

平成 29-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
総合研究報告書

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な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、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。

平成 29 年度に実施した MWNT-7 (長繊維貫通型)の実験は肺曝露量が十分でなかったため翌年度に再実験を実施した。このため、平成 30 と令和元年度に実施した MWNT-7、TiO₂ (粒状凝集型) 及び MWCNT-N (毛玉状凝集型)の実験で必要な情報を収集した。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曝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 塗抹細胞の形態学的解析及び病理組織学的解析の多面的な検討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貫通する状態となる。「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。病理組織学的評価の分担研究を進める中で、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学的検査を追加した。これらの解析によって、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の収集を企画した。

B. 研究方法

平成 29 年度から 3 年間の研究期間に、三種類のモデルナノマテリアルから各年度に 1 物質を検体とした対照群、低濃度、高濃度群の三群構成でマウス吸入曝露実験を行い、そこから得た肺のサンプルを用いて肺負荷量、免疫機能、病理組織評価からカテゴリーに分類の基盤となる情報の整備を計画した。

研究班のベースとなるマウス吸入曝露実験は分担研究者の高橋(国立医薬品食品衛生研究所 Natinal Institute of Helth science、以下 NIHS)が行い、解剖と採材には分担研究者が協働参画し、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。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 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。各モデルナノマテリアルは、吸入曝露実験を分担した高橋が肺の深部にまで到達可能なサイズのエアロゾルとするために分散処理 (Taquann 法) を行って吸入曝露実験に供試した。

年次計画に沿って、初年度(平成 29 年度)に「長繊維貫通型」のモデルナノマテリアルとして選定した MWNT-7 の実験から研究をスタートさせた。この実験は、肺負荷量の解析で曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断して、平成 30 年度に「長繊維貫通型」モデルの MWNT-7(再実験)と「粒状凝集型」モデルの TiO₂ の実験を行い、令和元年度に「毛玉状凝集型」モデルの MWCNT-N の高濃度と低濃度群の吸入曝露実験を実施した。吸入曝露実験の年次研究計画を以下に示す。

平成 29 年度は、MWNT-7(「長繊維貫通型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を、対照群(キャリアーエア吸入)、低用量群(1mg/m³)、高用量群

(3mg/m³)の三群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 4 匹、免疫機能評価に 5 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。この実験は前述したように曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断し、翌年に再度 MWNT-7(3mg/m³)の吸入曝露実験を行って必要なデータを収集した。

平成 30 年度は、TiO₂(「粒状凝集型」モデル)と MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験を行った。

実験は、対照群(キャリアーエア吸入)、TiO₂ 30mg/m³ 曝露群、MWNT-7 3mg/m³ 曝露群の 3 群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 3 匹、免疫機能評価に 6 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。

なお、この年度は、国立医薬品食品衛生研究所の移転に伴い吸入曝露実験の開始に遅延を生じたため、免疫機能と病理組織学的評価に関する解析は令和元年度まで継続実施した。

令和元年度は、MWCNT-N(「粒状凝集型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を行った。対照群、MWCNT-N 低用量群(1mg/m³)、高用量群(3mg/m³)の三群構成で曝露実験を実施し、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週での各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 3 匹、免疫機能評価に 6 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。

上記、年次計画に沿って各分担研究を以下のように実施した。

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 直噴全身曝露吸入装置 ver. 2.0(平成 29 年度の研究)、または ver. 3.0(平成 30、令和元年度の研究)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/m^3) 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。

吸入曝露実験に供試する検体の分散化処理過程で平成 29 年に目開き $25\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7 (T-CNT7#25) と、平成 30 年に目開き $53\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7 (T-CNT7#53) のエアロゾルの性状の違いについて、アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 ($51\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。

2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定 (大西)

肺組織での MWNT-7、MWCNT-N、並びにの TiO_2 の沈着量を以下の方法で測定して、組織負荷量のデータを収集した。平成 30 と令和元年度には縦隔組織の検体沈着量も併せて測定した。

