

厚生労働科学研究費補助金
化学物質リスク研究事業
平成29年度 総括研究報告書
研究代表者 相磯 成敏

平成30(2018)年3月

研究報告書目次

目次

. 総括研究報告書

ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究

生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築 —

. 分担研究報告書

1. 病理組織学的評価研究

相磯 成敏 17

2. 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 祐次 43

3. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

大西 誠 53

4. 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 直澄 60

. 研究成果の刊行物に関する一覧表 79

. 研究成果の刊行物・別刷 82

・ 総括研究報告書

総括研究報告書

ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究

-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

(H29-化学-一般-003)

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(NM)の産業応用が急速に進展し、多様な NM が製造されて市場に出まわる中、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な情報が得られる評価法の確立に至っていない。NM の毒性発現には異物除去を担うマクロファージが重要な役割を果たしており、NM を貪食したマクロファージが Frustrated phagocytosis (FP) という特殊な反応に陥ることがその起点となる可能性が示唆されている (FP 仮説)。先行研究から、NM を貪食した際のマクロファージの反応を 3 つの様式、M のサイズを超える長い単一の繊維による「長繊維貫通型」、柔軟性に富む繊維による「毛玉状凝集型」、M より小さな粒子による「粒状凝集型」に分類できるという知見を得た。及び については蓄積がある量を超えると、FP 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り、曝露量とサイトカインの種類と放出量の間には異なる想定される。本研究班では、モデル NM として二種類の MWNT (長繊維貫通型、毛玉状凝集型) 及び酸化チタン (粒状凝集型) を独自に開発した全身曝露吸入装置 (J Toxcol Sci 2013) を用いてマウスに吸入曝露させ、病理組織学的変化、免疫機能の解析、曝露濃度と肺負荷量に関するデータを取得して、FP 誘発に関連する要因の分類とその強度スケールにより有害性スクリーニングのカテゴリー評価基盤を整備する。

平成 29 年度は、「長繊維貫通型」のモデル NM として MWNT-7 (T-CNT7) を選定した。C57BL/NcrSlc 雄性マウス 12 週齢を使用し、対照群、低用量群及び高用量群の 3 群構成とし、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行った。曝露終了直後(0W)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(8W)に採取した生体材料を用いて、組織負荷量の測定、病理組織学的評価、免疫機能評価を行った。T-CNT7 の吸入曝露を実施できた(高橋)。T-CNT7 肺負荷量は、1 mg/m³ 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³ 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した(大西)。病理組織学検査では、T-CNT7 は肺泡マクロファージに貪食されて終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇して沈着する傾向が認められた。詳細に観察すると 0W から T-CNT7 投与依存的に、微

小さな組織変化が観察された。曝露後 4W の肺に曝露後 0W から 8W を通して最も多彩な組織像が認められ、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。免疫機能評価においても、対照群と比較し BALF 中における肺胞マクロファージの割合は曝露終了直後の 0W から減少が認められ、M1/M2 比率が経時的に変化することが明らかとなった。また、肺組織における MMP12 mRNA 発現増加及び BALF 中の IL-12、VEGF 蛋白質の上昇が示された。T-CNT7 投与依存的に認めた微小な病理組織変化は、曝露後 4 週を頂点として経時的に進行しており、M2 マクロファージの増加及び BALF 中 MMP12、IL-12、VEGF 発現増加は組織変化に関連する可能性が示唆された。病理組織変化と免疫機能変化の関連付けが示唆される事象を拾い上げ、病理組織学的評価で量・反応関係のデータを得ることにより、一層有用な T-CNT7 のカテゴリー評価基盤整備が可能となる。

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、本研究班の目的とする、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で、スケールに相当する曝露濃度と肺負荷量のデータを取得できた。

また、病理組織学的評価、並びに免疫機能評価の分担研究においても有用なデータを取得することができたが、病理組織学的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要である。

平成 30 年度は「粒状凝集型」のモデル NM として選定した酸化チタンを用いて吸入曝露実験を行い計画に沿って研究を進めるとともに、平成 29 年度の病理組織学的評価についても研究を進める。

研究体制

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 部長

研究分担者

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

石丸 直澄 徳島大学 大学院医歯薬学研究部
口腔分子病態学分野 教授

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
第三室 室長

体影響を数種類のモデル NM を用いて評価し、曝露濃度、肺負荷量及び肺病変の連関の情報を整備することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

NM 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となる基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法が必要とされているが、具体的な手法の確立に至っていない。その理由として、NM の多様な特性(素材、粒子径、イオン化傾向並びに表面活性等)が複雑に影響して有害性を発現すること、難分解性のため一般に急性毒性は弱く長期沈着による発がんや線維化といった慢性的な影響が問題となること、最も懸念される吸入曝露は他の曝露経路に比較して技術的難易度とコストが高いこと、が挙げられる。多様な NM の効率的な有害性評価方法として、国際的には比較的情報取得が容易である「物理化学的特性」を基盤としたカテゴリー評価が提案されている。

本研究班では「生体内反応特性」からのカテゴリー評価を試みる点を特色としている。すなわち、NM の

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的ナノマテリアル(NM)の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの in vivo 生体内反応に着目した生

毒性発現には異物除去を担うマクロファージが重要な役割を果たしており、NMを貪食したマクロファージが Frustrated phagocytosis (FP) という特殊な反応に陥ることがその起点となることが広く知られている (FP 仮説)。申請者らは、先行研究及び多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の発がん性実験 (Part Fibre Toxicol, 2016) の成果から、NM の種類によって 3 種類の FP の誘発様式 (長繊維貫通型、毛玉状凝集型及び粒状凝集型) を見出し、FP 誘発の型及び程度に着目した独創的なカテゴリー評価を試みる。

具体的には、モデル NM として二種類の MWCNT (長繊維貫通型、毛玉状凝集型) 及び酸化チタン (粒状凝集型) を独自に開発した全身曝露吸入装置 (J Toxcol Sci 2013) を用いてマウスに吸入曝露を行い、病理組織学的変化、免疫機能の解析、曝露濃度と肺負荷量に関するデータを取得し、FP 誘発に関連する要因の分類とその強度スケールにより有害性スクリーニングのカテゴリー評価基盤を整備する。

B. 研究方法

B-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

「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の一つである MWNT-7 (三井) を選択した。MWNT-7 は、先行研究で開発した Taquann 法処理により、凝集体・凝固体を含まない高分散検体として実験に供した (以下 T-CNT7 と記載)。MWCNT の曝露には既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 を使用した。曝露チャンバー内の T-CNT7 の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。動物は C57BL/6NcrSLC 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。群構成は、対照群、低用量群 (目標濃度 $1 \text{ mg}/\text{m}^3$)、高用量群 (目標濃度 $3 \text{ mg}/\text{m}^3$) の 3 群構成とした。各群 48 匹のマウスを使用し、病理組織用に 16 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 20 匹を割り当てた。曝露終了直後 (0W)、1 週後 (1W)、4 週後 (4W) 及び 8 週後 (8W) に定期解剖を行い、生体材料を採取して病理組織評価、免疫組

織評価及び肺負荷量測定に供した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7 の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した (高橋)。

B-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

肺組織中への T-CNT7 の負荷量を分担研究者の大西等が開発したベンゾ [ghi] ペリレンをマーカーとした MWCNT の微量定量法を用いて測定、解析を行った。その原理は MWCNT を構成している炭素原子の 6 員環に相補的に結合するベンゾ [ghi] ペリレン (BgP) (試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社) を吸着させ、T-CNT7 に相補的に吸着させた BgP を回収し、HPLC (Acquity UPLC、ウォーターズ) で回収した BgP の吸光度を測定した。BgP の吸光度強度に相当する T-CNT7 の量を検量線から読み取った値から算出する方法で行った。検量線は 6 点 (T-CNT7 濃度 $0.2 \mu\text{g}/\text{mL} \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{mL}$ (公比 2)) の吸光度の値を求めて直線を引いた。

測定に用いた肺は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次 (国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長) から提供された。吸入曝露後の定期解剖における肺の採材は、イソフルラン吸入麻酔下で、腋窩動脈を開放して安楽死させて開胸、T-CNT7 の混入防止のため、被毛に付着した T-CNT7 が開胸部に付着しないように留意して肺を摘出、肺重量を測定後した後に 10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬固定、組織負荷量の測定に供した。

肺組織中の T-CNT7 の測定 (組織負荷量の測定) は次のように行った。

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で浸漬固定した肺のサンプルを C99 (Clean99-K200、クリーンケミカル株式会社) で溶解し、セルロース沈殿硬化液 (日本バイオアッセイ研究センターによる研究開発) を添加し、遠心分離 (12000rpm、10 分間) 後、上澄み液を除去し、0.1% Tween 溶液 (TWEEN 80、富士フィルム和光純薬株式会社) を加えて遠心分離した。その上澄み液を除去、濃硫酸の添加により残渣を分解し、マーカー溶液を添加し $0.8 \mu\text{m}$ のフィルター (ワットマ

ン:GE Healthcare UK Ltd)でろ過した。フィルター上に残った T-CNT7 を、フィルターごとポンチ(8 mm)で打ち抜いて採取し、アセトニトリル(HPLC 用、富士フィルム和光純薬株式会社)を添加、抽出し、HPLC (Acquity UPLC、ウォーターズ)で抽出液の蛍光吸光度を測定した。

T-CNT7 の検量線で、6ポイント(C1~C6)の目標濃度と面積値から直線回帰式を求め、HPLC で測定した肺試料の面積値を直線回帰式に代入し、T-CNT7 の測定濃度を求めた。その値に希釈倍率を乗じて、T-CNT7 の肺個体当りの肺内沈着量(単位: μg)と、それらの3匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、解剖時に測定した肺の重量で除することにより肺 g 当りの値(単位: $\mu\text{g/g}$)及び、それらの平均値と標準偏差を求めた。

B-3. 病理組織学的評価研究

分担研究に用いた肺は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)から提供された各群 16 匹から採取した。但し、曝露後 4W に解剖した低用量群の 1 匹が fighting により死亡したため、この群の解剖動物数は 15 匹となった。解剖の際の肺の採取は、イソフルラン吸入麻酔下で、開胸、その際、T-CNT7 の混入防止のため、被毛に付着した T-CNT7 が開胸部に付着しないように留意した。また、肺の虚脱を防ぐ目的で気管を結紮した後、左心房にカニューレションし、腋窩動脈を開放し灌流固定をおこなった。まず、約 40cm 水柱の静水圧条件下で、生理食塩水を灌流し腋窩動脈開放部から透明の生理食塩水が流出することを確認し、次いで 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(4% PFA、和光純薬工業、組織固定用、用事調整)を同静水圧で約 3 分灌流した。結紮した気管と共に肺を虚脱させないように注意しつつ摘出し、さらに同組成固定液(4%PFA)にて一晚浸漬固定(冷蔵)した。その際、脱脂綿により肺の固定液面からの浮上を防いだ。翌朝、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(ナカライテスク)に交換して保存、切り出しを行った。その他の臓器は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に浸漬固定した。

なお、被毛と消化管内容物に含まれる T-CNT7 の固定時の混入を防ぐため、皮膚と消化管は検査対象から除外した。

・ 病理組織標本作製

定法に従いパラフィン包埋し、HE 染色標本、及び線維化の観察にマッソントリクローム染色(Masson trichrome stain)を作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織検査を行った。

型肺胞上皮細胞(型細胞)のマーカーとして surfactant protein C (SP-C、SC-13979、Santa Cruz)、マクロファージのマーカーとして、Macrophage receptor with collagenous structure (MARCO、LSBio-B15006)に対する一次抗体を用いて免疫染色を行った。MARCO はマクロファージのスカベンジャーレセプターであり、MWCNT に結合すると報告されている¹⁾。

二次抗体にはシンプルステインマウス組織用(ニチレイ)を用い、DAB 発色した。

(引用文献)

¹⁾S. Hirano, S. Kannno, A. Furuyama. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. Toxicology and Applied Pharmacology. 232:244-251, 2008

・ 病理組織学的検査

曝露後 0W、1W、4W、8W の肺について肺内の T-CNT7 の沈着と組織反応の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。

・ T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

非分解性である MWCNT を貪食あるいは貪食しようとした肺胞マクロファージは Frustrated phagocytosis に陥りアポトーシスに至り、貪食していた MWCNT を放出し、放出された MWCNT は次の肺胞マクロファージに補足され同様のサイクルが繰り返されると理解されている。この現象が T-CNT7 を吸入曝露した本実験で起きていることが、先行研究により明らかとなっていることから、MARCO 陽性細胞を追跡することで、

肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析した。

MWNT-7 が複屈折性を示すことを利用し、その局在を偏光観察により捕捉し、MARCO 陽性細胞との関係を明らかにした。今年度報告では、まだ対照群と高用量群について MARCO 免疫染色結果を視覚的な判断を行った予備調査の段階であるが、今後、数値データ化して量反応関係を求める。

B-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

分担研究に用いた肺、頸部リンパ節、脾臓は、吸入曝露実験を分担した高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)から提供された各群 20 匹から採取した。

肺胞洗浄液、脾臓、頸部リンパ節の免疫細胞について免疫細胞分画の変化のフローサイトメトリー解析、肺組織におけるスカベンジャー受容体などの mRNA を定量 RT-PCR 法による解析、肺胞洗浄液中の各種サイトカイン、ケモ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

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C, TERUMO)を留置し、1ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に 1ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin: APC, APC-Cy7) 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、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置

(FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

・定量化 RT-PCR 法

肺組織の一部を RNAlater に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。プライマーセット(分担研究報告を参照)を用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を-80℃にて保存した。各サンプルから 5 μL を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット(Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、IL-1 α , IL-1 β , 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 α , TNF- α , VEGF, FGF basic とした。

(倫理面への配慮)

本分担研究における動物実験は、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、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 日日本学会協議)、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)及び所属の研究機関が定める規定:日本バイオアッセイ研究センターでは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)、徳島大学では徳島大学動物実験管理規則

(平成 24 年 3 月 21 日)を遵守した。

また、ナノマテリアルの吸入曝露実験に際しては、国立医薬品食品衛生研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従って実験を実施し、曝露・漏洩を防止する対策については万全を期した。日本バイオアッセイ研究センターと徳島大学においても、それぞれの運用規則に従い実施しており、ナノマテリアル曝露した動物から採取した臓器・組織からの実験施設の汚染や実験従事者への曝露を防止する対策については万全を期した。

C. 研究結果

C-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

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-CNT7 の 5 日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値 ± SD)は、低用量群、高用量群それぞれ $1.4 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3.2 \pm 0.3 \text{ mg/m}^3$ であった。平均 CPC カウント(平均値 ± SD)はそれぞれ、 $960 \pm 80/\text{cm}^3$ 、 $2340 \pm 238/\text{cm}^3$ であった。2 時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低用量群、高用量群それぞれ 4.3 mg 及び 8.5 mg であった。2 時間の曝露チャンバーの総換気量が 1.2 m^3 であることから名目上の濃度は、低用量群、高用量群それぞれ 3.5 mg/m^3 及び 7.1 mg/m^3 と計算される。実際に測定した濃度から、エアロゾル化効率を計算するとそれぞれ 40%及び 45%であった。本実験において定期解剖した全ての個体に剖検所見に肉眼的異常は認められなかった。

C-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

1 mg/m^3 曝露群のマウスの肺当りの T-CNT7 負荷量は、曝露後 0W、1W、4W、8W でそれぞれ 6.30、4.59、5.42、5.39 $\mu\text{g/g}$ であった。 3 mg/m^3 曝露群のマウスの肺当りの T-CNT7 負荷量は曝露後 0 週、1 週、4 週、8 週でそれぞれ 10.15、9.98、10.84、10.25 $\mu\text{g/g}$ であった。 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に推移する傾向を示した。

C-3. 病理組織学的評価研究

病理組織学的検査：本試験では、通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見として、T-CNT7 の肺内沈着を認めた。T-CNT7 は気道及び肺泡マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺泡領域の細胞外の間質に存在した。貪食マクロファージは終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇する傾向を認めた。以下、継時的に詳細を記載した。

0W：終末細気管支から肺泡洞の領域に、長短、数十本～百本以上の T-CNT7 繊維を貪食したマクロファージを終末細気管支上皮面から肺泡洞にかけて認めた。T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、細胞死に向かう過程にある事を示唆する像であると考えられた。また、これら細胞死に向かう過程にある事が示唆される T-CNT7 貪食マクロファージの近傍には、貪食していた T-CNT7 を受け継ぐと思われるマクロファージは HE 染色標本、MWCNT のスカベンジャーレセプターと考えられている MARCO に対する免疫染色標本で認められなかった。

0W での肺泡域では、一本乃至少数の T-CNT7 を貪食した肺泡マクロファージが散在性に認められた。

1W：T-CNT7 貪食マクロファージの肺内分布は曝露後 0W と同様、終末細気管支から肺泡洞の領域に多くみられた。終末細気管支から肺泡洞の領域に、多数の T-CNT7 が肺泡マクロファージに貪食された状態で肺の組織に沈着したもののほか、マクロファージに貪食されていない T-CNT7 の沈着も認められた。また、T-CNT7 沈着部に向かって近傍の終末細気管支からの上皮の伸び出しと考えられる所見も認められた。肺泡域にはマクロファージに貪食されない T-CNT7 が散在性に沈着するが、肺の組織反応は認められなかった。さらに、細気管支周囲の間質で、

リンパ管内に T-CNT7 肺胞マクロファージが列をなしている所見が認められた。このことから、肺内に入った T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された。

4W: 終末細気管支から肺胞洞の領域で肺の組織に細胞死に向かう過程にあると示唆される多数の T-CNT7 を貪食したマクロファージを認めたほか、終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織に、終末細気管支上皮の伸び出しや出現頻度は低いものの、多核異物巨細胞を認めた。ただし、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも 8W までの期間内には、認められなかった。

8W: 終末細気管支から肺胞洞の領域に型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認め、この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していることから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な組織改変の可能性が示唆された。また、末梢気道周囲間質のリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージと、それに起因したと考えられる単核球の出現が認められた。この所見においても、末梢気道周囲間質において局所的な組織改変が行われた可能性が示唆された。

T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、局所的な組織改変の可能性を示唆する H&E 像を得たことから、今後、免疫染色による細胞種の同定、間質の構造改変の特定を行う事とする。その際、膠原繊維の増加が証明されれば、小型線維化病変に移行する可能性が高くなると思われる。

肺線維化の検討: HE 染色では、肺に明確な線維化は認められなかった。このことは、マッソントリクローム染色においても確認された。

その他の変化: 肺胞に好酸球を認めたが、その数は多くなかった(図 2-7)。

以上、曝露後 4 週の肺は、曝露後 0 週から 8 週を通して最も多彩な組織像が認められたことから、本試験の曝露条件下では、4 週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆され、肺負荷量測定結果との比較をした結果、8 週では器質化が始まっていると考えられた。

・T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

以下の結果を得た。

・MARCO 陽性マクロファージ数の経時的推移:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、対照群と T-CNT7 高用量曝露群との比較で曝露後 0 W では対照群と比べ、T-CNT 高用量曝露群で MARCO 陽性の肺胞マクロファージ数の明らかな増加が示された。4W 及び 8W において差は認められなかった。

・MARCO 陽性マクロファージの肺内分布:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。

T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布について経時的推移をみると、曝露後 0 W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4 W と 8 W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中する様子が認められた。

なお、曝露後 4 W と 8 W での T-CNT 貪食マクロファージの MARCO 免疫染色の DAB 発色は減弱し、び漫性を呈したり、痕跡程度となったものが多く認められた。

・T-CNT7 貪食による MARCO 陽性マクロファージの形態学的変化:

T-CNT7 高用量曝露群で T-CNT7 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することが示された。また、著しく膨化して MARCO 免疫染色の発色が著しく減

弱した肺泡マクロファージには萎縮したものや、MARCO 免疫染色陽性反応が痕跡程度のものが認められた。

C-4. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響 評価研究

T-CNT の吸入曝露により、8 週まで肺泡マクロファージの割合は有意に減少するのに対し、好酸球、単球は増加することがわかった。また、T-CNT の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT 曝露により肺泡マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体が関係していることが示唆された。肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT の曝露で有意に増加することが示された。さらに、T-CNT 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の BALF 中での上昇が確認された。脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、T-CNT 曝露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認められなかった。加えて、BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメータによる解析結果から、細胞の大きさを評価すると、T-CNT 曝露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった。

D. 考察

T-CNT7 の吸入曝露の分担研究(高橋)では、設定濃度どおりに安定した吸入曝露を実施した。また、肺内負荷量の分担研究(大西)では、1 mg/m³ 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³ 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。これら二つの分担研究が正確に実施されたことにより、本研究班の目的とする、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で、スケールに相当する曝露濃度と肺負荷量のデータを取得できた。

また、病理組織学的評価、並びに免疫機能評価の分担研究においても以下のように有用なデータを

取得することができた。

病理組織学的検査では、T-CNT7 の肺内沈着以外に通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は認められなかった。T-CNT7 の肺内沈着は気道及び肺泡マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺泡領域の細胞外の間質に存在し、貪食マクロファージが終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇する傾向が認められた。この結果は、先行研究での知見と一致するものであった。

曝露後 0W から 8W までを経時的に追うと、曝露後 0W から短く、数十本～百本以上の T-CNT7 繊維を貪食したマクロファージが終末細気管支上皮面から肺泡洞にかけて認められたが、これらの T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められた。これらの T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、細胞死に向かう過程にあると考えられた。曝露後 4W では、終末細気管支・肺泡洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織や多核異物巨細胞を認められたが、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも 8W までの期間内には、認められなかった。

曝露後 8W に、終末細気管支から肺泡洞の領域に型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認めた。この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していたことから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺泡単位での局所的な肺泡構造が改変されている可能性が示唆された。

また、細気管支周囲の間質では、曝露後 1W と曝露後 8W にリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージが認められた。このことから T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された。

以上、曝露後 4W の肺は、曝露後 0W から 8W を通して最も多彩な組織像が認められたことから、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。

マクロファージのスカベンジャーレセプターの中で MARCO は MWCNT に結合すると報告されている。

MARCO 陽性細胞を追跡することで、肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析を試みた。

その結果、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布の経時的推移は、曝露後 0 W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4 W と 8 W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中してくる様子が認められた。

これらの結果から T-CNT7 曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージは、曝露終了直後の 0 W から終末細気管支から肺胞洞の領域に集中しているのではなく、T-CNT7 曝露が終了した後に 1ヶ月以上の時間をかけて終末細気管支から肺胞洞の領域に集まると考えられた。

T-CNT7 の肺内負荷量の測定では、肺内に沈着した T-CNT7 の量は低用量、高用量群とも、0 W から 8 W までほぼ一定に推移し、曝露終了後、肺内から肺外に移行あるいは排泄される T-CNT7 はほとんど無く、肺内に留まることと考えられた(大西)。すなわち、今回の実験条件では、肺内に呼吸によって肺内に吸引された T-CNT7 はマクロファージに貪食されて曝露後 0 W から 4 W に終末細気管支から肺胞洞の領域に集まり、大部分がその場にとどまると考えられた。病理組織学的検査で、曝露後 4 W の肺は、曝露後 0 W から 8 W を通して最も多彩な組織像が認められ、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。この4週を頂点とした組織反応の減弱については、T-CNT7 は4週と8週で同じ量(質量)が肺内に含有されるが、病理学的には炎症の最盛期にあたる4週を過ぎて、8週は一時的に増生した組織が器質化に向かっている時期にあったと考えられた。

病理組織学的評価でみられた肺の組織変化に対応した変化が、免疫機能評価においても示された。具体的には T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少、M1 と M2 マクロファージの比率の経

時的な変動 が T-CNT 曝露群で示されたことや、曝露後 8 W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇が該当する。免疫機能評価での T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少については、病理組織学的検査で T-CNT7 貪食マクロファージに胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、これらのマクロファージが細胞死に向かう過程にあると考えられたことと符合する。M1 と M2 マクロファージの比率の経時的な変動が T-CNT 曝露群で示されたことや、曝露後 8 W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇については、終末細気管支から肺胞洞の領域に集まった T-CNT7 に対する肺組織反応に関連した変化である可能性が示唆された。

以上、T-CNT7 の肺内沈着以外に通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は認められなかった今回の実験においても、4週を頂点とした微小な病理組織変化が肺の中で時間の経過とともに進行していることが示された。

こうした微小な病理組織変化の推移に関連した可能性がある免疫機能の変化も起きていたことが示唆された。病理組織変化と免疫機能変化の関連付けが示唆される事象を拾い上げ、病理組織学的評価で量・反応関係のデータを得ることにより、一層有用な T-CNT7 のカテゴリー評価基盤整備が可能となる。

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、各分担研究でカテゴリー評価基盤を整備するためのデータを取得することができたが、病理組織学的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要とである。

E. 結論

以上の結果より平成 29 年度の研究のまとめとして、「長繊維貫通型」のモデル NM とした T-CNT7 について、各分担研究でカテゴリー評価基盤を整備するためのデータを取得することができたが、病理組織学

的評価についてはさらに踏み込んだ研究が必要とである。

平成 30 年度は「粒状凝集型」のモデル NM として選定した酸化チタンを用いて吸入曝露実験を行い計画に沿って研究を進めるとともに、平成 29 年度の病理組織学的評価についても研究を進める。

F. 研究発表

1. 発表論文

Senoh H, Kano H, Suzuki Masaaki, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S and Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. *J Occup Health*. 59: 112-121, 2017

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. *J Toxicol Sci*. 2017;42(2):121-128

Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. *J. Occup. Med. Toxicol*. 11:44 2016.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. *Particle and Fibre Toxicology* 13:53 2016.

Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora

Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 in press

Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M. Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 in press

Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203

Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10

Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- κ B2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. (2017) 69(11):2193-2202.

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune tolerance. *J Clin Cell Immunol*. (2017) 8(4):1000512

Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru

N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. J Exp Med. (2017) 214:1925-1935.

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. J Cytokine Biol. (2017) 2:1-5

Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Autoimmunity: Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. Handbook of Immunosenescence 1-11, 2017

石丸直澄 口腔免疫とその異常 CLINICAL CALCIUM 27(10):21-26, 2017

2. 学会発表

相磯成敏, 梅田ゆみ, 大西誠, 齋藤美佐江, 近藤ひとみ, 笠井辰也, 妹尾英樹, 高信健司, 福島昭治, 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. 2017/8/24

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

大西 誠、笠井辰也、東久保一郎、荒木明宏、福島昭治、新開発の粉塵発生装置(N-SHOT Cyclone)による多種類の多層カーボンナノチューブのエアロゾルの観察及びマーカー法に

よる微量定量の検討、第89回日本産業衛生学会学術年会(2016.5.27)

大西誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、平井繁行、福島昭治、N-SHOT Cycloneによるナノ酸化チタンの浮遊係数の提案、第43回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純、N-SHOT Cycloneによる多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第44回日本毒性学会学術年会(2017.7)

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、多層カーボンナノチューブ長期曝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

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren 's syndrome 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren 's syndrome. 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

石丸直澄 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～ 第59回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジウム 2018年9月18日 松本

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A,

Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren 's Syndrome. 第 46 回日本免疫学会 総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N : A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren 's syndrome 第 46 回日本免疫学会

総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
2. 実用新案登録
3. その他

. 分担研究報告

平成29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: ナノマテリアルの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 部長

研究協力者 山野 荘太郎 同 病理検査室 主任研究員
梅田 ゆみ 同 理検査室 室長

研究要旨

本研究班では、工業的ナノマテリアル(NM)を貪食した際にみられる3つの反応様式 肺胞マクロファージ(M₁)のサイズを超える長い単一の繊維による「長繊維貫通型」、柔軟性に富む繊維による「毛玉状凝集型」、M₁より小さな粒子による「粒状凝集型」に分類できるという先行研究の知見に基づき、これらの3つの貪食反応を誘発するモデルNMを用い、病理組織学的評価、免疫機能評価、肺負荷量を関連付けすることで、NMのカテゴリー評価に資する情報を3ヵ年で整備を目指す。初年度のH29年度は、のモデル物質として選択したMWNT-7の吸入曝露実験を、高橋祐次分担研究者(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)が実施したマウス、肺に対して病理組織学的解析を実施した。T-CNT7のマウス5日間反復全身曝露吸入実験で得た肺について病理組織学的解析を行った。その結果、T-CNT7は気道及び肺胞マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺胞領域間質中に存在し、曝露が終了した後に1ヶ月以上の時間をかけて終末細気管支から肺胞洞の領域に集簇する傾向が認められた。多数のT-CNT7を貪食した肺胞マクロファージは、細胞死に向かうことが示唆されたほか、T-CNT7の曝露に起因した微小な病理組織変化が肺の中で時間経過とともに進行し、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に組織反応が減弱していたことが示唆された。また、これに関連すると考えられる変化が免疫機能評価の分担研究(石丸直澄 徳島大大学院教授)においても示された。H29年度にT-CNT7貪食肺胞マクロファージの追跡にスカベンジャーレセプターのMARCO免疫染色が有用であることが判明した。H30年度は、MARCO免疫染色によるT-CNT7貪食肺胞マクロファージの動態について量反応関係を調べるとともに、病理組織変化と免疫機能変化の関連付けが示唆される事象を拾い上げてT-CNT7のカテゴリー評価基盤整備のための情報を収集する。

A. 研究目的

本研究班では、工業的ナノマテリアル(NM)の全身曝露吸入試験を実施し、肺内におけるNMの貪食反応について、病理組織学的評価、免疫機能評価、及び肺負荷量との関係において、NMの生体影響に基づくカテゴリー評価に資する情報を3ヵ年で整備を目指す。本分担研究ではこの目的に沿った、病理組織学的解析の体系を整備する。

H29年度は、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして選択した多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つであるMWNT-7(三井)を吸入曝露した肺について病理組織学的評価病理学的解析を行い、NMのカテゴリー評価に資する情報を得ることを目的とした。

B. 研究方法

B-1. 吸入曝露実験

吸入曝露実験は、分担研究者・高橋祐次(国立医薬品食品衛生研究所毒性部室長)が実施した。MWNT-7にTaquan処理を施し高分散化したものを(以下、T-CNT7)を、Taquan直噴式全身吸入曝露御装置を用いて一群16匹、合計48匹のC57BL/6NcrSlcマウスに曝露した。曝露は対照群(0 mg/m³)、低用量群(1 mg/m³)、及び高用量群(3 mg/m³)、に1日2時間(10:00~12:00)、週1日、5週間、延べ2時間×5回、10時間行った(図1)。

5回目の曝露を終了した日を曝露後0週(0W)とし、0W、1週(1W)、4週(4W)、及び8週(8W)に各群4匹ずつを解剖した(4Wの低用量群はfightingにより1匹が死亡したため解剖動物数は3匹となった)。イソフルラン吸入麻酔下で、開胸(T-CNT7の混入防止のため、被毛に付着したT-CNT7が開胸部に付着しないように留意)、肺の虚脱を防ぐ目的で気管を結紮した後、左心房にカニューレ挿入し、腋窩動脈を開放し灌流固定をおこなった。先ず、約40cm水柱の静水圧条件下で、生理食塩水を灌流し腋窩動脈開放部から透明の生理食塩水が流出することを確認し、次いで4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(4%PFA、和光純薬工業、組織固定用、用事調整)

を同静水圧で約3分灌流した。結紮した気管と共に肺を虚脱させないように注意しつつ摘出し、さらに同組成固定液(4%PFA)にて一晚浸漬固定(冷蔵)した。その際、脱脂綿により肺の固定液面からの浮上を防いだ。翌朝、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(ナカライテスク)に交換して保存、切り出しを行った。

その他の臓器は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液に浸漬固定した。

なお、被毛と消化管内容物に含まれるT-CNT7の固定時の混入を防ぐため、皮膚と消化管は検査対象から除外した。

B-2. 病理組織標本作製

定法に従いパラフィン包埋し、HE染色標本、及び線維化の観察にマッソントリクローム染色(Masson trichrome stain)を作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織検査を行った。

型肺胞上皮細胞(型細胞)のマーカーとしてsurfactant protein C(SP-C)、マクロファージのマーカーとして、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。MARCOはマクロファージのスカーベンジャーリセプターであり、MWCNTに結合すると報告されている¹。染色条件を以下に示す。

SPC(FL-197): SC-13979、Santa Cruz、
希釈倍率×200、

抗原賦活 Proteinase K 10分

MARCO: LSBio-B15006、

希釈倍率×100、室温1時間

抗原賦活 Target Retrieval Solution(DAKO)、
pH9、10~20分

二次抗体にはシンプルステインマウス組織用(ニチレイ)を用い、DAB発色した。

B-3. 病理組織学的検査

曝露後0W、1W、4W、8Wの肺について肺内のT-CNT7の沈着と組織反応の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。

B-3-1. T-CNT7貪食マクロファージの動態解析

非分解性である MWCNT を貪食あるいは貪食しようとした肺胞マクロファージは Frustrated phagocytosis に陥りアポトーシスに至り、貪食していた MWCNT を放出し、放出された MWCNT は次の肺胞マクロファージに補足され同様のサイクルが繰り返されると理解されている。この現象が T-CNT7 を吸入曝露した本実験で起きていることが、先行研究により明らかとなっていることから、MARCO 陽性細胞を追跡することで、肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析する。MWNT-7 が複屈折性を示すことを利用し、その局在を偏光観察により捕捉し、MARCO 陽性細胞との関係を明らかにする。今年度報告では、まだ対照群と高用量群について MARCO 免疫染色結果を視覚的な判断を行った予備調査の段階であるが、今後、数値データ化して量反応関係を求める。

(引用文献)

1: S. Hirano, S. Kannno, A. Furuyama. Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. Toxicology and Applied Pharmacology. 232:244-251, 2008

(倫理面への配慮)

本分担研究における動物実験は、科学的及び動物愛護の配慮を十分行い、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. 吸入曝露実験

C57BL/6NcrSlc 雄(wild type、12 週齢)マウスに T-CNT7(対照群、低濃度群、高濃度群)の全身吸入曝露を行い、曝露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解剖してサンプリングした 47 匹の肺組織について病理組織標本作製した(図 1、低濃度群 4W ファイティングにより 1 匹が途中死亡したため 3 匹)。

C-2. 病理組織標本作製

B-2 に記した方法により病理組織標本作製した。

C-3 病理組織学的検査

本試験では、通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は、T-CNT7 の肺内沈着以外は認められなかった(表 1)。T-CNT7 は気道及び肺胞マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺胞領域の細胞外の間質に存在した。貪食マクロファージは終末細気管支から肺泡洞の領域に集簇する傾向を認めた。以下、経時的に詳細を記載した。

0W: 終末細気管支から肺泡洞の領域における T-CNT7 沈着の様子を図 2-1-(1)に示した。長短、数十本～百本以上の T-CNT7 繊維を貪食したマクロファージを終末細気管支上皮面から肺泡洞にかけて認めた。T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、細胞死に向かう過程にある事を示唆する像であると考えられた。また、これら細胞死に向かう過程にある事が示唆される T-CNT7 貪食マクロファージの近傍には、貪食していた T-CNT7 を受け継ぐと思われるマクロファージは HE 染色標本で認められなかった。このことは後述の MARCO 免疫染色においても同様であった(図 3-4)。

0W での肺泡域での T-CNT7 貪食マクロファージ

沈着を図2-1-(2)に示した。肺胞域では一本乃至少数の T-CNT7 を貪食した肺胞マクロファージが散在性に認められた。

1W: T-CNT7 貪食マクロファージの肺内分布は曝露後 0W と同様、終末細気管支から肺胞洞の領域に多くみられた(図2-2-(1)、図2-2-(2))。終末細気管支から肺胞洞の領域に、多数の T-CNT7 が肺胞マクロファージに貪食された状態で肺の組織に沈着したもののほか、マクロファージに貪食されていない T-CNT7 の沈着も認められた(図2-2-(1)、図2-2-(2))。また、T-CNT7 沈着部に向かって近傍の終末細気管支からの上皮の伸び出しと考えられる所見も認められた(図2-2-(2))。肺胞域にはマクロファージに貪食されない T-CNT7 が散在性に沈着するが、肺の組織反応は認められなかった(図2-2-(3))。さらに、細気管支周囲の間質で、リンパ管内に T-CNT7 肺胞マクロファージが列をなしている所見が認められた。このことから、肺内に入った T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された(図2-2-(4))。

4W: 終末細気管支から肺胞洞の領域で肺の組織に細胞死に向かう過程にあると示唆される多数の T-CNT7 を貪食したマクロファージ(図2-3-(1)、B)を認めただけに、終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織に、終末細気管支上皮の伸び出し(図2-3-(1)、D、F)や出現頻度は低いものの、多核異物巨細胞を認めた(図2-3-(2))。ただし、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも8Wまでの期間内には、認められなかった。

8W: 終末細気管支から肺胞洞の領域に 型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認め、この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していることから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な組織変化の可能性が示唆された(図2-4-(1))。また、末梢気道周囲間質のリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージと、それに起因したと考

えられる単核球の出現が認められた。この所見においても、末梢気道周囲間質において局所的な組織変化が行われた可能性が示唆された(図2-4-(2))。

T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、局所的な組織変化の可能性を示唆する H&E 像を得たことから、今後、免疫染色による細胞種の同定、間質の構造変化の特定を行う事とする。その際、膠原繊維の増加が証明されれば、小型線維化病変に移行する可能性が高くなると思われる。

型細胞の増生の検討: 曝露後 0W、1W および 4W の高用量群における 型細胞の特異的マーカー、surfactant protein-C (SP-C) の免疫染色の結果、型細胞の増生を認めなかった(図2-5)。

肺線維化の検討: HE 染色では、肺に明確な線維化は認められなかった。このことは、マッソントリクローム染色においても確認された(図2-6)。

その他の変化: 肺胞に好酸球を認めたが、その数は多くなかった(図2-7)。

以上、曝露後 4W の肺は、曝露後 0W から 8W を通して最も多彩な組織像が認められたことから、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。肺負荷量測定結果との比較をもって確認する予定である。

C-3-1 T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

以下の結果を得た。

MARCO 陽性マクロファージ数の経時的推移:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、対照群と T-CNT7 高用量曝露群との比較で曝露後 0W では対照群と比べ、T-CNT7 高用量曝露群で MARCO 陽性の肺胞マクロファージ数の明らかな増加が示された(図3-1)。4W 及び8W において差は認められなかった。

MARCO 陽性マクロファージの肺内分布:

MARCO 免疫染色の写真からの判断であるが、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである 終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。

T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布について経時的推移をみると、曝露後 0W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4W と 8W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中してくる様子が認められた。

なお、曝露後 4W と 8W での T-CNT 貪食マクロファージの MARCO 免疫染色の DAB 発色は減弱し、び漫性を呈したり、痕跡程度となったものが多く認められた(図3-2)。

T-CNT7 貪食による MARCO 陽性マクロファージの形態学的変化:

T-CNT7 高用量曝露群で T-CNT7 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することが示された。また、著しく膨化して MARCO 免疫染色の発色が著しく減弱した肺胞マクロファージには萎縮したものや、MARCO 免疫染色陽性反応が痕跡程度のものが認められた(図3-3、3-4)。

D. 考察

病理組織学的検査

本試験では、通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は、T-CNT7 の肺内沈着以外は認められなかった。T-CNT7 の肺内沈着は気道及び肺胞マクロファージに貪食された状態、あるいは、肺胞領域の細胞外の間質に存在し、貪食マクロファージが終末細気管支から肺胞洞の領域に集簇する傾向が認められた。この結果は、先行研究での知見と一致するものであった。経時的に追うと、曝露後 0W から短、数十本～百本以上の T-CNT7

繊維を貪食したマクロファージが終末細気管支上皮面から肺胞洞にかけて認められたが、これらの T-CNT7 貪食マクロファージには胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められた。免疫機能評価(分担研究 石丸直澄教授)で、肺胞洗浄液(BALF)の単核球を集めたフローサイトメトリー解析で曝露後 0W に生細胞の割合が減少し、高濃度、低濃度群ともに肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)の減少が示された。高濃度群の肺胞マクロファージの減少は曝露後 8W まで持続することが示された。免疫機能評価での結果とあわせて、病理形態学的に T-CNT7 貪食マクロファージにみられた胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見は、マクロファージが細胞死に向っていることを示唆する所見であると考えられた。

曝露後 4W に終末細気管支・肺胞洞接合部の内腔に突出した小結節状の増生組織や出現頻度は低いものの、多核異物巨細胞を認められたが、類上皮細胞肉芽腫を形成する所見は、少なくとも8W までの期間内には、認められなかった。

曝露後 8W に、終末細気管支から肺胞洞の領域に型細胞もしくはクララ細胞と毛細血管からなる小結節性の変化を認めた。この小結節性内にはマクロファージに貪食された T-CNT7 の凝集塊が存在していたことから、T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な肺胞構造が改変されている可能性が示唆された。本試験の曝露条件下では、曝露後 0W から 8W を通して曝露後 4W の肺に最も多彩な組織像が認められ、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。免疫機能評価(分担研究 石丸直澄教授)においても、曝露後 8W の BALF 中のサイトカイン、ケモカイン、増殖因子に対してマルチプレックス解析を実施した結果、VEGF あるいは IL-12 が T-CNT7 の曝露によって増加することが示されたことは、曝露後 8W での病理組織学的変化と関連したものと考えられた。T-CNT7 貪食マクロファージを中心とした、肺胞単位での局所的な組織改変の可能性を示唆する H&E 像を得たことから、今後、免疫染色による細胞種の同定、間質の構造改変の特定を行う事とする。その際、膠原繊維の増加

が証明されれば、小型線維化病変に移行する可能性が高くなると思われる。

その他の変化として、肺胞に好酸球が認められており、低濃度群の曝露後 0W の写真を提示した。低用量群での好酸球の増加は免疫機能評価(分担研究 石丸直澄教授)においても、曝露後 0W だけに示されており、病理組織学検査と BALF のフローサイトメトリー解析(好酸球:CD11c⁻CD11b⁺)の結果が一致した。

細気管支周囲の間質では、曝露後 1W と曝露後 8W にリンパ管内に T-CNT7 貪食マクロファージが認められた。このことから T-CNT7 にはリンパ路を介して肺外移送されるものがあることが示された。先行研究(平成 28 年度、26-化学-一般-003、今井田班報告)で同様の T-CNT の曝露(曝露濃度は 2mg/m³)を行った後、12 ヶ月後に解剖したマウスに気管支周囲に線維化が認められた。今回、免疫機能評価の分担研究においても、線維化に関係するとされる MMP12 が BALF の定量化 PCR で低用量群、高用量群とも有意な上昇が 0W から 8W まで持続的に認められたことから、線維化等の慢性影響についても T-CNT7 のリンパ路を介した肺外に移送に起因した可能性が示唆された。

T-CNT7 貪食マクロファージの動態解析

MARCO はマクロファージのスカベンジャーレセプターで、MWCNT に結合すると報告されている。この MARCO 陽性細胞を追跡することで、肺胞マクロファージの動態を、その個数、形態、肺組織内の分布の経時的推移をもって解析を試みた。

MARCO 陽性マクロファージ数の経時的推移の解析では、MARCO 免疫染色写真から判断した限りではあるが、対照群と T-CNT7 高用量曝露群との比較で曝露後 0W では対照群と比べ、T-CNT 高用量曝露群において MARCO 陽性の肺胞マクロファージ数の明らかな増加が示された。一方、免疫機能評価の分担研究における BALF のフローサイトメトリー解析では曝露後 0W に生細胞の割合が減少し、高濃度、低濃度群ともに肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)

が減少したという結果が示された。両者の結果が相反する結果となった理由としては、曝露後 0W における高用量曝露群の T-CNT 貪食マクロファージは MARCO 免疫染色(図 8-5)に示されるような、通常のマクロファージとは染色性や形態が大きく異なるものが増加し、これらの T-CNT 貪食マクロファージはフローサイトメーターでは細胞の形状・大きさから生細胞と認識されなかったものと考えられた。

MARCO 陽性マクロファージの肺内分布の解析では、MARCO 陽性の肺胞マクロファージは対照群、T-CNT7 高用量曝露群ともに気流のメインストリームである終末細気管支から肺胞洞に沿って多く分布していることが示された。T-CNT7 高用量曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージの分布の経時的推移は、曝露後 0W では肺内に広く散在性に分布するが、曝露後 4W と 8W では終末細気管支から肺胞洞の領域に集中してくる様子が認められた。これらの結果から T-CNT7 曝露群での MARCO 陽性の肺胞マクロファージは、曝露終了直後の 0W から終末細気管支から肺胞洞の領域に集中しているのではなく、T-CNT7 曝露が終了した後に 1ヶ月以上の時間をかけて終末細気管支から肺胞洞の領域に集まることが示された。

こうした肺の病理組織学的変化は免疫機能評価の分担研究で示された結果と密接に関係したものであると考えられた。

具体的には T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少、M1 と M2 マクロファージの比率の経時的な変動 が T-CNT 曝露群で示されたこと、曝露後 8W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇が該当する。

免疫機能評価での T-CNT 曝露群でのマクロファージ数の持続的な減少については、病理組織学的検査で T-CNT7 貪食マクロファージに胞体の膨化、細胞質の染色性低下及び核の消失を疑う所見が認められ、これらのマクロファージが細胞死に向かう過程にあると考えられたことと符合すると考えられた。

M1 と M2 マクロファージの比率の経時的な変動が

T-CNT 曝露群で示されたことや、曝露後 8W の肺組織における MMP12 の mRNA 発現、BALF 中での、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の上昇については、T-CNT7 投与に起因した貪食マクロファージにおける Frustrated phagocytosis としての分子生物学的特徴を示している可能性が考えられる。

今年度、高用量曝露群で MARCO 免疫染色陽性細胞の追跡を試み、この手法が T-CNT 貪食マクロファージの動態解析に有用であることを確認することができた。来年度は低用量群での調査を進めて、量反応関係のデータを取得する。肺の微小環境における組織反応には MARCO 陰性マクロファージが関与している可能性も考えられる。

今後、CD11c、F4/80 などの広域肺胞マクロファージマーカー、及び肺胞マクロファージの主要な役割である余剰サーファクタント処理に係るとされている核内転写因子 PPAR 等の多重免疫染色による解析を予定している。また、曝露後 8W に肺胞や細気管支周囲間質で局所的な組織改編と考えられる組織像が認められた。これらの微小肺病変の成り立ちから予後に至るまでの経過を明らかにし、そこにどのタイプのマクロファージがどのタイミングで係わるのかという点についても可能な限り研究を進めて情報を得る。

E. 結論

今回の T-CNT7 の吸入曝露実験では、T-CNT7 の肺内沈着以外に通常の毒性試験における病理診断項目に該当する顕著な病理所見は認められなかったが、微小な病理組織変化が肺の中で時間の経過とともに進行しており、本試験の曝露条件下では、4週を頂点に、組織反応が減弱する可能性が示唆された。こうした微小な病理組織変化の推移に関連した可能性がある免疫機能の変化も起きていたことが示唆された。これらについては、病理組織変化と免疫機能の変化がどのようにかわるのかを注意深く解析することによって、カテゴリー評価に有意義な事象として選別、拾い上げをすることが可能であると考えられた。

謝辞:

本分担研究は日本バイオアッセイ研究センター病理検査室の齋藤美佐江氏、妹尾英樹氏、高信健司氏 並びに国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の辻昌貴氏、森田紘一氏の技術的支援を得ることで遂行することができた。各位に深く感謝を申し上げます。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Senoh H, Kano H, Suzuki Masaaki, Ohnishi M, Kondo H, Takanobu K, Umeda Y, Aiso S and Fukushima S. Comparison of single or multiple intratracheal administration for pulmonary toxic responses of nickel oxide nanoparticles in rats. J Occup Health. 59: 112-121, 2017

2. 学会発表

- (1) 相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、齋藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入曝露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会、2016.08
- (2) 齋藤美佐江、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、高信健司、笠井辰也、酒井俊男、福島昭治; 菅野純、MWNT-7 吸入曝露したラットに認めた肺上皮細胞ならびに肺固有組織への分化を欠く上皮様細胞の増生、第 48 回日本臨床分子形態学会総会・学術集会、2016.09
- (3) 相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、高信健司、片桐卓、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入曝露したラットの末梢気道並びに肺胞に於ける上皮の

挙動、第 33 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017.01

(4) 梅田ゆみ、高信健司、片桐卓、妹尾英樹、相磯成敏、福島昭治、菅野純、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の104週間吸入曝露により誘発されたラットの肺癌と過形成病変、第33回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2017.01

(5) 相磯成敏、梅田ゆみ、大西誠、齋藤美佐江、近藤ひとみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、福島昭治、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、2017.8.24、大津

(6) 妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、相磯成敏、菅野純、アクリル酸メチルの104週間吸入曝露によるラットの鼻腔発がんと呼吸器病変、第34回日本毒性病理学会学術集会、2018.7.01.25

