

## . 分担研究報告

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)  
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 病理検査室 室長

## 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 $\phi$ )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 $\phi$  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。今年度の研究では、三種類の NM 蓄積様式モデルのうち「粒状凝集様式」のモデルとして二酸化チタンと、「長繊維貫通様式」のモデルとして選択した MWNT-7 で、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)の分担で実施した。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の病理組織学的評価を行い、NM のカテゴリー評価基盤の整備において、肺胞マクロファージの胞体内で異なる蓄積様式を示す三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルの特徴的な有害性発現に関連する要因を抽出した。結果として、本実験の吸入曝露条件では、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病変を抽出した。

### 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 $\phi$ )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連関する要因の分類とその強度スケールの構築を目指し、本分担研究ではそのうちの病理組織学的評価を担当した。

## B. 研究方法

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。

吸入曝露実験で提供されたサンプルの概要は次の通り。「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン(AMT-600、テイカ)と、MWNT-7 をカートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴式全身曝露吸入装置 ver.3.0)を用いて C57BL/NcrSlc 雄性マウスに、それぞれ 30 mg/m<sup>3</sup>、3 mg/m<sup>3</sup> の濃度設定で 2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の吸入曝露を行った。MWNT-7 は Taquann 法による高分散処理の過程において粗大な成分が多く、肺の肉芽腫や線維化病変が起こりやすいと想定される 53 μm のメッシュで濾過した検体(以下、T-CNT7#53)を使用した(図 1)。曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖を行って病理組織学的評価に用いる肺と縦隔の組織をサンプリング、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)にて一晩浸漬固定(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)に交換して保存された材料の提供を受けた。気管支肺胞洗浄液(BALF)の採取と塗抹標本の作製は、定期解剖で免疫機能評価の分担(石丸)と協働で BALF を採取した際、免疫機能評価に割り当てた各解剖期の 6 匹のうちの 3 匹について実施した。気管

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 1.6ml の生理食塩水(大塚)を流し込みシリンジを静かに上下させることによって肺とシリンジの間を 3 回往復させた後、洗浄液を回収した。生理食塩水の注入量は 0 週に 2mL としたが、その際の肺が膨らむ状況から 1 週以降は 1.6mL とした。回収した BALF から 150μL を分取してサイトスピンを用いてスライドガラスに塗抹、メタノール固定後、May-Grunwald-Giemsa 染色を行って解析に供試した(図 2)。BALF 採取後の右肺の状態について病理組織標本を作成して確認した。残った BALF と BALF 採取後の左肺は免疫機能評価(分担:石丸)による BALF 細胞の FCM 解析と肺組織の定量化 RT-PCR 法による mRNA 発現を解析に供試した。

### B-1 病理組織標本作製

肺と縦隔の組織を図 3 に示す部位を切り出し、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)、vimentin 免疫染色(anti-vimentin antibody EPR3776, abcam)を作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織検査に供した。

### B-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-TiO<sub>2</sub> 及び T-CNT7 の沈着と組織反応、T-TiO<sub>2</sub> 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丁寧に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の病因学的な意義について検討した。

### B-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(肺胞

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、肺胞マクロファージで吸入曝露した検体(T-TiO<sub>2</sub>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胞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 - 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細胞について肺胞マクロファージ、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 - 2 BALF 塗抹標本に観察される肺胞マクロファージにおける検体の貪食率**

B-3 - 2 で肺胞マクロファージと分類した細胞について、検体(T-TiO<sub>2</sub>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 BALF 塗抹肺胞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丁寧に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。

(倫理面への配慮)

本分担任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 病理組織標本作製**

B-1 に記した方法により病理組織標本を作製した。

### **C-2 病理組織学的検査**

#### (1) T-TiO<sub>2</sub> 曝露群の病理組織変化

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なかった(図4)。

肺内でのT-TiO<sub>2</sub>粒子の存在の程度については、通常使用する40倍の対物レンズによる観察では、粒子の存在はほとんど認識できなかったが、100倍の対物レンズを用いて精査すると少ないながらも肺内に吸引されたTiO<sub>2</sub>粒子の存在を確認することができた(図5)。HE染色を施した病理組織標本ではTiO<sub>2</sub>粒子を認識することは困難であったが、BALF塗抹標本ではほとんどすべての肺胞マクロファージの細胞質内で容易に観察できた。本実験での曝露条件下ではT-TiO<sub>2</sub>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。

#### (2) T-CNT7 曝露群の病理組織変化

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た。肉芽腫の中に認められる T-CNT7 の凝集塊には長径で 20 $\mu$ m を超える大きなもの(図 7)も散見された。

### (3) Masson trichorm 染色結果

Masson trichorm 染色で肺線維化の状況を調べた。その結果、T-TiO<sub>2</sub> 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 Masson trichorm 染色で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泡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(図 8、9)。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(図 9)。

### (4) 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が認められた。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(図 10)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 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

実験全体を通して気管支肺泡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%であったが、それ以外はいずれも 80%以上と良好であった(図 11)。

## C-3-1 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 <sub>2</sub> 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。

## C-3-2 BALF 塗抹肺泡マクロファージにおける検体の貪食率

T-TiO<sub>2</sub> 曝露群は、0 週から 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。

T-CNT7 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(図 11)。

## C-3-3 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 BALF 塗抹標本にマクロファージが 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。こうした肺泡マクロ

ファージの集合体は対照群と T-TiO<sub>2</sub> 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、検体を貪食した肺泡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。肺泡マクロファージで 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泡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広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泡マクロファージが 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、検体貪食肺泡マクロファージと非貪食肺泡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(図 13-C)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。

#### D. 考察

T-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> 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 20 $\mu$ m 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-TiO<sub>2</sub> 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はなく、T-TiO<sub>2</sub> 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-TiO<sub>2</sub> 曝露群は、0 週から 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ている。

#### E. 結論

肺胞マクロファージの胞体内で異なる蓄積様式を示す三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルの特徴的な有害性発現に連関する要因として、本実験の吸入曝露条件では、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病変を抽出することができた。

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、近藤ひとみ、妹尾英樹、高信健司 並びに国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の辻昌貴、森田紘一の各氏からの技術的支援を頂き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) 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)
- (2) 梅田ゆみ、笠井辰也、山野荘太郎、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)

## H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

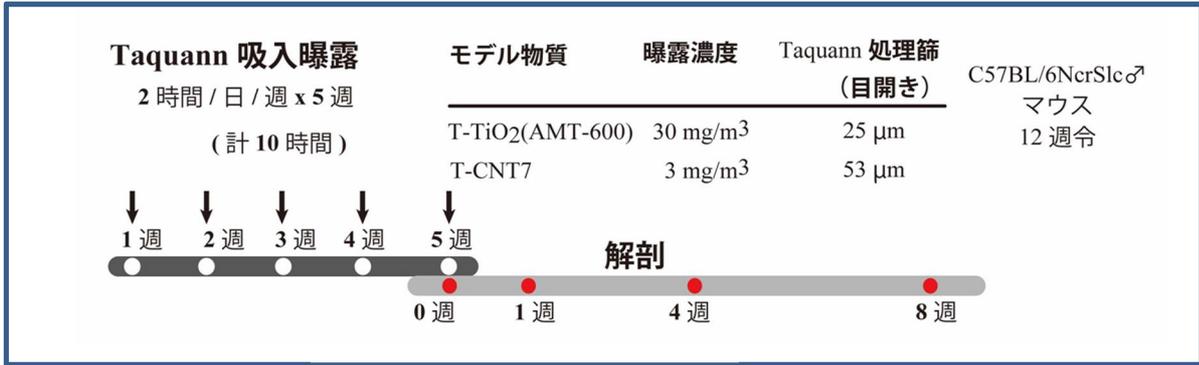
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



**図 1 実験デザイン**

May-Grunwald-Giemsa 染色	May-Grunwald-Giemsa 染色抹
1) May-Grunwald-Giemsa 染色イソフルラン麻酔下で気管から両肺に生理食塩水(大塚)を注入 注入量 0 週 : 2ml 1、4、8 週: 1.6mL 2) 洗浄 3) 回収した BALF から 150 μL を分取 4) サイトスピン (Shandon cytospin2、700rpm、5 分) で スライドガラスに均一に散布 (塗抹)	1) メタノール固定 1 分 2) 3% May-Grunwald 液 30 分 3) pH6.4 Buffer* 液で rinse 4) 5% Giemsa 液 30 分 5) pH6.4 Buffer* 液で rinse 6) 乾燥・封入 染色は一枚ずつ手染め * : pH6.4 Buffer は 10 倍希釈で使用

