

・ 総括研究報告書

平成30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(M ϕ)の in vivo 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M ϕ 胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指す。

3種類のモデル NM を各年度に1物質ずつ吸入全身曝露実験を実施して3ヵ年で研究成果を取り纏める計画で H29 年度に班研究をスタートさせた。H29 年度は「長繊維貫通様式」モデルとした MWNT-7 の吸入曝露実験を実施したが、肺での肉芽腫と線維化病変の形成が弱く、明確な実験解析結果を得ることができなかった。H30 年度は当初から予定していた二酸化チタンの実験に加えて、肺に肉芽腫と線維化病変の形成を期待して粗大な成分が多い MWNT-7 の吸入曝露実験を実施した結果、期待通り肺に肉芽腫や線維化を起こしたサンプルを解析することができた。吸入曝露終了後、経時的に採取した肺サンプルを組織負荷量、病理組織学的評価、免疫機能評価の三方向から解析を行って、「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルに特徴的な有害性発現に関連する要因を抽出した。

その結果、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンを曝露したマウス肺では肺胞マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。一方、MWNT-7 を曝露したマウス肺では二酸化チタン曝露と比べてクリアランスされにくいことが示された。病理組織学的に二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化であった。加えて、免疫機能評価で BALF フロー

サイトメトリ解析での生細胞と肺胞マクロファージの低下、単球、M1 及び M2 マクロファージ、好酸球の増加、MMP12 の mRNA 発現増加を抽出した。NM の有害性発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析により発現強度の把握したうえで要因の絞り込みを行う。

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

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(M)の in vivo 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M 胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指す。

B. 研究方法

NM の肺胞 M 胞体内の蓄積様式の三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」のモデルとして二酸化チタン(AMT-600、テイカ)と、「長繊維貫通様式」のモデルとして選択した MWNT-7 のマウスを用いた吸入曝露実験を高橋(国立医薬品食品衛生研究所)の分担で実施、吸入曝露終了日(曝露後 0 週、1 週、4 週及び 8 週)の定期解剖で採取したサンプルを組織負荷量の測定(大西、日本バイオアッセイ研究センター)病理組織学的評価(相磯、日本バイオアッセイ研究センター)、免疫機能評価用(石丸、徳島大)で解析を実施した。

二酸化チタンと MWNT-7 は Taquann 法による高分散処理したもの(以下、T-TiO₂、T-CNT7)を吸入曝露させた。

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

B-1-1. 検体の高分散化処理(Taquann 法)

実験に供試した TiO₂ と MWCNT の物理化学的性状は次の通り。

・TiO₂

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

以下の性状はテイカ株式会社のウェブサイトの情報である。

結晶形	アナターズ
TiO ₂ 含量	98%

一次粒径 30 nm
pH 弱酸性
比表面積 52 m²/g

・MWCNT

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)
長さ 1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数 3.55 × 10¹¹ 本/g
形状 繭状凝集体を含む単離繊維
化学組成 炭素純度 99.5% 以上
鉄: 3500 ppm
硫黄: 470 ppm
塩素: 20 ppm
フッ素: <5 ppm
臭素: <40 ppm

TiO₂ 及び MWNT-7 とともに実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維のみからなる分散性の高い検体を得る処理法 Taquann 法処理 (特許取得) を行った。Taquann 法は、走査型電子顕微鏡 (SEM) の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、検体を三級ブタノール (TB、融点: 25.69 °C、関東化学株式会社 特級) に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾液を溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の検体が得られる。

TiO₂ は、ガラス製メedium瓶内で TB と混合し 1 mg/mL の懸濁液とした。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散処

理を行い、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μm) で濾過した。濾液を液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理を行った二酸化チタンを T TiO₂ と記載する。

MWNT-7 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 53 μm) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧して TB を昇華させて除去し MWNT-7 の乾燥検体を得た。

H29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30 年度ではタングル状成分が多いと想定される目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。以下、目開き 25 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と記載する。T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状については、予備試験において、曝露チャンパー内のエアロゾルをアルミナフィルター (ワットマン、孔径 0.02 μm、25mm、Anodisc) に吸着させてサンプリングし、オスミウムコーター (HPC-1SW 型、真空デバイス) により 5 秒間オスミウムコートを行い走査型電子顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で 2,500 倍、加速電圧 2 ~ 2.8kV の条件で観察した。

B-1-2. マウス全身曝露吸入実験

(1) 動物

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 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。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチに

より行った。

(2) 飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージとPET製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1ケージ当り4匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度; 25 ± 1 、湿度; $55 \pm 5\%$ 、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時 ~ 20 時点灯(照明明暗サイクル 12 時間)とし、固型飼料 CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。ケージ内の環境を改善する目的で、シェパードシャック(Shepherd Specialty Papers 社)をケージ内に設置した。

(3) 群構成

対照群、T TiO₂ 群(目標濃度 30 mg/m³)、T-CNT7#53 群(目標濃度 3 mg/m³)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。曝露チャンバーに収容できるマウスの匹数が 25 匹であることから、各群を 25 匹のサブグループ(Sub-group A、Sub-group B)に分け、1 日 2 時間(10:00 ~ 12:00)の週 1 回の吸入曝露を 5 週間反復し、合計 10 時間の曝露を行った。

