

. 分担研究報告

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)
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: 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 病理検査部長 |
| 研究協力者 | 梅田 ゆみ | 同 病理検査室長 |
| | 山野 荘太郎 | 同 病理検査室主任研究員 |

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、研究を分担した病理組織学的な側面から異物を貪食した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。本研究で実施した吸入曝露実験では、病理組織所見とBALF塗抹の白血球百分比の結果から肺に病理学的な急性炎症を惹起させない低負荷量域で曝露が行われたことが示された。低負荷量域のナノマテリアルの曝露で肺に及ぼす影響を収集できたことが示された。粒子状物質である TiO₂と、分散した単離繊維とその凝集体である 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明らかにした。以上、本研究によって、3種類のモデル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病理組織学的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ため、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。

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レセプター、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、マクロファー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 TiO_2 、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。 TiO_2 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。(表 1)。

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 週)、4 週及び 8 週後に解剖・採材を行って、気管支肺胞洗浄液(BALF)並びに肺と縦隔を採取して分担研究の目的である病理組織学的評価に供試した(図 1)。また、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。

平成 30 年度の吸入曝露実験は TiO₂と NWNT-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(図 1)。

本研究のベースとなるマウス吸入曝露実験は分担研究者である高橋(国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health science、以下 NIHS)が行い、解剖と採材には各分担研究者が協同参画し、サンプルをそれぞれの所属施設にて研究目的にあった解析を行った。3 種類のモデルナノ材料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、NIHS で Taquann 法による分散処理を行って吸入曝露実験に供試した。BALF 採取と塗抹標本の作製では日本バイオアッセイ研究センター・血液生化学検査室の斎藤美佐江室長と近藤ひとみ技術専門役が専門家として参画した。

B-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

B-1-(1) BALF の採取

免疫機能評価用に割り当てた各群 6 匹のマウスか

ら BALF を採取した。採取方法は、あらかじめ 0.8 ~ 1.0 ml の生理食塩水(大塚)を充填した 1ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ、TERUMO)をマウス 1 匹につき 2 本用意した。安楽死をさせたマウスの気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C、TERUMO)を留置、この留置針に生理食塩水(大塚)を充填したシリンジを繋ぎ、可動式の押子(プランジャ)を注意深く押し引きして洗浄液(BALF)を回収した。1 本目のシリンジを用いた BALF の採取を終えると、留置針に 2 本目のシリンジを繋ぎ替えて、同様の操作を繰り返して BALF を採取した。1 本目のシリンジと 2 本目のシリンジから回収した BALF を合わせて、一匹のマウスから計 1.2 ~ 1.8 ml/匹の BALF を得た(表 2)。

B-1-(1) BALF 塗抹標本の作製

採取した BALF から 300 µl を分取して、マウス 1 匹につき 2 枚の塗抹標本を作成した。具体的には、分取した BALF 300µl/匹をスライドガラス 2 枚に 150 µl/匹ずつを滴下し、Thermo Shandon Cytospin 3 (Marshall Scientific LLC、700 rpm 5 分)でスライドガラスに均一に塗抹、メタノール固定し、塗抹未染色標本を作製した。塗抹未染色標本を所属機関に持ち帰り、May-Grünwald Giemsa(MG)染色を行った。2 枚ずつ作製した BALF 塗抹標本のうち 1 枚を解析用とし、1 枚を予備とした。

B-2 病理組織標本の作製

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て肺の病理組織標本を作製した。

B-2-(1) 肺の還流固定標本の作製

病理組織学的評価に割り当てた各群 3 匹のマウスの左右の肺を 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)で灌流固定し、常法により病理組織標本を作製、解析に供試した(灌流固定は高橋の分担で実施)。

B-2-(1) 肺の浸漬固定標本の作製

BALFを採取した各群6匹のマウスの右肺を10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(ナカライテスク)で浸漬固定、常法により病理組織標本を作製、解析に供試した。

なお、BALFを採取後の左肺は免疫機能評価での遺伝子発現解析に供試した(分担:石丸)。

B-2-(3) 縦隔の病理組織標本の作製

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)を灌流固定した縦隔を用いて常法により病理組織標本を作製、解析に供試した(灌流固定は高橋の分担で実施)。

B-3 BALF塗抹の検索

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における吸入曝露した検体(T-TiO₂、T-CNT7、T-CNT-N)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) 白血球分画(白血球百分比)

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500以上の細胞を観察し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細胞当りに換算した。

B-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の推移

塗抹標本の肺胞マクロファージを検体(T-TiO₂、T-CNT7、T-CNT-N)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を調べた。具体的には、光学顕微鏡下で肺胞マクロファージ500個以上について高分散化処理を行った検体を貪食したものと非貪食のものを区別し、500個当たり貪食率として集計、曝露を終了した日(0W)から曝露

終了後8週までの貪食率の経時的推移を調べた(n=3)。

B-3-(3) BALF塗抹細胞の詳細検索

BALF塗抹細胞を下記の方法により光学顕微鏡で詳細に検索した。

BALF塗抹細胞を100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)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80x縦60mm、解像度600pixel/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。

B-4 病理学組織学的検索

B-4-(1) 肺の病理組織学的検査

令和元年度計画のMWCNT-Nの吸入曝露実験に加えて、平成30年度の研究計画の遅れにより十分な解析ができなかったTiO₂、MWNT-7を併せて、曝露後0、1、4、8週の肺について肺内における検体(T-TiO₂、T-CNT7、T-CNT-N)の沈着と組織反応の状態を詳細に検索した。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、100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)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80x縦60mm、解像度600pixel/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。

今年度の分担研究ではBALF塗抹標本で観察された像と、灌流固定標本およびBALF採取後の浸漬固定標本での組織像を突合させて、肺内に吸引されたモデルナノ材料に対するマクロファージの特徴的な生体反応について形態学的に調べた。

B-4-(2) 縦隔の病理組織学的検査

呼吸によってマウスの肺内に吸引された各モデル

ナノマテリアルが縦隔の組織中に移行するかを病理組織学的に調べた。縦隔部を全長に渡り3mm幅で切り出し、病理組織標本を作製して、肺内に吸入されたナノマテリアル若しくはナノマテリアル貪食マクロファージの肺から縦隔部への移行を病理組織学的に調べた。観察に際しては、肺の病理組織検査と同様、通常の病理組織学的検査に加えて、100倍の対物レンズ(UPlanApo, 100x, Oiliris, 開口数 1.35、分解能 0.25 μ m, OLYMPUS)を使用した詳細観察を実施した。

B-5 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

病理組織学的検査で縦隔にナノマテリアルの沈着を疑う所見を認めた際に、当該病理組織標本のカバーガラスを外した組織切片に白金蒸着を施し走査型電子顕微鏡(日立 SU8000)で2000倍まで拡大した観察を行った。

(倫理面への配慮)

本分担研究における動物実験を実施するにあたり、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 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の

作製

C-1-(1) BALFの採取

免疫機能評価(分担 石丸)に割り当てた各群6匹のマウスからBALFを1.2~1.8ml/匹を採取した。BALF回収率は75.4%~90.5%、平均回収率84.0%であった(表2)。

C-1-(2) BALF塗抹標本の作製

塗抹標本を各個体につき2枚ずつ作製し、1枚を解析用、1枚を予備とした。

C-2 病理組織標本の作製

以下の標本を作製した。

C-2-(1) 肺の還流固定標本

C-2-(2) 肺の浸漬固定標本

C-2-(3) 縦隔の病理組織標本

C-3 BALF塗抹の検索

C-3-(1) 白血球分画(白血球百分比)

TiO₂(T-TiO₂)曝露群

解剖期0、1、4週に採取した各群のBALF塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はごく僅かであった(表3)。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

解剖期0、1、4週に採取した各群のBALF塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加は曝露終了後1週で4.0%であり、変化としては弱いものであった(表3)。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

解剖期0、1、4週に採取した各群のBALF塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はごく僅かであった(表3)。

C-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の経時的推移

TiO₂ (T-TiO₂) 曝露群

吸入曝露を終了した 0 週から 100% のマクロファージが TiO₂ を貪食し、4 週から非貪食マクロファージが少数出現した (図 2 左)。

MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群

吸入曝露を終了した 0 週で約 80% のマクロファージが MWNT-7 を貪食、以後漸減し曝露終了後 8 週での貪食率は約 20% であった。一方、吸入曝露を終了した 0 週から非貪食のものも約 20% 程度存在し、その後、漸増した (図 2 中)。

MWCNT-N (T-CNT-N) 曝露群

吸入曝露を終了した 0 週での貪食率が約 20%、8 週間には全て非貪食となった (図 2 右)。

なお、MWCNT-N 曝露実験の高濃度群は MWNT-7 と同じ濃度の曝露を計画していたが、実際の吸入曝露実験では、曝露濃度、肺負荷量ともに MWNT-7 の約 1/2 であった (高橋、大西の分担報告を参照)。

C-4 BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析

TiO₂ (T-TiO₂) 曝露群

TiO₂ 貪食マクロファージと非貪食マクロファージ

TiO₂ を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に径 1~2 μm 程度の異物粒子の他に大凡 0.1 μm 程度のナノサイズのものも数多く存在する様子が認められた。これらの粒子はマクロファージが貪食した TiO₂ と考えられ、製造メーカ公表による一次粒径が 30nm であることから、マクロファージの胞体内の粒子は一次粒子が粒状凝集した二次粒子に相当するものと考えられた (図 3-1 A)。一方、肺胞マクロファージには TiO₂ の貪食を示さないものも認めた。TiO₂ の貪食を示さない肺胞マクロファージは、核/細胞質比が大きく、胞体の輪郭が不明瞭、胞体は好塩基性色素のアズール B への染色性が弱く、淡桃色~淡い紫色を呈し、TiO₂ を貪食した肺胞マクロファージと接合したのも認められた (図 3-1 B)。TiO₂ の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、その形態学的特徴を表に示した (表 4)。

Type A マクロファージの相互接触/接合

BALF 塗抹には Type A マクロファージが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た。クラスターを形成する Type A マクロファージは、いずれも胞体の好塩基性の色調が強く、マクロファージが向かい合う辺縁部には相互に呼応するように好塩基性の線状斑が現れるなど、クラスターを構成する Type A マクロファージが同期して異物処理を行うことが示唆された (図 3-1 C、D)。

Type A マクロファージの変性

TiO₂ を貪食した Type A 肺胞マクロファージに、胞体の膨化と淡明化が認められた。それらの中には胞体の中に水腫状様の小胞が現れる (図 3-1 E、F)、胞体の輪郭の張りを失って不整な凹凸を示すもの (図 3-1 G)、など変性所見が認められた。貪食した TiO₂ 粒子が胞体内に充満して肥大したケースでは、胞体の淡明化と核の染色性低下、細胞質と核の輪郭が不整になるなど細胞死の状態か、もしくはそれに近い状態にあると考えられた (図 3-1 G)。これらの所見から、クラスターを形成したものは、クラスター全体で変性に陥ることが示された。

Type A 肺胞マクロファージの形態変化

単独で存在する TiO₂ を貪食した Type A マクロファージに、核クロマチンの核内分布の変化、核内に水腫様小胞の出現、極度に偏在した核クロマチンの核外への伸び出し、さらには細胞外への伸び出しなど核を中心とした Type A マクロファージの形態変化が認められた (図 3-1 H、I、J、k、M、N)。また、核膜を失った核が断片化したものもみられた (図 3-1 O)。

Type A マクロファージが他のマクロファージに付着

TiO₂ 曝露実験では、MWNT-7 や MWCNT-N の曝露実験よりも Type B マクロファージの出現が少ない

が、TiO₂を貪食した Type A マクロファージの中には Type B マクロファージが接合するものがみられた(図 3-1 K, L)。

TiO₂を貪食した Type A マクロファージの中には胞体から伸び出し突起で他のマクロファージ(形態が変化した Type A マクロファージと推定)への付着がみられた(図 3-1 P)。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

単独で存在する T-CNT7 貪食マクロファージ(Type A)

MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた(図 3-2 A、B)。MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージを TiO₂の場合と同様に、Type A マクロファージと称した。Type A マクロファージには細胞突起を伸ばしたのも認められた(図 3-2 B)。

Type A マクロファージのクラスター形成

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認められ、TiO₂で認められたものよりも胞体の大型化と濃青紫に染色される好塩基性が顕著で、クラスターの中心部のマクロファージには二核以上の多核細胞も認められた(図 3-2 C、D、E)。クラスターの外周部に位置するマクロファージからクラスターの内部に位置する大型で多核のマクロファージの胞体内に細胞突起を伸ばして強固に接合した所見も認められた(図 3-2 C、D)。相互に接触/接合した Type A マクロファージは、いずれも類似した形態、染色性を示し、向かい合うマクロファージの辺縁部に好塩基性の線状斑が現れる(図 3-2、C)など、Type A マクロファージ相互の同期が示唆された。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(図 3-2 E)も認められた。塗抹標本で観察されたマクロファージのクラスターは、構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

Type A マクロファージのクラスターの融合

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 μm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(図 3-2、F)。このクラスターには Type B マクロファージも少数集まり、核から胞体の外に淡赤紫の不定形物質が長く尾を引く Type B マクロファージが認められた。構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

病理組織所見でも、幾つかの小規模なマクロファージの集簇塊が肺胞管内で集合・癒合した島状のマクロファージの集簇塊が肺胞管を塞ぐ所見が認められており、その対応した BALF 塗抹所見と考えられた。(図 3-2、F 右上挿図)。

Type B マクロファージによる細かい MWNT-7 のトラップ

径16 μmの MWNT-7 凝集塊を中心部に据えた Type B マクロファージのクラスターで、胞体の外に流れ出たように見える淡桃色の不定形物質の中に繊維径約200nmの細かい MWNT-7 が認められ、淡桃色の不定形物質による異物のトラップが示唆された(図 3-2 G)。

Type A と Type B マクロファージが混在したクラスター

MWNT-7 曝露群で認められた肺胞マクロファージクラスターは、MWNT-7の凝集塊を中心部に据え、肺胞マクロファージがロゼット状に配列した円形のもの(図 3-2 H)と肺胞マクロファージが鎖状に連なったもの(図 3-2 I)が認められた。両タイプとも Type A と Type B が混在していたが、Type A がブレドミナントで、Type B はマイナーであった。また、両タイプとも塗抹標本の観察で構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

MWCNT-N 貪食肺胞マクロファージ (Type A)

MWCNT-N を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた(図 3-3 A、B、C)。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 は細く長い状態で存在し、毛玉状に凝集していないことが示された。

Type A 肺胞マクロファージのクラスター形成

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、クラスターの中心部のマクロファージには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(図 3-3、D、E)。

Type B マクロファージによる細かい MWCNT-N のトラップ

ひとつのマクロファージの胞体よりも広い範囲で緩やかに絡まった MWCNT-N (凝集体) には、Type B マクロファージが小さなクラスターを形成してより広い面積で検体をトラップすることを示唆する所見がみられた(図 3-3 F、G)。Type B マクロファージの核から胞体外にイソギンチャクの触手のような好塩基性の紐状構造物がたなびき、淡桃色の不定形物質に繊維径約 200 nm の細い MWCNT-N をトラップしていると考えられた所見が認められた(図 3-3 H)。

このタイプのマクファージは図 3-3 I に示したマクファージがアクティブになったものと考えられた。

Type A と Type B マクロファージが混在したクラスターによる MWCNT-N の広域トラップ

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も認められた(図 3-3 J、K)。

MWCNT-N ではこうした二つのタイプのマクファージが混在したクラスターが多く、大きなものでは短径が 60 μm 、長径が 80 μm を超えるサイズものもみられた(図 3-3 J、K)。集簇したマクファージの核は、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(図 3-3 J、K)。

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輪状に取り囲むクラスタは認められなかった。

C-3 病理学的解析

C-3-1 肺の病理組織学的検査

C-3-1-1 TiO_2 (T- TiO_2) 曝露群 炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も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。