**図 2 気管支肺胞洗浄液塗抹標本の作製**

肺の切り出し      胸腺・縦隔部の切り出し

右肺: 右肺の全ての葉を付けた状態で水平に切り出した

左肺: 長軸と平行に 3 切片を切り出した

**図 3 病理組織標本作成 (切り出し)**

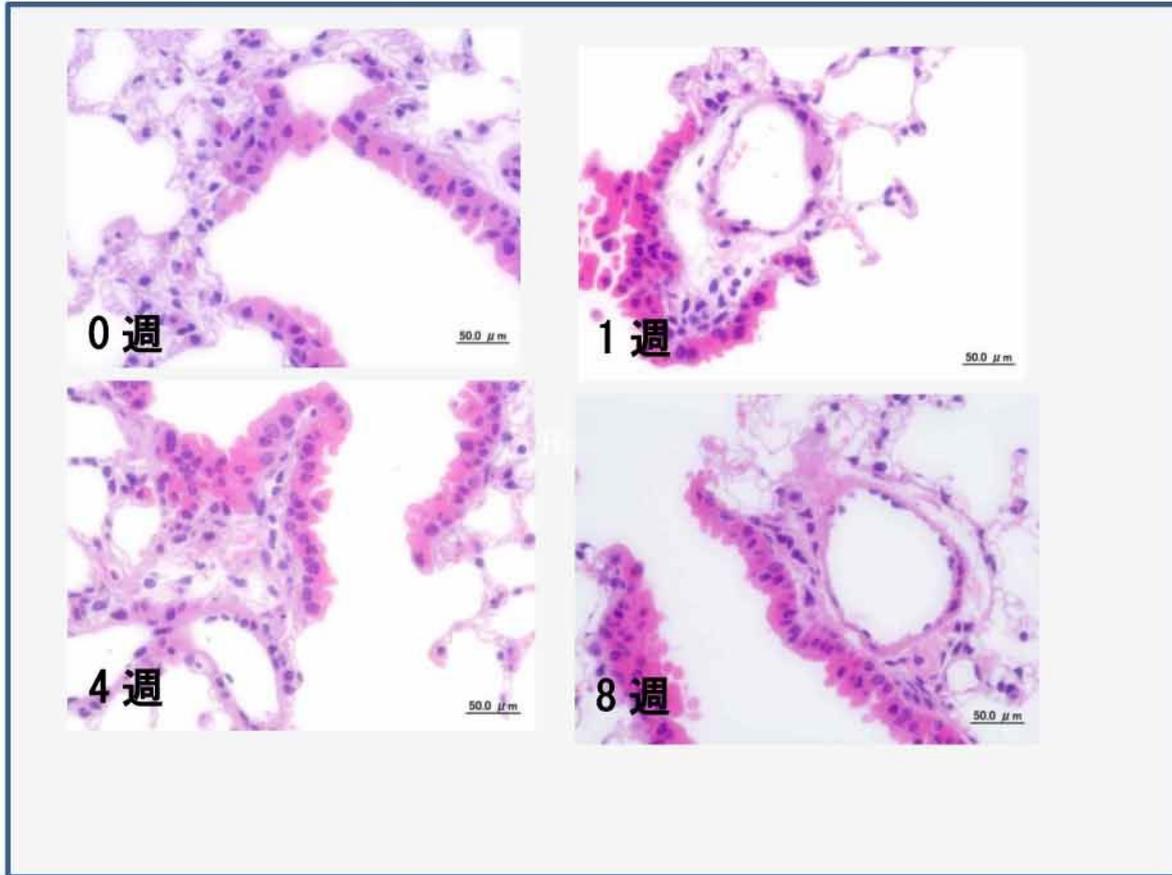


図 4 T-TiO<sub>2</sub> 吸入曝露群の病理組織像

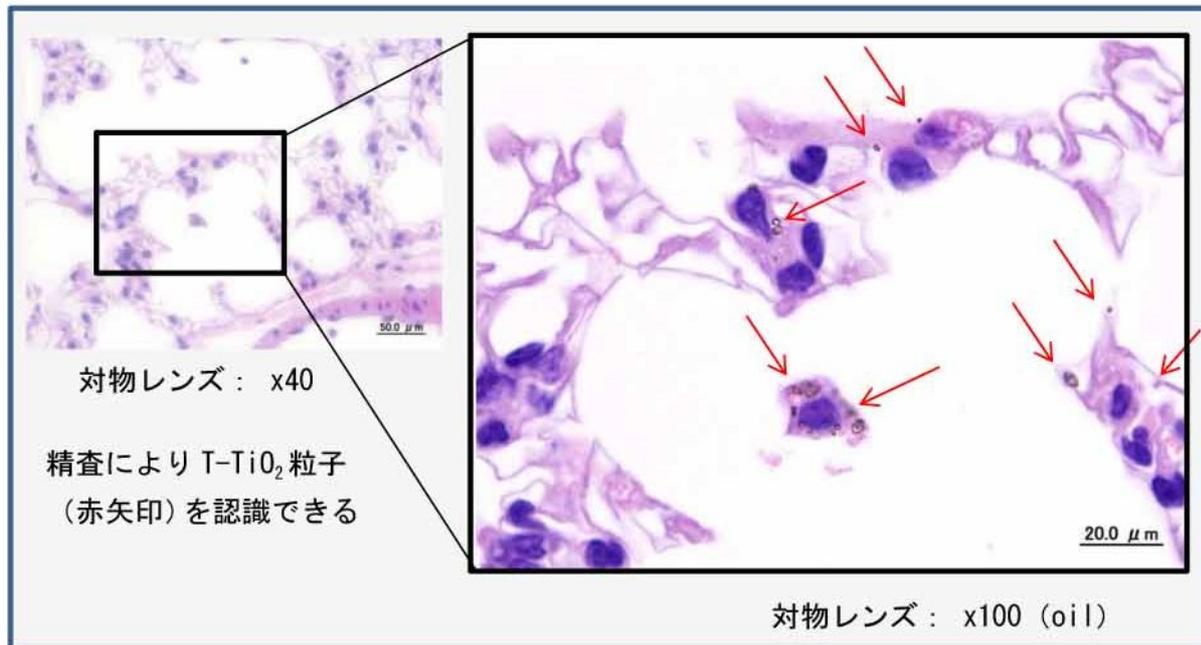


