

令和元年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）

分担研究報告書

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

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

研究分担者：	渡辺 渡	九州保健福祉大学生命医科学部	教授
研究協力者：	明石 敏	九州保健福祉大学薬学部	教授
研究協力者：	吉田裕樹	九州保健福祉大学薬学部	准教授
研究協力者：	宮内亜宜	九州保健福祉大学薬学部	講師

研究要旨

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評価を検討するため、前年度実施した MWNT-7 の単回での吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価に続いて、複数回の吸入曝露試験による評価を実施した。ウイルス感染前 7、5 および 3 日に MWNT-7 を Taqaan 法により吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させた。MWNT-7 曝露マウスの感染 5 日後では、肺洗浄液中の CCL5 (RANTES) など肺炎マーカーレベルが有意に上昇したが、肺の病理組織像での明確な肺炎増悪化は認められなかった。一方、単回曝露で見出した肺の線維化に関する指標 (TGF- β) も有意に上昇したが、非感染でも同様の結果が得られた。肺の病理組織像の検討では、胸膜へのカーボンの局在は無く、近傍でのカーボンを貪食したマクロファージやそれらの幅広い集束が認められた。今後、感染後の慢性期での影響や関連因子などについて検討する予定である。

露

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響については、研究がなされておらず、また定量的なリスク評価のために必要な慢性吸入曝

は多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) による報告のみである。そのため、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の開発は急務である。

前年度は、国立衛研毒性部・高橋祐次先生の研究グループでのMWNT-7のTaquaan法による吸入曝露システムを利用して、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いた単回吸入曝露での感染影響評価を実施した。その結果、吸入曝露による炎症性マーカーの上昇や肺炎増悪化などは明確ではなかったが、線維化に関わる因子 (TGF- β) の上昇を見出した。

今年度は、MWNT-7の複数回 (感染前7,5および3日) の吸入曝露によるRSウイルス感染肺炎への増悪化現象などの免疫応答影響について比較検討した。

B. 方法

MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研において Taquann 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53 μ m メッシュ濾過した MWNT-7 を質量濃度 3 および 6 mg/m³になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。この実験を 1 日おきに 3 回実施した。最終曝露の 2 日後に曝露マウスは、前年度と同様に SLC (実験動物ブリーダー) に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

RSV マウス感染実験

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

ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

肺重量の計測

MWNT-7 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存しているカーボンのコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES) および CCL3 (MIP-1 α) の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。TGF- β の定量は、Ready-Set-Go ELISA キット (eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託し、評価は HE 染色下で実施した。

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

(1) 吸入曝露による肺重量の変化

今回の試験では、MWNT-7の吸入曝露による肺負荷量 (蓄積量) を後に測定するため、BALF取得および病理組織学的実験とは別にマウスを確保した。マウスが4週齢と小さいこともあり、非感染マウスは何れ

も0.2 g未満であるのに対して、感染マウスでは約1.5倍以上ありウイルス感染での炎症惹起がはっきり見て取れた。さらに感染の有無にかかわらず、MWNT-7曝露で30～40%程度の重量増加があり、曝露による影響が重量変化からも認められた。

(2) BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカインCCL5のBALF中のレベルは、3 mg/m³ 曝露群では約25%有意に上昇したが、6 mg/m³群では頭打ちになっていた。非感染マウスではMWNT-7吸入曝露にかかわらずCCL5レベルは非常に低かった。CCL3レベルは感染マウスではMWNT-7吸入曝露により有意に上昇したが、検出レベルは低いものの非感染マウスでも上昇が認められた。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF-βは、曝露量に依存してウイルス感染マウス群で有意に増加したが、数値のバラツキが大きいもののむしろ非感染マウスでの検出レベルが高かった。

(3) 肺の病理組織学評価結果

HE染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。RSV感染により全群で弱い間質性の肺炎が観察され病理スコア化した。複数回にわたるMWNT-7吸入曝露により、RSV感染による肺炎のスコアの明確な上昇（増悪化）は認められなかった。吸入曝露による病理組織学的な特徴と