(4) ダスト発生装置

T-CNT7 のエアロゾル化は、Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)。この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成され、噴射装置がサブチャンバー(容量: 43 L)に接続されていて、噴射された検体はサブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。曝露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min(基礎換気流量; 29.5

L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min)と設定した。目標濃度に速やかに到達させるため、曝露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の 2 時間を通してモニタリングした。

(5) 曝露チャンバー

動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 25 匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製のアウトターチャンバーと PET 樹脂で作製したインナーチャンバー(直径 660 mm、高さ 477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。メインチャンバーの気積 179 L である。

(6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m³)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nm の粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、USA)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

曝露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。先行研究において、CPC による MWCNT の測定では 1×10^3 個/mL 程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、T-CNT7#53 群では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。CPC の測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWNT-7 のように繊維径は 100 nm 程度であるが、繊維長は 10 μ m を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定さ

れる。T-TiO₂群では、目標濃度がCPCの測定上限を超えると想定されることから、15倍希釈して測定を行った。また質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、55mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダ-ガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 99.9%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して1.5 L/minの流量で曝露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min = 180 L から 1 m³当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

(7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、二つの方法で実施した。一つは、T-TiO₂とT-CNT7#53ともにMicro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いたMass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)である。10 L/minの流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引してMOUDI(Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm, No.2; 5.6 μm, No.3; 3.2 μm, No.4; 1.8 μm, No.5; 1.0 μm, No.6; 0.56 μm, No.7; 0.32 μm, No.8; 0.1 μm, No.9; 0.10 μm, No.10; 0.056 μm, No.11; 0.032 μm, No.12; 0.018 μm, No.13; 0.01 μm)に導いた。吸引時間はT-TiO₂では10分、T-CNT7#53は20分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に50℃のインキュベーター内で3日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI装着前と、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

もう一つの方法は、粒子の電気移動度によって測定

するScanning Mobility Particle Sizer (SMPS, Model 3034, サンプリング流量:1.0 L/min、TSI, MN, USA)である。SMPSは粒子径の測定範囲が10~500 μmであるため、T-TiO₂のみを対象とした。エアロゾル濃度がSMPSの測定上限を超える濃度と想定されるため、25倍希釈して測定を行った。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られること、曝露チャンバーの気積が約180Lと比較的小さいため、測定機器のサンプリング流量を加味した流量調整が必要となることから、測定回数を限定して行った。

(8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後(Day 0)、1週後(1W)、4週後(4W)及び8週後(8W)に定期解剖を行った。マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DSファーマアニマルヘルス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。病理標本用の動物は、気道内のT-CNT7の人為的移动を避けるため、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。具体的には、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入しPBSを注入してBALを採取した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用実験施設内で実施しており、曝露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

B-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

吸入曝露実験を担当する高橋ら(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)から提供を受けた肺と縦隔の組織負荷量を測定した。

B-2-1 : T- TiO₂ の組織負荷量の測定

(1) T- TiO₂ 検量線の作成

検量線溶液 C7 を調製し、それを段階希釈して7ポイントの検量線溶液 (C7、C6、C5、C4C3、C2、C1) を調整した。

検量線溶液 C7 の調製手順。

1000µg/mL の T- TiO₂ 標準溶液 0.1mL に 3 % 硫酸水 0.9mL を加 10 倍希釈し、さらに、その溶液 0.1mL に 3 % 硫酸水を 0.9 mL 加え T- TiO₂ 標準液の 100 倍希釈液とした。T- TiO₂ 標準液の 100 倍希釈液 0.4mL に 3 % 硫酸水で 9.6 mL を加え 25 倍希釈した(検量線 C7 : 0.4 µg/mL)。

(2) サンプル中の T-TiO₂ 測定

検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の原子吸光で測定した吸光度値を直線回帰式に代入し、チタンの測定値を求めた。酸化チタン中のチタンの含有率は 60% であることから、原子吸光で測定したチタン量から換算して酸化チタン量として計算した。この値に希釈倍率を乗じることにより、酸化チタンの個体当りの沈着量 (単位 : µg) 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、各肺及び縦隔の重量で除することにより肺及び縦隔の g 当り

の値 (単位 : µg/g) とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

B-2-2 : T- CNT7 の組織負荷量の測定

10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液で 1 か月以上浸漬固定した肺及び縦隔のサンプルを 60 °C で 24 時間かけて、気相部分は窒素ガスで置換しながら溶解して測定溶液を調整した。また、溶液中の T-CNT7 の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し検量線溶液調製した。測定を阻害する T-CNT7 以外の組織成分の除去については、分担報告 B-5-1-1、B-5-1-2、B-8-1 参照。

T- CNT7 の組織負荷量はベンゾ[ghi]ペリレンをマーカーとした微量定量法 (大西法 : 定量限界 0.04 microgram/肺) を用いて測定する。使用するマーカー溶液の調製については、分担報告 B-5-1-4 参照。

(1) T- CNT7 検量線の作成

検量線溶液 C5 を調製し、それを段階希釈して7ポイントの検量線溶液 (C5、C4、C3、C2、C1) を調整した。

検量線溶液 C5 の調製手順。

T-CNT7 原液 0.2 mL を 15 mL 容のフタ・メモリ付の PP チューブに採取し、Tw-sol により 10 mL にメスアップし、1 分間超音波分散した。
(検量線溶液 C5 : 1 µg/mL)