図 5 肺内の T-TiO<sub>2</sub>

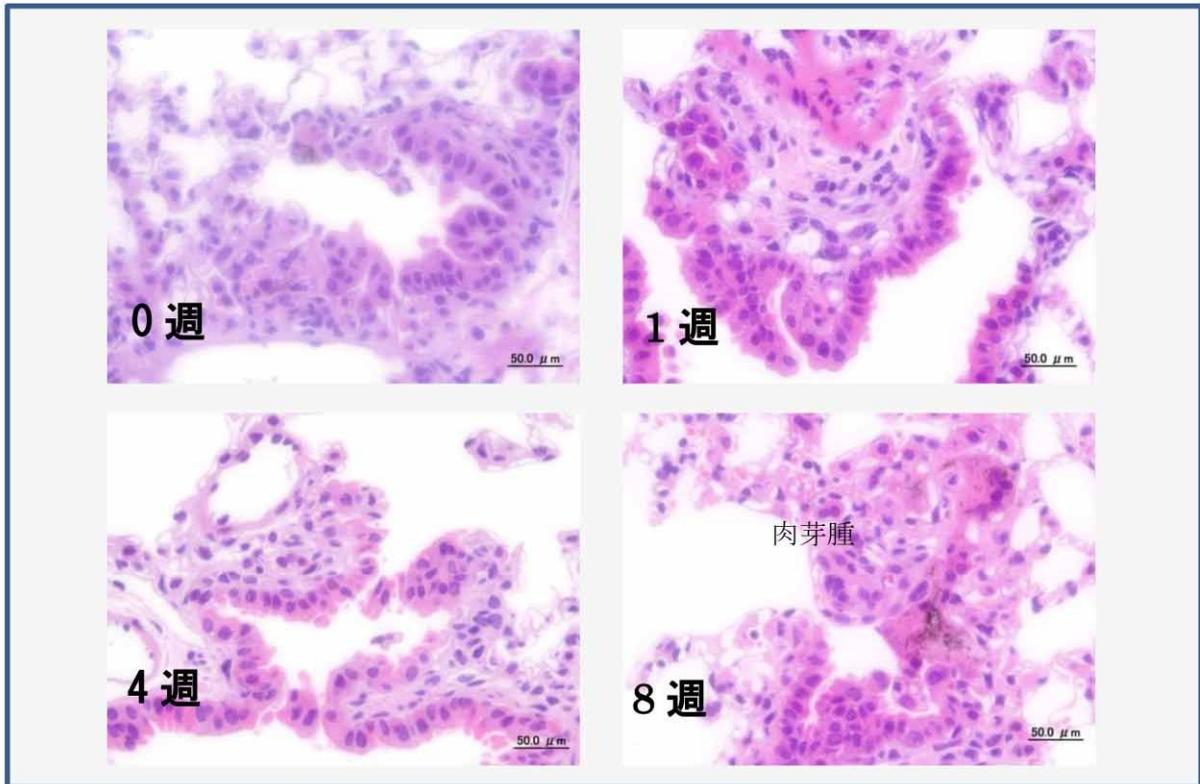


図 6 T-CNT7 吸入曝露群の病理組織像

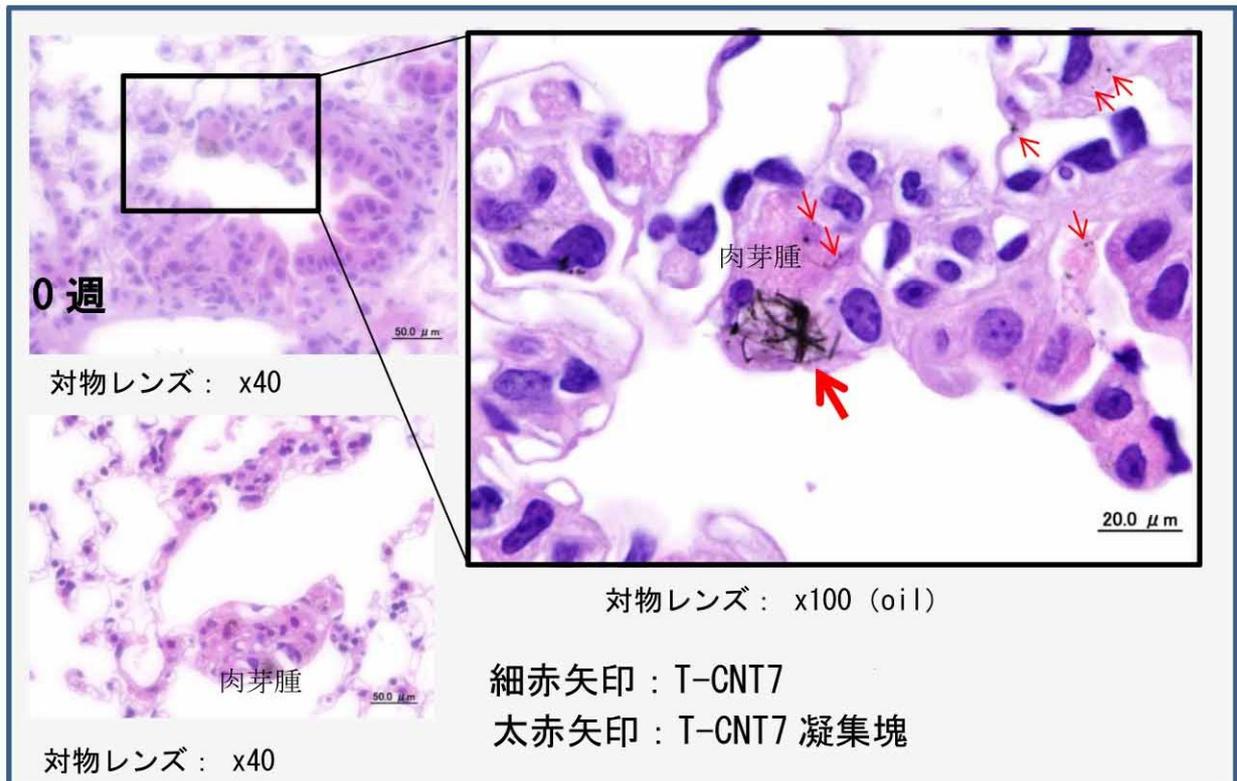


図 7 肺内の T-CNT7、肉芽腫形成

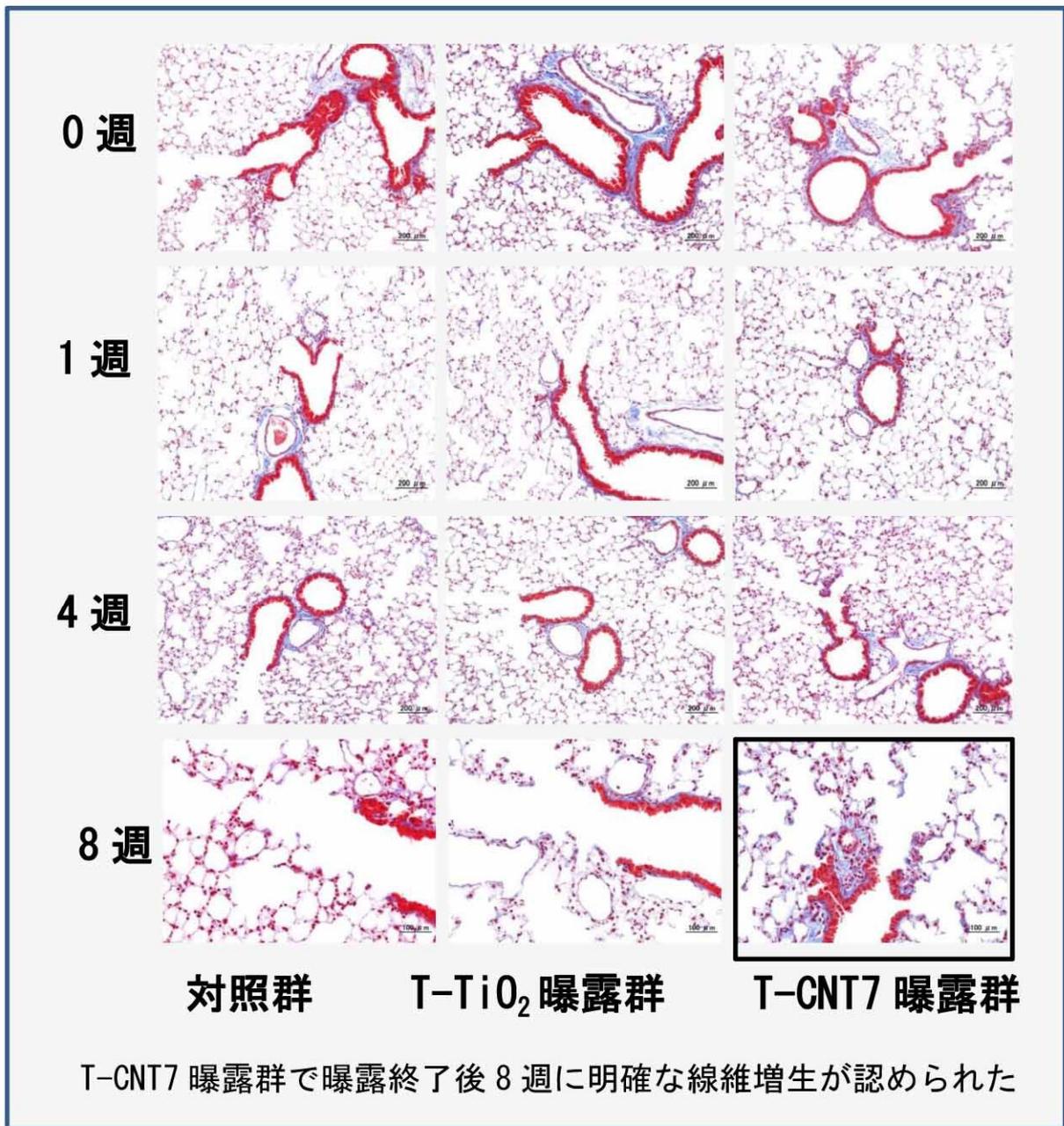


図 8 Masson trichrom 染色

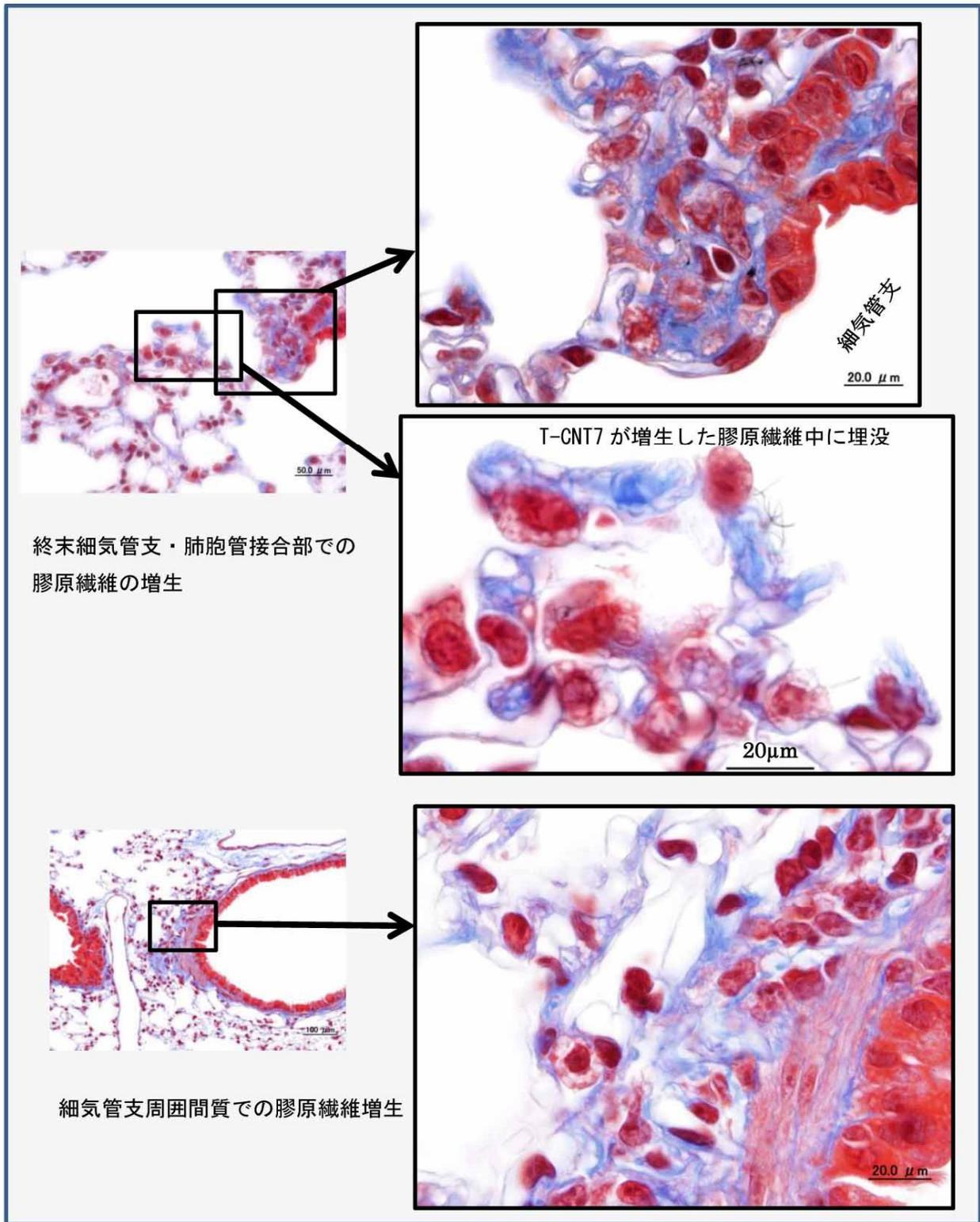
