

. 総括研究報告書

令和元年度 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

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の開発と産業応用が急速に進む中、製造者、使用者の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有害性情報が得られる評価法の構築が必要とされている。我々がこれまでに実施してきた実験動物を用いたナノマテリアルの吸入曝露による呼吸器毒性に関する先行研究から、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の胞体内での蓄積様式を「長繊維貫通型*」、「毛玉状凝集型*」及び「粒状凝集型*」の3つの様式に分類すると、それぞれの蓄積様式によって Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)の程度が異なると予測した。そこで、これらの3種類のモデルナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺についてマクロファージの胞体内での異物の蓄積様式と、それによって誘発される肺病変を関連付けたナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の収集を企画した。令和元年度は MWCNT-N (毛玉状凝集型) を吸入曝露した肺の解析を実施するとともに、前年度に実験を行った TiO₂ (粒状凝集型) と MWNT-7 (長繊維貫通型) の解析も継続した。研究の結果、肺負荷量と病理組織学的な解析結果から各モデルナノマテリアルの吸入曝露実験では肺に急性炎症を惹起させない低負荷量域のナノマテリアルの暴露が行われたことが示された。この低負荷量域の曝露では粒子状のものが曝露される TiO₂ と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることを肺負荷量の解析、免疫システムの変動の解析、BALF 塗抹細胞形態学的解析及び病理組織学的の多面的な解析によって明らかにした。

以上、本研究では、3種類の異なる物理化学的性状を示すナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における研究での情報収集が必要と考える。

(*)「貫通」とは、繊維が比較的太く強直でありマクロファージの細胞径よりも長い場合、マクロファージが貪食した際に繊維の一端または両端が細胞膜を貫通して細胞外に突出した像を呈する状況を指す。「粒状凝集」とは、マクロファージに対して十分に小さな粒子が細胞質内に高密度に凝集して貪食される状況を指す。「毛玉状凝集」とは、柔軟性の高い細い繊維が細胞質内で丸く絡まり、毛玉状に凝集する状況を指す。

研究分担者氏名・所属施設および所属施設における職名(50音順)

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
病理検査部長

石丸 直澄:徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授

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

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・室長

A. 研究目的

ナノマテリアル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な基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法の構築が必要である。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つであるMWNT-7についてはIARCでグループ2Bの評価がなされたが、他のMWCNTは情報不足のため評価がなされていない。MWCNT一つとっても多様な特性を有しており、他の多種多様な素材、粒子径、イオン化傾向、表面活性等が複雑に影響して有害性を発現するナノマテリアルの全容は未解明のままである。

国際的に、ナノマテリアルの物理化学的特性、製品運命、曝露評価などを基盤とした有害性のカテゴリー評価が提案されているが、ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり、かつ有害性発現が最も懸念される吸入曝露における *in vivo* 生体反応を反映させるものとはなっていない。先行研究(H26-化学-一般-003)及び(独)日本バイオアッセイセンターで実施されたMWNT-7の発がん試験の成果(Part Fibre Toxicol, 2016)に基づき、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の反応を3つの様式に分類した。すなわち、「長繊維貫通型」:マクロファージのサイズを超える長い単一の繊維では長繊維が胞体を通る状態となる。「毛玉状凝集型」:柔軟性に富む繊維はマクロファ

ージの胞体内に毛玉状の凝集塊として貯留されると予測される。「粒状凝集型」:マクロファージより小さな粒子は凝集塊として貯留される。「長繊維貫通型」においては、マクロファージは繊維を分解できずに Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)を示しつつアポトーシスに至り、繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。この現象による各種の細胞ストレスが繊維発がん機序の発端として提唱されている。「毛玉状凝集型」と「粒状凝集型」においては、マクロファージの胞体内の蓄積がある量を超えると、Frustrated phagocytosis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る。したがって、曝露量とサイトカインの種類と放出量の関係は異なると想定される。本研究では、当初、これらの3つの貪食反応を誘発するモデルを用い、マクロファージが発現する受容体、産生する各種サイトカインを明らかにし、異物を貪食したマクロファージの胞体内での蓄積様式と誘発される肺病変を関連付けすることで、ナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の整備を企図した。研究を進める中で、中間年度に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取して、BALF塗抹で肺胞マクロファージを形態学的にサブミクロンレベルで検索すると、これまでマクロファージによる異物処理は単独で行われることを想定していたものとは異なり、マクロファージが集団で異物を処理にあたる知見を得た。

この知見に基づき、平成30年度と令和元年度は病理組織学的評価の分担研究にBALF塗抹での白血球百分比と塗抹細胞の形態学的検索、BALF採取後にホルマリンで浸漬固定した組織標本の病理組織学的検索の追加、曝露したナノマテリアルの肺から縦隔部への移行を検索する目的で縦隔組織負荷量の測定と縦隔の病理組織検査を追加した。

本年度は令和元年度の吸入曝露物質とした「毛玉状凝集型」モデルに加えて、平成30年度に吸入曝露実験を行った「粒状凝集型」モデルと「長繊維貫通型」モデルについても解析を継続して、マクロファ

ジによるナノマテリアルの貪食で想定される3つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報整備を企画した。

B. 研究方法

モデルナノマテリアルとして球状粒子のTiO₂、及び長繊維の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のMWNT-7とMWCNT-Nの3種類を選択した。TiO₂は良く分散した球状粒子で一次粒子の径は30nmとされ、二次粒子も貪食した肺胞マクロファージの胞体内に完全に納まるサイズである。MWNT-7の原体には単離繊維と単離繊維が絡まった凝集体、及び製造時に生じた凝固体が混在している。MWCNT-Nの原体は肉眼観察で黒色のフレーク状を呈し、走査電子顕微鏡による観察では不織布状となっているが、分散化処理をしたものではナノサイズの幅の単離繊維とそれが緩やかに絡まった凝集体が混在している。

令和元年度は、MWCNT-N(日機装株式会社、NIHS 保有)を0(キャリアーエア吸入)、0.6と1.3 mg/m³の濃度でC57BL/NcrSlc雄性マウスにカートリッジ直噴式全身曝露吸入装置であるTaquann直噴式全身曝露吸入装置を用いて、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の曝露を行い、曝露終了日(0週)、1週、4週及び8週後に解剖・採材を行って、それぞれの分担研究の目的にあった解析を行った。また、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 石丸)と病理組織学的評価研究(分担 相磯)では平成30年度に吸入曝露実験を実施したTiO₂とMWNT-7について継続解析を行った。30年度に吸入曝露実験はTiO₂とMWNT-7を、それぞれ3、30mg/m³の濃度で令和元年度と同様、C57BL/NcrSlc雄性マウスにTaquann直噴式全身曝露吸入装置(ver. 3.0)を用いて、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の曝露を行い、曝露終了日(0週)、1、4週及び8週後に解剖・採材を行った。

3種類のモデルナノマテリアルは肺の深部にまで到達可能なサイズの粒子を揃えるため、Taquann法による分散処理を行って吸入曝露実験に供試した。

各分担研究者の研究方法を以下に示した。

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(高橋)

先行研究で開発した高分散乾燥検体を得るTaquann法で処理した検体を、Taquann直噴式全身曝露吸入装置 ver. 3.0を用いて吸入曝露実験を実施した。曝露チャンパ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。エアロゾルの粒度分布はMicro-Orifice Uniform Deposit Impactors(MOUDI)を用いた。

動物は、C57BL/NcrSlc雄性12週齢を使用し、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了日(0週)、1、4週及び8週後に定期解剖を行ってナノマテリアルの組織負荷量の測定、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究、及び病理組織学的評価研究の分担研究に生体サンプル提供した。

2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定(大西)

MWCNT-N(T-CNTN)の肺内と縦隔での沈着量を測定して負荷量のデータを収集した。

多層カーボンナノチューブの一種で「毛玉状凝集型」モデルとして選定したMWCNT-Nの負荷量の測定はホルマリンで固定した組織をアルカリ溶液で溶解し、溶解液中に含まれる多層カーボンナノチューブをBenzo[ghi]perylene(BgP)をマーカーとした蛍光強度を高速液体クロマトグラフ(HPLC)で測定、検量線から求めた直線回帰式を用いて検体の組織内沈着量を求めた。

なお、平成30年度に報告した「長繊維貫通型」モデルとして選定したMWNT-7は令和元年度のMWCNT-Nと同様にBenzo[ghi]perylene(BgP)をマーカーとして利用した方法で測定した。「粒状凝集型」モデルの二酸化チタンは冷凍保存した組織を強酸で溶解し、原子吸光の測定値を検量線から求めた直線回帰式を用いて検体の組織内沈着量を求めた。

3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究(石丸)

吸入曝露実験で得られたサンプルについて、以下の解析を行った。

フローサイトメータ解析による BALF、頸部リンパ節、脾臓を用いたリンパ球表面マーカーの発現解析、マルチプレックス解析による BALF を用いた各種サイトカインの解析、定量化 RT-PCR 法による BALF と肺サンプルを用いた mRNA 発現量の解析を実施した。

MWCNT-7 と TiO₂ の全身吸入曝露による影響に関して、BALF 細胞のフローサイトメータ解析の結果は、すでに報告している(平成 30 年度報告書)。今年度はその継続解析として、BALF 中の各種サイトカイン濃度をマルチプレックス解析した。

4. 病理組織学的評価研究(相磯)

平成 30 年度の吸入曝露実験のスケジュールの関係で、平成 30 年度物質の「粒状凝集型」モデルの TiO₂ と「長繊維貫通型」モデルの MWNT-7 を曝露して得たサンプルの解析を令和元年度に継続実施し、令和元年度物質の「毛玉状凝集型」モデルとした MWCNT-N の解析と併せて、マクロファージがナノマテリアルを貪食する結果、想定される 3 つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報整備を企画した。

BALF 塗抹を材料にした検索では、白血球百分比と塗抹細胞の詳細な形態学的検索を行った。

肺の病理組織学的検査では、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けた灌流固定と、気道を介し肺内に固定液を注入した浸漬固定の二通りの固定材料を用いた肺の病理組織標本を作製し、詳細な形態学的検索を行った。吸入肺曝露した検体の肺から縦隔への移行の状態を調べる目的で縦隔部の組織全に渡り 3mm 幅で切り出した組織切片について詳細な形態学的検索を行った。

BALF 細胞と病理組織標本の詳細な検索では、通常の病理組織学的検査で使用される 4 倍～40 倍の対物レンズを用いた観察に加えて、対物レンズ 100 倍(油浸)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がない Tagged Image File Format (TIF) で保存、画像処理ソフト「Adobe Photoshop」で横 80 x 縦

60mm、解像度 600 pixel/inch の psd.形式とし、さらに縦横 4 倍に拡大して、拡大倍率 2000 倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

縦隔の病理組織学的検索でもナノマテリアルの沈着を疑う所見に対し、当該病理組織標本のカバーガラスを外して走査型電子顕微鏡によるサブミクロンレベルの検索を行った。

(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 日日本学術会議)、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

各分担研究の結果を以下に示した。

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

MWCNT-N の全身曝露吸入を計画に従って実施し、曝露後 0、1、4 おび 8 週後にサンプリングして各分担研究者に提供した。MWCNT-N の曝露濃度は 1、3mg/m³ を目標としたが、実際に曝露できた濃度は目標濃度の約半分であった。

MWCNT-N の吸入曝露実験の曝露濃度(質量濃度)は低濃度、高濃度群それぞれ $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは、低濃度群、高濃度群それぞれ $503 \pm 150/\text{cm}^3$ 、 $1,107 \pm 246/\text{cm}^3$ であった。空気動学的質量中位径(MMAD)は低濃度群、高濃度群それぞれ $640 \sim 3,708 \text{ nm}$ ($\text{g}: 8.6 \sim 34.0$)、 $1,617 \sim 3,474 \text{ nm}$ ($\text{g}: 11.5 \sim 26.7$)であった。吸入曝露装置の曝露チャンバーからサンプリングした MWCNT-N のエアロゾルの形状を確認したところ、単離繊維とともに毛玉状に凝集しているものも認められ、その直径(長軸)は $8 \sim 200 \mu\text{m}$ 程度の大きさであった。実験期間を通して、質量濃度は目標濃度の約半分であり、エアロゾル化効率は 30% 未満であった。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。

2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

MWCNT-N 1.3 mg/m^3 曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後 0 週で $14.38 \mu\text{g/g}$ 、1 週で $10.96 \mu\text{g/g}$ 、4 週で $5.37 \mu\text{g/g}$ 、8 週は $3.77 \mu\text{g/g}$ であった。曝露後 0 週から 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は 0 週の約 $1/3$ となる減衰が示された。半減期は約 3.5 週であった。

MWCNT-N 0.6 mg/m^3 曝露群のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後 0 週で $8.84 \mu\text{g/g}$ 、1 週で $5.51 \mu\text{g/g}$ 、4 週で $2.69 \mu\text{g/g}$ 、8 週は $2.41 \mu\text{g/g}$ であった。曝露後 0 週から 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は 0 週の約 $1/3$ となる減衰が示された。半減期は約 3.5 週であった。

なお、MWCNT-N 1.3 mg/m^3 と 0.6 mg/m^3 曝露群の縦隔と対照群(キャリアーエア吸入)の肺と縦隔に MWCNT-N は検出されなかった。

令和元年度と平成 30 年度の解析結果と併せて、3 つのタイプのモデルナノマテリアルによる呼吸器への生体影響について肺負荷量の観点から比較解析した結果を以下に示した。

