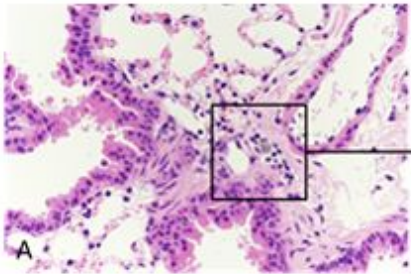


図 2 - 4 - (1). 病理組織学的検査 : 8 W



HE、動物番号：1247

対物レンズ

A：40x；B：100x（撮影画像を

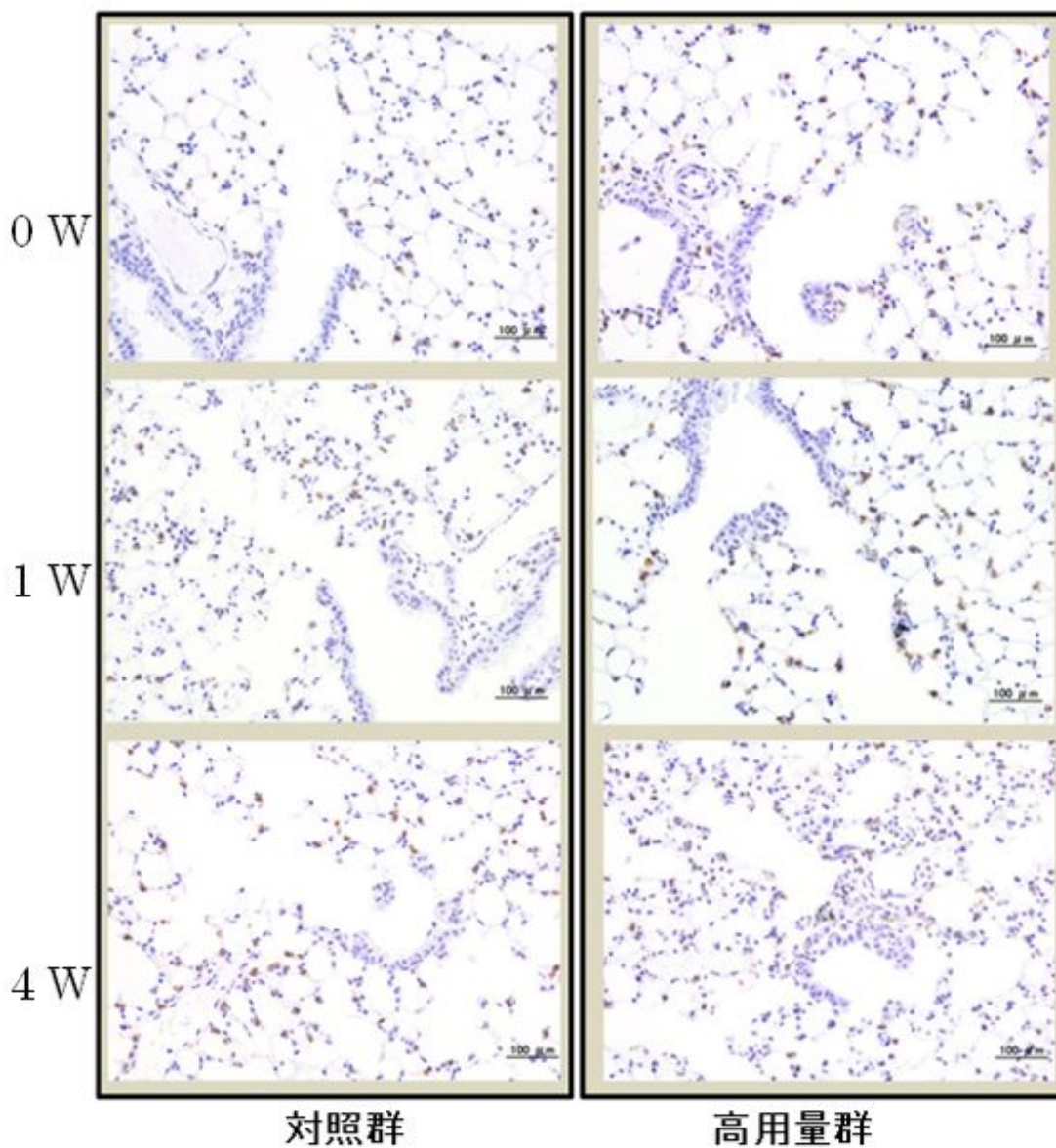
デジタル拡大）

リンパ管内の T-CNT7 貪食マクロファージと

単核球の出現

図 2 - 4 - (2). 病理組織学的検査：8W

細気管支周囲の間質



型細胞の増生を、高用量（T-CNT 3mg/m³）群の0 W から 4 W について 型細胞の特異的マーカー-surfactant protein-C （SP-C）の免疫染色で調べた。その結果、0 W から 4W で対照群と高用量群の間で SP-C の発現に差はなかった。