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

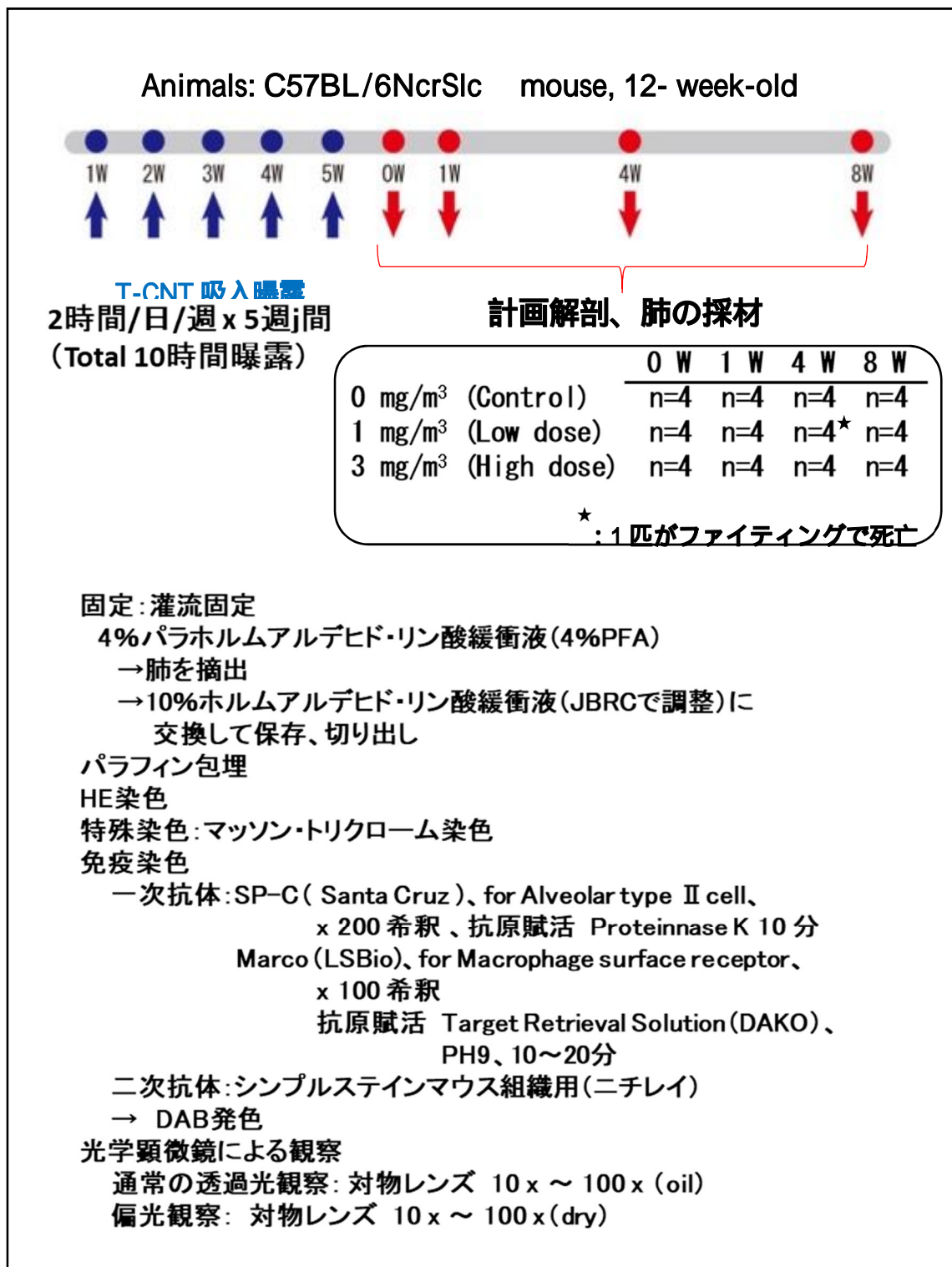


図 1. 実験デザイン

表 1. 病理検査結果

	0 W	1 W	4 W	8 W
1. T-CNT7の肺内沈着	+	+	+	+
2. II 型肺胞細胞の増生	—	—	—	—
3. 急性炎症	—	—	—	—
4. 線維化	—	—	—	—
5. 肉芽腫	—	—	—	—
6. BALTの増加	—	—	—	—

(+ : 当該所見あり : 当該所見なし)

- T-CNT7 の肺内沈着以外に明確な病態は認められなかった
- T-CNT7 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。
- 気道終末部と肺胞管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。

