

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30年度 総括研究報告書

研究代表者 相磯 成敏

平成31(2019)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. ナノマテリアルの病理組織学的評価研究

相磯 成敏 …… 25

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 …… 48

3. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

大西 誠 …… 63

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 …… 73

． 研究成果の刊行物に関する一覧表 …… 93

． 倫理審査等報告書の写し …… 96

・ 総括研究報告書

平成30年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)

総括研究報告書

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(M ϕ)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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M ϕ 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基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指す。

3種類のモデル NM を各年度に1物質ずつ吸入全身曝露実験を実施して3ヵ年で研究成果を取り纏める計画で H29 年度に班研究をスタートさせた。H29 年度は「長繊維貫通様式」モデルとした MWNT-7 の吸入曝露実験を実施したが、肺での肉芽腫と線維化病変の形成が弱く、明確な実験解析結果を得ることができなかった。H30 年度は当初から予定していた二酸化チタンの実験に加えて、肺に肉芽腫と線維化病変の形成を期待して粗大な成分が多い MWNT-7 の吸入曝露実験を実施した結果、期待通り肺に肉芽腫や線維化を起こしたサンプルを解析することができた。吸入曝露終了後、経時的に採取した肺サンプルを組織負荷量、病理組織学的評価、免疫機能評価の三方向から解析を行って、「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルに特徴的な有害性発現に関連する要因を抽出した。

その結果、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンを曝露したマウス肺では肺胞マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。一方、MWNT-7 を曝露したマウス肺では二酸化チタン曝露と比べてクリアランスされにくいことが示された。病理組織学的に二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化であった。加えて、免疫機能評価で BALF フロー

サイトメトリ解析での生細胞と肺胞マクロファージの低下、単球、M1 及び M2 マクロファージ、好酸球の増加、MMP12 の mRNA 発現増加を抽出した。NM の有害性発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析により発現強度の把握したうえで要因の絞り込みを行う。

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

A. 研究目的

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(M)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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M 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基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指す。

B. 研究方法

NM の肺胞 M 胞体内の蓄積様式の三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」のモデルとして二酸化チタン(AMT-600、テイカ)と、「長繊維貫通様式」のモデルとして選択した MWNT-7 のマウスを用いた吸入曝露実験を高橋(国立医薬品食品衛生研究所)の分担で実施、吸入曝露終了日(曝露後 0 週、1 週、4 週及び 8 週)の定期解剖で採取したサンプルを組織負荷量の測定(大西、日本バイオアッセイ研究センター)病理組織学的評価(相磯、日本バイオアッセイ研究センター)、免疫機能評価用(石丸、徳島大)で解析を実施した。

二酸化チタンと MWNT-7 は Taquann 法による高分散処理したもの(以下、T-TiO₂、T-CNT7)を吸入曝露させた。

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

B-1-1. 検体の高分散化処理(Taquann 法)

実験に供試した TiO₂ と MWCNT の物理化学的性状は次の通り。

・TiO₂

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

以下の性状はテイカ株式会社のウェブサイトの情報である。

結晶形	アナターズ
TiO ₂ 含量	98%

一次粒径 30 nm
pH 弱酸性
比表面積 52 m²/g

・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 × 10¹¹ 本/g
形状 繭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

TiO₂ 及び MWNT-7 とともに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 法処理(特許取得)を行った。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。

TiO₂ は、ガラス製メedium瓶内で TB と混合し 1 mg/mL の懸濁液とした。超音波洗浄器(SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz)に 15 分静置して分散処

理を行い、金属製フィルター(セイシン企業、目開き 25 μm)で濾過した。濾液を液体窒素で凍結・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 を昇華させて乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理を行った二酸化チタンを T TiO₂ と記載する。

MWNT-7 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 53 μm)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により減圧して TB を昇華させて除去し MWNT-7 の乾燥検体を得た。

H29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30 年度ではタングル状成分が多いと想定される目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。以下、目開き 25 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と記載する。T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状については、予備試験において、曝露チャンパー内のエアロゾルをアルミナフィルター(ワットマン、孔径 0.02 μm、25mm、Anodisc)に吸着させてサンプリングし、オスミウムコーター(HPC-1SW 型、真空デバイス)により 5 秒間オスミウムコートを行い走査型電子顕微鏡(VE-9800、KEYENCE)で 2,500 倍、加速電圧 2 ~ 2.8kV の条件で観察した。

B-1-2. 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

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージとPET製インナーケージを使用した。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(RAIR HD SUPER MOUSE 750TM 個別換気式飼育装置 特型)を使用した。飼育条件は、温度; 25 ± 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。ケージ内の環境を改善する目的で、シェパードシャック(Shepherd Specialty Papers 社)をケージ内に設置した。