肺内の TiO_2 貪食肺胞マクロファージ

灌流固定をした曝露後 0 週の肺には TiO_2 を貪食したマクロファージが散見され(図 4-1 A 左)、それを対物 100 倍で観察するとマクロファージの胞体内と肺組織の上に TiO_2 粒子を認めた(図 4-1 A 右)。

灌流固定をした曝露後 8 週の肺には TiO_2 貪食マクロファージの残留はほとんど認められず(図 5-1 B 左)、拡大を上げて対物 100 倍で観察しても TiO_2 貪食したマクロファージと TiO_2 粒子を僅かに肺組織に認めただけであった(図 4-1 B 右)。

肺負荷量の測定結果(分担:大西)によると肺 1g 当たりに含まれる検体の量(質量)は MWNT-7 よりも TiO_2 の方が多く、曝露後 8 週の TiO_2 値は MWNT-7 の 3 倍であることが示された(図 4-1 C)。

TiO_2 貪食マクロファージ (Type A) の肺胞域への固着

BALF 採取後に浸漬固定した曝露後 8 週の肺の標本で T- TiO_2 が肺内に固着されている状況を精査した。対物 100 倍で観察すると肺胞壁に胞体の輪郭や核が不鮮明な TiO_2 貪食マクロファージが肺胞壁と癒合する様子が認められた((図 5-1 C 上)。この画像をデジタル拡大して詳細に観察すると、肺胞マクロファージが細胞突起を長く伸長させて、相互に接合した網の目に TiO_2 貪食マクロファージがトラップされるよ

うに癒合している状況が示された(図 4-1 D)。

肺内に残留した TiO₂

粗造化した肺胞壁の表層に TiO₂ 貪食マクロファージが径 0.7μm の細胞突起を伸ばして付着する(図 4-1 E)など、肺胞マクロファージの積み重なりや毛細血管の増加によって、肺胞壁表面構造が限局性に複雑となり粗造化する所見が認められた(図 4-1 E、F)。

TiO₂ 貪食マクロファージによる肉芽腫性病変

TiO₂ を曝露群の一匹に、限局性の肉芽腫性病変を認め、粒子径は 100nm 程度のもので認識できた。この多数の TiO₂ を包含した病変部は、将来、TiO₂ を埋め込んで器質化されると考えられた(図 4-1 G)。

TiO₂ 貪食マクロファージの細気管支上皮への接合

灌流固定 8W の細気管支上皮に細気管支内腔の TiO₂ 貪食マクロファージが径 0.6μm の突起を伸ばして接合している所見が認められた(図 4-1 H)。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も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。

細気管支から肺胞管に至る気腔内で肺胞マクロファージによる島状集簇の形成

灌流固定をした肺には曝露後 0 週から 8 週までのいずれの解剖期においても細気管支から肺胞管にかけて気腔内に MWNT-7 を貪食したマクロファージの島状集簇塊を比較的頻繁に認めた。マクロファージの島状集簇塊は大きなものは長径で 100 μm を超えるものも存在したが、多くは 30 ~ 60 μm であった(図 4-2 A、B、C、D、E、F、G、H)。

細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

図 4-2 I と J の左の写真は病理組織学的検査で

常用される倍率で観察したもので、MWNT-7 貪食した肺胞マクロファージが細気管支内腔を上皮に沿って遡上している所見として認識されるものであった。これを対物 100 倍(油浸)のレンズを用いて撮影した TIF 画像を縦横 4 倍に拡大すると(図 4-2 I と J の右の写真)、複数の肺胞マクロファージの集団による異物処理が行われ、マクロファージは変性、壊死に陥っている様子が示された。

細気管支内で MWNT-7 を貪食した大型のマクロファージと小型のマクロファージが鎖状に連なった所見が認められた。これと同様の所見が BALF 塗抹においても大型の Type A と小型の Type B マクロファージの連鎖が認められた(図 4-2 K 挿図)。

肺胞マクロファージの増生による終末部細気管支内腔の架橋

肺の細気管支内腔で細気管支上皮の表層に集簇もしくは増生していると考えられるマクロファージが繋がって終末細気管の内腔を細線維で架橋する所見を認めた(図 4-2L)。さらに太い帯状に集簇して細気管支上皮間を架橋した部位においても、架橋部の表層に細長く伸びた複数のマクロファージが繋がってできたと考えられる細線維に細かな MWNT-7 が多数付着した所見を認めた(図 4-2M)。帯状に集簇もしくは増生したと考えられるマクロファージは PU.1 と CD11c の二重免疫染色によって骨髄由来の肺胞マクロファージであることが示された。

細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

MWNT-7 を吸入曝露した肺の細気管支終末部に肉芽腫性病変の初期像と考えられる変化が認められた。

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に径 40μm の集簇塊が認められた(図 4-2 N 左)。この集簇塊は主として MWNT-7 を貪食したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)と小型で N/C 比が大きいマクロファージ(同、Type B マクロファージに相当)からなり、MWNT-7 貪食マクロファージの胞体から伸長した径約 1μm の細胞突起で既存の細気管支や肺胞と 3 箇所接合する所見が

認められた(図 4-2 N 右)。

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に長径 84 μ m、短径 60 μ m で内部に MWNT-7 の凝集塊を包含したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)を中心として、複数のマクロファージが比較的ゆるやかに相互に接合した病巣を認めた(図 4-2 O)。この集簇巣にも約 1 μ m の細胞突起で既存の細気管支上皮に接合している所見が認められた(図 4-2 O)。

肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質(T-CNT7)の沈着

気道や肺胞内に存在するマクロファージを洗い流した浸漬固定標本肺の組織を観察すると、曝露後 8 週の浸漬固定標本に、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、その肥厚部から幅が約 3 μ m の突起が肺胞管の内周に沿って延伸、肺胞管の内周に線維性のフレームを構築したと思われる所見を認めた。当該部には好中球の浸潤などの急性炎症を示す病理組織所見はなかった(図 4-2 P)。この肺胞壁の肥厚部には煙状で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が認められた。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の肺や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ことが示され、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。

細気管支周囲間質での膠原繊維の増加

本実験の吸入曝露は間歇曝露方式で実施、肺には好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見は認められないものの、曝露後 8 週に気道周囲の間質組織に Masson trichrome stain で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原繊維の軽度な増加が示唆された(図 4-2 Q)。仔細に観察すると、細気管支周囲の間質内に MWNT-7 貪食マクロファージが鎖状に連なった

状態で線維性構造物に付着している所見が認められた(図 4-2 R)。後述の縦隔への肺胞マクロファージのクラスターや獣毛の移行と併せて、同部位に生じた膠原繊維の増加との関係が示唆された。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も好中球浸潤を伴う急性炎症の所見を認めなかった。

MWCNT-N 沈着病変の肺内分布

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 4 倍～40 倍の対物レンズを用いた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、MWCNT-N と比べて集簇巣の数と病変部を探す際の目印となる MWNT-7 の量が少ないことから、顕微鏡で認識するのは困難であった。

細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺胞管に MWCNT-N を囲んだ肺胞マクロファージの集簇巣(図 5-3 A、B、C)を認め、小型の集簇巣(図 4-3B、C)の内部に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、MWCNT-N を包含し、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(図 4-3B、C)。

仔細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察した。クラスター外周の途切れている部分をマクロファージから伸び出したと考えられる径 2 μ m の細線維が繋ぐ所見が認められた(図 4-3C)。

不定形混濁沈着物のなかで比較的大きなものでは断面が底辺 13 μm 、高さ 6 μm の三角形を呈する T-CNTN の凝集塊 (図 4-3D)、小さなものでは断面が底辺 8 μm 、高 3 μm の三角形を呈する凝集塊 (図 5-3E) がマクロファージの外縁に接してみられた。細気管支上皮表面に接して存在する 2 つのマクロファージの一方が胞体を延ばして他方に接合、その腹面に不定形混濁物質が認められ、MWCNT-N を包含していた (図 4-3F)。また、MWNT-7 のケースと同様、マクロファージ集簇部の表層に多くの MWCNT-N が沈着した所見も認められた (図 4-3G)。

C-3-2 縦隔の病理組織学的検査

TiO₂ (T-TiO₂) 曝露群

炎症性変化

TiO₂ を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

100 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、極めて稀に TiO₂ 貪食マクロファージが縦隔や心嚢膜を構成する細い線維 (膠原線維、細網線維) に付着している所見を認めた (図 5-1 A、B)。細い線維に付着した TiO₂ 貪食マクロファージは、胞体の染色性の低下と核や胞体内部の構造が不明瞭となった所見が認められた (図 5-1 A、B)。縦隔内に複数の大型の貪食マクロファージからなるクラスターは認められなかった。

MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群

炎症性変化

MWNT-7 を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

縦隔の疎性結合織に移行した MWNT-7 貪食マクロファージ

100 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、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た状態 (図 5-2 C、D) で縦隔の疎性結合

織に付着した所見を認めたが、縦隔に移行した所見は極めて稀であった。

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に類似した形態を示したが、クラスターの最も幅が広いところで 30 μm 程度であった。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が比較的多く認められ、図 5-4 C (右上) に示した獣毛の断面の径は 20 μm であった。

縦隔部のリンパ節に移行した MWNT-7 貪食マクロファージ

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 (図 5-2 E)、曝露後 8 週ではその数が増加している様子が示された (図 5-2 F)。

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 (T-CNT-N) 曝露群

炎症性変化

MWCNT-N を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

縦隔の疎性結合織に認められた MWCNT-N

100 倍の対物レンズを用いて撮影した画像をデジタル拡大した詳細観察で、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 と推定した (図 5-3 E)。

C-4 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

病理組織学的検査で縦隔に MWCNT-N と推定される物質が認められた HE 染色標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が認められた (図 6-3 F)。固形物が縦隔の組織と癒合していることから病理組織学的変化で認められた所見は器質

化が進んでいると考えられた。

D. 考察

肺の組織構造とナノマテリアル並びにマロファージの位置関係を保存する灌流固定病理組織標本(perfusion fixation 標本、PF 標本)、気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar Lavage Fluid、BALF)の塗抹標本(BALF 塗抹標本)、BALF採取後の肺の浸漬固定病理組織標本を用いた解析をおこなった。

D-1 粒子状ナノマテリアル

粒子状のモデルとして選定した TiO₂ が肺胞マロファージに貪食されて、以下のように肺胞壁に沈着する様子を捕らえることができた。

TiO₂ の肺内残留様式

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 TiO₂ を貪食したマロファージや TiO₂ 粒子はほとんど認められず、炎症等の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 TiO₂ の大部分が肺胞マ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 TiO₂ 貪食マ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 TiO₂ 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 8 週における肺 1g 当たり TiO₂ 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、TiO₂ 貪食マロファージは変性によって膨化・透明化した胞体内に TiO₂ 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 TiO₂ 貪食マ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。

肺胞域での病理組織学的変化

肺内に残存した TiO₂ 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、TiO₂ 貪食マ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、TiO₂ 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 TiO₂ が含まれていた。この病変も将来、膠原繊維に埋没した状態で TiO₂ が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

TiO₂ を曝露したマウス肺における病態形成メカニズム

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 Ⅰ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。Ⅰ型肺胞上皮細胞の細胞質はきわめて薄く(0.5μm)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 TiO₂ 貪食マロファージが付着すると、肺胞壁でのガス交換が阻害されるため、付着した TiO₂ 貪食マロファージが器質化されて、それを足場としてⅠ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起こると考えられた。

本研究班の吸入実験は 30mg/m³ 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Ⅰ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。

D-2 繊維状ナノマテリアル

繊維状のモデルナノマテリアルとして選定した MWNT-7 と MWCNT-N の物理学的性状には下記のような違いがあり、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ロファージの種類と処理方法が異なることが判明した。

MWNT-7 は鉄よりも強靱とされていて、太い繊維と細い繊維、それらが複雑にからまった強靱な構造の

凝集体が混在する。

MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、一本一本の繊維の幅はほぼ均一で、単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造の凝集体が混在する。

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、May-Grünwald Giemsa 染色 (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 に含まれる単離繊維の粗大な束や細かな単離繊維を貪食するとともに、自身で貪食できない粗大な単離繊維の束を集団で取り囲むことでクラスター内に包み込み、クラスターごと細気管支末梢に接合・付加させると考えられた。これによってマクロファージは、単独での処理が困難な粗大の繊維性ナノマテリアルの束を一括して線維化組織に埋没させる異物処理を行い、その際に細気管支周囲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、線維化を促進すると考えられた。粗大で強固な凝集体を処理するケースではクラスターの中心部の MWNT-7 の凝集体を囲むように肥大した Type A マクロファージが配列し、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の配列が認められる等、MWNT-7 を曝露した肺に特徴的な所見として知られる肉芽腫形成の要因になると考えられる所見が認められた。細気管支末梢に接合できなかったクラスターは粗大の繊維性ナノマテリアルの束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気管外に排泄されると推定された。

もうひとつは Type B とした小型のマクロファージで、Type B は MG 染色で胞体が淡桃色を呈した。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状ナノマテリアル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トラップが推測された。BALF 塗抹の詳細な観察で、Type B マクロファージ周囲の不定形分泌物に繊維状ナノマテリアルがトラップされ、Type B と Type A マクロ

ファージの混合クラスターでは広域に繊維状ナノマテリアルをトラップする様子が示された。繊維幅が 100 nm よりも細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、MWCNT-N 曝露群では細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺胞管に認められた小型集簇巢の内部に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。詳細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察された。これと同様のインク染みのような広がりが MWNT-7 曝露群の肺胞に認められた。MWNT-7 のケースでは、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、そこに煙のような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。この煙状の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ことが示され、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。このように繊維幅が 100 nm よりも細いナノファイバーは Type B マクロファージによってトラップされて肺胞域に付着することが示唆されたが、光学顕微鏡でその実態を認識できなかったため、これまで毒性学的に注目されてこなかったと考えられた。

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。MWNT-7 の場合、BULK の MWNT-7 は繊維径が 100nm 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. Ksai, 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であることから、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。

線維化病変の形成

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。

肺から縦隔への移行について

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。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、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。

E. 結論

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。その結果、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示唆された。本研究で、3種類のモデル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、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。さらなる研究を実施することにより、ナノマテリアルの安全性評価で、カテゴリー評価によるスクリーニングが可能となると期待される。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

加納浩和、笠井辰也、齋藤新、平井繁行、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、竹内哲也、三角恭兵、福島昭治、菅野純:メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性、第92回日本産業衛生学会、2019年5月(名古屋)

○ 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

表1 吸入曝露実験に供試した検体の物理化学的性状

| TiO ₂ (T-TiO ₂) | | MWNT-7 (T-CNT7) | |
|--|------------------------------|-----------------|-----------------------|
| 結晶形 | アナターゼ | 繊維径 | 7 - 170 nm |
| TiO ₂ 含量 | 98 % | 繊維長 | 1 - 19 μm |
| 一次粒径 | 30 nm | 分散処理検体の形状 | 太さがの強靱な単離繊維と強靱な凝集体が混在 |
| pH | 弱酸性 | マクロファージの胞体内での蓄積 | 長繊維がマクロファージの胞体を通 |
| 比表面積 | 52 cm ² /g | | |
| MWCNT-N (T-CNTN) | | | |
| 原末の形状 | 黒色フレーク状、不織布状 (SEM) | | |
| 分散処理検体の形状 | 柔らかく柔軟な単離繊維、単離繊維が緩やかに絡まった凝集体 | | |
| マクロファージの胞体内での蓄積 | 毛玉状凝集 (予想) | | |

