

平成 30 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する
研究

分担研究課題名：ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評
価系の確立に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学保健科学部 教授
研究協力者： 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授
研究協力者： 吉田裕樹 九州保健福祉大学薬学部 准教授
研究協力者： 宮内亜宜 九州保健福祉大学薬学部 助教

研究要旨

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評価を検討するた
め、MWNT-7 の単回の吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモ
デルでの影響評価を、先行研究である MWNT-7 の複数回の経鼻投与試験結果と比較
した。MWNT-7 を Taquann 法により吸入曝露し 3 日後、RSV をマウスに感染させた。
MWNT-7 曝露マウスの感染 5 日後では、肺洗浄液中の CCL5 など肺炎マーカーレ
ベルの上昇は認められなかったが、肺の線維化に関する指標（TGF- β ）の有意な上昇
を見出した。また、肺の病理組織像から、経鼻投与での MWNT-7 の凝集・偏在とは
異なり、感染の有無にかかわらず全葉で MWNT-7 の結晶を確認した。今後、曝露条
件や慢性化に関わる感染後の日数などを検討する予定である。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露による最も懸念されて
いる体内蓄積に伴う慢性影響については、
研究がなされておらず、また定量的にリスク
評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カ
ーボンナノチューブ (MWNT-7) による報告

のみである。そのため、2年間の慢性吸入試
験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験
法の開発は急務である。

これまで先行研究として、respiratory
syncytial virus (RSV) 感染マウスモデル
を用いた MWNT-7 の複数回の経鼻投与

による影響評価を実施し、炎症性マーカーの上昇や肺炎増悪化など感染免疫系への影響明らかにしてきた。そこで本研究では、MWNT-7のTaquann法による吸入曝露システムを利用して、ナノマテリアル曝露の感染性免疫系への影響を効率的に評価する試験法を開発することを目的としている。

今年度は、MWNT-7の単回の吸入曝露によるRSウイルス感染肺炎への増悪化現象などの免疫応答影響について、試験法の効率性などを含めて経鼻投与での結果と比較検討した。

B. 方法

MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研に新たに設置した Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53 μ m メッシュ濾過した MWNT-7 を質量濃度 3 および 6 mg/m³ になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。2 日後に曝露マウスは SLC (実験動物ブリーダー) に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下 (ketamine 40 μ g/g, xylazine 6 μ g/g、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80 $^{\circ}$ C に保管した。BALF 中から取得した細胞につ

いては、塗抹標本を作製し、ライトギムザ染色を実施した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。IFN- γ および TGF- β の定量は、Ready-Set-Go ELISA キット

(eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託し、評価は HE およびマッソントリクロム染色下で実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

(1) 吸入曝露のマウスへの影響

今回の試験では、初めて①4週齢 (平均体重 14-16 g) と小さなマウスを用いて Taquann 全身曝露吸入装置で 6 時間曝露する、②マウスを航空機利用で国立衛研 (川崎市) から九州保健福祉大学 (延岡市) へ移送する、ことからこれらのマウスへの影響を調べた。吸入曝露前・後で MWNT-7 曝露による体重変化や異常行動などは観察されなかった。また、輸

送前・後では輸送ストレスや摂餌量の減少で、非曝露群および曝露群ともに若干の体重減少は見られたが、感染実験に問題となるような影響は認められなかった。

(2) BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカインCCL5のBALF中のレベルは、MWNT-7吸入曝露により若干上昇したが、有意ではなかった。また、同じく肺炎マーカーとして知られているIFN- γ の上昇は認められなかった。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF- β は、曝露量に依存して有意に増加し、6 mg/m³ 群では対照群の約2倍に達していた。

(3)肺の病理組織学評価結果

HE染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。吸入曝露により、RSV感染に関わらず均一ではないが全葉でMWNT-7の結晶が確認された。特に、MWNT-7の凝集塊は殆ど見られず、気道終末部のマクロファージに貪食されている像が散見された。RSV感染マウスでは間質性肺炎が生じていたが、MWNT-7貪食マクロファージ周辺でのリンパ球の浸潤があるものの、曝露による明確な増悪化は見られなかった。さらに、マッソントリクロム染色プレパラートでの検鏡では、線維化などの差異は見いだせなかった。

D. 考察

今回初めて国立衛研・毒性部との共同で、Taquann 全身曝露吸入装置でのMWNT-7吸入曝露-RSV感染実験を実施したが、問題なく一連の実験をコンプライートできた。吸入曝露によるRSV感染マウスへの影響は、先行研究である複数回(感染1,3および5日前)の経鼻投与実験の結果のような肺炎マーカー上昇および肺炎像の増悪化は観察されなかった。しかし、経鼻投与ではMWNT-7の凝集塊が偏在していたのに対して、MWNT-7の結晶が肺の全葉で凝集なく観察されており、ナノマテリアルの安全性評価の観点からは吸入曝露の優位性が示されたと思われる。今後は曝露回数や吸入曝露量の検討を実施する予定である。

今回の評価から、TGF- β を影響指標に加えた。このサイトカインはPro-fibrogenic factorであり、肺の線維化に関わる因子として知られている。BALF中のTGF- β レベルはMWNT-7の曝露量に依存して有意に上昇しており、今後、RSV感染後の日数を延長してマッソントリクロム染色観察などで肺炎回復期への影響が明らかになるとと思われる。

E. 結論

1 Taquann 全身曝露吸入装置を用いたMWNT-7のRSV感染マウスへの影響

評価が可能であった。

2 MWNT-7の単回の吸入曝露での肺炎増悪化は認められなかったが、肺全葉での結晶の分布が観察された。

3 MWNT-7の吸入曝露により、BALF中のTGF- β レベルは有意に上昇し、線維化への影響が示唆された。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Sugita, C., Shin, K., Wakabayashi, H., Tshuhako, R., Yoshida, H., Wanatabe, W., Kurokawa, M. Antiviral activity of hypothiocyanite produced by lactoperoxidase against influenza A and B viruses and mode of its antiviral action Acta Virol. (2018) 62, 401-408. DOI:10.4149/av_2018_408.

2. 学会発表

Wataru Watanabe, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa Effects of double-walled carbon nanotubes on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. 54th Congress of the European Societies of Toxicology, P17-16, The SQUARE - Brussels Meeting Centre, 20180904.

渡辺 渡、明石 敏、宮内亜宜、吉田裕樹、黒川昌彦 二層カーボンナノチューブ曝露のRSウイルス肺炎への影響 第66回日本ウイルス学会総会、P1-P-17 京都テルサ 2018年10月28日

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし