

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  
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: 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。

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、TiO<sub>2</sub> (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、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 TiO<sub>2</sub> 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り、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(Par tFibre 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、マクロファージは線維を分解できずにFrus ta ed 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、Frus ta ed 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。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 Health science、以下NIHS)が行い、解剖と採材には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。また、平成30と令和元年度のNIHSでのBALF採取

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。

モデルナノマテリアルとして球状粒子のTiO<sub>2</sub>、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<sub>2</sub>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、分散化处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年度年に「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TiO<sub>2</sub>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/m<sup>3</sup>)、高用量群(3mg/m<sup>3</sup>)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、病理組織検査用として4匹を割り当てた。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した(図1)。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/m<sup>3</sup>)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、TiO<sub>2</sub>(「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)、TiO<sub>2</sub>30mg/m<sup>3</sup>曝露群、MWNT-73mg/m<sup>3</sup>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、病理組織検査用として3匹を割り当てた(図2)。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した。

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、研究を分担した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/m<sup>3</sup>)、高用量群(3mg/m<sup>3</sup>)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、病理組織検査用に3匹を割り当てた。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した。

上記、年次計画に沿って本分担研究を以下のように実施した。

## B-1 平成29年度の研究

平成29年度のMWNT-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、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。

### B-1-1 病理組織標本作製

吸入曝露実験で採取した肺の組織を定法に従いパラフィン包埋してHE染色標本を作製して病理組織学的解析を行った。高濃度群について型肺胞上皮細胞の増生の解析には型肺胞上皮細胞が産生するsurfactant protein C(SP-C)に対する一次抗体をマーカーとした免疫染色を、MWNT-7貪食マクロファ-

ジの肺内局在の経時的推移の解析にはマクロファージのスカベンジャー受容体のひとつで MWCNT に結合することが報告されている Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO) に対する一次抗体を用いて免疫染色を行った。

免疫染色条件を以下に示した。

- SPC (FL-197): SC-13979、Santa Cruz、希釈倍率 x 200、抗原賦活 Proteinase K 10 分
- MARCO: LSBio-B15006、希釈倍率 x100、室温 1 時間、抗原賦活 Target Retrieval Solution (DAKO)、pH9、10 ~ 20 分
- 二次抗体: シンプルステインマウス組織用 (ニチレイ)
- 発色: DAB (3,3'-ジアミノベンジジン)

#### B-1-2 病理組織学的検査

曝露後 0、1、4、8 週の肺について肺内の MWNT-7 の沈着と組織反応、型肺胞上皮細胞の動き、MWCNT に結合すると報告されているスカベンジャー受容体 MARCO の動きを病理組織学的に検索した。

### B-2 平成 30 - 令和元年度の研究

平成 30 と令和元年度に実施した TiO<sub>2</sub>、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、BALF 採取後の右肺をホルマリンに浸漬固定した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。

また、免疫機能評価用(分担 石丸)に採取した BALF の一部からサイトスピンで塗抹標本作成して、

BALF 細胞(主として肺胞マクロファージ)によるナノマテリアルの貪食状態を形態学的に観察した。

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、100 倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oiliris、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 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。

#### B-2-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

##### B-2-1-(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 3)。

##### B-2-1-(2) 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-2-2 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-2-2-(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-2-2-(2) 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-2-2-(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-2-3 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-TiO<sub>2</sub>、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-2-3-(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細胞当たりに換算した。

##### B-2-3-(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-TiO<sub>2</sub>、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-2-3-(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0.25 $\mu$ m、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-2-4 病理学組織的検索

##### B-2-4-(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TiO<sub>2</sub>、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-TiO<sub>2</sub>、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。

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マテリアル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-2-4-(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、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)を使用した詳細観察を実施した。

#### B-2-5 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倍まで拡大して観察を行った。

(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

### C-1 平成29年度の研究

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胞腔内や肺組織に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。

型肺胞上皮細胞の特異抗体であるSP-Cの免疫染色を行ったが、型肺胞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。MWCNTに結合すると報告されているスカベンジャー受容体MARCOを指標にMWNT-7貪食マクロファージの肺内分布と、その経時的推移を調べた結果、MARCO陽性の肺胞マクロファージは終末細気管支から肺胞管に沿って多く分布した(図2-1.)。経時的推移をみると曝露後0週では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後4週と8週には終末細気管支から肺胞管に集中していた。

MWNT-7 を多量に貪食した肺胞マクロファージは胞体が膨化してMARCO免疫染色の発色が減弱したもののや、萎縮して痕跡程度の発色ものが認められた(図 2-2.)。

## C-2 平成 30 - 令和元年度の研究

### C-2-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

#### C-2-1-(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 3)。

#### C-2-1-(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-2-2 病理組織標本の作製

以下の標本を作製した。

#### C-2-2-(1) 肺の還流固定標本

#### C-2-2-(2) 肺の浸漬固定標本

#### C-2-2-(3) 縦隔の病理組織標本

### C-2-3 BALF 塗抹の検索

#### C-2-3-(1) 白血球分画(白血球百分比)

##### TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)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 4)。

##### 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 4)。

##### 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 4)。

#### C-2-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の経時的推移

##### TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)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 TiO<sub>2</sub>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 4 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 4 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 4 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-2-3-(4) BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析

##### TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)曝露群

##### TiO<sub>2</sub>貪食マクロファージと非貪食マクロファージ

TiO<sub>2</sub>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 0.1μm 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 TiO<sub>2</sub>と考えられ、製造メーカー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 5-1 A)。一方、肺胞マクロファージには TiO<sub>2</sub>の貪食を示さないものも認めた。TiO<sub>2</sub>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、TiO<sub>2</sub>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5-1B)。TiO<sub>2</sub>の貪食能を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)、貪食能を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5)。

#### 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3-1C、D)。

#### Type A マクロファージの変性

TiO<sub>2</sub>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5-1E、F)、胞体の輪郭の張りを失って不整な凹凸を示すもの(図5-1G)、など変性所見が認められた。貪食したTiO<sub>2</sub>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5-1G)。これらの所見から、クラスターを形成したものは、クラスター全体が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TiO<sub>2</sub>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5-1H、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5-1O)。

#### Type A マクロファージが他のマクロファージに付着

TiO<sub>2</sub>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、TiO<sub>2</sub>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5-1K、L)。

TiO<sub>2</sub>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5-1P)。

#### 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5-2A、B)。MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージをTiO<sub>2</sub>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5-2B)。

#### 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、TiO<sub>2</sub>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5-2C、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5-2C、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5-2C)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5-2E)



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  $\mu\text{m}$  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 (図 5-2, 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 5-2, 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 $\mu\text{m}$  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 5-2 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 5-2 H) と肺胞マクロファージが鎖状に連なったもの (図 5-2 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 がプレドミナントで、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 5-3 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 5-3, 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 5-3 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 の細かい 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 5-3 H)。

このタイプのマクロファージは図 5-3 I に示したマクロ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 5-3 J, K)。

MWCNT-N ではこうした二つのタイプのマクロ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 5-3 J、K)。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 T-CNTN がび漫性に付着している様子が認められた(図 5-3 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ーは認められなかった。

#### C-2-4 病理学的解析

##### C-2-4-(1) 肺の病理組織学的検査

TiO<sub>2</sub> (T-TiO<sub>2</sub>) 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> を貪食したマクロファージが散見され(図 6-1 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<sub>2</sub> 粒子を認めた(図 6-1 A 右)。

灌流固定をした曝露後 8 週の肺には TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージの残留はほとんど認められず(図 6-1 B 左)、拡大を上げて対物 100 倍で観察しても TiO<sub>2</sub> 貪食したマクロファージと TiO<sub>2</sub> 粒子を僅かに肺組織に認めただけであった(図 6-1 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<sub>2</sub> の方が多く、曝露後 8 週の TiO<sub>2</sub> 値は MWNT-7 の 3 倍であることが示された(図 6-1 C)。

##### TiO<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> 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 6-1 D 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<sub>2</sub> 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 6-1 D)。

##### 肺内に残留した TiO<sub>2</sub>

粗造化した肺胞壁の表層に TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが径 0.7 μm の細胞突起を伸ばして付着する(図 6-1 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 6-1 E、F)。

##### TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージによる肉芽腫性病変

TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> を包含した病変部は、将来、TiO<sub>2</sub> を埋め込んで器質化されると考えられた(図 6-1 G)。

##### TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが径 0.6 μm の突起を伸ばして接合している所見が認められた(図 6-1 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 6-2 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 6-2 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 6-2 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 6-2 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 6-2 L)。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 6-2 M)。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 40 $\mu$ m の集簇塊が認められた(図 6-2 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 1 $\mu$ m 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 6-2 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 $\mu$ m、短径 60 $\mu$ 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 6-2 O)。この集簇巣にも約 1 $\mu$ 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 6-2 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 $\mu$ 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 6-2 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 6-2Q)。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。後述の縦隔への肺泡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(図 6-2R)。

#### 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 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、細気管支から肺泡管に至る領域で複数の肺泡マクロファージが 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。

##### 細気管支内での肺泡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泡管に MWCNT-N を囲んだ肺泡マクロファージの集簇巣(図 6-3 A、B、C)を認め、小型の集簇巣(図 6-3B、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 6-3B、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 $\mu$ m の細線維が繋ぐ所見が認められた(図 6-3C)。

不定形混濁沈着物のなかで比較的大きなものは断面が底辺 13 $\mu$ m、高さ 6 $\mu$ m の三角形を呈する T-CNTN の凝集塊(図 6-3D)、小さなものでは断面が底辺 8 $\mu$ m、高さ 3 $\mu$ m 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 6-3F)。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 6-3G)。

#### C-2-4-(2) 縦隔の病理組織学的検査

##### TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)曝露群

##### 炎症性変化

TiO<sub>2</sub>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 TiO<sub>2</sub> 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 7-1 A、B)。細い線維に付着した TiO<sub>2</sub> 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 7-1 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 7-2 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 $\mu$ m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7-2 C(右上)に示した獣毛の断面の径は20 $\mu$ m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7-2 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7-2 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7-3 E)。

#### C-2-5 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7-3 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ク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多角的解析をおこなった。

### D-1 粒子状ナノマテリアル

#### TiO<sub>2</sub> 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TiO<sub>2</sub>を貪食したマクロファージやTiO<sub>2</sub>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TiO<sub>2</sub>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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub> 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。

#### 肺胞域での病理組織学的変化

肺内に残存したTiO<sub>2</sub>の所在を顕微鏡の対物レンズを40倍から100倍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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub>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<sub>2</sub>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 TiO<sub>2</sub> が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

### TiO<sub>2</sub> を暴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 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。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 TiO<sub>2</sub> 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 TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが器質化されて、それを足場として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/m<sup>3</sup> の濃度で 1 日に 2 時間の暴露を週 1 回、5 週間にわたって繰り返したもので、1 週間に 2 時間の暴露を 1 回行う程度であれば、次週の暴露までの間に 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。

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、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気に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。粗大で強靱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 のラット吸入暴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 を暴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、May-Grünwald Giemsa 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。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 5μm 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。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。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 よりも細い狭義の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。

Type B マクロファージによる繊維幅が 100 nm よりも細い繊維状ナノマテリアルの集団処理の状況は、不織布状の製品を分散化処理によってナノファイバーにした MWCNT-N (T-CNT-N) の吸入曝露実験での BALF 塗抹の詳細な観察においても、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 よりも細い狭義の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。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。MWNT-7 の場合、繊維径が 100nm よりも小さいナノファイバーが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占める (T. Ksai, *et.al.*, 2014) 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 TiO<sub>2</sub>、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 (図 7-4)。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 TiO<sub>2</sub> 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 種類モデル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、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。ナノマテリアルによる生体影響を形態学的に研究するにあたっては、今後、縦横高さのいずれかが 100 nm よりも小さな狭義のナノマテリアルの影響に目を向ける必要がある。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 論文発表

Senoh H, Kano H, Suzuki M, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S, Fukushima S: Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. Journal of occupational health 2017, Mar 28;59(2):112-121.

### 学会発表

○ 相磯成敏、佐々木俊明、大西誠、梅田ゆみ、菅野純: 経気道曝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)

梅田ゆみ、笠井辰也、山野荘太郎、高信健司、齋藤美佐江、妹尾英樹、相磯成敏、菅野純: アナターゼ型ナノ酸化チタンの 13 週間吸入曝露によるラット肺胞上皮の増殖性変化、第 33 回発癌病理研究会、2018 年 8 月 29 日(静岡県御殿場市)

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、山野壯太郎、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 <sub>2</sub> (T-TiO <sub>2</sub> )		MWNT-7 (T-CNT7)	
結晶形	アナターゼ	繊維径	7 - 170 nm
TiO <sub>2</sub> 含量	98 %	繊維長	1 - 19 μm
一次粒径	30 nm	分散処理検体の形状	太さの強弱な単離繊維と強弱な凝集体が混在
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貫通
比表面積	52 cm <sup>2</sup> /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 病理検査結果 (H29年度)

	曝露後			
	0週	1週	4週	8週
MWNT-7の肺内沈着	+	+	+	+
II型肺胞細胞の増生	-	-	-	-
急性炎症	-	-	-	-
線維化	-	-	-	-
肉芽腫	-	-	-	-
BALTの増加	-	-	-	-

(+: 当該所見あり -: 当該所見なし)

- MWNT-7の肺内沈着以外に明確な病態は認められなかった。
- MWNT-7の肺内沈着は全期間を通して認められ、肺胞マクロファージに貪食されたものと、貪食されていないものが存在した。
- 気道終末部と肺動脈接合部を中心とした領域には、多量のT-CNT7を貪食した肺胞マクロファージが多く存在した。

表3 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 <sup>3</sup> )	TiO <sub>2</sub> (30mg/m <sup>3</sup> )		MWNT-7 (3mg/m <sup>3</sup> )		群名称 (曝露濃度)	対照群 (0mg/m <sup>3</sup> )	MWCNT-N (0.6mg/m <sup>3</sup> )		MWCNT-N (1.3mg/m <sup>3</sup> )	
		平均	SD	平均	SD			平均	SD	平均	SD
OW	注入量(ml)	2.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.6	0.06	1.6	0.02	1.7	0.09	1.6	0.07	1.6	0.04
	回収率(%)	78.7	3.21	80.0	0.87	87.3	4.73	82.2	4.16	81.7	3.62
1W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-
	回収量(ml)	1.3	0.09	1.4	0.03	1.3	0.06	1.3	0.10	1.4	0.11
	回収率(%)	82.3	5.32	88.8	1.57	83.8	3.77	84.5	4.77	89.2	1.89
4W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-
	回収量(ml)	1.3	0.13	1.3	0.03	1.3	0.07	1.3	0.06	1.7	0.16
	回収率(%)	80.0	8.20	83.5	2.01	81.8	4.07	85.8	2.89	82.8	0.58
8W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-
	回収量(ml)	1.2	0.25	1.4	0.06	1.4	0.05	1.4	0.01	1.7	0.04
	回収率(%)	75.4	15.52	85.2	3.77	87.1	2.89	88.3	0.58	84.8	2.25

表4 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 <sup>3</sup> )	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 <sub>2</sub> (34.8mg/m <sup>3</sup> )	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 <sup>3</sup> )	OW	3	99.2	0.3	0.4	0.0	0.1	100.0
	1W	3	99.8	0.0	0.2	0.1	0.0	100.0
	4W	3	98.0	1.1	0.8	0.2	0.1	100.0
	8W	3	99.2	0.8	0.1	0.1	0.0	100.0
MWCNT-N (1.3mg/m <sup>3</sup> )	OW	3	99.8	0.3	0.1	0.0	0.0	100.0
	1W	3	99.9	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 <sup>3</sup> )	OW	3	99.6	0.1	0.3	0.0	0.1	100.0
	1W	3	99.6	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5 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

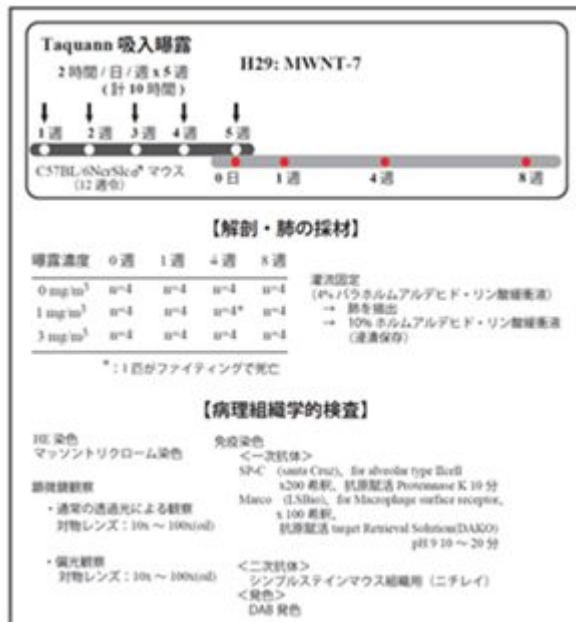
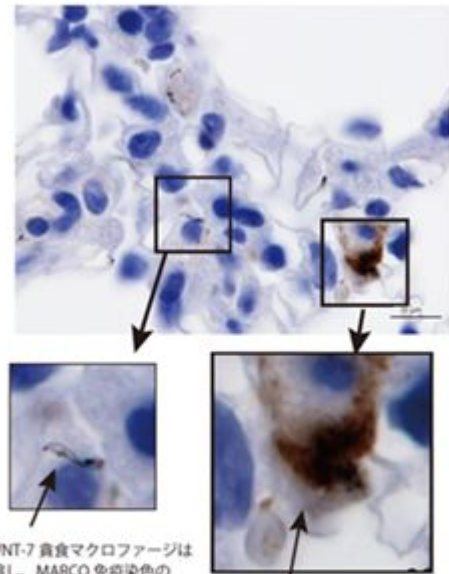


図1 実験デザイン (H29年度)



MWNT-7 貪食マクロファージは萎縮し、MARCO免疫染色の発現も痕跡程度。

肺マクロファージは肥化して不定形となる。MARCO免疫染色の発現は胞体内でびまん性に広がり鮮明さを欠く。

図2-2 病理組織学的検査：MARCO免疫染色

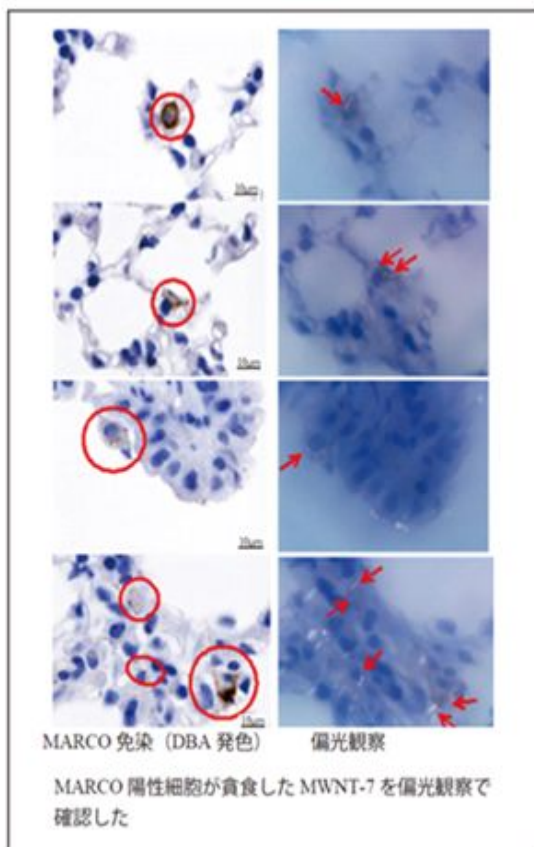
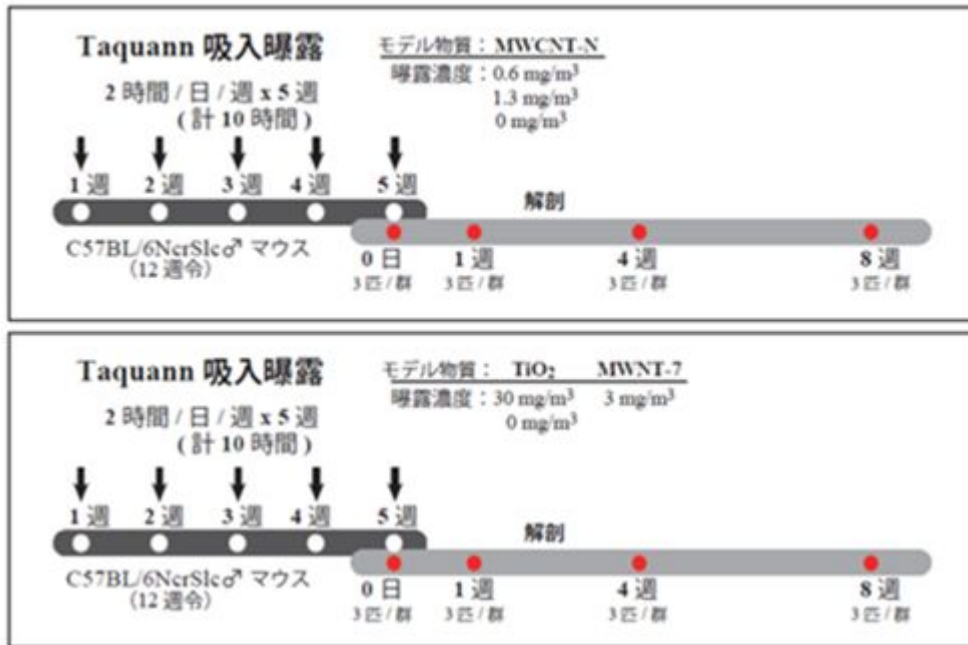


図2-1 病理組織学的検査：MARCO免疫染色



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 塗抹標本でのマクロファージの形態観察

- ・ 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 2000 倍相当)、露出を変化させた観察を実施。

図 3 実験デザイン

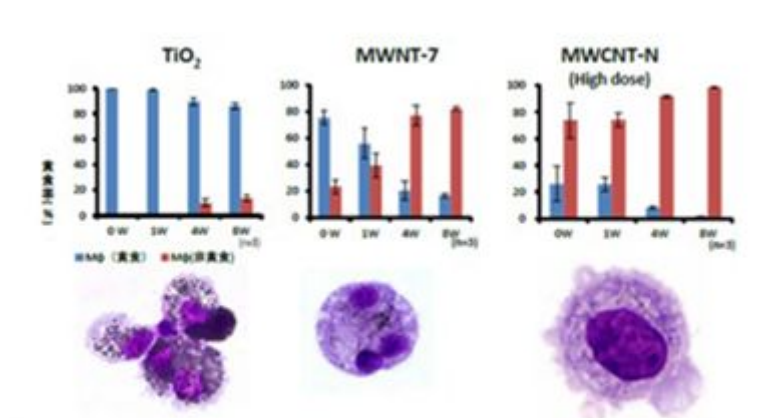
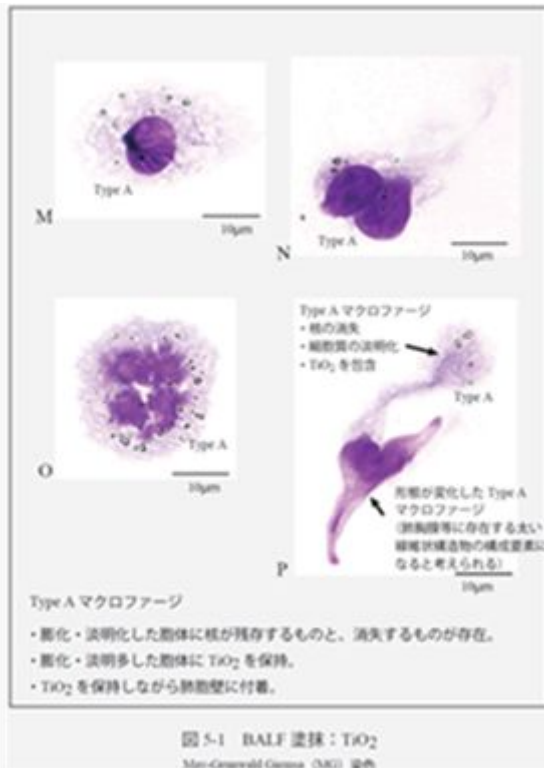
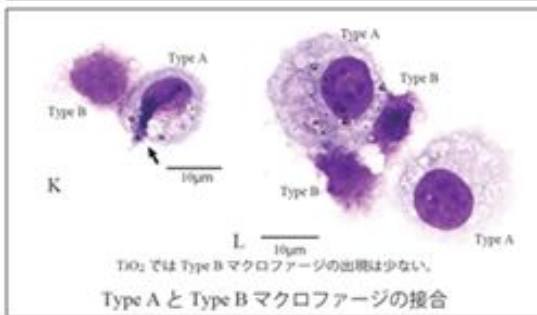
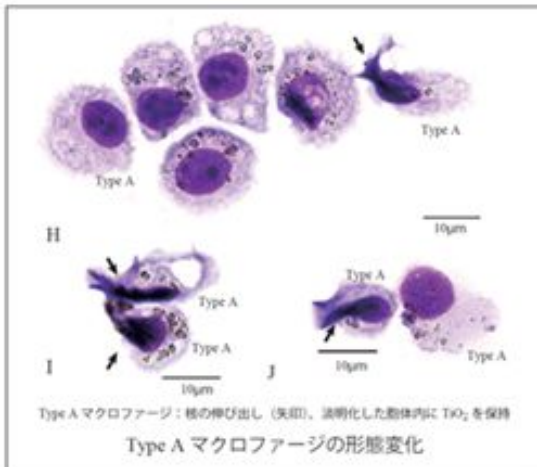
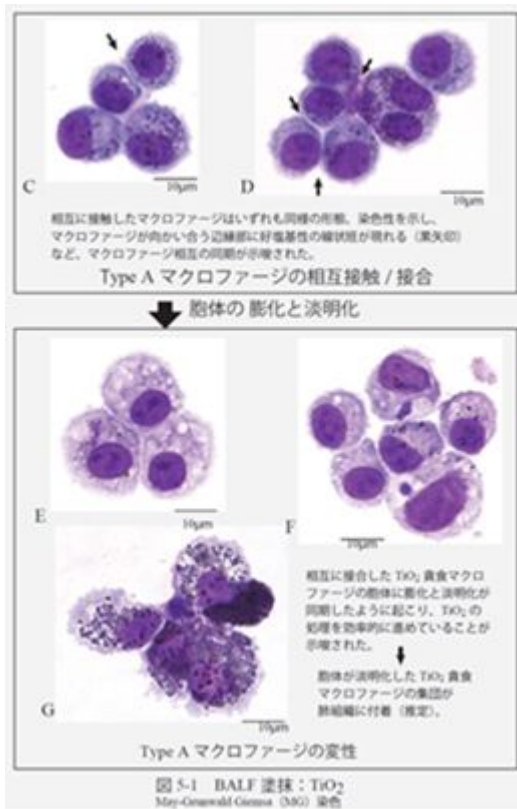
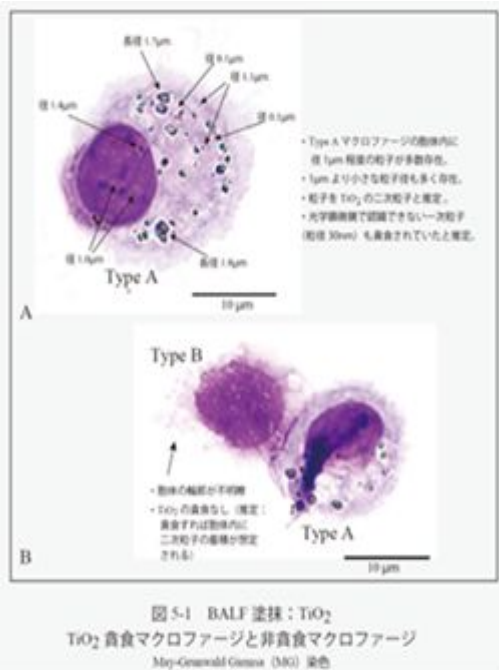
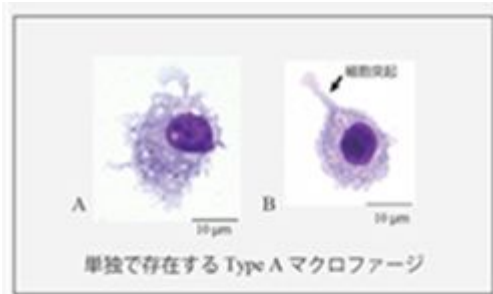
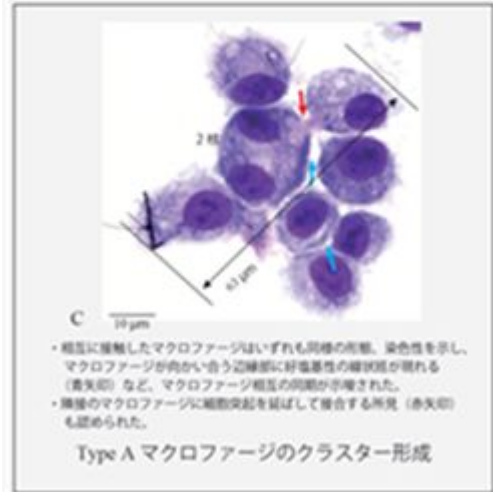