研究班で実施した吸入曝露の条件下での検体の肺負荷量は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期は約 3.5 週間であり、各モデルナノマテリアルの吸

入曝露実験を行った肺は、マクロファージによる肺からのクリアランスが阻害されない負荷状態であったことが示された。また、曝露後 0 週を基準としたときの曝露後 8 週の検体の肺内残存率は MWNT-7: 32%; MWCNT-N: 27%; TiO_2 : 17% で、曝露後 0 週での検体負荷量のおおよそ 30% ~ 15% が肺内に残存していることが示された。肺内残存率は MWNT-7 が最も多く、MWNT-7 は肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。残存率でみると TiO_2 (粒状凝集型)は MWNT-7 と MWCNT-N よりもクリアランスされ易く、曝露後 0 週の肺負荷量の $1/6$ 程度が 8 週後の肺内に残存していた。一方、肺 1g 当たりの検体沈着量でみると、曝露後 8 週の TiO_2 曝露群(曝露濃度: 30 mg/m^3)、MWNT-7 曝露群(同: 3 mg/m^3)、MWCNT-N 曝露群(同: 1.3 mg/m^3)の値は、それぞれ 25.85 、 9.15 、 $3.77 \mu\text{g}$ で、 TiO_2 曝露群の沈着量が最も多く、MWNT-7 群の 2.8 倍であった。

各モデルナノマテリアルとも対照群の肺と縦隔、曝露群の縦隔に検体の沈着は検出されなかった。

3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

平成 30 年度の研究で積み残しとなった MWNT-7 と TiO_2 の吸入曝露実験で採取したサンプルについての、BALF 細胞並びに肺組織(BALF 採取後)における遺伝子発現解析と BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析を令和元年度に実施した。

なお、考察に必要な平成 30 年度に報告した BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析結果を付記した。

BALF 細胞での mRNA 発現は次の通り。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-7 曝露で MMP12 と IL-6 の mRNA 発現が増加したが、 TiO_2 曝露では MMP12 と IL-6 の mRNA 発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MWCNT-7 曝露で CD204 と MARCO の mRNA 発現が上昇する傾向にあった(有意差なし)。 TiO_2 曝露で CD36 の mRNA 発現が曝露後 4 週と 8

週で上昇した。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、MWCNT-7 で Cox2 の mRNA 発現が曝露後 0 週に上昇(有意)し、1 週にも有意な上昇がみられた。

肺組織での mRNA 発現は次の通り。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-7 曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 1、4 週で有意に上昇、IL-6 の mRNA 発現が曝露後 1 週に上昇した。TiO₂ 曝露で IL-6 の mRNA 発現が曝露後 1 週に上昇した。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MWCNT-7 曝露で MARCO、CD204、CD36 の mRNA 発現が曝露後、1 週に上昇した(MARCO で有意差あり、CD204 と CD36 には有意差なし)。TiO₂ 曝露で CD204 と CD36 の mRNA 発現が曝露後、1 週に上昇した(有意差なし)。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、MWCNT-7 曝露で iNOS と Cox2 の mRNA 発現が上昇した。iNOS の mRNA 発現は曝露後 0 週に大きく上昇(有意)、Cox2 の mRNA 発現は曝露後 1 週に上昇が示された(有意)。TiO₂ 曝露では iNOS と、Cox2 の mRNA 発現上昇はなかった。

BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析は次の通り。MWCNT-7 の曝露によって、曝露後 0 週に VEGF および IL-12 の濃度が上昇(有意差無し)、IL-12 は曝露後 8 週においても発現上昇が示された。TiO₂ 曝露では曝露後 0 週に IL-4 の発現上昇が示された。

.....

< 付記 > BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析(平成 30 年度報告)

MWNT-7 の曝露で曝露後 0 週に生細胞の減少、肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁻F4/80⁺)の減少、好酸球の増加、単球、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加、M2 マクロファージ(CD206⁺)の増加が示された。これらの変化は、その後、次のような経時的推移を示した。

肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)の減少は、4 週以降に漸増して 8 週に対照群のレベルに回復した。肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁻F4/80⁺)の減少は、4 週まで減少が持続、8 週

に回復した。好酸球の増加は、曝露後 1 週まで増加、4 週以降低下して対照群のレベルに回復した。M2 マクロファージ(CD206⁺)の増加は、曝露後 1 週に回復した。単球と CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加は、曝露後 1 週をピークに 8 週まで持続した。

TiO₂ の曝露では、BALF 中の免疫担当細胞への影響はなかった。

.....

令和元年度の、MWCNT-N の吸入曝露実験で採取したサンプルを用いて、BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析、BALF 細胞並びに肺組織(BALF 採取後)における遺伝子発現解析、BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析を実施した。

BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析の結果は次の通りである。MWCNT-N の曝露後 0 週に生細胞の割合に変化はなく、好酸球、単球、各肺泡マクロファージ分画の割合に有意な影響はなかった。曝露後 1、4、8 週においても BALF 分画細胞の割合に変化はなかった。曝露後の経時的変化においても、肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)の分画が占める割合はほぼ一定のレベルで推移し、対照群と比較して大きな変化はなかった。肺泡マクロファージの各種スカベンジャー受容体の CD36、CD163、及び CD206 の発現に MWCNT-N 曝露による影響は認められなかった。

BALF 細胞での mRNA 発現は次の通りである。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-N の曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 0 週の低濃度群、曝露後 1 週の低濃度群と曝露後 8 週の高濃度群で上昇が示された(いずれも有意差無し)。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現については、MWCNT-N の曝露で MARCO の mRNA 発現が各週で上昇(有意差無し)、SRB1 の mRNA 発現が曝露後 0、4、8 週週で上昇(有意差無し)が示された。

肺組織での mRNA 発現は次の通りである。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-N の曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 0、4、8 週の全ての解析週で有意な上昇が示された。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MARCO の mRNA 発現

が曝露後 1、2 週で上昇(有意差あり:曝露後 0、1 週での低濃度、高濃度曝露群)が示されたが、SRB1 の mRNA 発現には、曝露後 0、1、4、8 週のどの解析週にも MWCNT-N 曝露の影響はなかった。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、Cox2 の mRNA 発現増加が曝露後 0 週の低濃度および高濃度曝露群で示された(有意差あり)。他の解析週では Cox2 の mRNA 発現に MWCNT-N 曝露の影響はなかった。

なお、MWNT-7 で発現の増加が示された IL-6 mRNA は、いずれの解析週も MWCNT-N 曝露の影響はなかった。

BALF 中の各種サイトカイン濃度を調べたマルチプレックス解析の結果は次の通りである。

下記 20 項目の解析のなかで、MWCNT-N の曝露による変化が示されたのは、曝露後 1 週に高濃度群で VEGF の上昇(有意差無し)だけであった 解析項目:IL-1 alpha、IL-1 beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 (p40/p70)、IL-13、IL-17、GM-CSF、IFN- γ 、IP-10、KC、MIG、MCP-1、MIP-1 alpha、TNF- alpha、VEGF、FGF basic