(2) サンプル中の T-CNT7 測定

測定溶液のマーカー溶液を添加してサンプル中の T-CNT7 にマーカーを吸着させた後、0.4 µm のフィルター (ワットマン : GE Healthcare UK Ltd) でろ過することで余分なマーカーを除去、フィルター上の T-CNT7 をポンチ (8 mm) でくり抜き、アセトニトリルでマーカーを脱着して抽出、HPLC で測定した。

検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の HPLC で測定した面積値

を直線回帰式に代入し、T-CNT7 の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、T-CNT7 の肺個体当りの沈着量（単位： μg ）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、各肺及び縦隔の重量で除することにより g 当りの値（単位： $\mu\text{g/g}$ ）とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

B-3. 病理組織学的評価研究

病理組織学的評価研究は吸入曝露実験を担当する高橋ら（国立医薬品食品衛生研究所毒性部）から肺と縦隔の組織の提供を受けて実施した。

病理組織学的解析サンプルは曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖された肺と縦隔の組織で、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）で約 3 分灌流固定後、同組成固定液（4%PFA）にて一晚浸漬固定（冷蔵）、翌朝、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（ナカライテスク）に交換して保存された状態で提供を受けた。気管支肺胞洗浄液（BALF）塗抹標本は、国立医薬品食品衛生研究所での定期解剖で免疫機能評価の分担（石丸）と協働で BALF を採取。その際、免疫機能評価に割り当てた各解剖期の 6 匹のうちの 3 匹についてサイトスピンで BALF150 μL を塗抹メタノール固定後、所属施設で May-Grunwald-Giemsa 染色、解析した。

B-3-1 病理組織標本作製

固定後の肺と縦隔から組織片を切り出し、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に供した。縦隔は胸腺を含む縦隔組織の全長に渡り 3mm 幅で切り出し、左肺は肺の長軸と平行に 3 切片、右肺は全断面を水平方向に切り出した。

B-3-2 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-TiO₂ 及び T-CNT7 の沈着と組織反応、T-TiO₂ 及び T-CNT7 の吸入曝露と肺の線維化病変の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。通常の病理組織学的検査に加えて、100 倍（油浸）の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア（Adobe Photoshop CS5）でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない組織変化について検討した。

B-3-3 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

BALF 塗抹標本に観察される免疫担当細胞（肺泡マクロファージ、単球、好中球、好酸球）の計数と百分比の算出、肺泡マクロファージで吸入曝露した検体（T-TiO₂ または T-CNT7）の貪食率を調べて経時的推移を調べた。また、BALF 塗抹標本に観察される肺泡マクロファージについての詳細な形態学的解析を行った。

B-3-3-1: BALF 塗抹細胞の百分比

各解剖期（n=3）の BALF 塗抹細胞の分画を計数して 500 細胞当たりの百分比の平均値を求めた。具体的には、BALF 塗抹細胞の計数は 40 倍の対物レンズを装着した光学顕微鏡を用いて目視によって、一匹当たり 503～624 細胞について肺泡マクロファージ、単球、好中球、好酸球に分類し、それぞれの細胞数を集計、それを 500 細胞当たりに換算した。

B-3-3-2: BALF 塗抹標本に観察される肺泡マクロファージにおける検体の貪食率

B-3-3-1 で肺泡マクロファージと分類した細胞について、検体（T-TiO₂ または T-CNT7）を貪食しているものと非貪食のものに分けて計数し、両者の比率の経時的推移について検討した。

B-3-3-3 BALF 塗抹肺泡マクロファージの詳細な形態学的解析

通常の観察に加えて、100倍(油浸)の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア(Adobe Photoshop CS5)でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない形態学的な変化を含めて病因学的な意義について検討した。

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

解析に供試したサンプルは吸入曝露実験を担当する高橋ら(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)から肺と縦隔の組織の提供を受けて、T-TiO₂またはT-CNT7の曝露後、0、1、2、4および8週間における肺組織における免疫システムの変動を肺胞洗浄液中の単核球(BALF細胞)のFCM解析、BALF細胞と肺組織の遺伝子のmRNA発現量の変動を把握した分担研究結果からT-TiO₂曝露とT-CNT7曝露に特徴的なものを抽出した。

B4-1: フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄で採取したBALF細胞、頸部リンパ節、脾臓の単核球についてフローサイトメトリー解析を行った。

肺胞洗浄液からの単核球の採取は、定期解剖の際、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PBSを流し込み洗浄液を回収後、遠心した。リンパ節からの単核球の採取は、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用いて採取、脾臓からの単核球の採取は、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、濾過を行って採取した。

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。解析では、FSC/SSCから生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、CD3⁻CD19⁻7AAD⁻細胞からCD11c/CD11bにて展開することによって、肺胞マクロファージ(AM)、好酸球(E)、単球(M)に分類した。さらに、AM分画をCD192/CD206で展開することによってM1(CD192)あるいはM2(CD206)マクロファージサブセットの検出を行った。一方で、F4/80とCD11bをマーカーとした分画も検討した。肺胞マクロファージはF4/80⁺CD11b⁻の表現型を示し、前年度までの報告ではT-CNT7の吸入曝露でF4/80⁺CD11b⁺あるいはCD11b^{high}の分画が増加することがわかっている。この分画はM1マクロファージの性格を有していることも知られている。