多層カーボンナノチューブの MWNT-7 と 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 MWCNT 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。

TiO_2 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)

平成 29 年度に実施した MWNT-7 の吸入曝露実験で、フローサイトメトリー (FACSCant BD Biosciences) による BALF、脾臓及び頸部リンパ節の単核球のリンパ球表面マーカーの発現解析、肺組織の mRNA の発現解析、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の各種サイトカインのマルチプレックス解析を実施した。

フローサイトメトリー解析では、蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色、FACSCant BD Biosciences で発現を解析した。肺組織の mRNA 発現解析では、肺組織の一部から全 RNA を抽出、逆転写反応により得た cDNA をから CD204, MARCO, CD36, SRB1, F4/80, CD68, iNOS, MMP-12, β -actin の mRNA を定量化した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のサイトカインの解析では、曝露後 8 週に採取した BALF について Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) 用いて 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 についてマルチプレックス解析を実施した。

平成 30 と令和元年度に実施した TiO_2 、MWNT-7、及び MWCNT-N の吸入曝露実験も、フローサイトメトリー解析、BALF 細胞と肺組織の mRNA の発現解析、BALF 中の各種サイトカインのマルチプレックス解析を実施した。BALF フローサイトメトリー (FACSCant BD Biosciences) 解析は平成 29 年度と同じ項目で実施した。mRNA の発現解析は肺組織の RNA の発現解析に加えて、BALF 細胞についても解析を行うことで BALF 細胞と肺組織をセットにした解析を計画した。mRNA 発現の解析項目についても見直しを行い、CD204, Col IV, GM-CSF, IL-6, IL-33, TIMP-1, VEGF, MMP12, β -actin, SRB1, Cox2 とした。BALF 中の各種サイトカインの解析では、平成 29 年度と同じ Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) 用いたマルチプレックス解析を、曝露後 0、1、

4、8週各解剖期に採取したBALFについて実施した。

4. 病理組織学的評価研究(相磯)

平成29年度のMWNNT-7を検体とした研究では、吸入曝露後0、1、4、8週に採取した肺を病理組織学的に検索した。また、Ⅱ型肺胞上皮細胞の増生の解析をsurfactant protein C(SP-C)の免疫染色で、MWNT-7貪食マクロファージの肺内局在をMWCNTに結合することが報告されているスカベンジャー受容体Macrophage receptor with collagenous structure(MARCO)の免疫染色を行って解析した。

平成30と令和元年度に実施したTiO₂、MWNT-7、及びMWCNT-Nを検体とした実験で採取したBALF、肺組織、及び縦隔の組織について以下の検索を行った。

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長に渡り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。

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

平成29年度のMWNNT-7を検体とした吸入曝露実験での曝露データを示す。

低用量群は質量濃度(平均値±SD): 1.4 ± 0.1 mg/m³;CPCカウント(平均値±SD): 960 ± 80 /cm³、高用量群は質量濃度(平均値±SD): 960 ± 80 /cm³;CPCカウント(平均値±SD): 2340 ± 238 /cm³であった。この年度は、の吸入曝露実験は、目標濃度を達成し、安定した濃度で推移したデータが示されたが、エアロゾルの粒度分布を示すMMADのデータは得られなかった。

平成 30 年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験研究での曝露データを示す。

平成 30 年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験は、質量濃度 : $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 \pm SD) ; CPC カウント : $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD) ; MMAD : $893 \sim 1,060\text{nm}$ (σ_g : $3.5 \sim 4.2$ 、平均値 : 975.3 nm) であった。SMPS で測定したエアロゾルの粒度分布は、粒子径の中央値 : 149.4 nm 、平均値 : 177.6 nm であった。エアロゾル化効率を計算すると 34.8% であった。

平成 30 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験研究での曝露データを示す。

平成 30 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験は、質量濃度 : $3.0 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 \pm SD) ; CPC カウント : $1,449 \pm 155/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD) ; MMAD : $522 \sim 1,114\text{nm}$ (σ_g : $5.3 \sim 7.9$) であった。エアロゾル化効率を計算すると 78.9% であった。