(3) 群構成

対照群、T TiO₂ 群(目標濃度 30 mg/m³)、T-CNT7#53 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 25 匹であることから、各群を 25 匹のサブグループ(Sub-group A、Sub-group B)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。

(4) ダスト発生装置

T-CNT7 のエアロゾル化は、Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)。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、噴射装置がサブチャンバー(容量: 43 L)に接続されていて、噴射された検体はサブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。曝露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min(基礎換気流量; 29.5

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 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の 2 時間を通してモニタリングした。

(5) 曝露チャンバー

動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形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 25 匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製のアウトターチャンバーと PET 樹脂で作製したインナーチャンバー(直径 660 mm、高さ 477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナー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。メインチャンバーの気積 179 L である。

(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エアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/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。

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。先行研究において、CPC による MWCNT の測定では 1×10^3 個/mL 程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、T-CNT7#53 群では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。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、MWNT-7 のように繊維径は 100 nm 程度であるが、繊維長は 10 μ m を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定さ

れる。T-TiO₂群では、目標濃度がCPCの測定上限を超えると想定されることから、15倍希釈して測定を行った。また質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、55mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダ-ガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、55mm、捕集効率(DOP 0.3 μm): 99.9%、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 L/min × 120min = 180 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。

(7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、二つの方法で実施した。一つは、T-TiO₂とT-CNT7#53ともにMicro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI)を用いたMass Median Aerodynamic Diameter (MMAD)である。10 L/minの流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引してMOUDI(Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm, No.2; 5.6 μm, No.3; 3.2 μm, No.4; 1.8 μm, No.5; 1.0 μm, No.6; 0.56 μm, No.7; 0.32 μm, No.8; 0.1 μm, No.9; 0.10 μm, No.10; 0.056 μm, No.11; 0.032 μm, No.12; 0.018 μm, No.13; 0.01 μm)に導いた。吸引時間はT-TiO₂では10分、T-CNT7#53は20分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に50 ℃のインキュベーター内で3日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤(XP26V、METTLER TOLEDO)を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI装着前と、MWCNT回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

もう一つの方法は、粒子の電気移動度によって測定

するScanning Mobility Particle Sizer (SMPS, Model 3034, サンプリング流量: 1.0 L/min, TSI, MN, USA)である。SMPSは粒子径の測定範囲が10~500 μmであるため、T-TiO₂のみを対象とした。エアロゾル濃度がSMPSの測定上限を超える濃度と想定されるため、25倍希釈して測定を行った。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られること、曝露チャンバーの気積が約180Lと比較的小さいため、測定機器のサンプリング流量を加味した流量調整が必要となることから、測定回数を限定して行った。

(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の人為的移动を避けるため、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、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、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。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、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。流量は点滴調節器により適宜調節した。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、当研究所の専用実験施設内で実施しており、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。

B-2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

吸入曝露実験を担当する高橋ら(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)から提供を受けた肺と縦隔の組織負荷量を測定した。

B-2-1 : T- TiO₂ の組織負荷量の測定

(1) T- TiO₂ 検量線の作成

検量線溶液 C7 を調製し、それを段階希釈して7ポイントの検量線溶液 (C7、C6、C5、C4C3、C2、C1) を調整した。

検量線溶液 C7 の調製手順。

1000µg/mL の T- TiO₂ 標準溶液 0.1mL に 3 % 硫酸水 0.9mL を加 10 倍希釈し、さらに、その溶液 0.1mL に 3 %硫酸水を 0.9 mL 加え T- TiO₂ 標準液の 100 倍希釈液とした。T- TiO₂ 標準液の 100 倍希釈液 0.4mL に 3 %硫酸水で 9.6 mL を加え 25 倍希釈した(検量線 C7 : 0.4 µg/mL)。

(2) サンプル中の T-TiO₂ 測定

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た。肺及び縦隔の原子吸光で測定した吸光度値を直線回帰式に代入し、チタンの測定値を求めた。酸化チタン中のチタンの含有率は 60% であることから、原子吸光で測定したチタン量から換算して酸化チタン量として計算した。この値に希釈倍率を乗じることにより、酸化チタンの個体当りの沈着量 (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、各肺及び縦隔の重量で除することにより肺及び縦隔の g 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た。