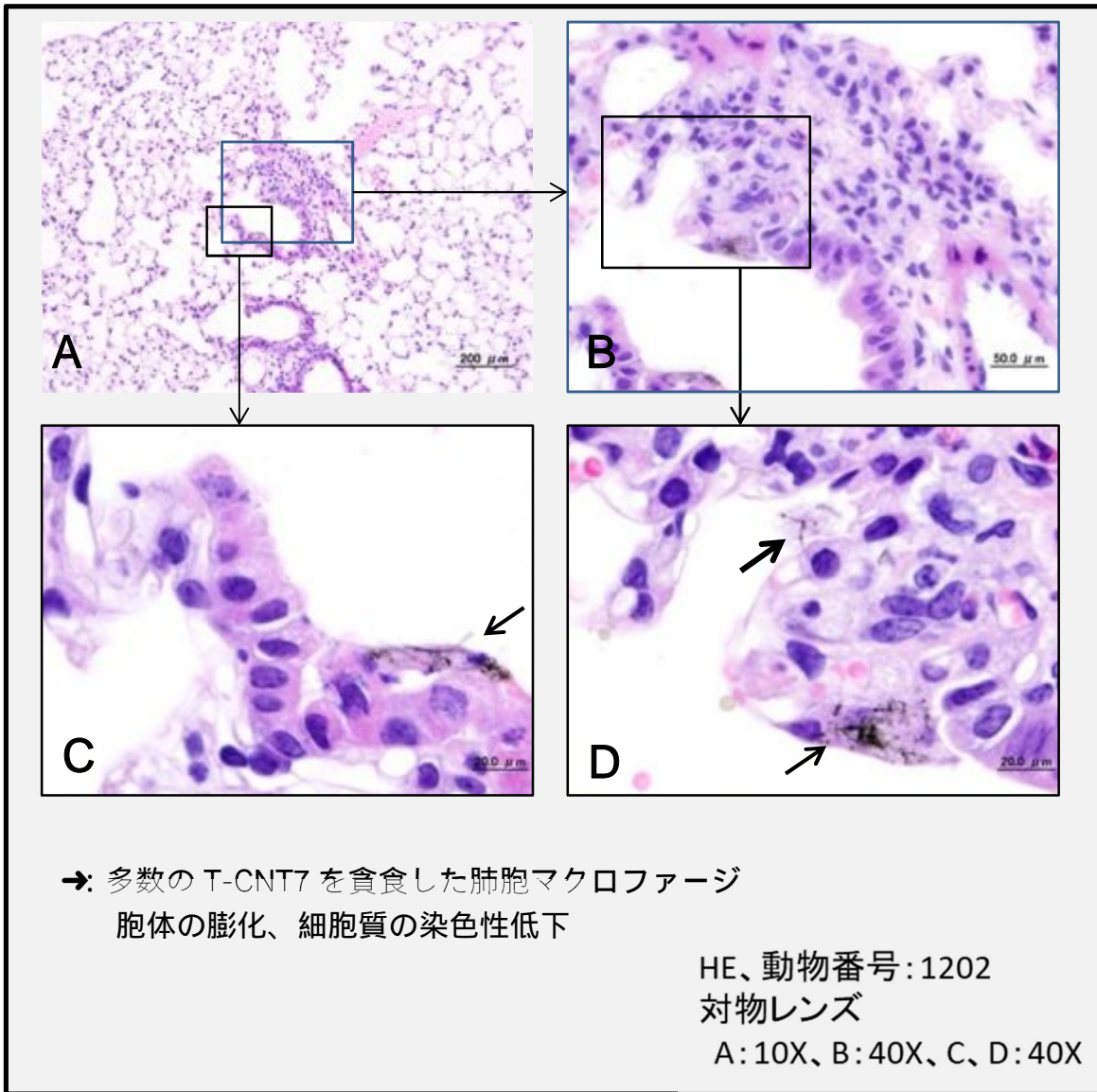


図 2 - 1 - (1). 病理組織学的検査 : 0 W
 終末細気管支から肺胞洞の領域

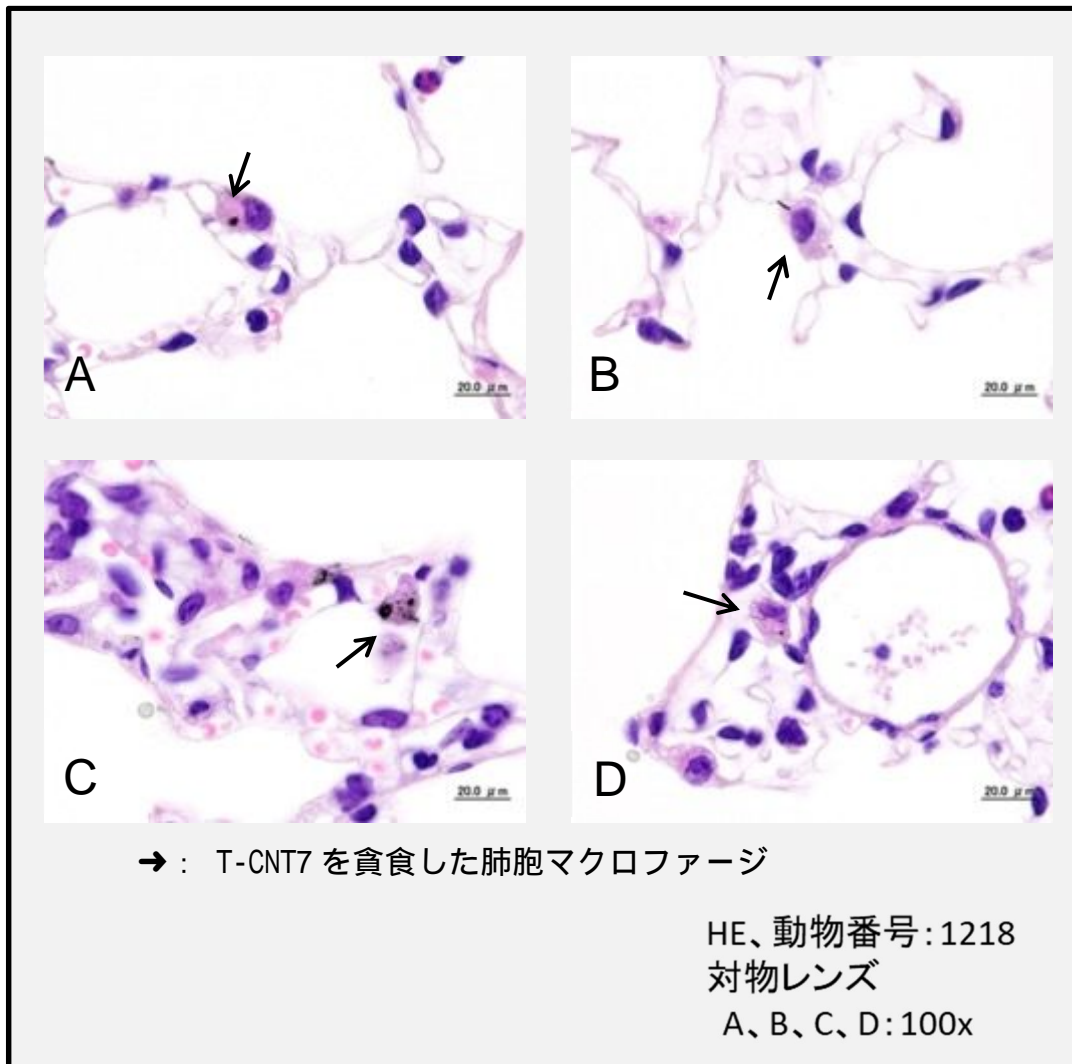


図 2 - 1 -(2). 病理組織学的検査 : 0 W
肺胞域

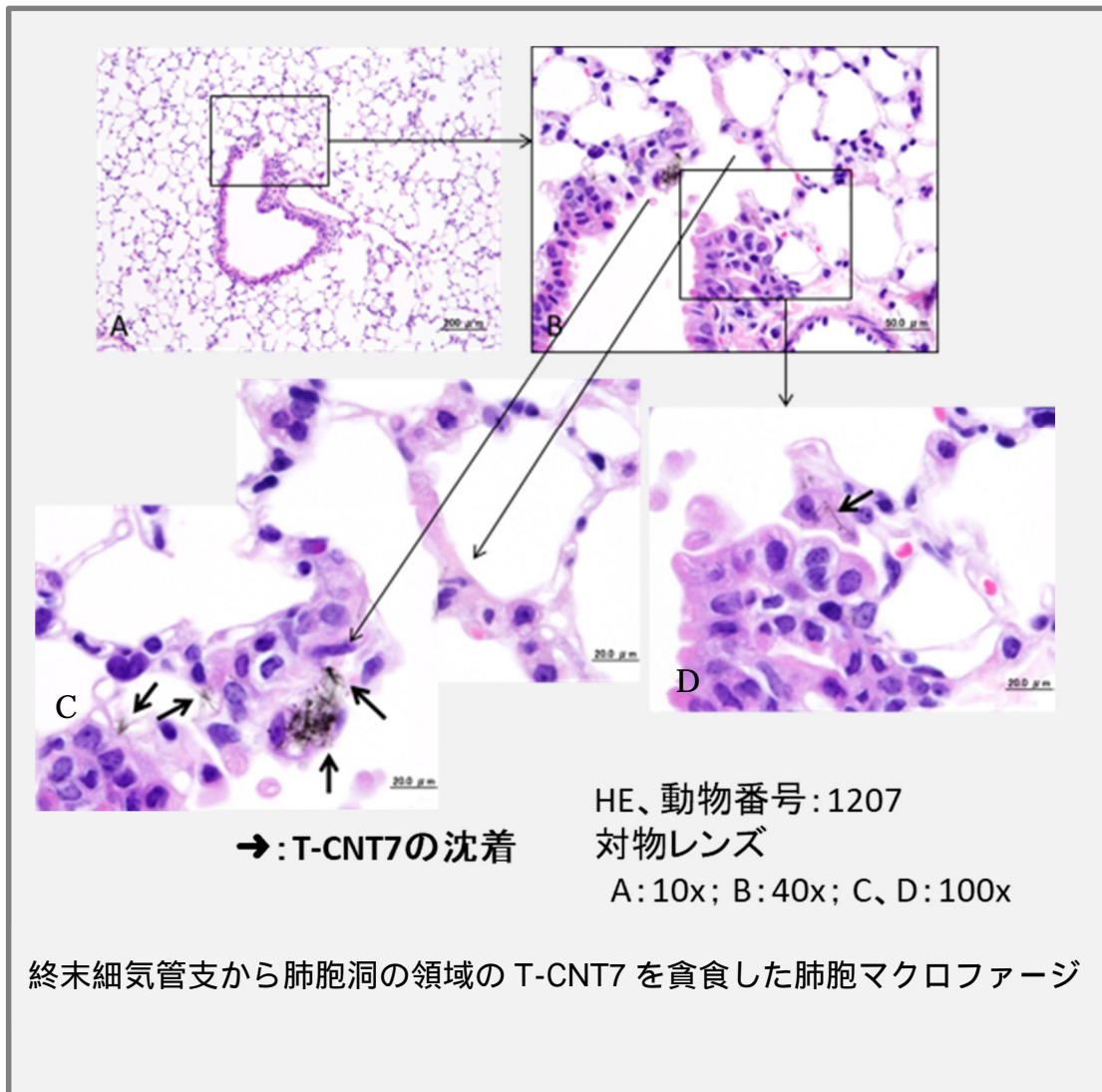


図 2 - 2 -(1). 病理組織学的検査 : 1 W

終末細気管支から肺胞洞の領域

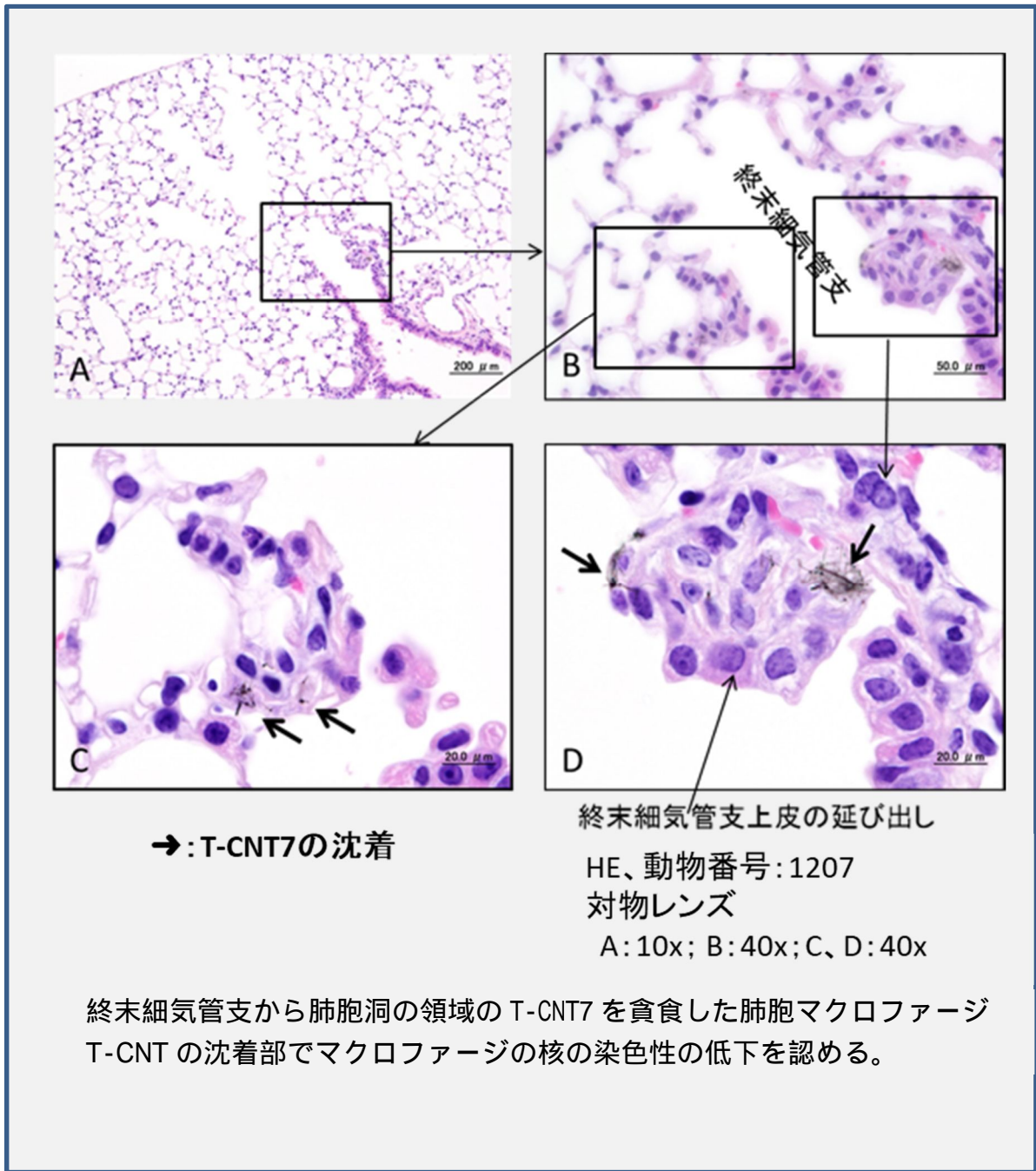


図 2 - 2 -(2). 病理組織学的検査 : 1 W

終末細気管支から肺胞洞の領域

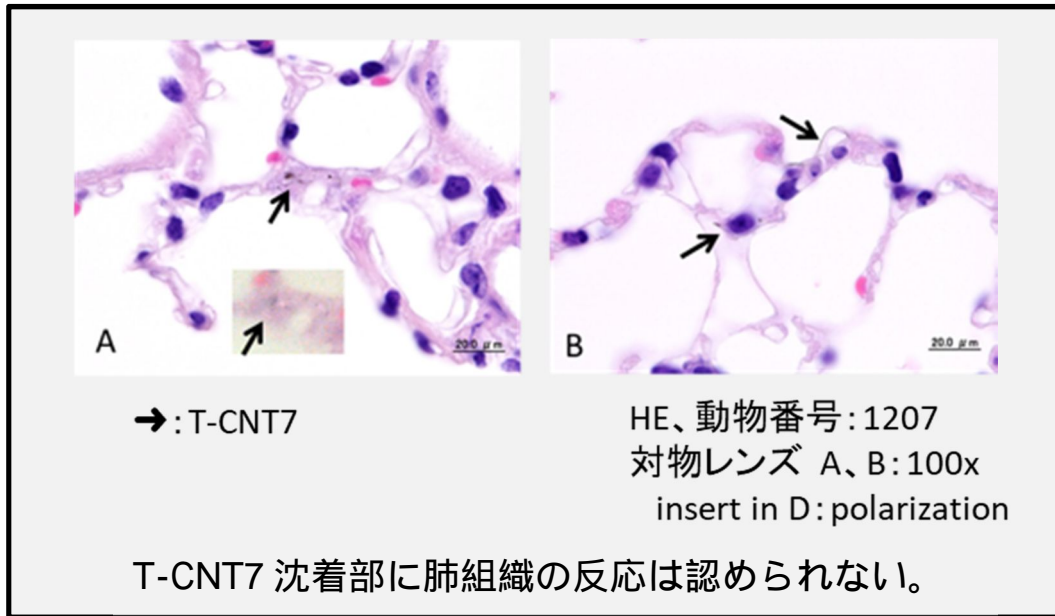


図 2 - 2 - (3). 病理組織学的検査: 1 W
肺胞域

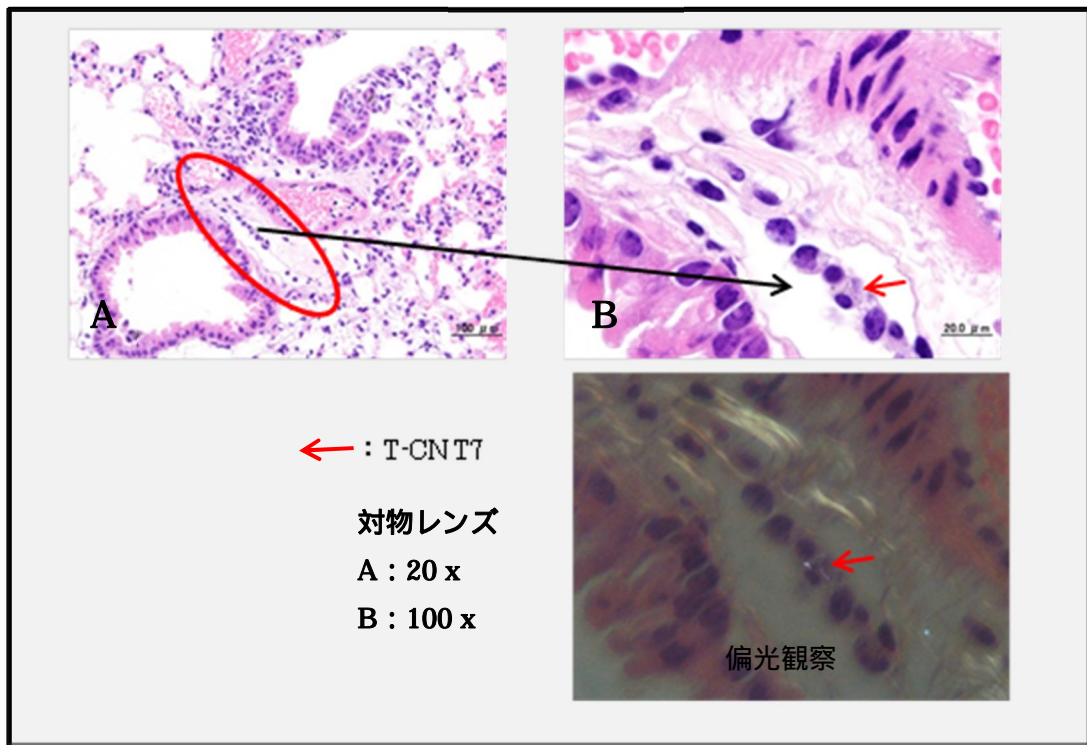


図 2 - 2 - (4). 病理組織学的検査: 1 W
細気管支周囲間質のリンパ管

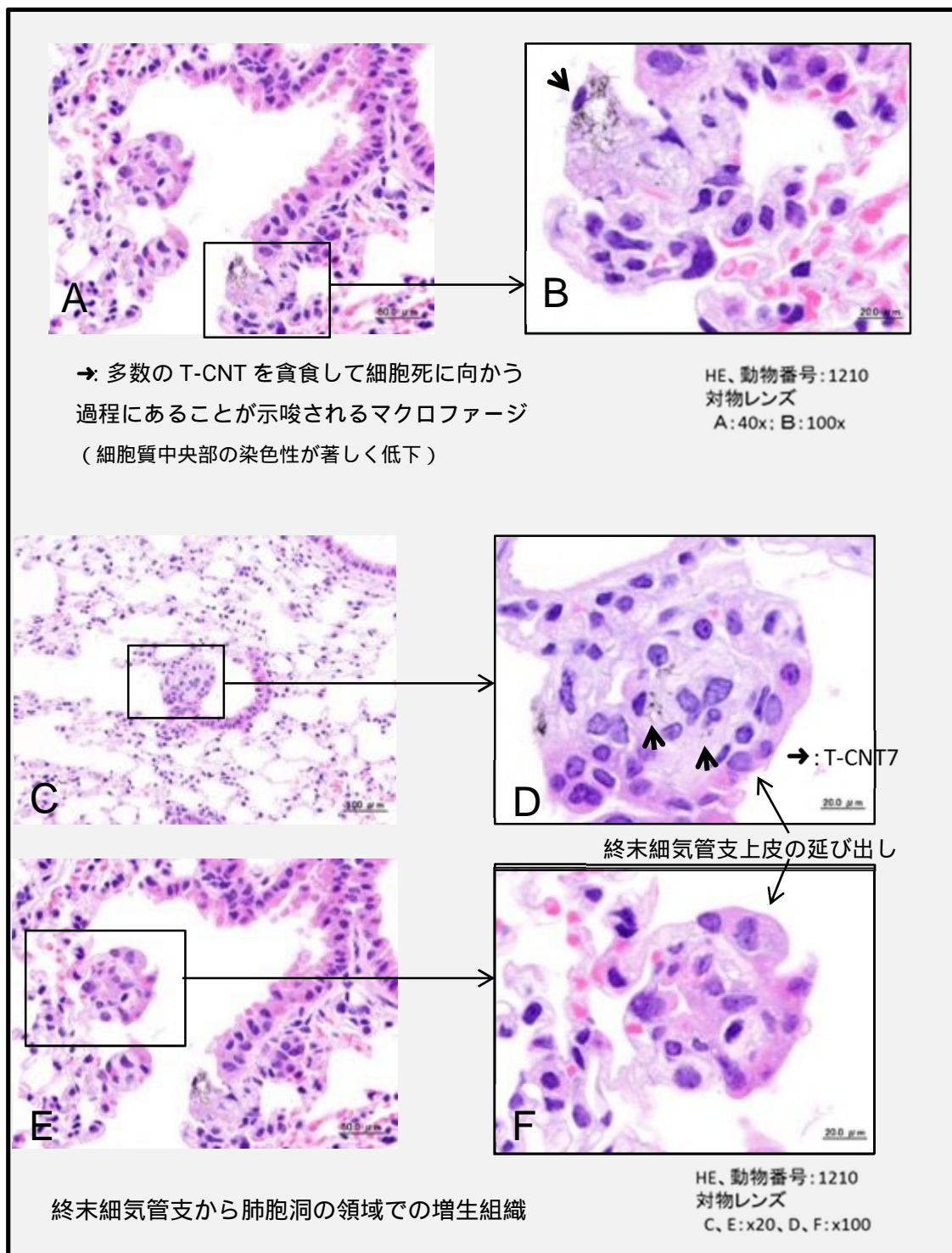


図 2 - 3 -(1). 病理組織学的検査 : 4 W
終末細気管支から肺胞洞の領域

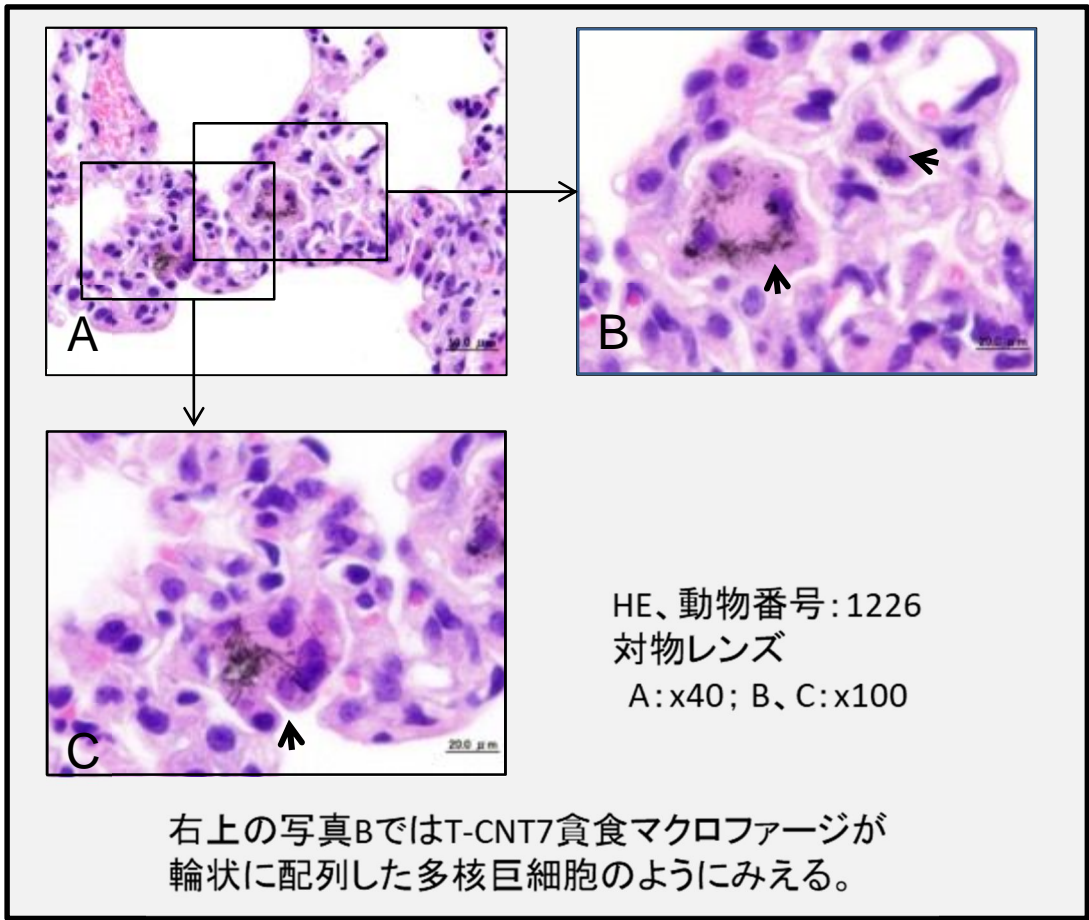


図 2 - 3 - (2). 病理組織学的検査 : 4 W

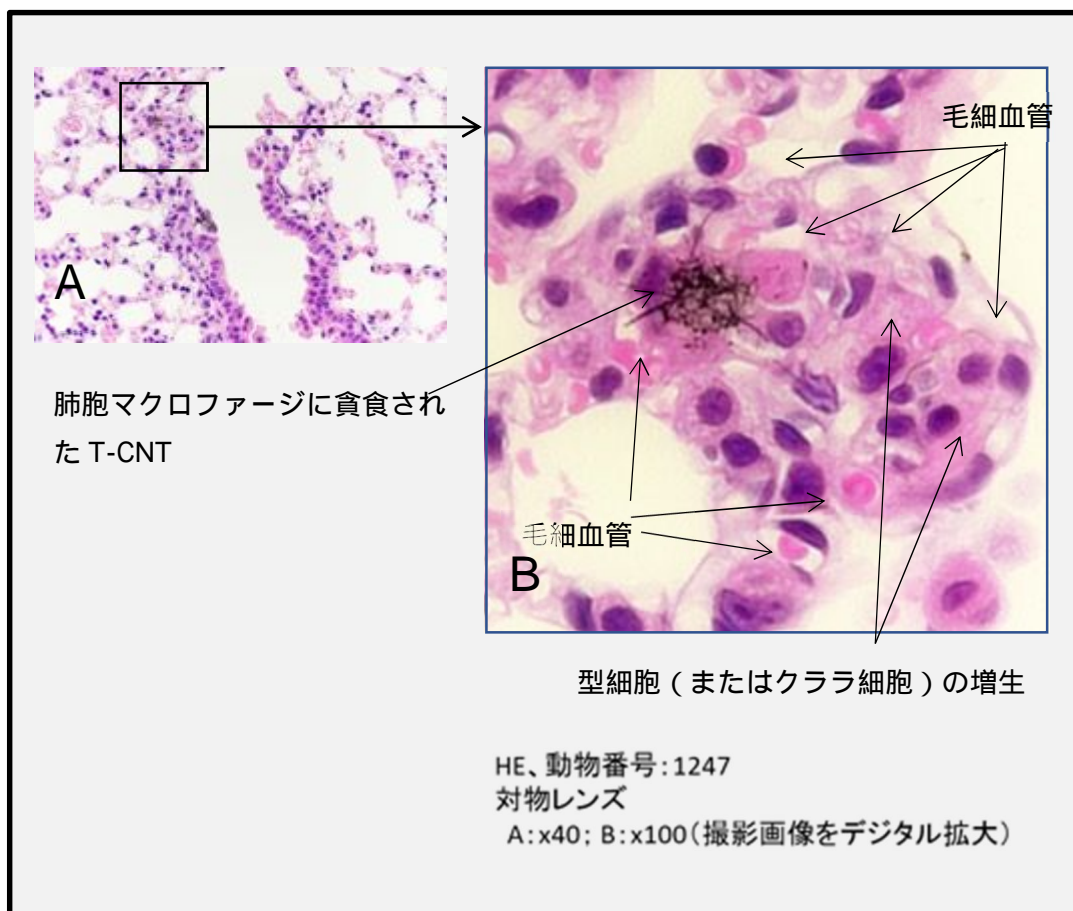
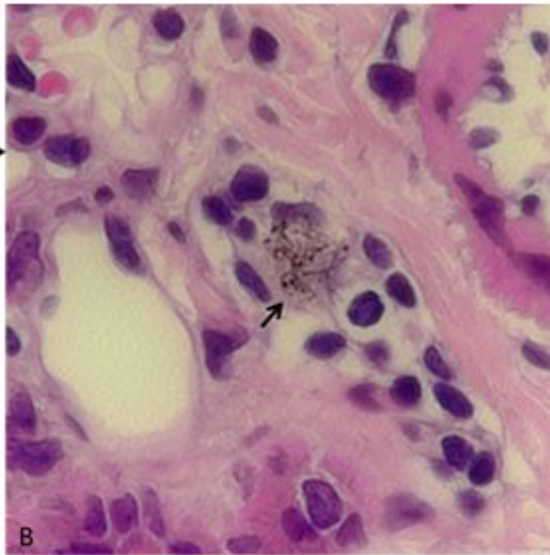
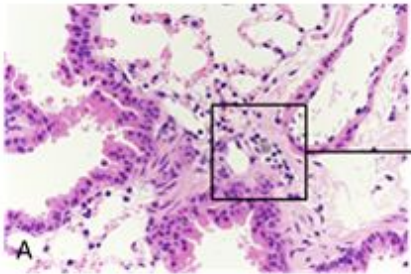


図 2 - 4 - (1). 病理組織学的検査 : 8 W



HE、動物番号：1247

対物レンズ

A：40x；B：100x（撮影画像を

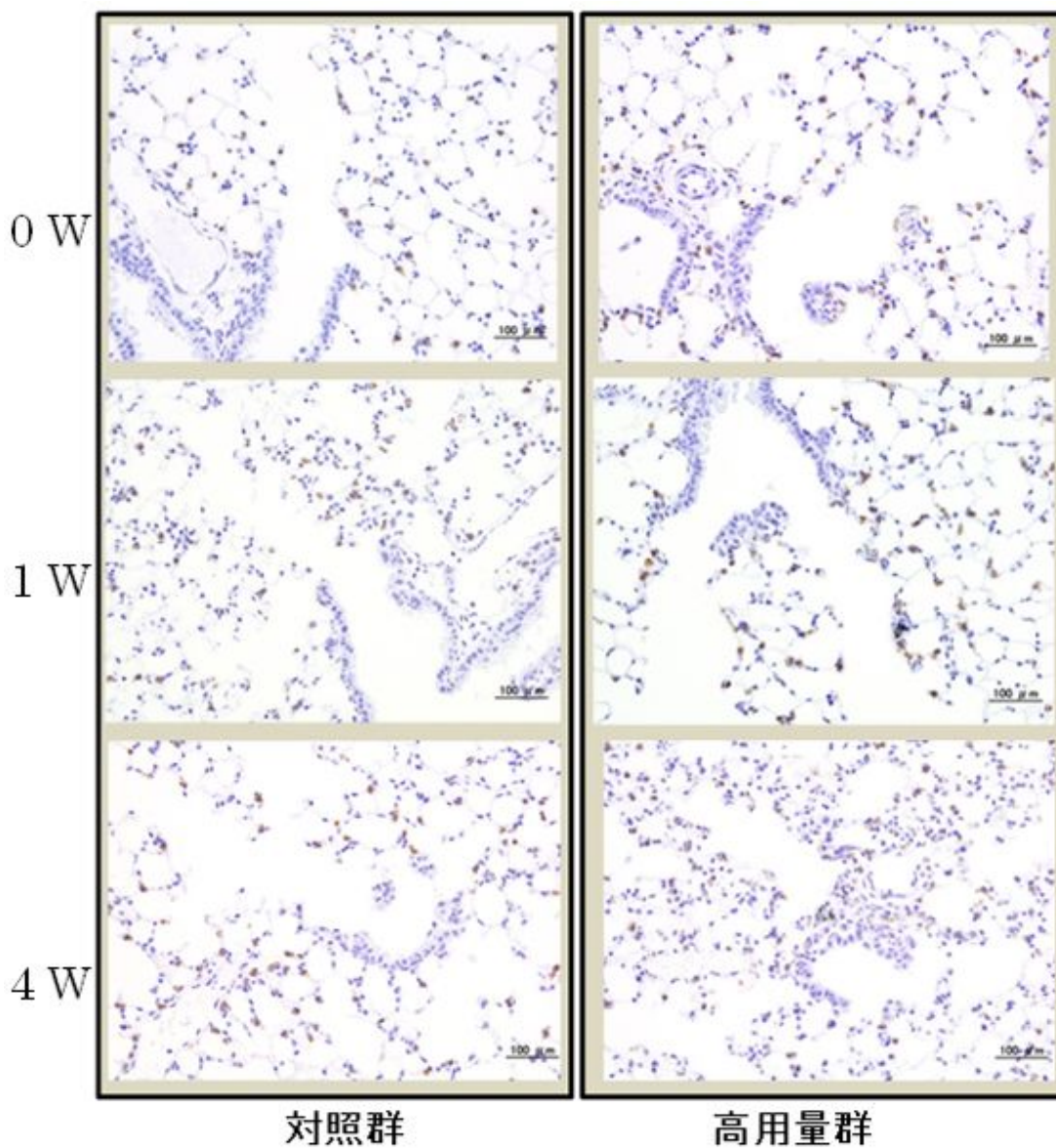
デジタル拡大）

リンパ管内の T-GNT7 貪食マクロファージと

単核球の出現

図 2 - 4 - (2). 病理組織学的検査：8W

細気管支周囲の間質



型細胞の増生を、高用量（T-CNT 3mg/m³）群の0 W から4 W について 型細胞の特異的マーカー-surfactant protein-C （SP-C）の免疫染色で調べた。その結果、0 W から4 W で対照群と高用量群の間でSP-C の発現に差はなかった。

図2 - 5 .病理組織学的検査：SP-C 免疫染色

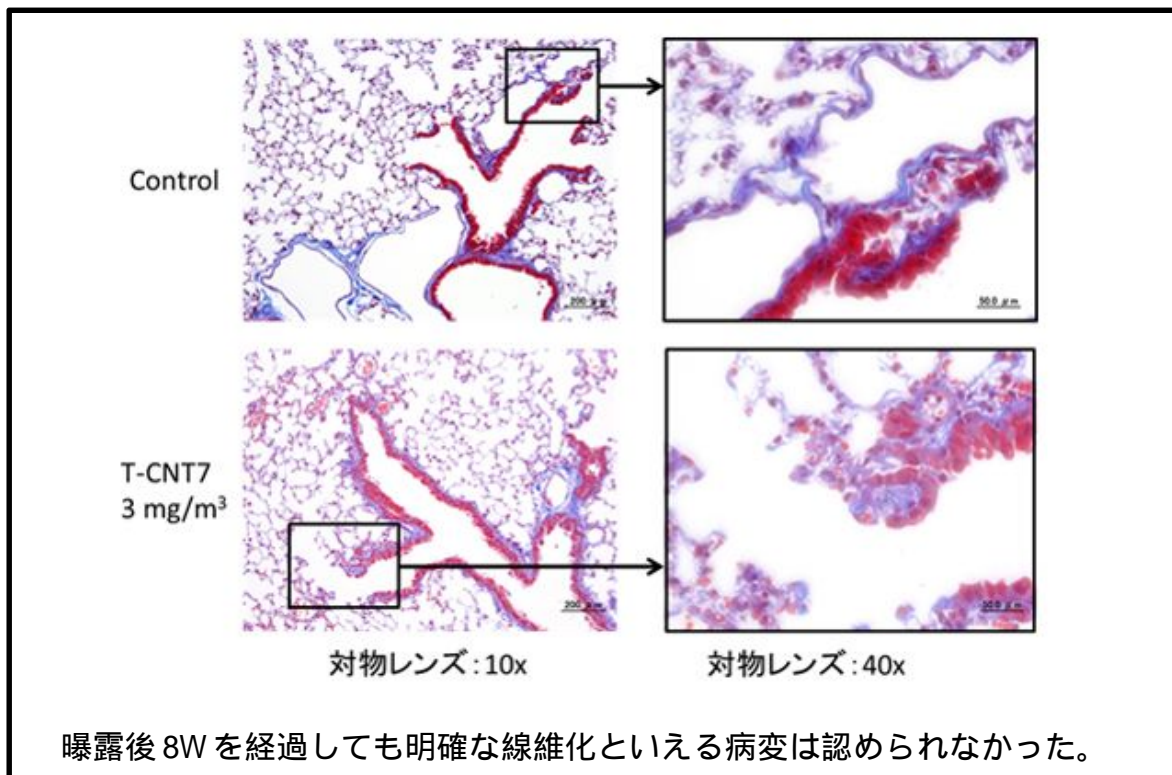


図 2 - 6. 病理組織学的検査：

マッソントリクローム染色

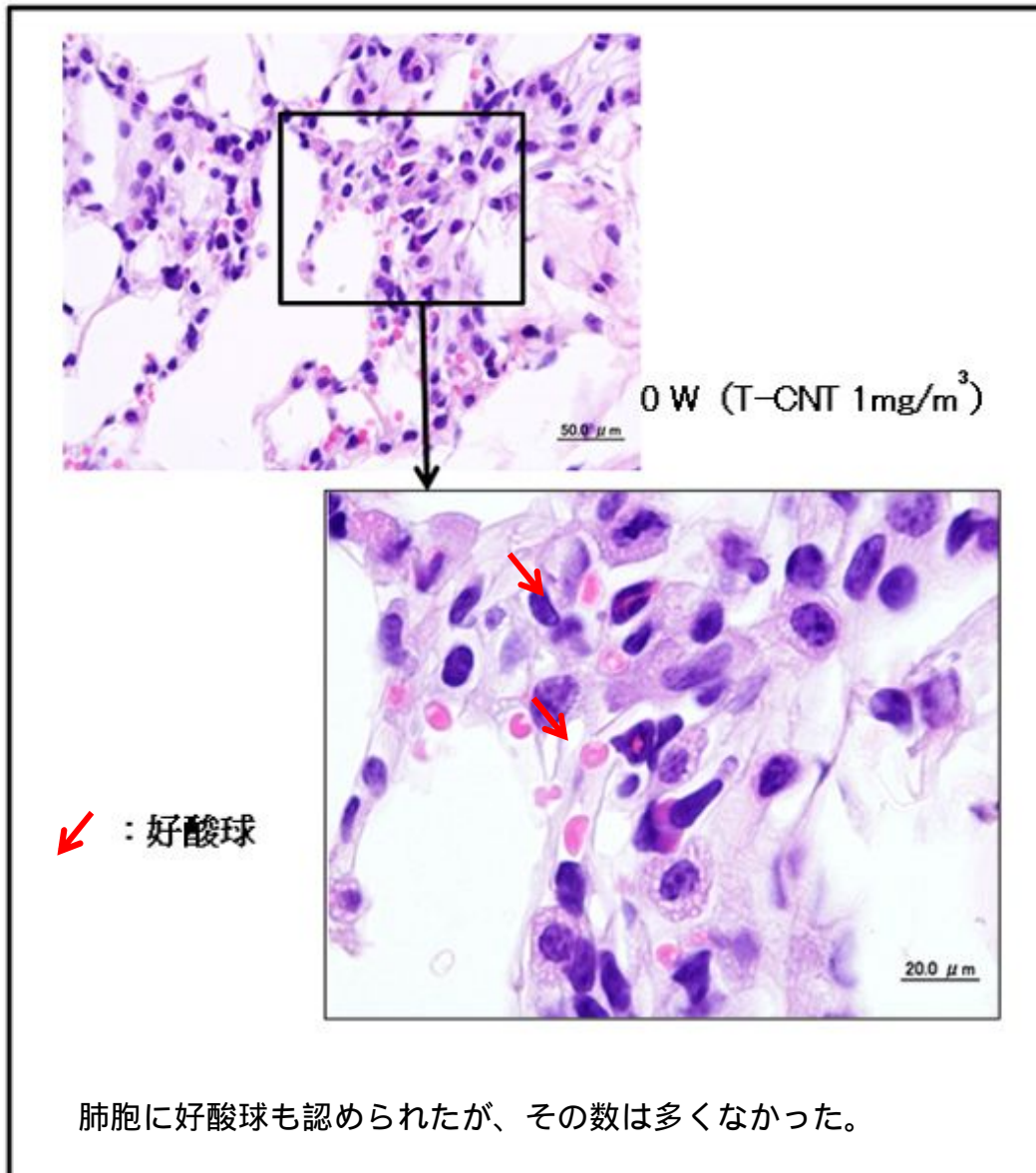


図 2 - 7. 病理組織学的検査：好酸球浸潤

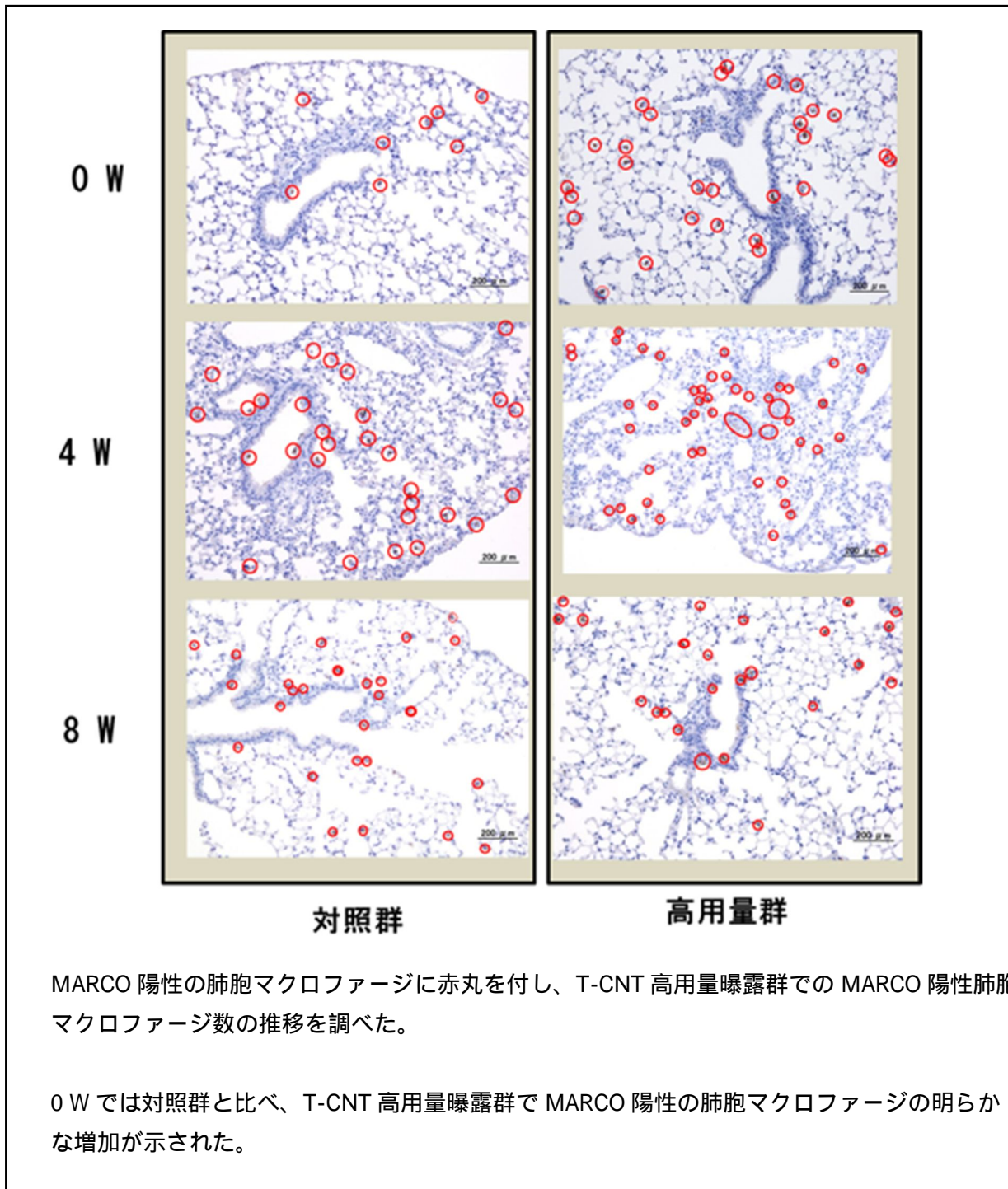
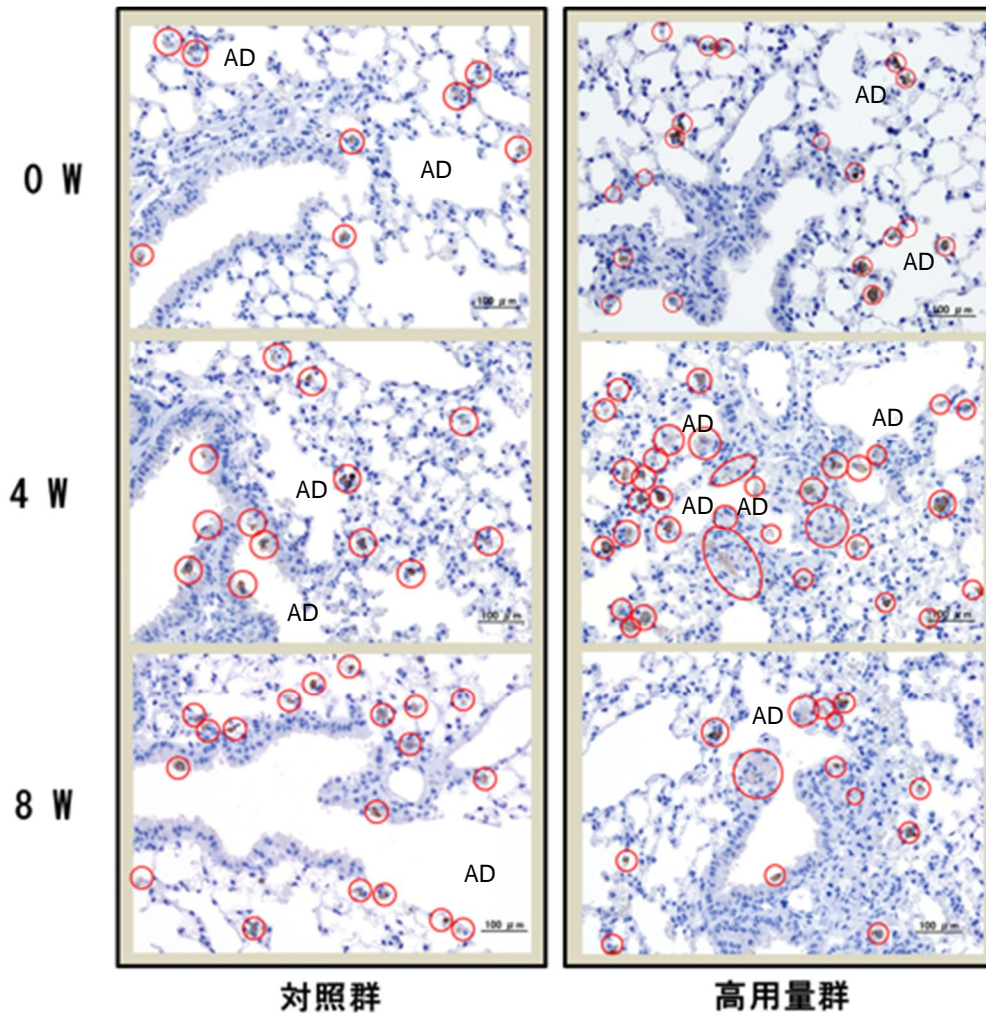