図 4 マクロファージの検体食食率の経時的推移





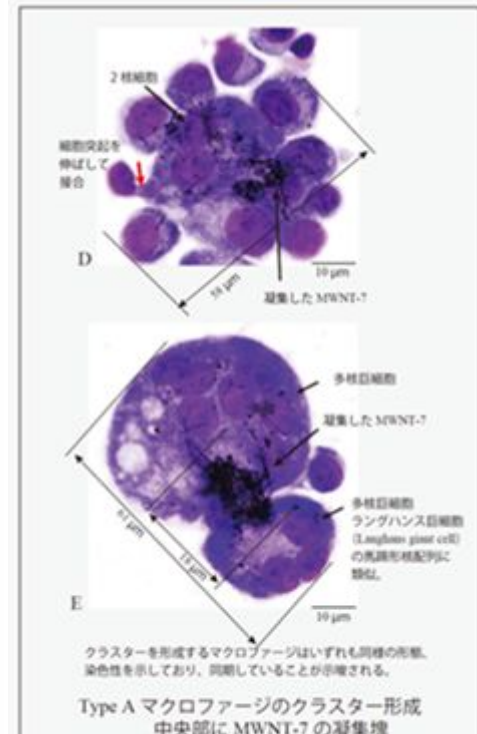
単独で存在する Type A マクロファージ



- 相互に接触したマクロファージはいずれも同様の形態、染色性を示し、マクロファージが向かい合う辺縁部に好塩基性の線状物が現れる（黒矢印）など、マクロファージ相互の同期が示唆された。
- 隣接のマクロファージに細胞突起を伸ばして接合する所見（赤矢印）も認められた。

Type A マクロファージのクラスター形成

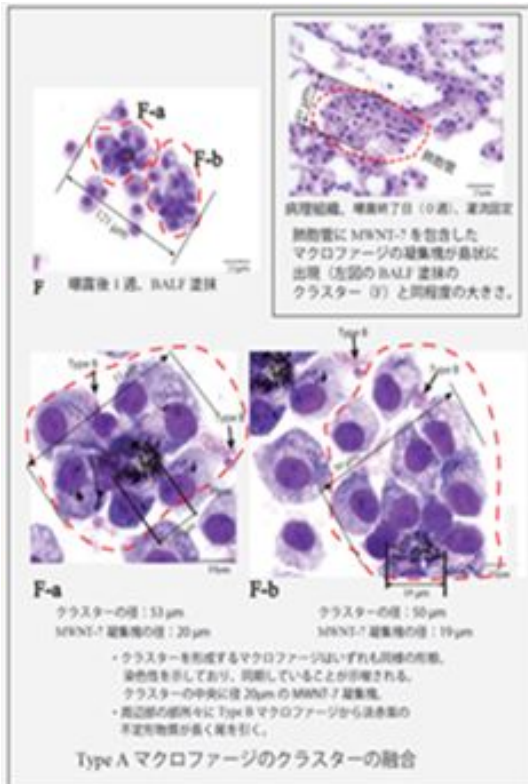
図 5-2 BALF 塗抹：T-CNT7  
May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



クラスターを形成するマクロファージはいずれも同様の形態、染色性を示しており、同期していることが示唆される。

Type A マクロファージのクラスター形成  
中央部に MWNT-7 の凝集塊

図 5-2 BALF 塗抹：MWNT-7  
May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



F 曝露後 1 週、BALF 塗抹

病理組織、曝露終了日（0 週）、凍結固定  
肺動脈に MWNT-7 を包含した  
マクロファージの凝集塊が鼻状に  
出現（左図の BALF 塗抹の  
クラスター (F) と同程度の大きさ）。

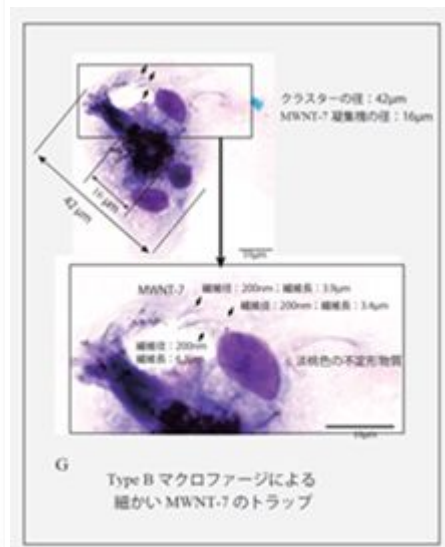
F-a クラスター径：53 μm  
MWNT-7 凝集塊径：20 μm

F-b クラスター径：50 μm  
MWNT-7 凝集塊径：19 μm

- クラスターを形成するマクロファージはいずれも同様の形態、染色性を示しており、同期していることが示唆される。
- クラスターの中核に径 20 μm の MWNT-7 凝集塊。
- 周辺部の箇所々に Type B マクロファージから淡赤色の不定形物質が鼻く突起を引く。

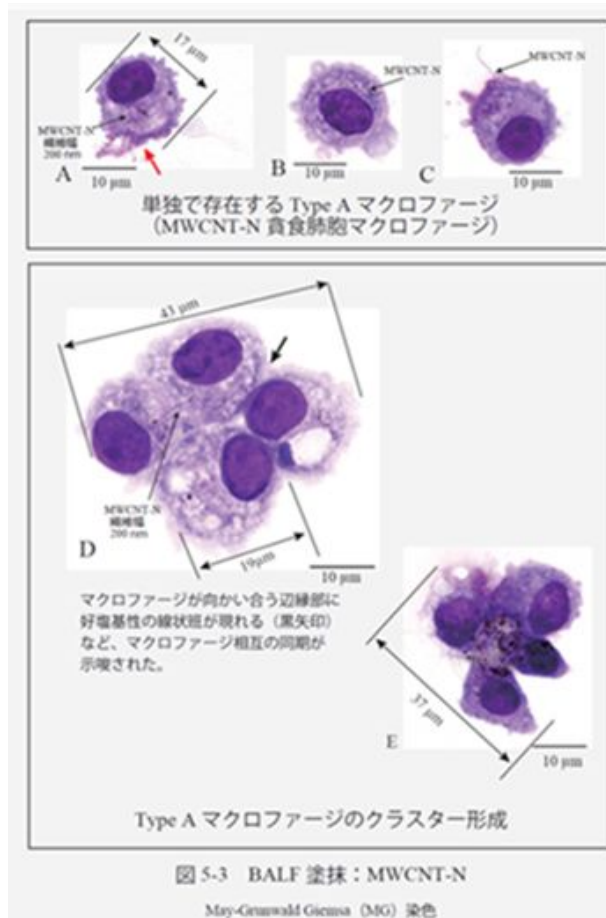
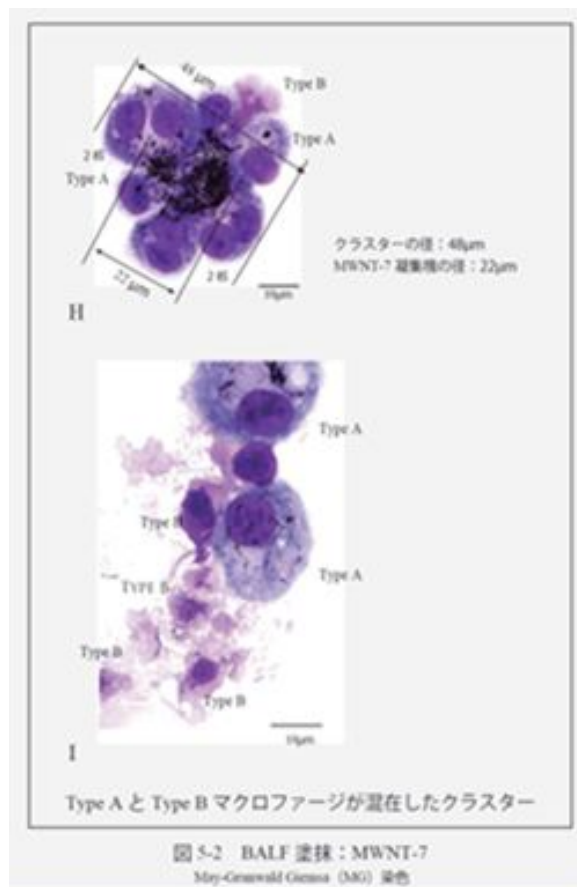
Type A マクロファージのクラスターの融合