4. 病理組織学的評価研究

病理組織学的研究は、平成 30 年度から肺の病理組織学的解析に BALF の形態学的解析と縦隔の病理組織検査を追加して、BALF の形態学的解析、肺と縦隔の病理組織検査を実施した。以下、順にその結果を記す。

BALF の形態学的解析では、白血球百分比と BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析を行った結果を以下に示す。

白血球百分比を調べた結果では、三種類のモデルナノマテリアルの曝露実験で採取した BALF 細胞のほとんど全てがマクロファージであることが示され、急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はなかった。

塗抹細胞の詳細な形態学的解析を行った結果、以下のことが判明した。

TiO₂ 曝露群では、マクロファージに TiO₂ を貪食したものと非貪食のものが認められた。貪食能示す肺胞マクロファージを Type A 肺胞マクロファージ(以下、

Type A マクロファージ)、貪食能示さない肺胞マクロファージを Type B 肺胞マクロファージ(以下、Type B マクロファージ)と称した。Type A マクロファージには単独で存在するものと複数が相互に接触ないし接合したクラスターとして存在するものが認められ、クラスターを形成する Type A マクロファージは、胞体の好塩基性の色調が強かった。Type A 肺胞マクロファージは、TiO₂ を内包した状態で変性所見を認めるものや、核クロマチンの核外への伸び出しなどの形態変化をしたものも認められた。TiO₂ 曝露実験では Type B マクロファージの出現は少ないが、TiO₂ を貪食した Type A マクロファージの中には Type B マクロファージと接合したものや、形態が変化した別の Type A マクロファージに付着するものがみられた。

MWNT-7 曝露群にも検体を貪食する Type A マクロファージと非貪食の Type B マクロファージが認められた。貪食によって様々な長さや太さの繊維状物質を胞体内に蓄積した Type A マクロファージは、TiO₂ で見られたものよりも強く青紫を帯び、細胞突起を伸ばしたのも認められた。MWNT-7 を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも多く、TiO₂ で認められたものよりも胞体は大型化し、胞体の色調は好塩基性が顕著で濃青紫を呈した。二核以上の多核細胞や多核巨細胞、クラスターを構成するマクロファージ同士が細胞突起を伸ばして強固に接合した所見も認められた。多核巨細胞にはラングハンス型巨細胞の様に核が辺縁に沿って馬蹄形に配列するものも認められた。MWNT-7 の凝集塊を囲む 4~10 細胞程度の Type A マクロファージのクラスターを基本単位として、それらが融合することにより長径が 100 μ m を超える大きなクラスターを形成したものが認められた。一方、Type B マクロファージについては、細かい MWNT-7 のトラップを示唆する所見が示された。MWNT-7 の曝露では、Type A と Type B が混在するクラスターでは Type A の方が主体占め、Type B はすくなかった。

MWCNT-N 曝露群にも検体を貪食した Type A マクロファージと非貪食の Type B マクロファージが認められた。Type A マクロファージに貪食されて胞体内に取り込まれた MWCNT-N は当初に予測したような毛

玉状凝集ではなく、細く長い繊維の状態が存在していた。MWCNT-N を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも認められたが、MWNT-7 で認められたものに比較して胞体の大型化や濃青紫に染色される好塩基性は顕著ではなく、二核以上の多核細胞の出現はほとんど認められなかった。MWCNT-N においても、Type B マクロファージによる細かい検体のトラップを示唆する所見が認められた。本研究で曝露された MWCNT-N のエアロゾルには直径(長軸)が 8~200 μm 程度の凝集体が存在することが確認されており(吸入曝露分担 高橋)、緩やかに絡まって広がった凝集体(Type B マクロファージの胞体よりも、面積において大きな広がりをもつ)に対する異物処理では、Type B マクロファージがクラスターを形成することで、より広い面積で検体をトラップしていると考えられる所見がみられた。MWCNT-N では Type A と Type B マクロファージが混在して大きなクラスターを形成したケースが多く、集簇したマクロファージの核は、クラスターの中央部に不規則にオーバーラップするように密集し、多数の MWCNT-N がび漫性に付着している様子が認められた。MWCNT-N では MWNT-7 でみられた多核巨細胞や、胞体が著しく肥大し濃青紫色を呈する Type A マクロファージが検体の凝集塊を取り囲むクラスターは認められなかった。

肺の病理学組織的評価で以下の結果を得た。

三種類のモデルナノマテリアルの曝露で、曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期にも肺に好中球浸潤を伴う急性炎症、その他明確な毒性影響を認めなかった。

肺組織の詳細な形態学的解析で得た結果の中から、カテゴリー評価考える上で重要と思われるものを以下に示した。

TiO₂ 曝露群では、肺内に認められる TiO₂ 貪食したマクロファージは少なく、灌流固定をした肺であっても曝露後 0 週に TiO₂ 貪食したマクロファージが散見された程度であった。曝露後 8 週の肺には TiO₂ 貪食マクロファージの残留をほとんど認めなかった。BALF 採取後に浸漬固定した曝露後 8 週の肺の標本で

TiO₂ が肺内に固着されている状況を精査した。病理組織学的検査で常用する観察倍率では病変を確認することができないが、対物 100 倍で撮影した肺組織の画像を、デジタル拡大を行って詳細に検索すると、マクロファージが貪食した TiO₂ を胞体内に保有した状態で肺組織に付着、それに対する毛細血管の増加などの極めて微小な組織学的変化が起きていることが判明した。

MWNT-7 曝露群では、曝露後 0 週から 8 週までの各解剖期で、細気管支から肺胞管に至る気腔内に MWNT-7 を貪食した肺胞マクロファージによる島状集簇塊など MWNT-7 を取り込んだ肉芽腫性病変の形成が顕著に認められた。BALF 塗抹所見と病理組織所見から、MWNT-7 を貪食したマクロファージは大・小のクラスターを形成して肺組織に付加・固着されることが示された。曝露後 8 週の肺(浸漬固定標本)に、細気管支から続く肺胞管の内腔が末梢に向かうほど広く拡張し、肺気腫を思わせる所見を認めた。最も強く内腔拡張がみられる肺胞管末梢側の端部に肺胞壁の肥厚を認め、この肥厚部には煙状の淡灰色の不定形物質がマクロファージにオーバーラップするように沈着した所見を認め、煙状の淡灰色の不定形物質は光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

曝露後 8 週の肺に気道周囲の間質組織に Masson trichrome 染色で青色に染まる領域の増加を認め、好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見がなくても膠原繊維の軽度な増加が起こることが示された。