図 3 -1.Marco 免疫染色：

Marco 陽性肺胞マクロファージ数の経時的推移



AD：肺胞管

- MARCO 陽性肺胞マクロファージは、対照群、T-CNT 曝露群とも気流のメインストリーム（終末細気管支-肺胞管）に沿って多く分布していた。
- 吸入曝露によって肺の中に送り込まれた T-CNT7 はマクロファージに貪食され、曝露が終了した後も終末細気管支から肺胞洞の領域への集積が進み 4 W で最も顕著となるが、8 W では MARCO 陽性肺胞の染色性が低下し、DAB の発色が淡くび漫性となった。

図 3 - 2 .Marco 免疫染色：

Marco 陽性肺胞マクロファージの肺内分布

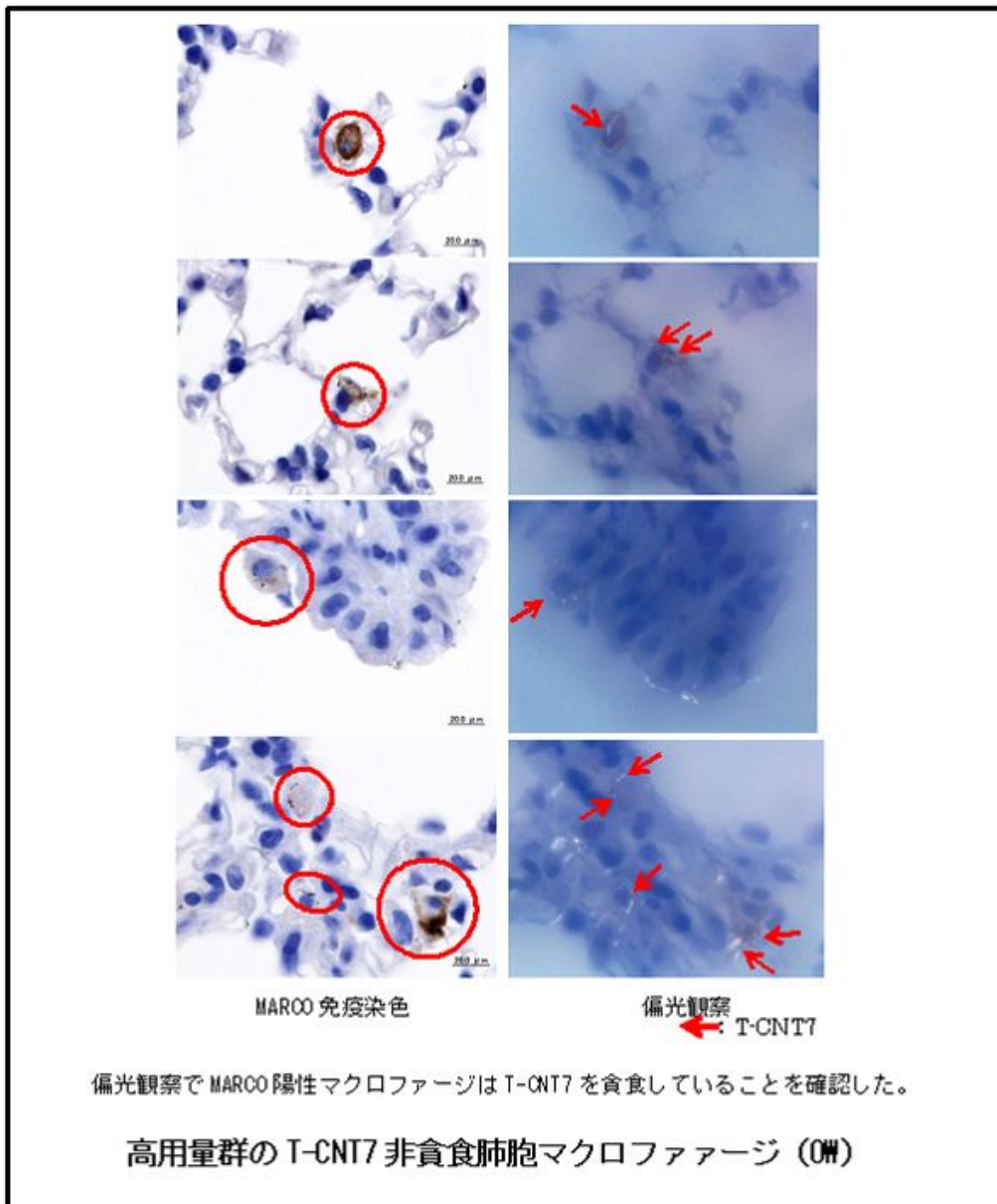


図 3 - 3. Marco 免疫染色：

T-CNT7 貪食肺胞マクロファージの形態

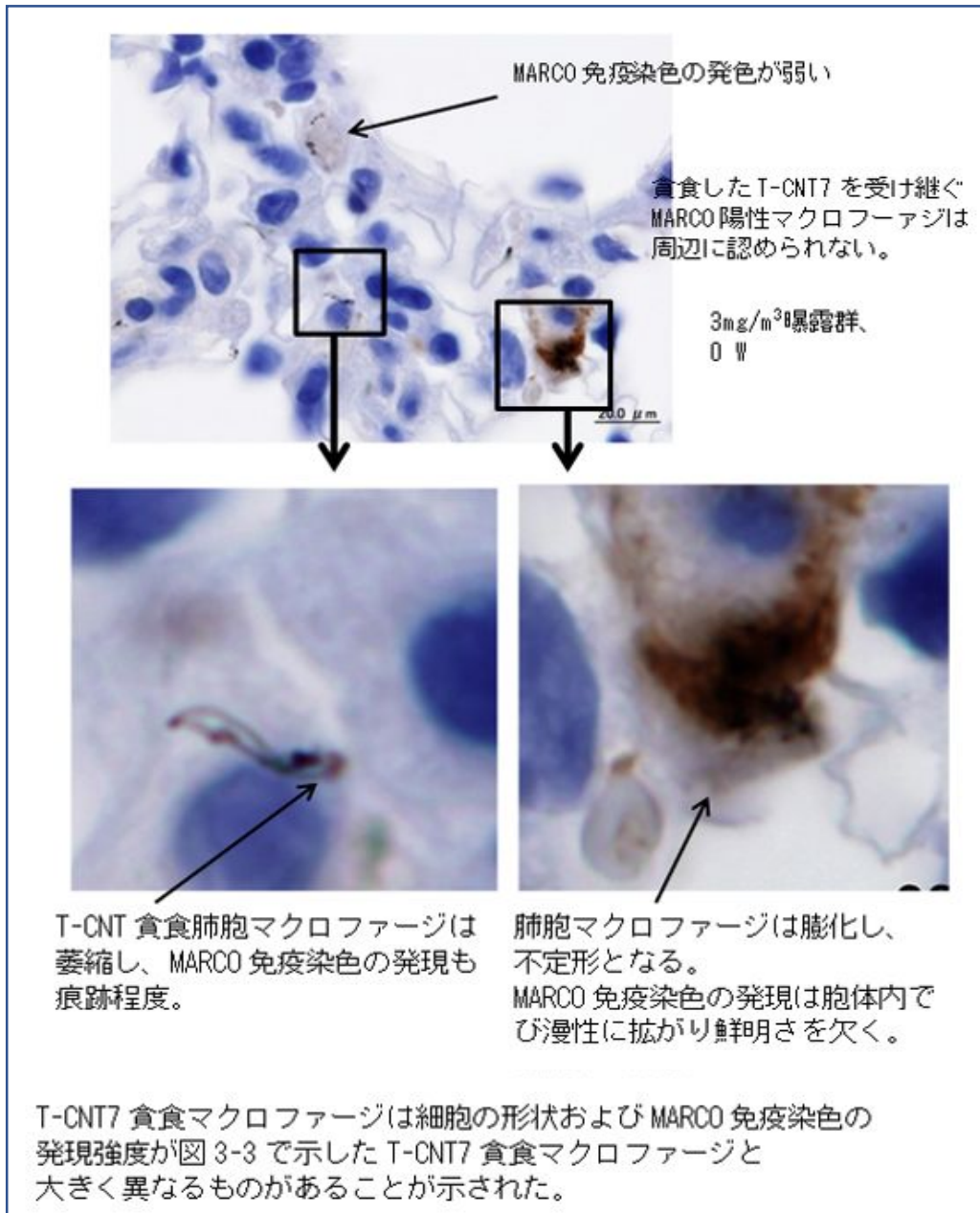


図 3 - 4 (続) . Marco 免疫染色 :

T-CNT7 貪食肺胞マクロファージの形態

平成29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: ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

分担研究者 : 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

研究協力者 高木篤也 同 動物管理室 室長
研究協力者 菅野 純 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 所長

研究要旨

本研究の目的は、工業的ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノマテリアルの肺胞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。本分担研究は、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を行い、定期解剖により試料のサンプリングし研究協力者に提供することを担当している。H29年度は、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を選択した。MWNT-7は、先行研究において開発した Taquann 法により高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴全身曝露吸入装置)を用いて曝露を行った。動物は、C57BL/6NCrSlc 雄性 12週齢を使用し、目標濃度を1または3 mg/m³に設定し、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1週間、4週間及び8週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。5日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値±SD)は、低用量群、高用量群それぞれ1.4±0.1 mg/m³、3.2±0.3 mg/m³であった。平均CPCカウント(平均値±SD)はそれぞれ、960±80/cm³、2340±238/cm³であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移が得られた。

A. 研究目的

本研究の目的は、工業的ナノ材料の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノ材料の肺胞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。

H29年度の本分担研究では、マクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を選択した。

MWNT-7は、先行研究において開発した Taquann 法により高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置(Taquann 直噴式全身曝露吸入装置)を用いて曝露を行った。動物は、C57BL/6NCrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度を 1 または 3mg/m³ に設定し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。

B. 研究方法

B-1. 検体の高分散化処理(Taquann 法)

MWNT-7は、Taquann 法処理により、凝集体・凝固体を含まない高分散検体として実験に供した。

粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノ

マテリアルの全身曝露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。また、検体に用いた MWCNT には製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。ヒトが現実的に曝露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。ヒトと比較して細い気道径を有するマウスを用いた吸入実験では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。そのため、実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある(図1)。以上の点から、先行研究において、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維のみからなる分散性の高い検体を得る処理法(Taquann 法、特許取得済)を独自に開発した。

Taquann 法は、走査型電子顕微鏡(SEM)の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、検体を三級ブタノール(TB、融点; 25.69 °C、関東化学株式会社 特級)に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾液を溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の検体が得られる(図2)。

(1) MWCNT

MWCNTは三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm)
長さ	1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
繊維数	3.55×10 ¹¹ 本/g

形状 菌状凝集体を含む単離繊維

化学組成 炭素純度 99.5%以上

鉄: 3500 ppm

硫黄: 470 ppm

塩素: 20 ppm

フッ素: <5 ppm

臭素: <40 ppm

MWCNT 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μ m) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

以下、Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7 と記載する。

B-2.DWCNT のマウス全身曝露吸入実験

(1) 動物

C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウスを 10 週齢で購入し 2 週間の馴化期間を経たのち 12 週齢にて使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT を含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

(2) 飼育条件

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 4 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (商品名: VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度; 25 \pm 1、湿度; 55 \pm 5%、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時 ~ 20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、

飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

(3) 群構成

対照群、低用量群 (目標濃度 1 mg/m³)、高用量群 (目標濃度 3 mg/m³) の 3 群構成とした。各群 48 匹のマウスを使用し、病理組織用に 16 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 20 匹を割り当てた。曝露チャンバーに収容できるマウスの匹数が 16 匹であることから、各群を 16 匹のサブグループ (Sub-group A、Sub-group B、Sub-group C) に分け、1 日 2 時間 (10:00 ~ 12:00) の週 1 回の吸入曝露を 5 週間反復し、合計 10 時間の曝露を行った (表 1)。

(4) ダスト発生装置

MWCNT のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社) (図 2)。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジ (容量: 23.5 mL、内寸: 直径 22 mm 高さ 65 mm) はステンレス製で、円筒状胴体、4 つの噴出孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバルブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、所定の濃度 (0.025 又は 0.05 mg/mL) で TB に T-CNT7 を再懸濁し、各カートリッジに懸濁液 10 mL を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TB を昇華除去することで達成した。低用量群では 250 μ g/カートリッジ、高用量群では 500 μ g/カートリッジを充填した。

噴射装置は、サブチャンバー (容量: 32 L) に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルタ

ーが接続されている。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して曝露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.4 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は約 13 L/min(基礎換気流量; 10 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、曝露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 8 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入曝露実験において、合計 17 本のカートリッジを使用した。

(5) 曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、チャンバーの蓋から吊るしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 16 匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製の OUTER チャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製した INNER チャンバーの 2 重構造となっている。INNER チャンバーは、直径 550 mm、高さ 550 mm、気積 105.5 L である。検体が触れる INNER チャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。

(6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

曝露チャンバー内の T-CNT7 の濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m³)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nm の粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、MN、

USA) を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。先行研究において、繊維状のナノマテリアルの場合には高濃度の測定では CPC による粒子数測定が低値で推移することが散見されたことから、低用量群では 7.5 倍希釈、高用量群では 15 倍希釈して CPC による測定を行った。また、曝露チャンバーと CPC を接続するチューブは、銅管を使用してサンプリングによる損失を最小限にした。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター(Model T60A20、φ55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 96.4%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して 1.5 L/min の流量で曝露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用した。

曝露チャンバー内の温度、湿度を曝露時間の 2 時間を通してモニタリングした。

(8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後(Day 0)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(8W)に定期解剖を行った。

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(DS ファーマアニマルヘルス)麻酔下で、眼窩より採血を行い、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛からコンタミを防止するため、開胸前に全ての被毛を除去した。

病理標本用の動物は、気道内の T-CNT7 の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸後、右心室に翼状針(21G、

SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約 40cm 水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。流量は点滴調節器により適宜調節した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入し、回路を切り替えて 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)を同静水圧にて約 3 分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。組織沈着量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後ホルマリン固定した。免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し PBS を 1 mL 注入して BAL を採取した。

(倫理面への配慮)

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、曝露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

(1) T-CNT7 の吸入曝露実験

実験に供したマウスは、いずれも体重推移に異常は認められなかった(図4)。一般状態観察においてファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

T-CNT7の5日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度(平均値 ± SD)は、低用量群、高用量群それぞれ 1.4 ± 0.1 mg/m³、 3.2 ± 0.3 mg/m³であった。平均CPCカウント(平均値 ± SD)はそれぞれ、 960 ± 80 /cm³、 2340 ± 238 /cm³であった(表2、図5)。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、低用量群、高用量群それぞれ 4.3 mg及び8.5 mgである。2時間の曝露チ

ャンバーの総換気量が1.2 m³であることから名目上の濃度は、低用量群、高用量群それぞれ 3.5 mg/m³及び7.1 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度から、エアロゾル化効率を計算するとそれぞれ40%及び45%であった。

(2) 剖検所見

本実験において定期解剖した全ての個体に剖検所見に肉眼的異常は認められなかった。

D. 考察

ナノマテリアルの吸入曝露実験においては、検体の凝集が問題となるが、これまでの研究において Taquann法とTaquann全身曝露吸入装置はこれを解決する手段として有効であることを示してきた。その一方で、MWCNT のように繊維状ナノマテリアルの場合、検体を噴射した直後に CPC による粒子数測定が一時的に低下する状況が散見されていた。本年度の研究では全ての曝露実験において安定した濃度推移が得られた。CPC 測定において希釈倍率を上げて測定したこと CPC 測定では低用量群では 7.5 倍希釈、高用量群では 15 倍希釈を行い測定した。CPC の測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWCNT のように繊維径は nm オーダーであるが、繊維長がµm オーダー粒子の場合、高い濃度では測定セル内で繊維が重なり、過小評価されることが考えられる(このような現象は、酸化チタンの測定では認められていない)。また、曝露チャンバーとCPCを接続するチューブは粒子の損失を抑制するため、通常導電性シリコンチューブが用いられるが、MWCNTでは不十分であることが判明した。より静電気を帯びにくい銅管を用いることで、CPCの反応性が改善された。

E. 結論

T-CNT7の Maus 5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、低用量群、高用量群それぞれ

1.4 ± 0.1 mg/m³, 3.2 ± 0.3 mg/m³, 平均 CPC カウントは 960 ± 80/cm³, 2340 ± 238/cm³ であり、実験期間を通して安定した濃度推移が得られた。定期解剖を行い、病理組織評価、免疫機能評価及び肺負荷量測定に供した。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた辻昌貴氏、森田紘一氏に深く感謝する。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

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

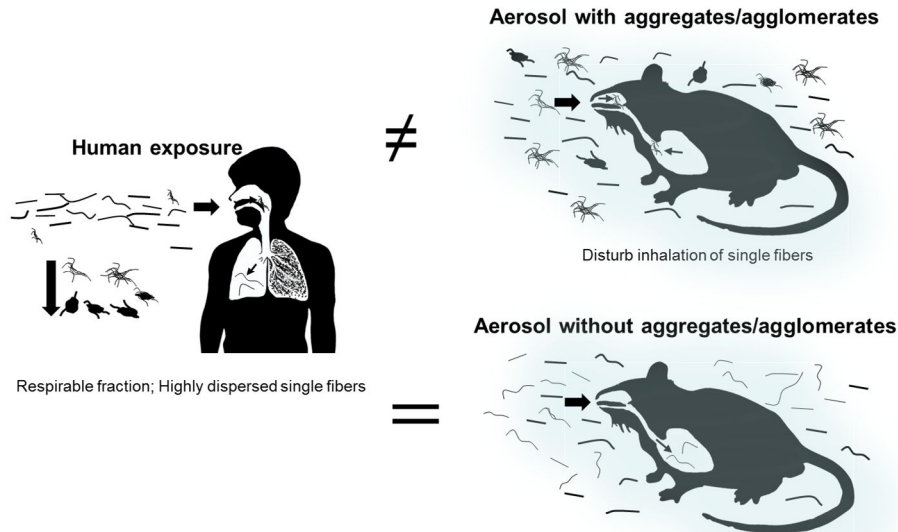


図1 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価方法

粒子状物質の吸入において、粒径分布は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子である。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルに曝露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入曝露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャンバー内の空気は強く攪拌されている。凝集体/凝固体を含む検体をエアロゾル化すると、ヒトに比較して細く短い気道を有するげっ歯類では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。以上のことから、吸入曝露試験において実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集体/凝固体を除去した上で分散性が高い検体を使用する必要がある。

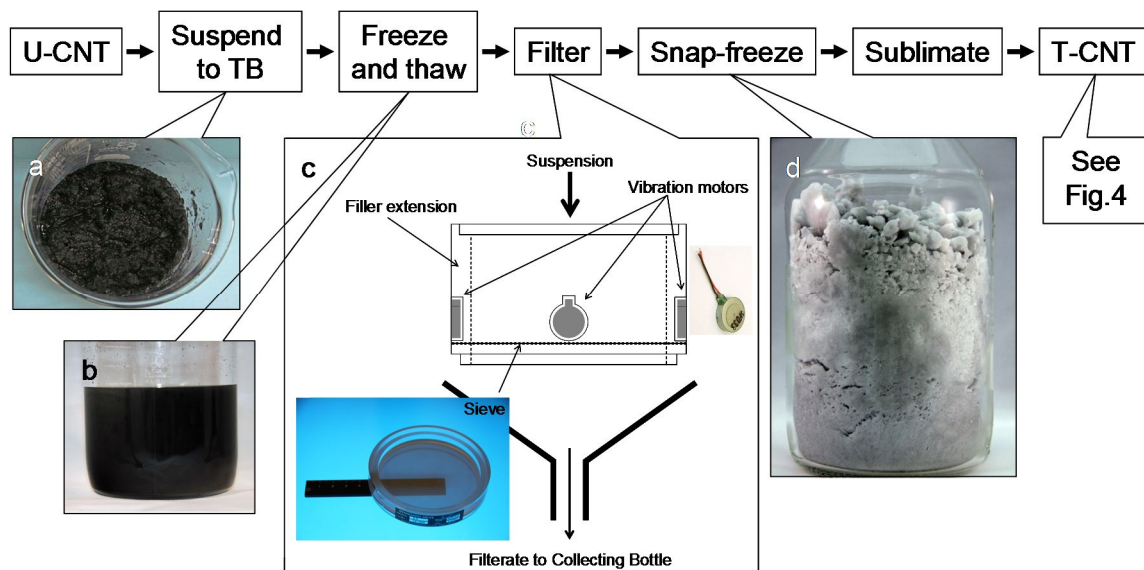


図 2 Taquann 法の概要

(a) MWCNT 原末 (U-CNT) を三級ブタノール (TB) に混合して氷冷して TB をシャベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混和する。(b) -25°C で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター (セイシン企業、目開き $25\ \mu\text{m}$) で濾過し大型の凝集体を除く。濾過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量: $17.6\ \text{m/s}^2$) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System Version 2.0

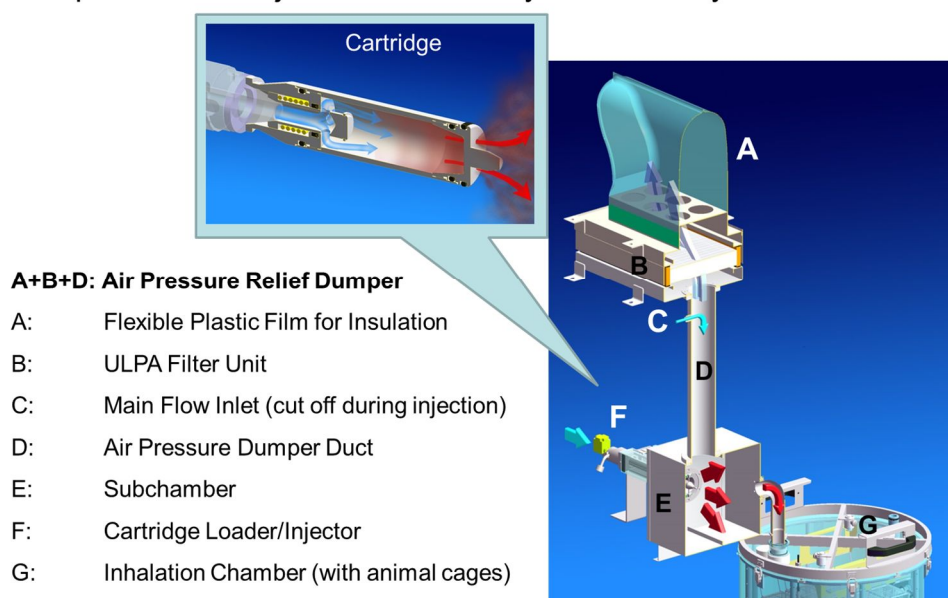


図 3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 2.0)