図 5-2 BALF 塗抹：MWNT-7  
May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



Type B マクロファージによる  
細かい MWNT-7 のトラップ

図 5-2 BALF 塗抹：T-CNT7  
May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



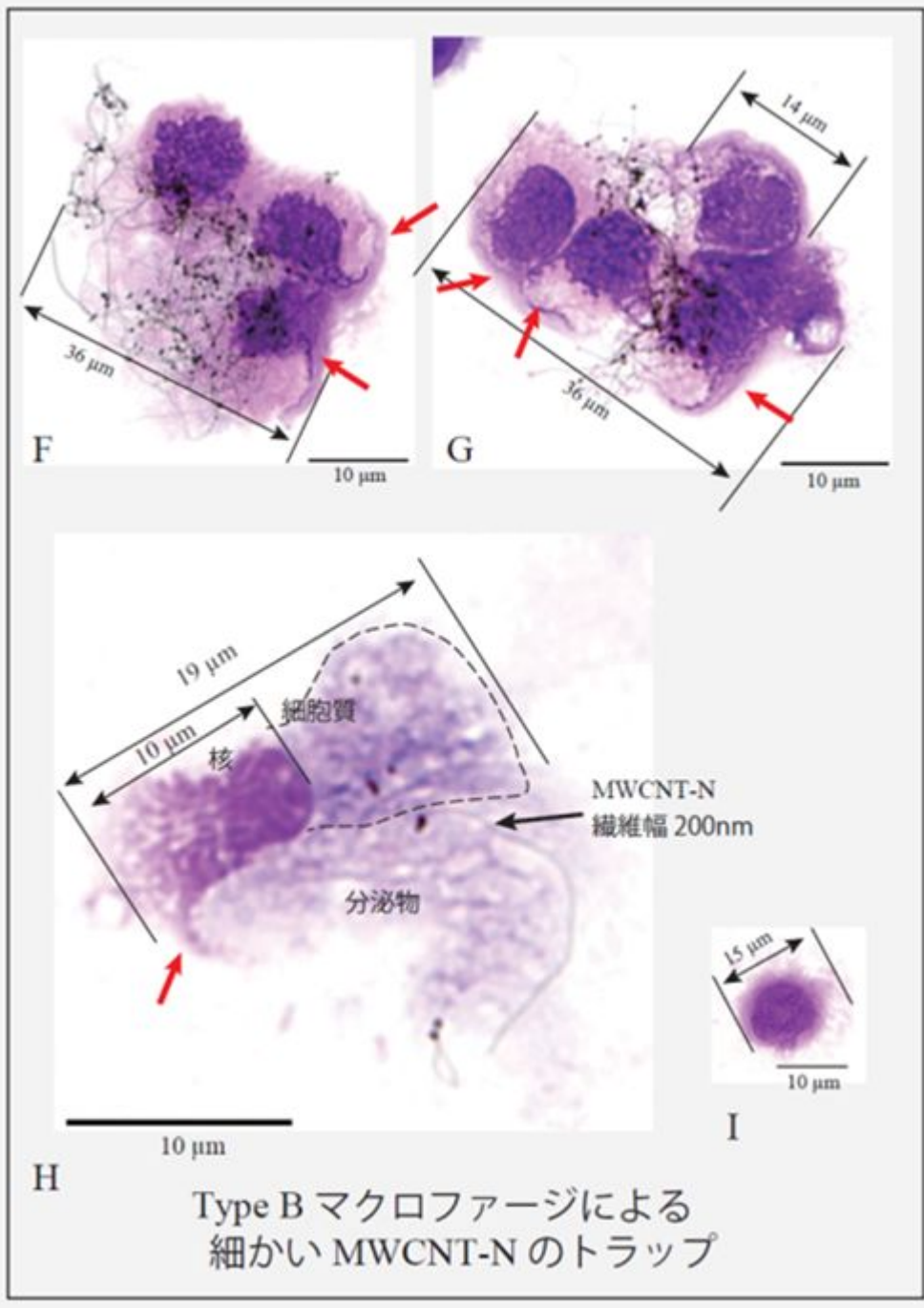


図 5-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

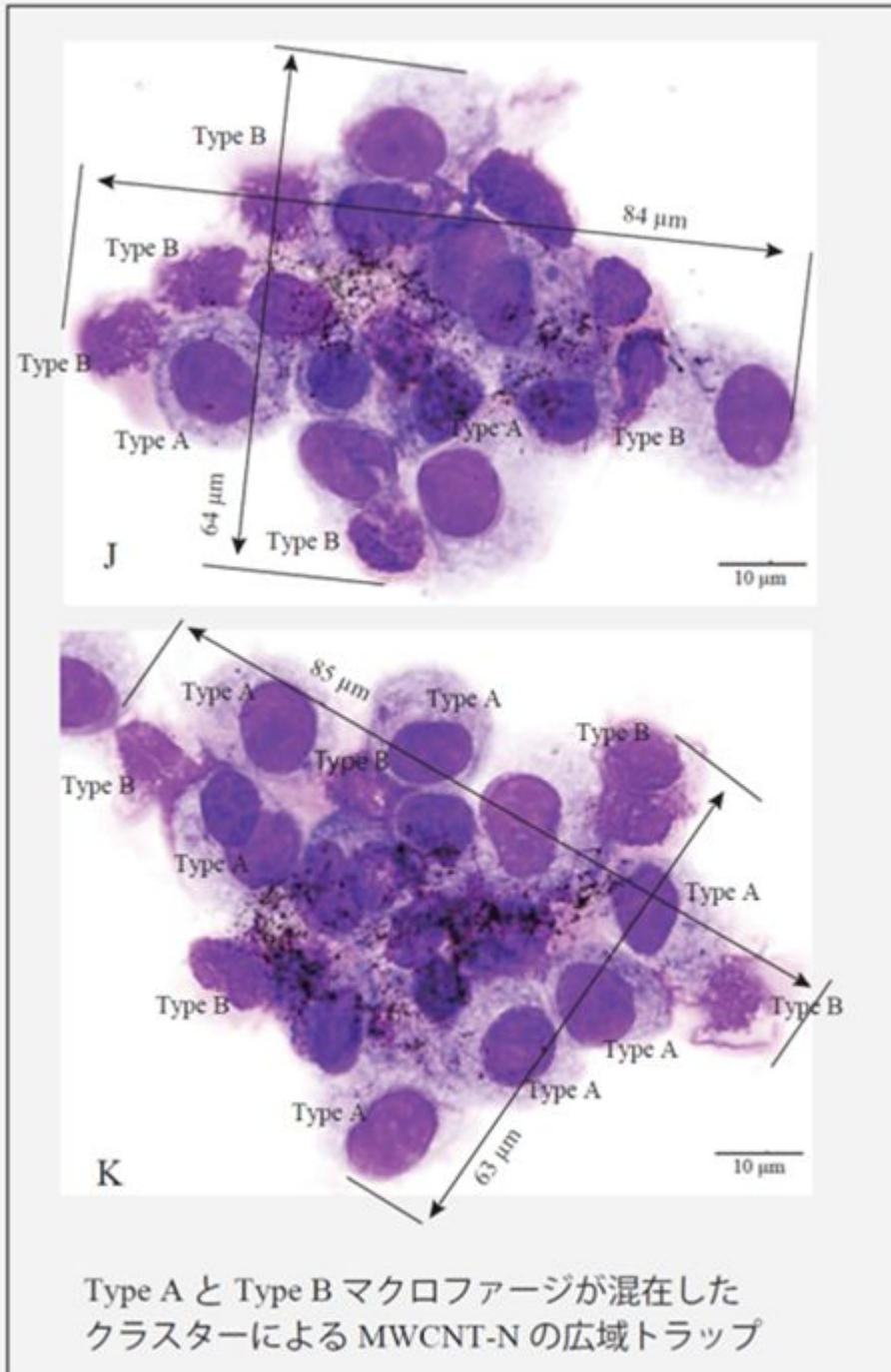


図 5-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色



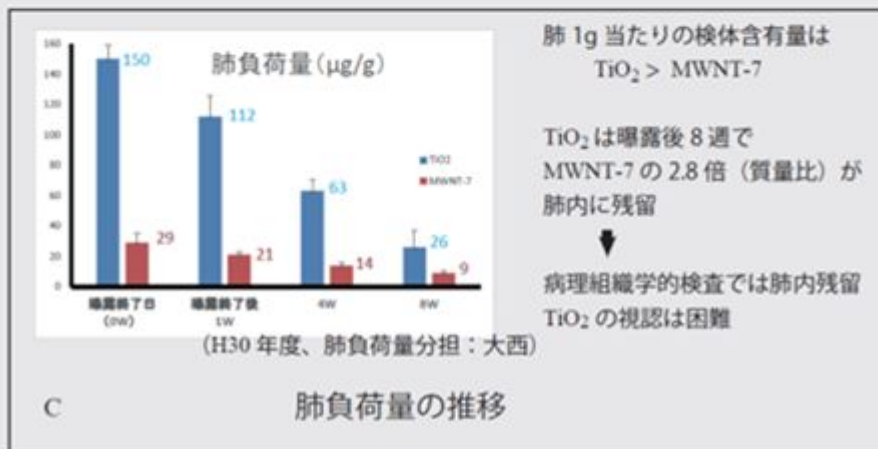
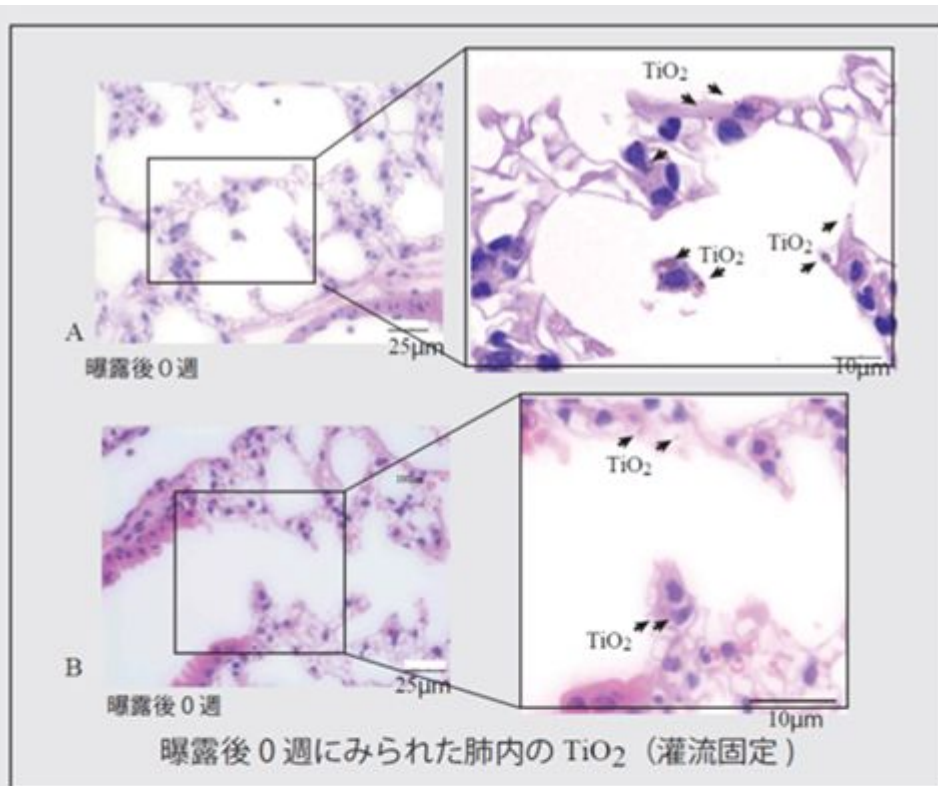
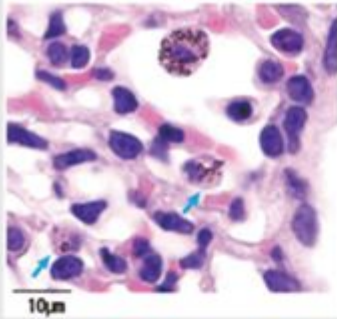
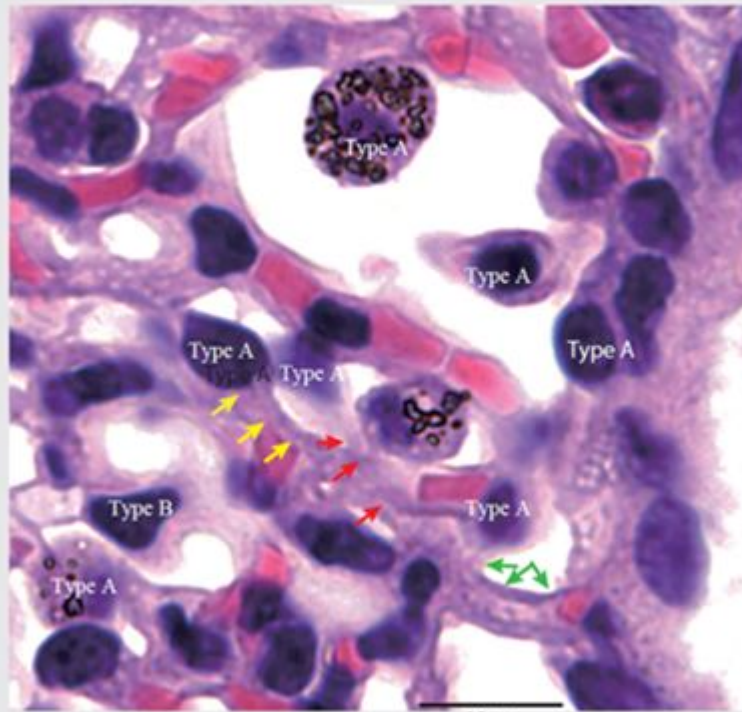


図 6-1 病理組織：TiO<sub>2</sub>



- ・光学顕微鏡下で視認できる肺内残留 TiO<sub>2</sub> は MENT-7 と比べて極めて少ない。
- ・TiO<sub>2</sub> 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)