MWCNT-N 曝露群では、MWCNT-N を吸入曝露した肺は、灌流固定標本、浸漬固定標本ともに常用される倍率での病理組織検査では目立った変化は認められなかった。100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支から肺胞管に至る領域で複数の肺胞マクロファージが MWCNT-N を囲んだ小型の集簇巣を認めた。その分布は MWCNT-N 曝露群と基本的に同様であったが、顕微鏡で認識するのは困難であった。MWCNT-N を囲んだ肺胞マクロファージの小型集簇巣の内部に透けるような不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着

物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた。

縦隔組織の詳細な形態学的解析を行った結果、以下の知見を得た。

常用される倍率での病理組織検査では、三種類のモデルナノマテリアルの吸入曝露で縦隔に目立った変化を認めなかった。100倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で以下の所見を認めた。

TiO₂曝露群では、極めて稀にTiO₂貪食マクロファージが縦隔組織内で線維(膠原線維、細網線維)に付着していた。

MWNT-7曝露群では、MWNT-7貪食マクロファージが単独またはクラスターを形成して縦隔の疎性結合織に付着していた。縦隔組織内に認めたMWNT-7貪食マクロファージのクラスターはBALF塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと類似した形態を示した。肺から縦隔に移行できるサイズに上限があるようで、縦隔に移行したクラスターの最も幅が広いところで30μm程度で、縦隔内に比較的多く認められる獣毛の断面(毛髄質の細胞と毛皮質の染色性とを失う)の径は20μm程度であった。縦隔部リンパ節に曝露後0週に少数の細いMWNT-7が認められ、曝露後8週ではその数が増加している様子が示された。縦隔部リンパ節には、MWNT-7曝露群の縦隔の疎性結合組織内に認められたようなMWNT-7貪食マクロファージのクラスターは認められなかった。

MWCNT-N曝露群では、極めて稀にマクロファージと灰色を帯びた煙状の不定形物質が縦隔の組織と癒合したと考えられる所見が認められ、この不定形物質をMWCNT-Nと推定して、当該病理組織標本のカバーガラスを外した組織切片を透過型電子顕微鏡で2000倍まで拡大した観察した結果、光学顕微鏡で観察された灰色を帯びた煙状の不定形物質と同様の形状、大きさの固形物が縦隔の組織と癒合している所見を認めた。

D. 考察

各分担研究者の研究成果は下記のように考察さ

れた。

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

吸入チャンバー内のMWCNT-Nのエアロゾルの形状を確認すると単離繊維とともに凝集体も多く認められた。MWCNT-NはMWNT-7に比較して繊維径が細く、分散されてエアロゾル化したMWCNT-Nが、再凝集する可能性が考えられた。

MWCNT-Nは、原末の形状からエアロゾル化は非常に困難と考えられたが、Taquann法により高分散検体が得られ、また、Taquann吸入曝露装置Ver3.0によりエアロゾル化が可能であった。しかし、質量濃度は低用量、高用量ともに目標濃度の半分程度であった。MWCNT-NはMWNT-7に比較して繊維径が細いため、検体の分散化処理(Taquann法)過程でtert-ブチルアルコール(TB)懸濁液を金属製フィルターでろ過する際に、フィルターに絡まりやすく濾過効率が低いことを経験している。MWCNT-Nはエアロゾル化したものがチャンバー内で細い繊維が絡まりあって再凝集している可能性が考えられた。

MWCNT-Nの繊維長はMWNT-7とほぼ同等であるが、繊維径は細く絡まりやすいため、分散されてエアロゾル化したものが再凝集する可能性が考えられた。

2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

曝露終了日、1、4および8週間における肺の検体沈着量を測定して、休薬期間における肺負荷量の経時的な推移を調べた。その結果、0.6mg/m³群1.3mg/m³群とも曝露終了後8週後の肺負荷量は曝露直後の約1/3に減衰し、半減期は約3.5週間であり、マクロファージによる肺からのクリアランスの障害を起さない負荷状態であったことが示された。

令和元年度は平成30年度に実施したTiO₂(T-TiO₂)とMWNT-7(T-CNT7)の測定結果と併せて、3つのタイプのモデルナノマテリアルによる肺負荷量の推移について比較解析を行った。その結果、実施した吸入曝露条件下で、肺での検体負荷量の推移

は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約 3.5 週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスが阻害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また 3 つのタイプのモデルナノマテリアル全体としてみると、曝露終了後 8 週間には曝露終了時の負荷量のおおよそ 30% ~ 15% の検体が肺内に残存していることが示された。残存率は MWNT-7 が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO₂ は MWCNT (MWNT-7, MWCNT-N) と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の約 1/6 が肺内に残存していることが示された。

3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

平成 30 年度に令和元年度まで継続した MWCNT-7 または二酸化チタンを曝露した肺の遺伝子発現解析の結果、BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現は、これまでの報告と同様に、MWCNT-7 の曝露で大きく上昇し、逆に、TiO₂ の曝露では MMP12 mRNA の発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体遺伝子あるいは酸化ストレスに参与する Cox2 遺伝子の発現にも MWCNT-7 と TiO₂ の曝露で違いが生じていた。肺組織においても MWCNT-7 と TiO₂ の曝露でそれぞれの遺伝子発現に違いが確認されたことから、ナノマテリアルの性状の違いがマクロファージを中心とした肺免疫の反応性が大きく影響を受けることが判明した。BALF 中の各種サイトカインの濃度に関して、検出できたのが VEGF、IL-12、IL-4 であり、MWCNT-7 の曝露後 0 週に VEGF と IL-12 の濃度の上昇があった。TiO₂ とのナノマテリアルの性状の相違によってサイトカイン分泌にも影響がでることがわかった。

また、今年度の研究では フローサイトメータを用いた細胞分画の解析では、BALF 細胞中の生細胞の割合は MWCNT-N 曝露では影響が観察されなかった。H29 および H30 年度に実施した MWCNT-7 を用いた曝露実験では、曝露後 BALF 細胞の生細胞の割合が急激に減少し、その後経時的に増加していたが、MWCNT-N 曝露では生細胞の割合に関して、

各解析週で曝露による影響は観察されなかった。この所見は MWCNT-N と MWCNT-7 の形状の相違が起因しているものと考えられた。

BALF 細胞中の好酸球、単球、肺泡マクロファージあるいは肺泡マクロファージの各分画 (F4/80, CD11b⁺F4/40⁺, CD11b⁻F4/80⁺) に関して、各解析週で MWCNT-N の曝露による影響は観察されなかった。このことも、MWCNT-7 との相違点としてあげられた。

肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現に関しては、細胞表面上の発現には大きな変化は認められなかったが、BALF 細胞あるいは肺組織における MARCO および SRB1 mRNA の発現が MWCNT-N 曝露で変化していたことから、カーボンナノマテリアルの処理にスカベンジャー受容体が関与していることが示唆された。