令和元年度の MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験の曝露データを示す。

低用量群は質量濃度(平均値 \pm SD) : $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$; CPC カウント(平均値 \pm SD) : $503 \pm 150/\text{cm}^3$; MMAD は $640 \sim 3,708\text{nm}$ (σ_g : $8.6 \sim 34.0$)、高用量群は質量濃度(平均値 \pm SD) : $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/cm}^3$; CPC カウント(平均値 \pm SD) : $1,107 \pm 246/\text{cm}^3$; MMAD は $1,617 \sim 3,474 \text{ nm}$ (σ_g : $11.5 \sim 26.7$) 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。吸入曝露装置の曝露チャンパ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。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、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた。

吸入曝露実験に供試する検体の分散化処理過程で平成 29 年に目開き $25\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#25)と、平成 30 年に目開き $53\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#53)のエアロゾルの性状を比較した結果は、Aggregates(共有結合した状態のエアロゾル)の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 0.5 個/視野、1.4 個/視野、Agglomerates(複数の繊維が絡まったエアロゾル)の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 1.5 個/視野、4.1 個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 よりも Aggregates および Agglomerates の数が多く観察された。一方、Aggregates と Agglomerates の比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ 25% と 75% と同じ割合であった。

本実験において定期解剖した全ての個体の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

平成 29 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験の肺負荷量データを示す。

1 mg/m^3 曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露直後では $6.30 \mu\text{g/g}$ 、1 週目では $4.59 \mu\text{g/g}$ 、4 週目では $5.42 \mu\text{g/g}$ 、8 週目では $5.39 \mu\text{g/g}$ でやや減少傾向であった。また、 3 mg/m^3 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では $10.15 \mu\text{g/g}$ 、1 週目では $9.98 \mu\text{g/g}$ 、4 週目では $10.84 \mu\text{g/g}$ 、8 週目では $10.25 \mu\text{g/g}$ で一定に推移した。対照群(0 mg/m^3)の肺での MWNT-7 測定値は $0.00\mu\text{g/g}$ であった。以上ことから、Taquann 法にて分散処理を施した MWNT-7 を全身吸入装置により曝露後、1、4 および 8 週後における肺内の MWNT7 の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、 1 mg/m^3 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、 3 mg/m^3 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定の傾向を示した。先行研究(H26-化学-一般-003)の知見と照合して、この年度の吸入曝露実験は、曝露後 0 週の沈着量は異常値と判断した。

平成30年度に実施したTiO₂ 30 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は150.11 ± 9.05 μg/g、曝露後1週は112.47 ± 13.94 μg/g、曝露後4週は63.05 ± 7.21 μg/g、曝露後8週は25.85 ± 11.36 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/6で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は曝露終了後約3.5週であった。縦隔でのTiO₂測定値は0.00μg/gであった。対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)の肺と縦隔のTiO₂の測定値は0.00μg/gであった。

平成30年度に実施したMWNT-7 3 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は29.04 ± 6.16 μg/g、曝露後1週は21.33 ± 2.01 μg/g、曝露後4週は13.68 ± 1.62 μg/g、曝露後8週は9.15 ± 2.17 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は曝露終了後約3.5週であった。

縦隔及び対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)ではMWNT-7は検出されなかった(測定値は0.00μg/g)。

令和元年度に実施したMWNT-7を検体とした吸入曝露実験の肺負荷量データを示す。

MWCNT-N 1.3 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は14.38 μg/g、曝露後1週は10.96 μg/g、曝露後4週は5.73 μg/g、曝露後8週は3.77 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は約3.5週であった。

MWCNT-N 0.6 mg/m³曝露群のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週に8.84 μg/g、曝露後1週に5.51 μg/g、曝露後4週に2.69 μg/g、曝露後8週は2.41 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の負荷量の1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は約3.5週であった。