表2 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取量

| 群名称 (曝露濃度) | | 対照群 (0mg/m ³) | | TiO ₂ (30mg/m ³) | | MWNT-7 (3mg/m ³) | | 群名称 (曝露濃度) | | 対照群 (0mg/m ³) | | MWCNT-N (0.6mg/m ³) | | MWCNT-N (1.3mg/m ³) | |
|---------------|---------|------------------------------|-------|--|------|---------------------------------|------|---------------|---------|------------------------------|------|------------------------------------|------|------------------------------------|------|
| | | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD | | | 平均 | SD | 平均 | SD | 平均 | SD |
| OW | 注入量(ml) | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - | OW | 注入量(ml) | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - |
| | 回収量(ml) | 1.6 | 0.06 | 1.6 | 0.02 | 1.7 | 0.09 | | 回収量(ml) | 1.6 | 0.08 | 1.6 | 0.07 | 1.6 | 0.04 |
| | 回収率(%) | 78.7 | 3.21 | 80.0 | 0.87 | 87.3 | 4.73 | | 回収率(%) | 82.2 | 4.16 | 81.7 | 3.62 | 82.2 | 2.02 |
| 1W | 注入量(ml) | 1.6 | - | 1.6 | - | 1.6 | - | 1W | 注入量(ml) | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - |
| | 回収量(ml) | 1.3 | 0.09 | 1.4 | 0.03 | 1.3 | 0.06 | | 回収量(ml) | 1.7 | 0.10 | 1.8 | 0.04 | 1.7 | 0.11 |
| | 回収率(%) | 82.3 | 5.32 | 85.8 | 1.57 | 83.5 | 3.77 | | 回収率(%) | 84.5 | 4.77 | 89.2 | 1.89 | 83.3 | 5.30 |
| 4W | 注入量(ml) | 1.6 | - | 1.6 | - | 1.6 | - | 4W | 注入量(ml) | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - |
| | 回収量(ml) | 1.3 | 0.13 | 1.3 | 0.03 | 1.3 | 0.07 | | 回収量(ml) | 1.7 | 0.06 | 1.7 | 0.01 | 1.6 | 0.04 |
| | 回収率(%) | 80.0 | 8.20 | 83.5 | 2.01 | 81.5 | 4.07 | | 回収率(%) | 85.8 | 2.89 | 82.6 | 0.58 | 81.8 | 1.89 |
| 8W | 注入量(ml) | 1.6 | - | 1.6 | - | 1.6 | - | 8W | 注入量(ml) | 2.0 | - | 2.0 | - | 2.0 | - |
| | 回収量(ml) | 1.2 | 0.25 | 1.4 | 0.06 | 1.4 | 0.05 | | 回収量(ml) | 1.8 | 0.01 | 1.7 | 0.05 | 1.8 | 0.04 |
| | 回収率(%) | 75.4 | 15.52 | 85.2 | 3.77 | 87.1 | 2.89 | | 回収率(%) | 88.3 | 0.58 | 84.8 | 2.25 | 87.5 | 1.80 |

表3 BALFの白血球分画

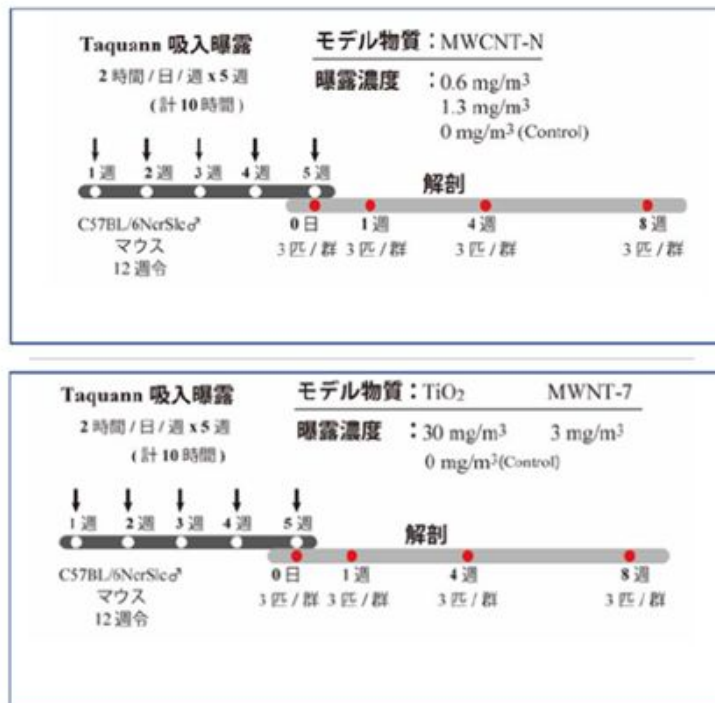
| 群名称 (曝露濃度) | 曝露後 週数 | n | 白血球分画 (百分比) | | | | | |
|--|-----------|---|-------------|-----|------|-----|-----|-------|
| | | | AM | Seg | Mono | Eo | Lym | Total |
| Control (0mg/m ³) | OW | 3 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 1W | 3 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 4W | 3 | 99.8 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 8W | 3 | 100.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| TiO ₂ (34.8mg/m ³) | OW | 3 | 99.8 | 0.0 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 1W | 3 | 99.9 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 4W | 3 | 99.7 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 8W | 3 | 99.8 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| MWNT-7 (3.0mg/m ³) | OW | 3 | 99.2 | 0.3 | 0.4 | 0.0 | 0.1 | 100.0 |
| | 1W | 3 | 95.8 | 4.0 | 0.2 | 0.1 | 0.0 | 100.0 |
| | 4W | 3 | 98.0 | 1.1 | 0.8 | 0.2 | 0.1 | 100.0 |
| | 8W | 3 | 99.3 | 0.8 | 0.1 | 0.1 | 0.0 | 100.0 |
| MWCNT-N (1.3mg/m ³) | OW | 3 | 99.6 | 0.3 | 0.1 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 1W | 3 | 98.9 | 0.3 | 0.7 | 0.0 | 0.1 | 100.0 |
| | 4W | 3 | 99.5 | 0.1 | 0.3 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 8W | 3 | 99.7 | 0.4 | 0.8 | 0.0 | 0.1 | 100.0 |
| MWCNT-N (0.6mg/m ³) | OW | 3 | 99.6 | 0.1 | 0.3 | 0.0 | 0.1 | 100.0 |
| | 1W | 3 | 99.8 | 0.2 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 100.0 |
| | 4W | 3 | 99.2 | 0.3 | 0.4 | 0.0 | 0.1 | 100.0 |
| | 8W | 3 | 99.4 | 0.3 | 0.2 | 0.0 | 0.0 | 99.9 |

AM: Alveolar macrophage; Seg: Segmental neutrophil; Mono: monocyte; Eo: eosinophil; Lym: lymphocyte

表4 Type A と Type B マクロファージの形態学的特徴

| | 大きさ | 核/細胞質比 | 胞体の染色性 | 貪食* |
|--------|-----|--------|----------|-----|
| Type A | 大 | 小 | 青紫色～濃青紫色 | 有り |
| Type B | 小 | 大 | 淡桃色～淡紫色 | 無し |

*: 光学顕微鏡レベルでの観察



病理組織学的検査

- ・肺と縦隔の灌流固定組織: 3匹
 (4% Paraformaldehyde Phosphate Buffer Solution)
- ・気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取後の右肺の浸漬固定組織: 6匹
 (10% Formaldehyde Phosphate Buffer Solution)
- ・Masson trichrome 染色、Vimentin免疫染色

BALF塗抹標本でのMφの形態観察

- ・塗抹: 3匹 (May-Grunwald Giemsa 染色)
- 病理組織標本とBALF塗抹標本の観察では、100倍の対物レンズ(oil)を使用、撮影画像をphotoshopで拡大(最大で2500倍相当)、露出を変化させた観察を実施。

図1 実験デザイン

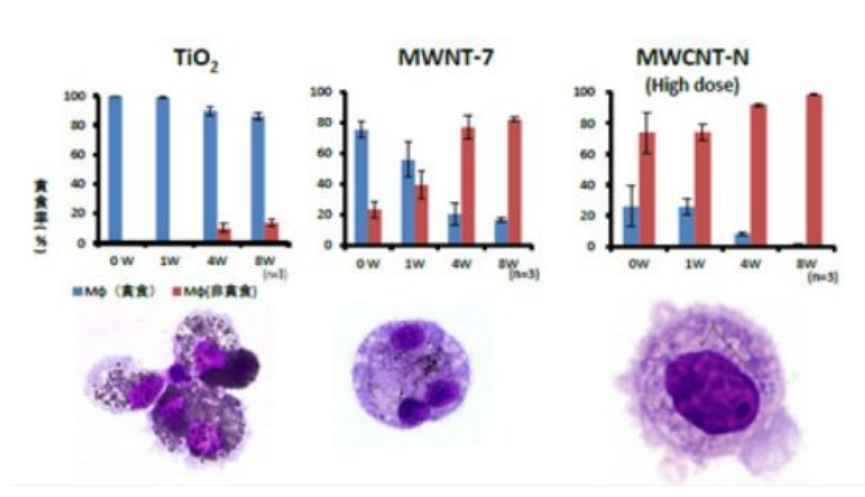


図2 マクロファージの経時的変化

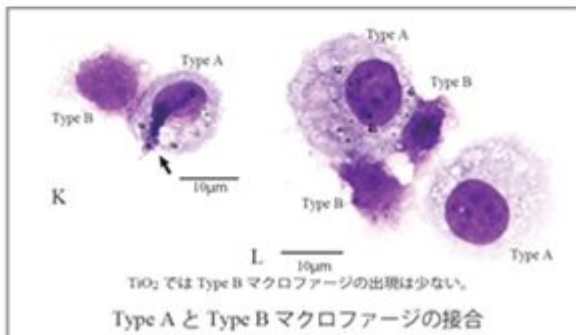
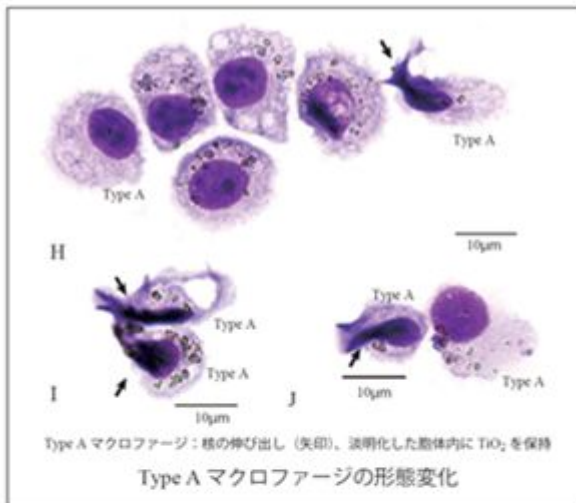


図 3-1 BALF 塗抹：TiO₂
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

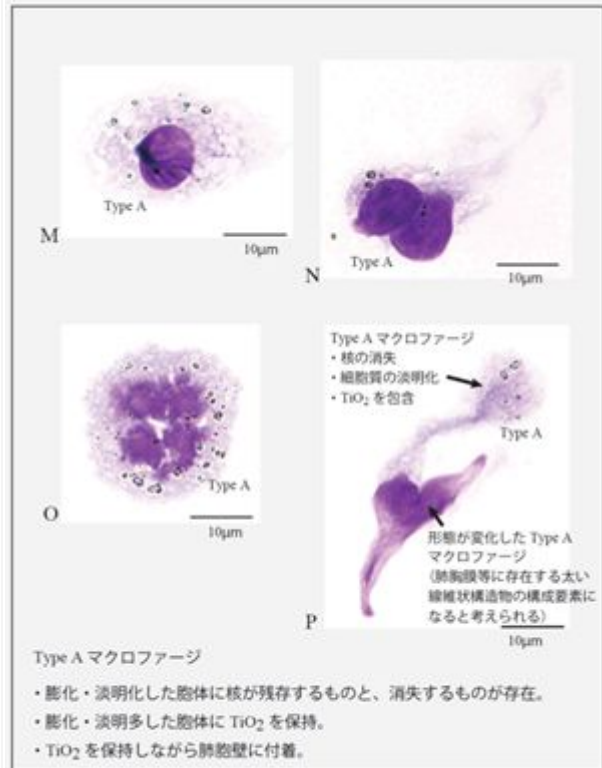


図 3-1 BALF 塗抹：TiO₂
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

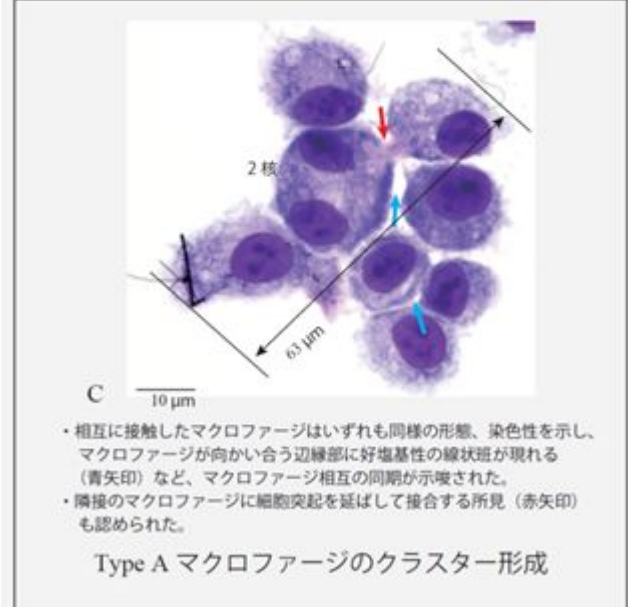
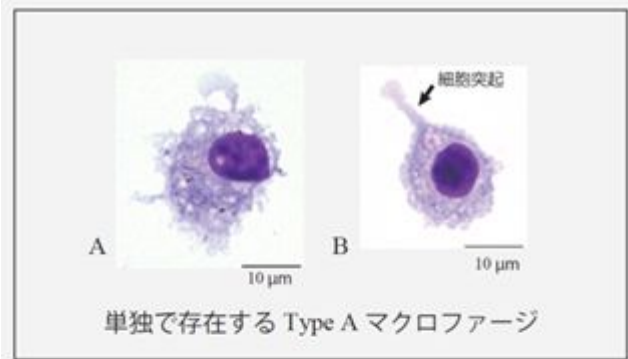