図 2 - 5 .病理組織学的検査：SP-C 免疫染色

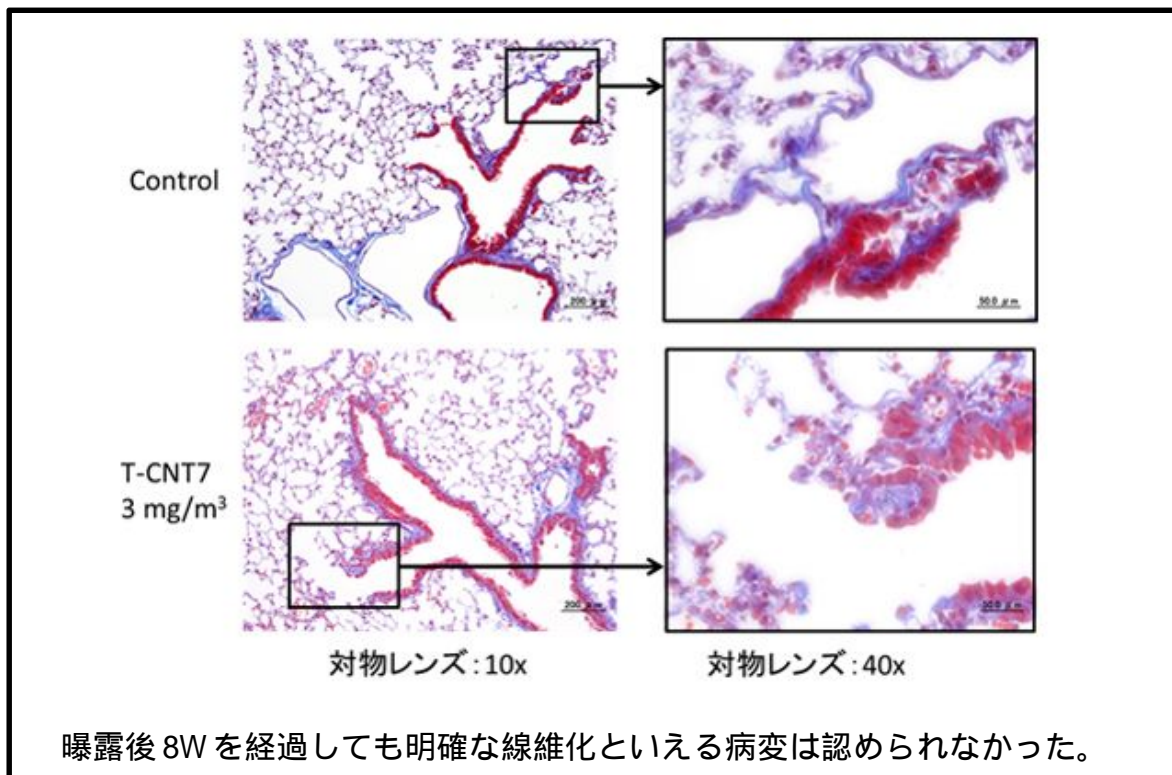