噴射装置は、サブチャンバーに接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーに煙突を設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターに接続されている。煙突部分の上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体はサブチャンバー内で気相に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して曝露チャンバーに導く構造となっている。

表 1 T-CNT7 曝露における群構成

Group	Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
			Day 0	1W	4W	8W
Control	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
Low Dose	• Lung Burden	12	3	3	3	3
1 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
High Dose	• Lung Burden	12	3	3	3	3
3 mg/m ³	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W × 5W	• Immune function					
Total 10hr	BALF	20	5	5	5	5
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into three sub-groups, A, B and C			
Total number of animals		144				

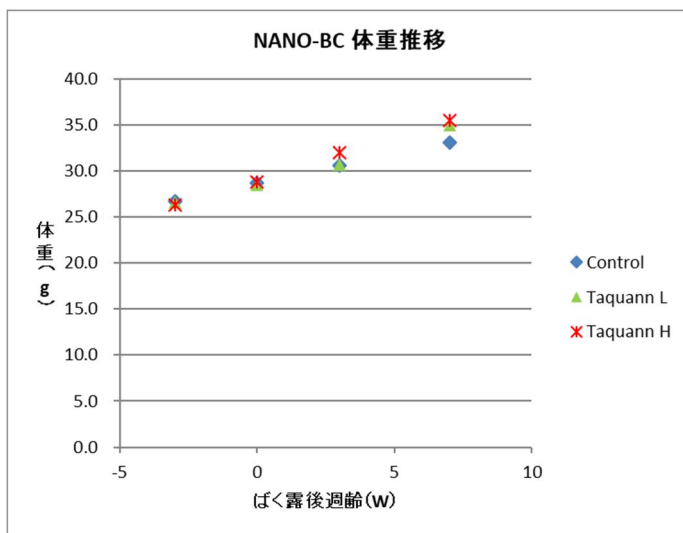


図 4 T-CNT7 の吸入曝露後の体重推移

体重推移に異常は認められなかった。一般状態では、ファイティングによる咬傷、脱毛が散見されたが検体曝露との関係は認められなかった。

表 2 T-CNT7 反復曝露における質量濃度と CPC による粒子数

		1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Low Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	1.4	1.6	1.4	1.4	1.4	1.4	0.1
	CPC Average(0-120min, # / cm ³)	905	1,047	888	912	1,046	960	80
High Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	3.6	3.4	3.3	3.2	2.7	3.2	0.3
	CPC Average(0-120min, # / cm ³)	2,097	2,352	2,107	2,525	2,621	2,340	238

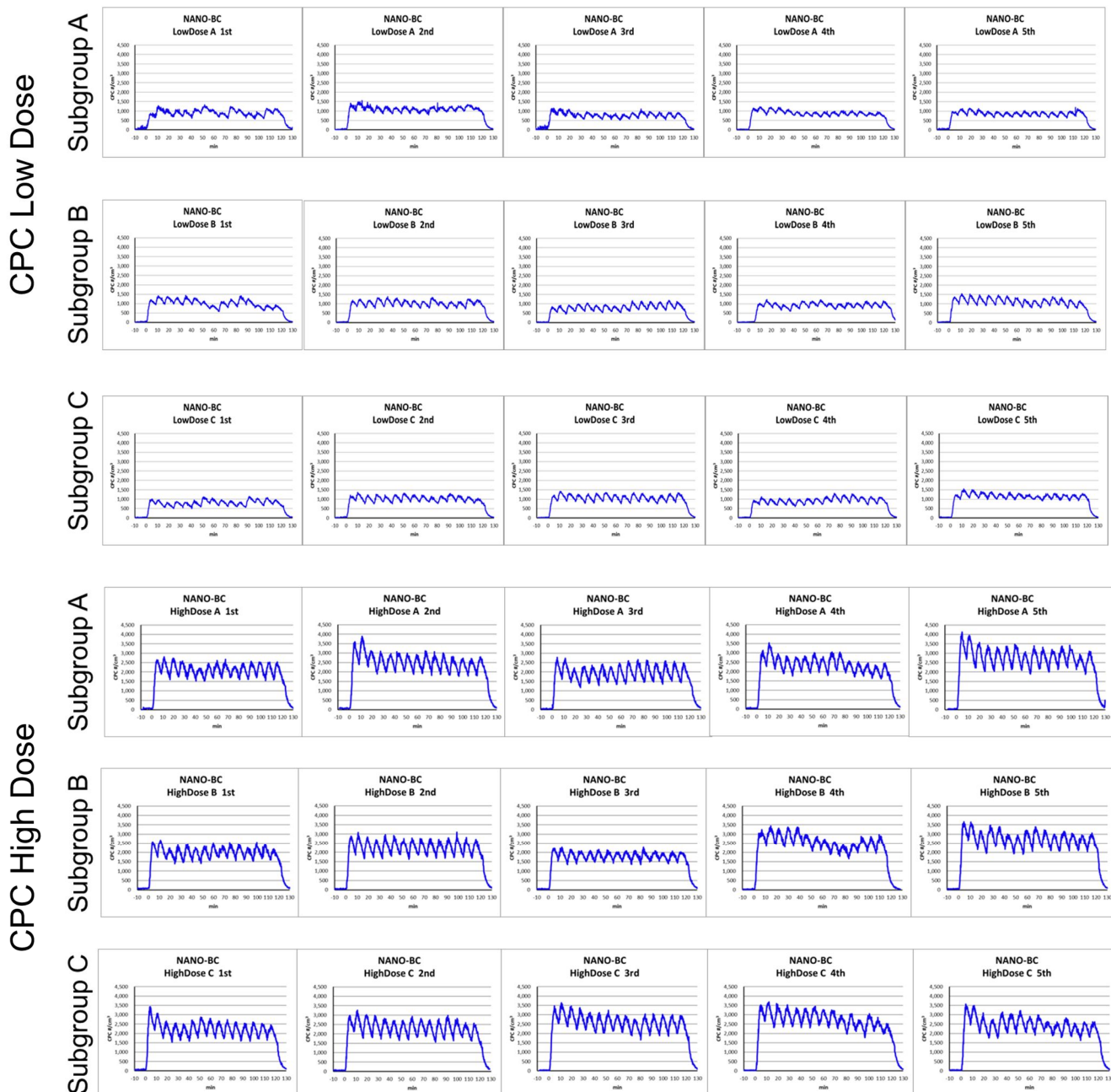


図 5 T-CNT7 の吸入曝露における CPC カウント

CPC による T-CNT7 エアロゾルの粒子数は鋸歯状の推移を示す。5 日間の曝露を通して安定した濃度推移であった。

平成29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: ナノ材料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: ナノ材料の組織負荷量の測定

研究分担者 大西 誠 労働者健康安全機構・日本バイオアッセイ研究センター

研究要旨

ナノ材料の曝露による肺内のナノ材料の負荷量の測定は、ナノ材料が肺内の沈着量を正確に把握する上で重要である。本研究では、Taquann 法にて分散処理を施した多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を用い、全身吸入装置により一定期間曝露直後、1、4 および 8 週後における肺内の T-CNT7 の負荷量を測定することで、ナノ材料の曝露による生体影響評価を検討した。その結果、1 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 6.30 µg/g、1 週目では 4.59 µg/g、4 週目では 5.42 µg/g、8 週目では 5.39 µg/g でやや減少傾向であった。また、3 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 10.15 µg/g、1 週目では 9.98 µg/g、4 週目では 10.84 µg/g、8 週目では 10.25 µg/g で一定に推移した。Taquann 法にて分散処理を施した T-CNT7 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 T-CNT7 の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m³ 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³ 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。

A. 研究目的

本研究事業は、工業的ナノ材料(NM)の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、曝露したナノ材料の肺内における負荷量である沈着量を把握することにより、ナノ材料の生体影響を評価することである。

平成29年度の実験研究では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および8週後における肺組織における肺内の T-CNT7の負荷量を測定することで、ナノ材料の曝露による生体影響評価を検討した。

B. 研究方法

B-1: 試験材料

B-1-1: 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)

試薬名: T-CNT7

前処理: Taquann処理

保管条件: 室温

B-2: 装置、器具及び試薬

B-2-1: HPLC

メーカー: ウォータース

形式: Acquity UPLC

B-2-2: 電子天秤

メーカー: (株)日本シイベルワーグナー

形式：AE163
B-2-3：振とう機
メーカー：サーマル化学産業株式会社
形式：TS-100
B-2-4：遠心分離機
メーカー：ベックマンコールター株式会社
形式：Microfuge® 22R Centrifuge
B-2-5：超音波分散機
メーカー：タイテック株式会社
形式：VP-30S

B-3：試薬
B-3-1：アセトニトリル
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：HPLC用
B-3-2：メタノール
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：HPLC用
B-3-3：Benzo[ghi]perylene(BgP)
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：試薬特級
B-3-4：Tween
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
形式：TWEEN 80
B-3-5：PBS
メーカー：日水製薬株式会社
形式：タルベッコPBS(-)粉末
B-3-6：C99
メーカー：クリーンケミカル株式会社
形式：Clean99-K200

B-4：HPLC測定条件
HPLC：ウォータース Acquity UPLC
カラム：Acquity BEH C18 (ウォータース)
カラム粒径、長さ × 内径：1.7 μm、100 mm × 2.1 mm
カラム温度：40
検出器：蛍光検出器 (励起波長：294 nm、蛍光波長：410 nm)
試料注入量：5 μL

移動相組成：アセトニトリル：メタノール：蒸留水 =75：20：5
移動相流量：0.5 mL/min

B-5：溶液調製

B-5-1：T-CNT7原液の調製

分析を実施する前日に、T-CNT7約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、Clean 99-K200 (C99) を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰り返す。最後にC99で100 mLにメスアップする。その溶液を超音波分散機により1分間、超音波分散する。(以下用いる周波数と強度は20 kHz、300 Wで共通)(T-CNT7原液：50 μg/mL) なお、分析を実施する当日に、この溶液は超音波分散機により1分間、超音波分散を行って下記の分析に用いる。

B-5-2：検量線溶液C6の調製

B-5-1項で調製したT-CNT7原液0.4 mLを15 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブに採取し、C99により10 mLにメスアップし、1分間超音波分散する。(検量線溶液C6：2 μg/mL)

B-5-3：検量線溶液 (C1～C6)の調製

B-5-2項で調製した検量線溶液C6を採取し、2mL容の遠心分離用チューブに入れ、さらにC99をそれぞれの量を添加して検量線溶液 (C1～C6)を作成した(表1)。

B-5-4：マーカ溶液の調製

200mL容のメスフラスコにBenzo[ghi]perylene(マーカ)約1mgを秤量し、アセトニトリルを加え十分に溶解し、アセトニトリルでメスアップしてBgPのマーカ原液(5.0 μg/mL)とする(冷暗所に保存)。その溶液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合攪拌した溶液2.5 mLを9.6%PBS水溶液+0.1% Tween水溶液 (TW-mixture) 50 mLに加え混合攪拌し、

マーカー溶液とする。

B-6：測定試料

B-6-1：測定試料

図 1 に本研究の実験デザインを示した。Taquann処理されたT-CNT7を吸入曝露したマウスの構成を対照群 (0 mg/m³) と低用量群 (1 mg/m³)、高用量群 (3 mg/m³) とし、各3検体の曝露直後、1、4、8週目 (合計36検体) とした。

曝露は1日に2時間 (10:00 ~ 12:00)、週に1日の曝露を5週間繰り返し、各群2時間 × 5回の計10時間の吸入曝露を行った。5回 (計10時間) の曝露を終了した日をday 0 (0W) とし、0Wの午後2:00 ~ 6:00に初回の解剖、その後、1週、4週、8週に各群3匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、T-CNT7のサンプリング材料への汚染を防ぐため局所の被毛を除去して開胸し、腋窩動脈の切断により放血して安楽死させてから肺を摘出した。その肺は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬したサンプルを日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) に持ち帰り、組織負荷量の測定のために保管した。

B-7：試料の調製

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に1か月以上浸透した試料の肺を100 mLのC99で一晩かけて溶解する。溶解した溶液は60秒間超音波分散する。その溶液中のT-CNT7の量が検量線の範囲に入るようにC99で希釈し、60秒間超音波分散する。

B-8：試料の前処理とHPLCによる測定

図 2 にT-CNT7の前処理について示した。B-5-3及びB-7項で調製した各溶液1 mLに沈殿硬化液 (当センターの研究開発による溶液) をそれぞれ60 µLずつ添加する。10秒間超音波分散し、12000 rpmで10分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、TW-mixtureを1 mL加え、12000 rpmで10分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、それぞれに濃硫酸 (和光純薬工業

株式会社) 0.2mLを加え、残渣を分解し、タッチミキサーで10秒間攪拌する。その後、12.4 mLで調製したマーカー溶液1 mLをそれぞれに添加し、10秒間超音波分散し、振とう機で15分間攪拌させた後、0.8 µmのフィルター (ワットマン: GE Healthcare UK Ltd) でろ過したフィルター上のT-CNT7をポンチ (8 mmφ) でくり抜き、PP試験管に入れ、アセトニトリル1 mLを加え、タッチミキサーで10秒間攪拌・抽出し、その溶液をHPLCで測定する。

B-9：肺内のT-CNT7の沈着量の計算方法

T-CNT7の検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求める。肺試料のHPLCで測定した面積値を直線回帰式に代入し、T-CNT7の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、T-CNT7の肺個体当りの肺内沈着量 (単位: µg) と、それらの3匹当りの平均値及び標準偏差を求める。また、試験委託者から通達された各肺の重量で除することにより肺当りの値 (単位: µg/g) とそれらの平均値及び標準偏差を求める。

C . 研究結果及び考察

C-1: 検量線

Taquann処理されたT-CNT7の検量線を図 3 に示した。その結果、T-CNT7とマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、T-CNT7を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、T-CNT7は0.2 ~ 2.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

C-2: マウス肺内のT-CNT7の肺負荷量

表 2及び図 4に、Taquann処理されたT-CNT7を吸入曝露したマウス肺内のT-CNT7の肺負荷量の結果を示した。

その結果、1 mg/m³曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では6.30 µg/g、1週目では4.59 µg/g、4週目では5.42 µg/g、8週目では5.39 µg/gでやや減少傾向であった。また、3 mg/m³曝露の

マウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では10.15 µg/g、1週目では9.98 µg/g、4週目では10.84 µg/g、8週目では10.25 µg/gで一定に推移した。なお、0 mg/m³ 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は認められなかった。以上のことから、Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7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T-CNT7の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m³曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³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。

D. 結論

Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7の全身吸入曝露により、肺内のT-CNT7をBgPマーカーを用いて測定した結果、曝露直後、1、4および8週後における肺当りのT-CNT7の負荷量は1 mg/m³曝露では6.30 µg/g、4.59 µg/g、5.42 µg/g、及び5.39 µg/gであり、3 mg/m³曝露では10.15 µg/g、9.98 µg/g、10.84 µg/g及び8週目では10.25 µg/gであった。1 mg/m³曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定に推移する傾向を示した。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima

S. Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. J. Occup. Med. Toxicol. 11:44 2016.

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Particle and Fibre Toxicology 13:53 2016.

2. 学会発表

大西 誠、笠井辰也、東久保一郎、荒木明宏、福島昭治
新開発の粉塵発生装置(N-SH0t Cyclone)による多層の多層カーボンナノチューブのエアロゾルの観察及びマーカー法による微量定量の検討
第 89 回日本産業衛生学会学術年会(2016.5.27)

大西誠、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、平井繁行、福島昭治
N-SH0t Cyclone によるナノ酸化チタンの浮遊係数の提案
第 43 回日本毒性学会学術年会(2016.7.1)

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純
N-SH0t Cyclone による多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較
第 44 回日本毒性学会学術年会(2017.7)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

なし

表 1 検量線溶液の調製

試料名	C6採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
溶液C1	0.1	0.9	0.2
溶液C2	0.2	0.8	0.4
溶液C3	0.4	0.6	0.8
溶液C4	0.6	0.4	1.2
溶液C5	0.8	0.2	1.6
溶液C6	1.0	0.0	2.0

図 1 実験デザイン

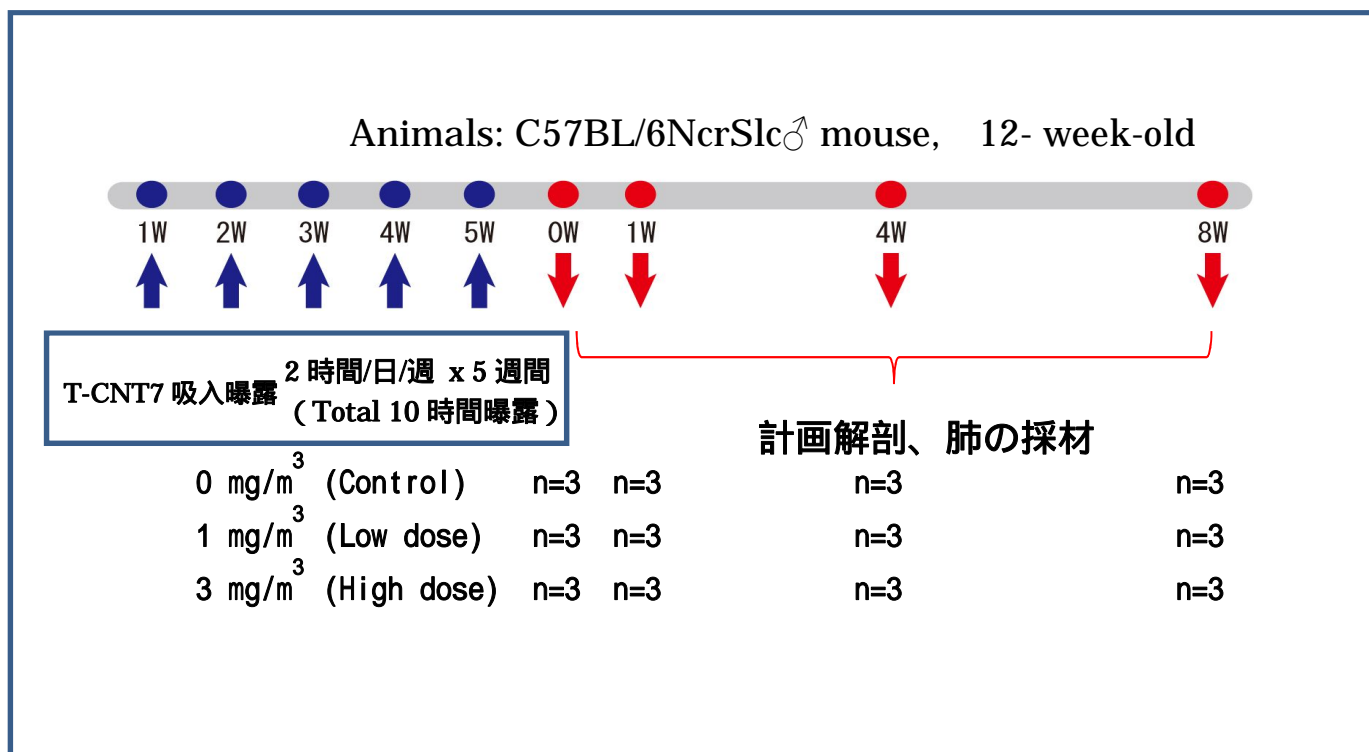


図 2 T-CNT7 の前処理

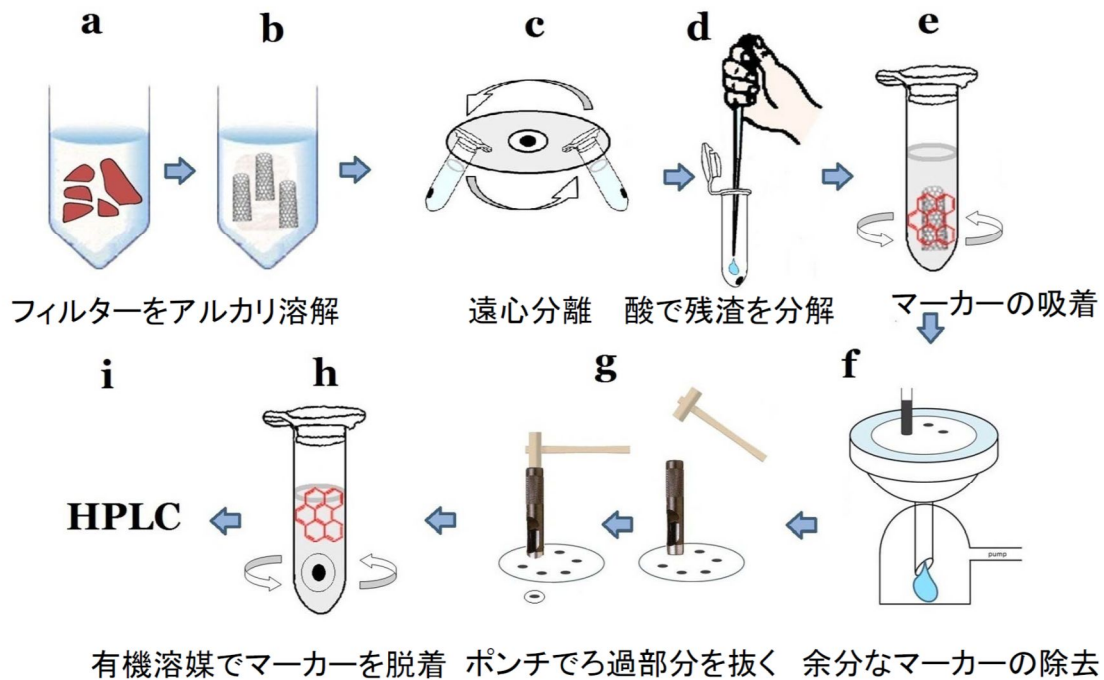


図 3 T-CNT7 の検量線

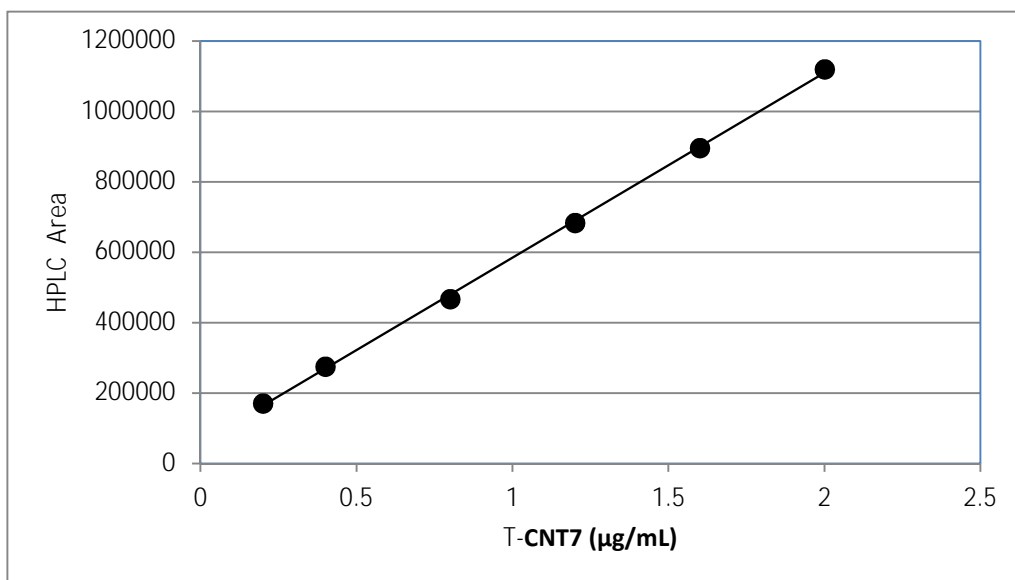
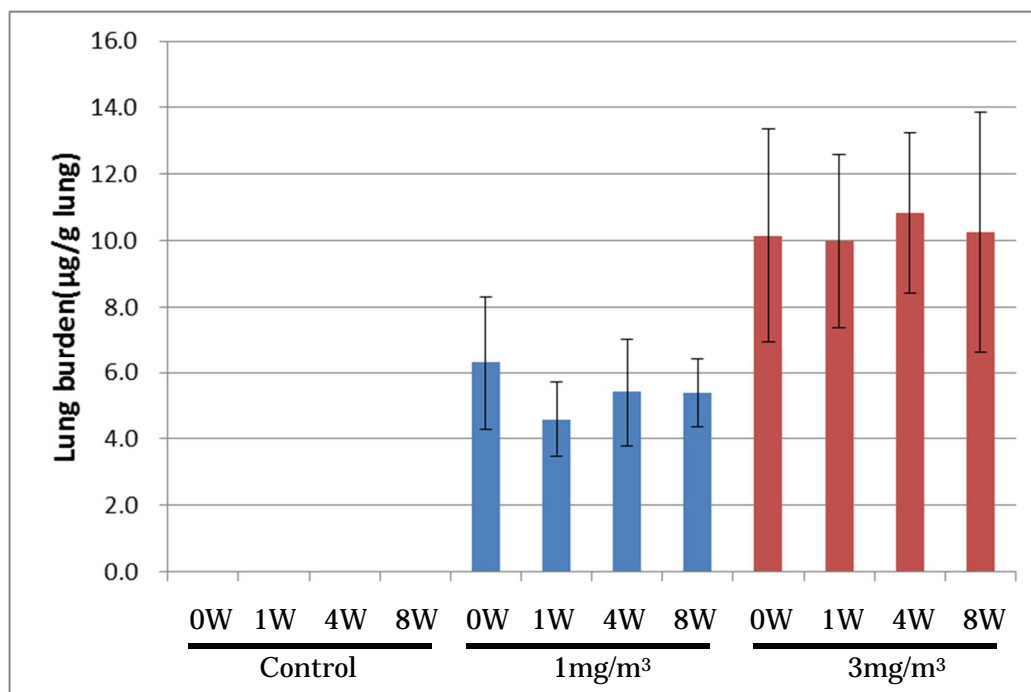