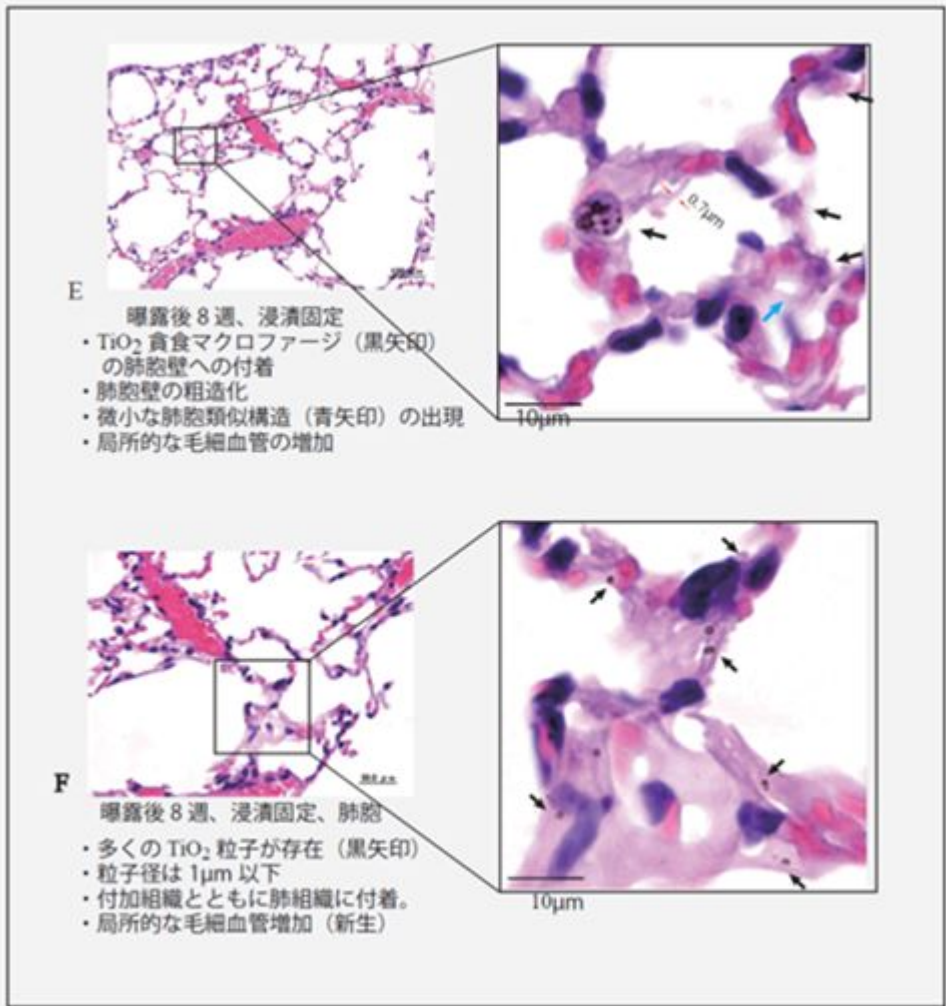


D

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 TiO<sub>2</sub> 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

TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージ (Type A) の肺胞域への固着

図 6-1 病理組織: TiO<sub>2</sub>



肺内に残留した  $\text{TiO}_2$

図 6-1 病理組織： $\text{TiO}_2$

曝露後0週、  
浸漬固定、細気管支-肺胞

- ・径 100nm 程度の粒子まで認識できた
- ・光学顕微鏡で認識できない一次粒子 (径 30nm) も含まれる推察された。

↓ (推定)

- ・TiO<sub>2</sub> を埋め込んだ状態で器質化の機転を辿る。

G 図左上 (h-1) と同一病変 10µm

**TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージによる肉芽腫性病変**

- ・TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが細い突起で細気管支上皮に接合。

↓

- ・TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが壊死して細気管支上皮から剥離、もしくは細気管支上皮の turnover の際上皮とともに剥離して mucociliary escalation によって排泄される (推測)。

H 曝露後8週、浸漬固定、細気管支 10µm

**TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージの細気管支上皮への接合**

図 6-1 病理組織：TiO<sub>2</sub>

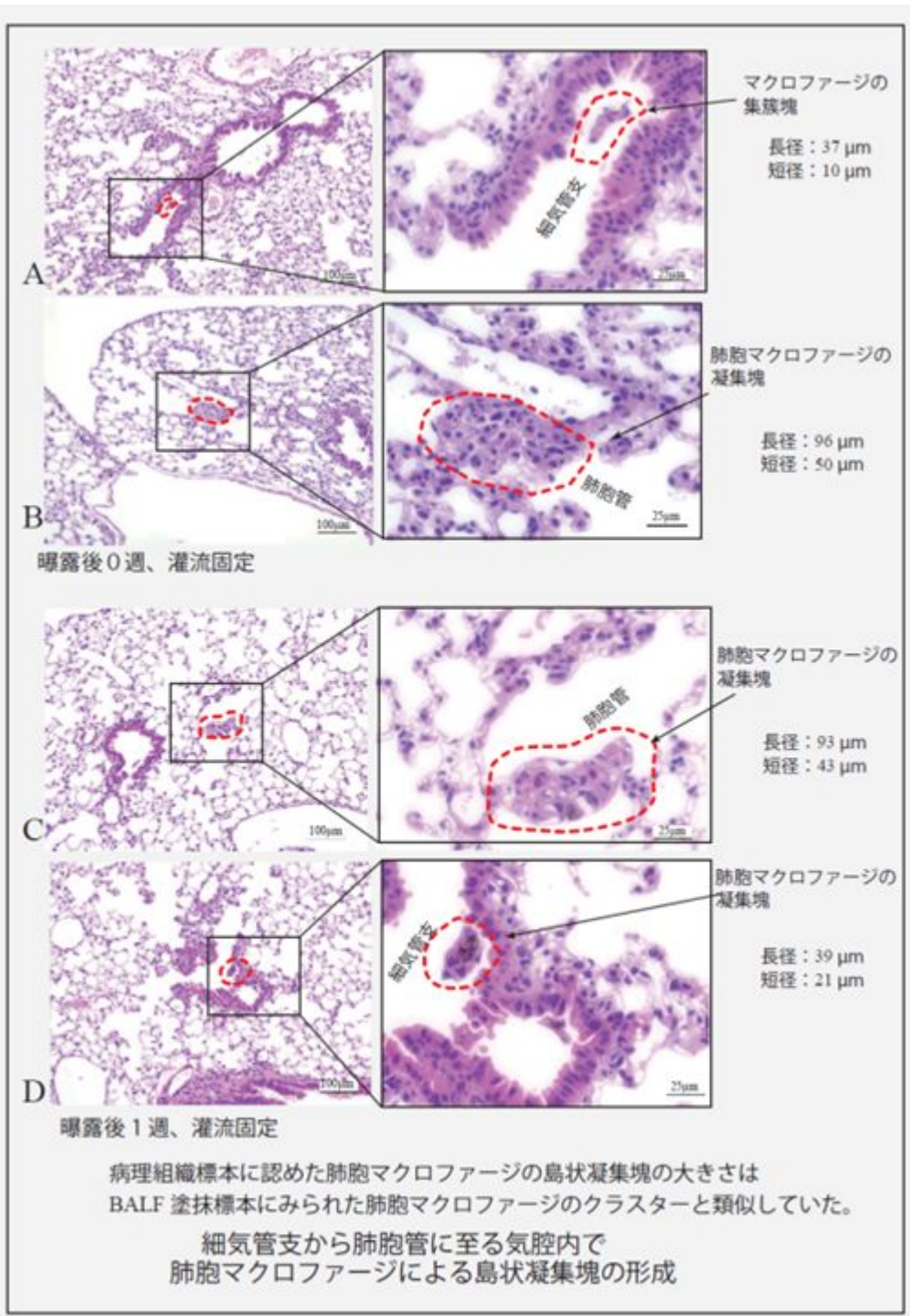


図6-2 病理組織：MWNT-7

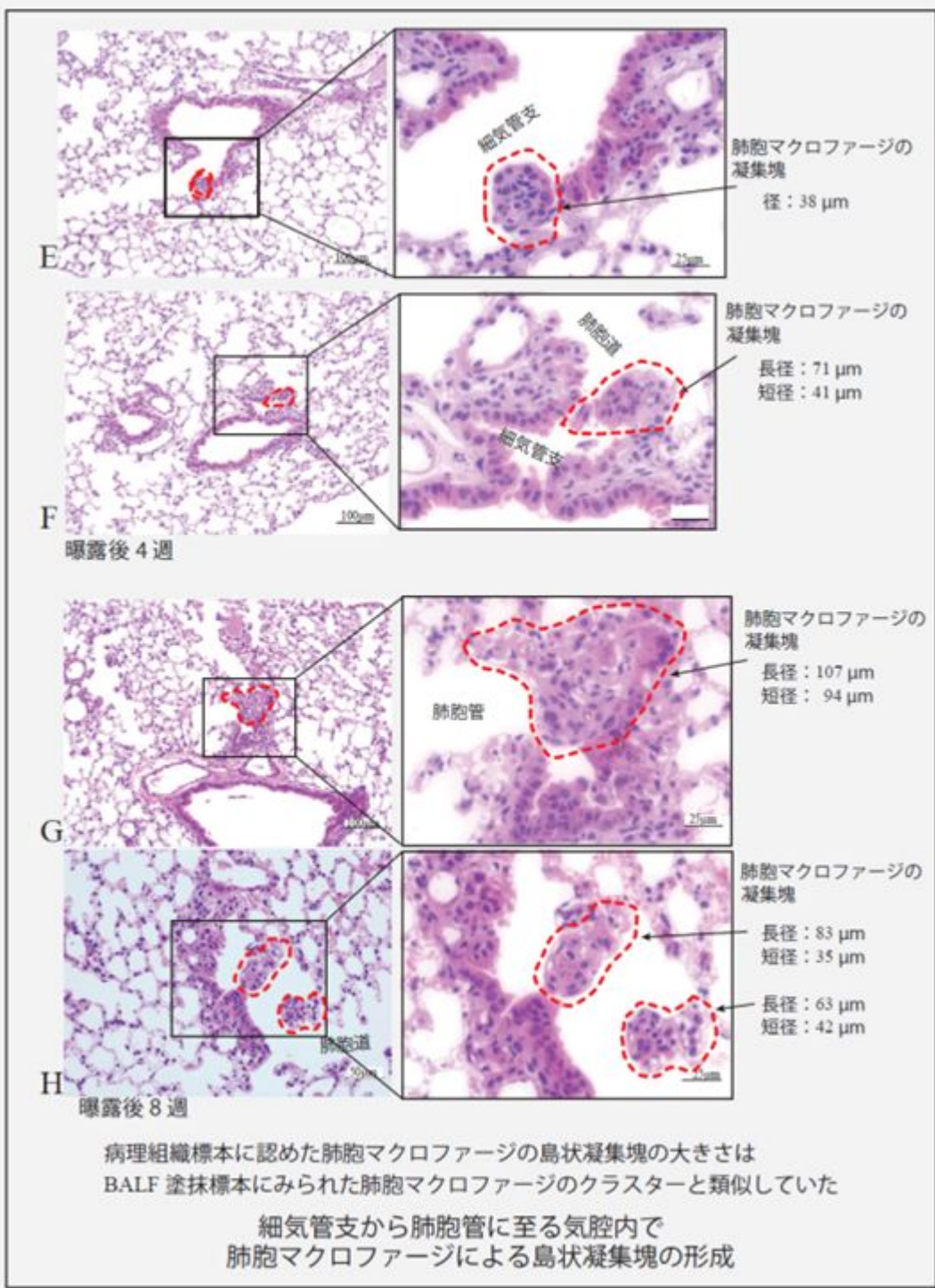
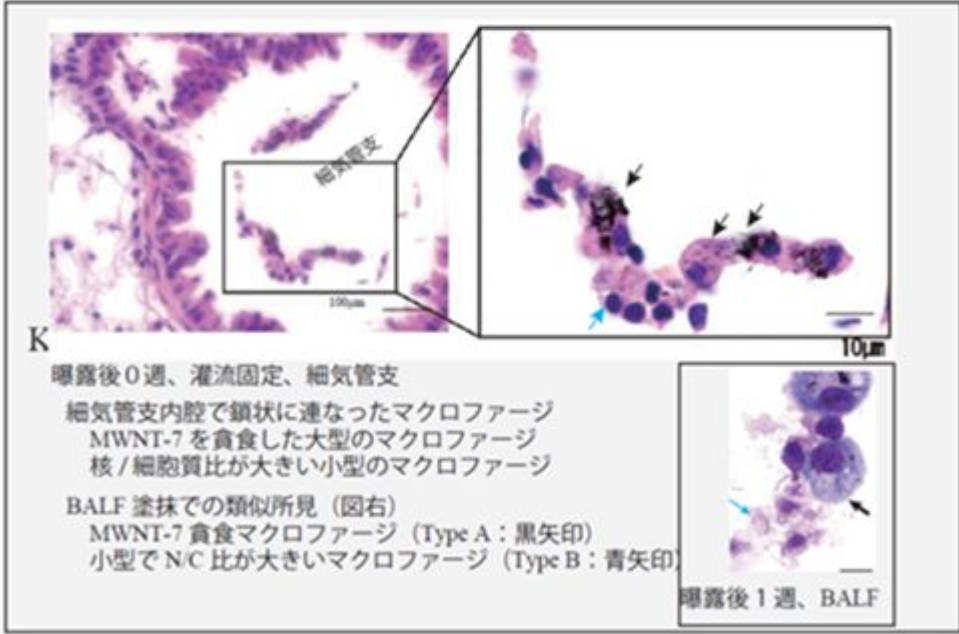
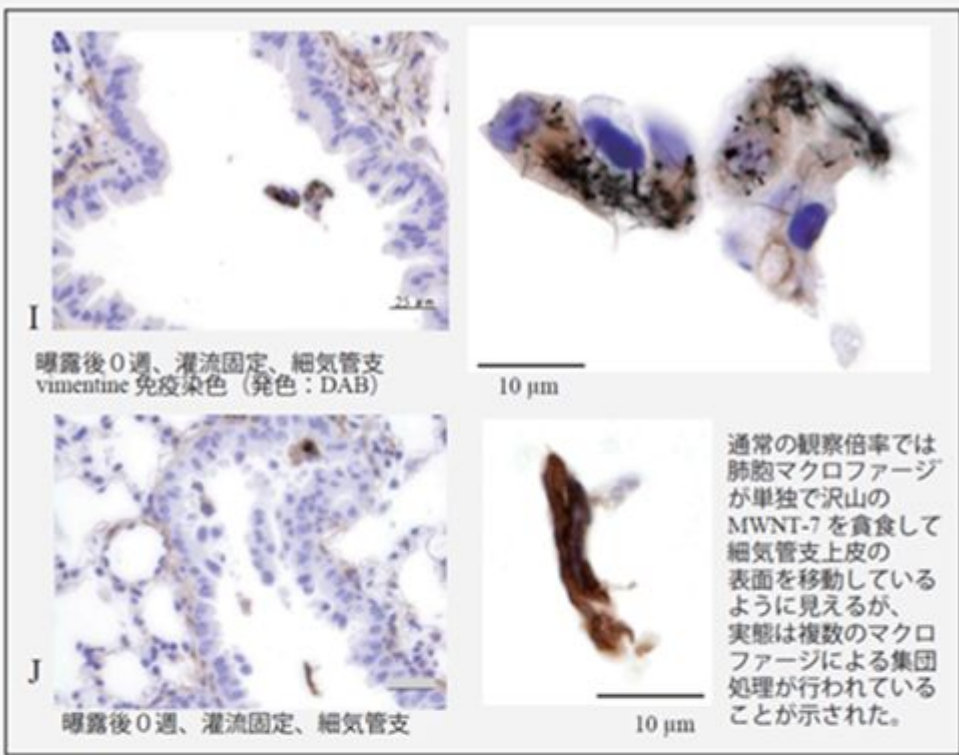
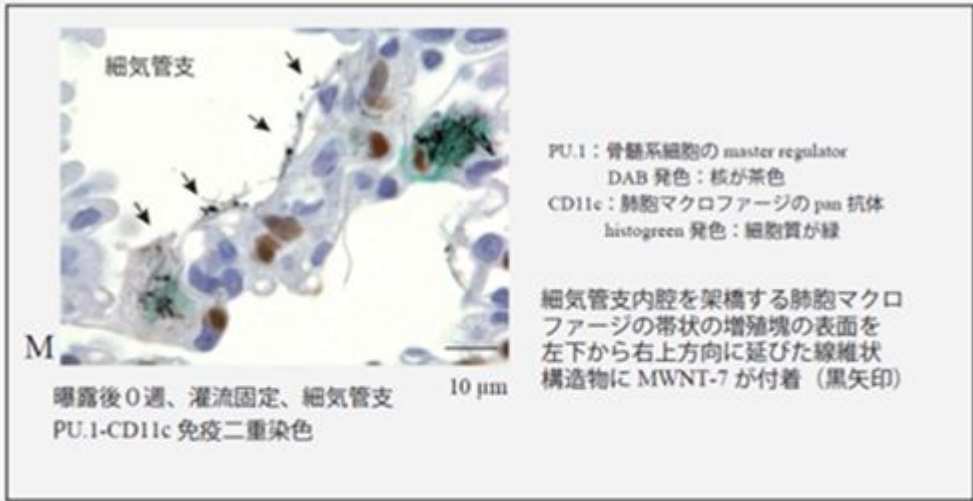
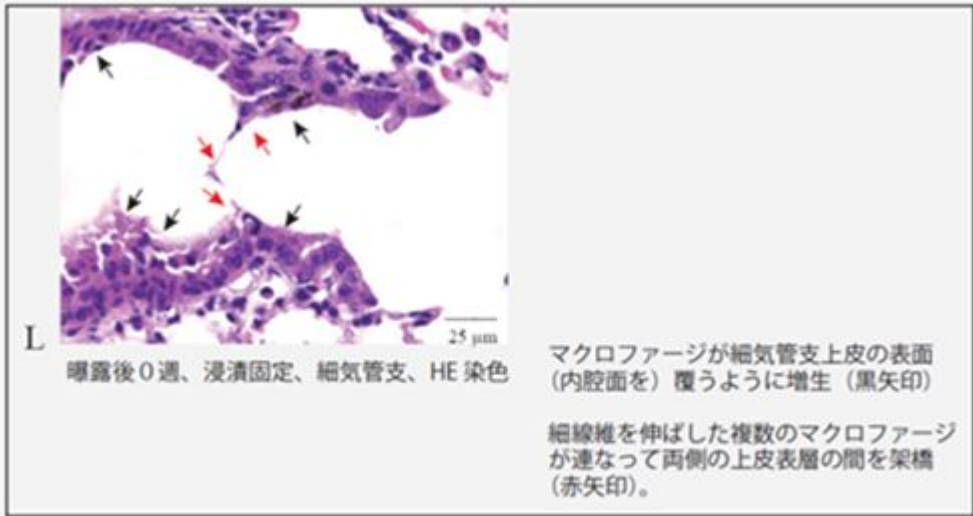