図 3-2 BALF 塗抹：MWNT-7
May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

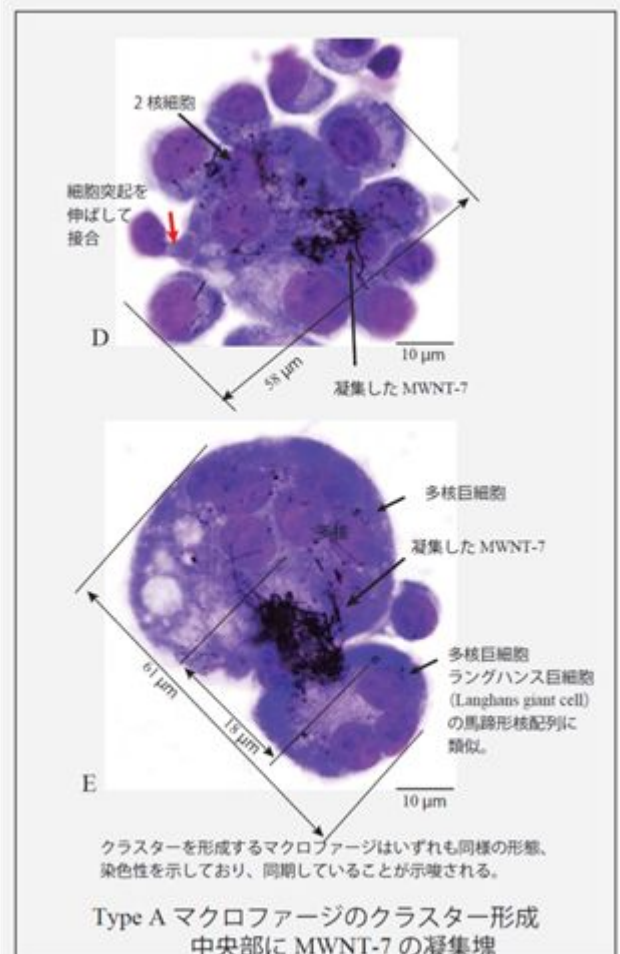


図 3-2 BALF 塗抹：MWNT-7
May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

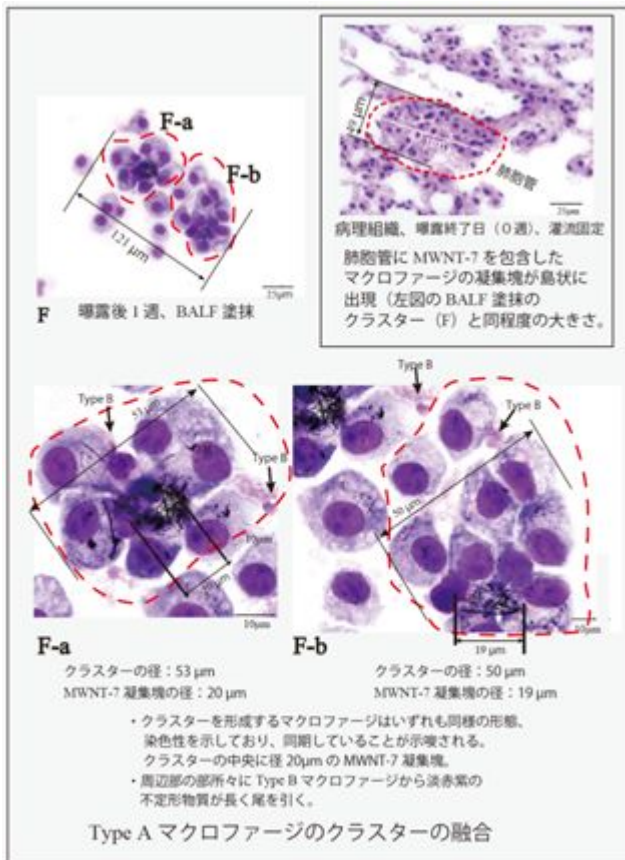


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

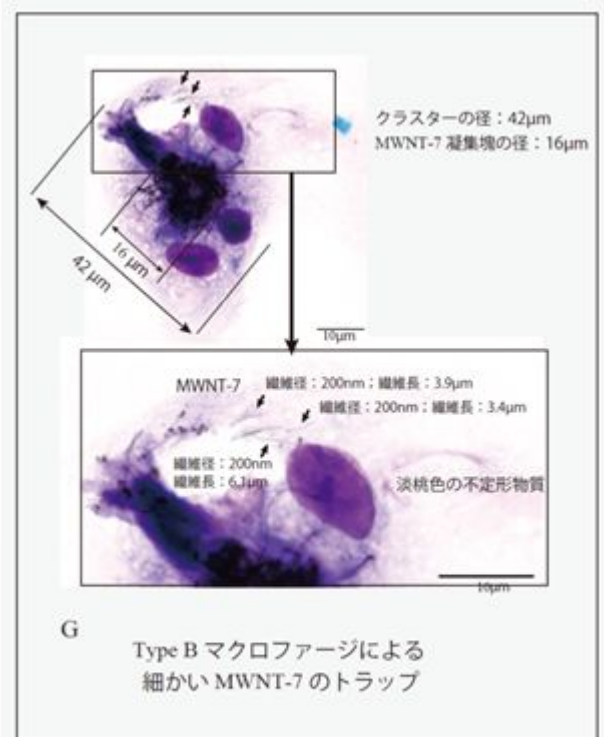


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

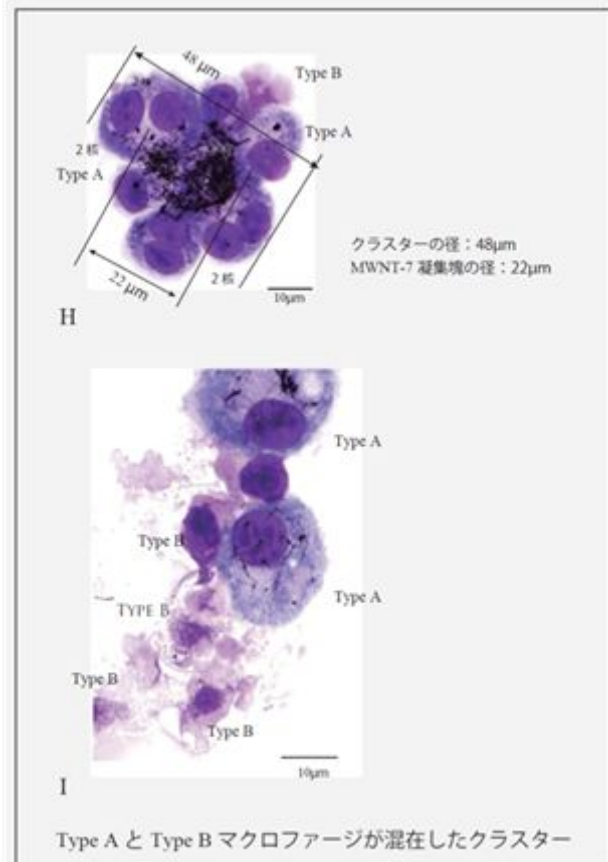


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

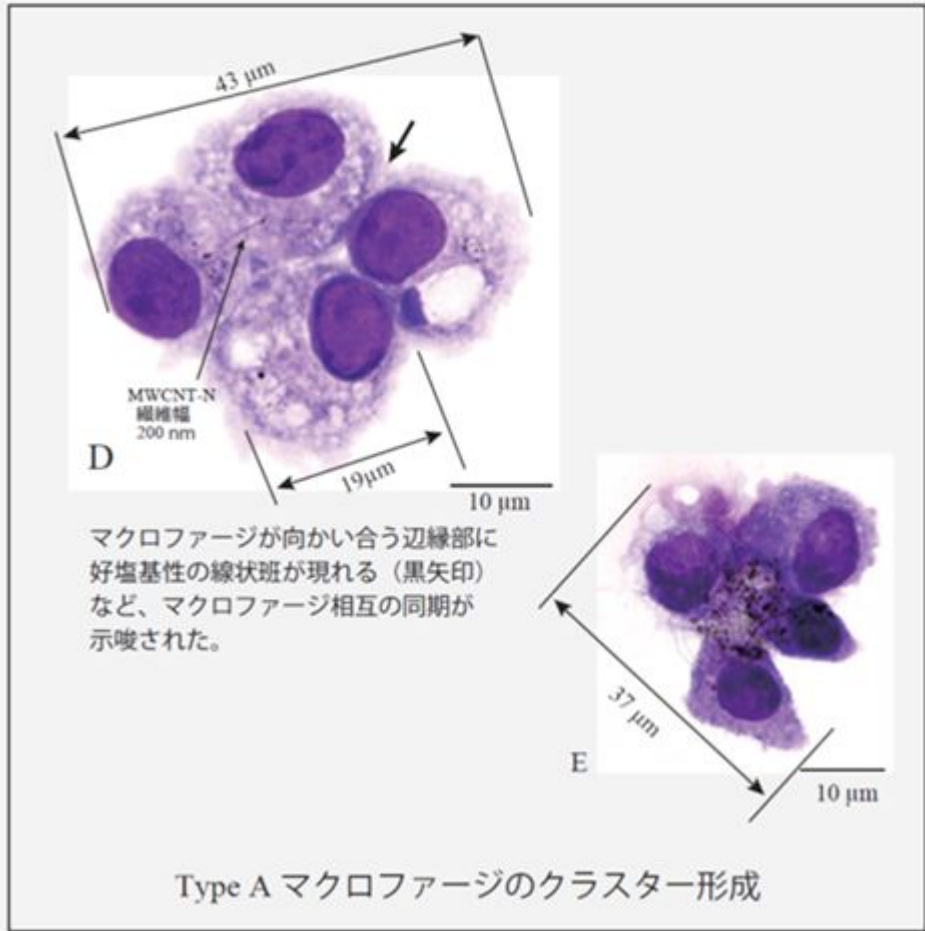
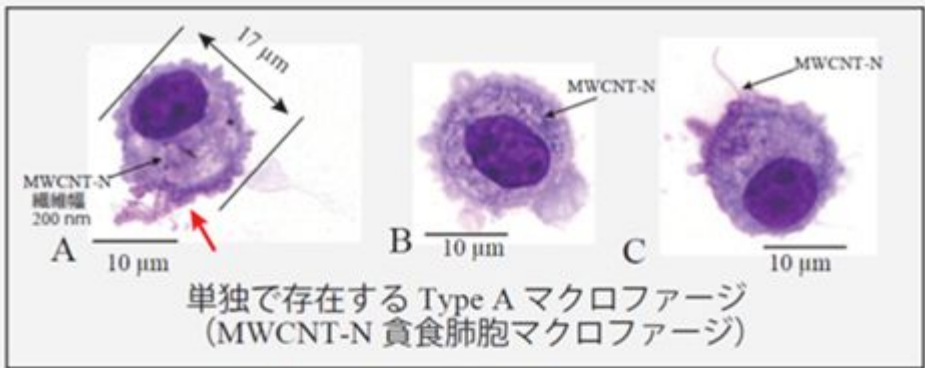


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

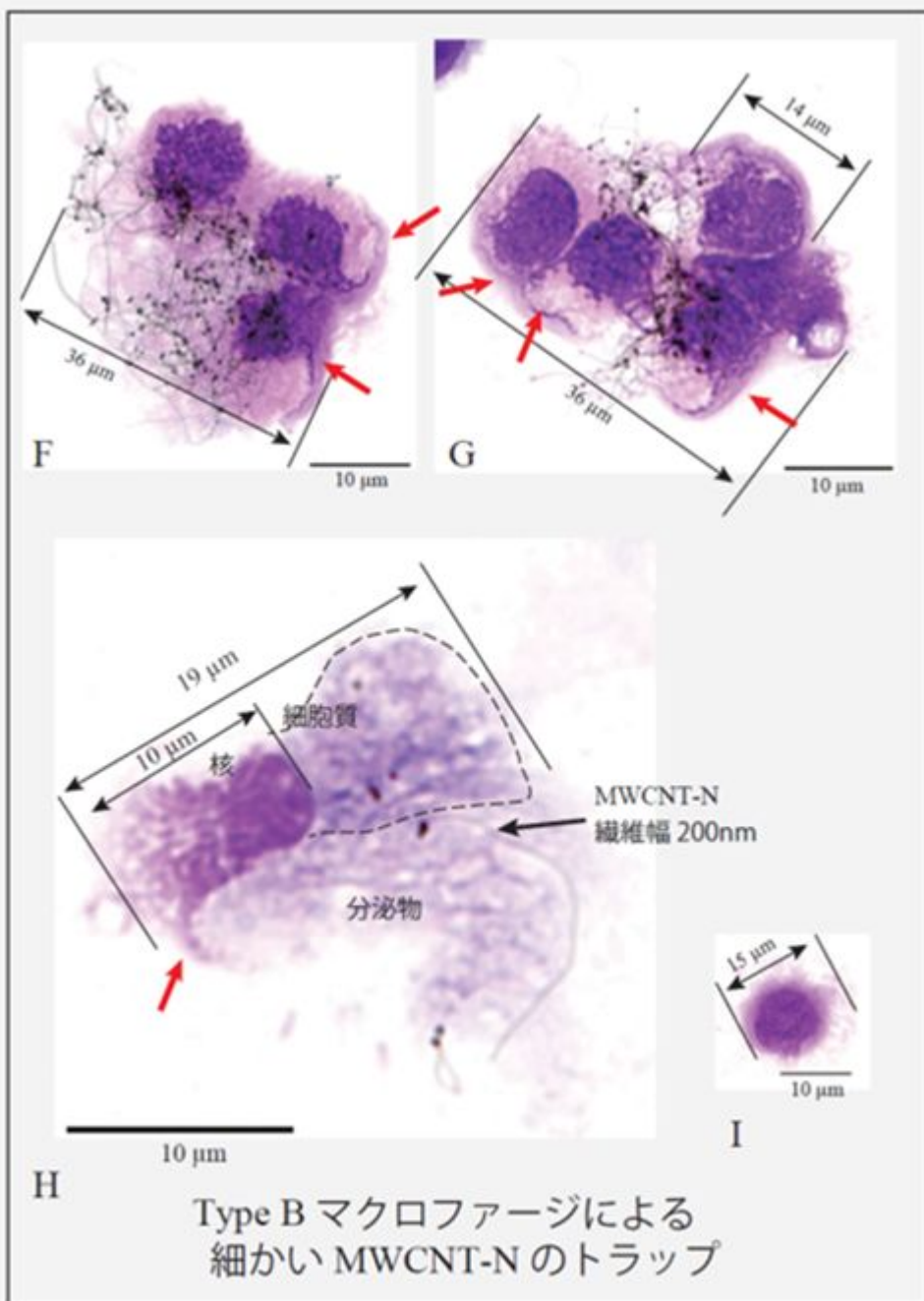


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N
May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