なお、MWCNT-N 1.3 mg/m³と0.6 mg/m³曝露群とも、縦隔及び対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)では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%; TiO₂:17%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TiO₂(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TiO₂曝露群(曝露濃度:30 mg/m³)、MWNT-7曝露群(同:3 mg/m³)、MWCNT-N曝露群(同:1.3 mg/m³)の値は、それぞれ25.85、9.15、3.77μgで、TiO₂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29年度のMWNT-7を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF細胞のフローサイトメトリー解析で、曝露後0週の変化として、生細胞の減少、肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁺F4/80⁺)の減少、好酸球、単球、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加が示された。曝露後1週には、BALF中の生細胞の減少がみられなくなり、肺胞マクロファージの減少(高用量群、有意)、単球と好酸球の増加(高用量群、有意)が示された。曝露後4週には、1週後と同様に、肺

肺マクロファージの減少(高用量群、有意)、単球、好酸球の増加(高用量群、有意)が示された。曝露後8週まで、肺マクロファージの減少、好酸球と単球の増加が示された。肺マクロファージのスカベンジャー受容体(CD36、CD163)の発現に検体の曝露による大きな変化は示されなかった。肺組織の mRNA 発現では曝露後0週に CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現上昇(有意)、曝露後1週に MARCO の mRNA 発現の上昇(有意)、曝露後4週に CD204、iNOS の mRNA の上昇(有意)が示された。MMP12 mRNA の発現は、どの解剖期においても上昇が示された(低用量群、高用量群とも有意)。曝露後8週の解剖で採取した BALF 中のサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子に関して、マルチプレックス解析を実施すると、4種類の因子が検出され、VEGF あるいは IL-12 が MWNT-7 の吸入曝露で増加することが判明した。

脾臓、頸部リンパ節では、リンパ節において、曝露後4週で、M1 の低下、M2 の上昇が確認された以外、特段の変化は見られなかった。

平成30年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF 細胞のフローサイトメトリー解析の結果は、MWNT-7 の曝露で曝露後0週に生細胞の減少、肺マクロファージ(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。

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。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)。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。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)。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)。

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。

平成30年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF 細胞のフローサイトメトリー解析の結果は、TiO₂ の曝露で BALF 中の免疫担当細胞への影響は示されなかった。

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、TiO₂ 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、TiO₂ 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は、TiO₂ 曝露による変化は示されなかった。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、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、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は、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。TiO₂曝露では曝露後0週にIL-4の発現上昇が示された。

令和元年度のMWCNT-Nを検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

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、対照的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29年度のMWNT-7の吸入曝露実験で、病理組織学的には肺胸腔内や肺組織にMWNT-7とMWNT-7貪食マクロファージを認めた程度で、好中球浸潤を伴う炎症所見や毒性所見を認めなかった。型肺泡上皮細胞の特異抗体であるSP-Cの免疫染色を行ったが、型肺泡上皮細胞の増生は示されなかった。Masson's trichrome染色を行ったが、肺の線維化病変はMWNT-7曝露後8週の標本においても認められなかった。MWNT-7に結合すると報告があるマクロファージのスカベンジャー受容体MARCOの免疫染色でMWNT-7貪食マクロファージがMARCO陽性所見を示すことが確認された。また、MARCO陽性マクロファージは曝露後0週では肺内に広く分布するが、次第に肺泡管・細気管支とその周囲に集まる様子が認められた。

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、順にその結果を記した。

平成 30 と令和元年度の実験で採取した 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した。

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が相互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。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 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。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 は少なかった。

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して、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 がびまん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。

平成 30 年度と令和元年度の実験で採取し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 stain 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 30 μm 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 20 μm 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 倍まで拡大して観察した結果、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

ナノマテリアルの肺泡マクロファージ胞体内の蓄積様式(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を試みるため、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を実施した。

MWCNT-N を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験を、目標濃度においてエアロゾル化した検体を安定した濃度推移で曝露することができた。しかしながら、MWCNT-N は目標濃度の半分程度であった。