B4-2: 定量化RT-PCR法による解析

BALF細胞および肺組織の一部を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。下記のプライマーセットを用いて、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。

CD204; forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3',
reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3',
Col IV; forward, 5'-ATGCCCTTCTCTTCTGCAA-3',
reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3',
GM-CSF; forward,
5', -CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA-3
reverse, 5'-CAGCTTGTAGGTGGCACACA-3',

IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3',
reverse, 5'-CAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3',
IL-33; forward, 5'-ATTTCCCGGCAAAGTTCAG-3',
reverse, 5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3',
MMP12; forward,
5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',
reverse,
5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',
TIMP-1; forward,
5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3',
reverse,
5'-GGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3',
VEGF; forward, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3',
reverse, 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3',
 β -actin; forward,
5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3',
reverse,
5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、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)及び所属の研究機関が定める規定を遵守した。

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

C-1-1. 検体の高分散化処理(Taquann法)

(1) T-CNT7#25とT-CNT7#53のエアロゾルの性状
アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを2,500倍の倍率で50視野($51\ \mu\text{m} \times 38\ \mu\text{m}$)を観察し、共有結合した状態のエアロゾル(Aggregates)と、複数の繊維が絡まったエアロゾル(Agglomerates)の数、およびその比率を比較した。その結果、Aggregatesの数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53それぞれ0.5個/視野、1.4個/視野、Agglomeratesの数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53それぞれ1.5個/視野、4.1個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53はT-CNT7#25よりもAggregatesおよびAgglomeratesの数が多く観察された。一方、AggregatesとAgglomeratesの比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ25%と75%と同じ割合であった。

C-1-2. マウス全身曝露吸入実験

(1) T-TiO₂の吸入曝露実験

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-TiO₂の5日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度(Sub-Group A \times 5回、Sub-Group B \times 5回、計10回)は $34.8 \pm 3.1\ \text{mg}/\text{m}^3$ (平均値 \pm SD)であった。平均CPCカウント(同10回)は $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD)であった。

MMADは893~1,060nm(σ :3.5~4.2)であり、全体の平均(5回)は、975.3nmであった。

SMPSの測定では、1回の吸入曝露実験で約30の

データが生成され、合計 150 程度のデータが得られたが、ほとんど同様の値を示していた。代表例として示された Sub-Group B の三回目のデータでは粒子径の中央値は 149.4 nm、平均値は 177.6 nm 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、390 mg である。2 時間の曝露チャンバーの総換気量は 3.9 m³ であることから名目上の濃度は 100 mg/m³ と計算される。実際に測定した濃度の平均は 34.8 mg/m³ から、エアロゾル化効率を計算すると 34.8% であった。

(3) T-CNT7 の吸入曝露実験

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全体の平均質量濃度 (Sub-Group A × 5 回、Sub-Group B × 5 回、計 10 回) は 3.0 ± 0.1 mg/m³ であった。平均 CPC カウント (同 10 回) は 1,449 ± 155/cm³ であった。

MMAD は 522 ~ 1,114 nm (σg: 5.3 ~ 7.9) であり、5 回の平均は、788.2 nm 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、15 mg である。2 時間の曝露チャンバーの総換気量は 3.9 m³ であることから名目上のエアロゾル濃度は 3.8 mg/m³ と計算される。実際に測定した濃度の平均値 3.0 mg/m³ から、エアロゾル化効率を計算すると 78.9% であった。

(4) 剖検

本実験において定期解剖した全ての個体で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

C-2-1 T- TiO₂ の組織負荷量の測定

(1) 肺: 肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 150.11 ± 9.05 μg/g、1 週目では 112.47 ± 13.94 μg/g、4 週目では 63.05 ± 7.21 μg/g、8 週目では 25.85 ±

11.36 μg/g であり、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/6 の減衰傾向が認められた。

縦隔負荷量: TiO₂ の負荷は認められなかった。

(2) 縦隔: TiO₂ の負荷は認められなかった。

T-TiO₂ の検量線の信頼性については、T-TiO₂ の濃度と吸光度の相関係数 0.9978 で T-TiO₂ を測定に良好な直線性を示した。T-TiO₂ は 0.025 ~ 0.4 μg/mL の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

なお、対照群の肺と縦隔に TiO₂ の負荷は認められなかった。

C-2-2 T- CNT7 の組織負荷量の測定

(1) 肺: 肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 29.04 ± 6.16 μg/g、1 週目では 21.33 ± 2.01 μg/g、4 週目では 13.68 ± 1.62 μg/g、8 週目では 9.15 ± 2.17 μg/g で減衰傾向が認められ、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/3 の減衰傾向であった。

(2) 縦隔: T- CNT7 の負荷は認められなかった。

T-CNT7 の検量線の信頼性については、T-CNT7 の濃度とマーカの面積値の相関係数 0.9938 であり、T-CNT7 を測定するために良好な直線性を示した。これらのことから、T-CNT7 は 0.2 ~ 1.0 μg/mL の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