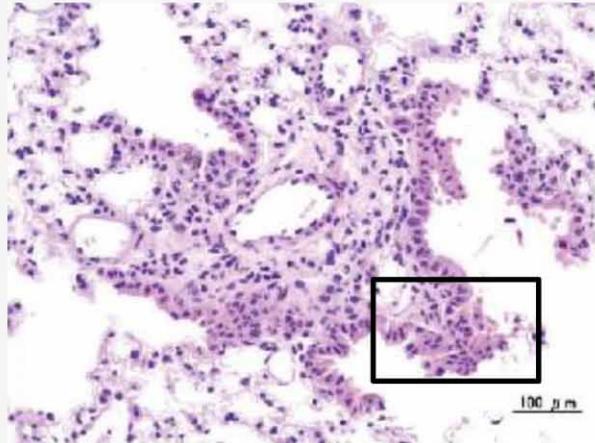
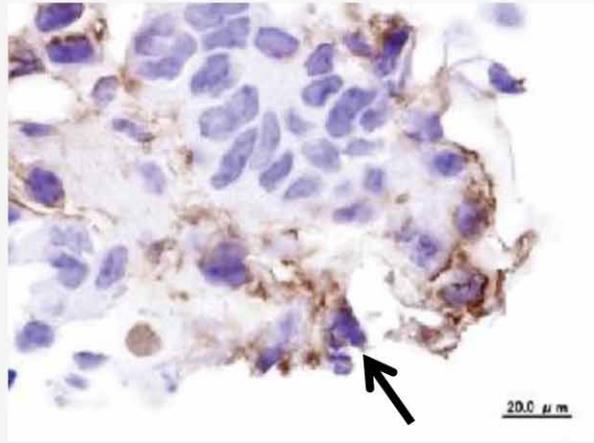


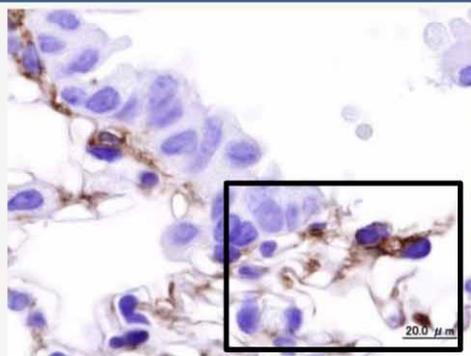
図 9 T-CNT7 曝露終了後 8 週での詳細観察  
(Masson trichrom 染色)



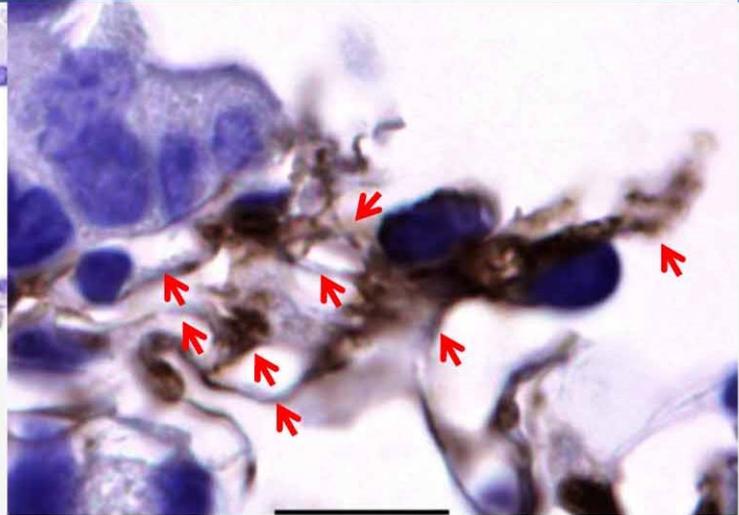
末梢気道周囲間質の肥厚  
(HE)