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。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。その理由として、繊維径が細いためエアロゾル化した段階においてチャンバー内で繊維が絡まりあり再凝集していることが想定された。これについては、分担研究において、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。そこで、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 の繊維長は MWNT-7 とほぼ同等であるが、MWNT-7 に比較して繊維径が細く絡まりやすいため、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。

吸入曝露実験では、鼻腔のフィルター機能によって除去される粗大な粒子を予め除去して、肺深部の肺胞まで到達可能な粒子径の検体をエアロゾル化して曝露する必要がある。本研究班の吸入曝露実験で検体の分散化処理に用いた Taquann 法では、大型の凝集体を除去するため金属製フィルターにて濾過する工程がある。平成 29 年度の実験では、Taquann 法の開発における先行研究と同じ目開き 25 μm 金属製フィルターを用いたが、平成 30 と令和元年の実験では、細気管支から肺胞管まで到達可能な、荒い検体を得る事を目的として目開き 53 μm のフィルターを使用した。実際にエアロゾル化した粒子の形状を観察した結果、Taquann 法で分散化処理をした MWNT-7 には粗大成分として、共有結合した状態の凝固体(Aggregates)と複数の線維が絡まった凝集体(Agglomerates)が存在し、その比率は目開き 25 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#25)と目開き 53 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#53)は同じであったが、それぞれの単位面積当たりの個数は T-CNT7#25 よりも T-CNT7#53 の方が多いことが示された。粗大成分の増加によって末梢域まで入る凝集成分も増えるとしたら肺病変の形成に T-CNT7#25 と T-CNT7#53 は異なった影響を示す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

こ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 と MWNT-7 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の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。平成 29 と 30 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⁺) に関しても、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 TiO₂ を貪食したマクロファージや 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 TiO₂ 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 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 8W 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 貪食マク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 TiO₂ の存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、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、膠原線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。

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(0.5 μm)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 貪食マク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 貪食マク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生じると考えられた。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。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 TiO₂ 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 μm 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 ± 74 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、May-Grünwald Giemsa 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 の単離繊維や強靭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靭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靭な 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 の強靭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の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 よりも小さな外来異物の侵入が可能で、肺胞には 1 乃至 2 μm よりも小さな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も大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 よりも小さな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、強靭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よう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-5-3,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 μ m 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-5-3,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-6-2, 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-7-3,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 μ m 程度であった(分担研究:図-7-2,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-7-2,C)、獣毛や肺胞マクロファージの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。」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の単離繊維と強靱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 の強靱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。MWNT-7 貪食における MARCO の関与は平成 29 年度の病理組織学的評価研究での免疫染色の結果でも明確に示された。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 の強靱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-Grunwald 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的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。

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とその σ_g 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塗抹細胞形態学的解析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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

○ [Otsuka K](#), Yamada K, Taquahashi Y, [Arakaki R](#), [Ushio A](#), Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, [Kanno J](#), [Ishimaru N](#). Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

学会発表

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

○ [Yuhji Taquahashi](#), Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and [Jun Kanno](#): Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

○ [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

○ 相磯成敏、佐々木俊明、大西誠、梅田ゆみ、菅野純: 経気道暴露された多層カーボンナノチューブのリンパ路による肺外移送、第 32 回発癌病理研究会、2017 年 8 月 24 日(滋賀県大津市)

○ 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会、2018 年 4 月 28 日(東京)

○ 高橋祐次: ナノ材料の安全性確保に関する生物試験の現状と課題、第 58 回澱粉研究懇談会、招待講演、2018 年 6 月 8 日(静岡県伊東市)

○ 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄: 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響、第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌市)

○ 高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、2018 年 7 月 17 日(大阪)

○ 菅野純: ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018 年 7 月 18 日(大阪)

○ 高橋祐次、相磯成敏、大西誠、石丸直澄、菅野純: マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018 年 7 月

18 日(大阪)

○ 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)

○ 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 年 12 月 3 日(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)

○ 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)

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

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

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

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し