なお、対照群の肺と縦隔に TiO₂ の負荷は認められなかった。

C-3. 病理組織学的評価研究

C-3-1 病理組織変化

T-TiO₂ 曝露群

曝露終了日 (0 週) から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかったことから、本実験での曝露条件下では T-TiO₂ を貪食したマクロファージによる病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

T-CNT7 曝露群

曝露終了日 (0 週) から曝露終了後 8 週までいずれ

の解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした肺泡域での肺胞壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺胞管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられた。肉芽腫の中に認められる T-CNT7 の凝集塊には長径で 20 μ m を超える大きなものも散見された。H29 年度の T-CNT7#25 よりも Taquann 法による検体の高分散化処理で金属フィルターが目開き径が大きなものでろ過した T-CNT7#53 を使用した今年度の吸入曝露実験では、肺に明確な肉芽腫や線維増生がみられるサンプルを採材することができた。

Masson trichorm 染色結果

肺線維化の状況を Masson trichorm 染色でみると、T-TiO₂ 曝露群では対照群と比べて変化が見られなかった。一方、T-CNT7 曝露群で曝露終了後 8 週に青色に染色された膠原線維の増生所見を認めた。その部位は末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺胞管の胞隔で顕著な肥厚がみられたところと一致していた。また増生した膠原線維の中に T-CNT7 が埋没している所見も認められた。

T-CNT7 曝露群の詳細観察

T-CNT7 曝露群の詳細観察で肺泡マクロファージと推定される細胞が増生・伸長して末梢気道の上皮組織や上皮組織下の間質に連続する所見など認められた。この変化では vimentin 免疫染色で上皮組織に間葉系細胞が侵入していると思われる所見が(認められているが、肺泡マクロファージの表面抗原マーカー等の免疫染色での確認までは行っていない。T-CNT7 の曝露によって長く伸長する fibrous な形態をとるマクロファージの活発動きが肉芽腫を形成している可能性も考えられ、今後、免疫染色等を実施して、「長繊維細胞質貫通」タイプの NM に特徴的な所見候補と考えられる肉芽腫の発生との係わりを検証していく。

C-3-2 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

実験全体を通して気管支肺胞洗浄液の平均回

収率は、0 週と 8 週の対照群は、それぞれ 78.7%と 75.4%であったつたが、それ以外はいずれも 80%以上と良好であった。

BALF 塗抹細胞の百分比

各群の 0、1、4 週での BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。

マクロファージ以外の細胞でカウントされたものは以下の通り。

対照群	該当なし
T-TiO ₂ 曝露群 4 週	分葉核好中球 0.2%、 単球 0.1%
T-CNT7 曝露群 0 週	単球 0.4% リンパ球 0.1%
1 週	分葉核好中球 4.0%、 単球 0.2% 好酸球 0.1%
4 週	分葉核好中球 1.1% 単球 0.6%、 好酸球 0.2% リンパ球 6.1%

気管支肺胞洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみとめられているだけで急性の炎症性変化としては微弱なもので、病理組織学的には認められなかった。

BALF 塗抹肺泡マクロファージにおける検体の貪食率

T-TiO₂ 曝露群は、0 週か 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。一方、T-TCNT7 曝露群では曝露終了(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した。

BALF 塗抹肺泡マクロファージの詳細な形態学的解析

T-CNT7 曝露群の ALF 塗抹標本にマクファージが 10 細胞以上集合し、その中央部に T-CNT の凝集体

が存在する所見が認められた。こうした肺胞マクロファージの集合体は対照群と T-TiO₂ 曝露群に認められなかった。この変化を詳細に観察する中で、検体を貪食した肺胞マクロファージの周囲を非貪食マクロファージが取り囲むように配列し、周囲の非貪食マクロファージの細胞質が中央部の貪食マクロファージの胞体内に入り込むと思われる所見を認めた(図 13-J)。BALF 塗抹標本を仔細に観察すると、通常みられるマクロファージや単球、好酸球とは形態学的に異なる多様な細胞が多数存在していた。肺胞マクロファージで T-CNT7 を貪食しているものはおおむね円形、May-Grunwald-Giemsa 染色で幾分紫色を帯びた淡青色に染まる円形の胞体を有する。核は円形で濃赤紫色を呈し、胞体の中央に位置するものもあるが、辺縁部に偏在するものもある。個々のマクロファージが貪食している T-CNT7 の数は比較的少ないことが多い(図 13-A, B, L, N)。一方、検体を貪食していないと思われるマクロファージは検体を貪食した肺胞マクロファージよりも小型で、核・細胞質比が大きく、細胞質の色調は赤紫を帯び、細胞の形は円形のものから複雑に伸長したのまで様々であった。濃赤紫色に染色された核構造物が細胞質内に拡がる所見も認められ(図 13-M)、これと同質の核構造物の変化を起こしていると考えられる肺胞マクロファージが 2 つの T-CNT7 貪食マクロファージの間に介在している所見((図 13-N)も認められた。さらに、検体貪食肺胞マクロファージと非貪食肺胞マクロファージが鎖状に繋がって延びていると考えられる所見(図 13-D)、パラフィン包埋・HE 染色標本で細気管支内に認められた検体貪食マクロファージも多数の貪食マクロファージと非貪食マクロファージの集合体となっている所見など、様々な形態を示すマクロファージが肺内に吸引された T-CNT7 の処理にかかわっている可能性が示唆された。