しては、カーボンを貪食したマクロファージの集束と小肉芽腫様の病変が広く散見された。肺炎像としては、リンパ球の浸潤や肺胞壁の肥厚が特徴的に認められたが、マクロファージの集束との関連は不明であった。また、胸膜へのカーボンの局在は見られなかった。

D. 考察

前回初めて国立衛研・毒性部との共同実験で、Taquann 全身曝露吸入装置でのMWNT-7吸入曝露-RSV感染実験をコンプリートしたが、単回吸入曝露によるRSV感染マウスへの影響は明確でなかった。そのため、今年度は複数回吸入曝露（感染3,5および7日前）により、影響評価を実施した。さらにMWNT-7の肺負荷量も併せて評価することとした。

複数回のMWNT-7吸入曝露による肺負荷量は、ラットではデータが蓄積されているのに対して、マウスではデータがないため、Taquann法の検証の意味もあって毒性部が計測中である。しかし、肺重量の計測結果からも今回の吸入曝露による肺組織への移行に問題はないことが見て取れた。

RSV感染での肺炎マーカーであるケモカインCCL5（RANTES）は、前回実施した単回吸入曝露では上昇していなかったのに対して、複数回の曝露により程度こそ高くないが有意に上昇していることが認められた。病理組織学的に全部の肺葉を検討したが、病理スコアからは肺炎の増悪化は明確にならず、CCL5が感度の良いマー

カーであることが再認識された。一方、単回曝露試験で影響指標の候補として導入した肺の線維化に関わる因子 TGF- β レベルは、複数回の吸入曝露で有意に上昇していた。しかし、前回評価できなかった非感染マウスにおいても上昇し、かつバラツキこそ大きい感染マウスよりその程度が大きいことが判明した。今後、ウイルス感染後の肺炎終息期/慢性期での影響評価、特に繊維化について検証することで影響指標としての価値が判明すると思われる。

今回、マクロファージ炎症性因子 CCL3 (MIP-1 α) の上昇や病理組織像でのマクロファージの集束結果から、改めて MWNT-7 の標的が肺胞マクロファージであることが強く示唆された。しかし、まだ RS ウイルス肺炎の増悪化とマクロファージへの作用との関連が明確になっていない。現在、肺負荷量と影響因子の変動との関連性を評価中である。今後は RSV 感染後の日数を延長する等 *in vivo* 試験と並行して培養マクロファージへの作用など *in vitro* 試験に注力して影響指標の選定を行っていききたい。

E. 結論

1. Taquann 全身曝露吸入装置を用いた MWNT-7 の複数回曝露による RSV 感染マウスへの影響評価において、RSV 感染肺炎マーカー CCL5 の有意な上昇を認めた。
2. 病理組織学的な検討では、MWNT-7 の吸入曝露での肺炎増悪化は明確ではなかつ

ったが、マクロファージ集束など特徴的な影響が観察された。

3. BALF 中の TGF- β レベルの上昇は非感染マウスでも顕著であった。
4. MWNT-7 の Taquann 法による肺負荷量を計測すると共に影響因子の変動との関係を検討中である。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyauchi, A., Watanabe, W., Akashi, T., Hashiguchi, S., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M. Effect of inactivated *Streptococcus pneumoniae* as non-pathogenic particles on the severity of pneumonia caused by respiratory syncytial virus infection in mice. *Toxicol. Rep.* (2019) 6, 514-520.
DOI:10.1016/j.toxrep.2019.05.004..

2. 学会発表

Watanabe W, Akashi T, Hirose A, Miyauchi A, Yoshida H, Kurokawa M. Effects of double-walled carbon nanotubes on the early phase of respiratory syncytial virus infection in mice. 55th Congress of the European Societies of Toxicology, (September 2019 Helsinki, Finland).

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他