カーボンナノチューブの吸入曝露により肺泡マクロファージあるいは MMP12 の発現が上昇することが明らかになっている。今年度の実験においても、BALF 細胞あるいは肺組織の MMP12 mRNA 発現は MWCNT-N 曝露によって上昇した。一方で、MWCNT-7 曝露での BALF 細胞の mRNA 発現は対照群に比較して約 100 倍程度の増加が認められたのに対して、MWCNT-N 曝露では 10 倍程度であることから、ナノマテリアルの形状によって MMP12 の発現自体にも影響があることが明らかになった。

BALF 中のサイトカインの濃度に関しては、アッセイ系での検出限界の問題もあり、今回は VEGF のみの結果となった。MWCNT-7 曝露においても VEGF の濃度は高くなっていたので、程度の差はあるものの MWCNT-N 曝露による肺傷害に対する修復の機転が作動しているものと推測できる。

MWCNT-N の吸入曝露によって、MWCNT-7 曝露に比較して肺泡傷害は軽度であり、肺のマクロファージを中心とした免疫システムに大きな影響を与えていない可能性が考えられた。

4. 病理組織学的評価研究

粒子状ナノマテリアルの TiO₂ は、曝露後 8 週の通常の観察倍率による病理組織検査で還流固定を行った病理組織標本、BALF 採取後に浸漬固定を行っ

た病理組織標本のいずれにおいても肺内に TiO_2 を貪食したマクロファージや TiO_2 粒子はほとんど認められず、炎症等の肺毒性影響は見られなかった。この結果について当初、マウスの肺内に吸引された TiO_2 の大部分が肺胞マクロファージに貪食されて肺外に移送され、病理組織学的にも肺内に残留する TiO_2 貪食マクロファージは殆ど認められなかったことから、肺内に残留する TiO_2 は MWNT-7 とは比較にならないほど少なく、毒性学的にも問題になるものではないと考えていた。しかし、組織負荷量測定を分担した大西の結果から曝露後 8W における肺 1g 当たり TiO_2 の残存量は MWNT-7 群曝露群の 2.8 倍であることが示された。

BALF 塗抹標本の精査で、 TiO_2 貪食マクロファージは変性によって膨化・透明化した胞体内に TiO_2 を包含した状態で BALF 中に存在することが判明し、変性によって膨化・透明化した胞体を有する TiO_2 貪食マクロファージが肺胞壁などの肺組織に付着して存在すると推察された。肺内に残存した TiO_2 の所在を顕微鏡の対物レンズを 40 倍から 100 倍 (油浸) に替えて撮影した画像をデジタル拡大して仔細に観察すると、 TiO_2 貪食マクロファージが肺胞壁に取り付いたまま器質化され、当該の肺胞壁の粗造化、毛細血管の新生と考えられる所見を認めた。また、 TiO_2 を曝露したマウスに、一匹ではあるが限局性の肉芽腫性病変に多数の TiO_2 が含まれていた。この病変も将来、膠原線維に埋没した状態で TiO_2 が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

肺の最も重要な機能は肺胞壁の「空気 血液関門」を通して行われる酸素と炭酸ガスの交換である。「空気 血液関門」は Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管内皮細胞及び基底膜で構成される。Ⅱ型肺胞上皮細胞の細胞質はきわめて薄く ($0.5 \mu\text{m}$) 引き伸ばされて肺胞毛細血管に密着し、基底膜を両者が共有することでガスの通過を容易にする構造となっている。

肺胞壁に TiO_2 貪食マクロファージが付着すると、肺胞壁でのガス交換が障害されるため、付着した TiO_2 貪食マクロファージが器質化されて、それを足場として Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管がセットで表層に新生される肺胞壁のリモデリングが生じると考え

られた。本研究班の吸入実験は $30\text{mg}/\text{m}^3$ の濃度で 1 日に 2 時間の曝露を週 1 回、5 週間にわたって繰り返したもので、1 週間に 2 時間の曝露を 1 回行う程度であれば、次週の曝露までの間に Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管によるリモデリングは完了して肺胞壁の塑造化と新生毛細血管が所見として認識される程度の極めて微弱な変化として現れたものと考えられた。それぞれの変化は微弱なものであっても、こうした変化が肺胞域全域に生じていると想定すると、かなりの量の TiO_2 が肺胞壁に沈着していると考えられる。

繊維状ナノマテリアルの MWNT-7 と MWCNT-N では、吸入曝露した繊維の物理学的性状が異なり、繊維の太さと長さ、凝集体の性状の違いによって異物処理に係る肺胞マクロファージの種類と処理方法が異なることが判明した。吸入曝露でエアロゾル化される Taquann 法で分散化処理を行った MWNT-7 には、単離した繊維と単離繊維が絡まった凝集体、製造時の焼成の際にできる凝固体が含まれる。

エアロゾル化された単離繊維には、50 nm 程度の細いものから $1\mu\text{m}$ を超える太いものまで様々な幅の繊維が含まれ、平均幅と標準偏差は $115 \pm 74 \text{ nm}$ (Taquahashi et.al., JST, 2013;38(4):619-28) で、凝集体は鉄よりも強靱とされている MWNT-7 の太い繊維と細い繊維が複雑に絡まった強靱な構造となっている。

一方、多層カーボンナノチューブのなかでも、グラフェンシートの巻数が少ない MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、SEM 画像では単離した繊維の幅はほぼ均一な様相を呈し、凝集体は細く均一な幅の単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造となっている。

本分担研究で形態学的に BALF 中の肺胞マクロファージを二種類に大別した。ひとつは Type A としたもので胞体が貪食によって肥大し、MG 染色で肥大した胞体が青紫を呈した。Type A マクロファージは MWNT-7 の単離繊維や強靱な凝集体を貪食するとともに、自身で貪食できない大きく強靱な凝集体の処理には、Type A マクロファージが集団で取り囲み、凝集体をクラスターの中心部に包み込む。こうしたクラス

ターを細気管支末梢に付加することでマクロファージが単独で処理することが困難な強靱な MWNT-7 の凝集体を線維化組織の中に埋没させて異物処理を行っていると考えられた。この際に細気管支側の間質から線維芽細胞など線維化に係る細胞が進出することで、線維の増生を促進すると考えられた。BALF 塗抹で MWNT-7 の強靱な凝集体を囲む肥大した Type A マクロファージには、胞体が著しく肥大した多核細胞やラングハンス型巨細胞に類似した核の配列をした多核巨細胞が認められた。これらの Type A マクロファージのクラスターが細気管支終末部に付加された後、線維の増生が進むと MWNT-7 のラット吸入曝露試験で報告されているラングハンス型巨細胞に類似した核配列を示す肉芽腫や線維化病変など MWNT-7 を曝露した肺に特徴的な病態に移行すると考えられた。MWNT-7 を曝露した肺で病理組織学的に異物肉芽腫などの病変がみられるのは細気管支から肺胞管に沿った領域である。この領域には経気道で径 5 μm よりも小さい外来異物の侵入が可能で、肺胞には 1 乃至 2 μm よりも小さい異物しか到達できないとされている。