表 2 肺内 T-CNT7 の沈着量の分析結果

曝露濃度と曝露後期間	T-CNT7 肺内絶対量(μg)	SD(μg)	T-CNT7 肺当り(μg/g)	SD(μg/g)
0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
1 mg/m ³ -0 週	0.96	0.29	6.30	2.00
1 mg/m ³ -1 週	0.73	0.18	4.59	1.11
1 mg/m ³ -4 週	0.89	0.27	5.42	1.62
1 mg/m ³ -8 週	0.81	0.12	5.39	1.01
3 mg/m ³ -0 週	1.61	0.47	10.15	3.22
3 mg/m ³ -1 週	1.66	0.47	9.98	2.60
3 mg/m ³ -4 週	1.65	0.33	10.84	2.42
3 mg/m ³ -8 週	1.74	0.66	10.25	3.60

図 4 肺内 T-CNT7 の沈着量の分析結果



平成 29 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：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

分担研究者	石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授
研究協力者	新垣理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部・准教授
	牛尾 綾	徳島大学大学院医歯薬学研究部・助教
	大塚 邦紘	徳島大学大学院医歯薬学研究部・大学院生

研究要旨

ナノマテリアルの曝露によるマクロファージを中心とした免疫システムの制御機構は不明な点が多い。本研究では、Taquan 法にて分散処理を施した多層カーボンナノチューブ（T-CNT7）を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。T-CNT7 の吸入曝露により、8 週まで肺泡マクロファージの割合は有意に減少するのに対し、好酸球、単球は増加することがわかった。また、T-CNT7 の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT7 曝露により肺泡マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体に関係していることが示唆された。肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT7 の曝露で有意に増加することが示された。さらに、T-CNT7 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子の BALF 中での上昇が確認された。以上のことから、いくつかの肺泡マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性が示された。

A．研究目的

本研究事業は、工業的ナノマテリアル（NM）の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージ（M₁）の *in vivo* 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

平成 29 年度の手分担研究では分散処理を施した多層カーボンナノチューブを用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を

解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。

B．研究方法

・マウス

12 週齢の C57BL/6NCrSlc（雄）を用い、各群 5 匹ずつ（5 × 3 × 4 = 60 匹）で多層カーボンナノチューブを吸入曝露装置（国立医薬品食品衛生研究所）により曝露を実施し、曝露後（0 週）、1 週、4 週及び 8 週で適切に屠殺後解析を行った。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死

の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの曝露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

・T-CNT7

多層カーボンナノチューブは MWCNT-7(三井)を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により供与された Taquann 処理 MWCNT-7(T-CNT7)を用いた。対照群はフィルターを通したキャリアエア曝露とした。低用量群は $1 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間吸入した。高用量群は $3 \text{ mg}/\text{m}^3$ 、1日2時間(週1回×5)の計10時間の吸入とする。

・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83%塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C, TERUMO)を留置し、1mlのシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO)に1mlのPBSを流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識(fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7)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、0.9%-PFA-PBSで固定後、解析装置(FACSCant BD Biosciences)にてそれらの発現を解析した。

・定量化 RT-PCR 法

肺組織の一部を RNAlater に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全RNAを抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化

した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。CD204, forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3', and reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3'; MARCO: forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; CD36: forward, 5'-TGGCCTTACTTGGGATTGG-3', and reverse, 5'-CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3'; SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; CD68: forward, 5'-TCTTGGGAACTACACGTGGGC-3', and reverse, 5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'; iNOS: forward, 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' and reverse, 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'; MMP-12: forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3' and reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3'; β -actin, forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80°C にて保存する。各サンプルから $5 \mu\text{L}$ を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット(Biorad) マニュアルに従って実施する。解析項目は、IL-1 α , IL-1 β , 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 α , TNF- α , VEGF, FGF basic である。

C. 研究結果

正常 C57BL/6NCrSlc 雄 (12 週齢) マウスに T-CNT7 (対照群、低濃度群、高濃度群) を全身吸入装置にて、曝露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (図 1)。各群は 5 匹ずつとする。

図 2 に示すように、T-CNT7 曝露後 0 週、CD11c および CD11b を用い、肺胞洗浄液中 (BALF) の免疫細胞 (肺胞マクロファージ: CD11c⁺CD11b⁻、単球: CD11c⁺CD11b⁺、好酸球: CD11c⁻CD11b⁺) をフローサイトメーターにて解析すると、肺胞マクロファージが減少することが明らかになった。一方で、単球、好酸球に関しては T-CNT7 曝露によって割合が増加していた。さらに、肺胞マクロファージを CD11b および F4/80 にて展開すると、T-CNT7 曝露によって割合が減少することがわかった (図 2、図 3A)。曝露後 0 週では、BALF 中の生細胞の割合は減少することがわかった (図 3A)。この時点では、肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトに大きな偏りは観察されない (図 3A)。

曝露後 1 週では、BALF 中の生細胞の割合に変化は見られなくなり (図 3B)、高用量曝露群で肺胞マクロファージが有意に減少している (図 2、図 3B)。単球、好酸球に関しては、高用量群で有意に増加した (図 3B)。また、肺胞マクロファージは高用量曝露群で M1 へのシフトが見られた (図 3B)。

曝露後 4 週では、1 週後と同様に、肺胞マクロファージ数は高用量群で有意に減少していた (図 2、図 4A)。また、単球、好酸球に関しても、高用量曝露群で有意に増加した状態が続いていた (図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトは明らかではなかった (図 4A)。

曝露後 8 週でも、T-CNT7 の高用量曝露群で、肺胞マクロファージの減少、好酸球、単球の増加が確認された (図 2、図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 分化は高用量曝露群で M1 へのシフトが抑制されていた (図 4B)。

T-CNT7 の吸入曝露による常在型肺胞マクロファージの変化を経時的に観察すると、高用量群では 0～8 週まで有意に低下していた (図 5A)。好酸球に関

しては 0～8 週後でいずれにおいても対照に比較して、高用量群で有意に増加していた (図 5B)。経時的には 1 週で増加し、その後 8 週まで徐々に減少することがわかる (図 5B)。単球に関しては、対照群に比較して、低用量、高用量ともにどの時期においても有意に割合が増加していた (図 6A)。経時的には曝露後 1 週から徐々に低下する傾向にあった (図 6A)。一方、M2 型マクロファージはどの群とも経時的に増加していたが、群間での差は認められなかった (図 6B)。

T-CNT7 曝露による肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 (CD36、CD163) の発現の変化をフローサイトメーターにて解析したところ、大きな変化は観察できなかった (図 7)。また、肺組織における各種スカベンジャー受容体、MMP12 などの mRNA 発現を定量 RT-PCR にて解析すると、T-CNT7 曝露後 0 週での CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現の有意な上昇 (図 8A)、1 週では MARCO の mRNA の有意な上昇 (図 8B)、4 週では CD204、iNOS の mRNA の有意な上昇 (図 8C) が観察された。MMP12 mRNA に関しては、どの時期においても低用量、高用量のいずれの群も T-CNT7 曝露によって有意に上昇することがわかった。

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 T-CNT7 吸入曝露によって増加することが判明した (図 9)。

脾臓、頸部リンパ節における B 細胞、CD4T 細胞 CD8T 細胞の割合に関しては、T-CNT7 曝露によってどの時期においても影響は見られなかった (図 10A、図 10B)。さらに、CD4 及び CD8T 細胞における活性化マーカー (CD44/CD62L) を検討したところ、脾臓、頸部リンパ節において、どの時期でも T-CNT7 の曝露で変化は確認されなかった (図 11A、図 11B)。

脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、T-CNT7 曝露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認めら

れなかった(図12A、図12B)。さらに、脾臓、頸部リンパ節におけるマクロファージにおける M1/M2 マーカー (CD192/CD206) を検討したところ、脾臓では T-CNT 曝露で変化は見られなかったが(図13A)、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(図13B)。

BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメーターによる解析結果から、細胞の大きにて評価すると、T-CNT7 曝露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった(図14A, B, C)。

D. 考察

T-CNT7 の吸入曝露により、8 週まで肺胞マクロファージ (CD11b^{low}) の割合は有意に減少するのに対し(高濃度群)、好酸球、単球あるいは CD11b^{high} マクロファージは増加することがわかった。また、T-CNT の吸入曝露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、T-CNT 曝露により肺組織におけるスカベンジャーレセプターの mRNA 発現の変動が生じる可能性が示されたことから、ナノマテリアルの肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体が関係していることが示唆された。

肺組織における MMP12 の mRNA 発現は T-CNT7 の曝露で有意に増加することが示されたが、昨年度までの研究(平成28年度今井田班報告済)でも、T-CNT7 の曝露後1年経過した時点で MMP12 の発現亢進が持続していたことから、T-CNT 曝露後、初期から長期に渡って MMP12 の発現が上昇するものと考えられる。さらに、T-CNT7 曝露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子が BALF 中で上昇が確認された。

E. 結論

T-CNT7 の吸入曝露によって、肺胞マクロファージは T-CNT7 の処理によって細胞死を介して、細胞数が減少し、その後 M1/M2 分化の不均衡が生じる。また、いくつかの肺胞マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 in press
- (2) Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M. Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 in press
- (3) Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203
- (4) Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10
- (5) Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- κ B2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. (2017) 69(11):2193-2202.
- (6) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune

tolerance. J Clin Cell Immunol. (2017) 8(4):1000512

(7) Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. J Exp Med. (2017) 214:1925-1935.

(8) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. J Cytokine Biol. (2017) 2:1-5

(9) Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Autoimmunity: Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. Handbook of Immunosenescence 1-11, 2017

(10) 石丸直澄 口腔免疫とその異常 CLINICAL CALCIUM 27(10):21-26, 2017

2. 学会発表

(1) 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、多層カーボンナノチューブ長期曝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

(2) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(3) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(4) 石丸直澄 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～ 第59回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジウム 2018年9月18日 松本

(5) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's Syndrome. 第46回日本免疫学会総会 2017年12月13日 仙台

(6) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N : A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第46回日本免疫学会総会 2017年12月13日 仙台

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

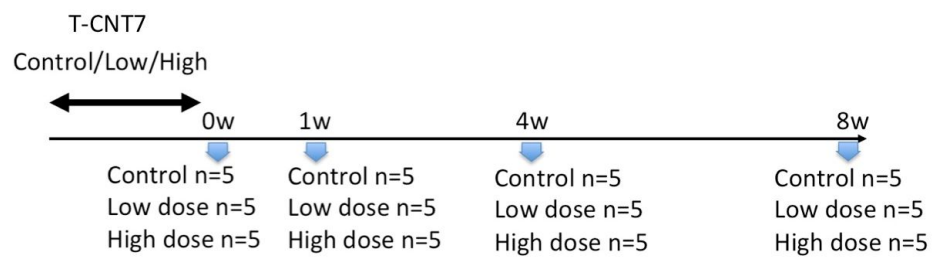
無し

3. その他

無し

☒ 1

Experimental Schedule



	0w	1w	4w	8w
BALF/FCM	◎	◎	◎	◎
BALF/Multiplex				◎
CLN/FCM	○	○	○	○
Spleen/FCM	○	○	○	○
Lung/q-RT-PCR	◎	◎	◎	◎

図2

T-CNT 吸入曝露による肺胞洗浄液中の免疫細胞の変化

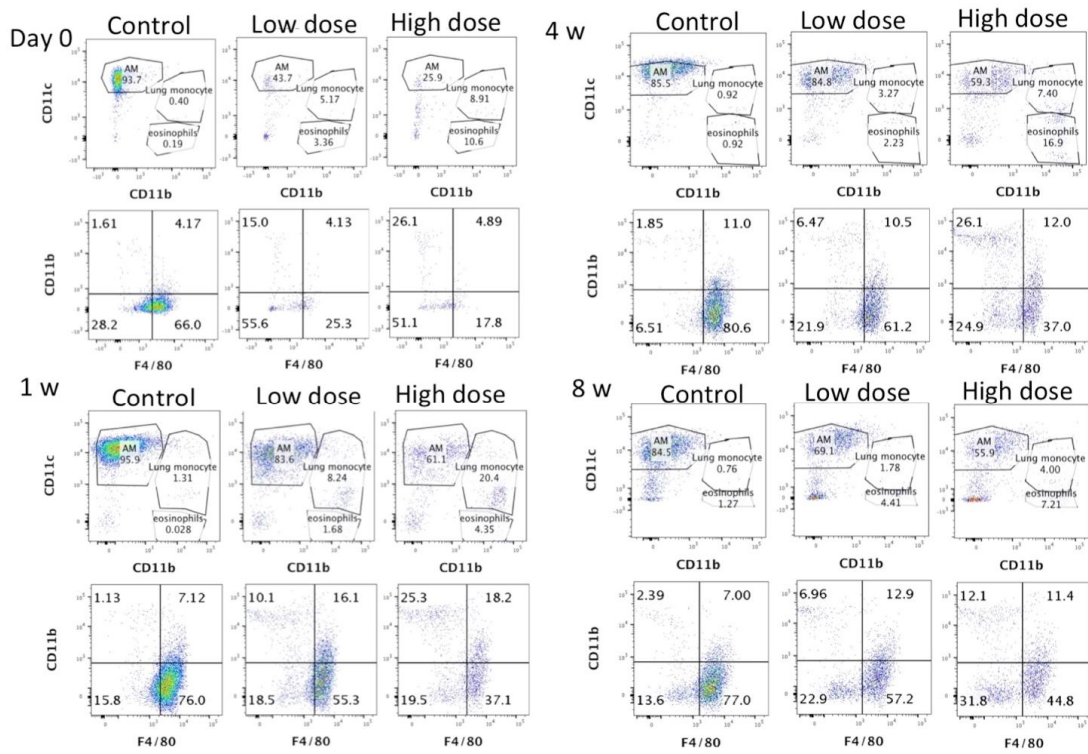
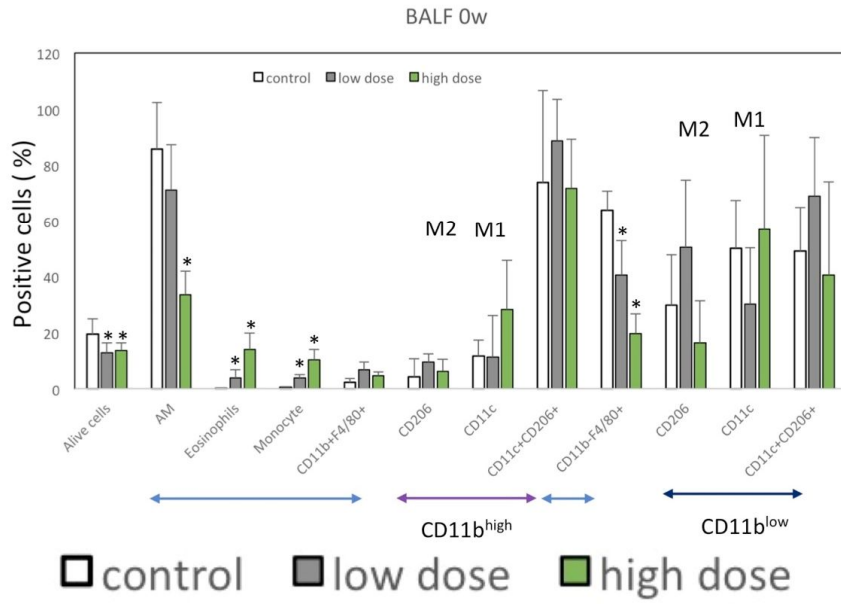


図3

A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



B 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する

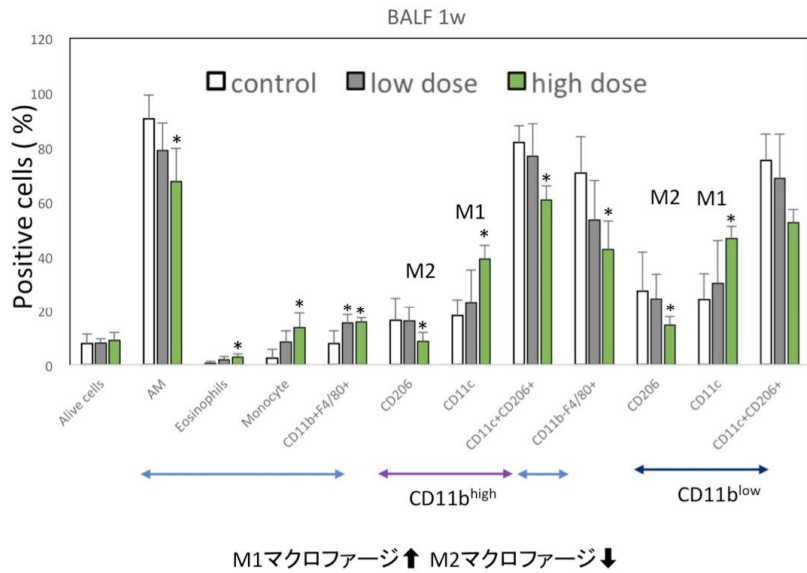


図4

A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する

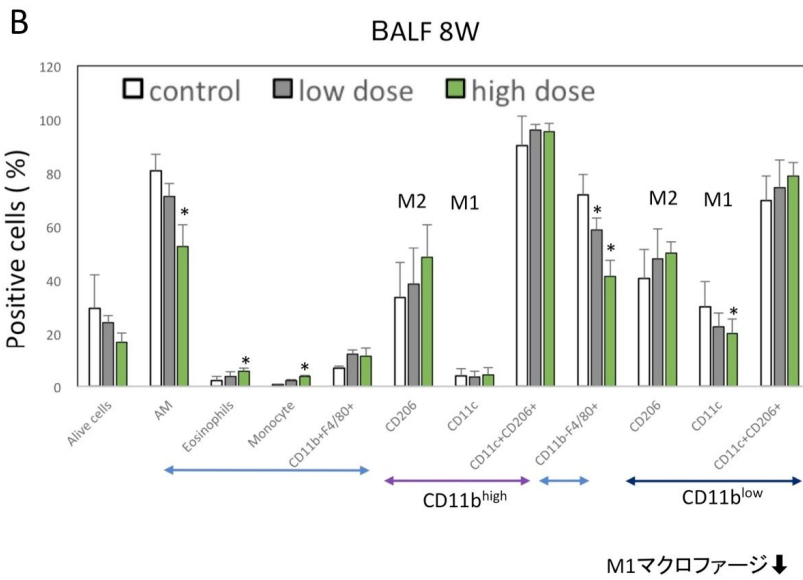
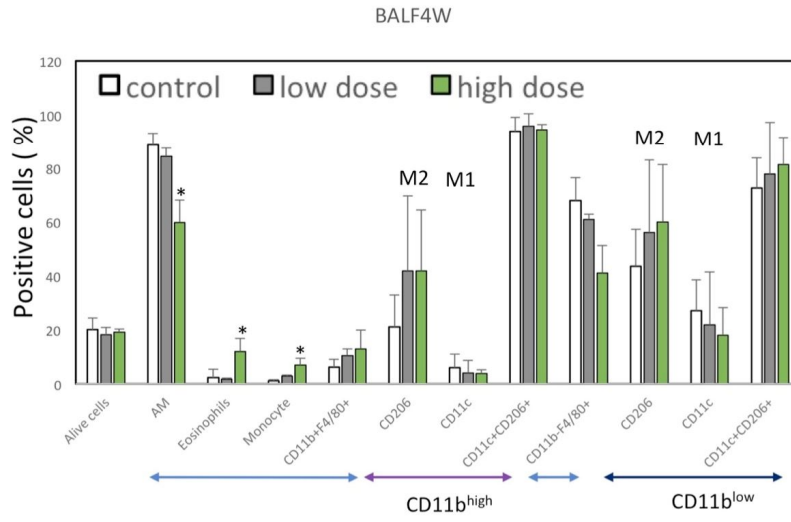
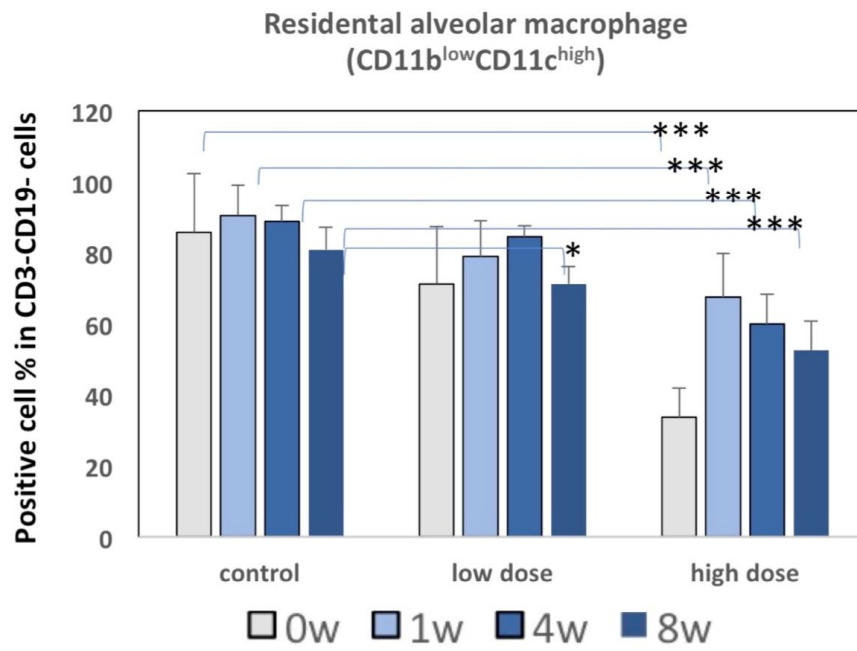


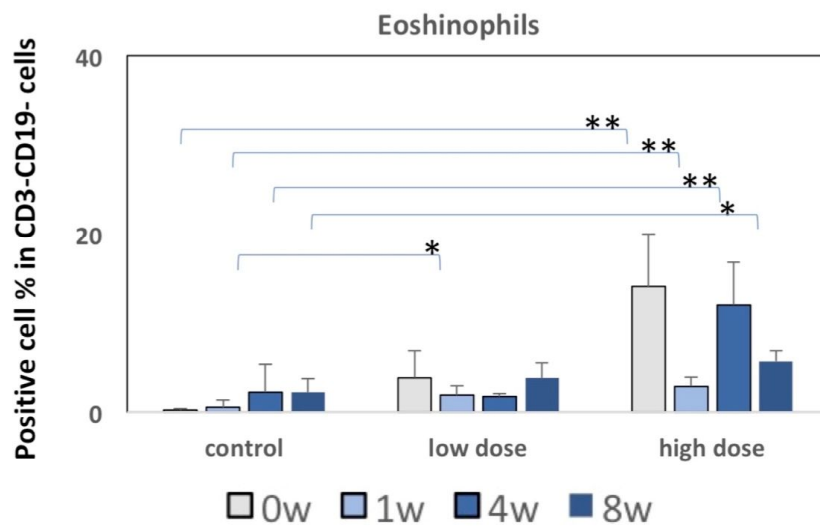
図5

A



B

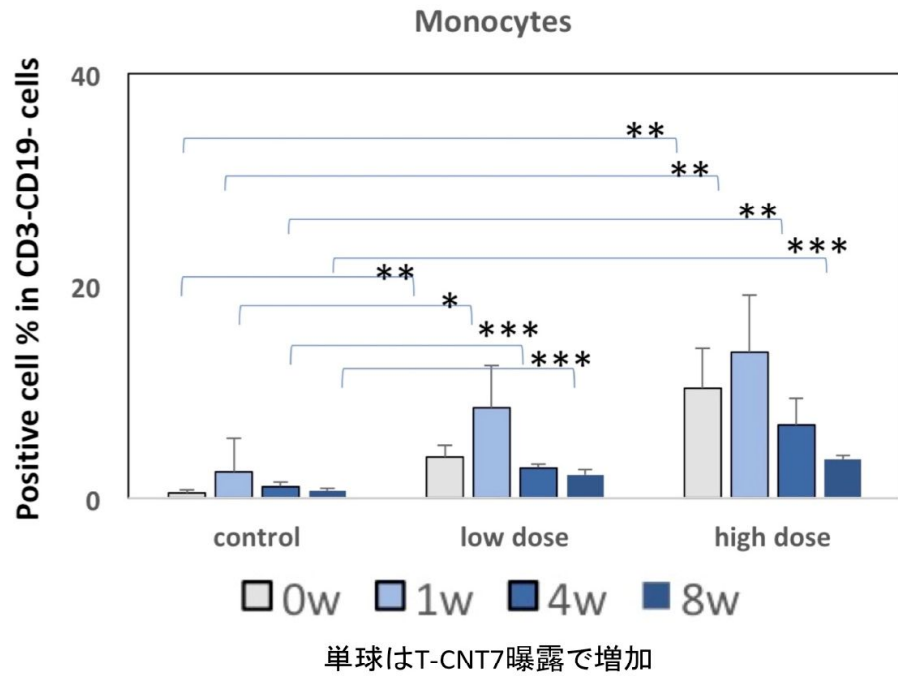
暴露後8週まで肺胞マクロファージは減少してま (high dose)