図 6-2 病理組織：MWNT-7



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

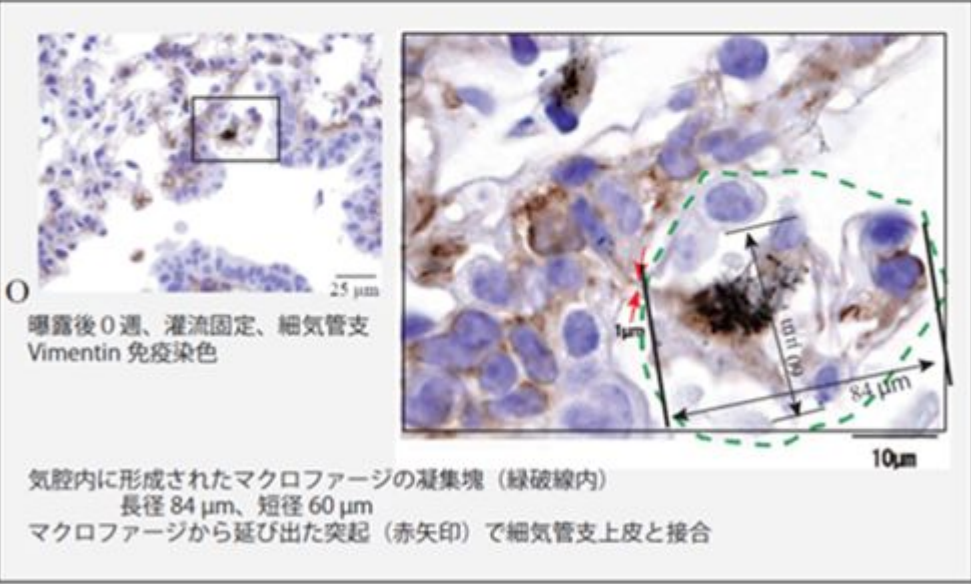
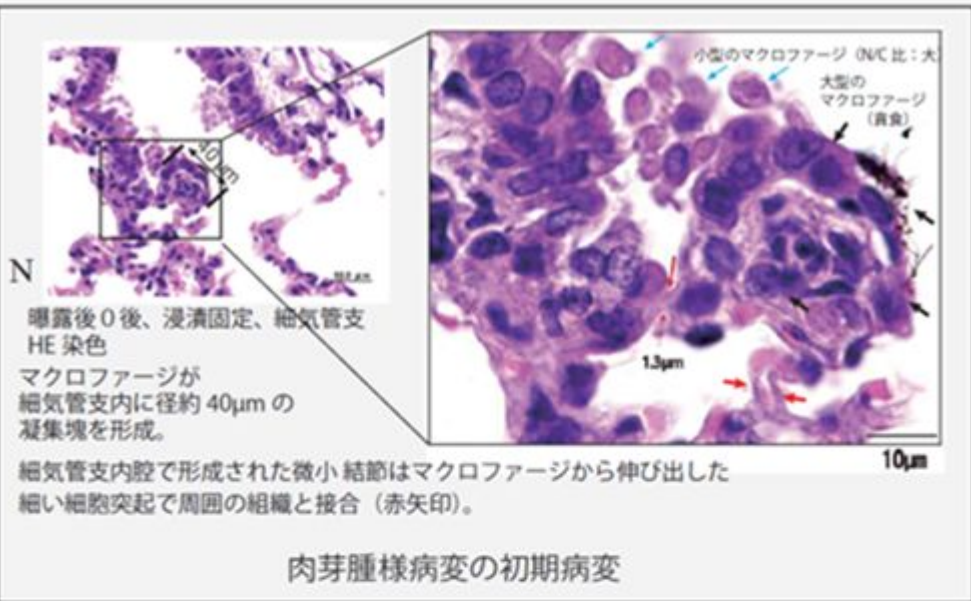
図 6-2 病理組織: MWNT-7



肺胞マクロファージの増生による細気管支内腔の架橋

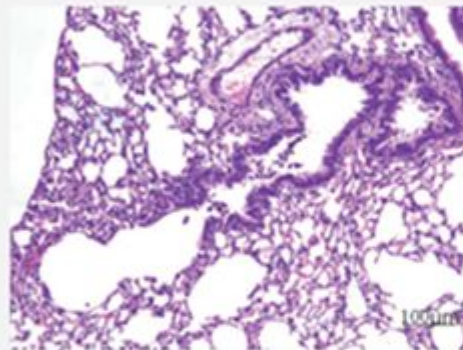
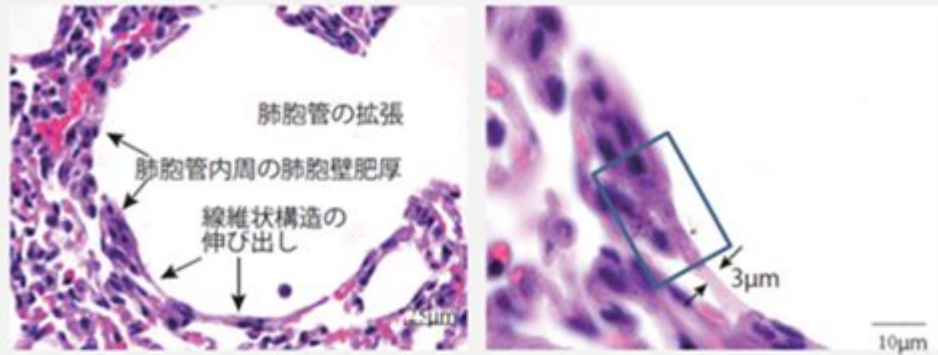
図 6-2 病理組織: MWNT-7



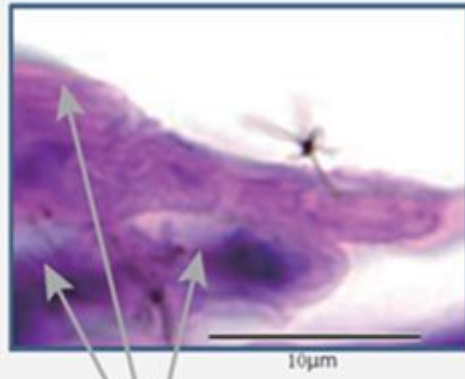


細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

図 6-2 病理組織：MWNT-7



P 曝露後 0 週、浸漬固定、肺胞管



煙のような淡灰色の不定形物質が肺組織にオーバーラップ、インク染みのように広がる。  
 (MWNT-7 曝露群の肺や縦隔に同様の沈着所見が認められた  
 → 細かな繊維状ナノマテリアルがトラップされた菲薄なフィルム状の不定形物質が肺胞壁に付着していると推察 (この症例では MWNT-7 がトラップされていると推察)

肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質 (MWNT-7) の沈着

図 6-2 病理組織：MWNT-7

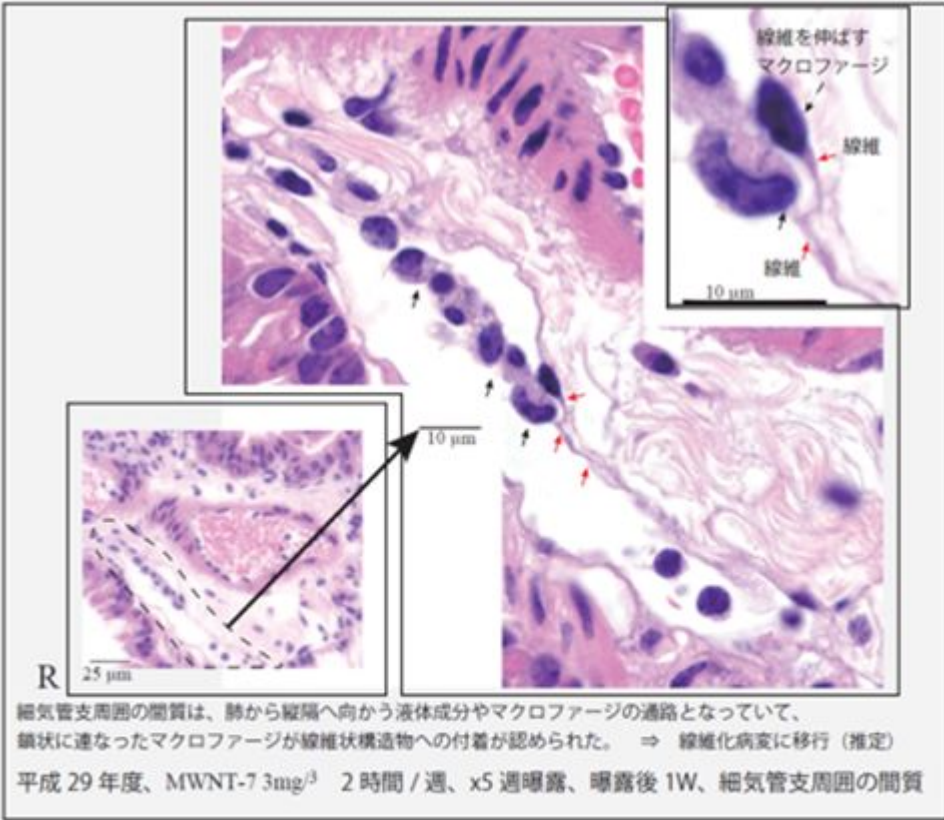
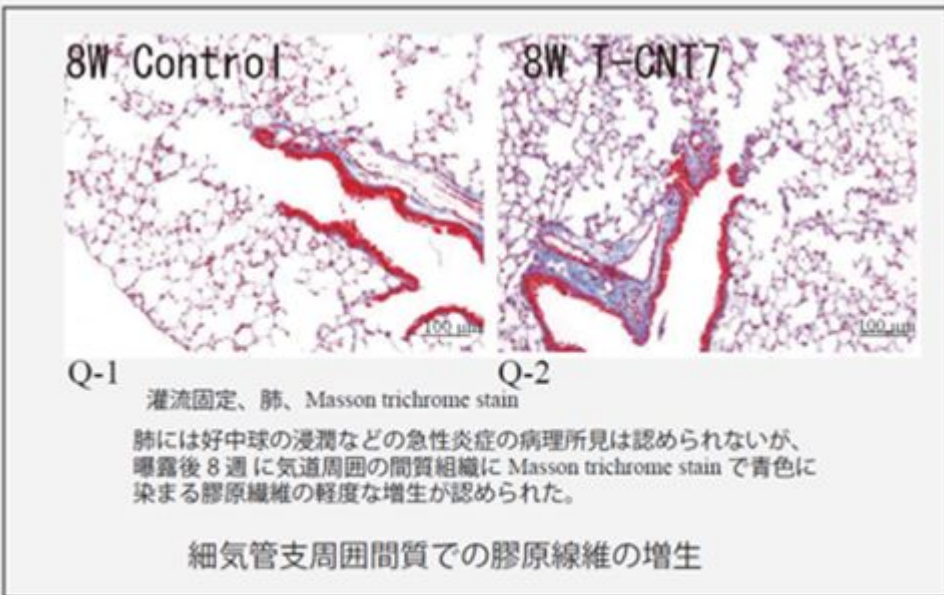


図 6-2 病理組織：MWNT-7

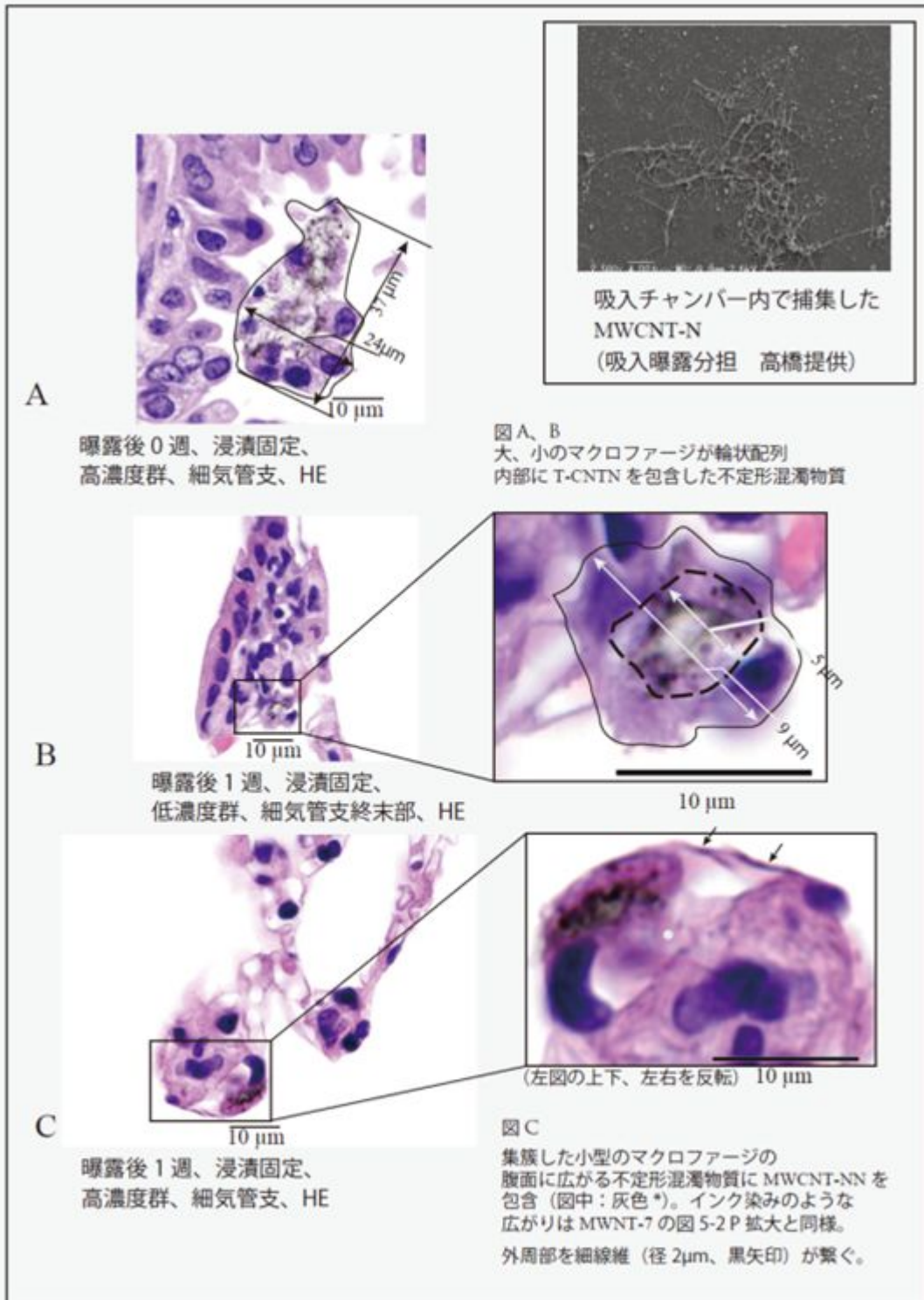
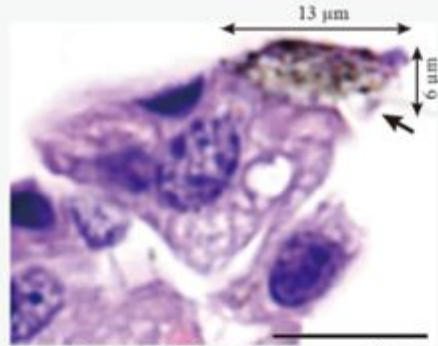
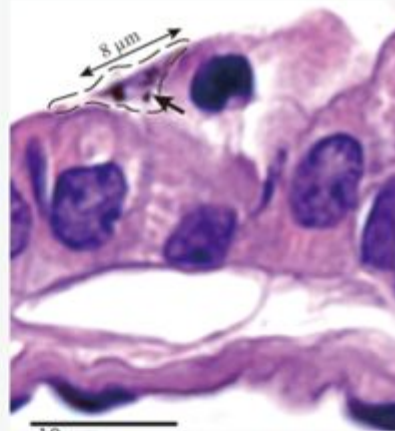


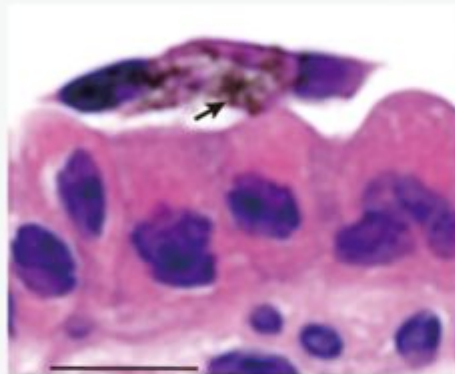
図 6-3 病理組織：MWCNT-N



D 曝露後0週、浸漬固定、  
高濃度群、細気管支、HE



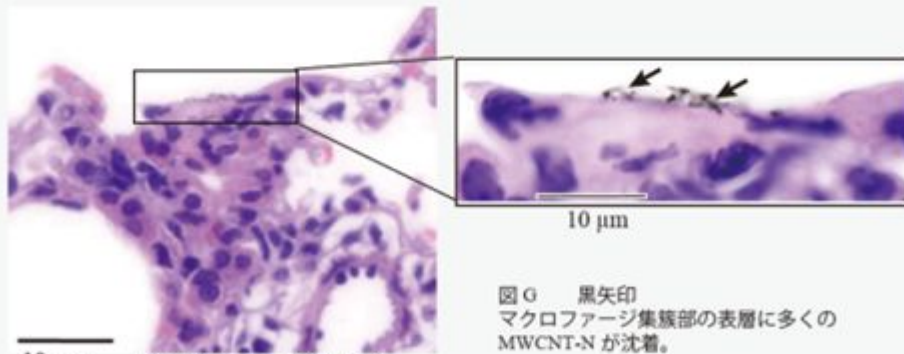
E 曝露後0週、浸漬固定、  
高濃度群、細気管支、HE



F 曝露後1週、灌流固定、  
高濃度群、細気管支、HE

図D、E、F 黒矢印  
MWCNT-N を包含した不定形混濁物質は  
マクロファージの胞体の外側に存在。

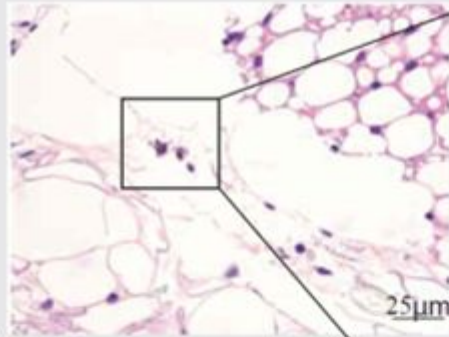
図F 黒矢印  
細気管支上皮表面に接して存在する2つの  
マクロファージの一方が胞体を延ばして  
他方に接合、その腹面に胞体と連続した  
不定形混濁物質が認められ、MWCNT-N を  
包含。



G 曝露後1週、灌流固定、  
高濃度群、肺泡道 / 肺泡、HE

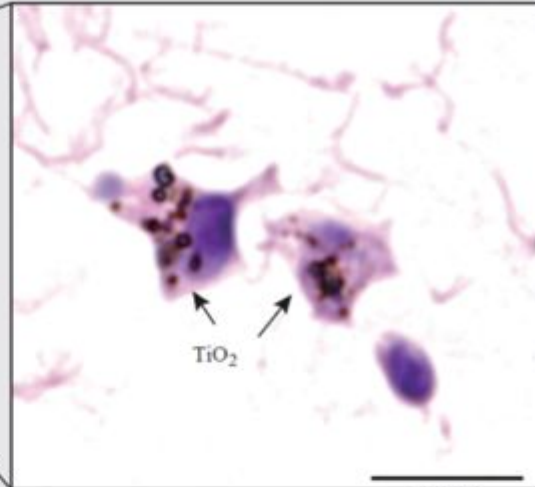
図G 黒矢印  
マクロファージ集簇部の表層に多くの  
MWCNT-N が沈着。

図 6-3 病理組織：MWCNT-N



A

曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE

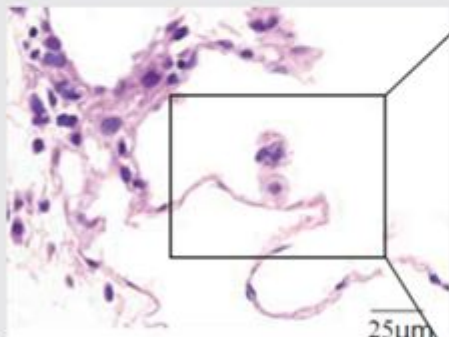


TiO<sub>2</sub>

TiO<sub>2</sub>

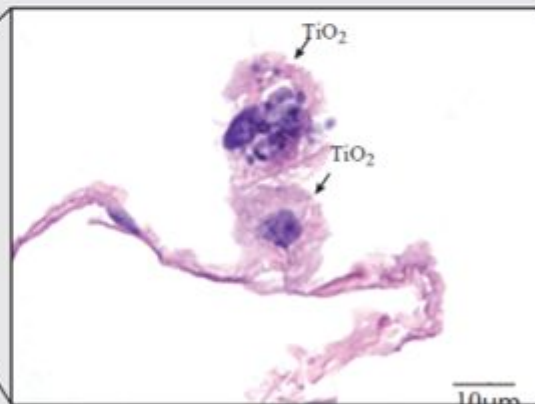
10μm

TiO<sub>2</sub> 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



TiO<sub>2</sub>

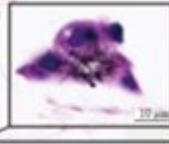
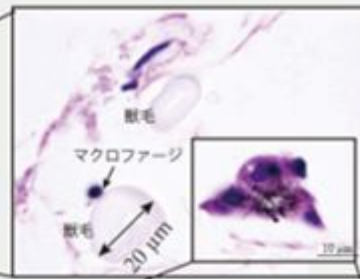
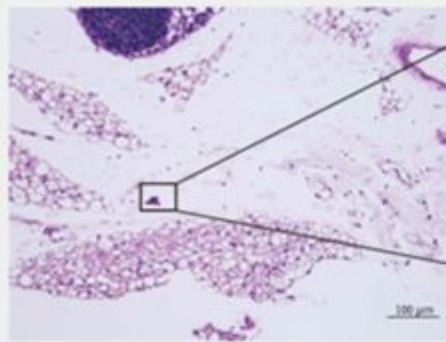
TiO<sub>2</sub>