Taquann 法による検体の分散化処理で平成 29 年度の吸入実験は目開き径 25 μm 金属メッシュを濾過に使用したが、平成 30 年度と令和元年度の吸入実験では目開き径を 53 μm のものを使用した。Taquann 法で分散化処理した検体は、先行研究で分散化処理の過程で使用する篩の目の径を超える大きさの凝集体はないことが確認されている(厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業、23-化学-一般-005)。このため平成 30 年度と令和元年度に曝露した検体のエアロゾルは径 53 μm までの凝集体が含まれていたと考えられ、そのうち 5 μm よりも小さいものが呼吸によってマウスの肺の肺胞管まで到達したものが Type A マクロファージによる貪食、クラスター形成による集団処理が行われたと考えられた。このことは、強靱な構造の凝集体が含まれる MWNT-7 の処理を目的と考えられる異物肉芽腫がこの領域に好発することと符合した。

細気管支末梢に接合できなかったクラスターは MWNT-7 の凝集体を包含したまま壊死に陥り、ムコ

シリアリーエスカレーションによって喀痰のように排泄されると推定された。

Type B とした小型のマクロファージは、May-Grünwald Giemsa 染色で胞体が淡桃色を呈し、胞体が青紫に染まる Type A マクロファージとは異なる染色性を示した。Type B とした小型のマクロファージは顕微鏡で視認できるサイズの繊維を明確に貪食している所見は認められず、Type B マクロファージの胞体の外側に分泌される基質のような不定形物質による繊維状ナノファイバーのトラップが推測された。

BULK の MWNT-7 は繊維幅が 100 nm よりも小さいものが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占め、線維長は 5 μm よりも短いものが 52.3% (T. Kasai, et.al.,2014) で、その大多数が光学顕微鏡では視認できないサイズの狭義のナノ繊維である。MWNT-7 と MWCNT-N とともに BALF 塗抹で Type B マクロファージの胞体の外側に分泌されている不定形物質に繊維幅が凡そ 100 nm 程度のナノ繊維がトラップされている様子が観察されたこともこの仮説と符合する。前述したように MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、SEM 画像では単離した繊維の幅はほぼ均一の様相を呈し、凝集体は細く均一な幅の単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造となっている。MWNT-N の吸入曝露実験では、吸入曝露チャンバー内で細く長い繊維が緩やかに絡まった綿菓子のような凝集体が形成されたと考察している(高橋)。本分担研究の BALF 塗抹で幅 30 μm よりも広い範囲に広がった MWNT-N の凝集体を 3 つのマクロファージがクラスターを作って集団でトラップしていると考えられる所見がみられた(分担研究:図-3-3,F)。この所見は異物処理の対象とする MWNT-N の凝集体の広がり Type B マクロファージより大きいため、Type B マクロファージ単独での異物処理は無理とマクロファージが判断して複数の Type B マクロファージによる協同作業が選択されたものと考えられた。また、30 μm よりも広い範囲に広がった網状の凝集体を Type A マクロファージが貪食して胞体の中に引きこむのも難しく、Type A マクロファージによる貪食ではなく、複数の Type B マクロファージによる協同作業が選択されたものと考えられた。以上のことを勘案すると、肺胞マクロファージに

よる繊維状ナノファイバーの異物処理では、処理の対象となるナノファイバーの物理学的性状(太さ、長さ、凝集体の性状)によって、異物処理にあたるマクロファージの種類と、それによる処理方法が異なると考えられた。

さらに大きな範囲に広がる MWNT-N の凝集体には、Type A と Type B のマクロファージが協働する混合クラスターを形成して異物処理にあたると考えられた(分担研究:図-3-3,J, K)。

これまで報告されている多くの情報は粗大な繊維を貪食するマクロファージ(本研究の Type A マクロファージ)の単独の働きに関するもので、複数のマクロファージによる集団処理には関心が向けられてこなかったが、本研究で得た知見では、粗大な繊維の異物処理は Type A マクロファージの集団処理が主体になっていると考えられ、繊維幅が 100nm よりも細かい繊維状ナノマテリアルは肺胞の末端まで肺内に広く吸引され、その処理には Type B マクロファージによる集団処理の関与が示唆された。繊維幅が 100 nm よりも細かいナノファイバーを光学顕微鏡で視認することは不可能であるが、MWNT-7 曝露群に拡張した肺胞管に面した肺胞域に限局性マクロファージの増生部が存在し、そこに煙状で淡灰色の不定形物質がオーバーラップするように沈着した所見が認められた(分担研究:図-4-2,P)。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であると考えられた(分担研究:図-5-3,E, F)ことから、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

今後は粒子径分布で大多数を占める細かい繊維状ナノマテリアルによる呼吸器毒性に注目する必要がある。macrophage extracellular traps (METs) のようなマクロファージの外来異物の処理機構についても検討してみる必要がある。

MWNT-7 曝露群では曝露後 8 週の気管支周囲の間質組織内に Masson trichrome 染色で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原線維の増加が示唆さ

れた。この部位に膠原線維が増加したメカニズムとして、気道内や肺胞域での肺胞マクロファージの挙動とは異なる可能性が考えられ、今後の解明が必要である。

本研究でモデルナノマテリアルとして選定した TiO₂、MWNT-7、MWCNT-N はいずれも肺胞マクロファージがクラスターを形成して肺から縦隔に移行、縦隔内に付着して器質化されるものがあることが示された。縦隔に移行した肺胞マクロファージのクラスターは BALF 塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと同様の形態を示したが、その最も幅が広いところで 30 μm 程度であった(分担研究:図-5-2,C)。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面も多く認められた。こうした獣毛の断面の径と肺胞マクロファージのクラスターの径はほぼ等しく(分担研究:図-5-2,C)、獣毛や肺胞マクロファージが肺から縦隔に移行する流路の存在が示唆された。今後、肺から縦隔に移行する流路の解明とこれまで意識されてこなかった縦隔機能の研究が必要と考える。

5. 分担研究における総合的な考察

BAL の FCMM 解析で、MWCNT-7 は、曝露後 0 週に BALF 細胞の生細胞、肺胞マクロファージ (CD11c⁺CD11b⁻, F4/80⁺, Cd11c⁺F4/80⁺) が減少し、4 週以降に漸増して 8 週には対照群のレベルまで回復することが示された。単球と単球の性格を有する肺胞マクロファージ (CD11b⁺F4/80⁺) は曝露後 1 週をピークとした増加が 8 週まで持続した。一方、MWCNT-N と TiO₂ には、これらの変化が示されなかった。研究報告の目的に記した「長繊維貫通型」においては、マクロファージは線維を分解できずに Frustrated phagocytosis を示しつつアポトーシスに至り繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。」とする仮説にもとづくと、これらの免疫担当細胞の変化は、MWCNT-7 を貪食した肺胞マクロファージが細胞死に陥るため、BALF 細胞での割合が減少し、その後に単球や単球の性格を有する肺胞マクロファージの増加によって曝露後 0 週に減少した肺胞マクロファージが補填されたとする理解