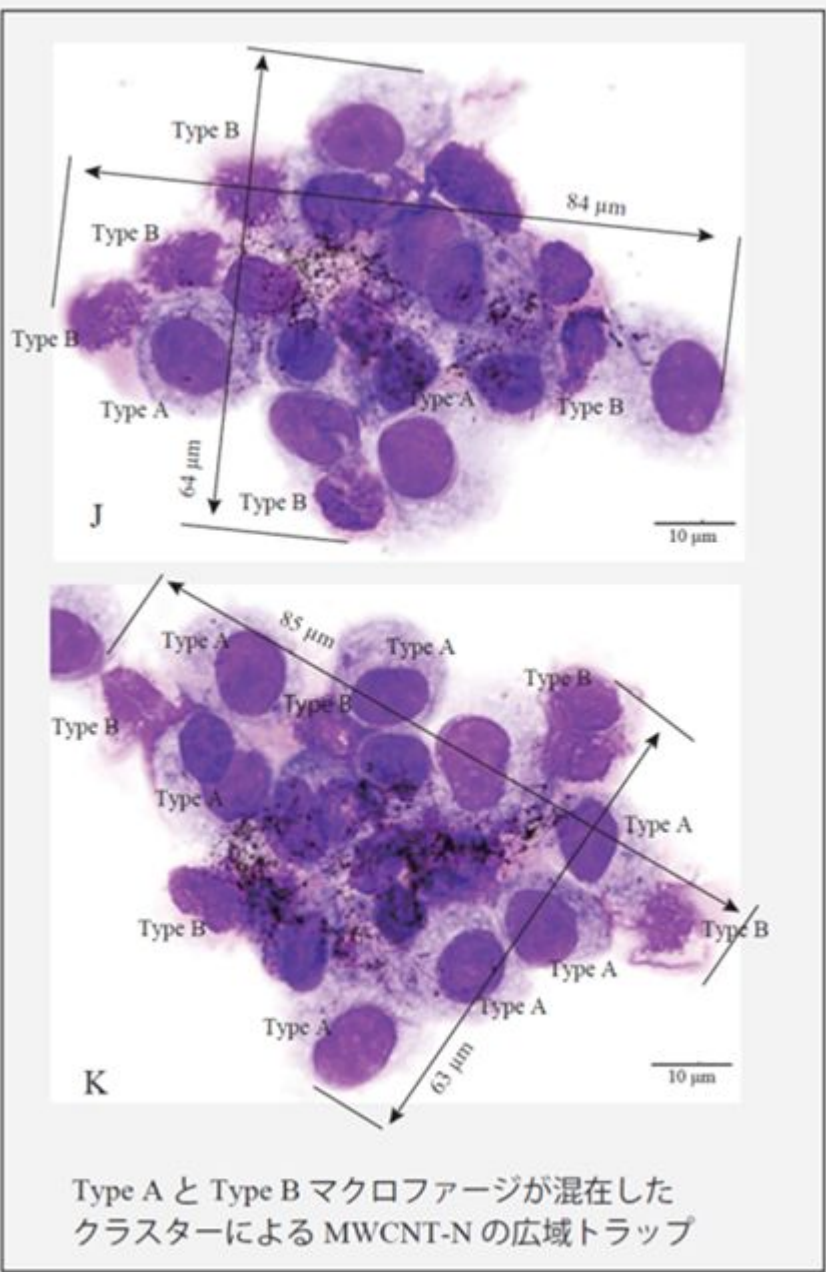


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

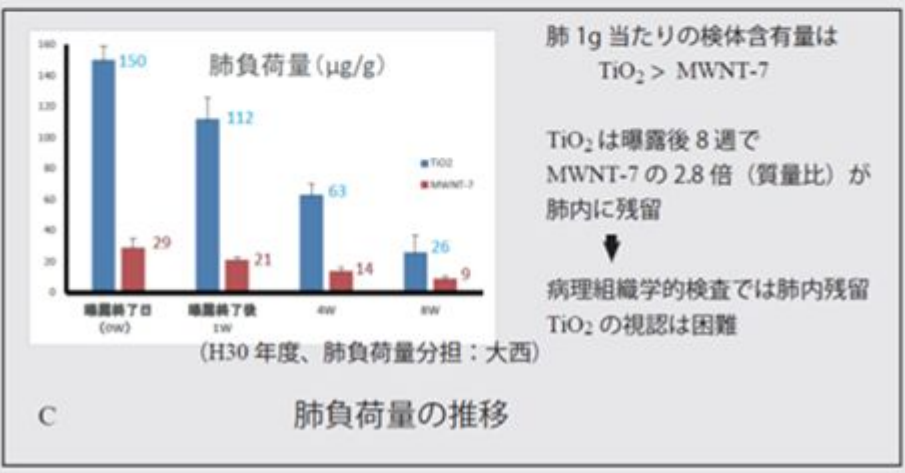
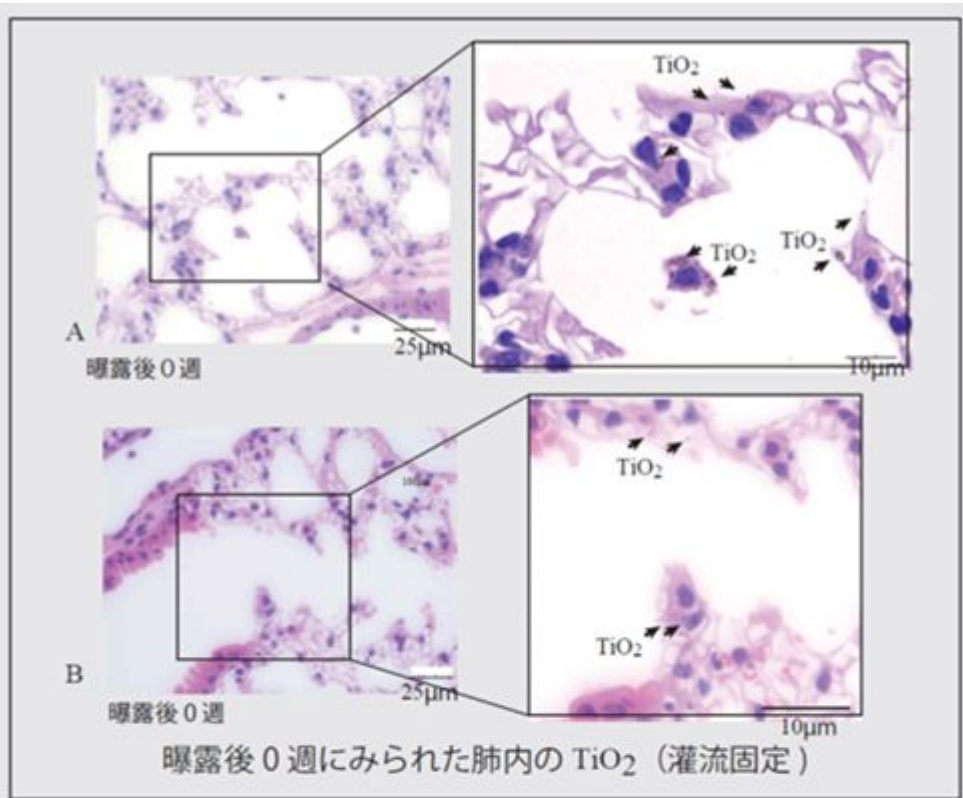
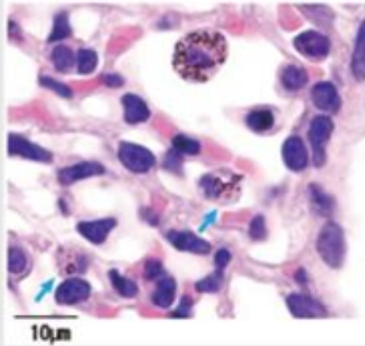
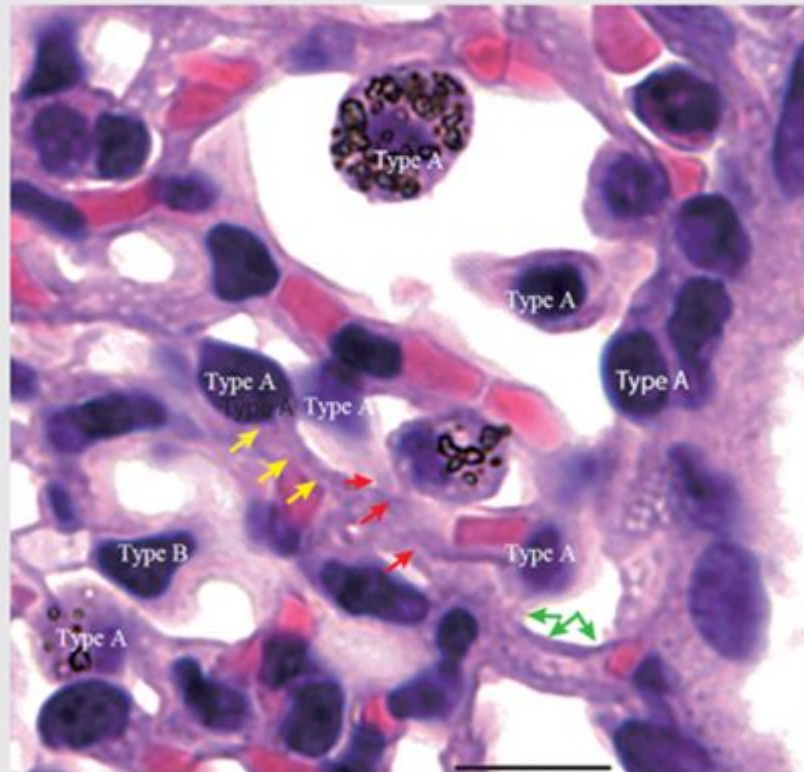


図 4-1 病理組織：TiO₂



- ・光学顕微鏡下で視認できる肺内残留 TiO₂ は MENT-7 と比べて極めて少ない。
- ・TiO₂ 貪食マクロファージ 肺胞壁に癒合 (青矢印)

対物 100 x (油浸) で観察した曝露後 8 週の肺胞域 (浸漬固定)



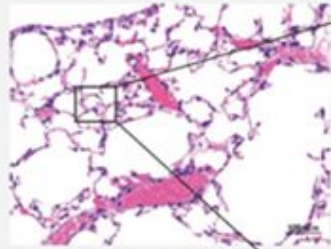
D

上の写真 (対物 100 x で撮影) を拡大、さらに Adobe Photoshop で明るさ -100% に調整して細部を可視化

細胞突起を長く伸長 (矢印: 黄、赤、緑) させ相互に接合した網の目に TiO₂ 貪食マクロファージがトラップされるように癒合。
Type B マクロファージ (図左下) の関与は少ない

TiO₂ 貪食マクロファージ (Type A) の肺胞域への固着

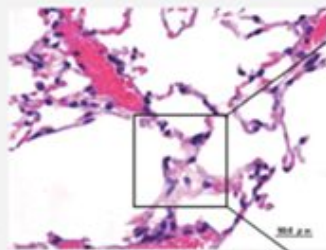
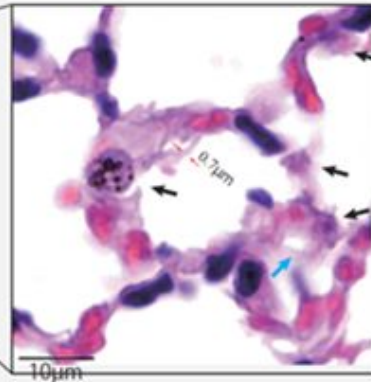
図 4-1 病理組織: TiO₂



E

曝露後8週、浸漬固定

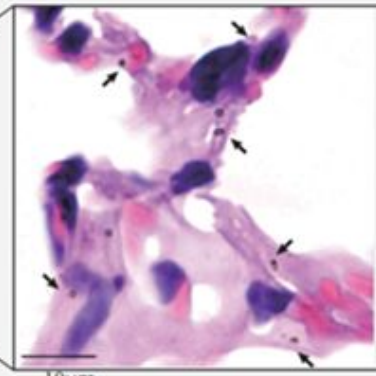
- ・TiO₂ 貪食マクロファージ (黒矢印) の肺胞壁への付着
- ・肺胞壁の粗造化
- ・微小な肺胞類似構造 (青矢印) の出現
- ・局所的な毛細血管の増加



F

曝露後8週、浸漬固定、肺胞

- ・多くのTiO₂ 粒子が存在 (黒矢印)
- ・粒子径は1µm以下
- ・付加組織とともに肺組織に付着。
- ・局所的な毛細血管増加 (新生)



肺内に残留したTiO₂

図 4-1 病理組織：TiO₂

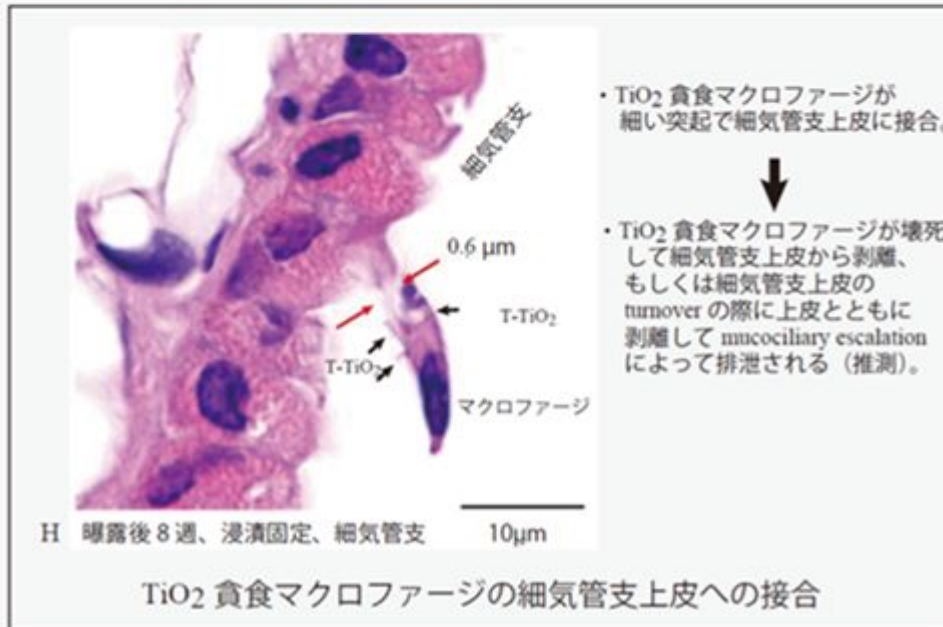
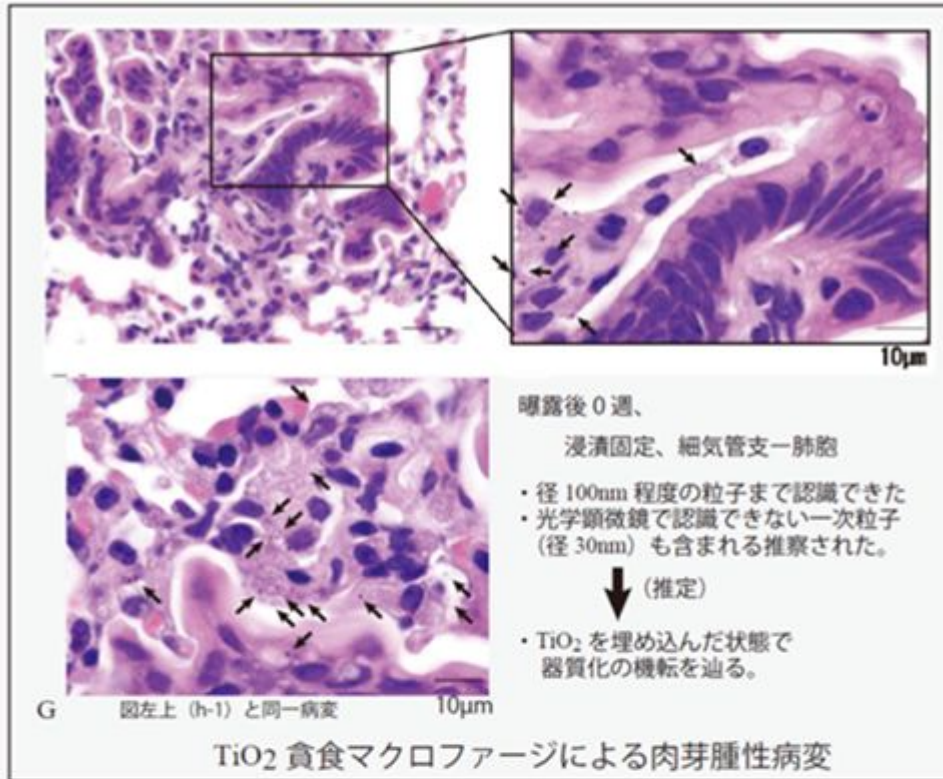