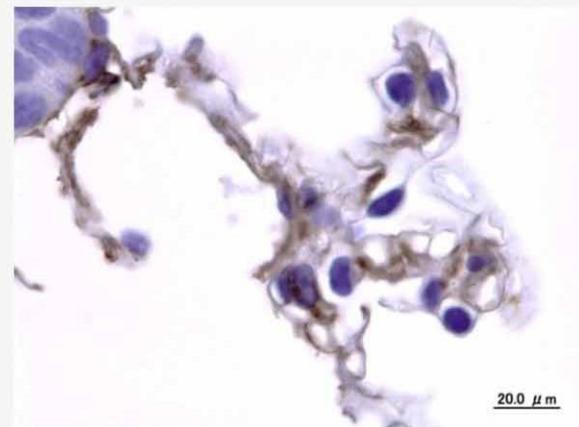
左枠内の vimentin 免疫



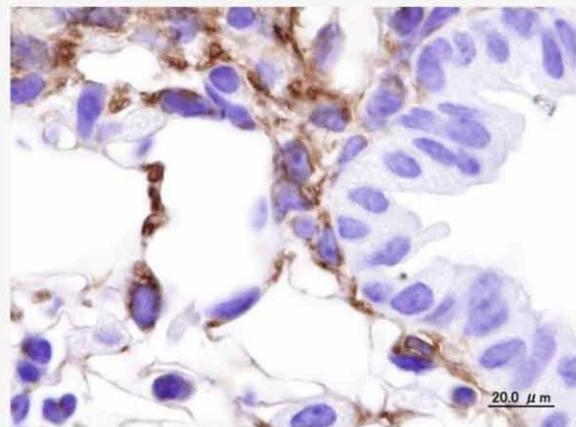
vimentin 免疫



赤矢印：vimentin 陽性の細胞突起が複雑に絡みあう。



vimentin 免疫



vimentin 免疫

図 10 T-CNT7 曝露群の詳細観察

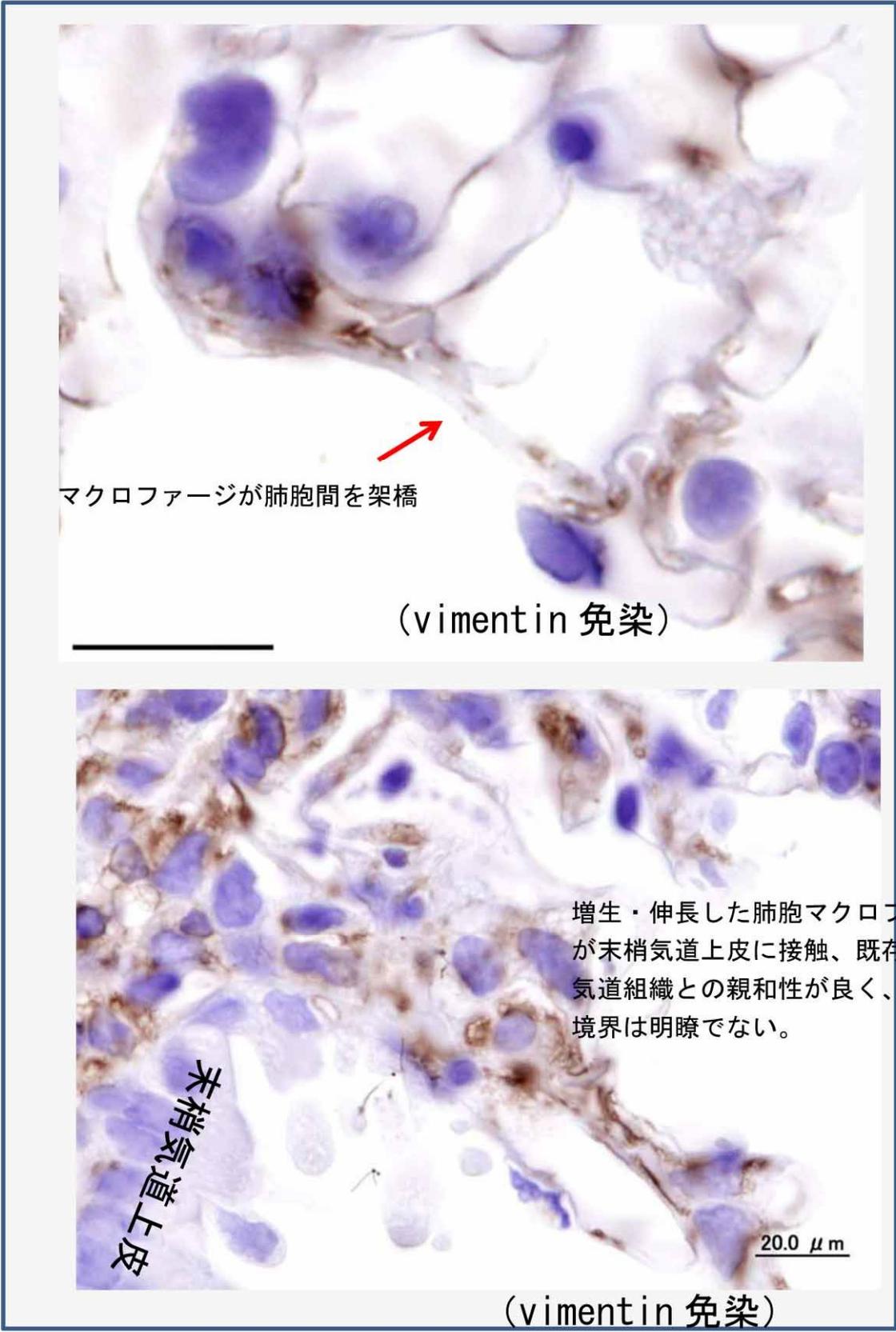


図 10 T-CNT7 曝露群の詳細観察 (続)

# 表 1 病理組織学的検査結果の総括

## A T-TiO<sub>2</sub> 曝露群

病理組織所見 (所見の強さ 2+: 顕著、+: 軽微)	0 週	1 週	4 週	8 週
<b>&lt;T-TiO&gt;</b>				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の末梢気道				
T-TiO <sub>2</sub> (非食食/食食)	+	+	+	+
T-TiO <sub>2</sub> 食食マクロファージ	+	+	+	+
肉芽腫(T-TiO <sub>2</sub> /T-TiO <sub>2</sub> 食食マクロファージの集簇)				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の間質組織(血管/リンパ管周囲)				
T-TiO <sub>2</sub> /T-TiO <sub>2</sub> 食食マクロファージ				
肥厚				
線維増生				
● 肺胞				
T-TiO <sub>2</sub> (非食食/食食)	+	+	+	+
T-TiO <sub>2</sub> 食食マクロファージ	+	+	+	+
肉芽腫(T-TiO <sub>2</sub> /T-TiO <sub>2</sub> 食食マクロファージの集簇)				
肺胞壁の肥厚				
線維増生				

## B T-CNT7 曝露群

病理組織所見 (所見の強さ 2+: 顕著、+: 軽微)	0 週	1 週	4 週	8 週
<b>&lt;T-TCNT7&gt;</b>				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の末梢気道				
T-CNT7(非食食/食食)	2+	2+	2+	2+
T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肉芽腫(T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージの集簇)	2+	2+	2+	2+
● 終末細気管支・肺胞管接合部の間質組織(血管/リンパ管周囲)				
T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肥厚				2+
線維増生				2+
● 肺胞				
T-CNT7(非食食/食食)	2+	2+	2+	2+
T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肉芽腫(T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージの集簇)				2+
肺胞壁の肥厚				2+
線維増生				2+

## 気管支肺胞洗浄液の注入量と回収率

Day0	対照群		T-TiO <sub>2</sub>		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	2.0		2.0		2.0	
回収量(ml)	1.6	0.064	1.8	0.017	1.7	0.095
回収率(%)	78.7	3.215	90.5	0.866	87.3	4.726

1W	対照群		T-TiO <sub>2</sub>		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.3	0.085	1.4	0.025	1.3	0.060
回収率(%)	82.3	5.316	85.8	1.573	83.5	3.767

4W	対照群		T-TiO <sub>2</sub>		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.3	0.131	1.3	0.032	1.3	0.065
回収率(%)	80.0	8.197	83.5	2.009	81.5	4.067

8W	対照群		T-TiO <sub>2</sub>		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.2	0.248	1.4	0.060	1.4	0.046
回収率(%)	75.4	15.516	85.2	3.767	87.1	2.887

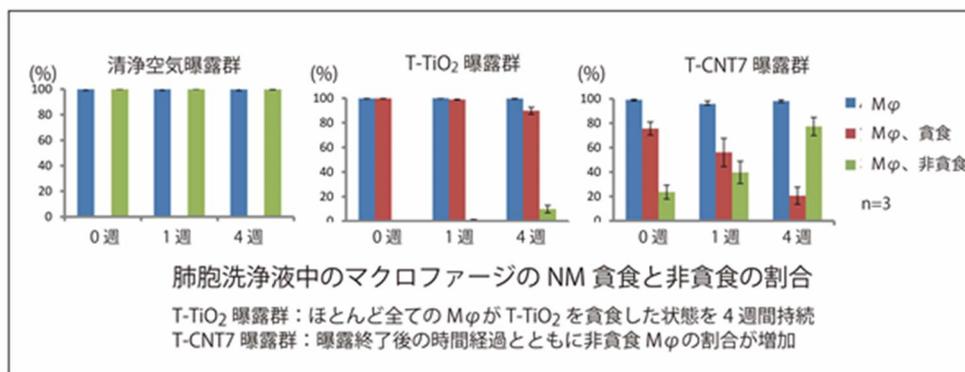
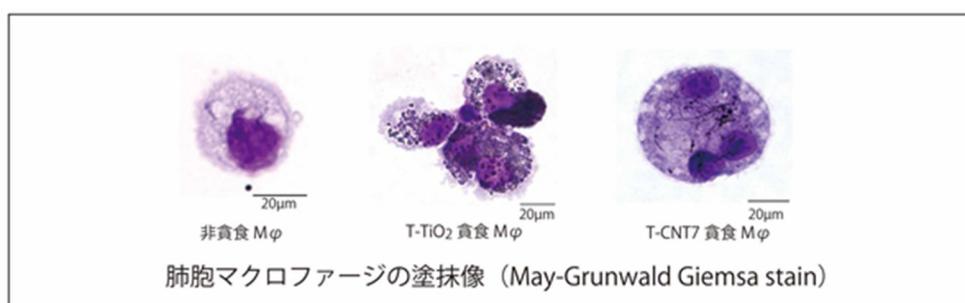