B-2-2 : T- CNT7 の組織負荷量の測定

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で 1 か月以上浸漬固定した肺及び縦隔のサンプルを 60 °C で 24 時間かけて、気相部分は窒素ガスで置換しながら溶解して測定溶液を調整した。また、溶液中の T-CNT7 の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し検量線溶液調製した。測定を阻害する T-CNT7 以外の組織成分の除去については、分担報告 B-5-1-1、B-5-1-2、B-8-1 参照。

T- CNT7 の組織負荷量はベンゾ[ghi]ペリレンをマーカーとした微量定量法 (大西法 : 定量限界 0.04 microgram/肺) を用いて測定する。使用するマーカー溶液の調製については、分担報告 B-5-1-4 参照。

(1) T- CNT7 検量線の作成

検量線溶液 C5 を調製し、それを段階希釈して7ポイントの検量線溶液 (C5、C4、C3、C2、C1) を調整した。

検量線溶液 C5 の調製手順。

T-CNT7 原液 0.2 mL を 15 mL 容のフタ・メモリ付の PP チューブに採取し、Tw-sol により 10 mL にメスアップし、1 分間超音波分散した。
(検量線溶液 C5 : 1 µg/mL)

(2) サンプル中の T-CNT7 測定

測定溶液のマーカー溶液を添加してサンプル中の T-CNT7 にマーカーを吸着させた後、0.4 µm のフィルター (ワットマン : GE Healthcare UK Ltd) でろ過することで余分なマーカーを除去、フィルター上の T-CNT7 をポンチ (8 mm) でくり抜き、アセトニトリルでマーカーを脱着して抽出、HPLC で測定した。

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た。肺及び縦隔の 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、各肺及び縦隔の重量で除することにより g 当りの値（単位： $\mu\text{g/g}$ ）とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

B-3. 病理組織学的評価研究

病理組織学的評価研究は吸入曝露実験を担当する高橋ら（国立医薬品食品衛生研究所毒性部）から肺と縦隔の組織の提供を受けて実施した。

病理組織学的解析サンプルは曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖された肺と縦隔の組織で、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）で約 3 分灌流固定後、同組成固定液（4%PFA）にて一晚浸漬固定（冷蔵）、翌朝、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（ナカライテスク）に交換して保存された状態で提供を受けた。気管支肺胞洗浄液（BALF）塗抹標本は、国立医薬品食品衛生研究所での定期解剖で免疫機能評価の分担（石丸）と協働で BALF を採取。その際、免疫機能評価に割り当てた各解剖期の 6 匹のうちの 3 匹についてサイトスピンで BALF150 μL を塗抹メタノール固定後、所属施設で May-Grunwald-Giemsa 染色、解析した。

B-3-1 病理組織標本作製

固定後の肺と縦隔から組織片を切り出し、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に供した。縦隔は胸腺を含む縦隔組織の全長に渡り 3mm 幅で切り出し、左肺は肺の長軸と平行に 3 切片、右肺は全断面を水平方向に切り出した。

B-3-2 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-TiO₂ 及び T-CNT7 の沈着と組織反応、T-TiO₂ 及び T-CNT7 の吸入曝露と肺の線維化病変の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。通常の病理組織学的検査に加えて、100 倍（油浸）の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア（Adobe Photoshop CS5）でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない組織変化について検討した。

B-3-3 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

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で吸入曝露した検体（T-TiO₂ または T-CNT7）の貪食率を調べて経時的推移を調べた。また、BALF 塗抹標本に観察される肺胞マクロファージについての詳細な形態学的解析を行った。

B-3-3-1: BALF 塗抹細胞の百分比

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 503 ~ 624 細胞につい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-3-3-2: BALF 塗抹標本に観察される肺胞マクロファージにおける検体の貪食率

B-3-3-1 で肺胞マクロファージと分類した細胞について、検体（T-TiO₂ または T-CNT7）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について検討した。

B-3-3-3 BALF 塗抹肺胞マクロファージの詳細な形態学的解析

通常の観察に加えて、100倍(油浸)の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア(Adobe Photoshop CS5)でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない形態学的な変化を含めて病因学的な意義について検討した。

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

解析に供試したサンプルは吸入曝露実験を担当する高橋ら(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)から肺と縦隔の組織の提供を受けて、T-TiO₂またはT-CNT7の曝露後、0、1、2、4および8週間における肺組織における免疫システムの変動を肺胞洗浄液中の単核球(BALF細胞)のFCM解析、BALF細胞と肺組織の遺伝子のmRNA発現量の変動を把握した分担研究結果からT-TiO₂曝露とT-CNT7曝露に特徴的なものを抽出した。