図 4-1 病理組織：TiO₂

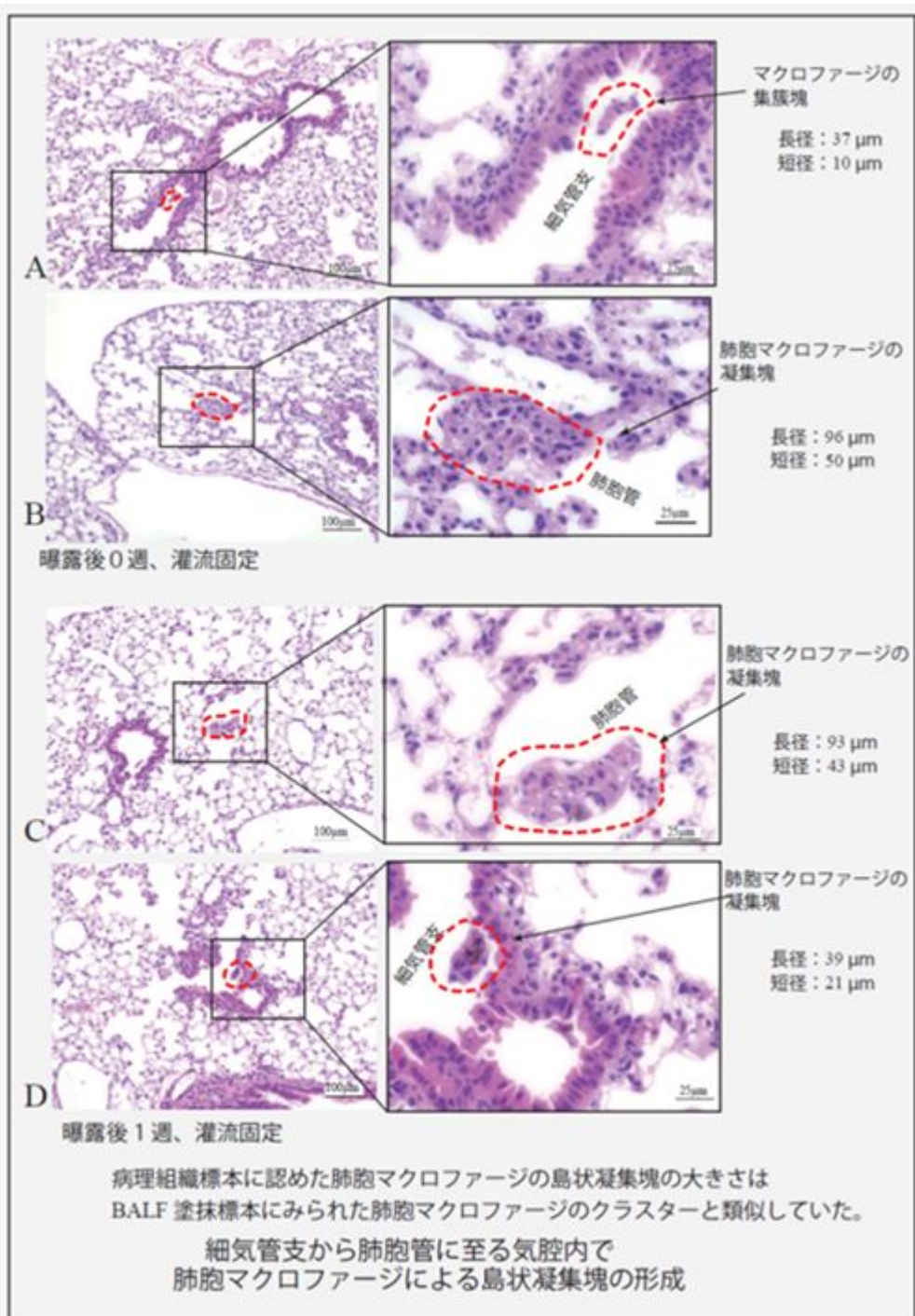


図 4-2 病理組織：MWNT-7

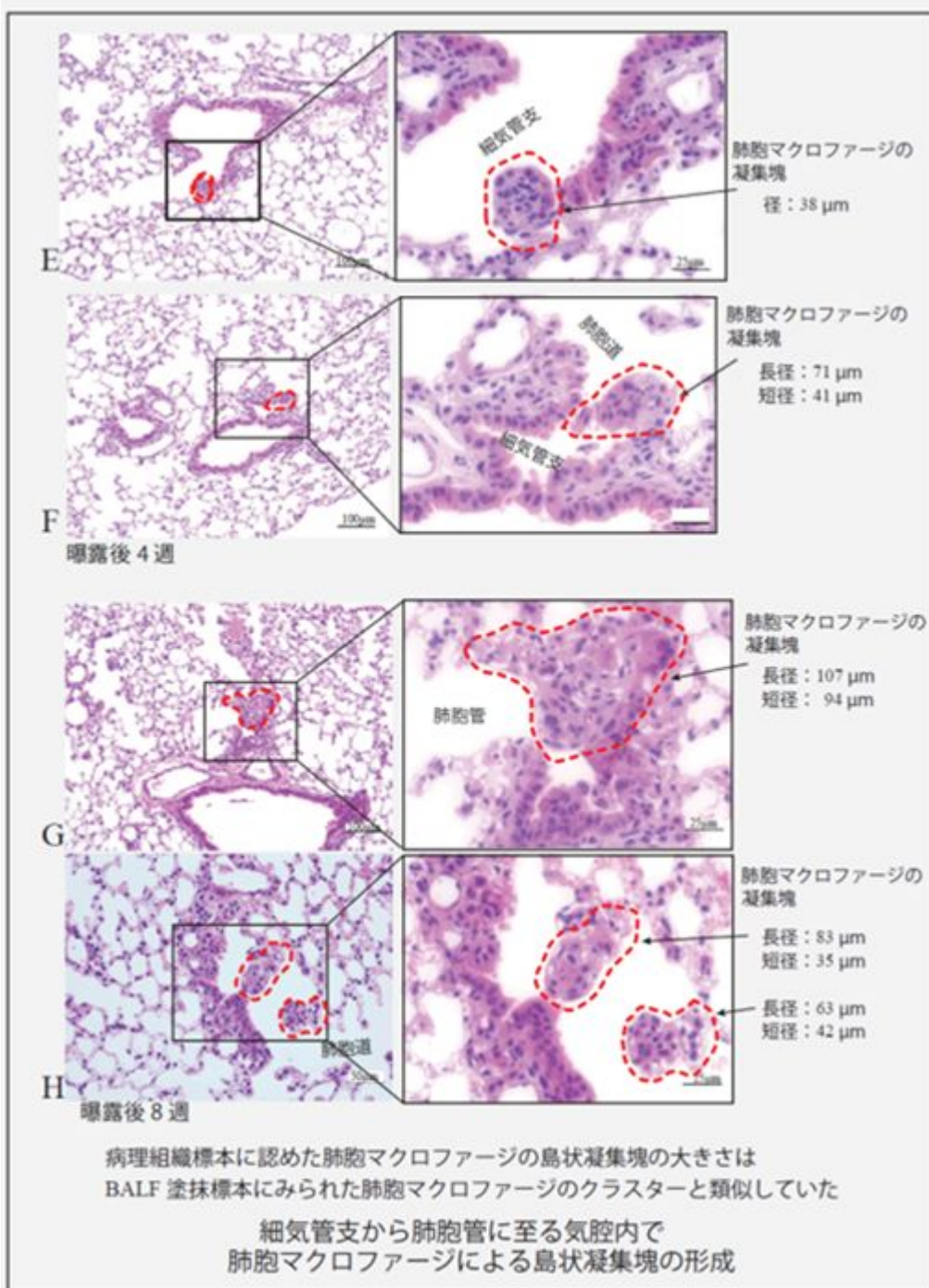
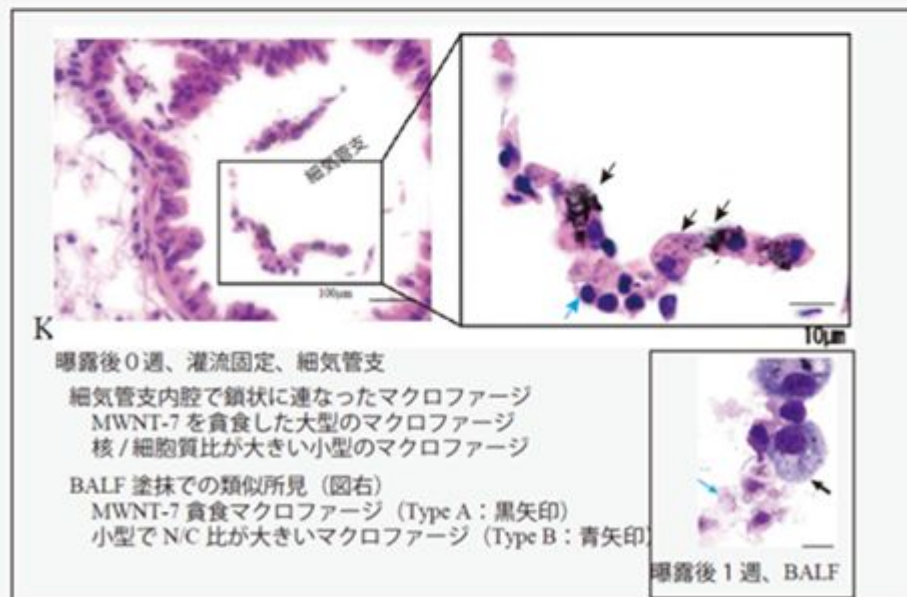
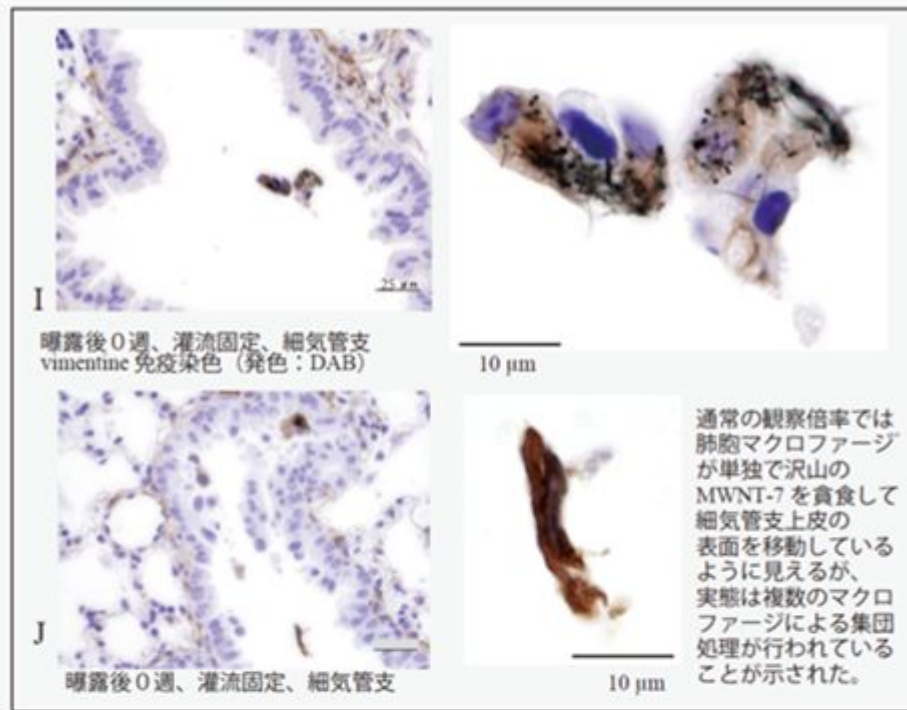
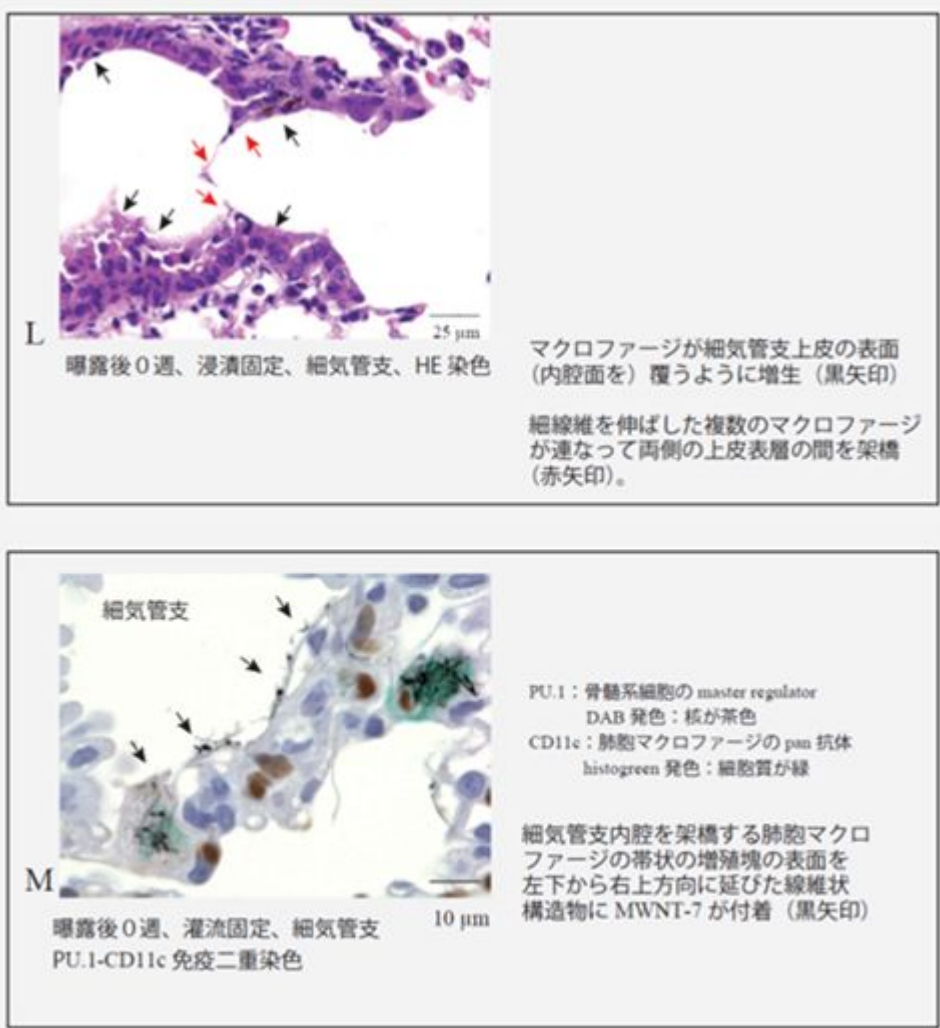