図 11 BALF マクロファージのNM 貪食と非貪食の割合

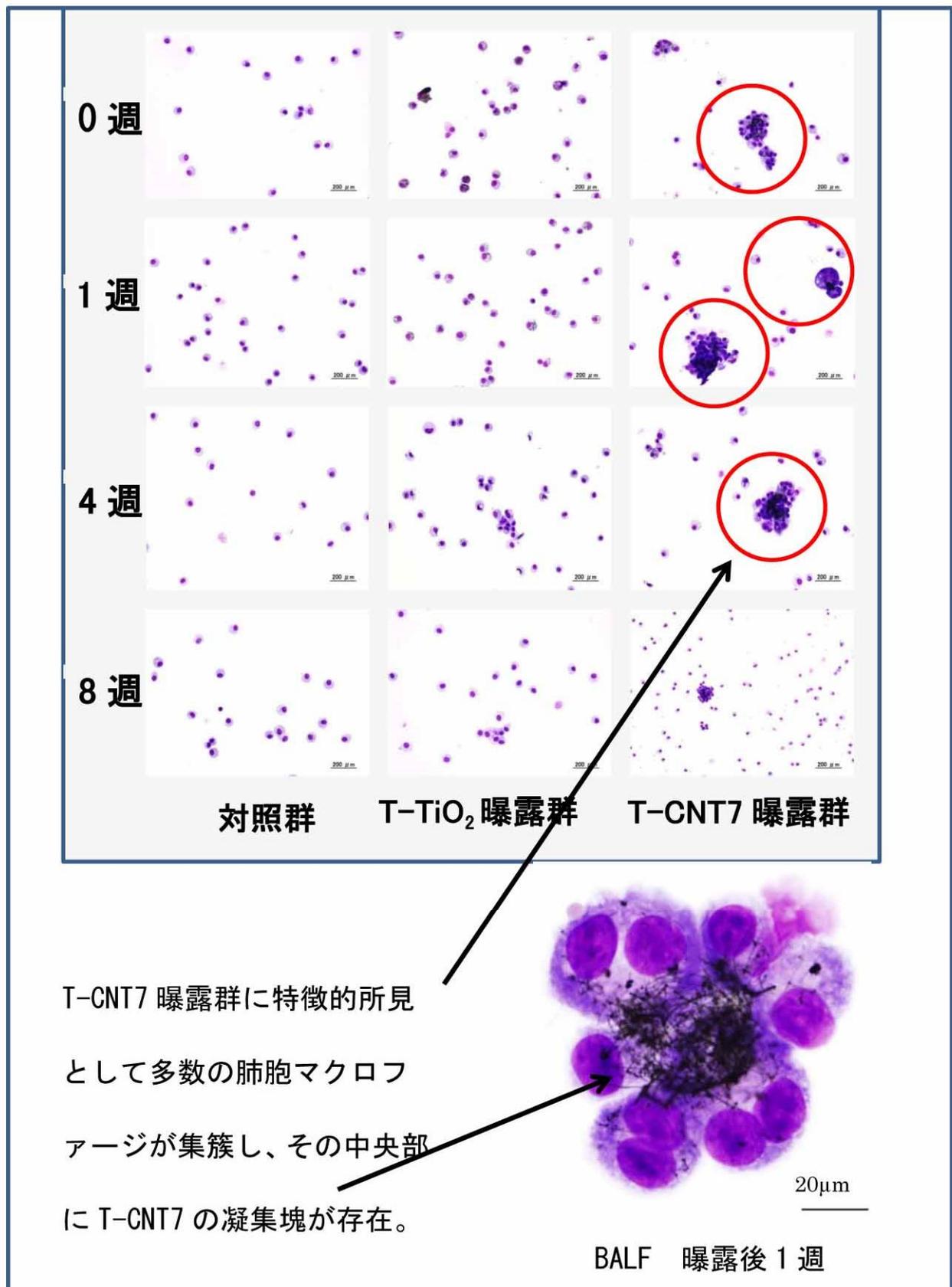


図 12 BALF 塗抹

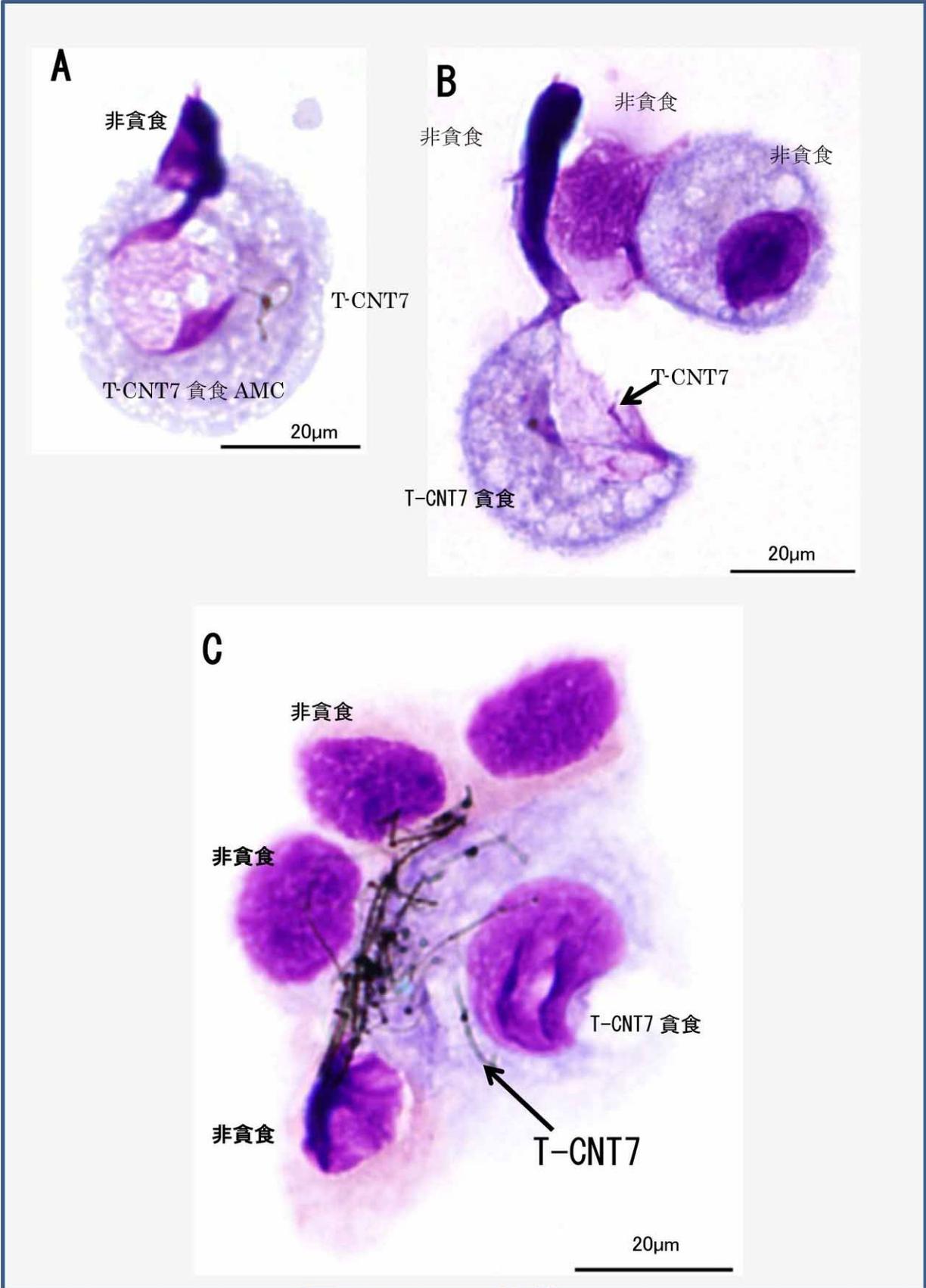
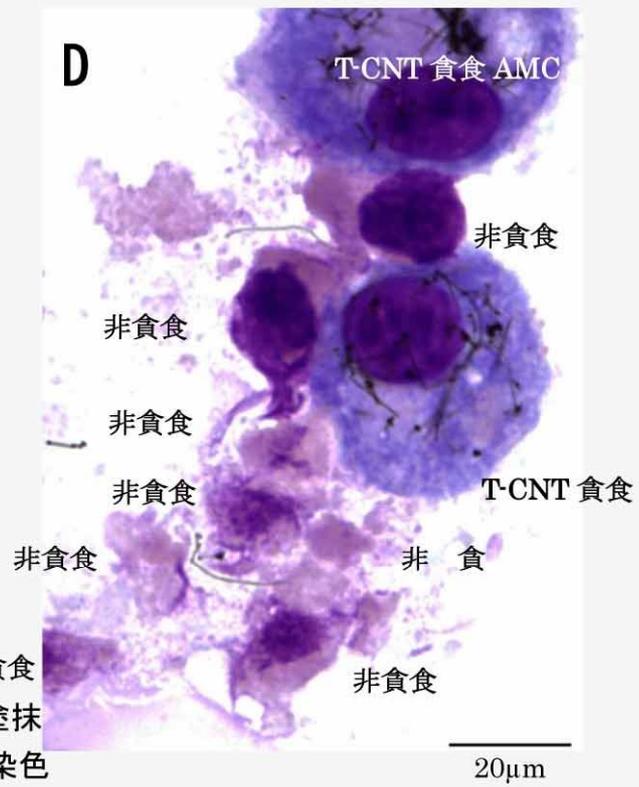
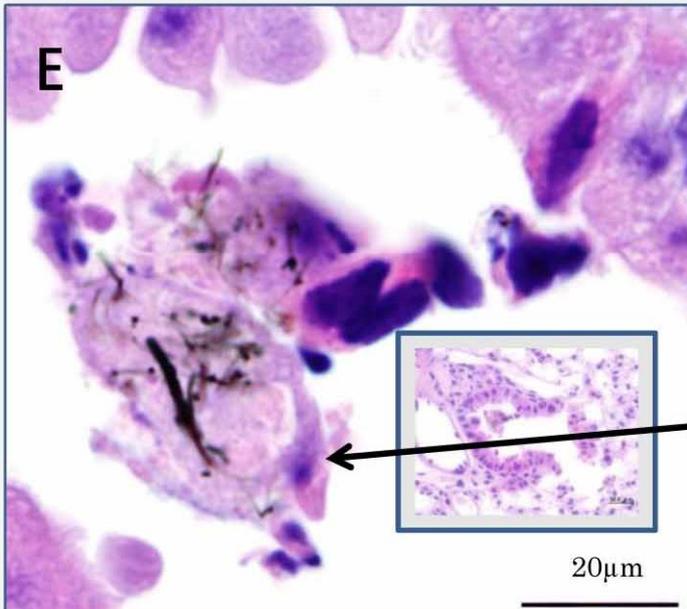


圖 13 BALF 塗抹

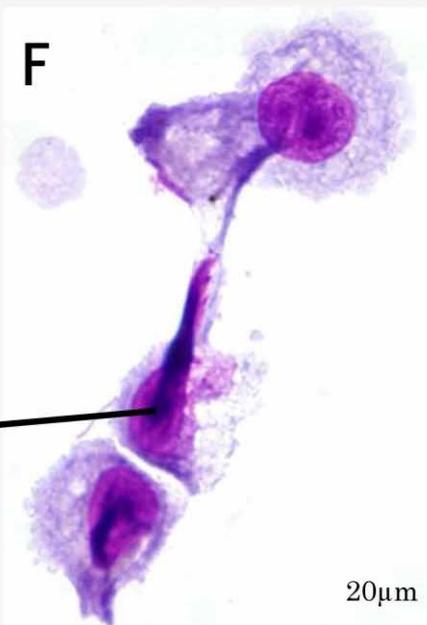
- 肺胸腔内で T-CNT7 貪食 AMC と非貪食 AMC が鎖状に繋って伸長している可能性が示された



T-CNT7 曝露後 1 週の BALF 塗抹 AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色  
photoshop で露出をアンダー (-90) に調整