図 2 - 6. 病理組織学的検査：

マッソントリクローム染色

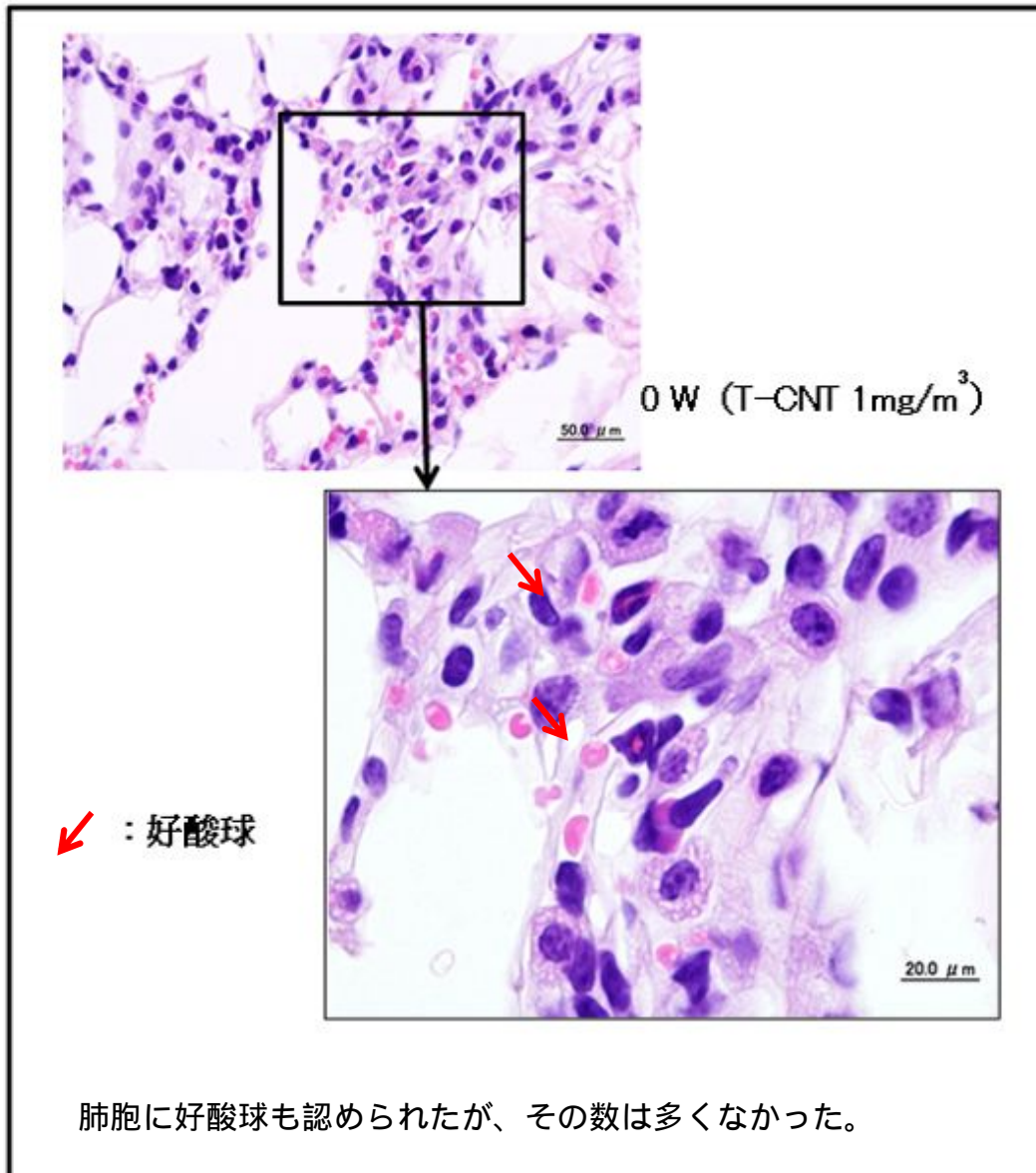