図 4-2 病理組織：MWNT-7



細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

図 4-2 病理組織: MWNT-7



肺胞マクロファージの増生による細気管支内腔の架橋

図 4-2 病理組織: MWNT-7

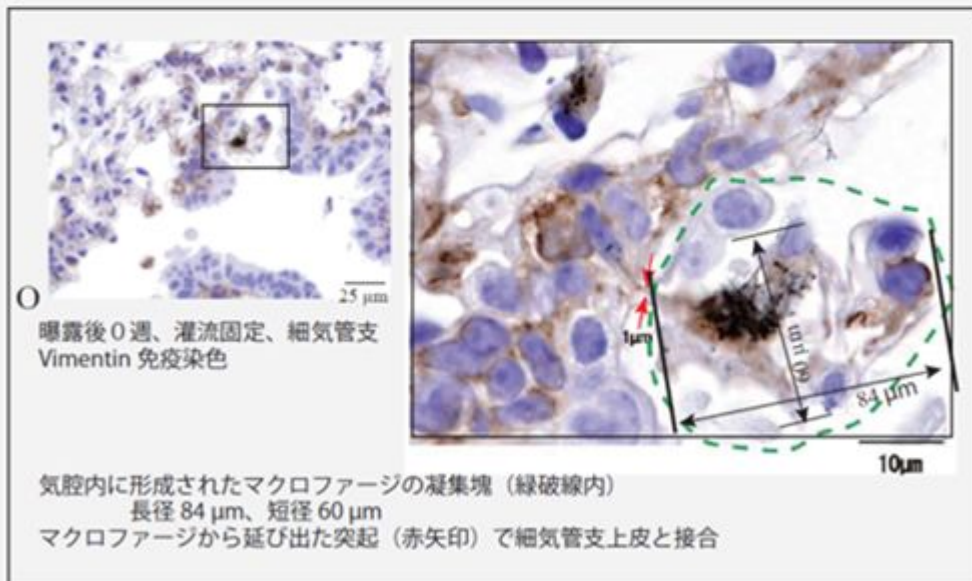
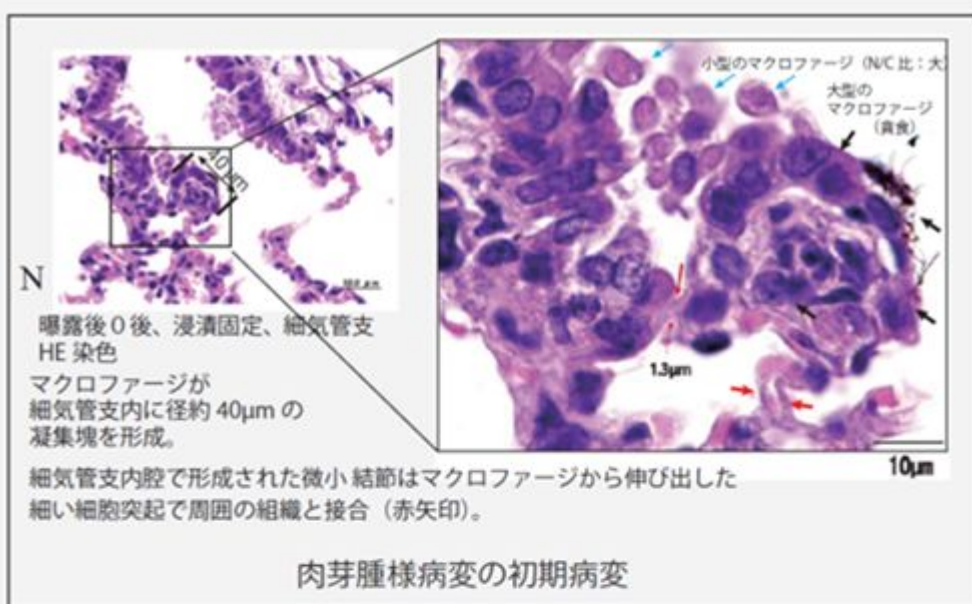
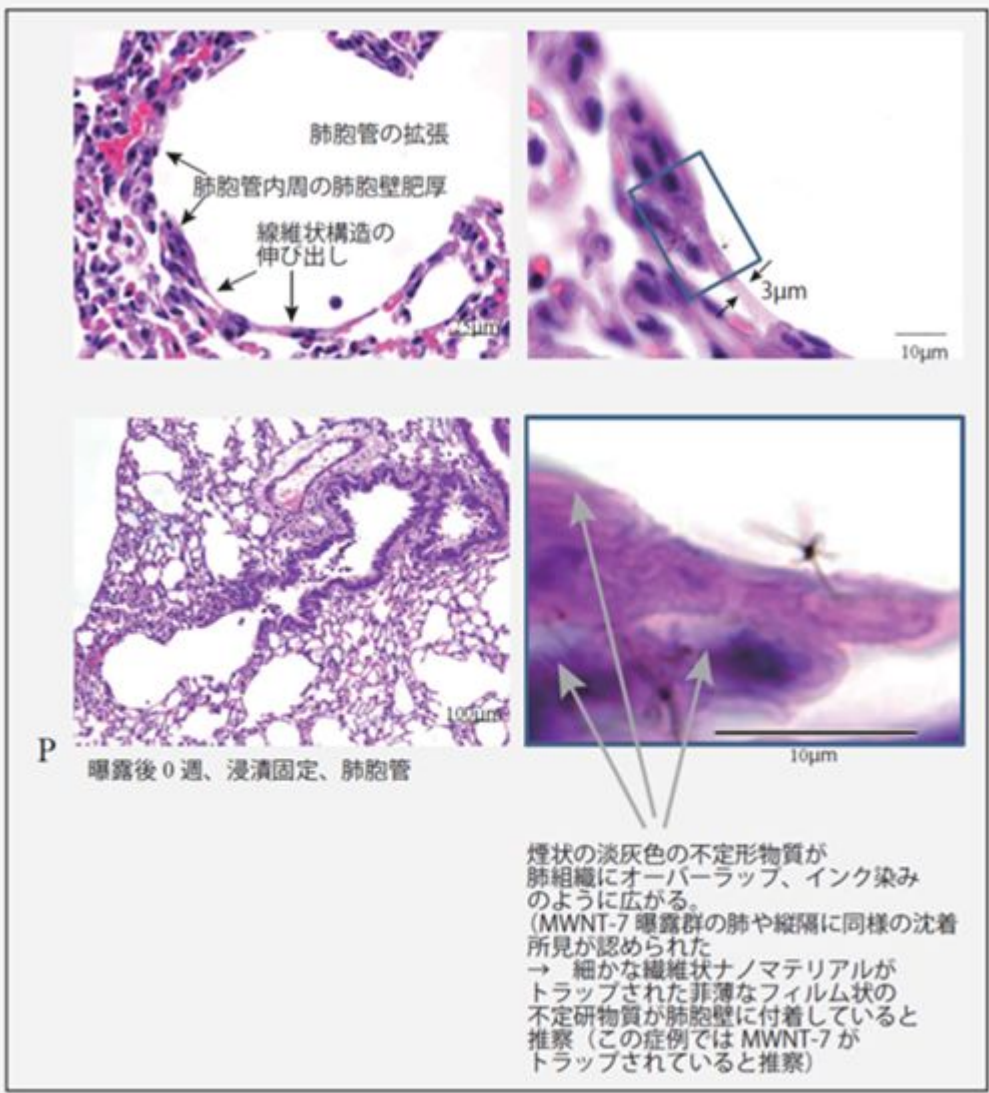


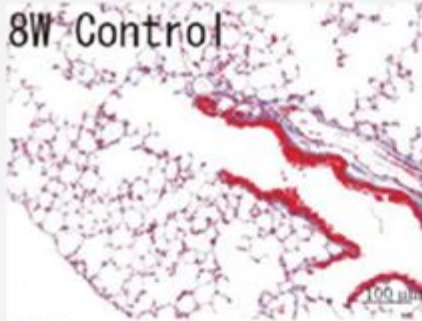
図 4-2 病理組織：MWNT-7



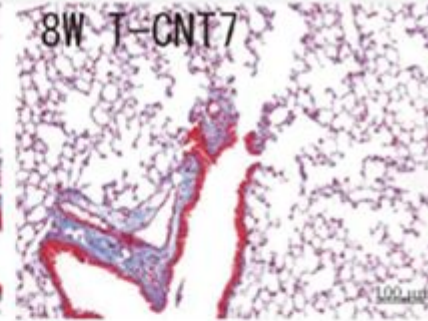
肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質 (MWNT-7) の沈着

図 4-2 病理組織：MWNT-7

8W Control



8W T-CNT7



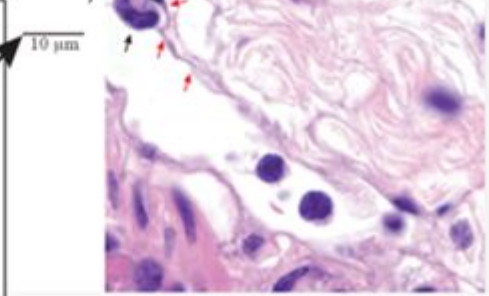
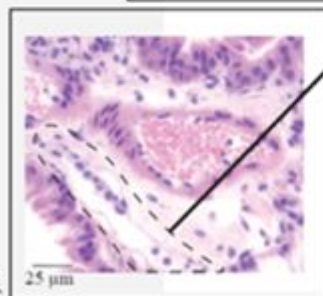
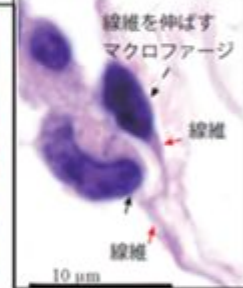
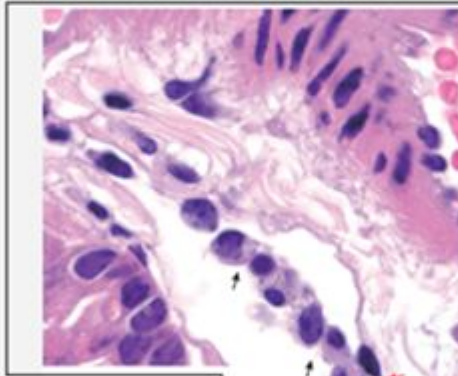
Q-1

灌流固定、肺、Masson trichrome stain

Q-2

肺には好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見は認められないが、曝露後8週に気道周囲の間質組織に Masson trichrome stain で青色に染まる膠原繊維の軽度な増生が認められた。

細気管支周囲間質での膠原線維の増生



R

細気管支周囲の間質は、肺から縦隔へ向かう液体成分やマクロファージの通路となっていて、鎖状に連なったマクロファージが線維状構造物への付着が認められた。⇒ 線維化病変に移行（推定）
平成29年度、MWNT-7 3mg³ 2時間/週、x5週曝露、曝露後1W、細気管支周囲の間質

図 4-2 病理組織：MWNT-7

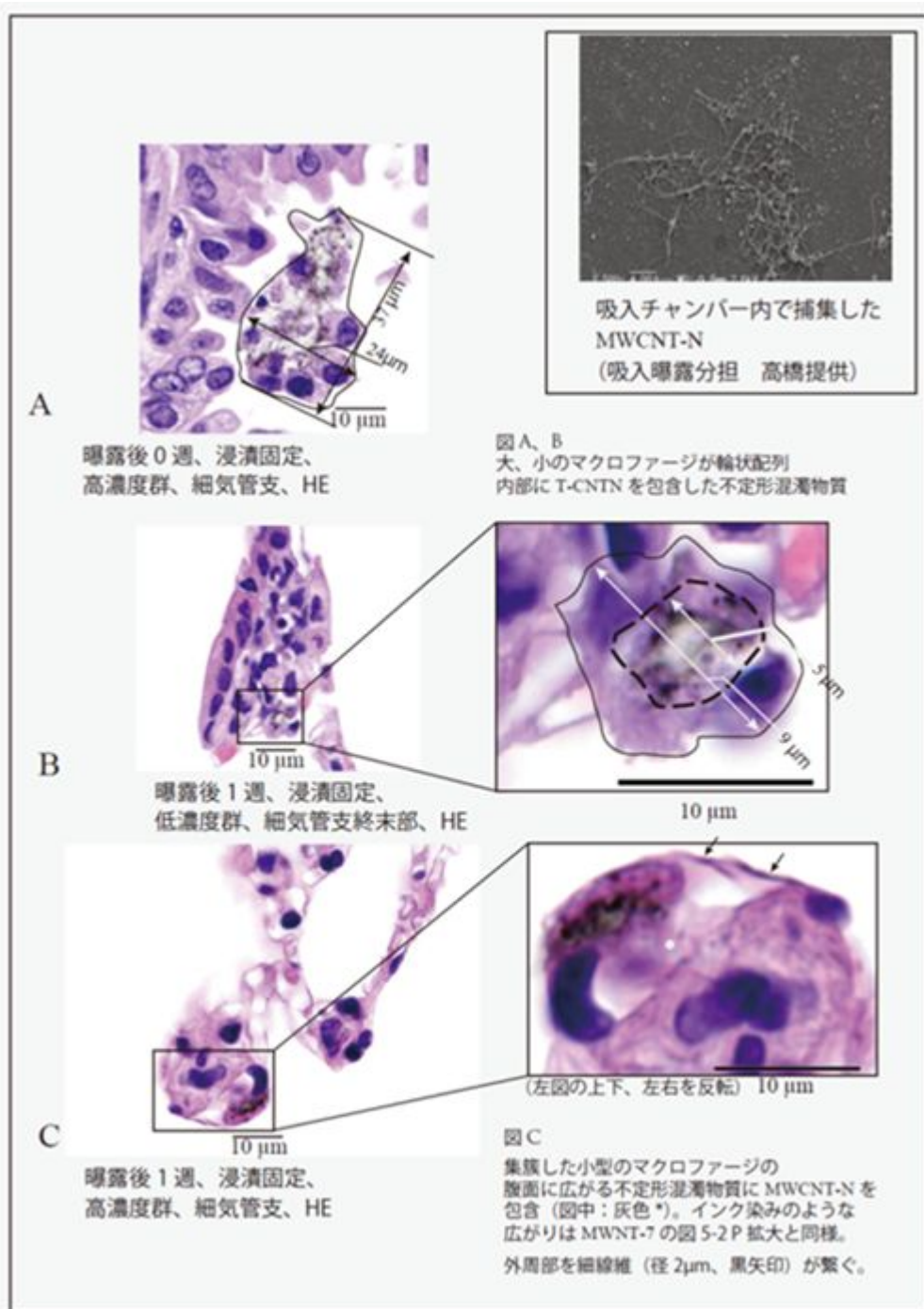


図 4-3 病理組織：MWCNT-N

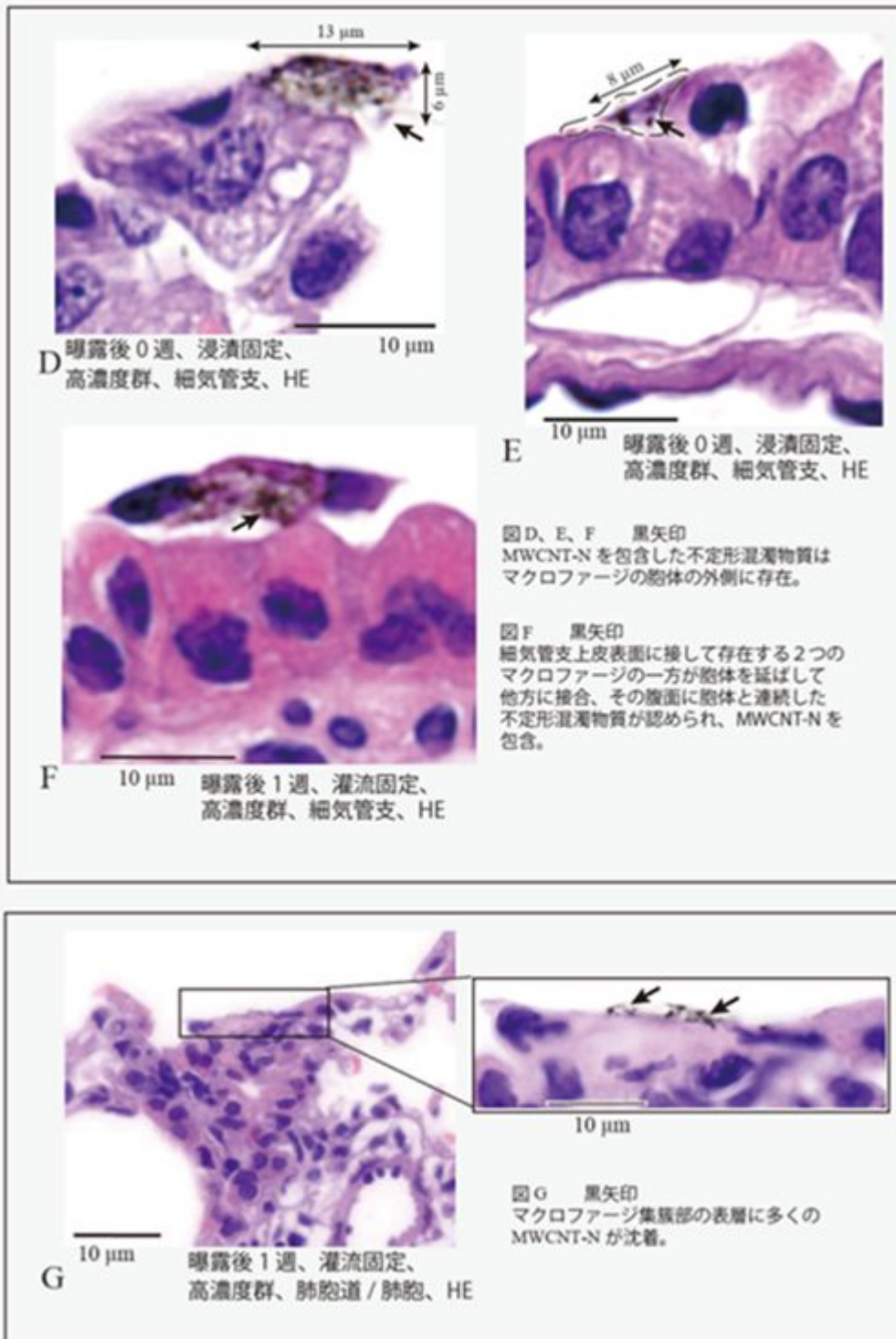
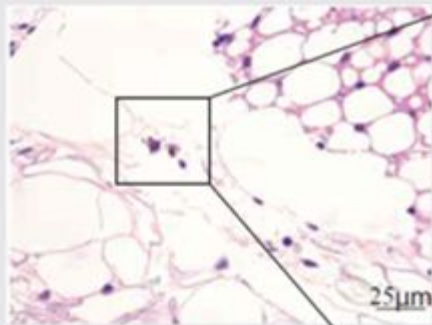
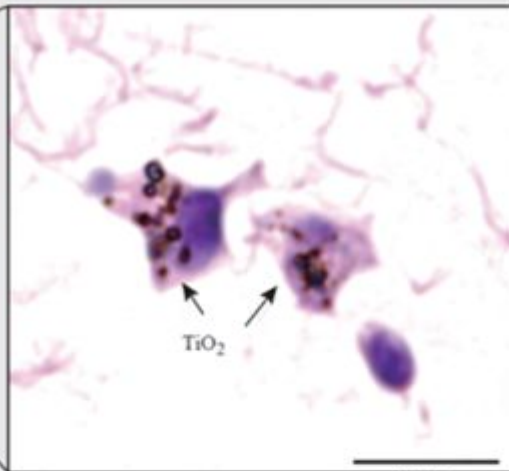