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

C4-1: フローサイトメトリー解析

生細胞

T-CNT7 曝露で BALF 中の生細胞の低下が曝露直後(0 週)から 4 週まで持続、8 週で回復していた

CD11c⁺CD11b⁻肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で肺胞マクロファージ(AM)の低下が曝露直後(0 週)から 4 週まで持続、8 週で回復していた。

CD11b⁻F4/80⁺肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に低下がみられ、その影響が 8 週まで持続
T-TiO₂ 曝露では減少なし

単球

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週まで増加が続き、その影響が 8 週まで持続していた。
T-TiO₂ 曝露では、対照群と変化はなかった

F4/80⁺肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に減少がみられ、その影響が 8 週まで持続
T-TiO₂ 曝露では減少なし

CD206⁺マクロファージ in AM(CD11c⁺CD11b⁻) (M2 マクロファージの性格を有する)

T-CNT7 曝露で 0 週のみ増加
T-TiO₂ 曝露では増加なし。

CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ (M1 マクロファージの性格を有する)

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に 1 週をピークとした増加がみられ、その影響が 8 週まで持続した
T-TiO₂ 曝露では明確な増加なし

好酸球

好酸球は BALF 細胞全体で占める割合が低率であること考えると T-CNT7 曝露で 0 週と 1 週に増加し、4 週と 8 週では対照群のレベルに低下した。

T-TiO₂ 曝露では、曝露の影響はなかった。

T-CNT7 曝露での増加は繊維状のナノマテリアル
に対しての初期の免疫反応に關与している可能
性がある。

CD36 in AM (スカベンジャー受容体)

T-CNT7 曝露で 0 週のみ増加

T-TiO₂ 曝露でも 0 週のみ T-CNT7 曝露と同程度
増加

CD36 in CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ(スカベンジャ ー受容体)

肺胞マクロファージ全体での発現量とほぼ同じで
あったことから CD36 はこの分画における発現が
T-CNT7 と T-TiO₂ に対する反応の鍵になると考えら
れた

CD163 in AM (スカベンジャー受容体)

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い
(マクロファージの 5% 以下の発現) ため曝露に
よる影響は低いと考えられた

CD136 in CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ(スカベンジャ ー受容体)

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い(マク
ロファージの 5% 以下の発現) ため曝露による影響
は低いと考えられた。(図 6B)

C 4 - 2 : 定量化 RT-PCR 法による解析

MMP12

・BALF 細胞での発現

T-CNT7 曝露で 1 週をピークとした増加

T-TiO₂ 曝露では、変化なし

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で 1 週に強いピークを有する増加
(図 8A)

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加が見られたが、

T-CNT7 と約 9 倍の開きが見られた)

CD204(class A scavenger receptor)

・BALF 細胞での発現

T-CNT7 曝露で 1 週をピークとした増加(図 7B)

T-TiO₂ 曝露では、変化なし

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で 1 週にピークを有する増加(図 8B)

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する。

GM-CSF

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、明確な変化なし

IL-6

肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

IL-33

肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

TIMP-1

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

Col type 4

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で変化なし

T-TiO₂ 曝露でも変化なし

VEGF

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い(マクロファージの5%以下の発現)ため曝露による影響は低いと考えられた。

D. 考察

ナノマテリアルの組織負荷量の測定

肺組織内負荷量の測定結果から、T-TiO₂ については曝露直後、1、4 および 8 週後における肺当りの T-TiO₂ の負荷量(曝露濃度 30 mg/m³)は 150.11 ± 9.05 μg/g、112.47 ± 13.94 μg/g、63.05 ± 7.21 μg/g 及び 8 週目では 25.85 ± 11.36 μg/g であった。曝露後 4 週での肺負荷量は曝露直後の肺負荷量の 42.8%で、4 週間で肺に入ったもののうちの半分以上(57.2%)が肺からクリアランスされていて、本実験の吸入曝露条件では、マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。病理組織学的検査で T-CNT7 は、曝露直後、1、4 および 8 週後における肺当りの T-CNT7 の負荷量(曝露濃度 3 mg/m₃)は 29.04 ± 6.16 μg/g、21.33 ± 2.01 μg/g、13.68 ± 1.62 μg/g、9.15 ± 2.17 μg/g で減衰傾向が認められたものの、4 週と 8 週後の負荷量はそれぞれ曝露終了日(0 週)の値の 47.1%、31.5%であり、肺内に吸引された T-CNT7 は T-TiO₂ に比べてクリアランスされにくいことが示された。

病理組織学的評価研究

T-TiO₂ 曝露群では、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかったことから、本実験での曝露条件下ではマクロファージによって完全貪食される T-TiO₂ 曝露群に病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

一方、マクロファージによって不完全貪食される T-CNT7 曝露群は、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした肺泡域での肺泡壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺泡管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられ、肉芽腫の中に長径で