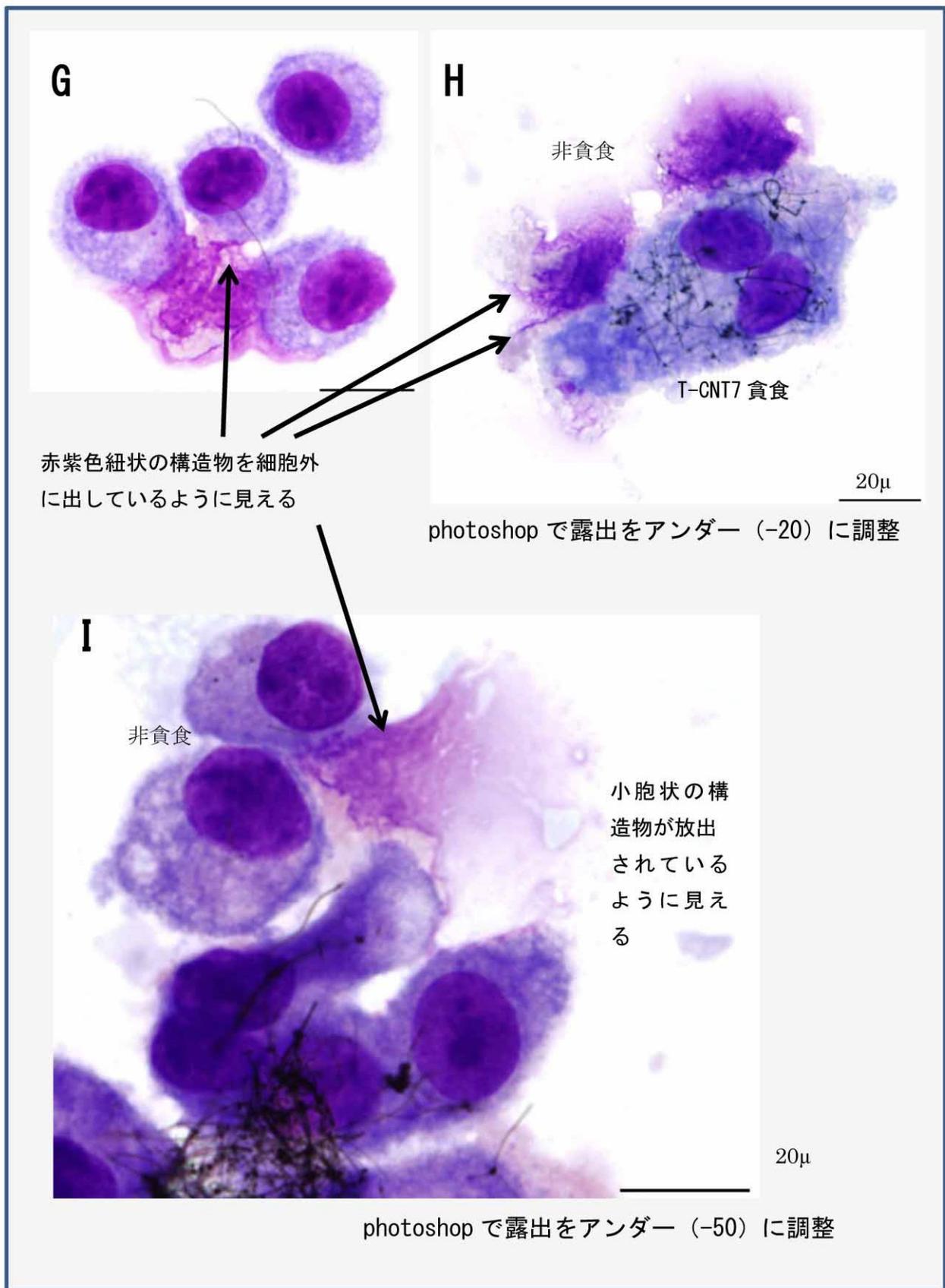


T-CNT7 曝露後 0 週  
パラフィン包埋、HE 染色



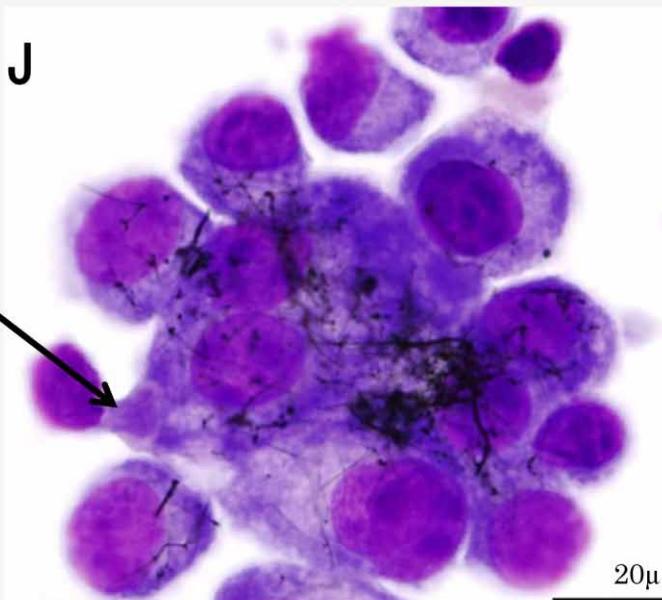
T-CNT7 曝露後 0 週の BALF 塗抹 AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色

図 13 BALF 塗抹

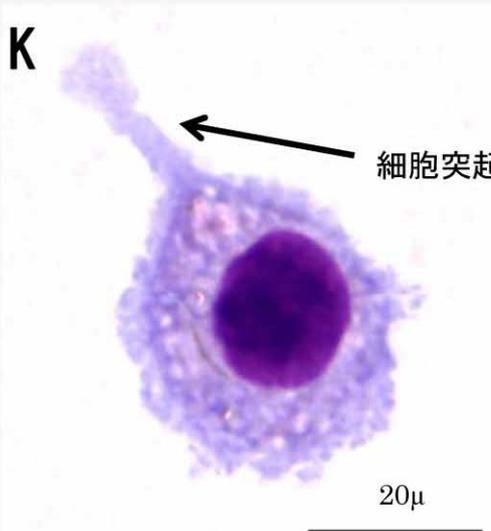


**図 13 BALF 塗抹**

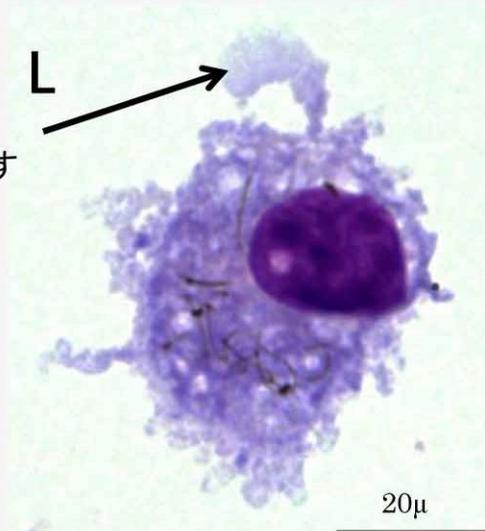
細胞突起を伸ばして他の肺胞マクロファージに接合する



T-CNT7 曝露後 1 週の BALF 塗抹  
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色  
photoshop で露出をアンダー (-20) に調整



T-CNT7 曝露後 4 週の BALF 塗抹  
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色  