好酸球はT-CNT7暴露で増加

図6

A



B

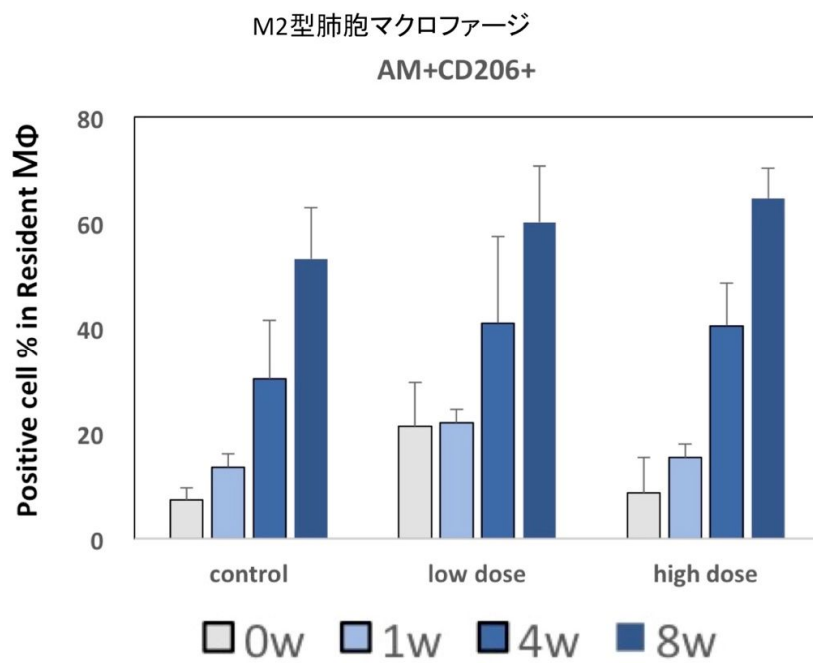
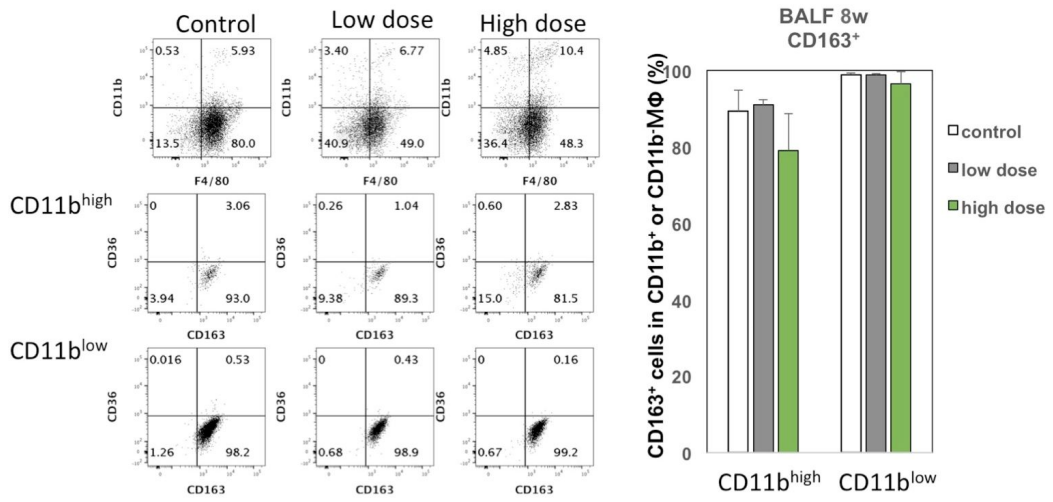
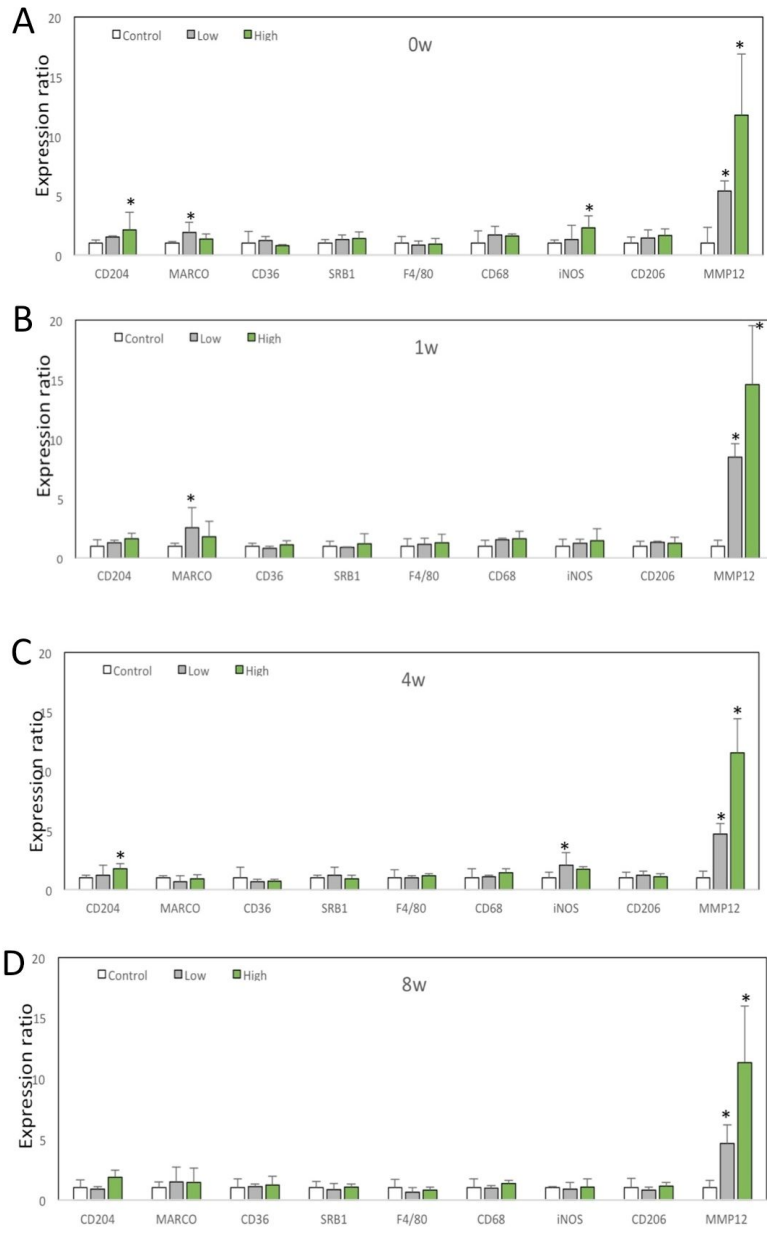


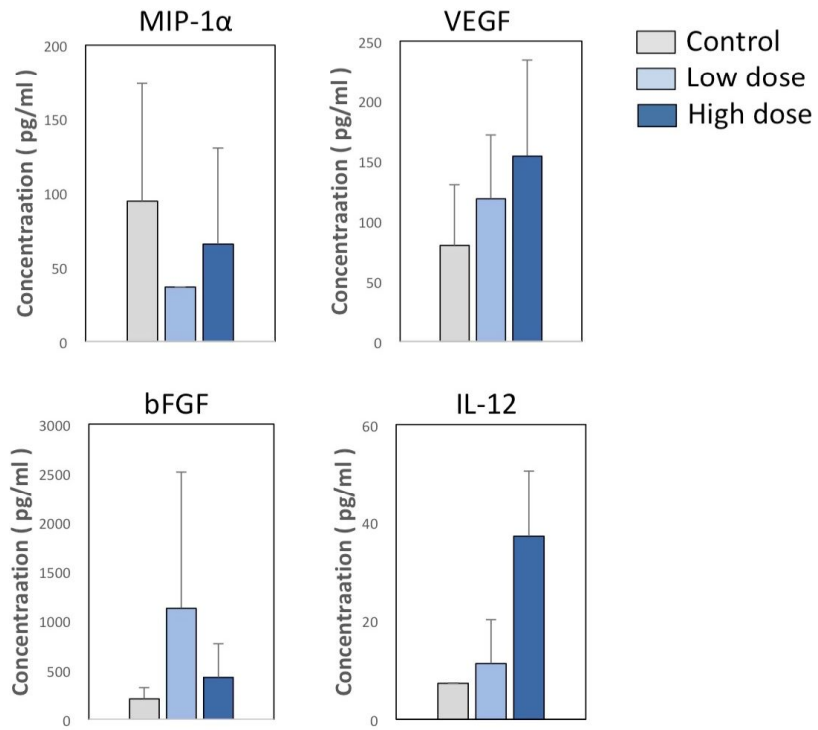
図7

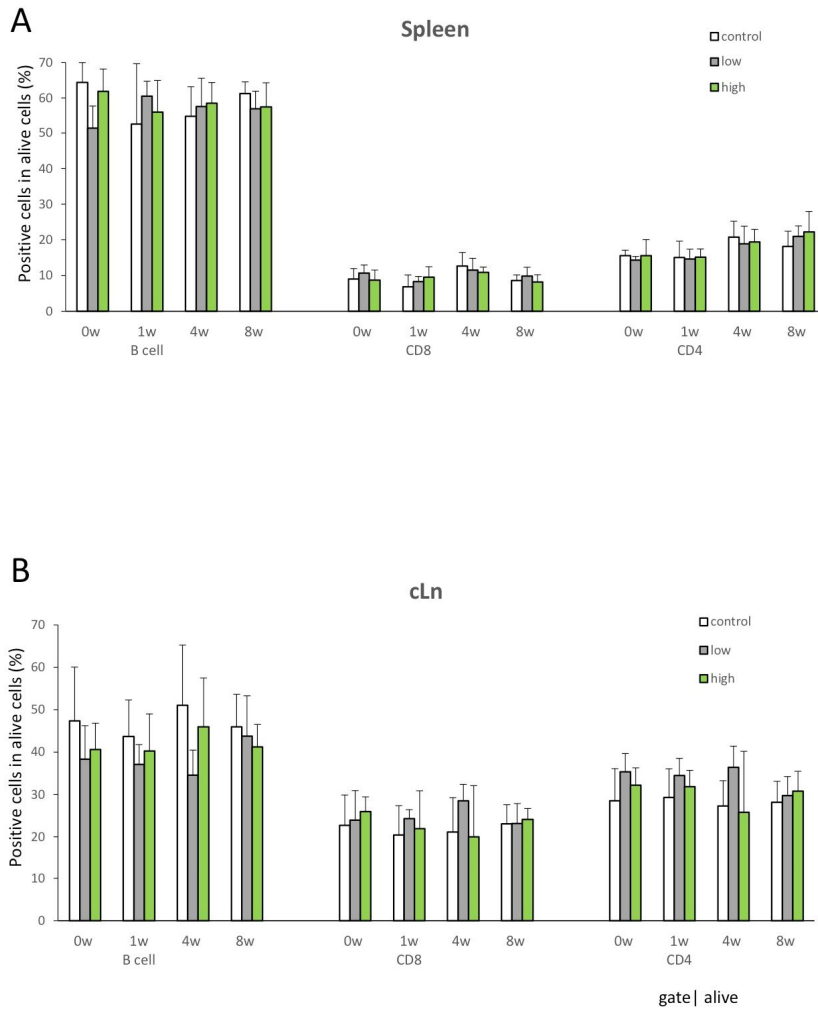
Scavenger receptor on alveolar macrophages





Levels of Cytokine, Chemokine and Growth Factor in BALF (8w)





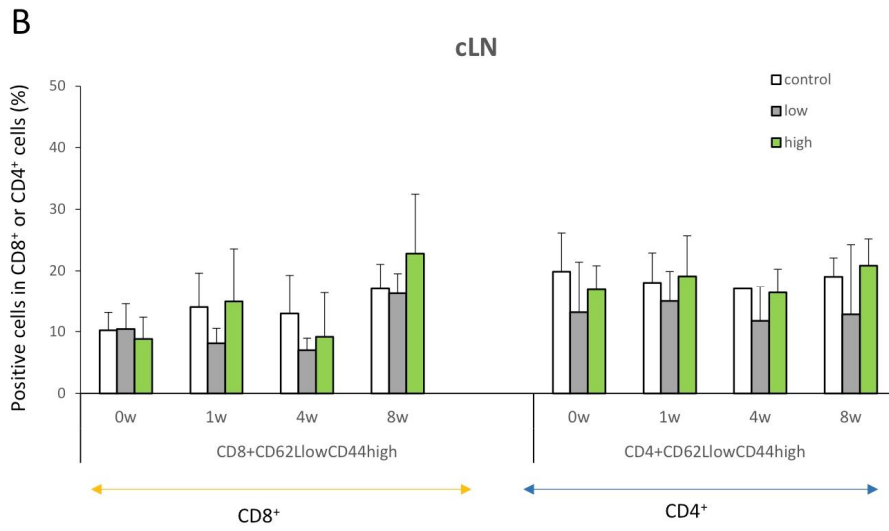
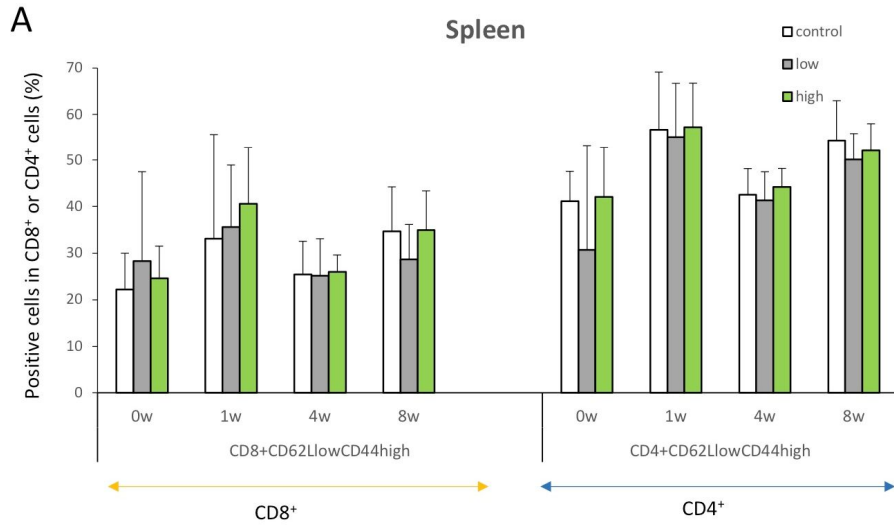


图12

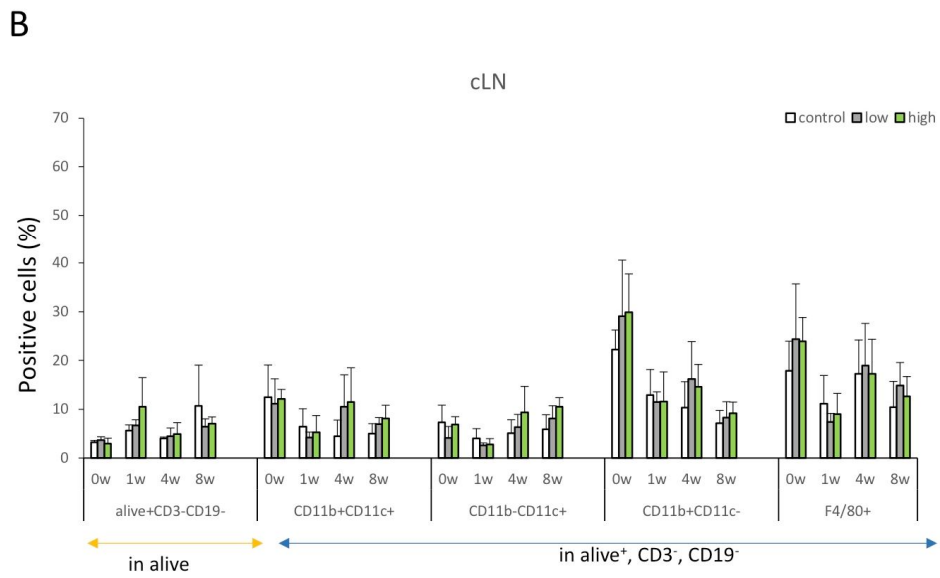
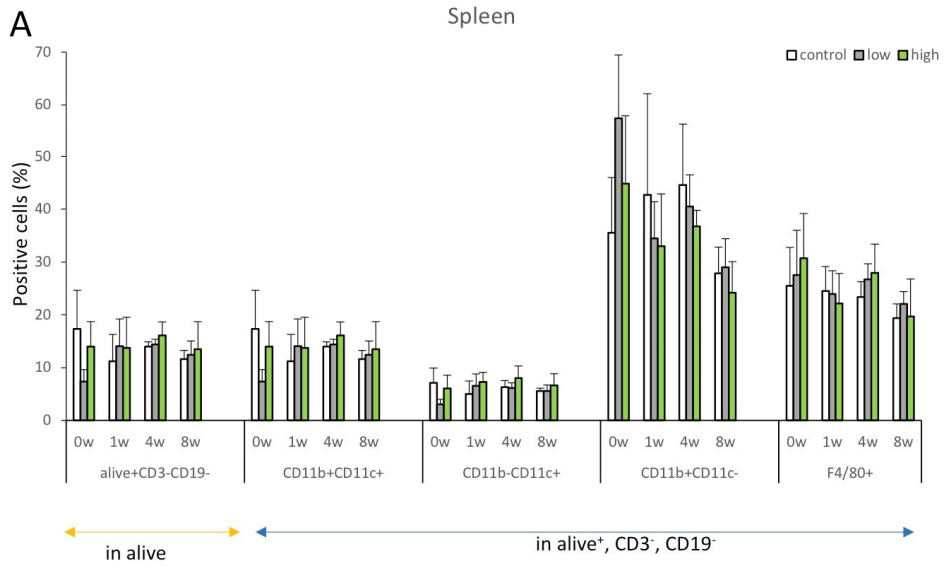


Figure 13

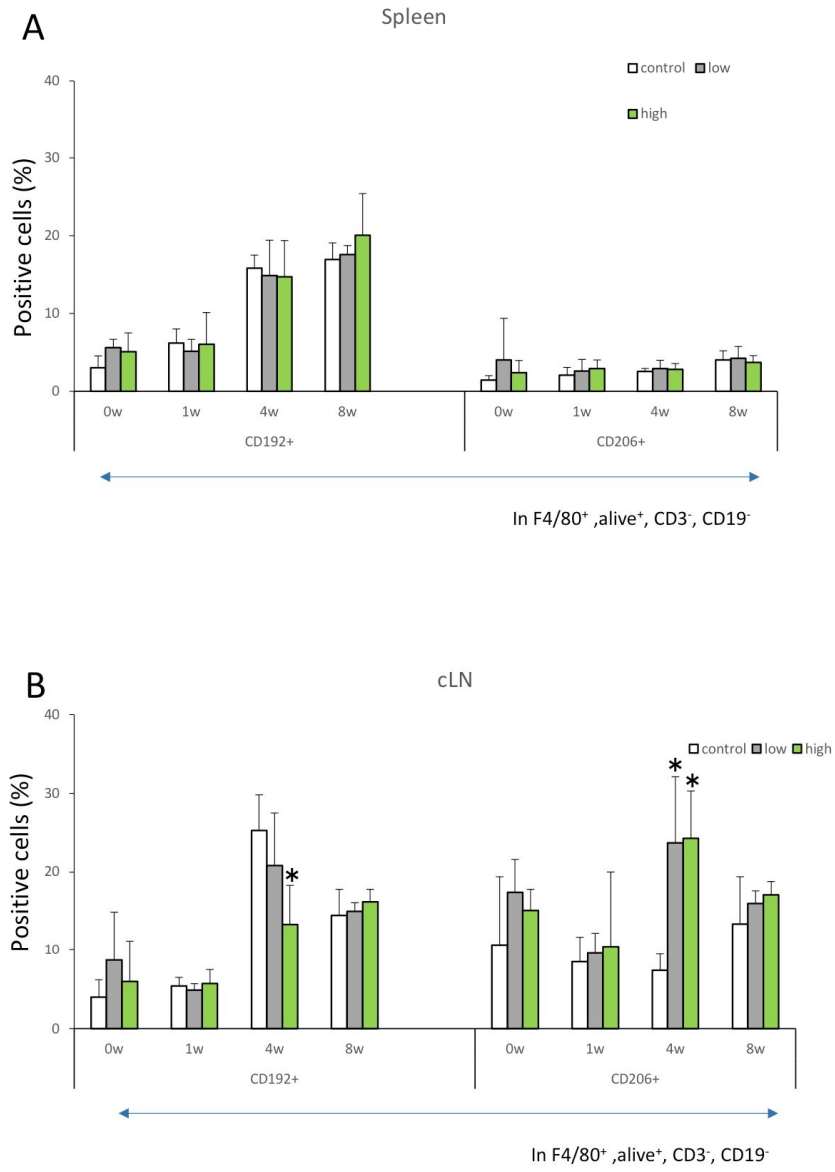
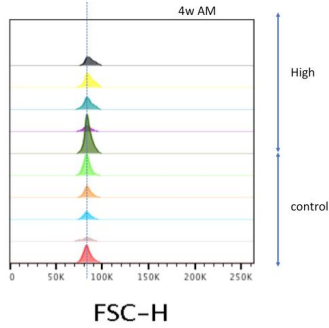


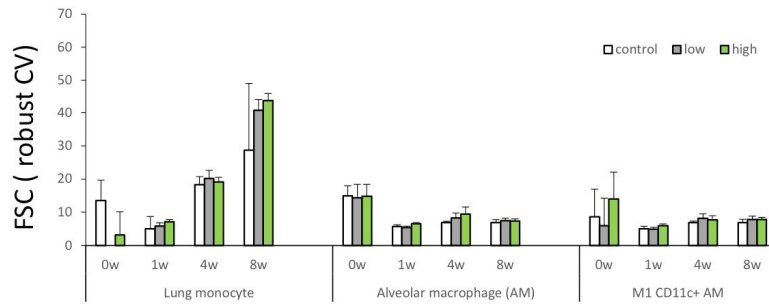
图14

A Difference of FSC value of BALF in control and high dose treated mice



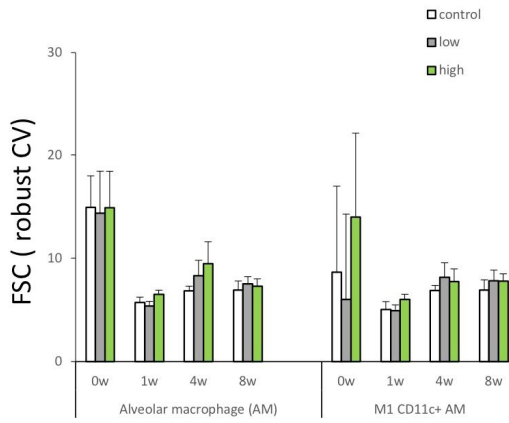
Sample Name	Subset Name	Count
33171.fcs	AM	1157
33169.fcs	AM	1885
33161.fcs	AM	1636
33151.fcs	AM	770
33163.fcs	AM	3915
33155.fcs	AM	2205
33153.fcs	AM	1264
33145.fcs	AM	940
33149.fcs	AM	650
33143.fcs	AM	1916

B



BALF

C



研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者指名	論文タイトル	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ
Yoshio Hayashi and Naozumi Ishimaru	Autoimmunity : Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases	Tamas Fulop eds	Handbook of Immunosenescence	Springer International Publishing AG	Switzerland	2018	1-10

雑誌

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Senoh H1, 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	J Occup Health	59(2)	112-121	2017
Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J	Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration	J Toxicol Sci.	42(2)	121-128	2017
Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S	Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung	J. Occup. Med. Toxicol.	11	44	2016

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S	Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats	Particle and Fibre Toxicology	13(1)	53	2016
Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S, Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y	Aurora Kinase Inhibitors In Head And Neck Cancer	Curr Top Med Chem			2018
Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M	Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells	Inflammation			2018
Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y.	Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study.	Clin Exp Dent Res	3(5)	198-203	2017
Utaijaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit P, Thuwajit C, Kudo Y	The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells.	Mol Cancer	17(1)	10	2018
Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N	F-κB2 Controls the Migratory Activity of Memory T Cells by Regulating Expression of CXCR4 in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome.	Arthritis Rheumatol	69(11)	2193-2202	2017

Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N	Role of Fas and RANKL Signaling in Peripheral Immune Tolerance	J Clin Cell Immunol	8	4	2017
Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y	Essential role of CCL21 in establishment of central selftolerance in T cells	J. Exp. Med	214(7)	1925-1935	2017
Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N	Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signalling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis	J Cytokine Biol	2	2	2017
石丸 直澄	口腔免疫とその異常	Clinical Calucium	27(10)	21-26	2017