20μm を超える大きな T-CNT の凝集塊も散見された。こうした変化は曝露終了後 8 週に Masson trichrome 染色で示された膠原線維の増生所見に移行し、T-CNT7 は増生した膠原線維の中に埋没されていると考えられた。一方、病理組織学的な変化がみられなかった T-TiO₂ 曝露群には Masson trichrome 染色で膠原線維の増生所見は認められなかった。

気管支肺泡洗浄液の回収率は最も低い場合で 75%、大多数は 80%以上であることが示され、気管支肺泡洗浄液採取は良好であった。

BALF 塗抹で曝露終了時(0 週)、1、4 週での各群の細胞を分類すると、BALF 塗抹細胞のほとんど全てがマクロファージであった。マクロファージ以外の細胞でカウントされたものとして分葉核好中球があるが、分葉核好中球は対照群で認められたものではなく、T-TiO₂ 曝露群の 4 週で 0.2%、T-CNT7 曝露群の 1 週で 4.0%、同 4 週で 1.1%であり、気管支肺泡洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみられた程度で病理組織学的にも急性の炎症を示す変化は認められなかった。

BALF 塗抹の観察で T-TiO₂ 曝露群は、0 週か 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。一方、T-CNT7 曝露群では曝露終了時(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した。この検体非貪食マクロファージは曝露終了時(0 週)に減少した肺泡マクロファージの数を補填するものと考えられている。

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響

BALF フローサイトメトリー解析で T-CNT7 だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは T-CNT7 曝露直後(0 週)から 4 週まで生細胞と肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、CD11b⁻F4/80⁺)の低下、同時期における単球の増加、T-CNT7 曝露後早い段階での M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ、M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージ、好

酸球の増加であった。

生細胞と肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、CD11b⁻F4/80⁺)の低下が曝露直後(0週)から4週まで持続し、8週には対照群の水準まで回復していた。一方、単球の増加が生細胞と肺胞マクロファージが低下した0週から4週の期間に認められ、その影響が8週まで持続していた。T-CNT7の曝露によって細胞死に陥った肺胞マクロファージを肺胞内の恒常性維持のため細胞数の増加した可能性が考えられる。この細胞増加は組織常在型のマクロファージの増加によるものか、末梢由来の単球から分化して増加したのかは不明であり、今後の課題である。

M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージが0週から4週に1週をピークとした増加がみられ、その影響が8週まで持続した。また、M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージの増加が0週のみを示された。

CD11b⁺F4/80⁺マクロファージについては、MWCNT 曝露後1年の肺で CD11b^{high}+F4/80 マクロファージが増加し、線維化に関係する MMP12 を産生することが報告されている(Otsuka et al.,2018)。今年度の研究で CD11b^{high} 分画を含 CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージや M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージが T-CNT7 曝露後の早い段階から増加していたことは、肺の線維化に係るマクロファージの分画が T-CNT7 の吸入曝露による免疫反応に重要な役割を果たしていると考えられた。また、好酸球の増加も T-CNT7 曝露後0週と1週という早い段階でみられていて、繊維状のナノマテリアルの曝露に対しての初期の免疫反応に関与している可能性がある。

スカベンジャー受容体については、BALF の FCM 解析でカテゴリー評価の要因となるものを見いだせなかった。 Class B 受容体である CD36 は曝露直後(0週)に T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露の両群で同程度の発現増加みられたことから、カテゴリー評価の指標にはならないと考えられた。CD3 の発現は全肺胞マクロファージ全体(CD11c⁺CD11b⁻)の発現と CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの発現量がほぼ同じであったことから CD3 の発現は CD11b⁺F4/80⁺分画によ

るものと考えられた。同じく Class B 受容体である CD136 については T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露ともに明確な発現増加は示されなかった。

BALF フローサイトメトリー解析で TiO₂ だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは見いだせなかった。

定量化 RT-PCR 法による解析で T-CNT7 だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは MMP12 だけであった。

MMP12 は、BALF 細胞と肺組織の両方に T-CNT7 曝露で1週をピークとした増加認められ、T-TiO₂ にも肺組織で1週に増加が見られたが、T-CNT7 と約9倍の開きが見られた。

Class A 受容体である CD204 は BALF 細胞での発現で T-CNT7 曝露群だけに曝露後1週をピークとした増加認められているが、肺組織での発現では T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露群の両方に1週をピークとした増加認められた。但し、T-TiO₂ 曝露群の発現にバラツキが大きいので、今後の検討が必要である。

サイトカインの定量化 RT-PCR 法による解析では肺組織の解析までこれまでに終了しているが BALF 細胞での発現解析を残している。カテゴリー評価の指標としての判断は今後の解析が待たれる。現在、カテゴリー評価の要因として候補は GM-CSF を考えている。

GM-CSF は T-CNT7 曝露で、肺組織に曝露後1週をピークとした増加認められた。T-TiO₂ 曝露でも明確な変化が示されなかった。

IL-6 と TIMP-1 は T-CNT7 曝露で、肺組織に曝露後1週をピークとした増加認められ、T-TiO₂ 曝露でも、曝露後1週に発現の増加を認めるが値のバラツキが大きく今後の検討課題である。