図 2 - 7. 病理組織学的検査：好酸球浸潤

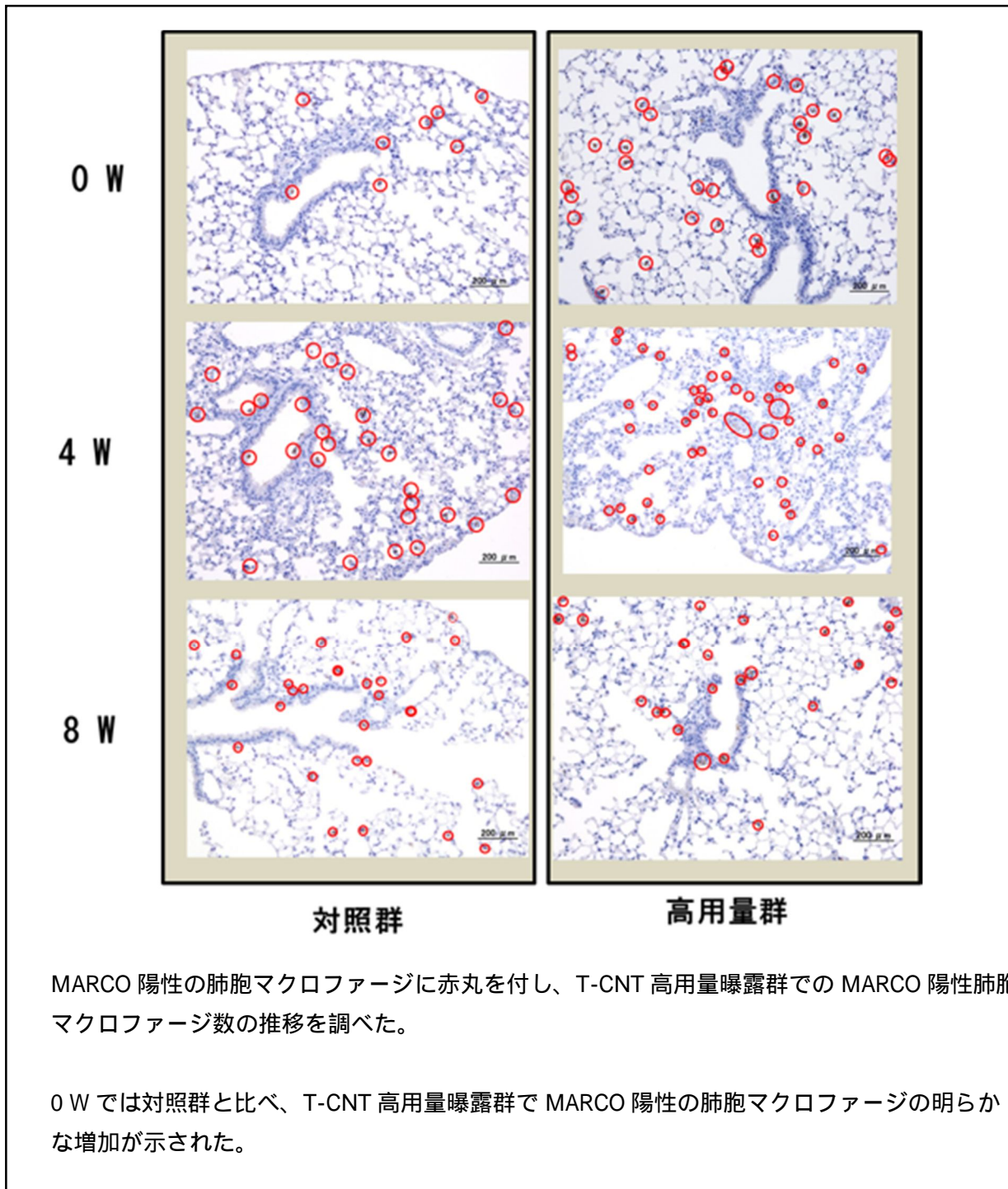
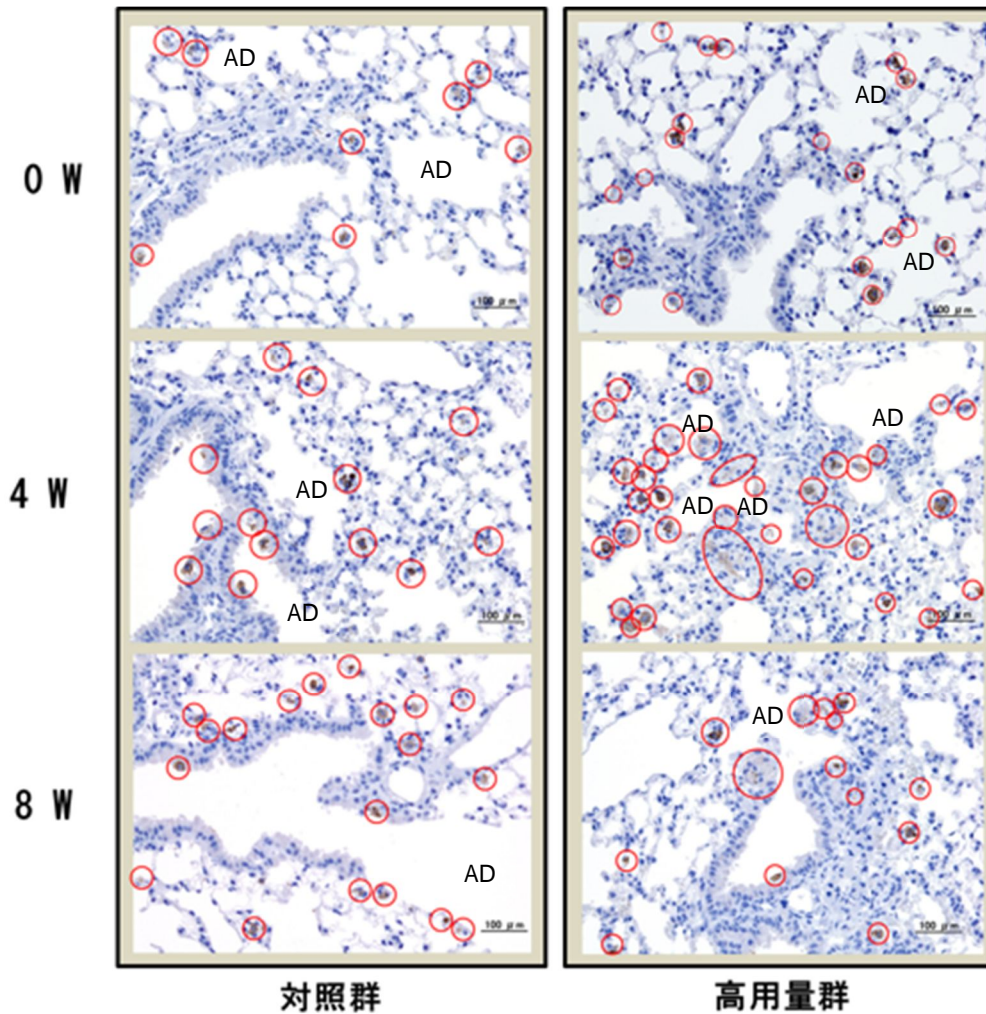