B4-1: フローサイトメトリー解析

肺胞洗浄で採取したBALF細胞、頸部リンパ節、脾臓の単核球についてフローサイトメトリー解析を行った。

肺胞洗浄液からの単核球の採取は、定期解剖の際、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PBSを流し込み洗浄液を回収後、遠心した。リンパ節からの単核球の採取は、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用いて採取、脾臓からの単核球の採取は、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、濾過を行って採取した。

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。解析では、FSC/SSCから生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、CD3⁺CD19⁻7AAD⁻細胞からCD11c/CD11bにて展開することによって、肺胞マクロファージ(AM)、好酸球(E)、単球(M)に分類した。さらに、AM分画をCD192/CD206で展開することによってM1(CD192)あるいはM2(CD206)マクロファージサブセットの検出を行った。一方で、F4/80とCD11bをマーカーとした分画も検討した。肺胞マクロファージはF4/80⁺CD11b⁻の表現型を示し、前年度までの報告ではT-CNT7の吸入曝露でF4/80⁺CD11b⁺あるいはCD11b^{high}の分画が増加することがわかっている。この分画はM1マクロファージの性格を有していることも知られている。

B4-2: 定量化RT-PCR法による解析

BALF細胞および肺組織の一部を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',
reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3',
Col IV; forward, 5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3',
reverse, 5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3',
GM-CSF; forward,
5', -CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA-3
reverse, 5'-CAGCTTGTAGGTGGCACACA-3',

IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3',
reverse, 5'-CAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3',
IL-33; forward, 5'-ATTTCCCGGCAAAGTTCAG-3',
reverse, 5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3',
MMP12; forward,
5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',
reverse,
5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3',
TIMP-1; forward,
5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3',
reverse,
5'-GGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3',
VEGF; forward, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3',
reverse, 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3',
 β -actin; forward,
5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3',
reverse,
5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成19年6月1日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律(平成15年法律第97号)及び所属の研究機関が定める規定を遵守した。

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

C-1-1. 検体の高分散化処理(Taquann法)

(1) T-CNT7#25とT-CNT7#53のエアロゾルの性状
アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを2,500倍の倍率で50視野($51\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$)を観察し、共有結合した状態のエアロゾル(Aggregates)と、複数の繊維が絡まったエアロゾル(Agglomerates)の数、およびその比率を比較した。その結果、Aggregatesの数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53それぞれ0.5個/視野、1.4個/視野、Agglomeratesの数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53それぞれ1.5個/視野、4.1個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53はT-CNT7#25よりもAggregatesおよびAgglomeratesの数が多く観察された。一方、AggregatesとAgglomeratesの比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ25%と75%と同じ割合であった。

C-1-2. マウス全身曝露吸入実験

(1) T-TiO₂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。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-TiO₂の5日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度(Sub-Group A \times 5回、Sub-Group B \times 5回、計10回)は $34.8 \pm 3.1\text{ mg/m}^3$ (平均値 \pm SD)であった。平均CPCカウント(同10回)は $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD)であった。

MMADは893~1,060nm(σ :3.5~4.2)であり、全体の平均(5回)は、975.3nmであった。

SMPSの測定では、1回の吸入曝露実験で約30の

データが生成され、合計 150 程度のデータが得られたが、ほとんど同様の値を示していた。代表例として示された Sub-Group B の三回目のデータでは粒子径の中央値は 149.4 nm、平均値は 177.6 nm 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、390 mg である。2 時間の曝露チャンバーの総換気量は 3.9 m³ であることから名目上の濃度は 100 mg/m³ と計算される。実際に測定した濃度の平均は 34.8 mg/m³ から、エアロゾル化効率を計算すると 34.8% であった。

(3) 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。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全体の平均質量濃度 (Sub-Group A × 5 回、Sub-Group B × 5 回、計 10 回) は 3.0 ± 0.1 mg/m³ であった。平均 CPC カウント (同 10 回) は 1,449 ± 155/cm³ であった。

MMAD は 522 ~ 1,114 nm (σ_g: 5.3 ~ 7.9) であり、5 回の平均は、788.2 nm 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、15 mg である。2 時間の曝露チャンバーの総換気量は 3.9 m³ であることから名目上のエアロゾル濃度は 3.8 mg/m³ と計算される。実際に測定した濃度の平均値 3.0 mg/m³ から、エアロゾル化効率を計算すると 78.9% であった。

(4) 剖検

本実験において定期解剖した全ての個体で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

C-2-1 T- TiO₂ の組織負荷量の測定

(1) 肺: 肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 150.11 ± 9.05 μg/g、1 週目では 112.47 ± 13.94 μg/g、4 週目では 63.05 ± 7.21 μg/g、8 週目では 25.85 ±