図 4-3 病理組織：MWCNT-N



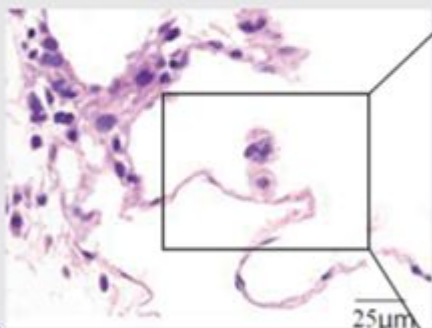
A

曝露後 0 週、灌流固定、縦隔、HE



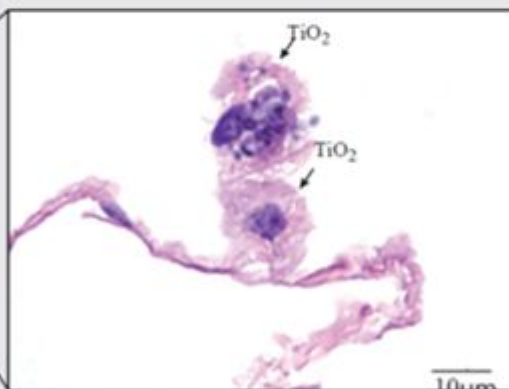
10μm

TiO₂ 貪食マクロファージが縦隔内の疎性結合組織に付着



B

曝露後 8 週、灌流固定、
高濃度群、縦隔 (心嚢膜)、HE

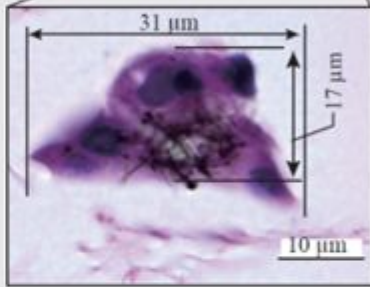
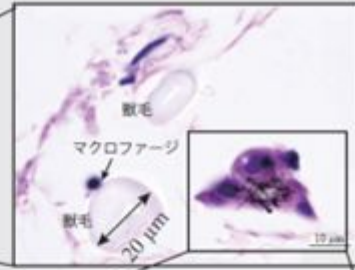
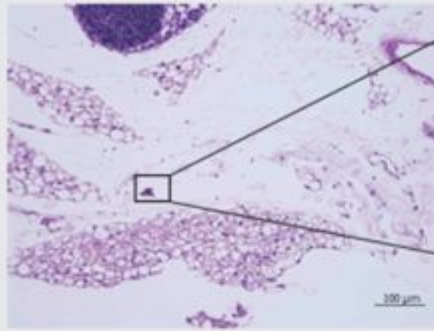


10μm

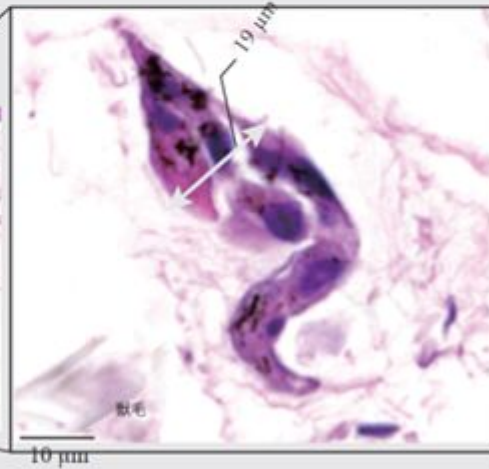
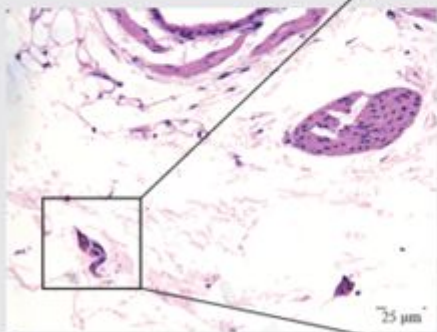
TiO₂ 貪食マクロファージが心嚢膜に付着

縦隔での沈着

図 5-1 病理組織：TiO₂



C
曝露後1週、灌流固定、縦隔、HE
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

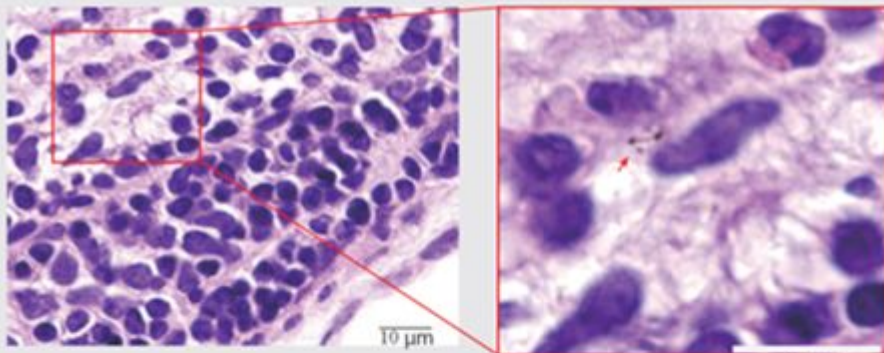


D
曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

MWNT-7 貪食マクロファージが縦隔内の疎性結合組織に付着

縦隔での沈着

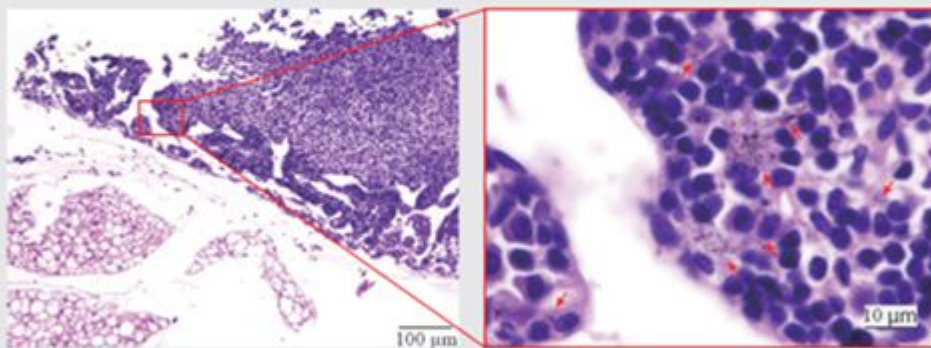
図 5-2 病理組織：MWNT-7



E 曝露後0週、灌流固定、
縦隔のリンパ節、HE

赤矢印：MWNT-7

10 μm



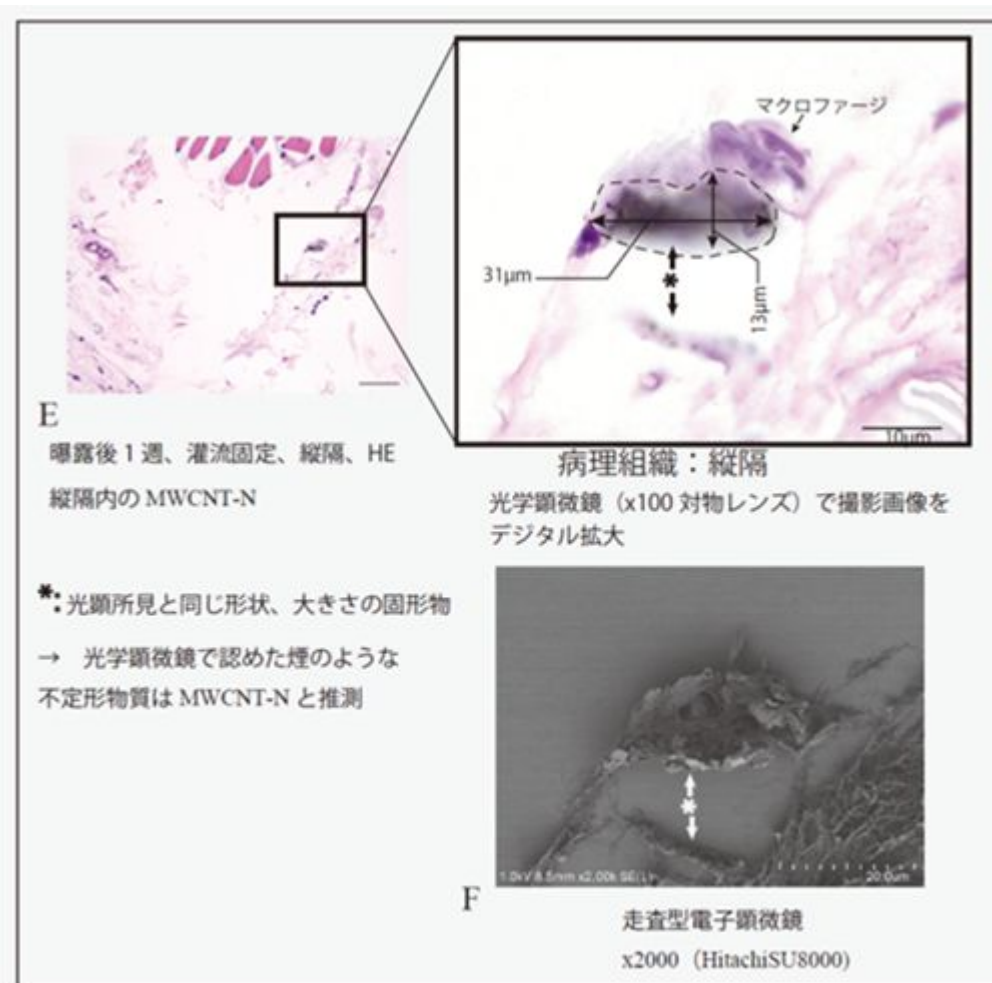
F 曝露後8週、灌流固定、
縦隔のリンパ節、HE

赤矢印：MWNT-7
細かいMWNT-7が多数存在
(曝露後0週よりも増加)

肺に急性炎症の所見が認められなかった本実験は、縦隔のリンパ節に
細かいMWNT-7の移行が認められ、MWNT-7の凝集体の移行は認められなかった。

縦隔リンパ節での沈着

図 5-2 病理組織：MWNT-7



E

曝露後1週、灌流固定、縦隔、HE
縦隔内のMWCNT-N

*: 顕微鏡所見と同じ形状、大きさの固形物
→ 光学顕微鏡で認めた煙のような
不定形物質はMWCNT-Nと推測

病理組織：縦隔

光学顕微鏡 (x100 対物レンズ) で撮影画像を
デジタル拡大

F

走査型電子顕微鏡
x2000 (HitachiSU8000)

MWCNT-N がマクロファージとともに縦隔内の疎性結合組織に付着

図 5-3 病理組織：MWCNT-N

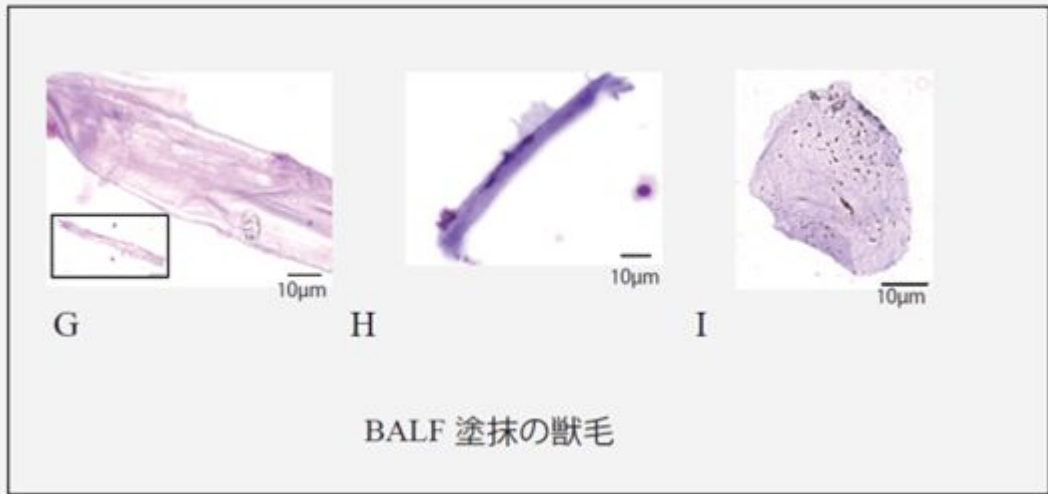
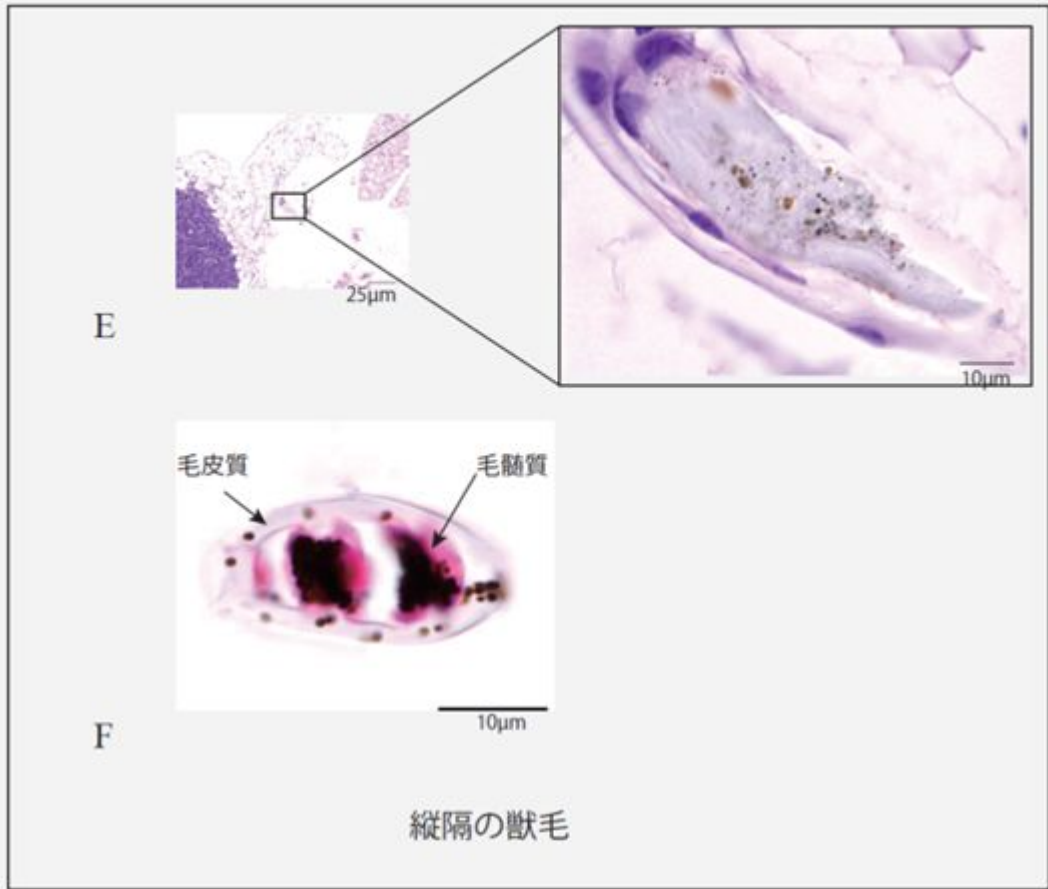


図 5-4 対照群の獣毛