なお、BALF 細胞での mRNA 発現解析には、マルチプレックス解析の実施も予定している。

T-CNT7 曝露群の詳細な病理標本の観察で、曝

露終了日(0週)から肺胞マクロファージと推定される細胞が増生・伸長して末梢気道の上皮組織や上皮組織下の間質に連続する所見など認められ、T-CNT7曝露後の早い時期から fibrous な形態で長く伸長するマクロファージの活発な動きが肉芽腫を形成している可能性も考えられた。こうした所見は BALF 塗抹の詳細な形態観察でも類似した所見が認められた。また、免疫機能評価でも M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージや M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加、TIMP-1 の mRNA 発現が T-CNT7 曝露後の早い時期に認められていることも T-CNT7 曝露後肉芽腫形成に関与する可能性も考えられた。

肺組織での負荷量測定結果で T-CNT7 曝露後直後(0週)から4週の期間に肺内に吸引された T-CNT7 がクリアランスされにくいことや、BALF の FCM 解析での生細胞減少と肺胞マクロファージの低下などの現象も肉芽腫の成り立ちと係わっている可能性が考えられた。本研究での曝露条件下では T-CNT7 の吸入曝露で肺に好中球の浸潤を伴う炎症性変化が起こらなかったことから肺胞マクロファージが炎症性反応を誘発するサイトカインを放出/漏出している可能性は低く、あったとしてもその発現の強度は小さいと考えられた。一方、肉芽腫の形成と線維化を誘導するサイトカインを放出/漏出している可能性が考えられた。

以上、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンを曝露したマウスの肺では肺胞マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。MWNT-7 を曝露したマウスの肺では二酸化チタン曝露と比べてクリアランスされにくいことが示された。病理組織学的に二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化であった。加えて、免疫機能評価で BALF フローサイトメトリー解析での生細胞と肺胞マクロファージの低下、単球、M1 及び M2 マクロファージ、好酸球の増加、MMP12 の mRNA 発現増加を抽出した。NM の有害性

発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析による要因の絞り込みと、発現強度の把握を試みる。

E. 結論

NM の有害性発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析により発現強度を把握したうえで要因の絞り込みを行う。

次年度は「毛玉状凝集様式」について吸入曝露実験を実施して研究成果をとり纏める。

F. 研究発表

1. 発表論文

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure

to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One*. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci*. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *Journal of Occupational Health*, 60:10-30, 2018

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. *Particle and Fibre Toxicology* 13:53 2016.

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

Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2

019 Apr;121:29-41 doi: 10.5152/eurjrheum.2019.18137.

Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2018.02594.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10):e0205702, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0205702

Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018 doi: 10.1111/jop.12756

Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, **Ishimaru N**, Kudo Y. Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(5):E1462, 2018 doi: 10.3390/ijms19051462

Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation*. 2018 Aug;41(4):1172-1181. doi:10.1007/s10753-018-0764-0.2 .

石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版(2018年) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 病理と臨床 36(6), 580-585, 2018

牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群研究の最前線 細胞 50(10), 528-531, 2018

石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞 医学のあゆみ Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップ セミナー：肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性：肺毒性を中心として、第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17 (大阪)

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18 (大阪)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18 (大阪)

Jun Kanno, Chuen Jinn Tsai, Plenary Session 4: Improvement of Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM., Plenary Lectures, Xth International Aerosol Conference (IAC 2018), Invited, 2019.9.6, St. Louis.

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual

Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

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)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

梅田ゆみ、笠井辰也、山野莊太郎、高信健司、齋藤美佐江、妹尾英樹、相磯成敏、菅野純 アナターゼ型ナノ酸化チタンの 13 週間吸入曝露によるラット肺胞上皮の増殖性変化、第 33 回発癌病理研究会、2018.8.29(御殿場)

Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo:
Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International Sjogren's Syndrome Symposium, Washington DC, April 18-21, 2018

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing resident macrophages enhance autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Masako Saito, Satoko Kujiraoka, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Hidehiro Kishimoto, Naozumi Ishimaru: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Akiko Yamada, Aya Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Jonathan Sprent, and Naozumi Ishimaru. NF- κ B2 Controls the Migratory Activity of Memory T Cells to the Target Tissues in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、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肺胞マクロファージへの影響 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺におけるIL-33の発現とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に 関与する 第107回日本病理学会総会 札幌 (ロイトン札幌) 2018.6.21

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルにおけるNotchシグナルの役割 第107回日本病理学会総会 札幌 (ロイトン札幌) 2018.6.23

常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄 DNAライセンス因子CDT1の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 Emi1の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔癌におけるPeriostinスプライシングバリエーションの同定とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers

differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第17回四国免疫フォーラム 徳島 2018.6.30

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 分子病理学研究会37はがくれシンポジウム 佐賀 2018.7.7

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 先端歯学スクール2018 東京 2018.8.23-24

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 第29回日本臨床口腔病理学会総会 東京 2018.8.25-26

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018.9.5-7

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat 香川 (リゾートホテル オリビアン小豆島) 2018.9.20-22

Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

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、多層化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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

3. その他

なし

特許出願；柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次：吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願；柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次：試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

独立行政法人労働者健康安全機構、大西誠、笠井辰也、鈴木正明：粒子状物質の浮遊特性測定方法及び浮遊特性測定装置 特許第 6362669 号 特許登録日：平成 30 年 7 月 6 日

2. 実用新案登録

なし