が一般的であるが、病理組織学的評価研究から MWNT-7 を吸入曝露した肺では MWNT-7 の単離繊維と強靭な構造の凝集体の処理を目的として、肺胞マクロファージがクラスターを形成し、そのクラスターが肺組織に付着して肉芽腫性病変が形成されることが示された。この知見から免疫制御システムへの影響評価で示された FCM 解析結果を検討すると、クラスターを形成して肺組織に付着した BALF の肺胞マクロファージは FCM では生細胞とは認識されないため、FCM 解析の結果は生細胞と肺胞マクロファージの減少として示されたと考えられた。

遺伝子発現解析で、炎症関連酵素と酸化ストレス関連マーカーに繊維状ナノマテリアルの MWNT-7 と MWCNT-N で共通した遺伝子発現が示された。炎症関連酵素の MMP12 mRNA の強い発現が MWNT-7 曝露群の BALF 細胞と肺組織の両方に認められ、MWCNT-N 曝露群にも弱い発現が BALF 細胞と肺組織の両方に認められた。酸化ストレス関連マーカーの iNOS と Cox2 mRNA の発現が MWNT-7 曝露群の BALF 細胞に、Cox2 mRNA の発現が MWCNT-N 曝露群の肺組織に認められた。これらの遺伝子は MWCNT-N 曝露群よりも MWNT-7 曝露群で強く発現していて、BALF 塗抹や病理組織の詳細な検索で、MWNT-7 の強靭な構造の凝集体の処理にあたる Type A マクロファージが細気管支や肺胞管の気腔内に形成した大きなクラスターが肺組織に付加され、それによって生じる肺の組織構造のリモデリングに関係した変化と考えられた。MWCNT-N についても MWNT-7 よりは弱い同種の組織変化が起きていると考えられた。

スカベンジャー関連遺伝子にも MWNT-7 曝露群と MWCNT-N 曝露群に共通した MARCO の発現が見られた。粒子状の TiO₂ 曝露群では、繊維状ナノマテリアルとは異なる CD204 と CD36 の mRNA の発現が示された。

BALF 塗抹の詳細観察で、MWNT-7 の強靭な構造の凝集体が含まれる検体を貪食した Type A マクロファージに認められた著しい胞体の肥大、May-Grünwald Giemsa 染色での胞体の強い好塩基の色調、多核巨細胞の出現などの所見は Frustrated

phagocytosis を反映した変化と考えられ、免疫機能評価で示された MMP12 mRNA の強発現も MWNT-7 を貪食した Type A マクロファージによる肺組織のリモデリングに関係した変化と推察された。BALF 中のサイトカインを Multiplex 解析した結果でも炎症関連 VEGF が MWNT-7 と MWCNT-N 曝露群に認められ、粒子状の TiO₂ 曝露群に VEGF の変化は検出されなかった。

以上、粒子状物質が曝露される TiO₂ と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが肺負荷量の解析、免疫システムの変動を解析、BALF 塗抹細胞形態学的解析及び病理組織学的の多面的な解析によって示されナノマテリアルの物理学的性状に基づく生体マクロファージの異物処理様式によるカテゴリー評価の可能性が強く示唆された。炎症関連サイトカインの発現 (IL-6、IL-12、IL-4) は、どの検体曝露群においても顕著な発現の上昇は示されなかった (有意差なし)。本研究の吸入曝露条件下では、各検体とも病理組織学的に検体を貪食したマクロファージによる微小な組織学的な変化を生じていたが、免疫学的に炎症関連の遺伝子変化も小さいものであった。

当初の研究計画では外来異物を貪食した生体マクロファージの胞体内で異物の蓄積状態によって「長繊維貫通型」、「毛玉状凝集型」及び「粒状凝集型」の3種類のモデルを想定した。すなわち、異物を貪食するマクロファージ単独の働きだけの単純なものであった。しかし、実際に肺内で繰り広げられる外来異物の処理は、当初想定したような単純なものではなく、マクロファージは肺内に侵入した外来異物の物理化学的性状(形状、長さ、幅、硬さ、量)に応じて最も効率的で肺に炎症等の付加をかけない異物処理方法を選択している様子の一端が本研究で見えて来た。

本研究で、異なる物理化学的特徴を持つ3種類のナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量曝露域での有害性のカテゴリー評価の

基盤となる情報を収集することができた。今後、毒性発現量での量・反応関係を考慮した情報収集が必要と考える。

なお、吸入曝露実験で曝露濃度を複数設定して量反応関係を押さえるには、エアロゾル化する検体の粒子径を呼吸によって肺深部に到達可能な大きさに揃え、各濃度群の粒子径も同じ粒径に揃える必要がある、本年度の MWCNT-N の吸入曝露実験では高濃度群と低濃度群の MMAD と の値が大きく異なる結果となった。絡まりやすい繊維状のナノマテリアルの吸入曝露実験結果で量 反応関係を求めるには、この点について留意する必要がある。

E. 結論

ナノマテリアルの吸入曝露実験を行って採取した肺のサンプルについて、肺負荷量の解析、免疫システムの変動を解析、BALF 塗抹細胞形態学的検索及び病理組織学的検索から、実際に肺内で繰り広げられる外来異物の処理は、当初想定したような単純なものではなく、マクロファージは肺内に侵入した外来異物の物理化学的性状(形状、長さ、幅、硬さ、量)に応じて異物処理方法を選択している様子が示された。3 種類のモデルナノマテリアルを肺に炎症を惹起しない低負荷量でマウスを用いた吸入曝露実験を行った結果、粒子状物質が曝露される TiO₂ と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なる結果を得た。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが示された。

以上、本研究では、3 種類の異なる物理化学的性状を示すナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起ささない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における研究での情報収集が必要と考える。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

○ Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno,

Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

○ Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Akihiko Hirose and Jun Kanno,

A long-term whole-body inhalation study of multi-walled carbon nanotube in mice with an improved dispersion and inhalation system, the 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, at the Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA, March 17, 2020, Abstract Number/Poster Board number: 2104/ P452, Poster (Cancelled due to COVID-19)

○ 新垣理恵子, 牛尾綾, 大塚邦紘, 工藤保誠, 石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ吸入曝露初期の肺胞マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月(東京)

○ Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonary immune cells at the early stage, 第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月(福岡)

○ 高橋祐次: 新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-、JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)

○ 相磯成敏、山野壮太郎、梅田ゆみ、近藤ひとみ、齋藤美佐江、高信健司、妹尾英樹、菅野純:異なる物理学的性状のナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺と縦隔における肺胞マクロファージの挙動. 第36回日本毒性病理学会学術集会、2020年2月14日(東京)

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