図 3 -1.Marco 免疫染色：

Marco 陽性肺胞マクロファージ数の経時的推移



AD：肺胞管

- MARCO 陽性肺胞マクロファージは、対照群、T-CNT 曝露群とも気流のメインストリーム（終末細気管支-肺胞管）に沿って多く分布していた。
- 吸入曝露によって肺の中に送り込まれた T-CNT7 はマクロファージに貪食され、曝露が終了した後も終末細気管支から肺胞洞の領域への集積が進み 4 W で最も顕著となるが、8 W では MARCO 陽性肺胞の染色性が低下し、DAB の発色が淡くび漫性となった。

図 3 - 2 .Marco 免疫染色：

Marco 陽性肺胞マクロファージの肺内分布

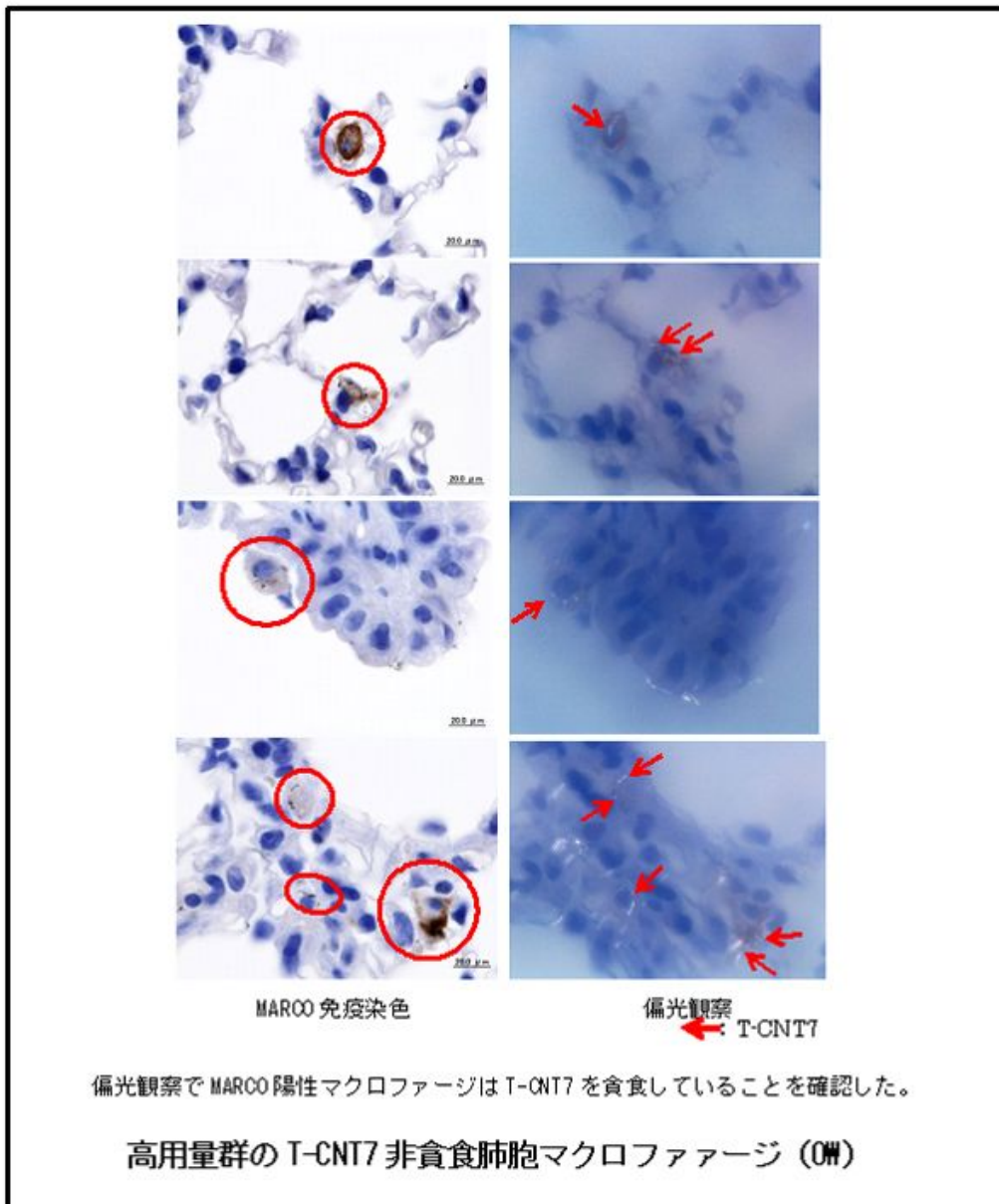


図 3 - 3. Marco 免疫染色：

T-CNT7 貪食肺胞マクロファージの形態

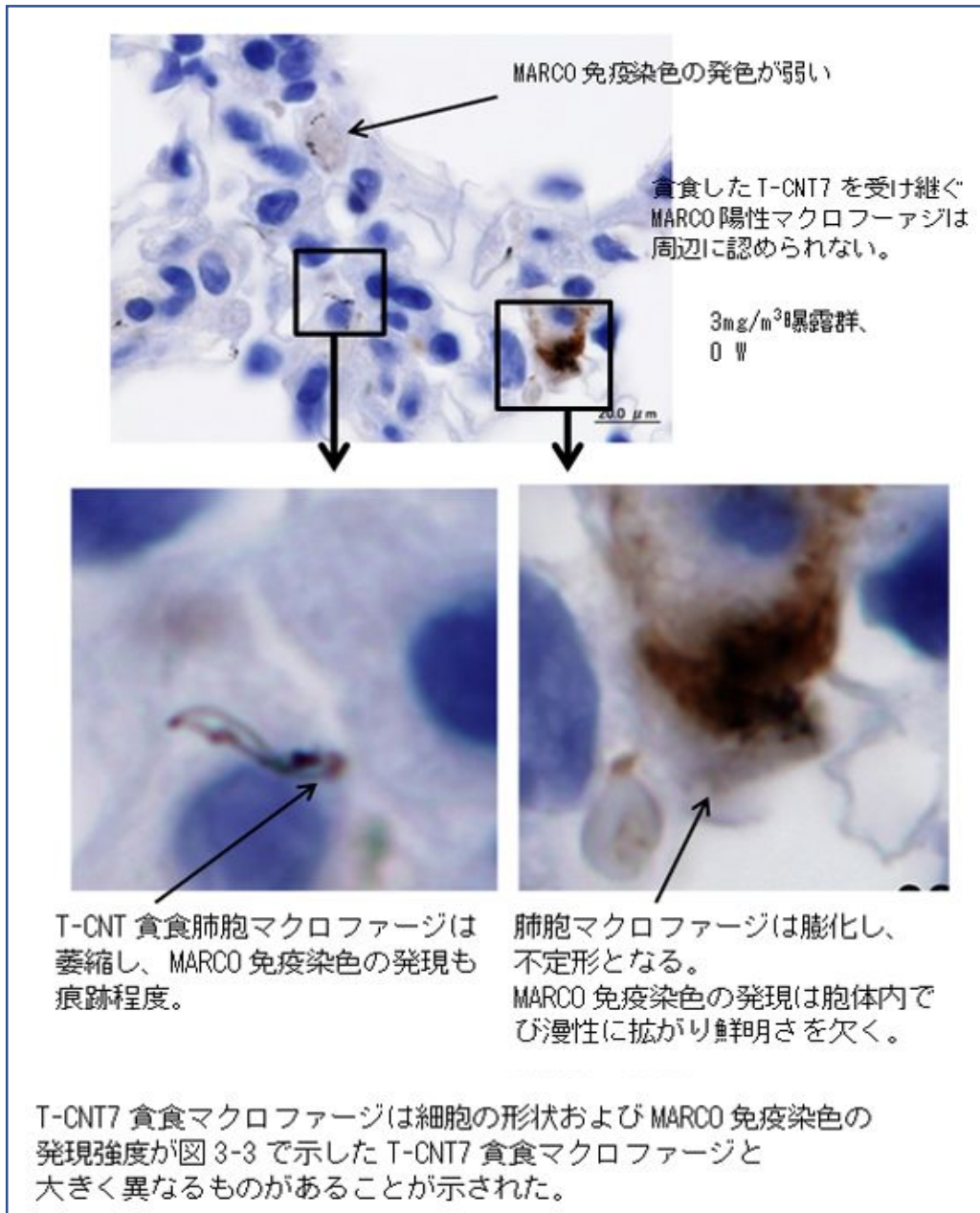


図 3 - 4 (続) . Marco 免疫染色 :

T-CNT7 貪食肺胞マクロファージの形態