10μm

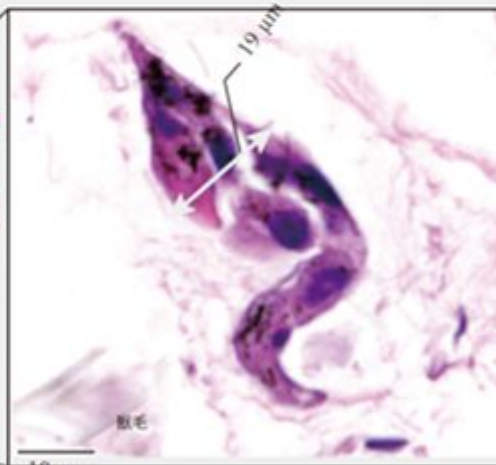
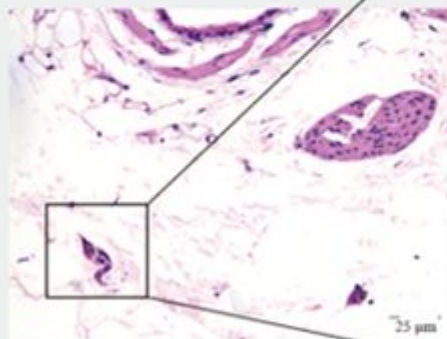
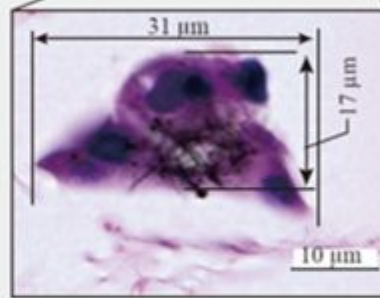
TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが心嚢膜に付着

縦隔での沈着

図 7-1 病理組織：TiO<sub>2</sub>



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

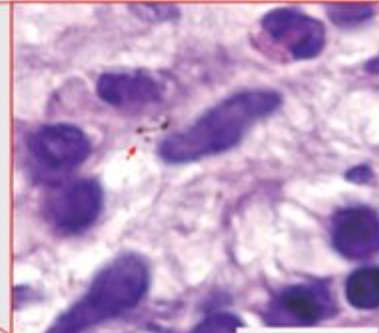
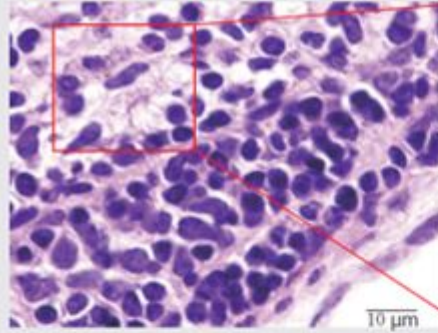


D  
曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE  
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

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

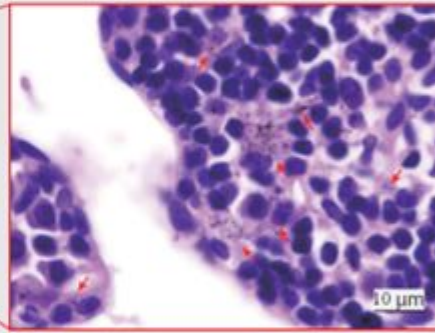
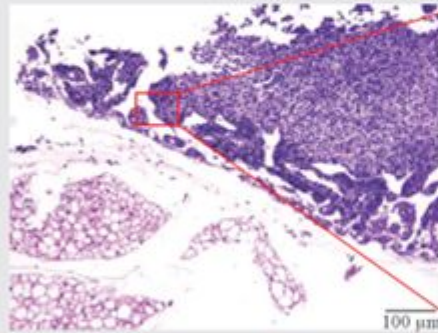
図 7-2 病理組織：MWNT-7



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

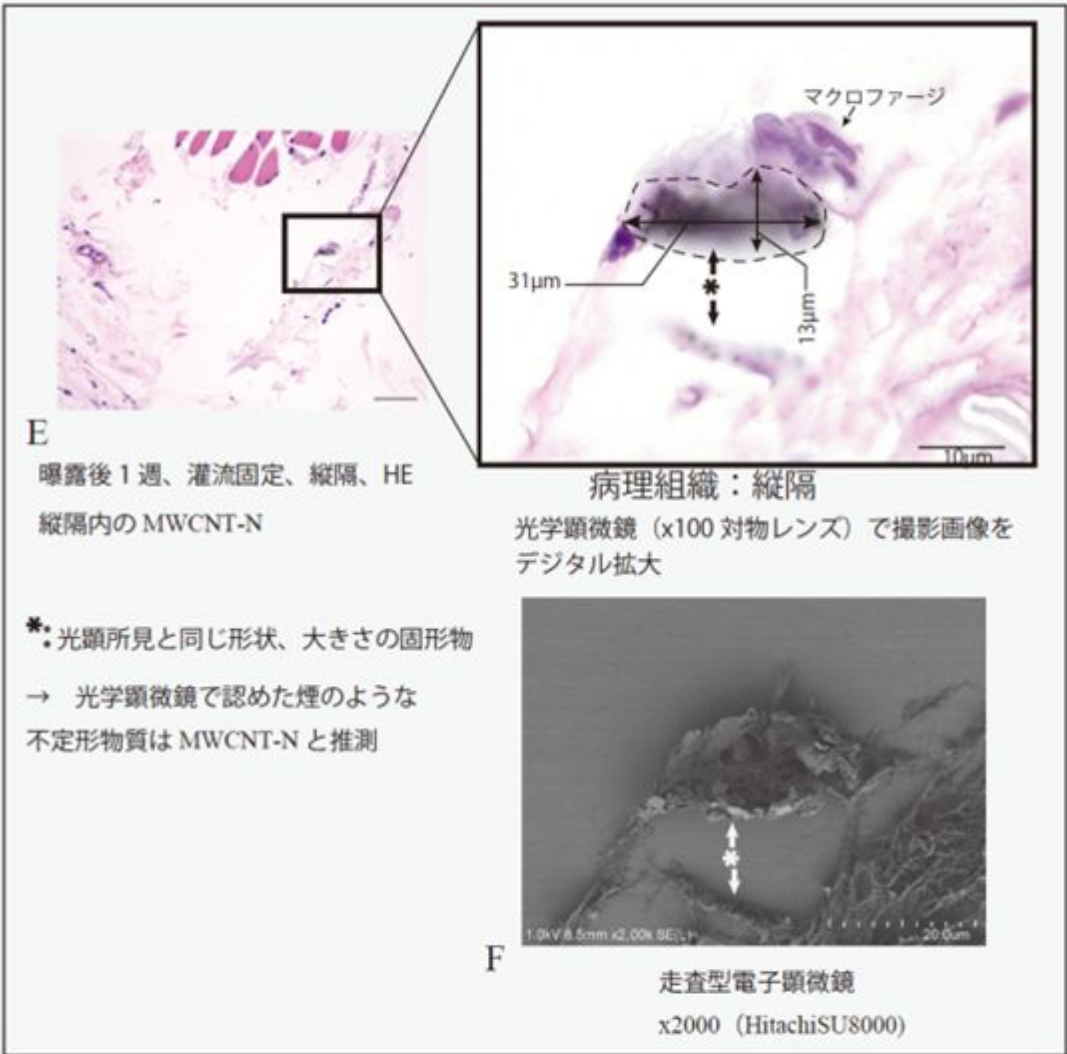
赤矢印：MWNT-7  
細いMWNT-7が多数存在  
(曝露後0週よりも増加)

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 7-2 病理組織：MWNT-7





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 7-3 病理組織：MWCNT-N

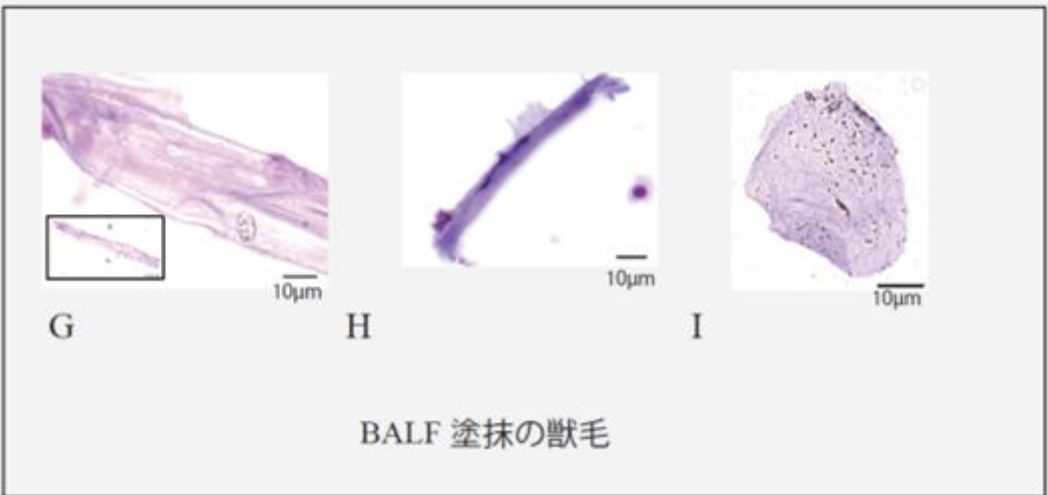
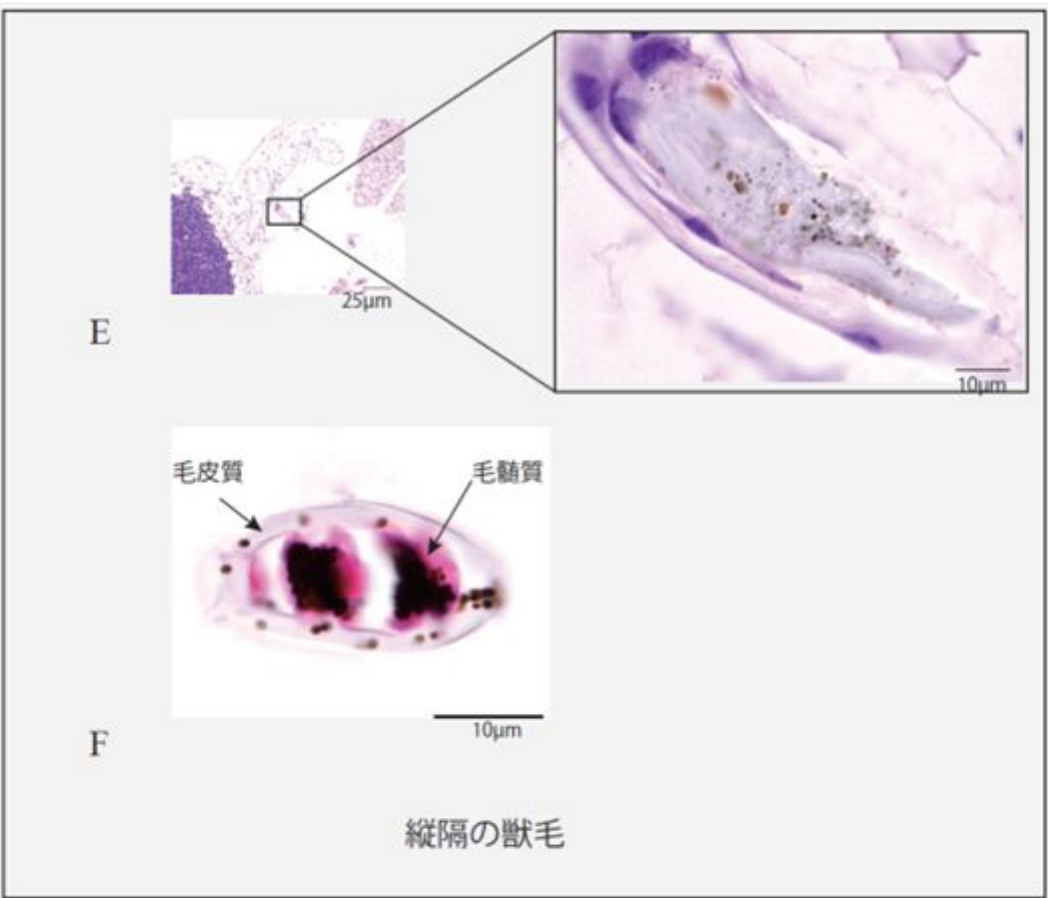


図 7-4 対照群の獣毛