photoshop で露出をアンダー (-20) に調整



T-CNT7 曝露後 4 週の BALF 塗抹  
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色  
photoshop で露出をアンダー (-90) に調整

図 13 BALF 塗抹

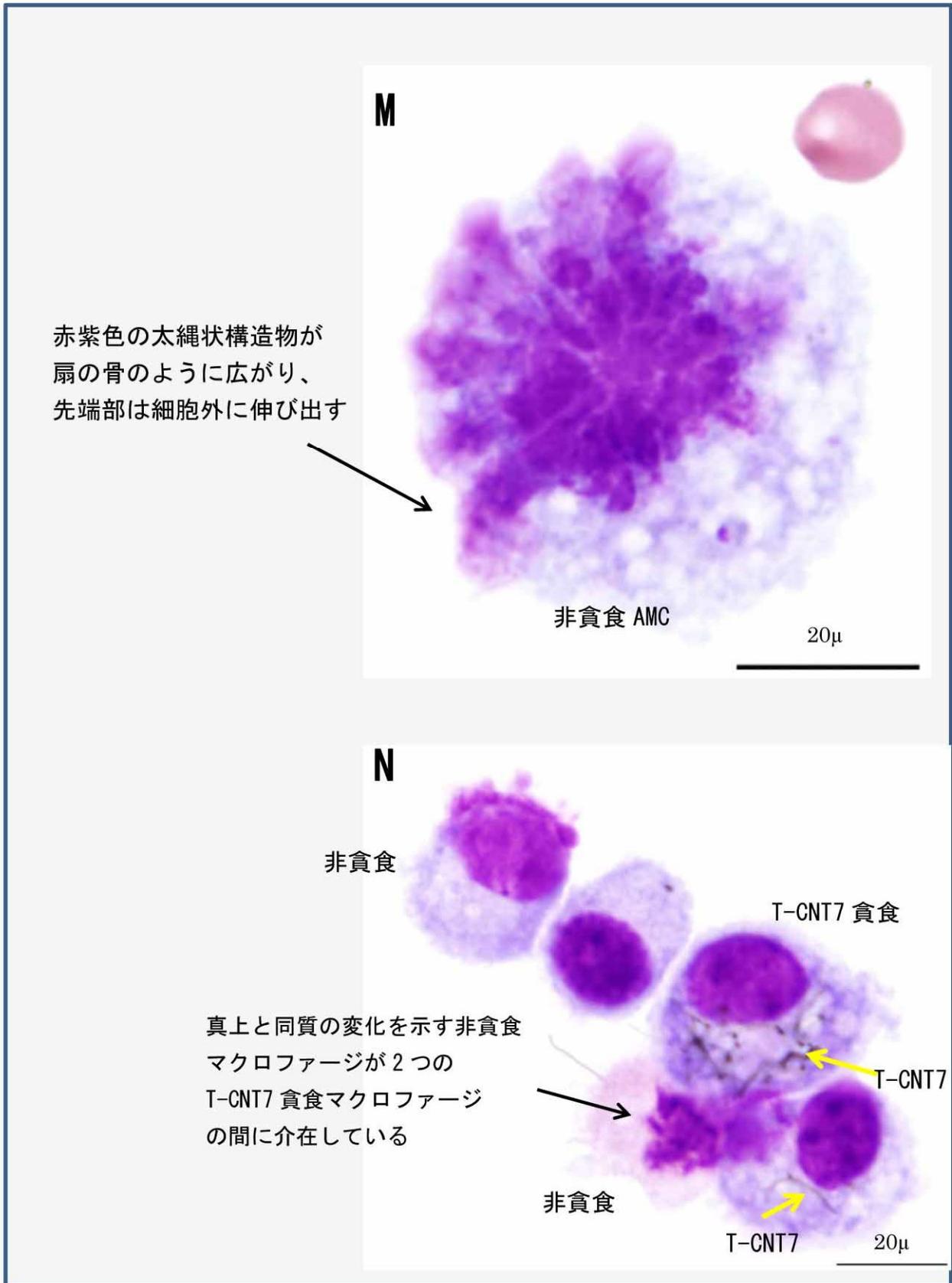


図 13 BALF 塗抹

気管支肺胞洗浄液塗抹

<T-CNT7>

貪食率： 0週でT-CNT7貪食マクロファージが80%、非貪食が20%程度

曝露後の時間経過とともに非貪食Mφの割合が増加

付記 10細胞以上のT-CNT7貪食マクロファージと非貪食マクロファージが接合した集合体  
(中央部にT-CNT7の凝集塊が存在)

<T-TiO<sub>2</sub>>

貪食率： ほとんど全てのマクロファージがTiO<sub>2</sub>を貪食

0週～1週まで貪食率100%、4週に非貪食マクロファージロファジの比率増加

## 表2 気管支肺胞洗浄液塗抹検査結果の総括