11.36 μg/g であり、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/6 の減衰傾向が認められた。

縦隔負荷量: TiO₂ の負荷は認められなかった。

(2) 縦隔: TiO₂ の負荷は認められなかった。

T-TiO₂ の検量線の信頼性については、T-TiO₂ の濃度と吸光度の相関係数 0.9978 で T-TiO₂ を測定に良好な直線性を示した。T-TiO₂ は 0.025 ~ 0.4 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。

なお、対照群の肺と縦隔に TiO₂ の負荷は認められなかった。

C-2-2 T- CNT7 の組織負荷量の測定

(1) 肺: 肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 29.04 ± 6.16 μg/g、1 週目では 21.33 ± 2.01 μg/g、4 週目では 13.68 ± 1.62 μg/g、8 週目では 9.15 ± 2.17 μg/g で減衰傾向が認められ、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/3 の減衰傾向であった。

(2) 縦隔: T- CNT7 の負荷は認められなかった。

T-CNT7 の検量線の信頼性については、T-CNT7 の濃度とマーカの面積値の相関係数 0.9938 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 ~ 1.0 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。

なお、対照群の肺と縦隔に TiO₂ の負荷は認められなかった。

C-3. 病理組織学的評価研究

C-3-1 病理組織変化

T-TiO₂ 曝露群

曝露終了日 (0 週) から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかったことから、本実験での曝露条件下では T-TiO₂ を貪食したマクロファージによる病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

T-CNT7 曝露群

曝露終了日 (0 週) から曝露終了後 8 週までいずれ

の解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした肺泡域での肺胞壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺胞管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられた。肉芽腫の中に認められる T-CNT7 の凝集塊には長径で 20 μ m を超える大きなものも散見された。H29 年度の T-CNT7#25 よりも Taquann 法による検体の高分散化処理で金属フィルターが目開き径が大きなものでろ過した T-CNT7#53 を使用した今年度の吸入曝露実験では、肺に明確な肉芽腫や線維増生がみられるサンプルを採材することができた。

Masson trichorm 染色結果

肺線維化の状況を Masson trichorm 染色でみると、T-TiO₂ 曝露群では対照群と比べて変化が見られなかった。一方、T-CNT7 曝露群で曝露終了後 8 週に青色に染色された膠原線維の増生所見を認めた。その部位は末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺胞管の胞隔で顕著な肥厚がみられたところと一致していた。また増生した膠原線維の中に T-CNT7 が埋没している所見も認められた。

T-CNT7 曝露群の詳細観察

T-CNT7 曝露群の詳細観察で肺泡マクロファージと推定される細胞が増生・伸長して末梢気道の上皮組織や上皮組織下の間質に連続する所見など認められた。この変化では vimentin 免疫染色で上皮組織に間葉系細胞が侵入していると思われる所見が(認められているが、肺泡マクロファージの表面抗原マーカー等の免疫染色での確認までは行っていない。T-CNT7 の曝露によって長く伸長する fibrous な形態をとるマクロファージの活発動きが肉芽腫を形成している可能性も考えられ、今後、免疫染色等を実施して、「長繊維細胞質貫通」タイプの NM に特徴的な所見候補と考えられる肉芽腫の発生との係わりを検証していく。

C-3-2 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

実験全体を通して気管支肺胞洗浄液の平均回

収率は、0 週と 8 週の対照群は、それぞれ 78.7%と 75.4%であったつたが、それ以外はいずれも 80%以上と良好であった。

BALF 塗抹細胞の百分比

各群の 0、1、4 週での BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。

マクロファージ以外の細胞でカウントされたものは以下の通り。

対照群	該当なし
T-TiO ₂ 曝露群 4 週	分葉核好中球 0.2%、 単球 0.1%
T-CNT7 曝露群 0 週	単球 0.4% リンパ球 0.1%
1 週	分葉核好中球 4.0%、 単球 0.2% 好酸球 0.1%
4 週	分葉核好中球 1.1% 単球 0.6%、 好酸球 0.2% リンパ球 6.1%

気管支肺胞洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみとめられているだけで急性の炎症性変化としては微弱なもので、病理組織学的には認められなかった。

BALF 塗抹肺泡マクロファージにおける検体の貪食率

T-TiO₂ 曝露群は、0 週か 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。一方、T-TCNT7 曝露群では曝露終了(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した。

BALF 塗抹肺泡マクロファージの詳細な形態学的解析

T-CNT7 曝露群の ALF 塗抹標本にマクファージが 10 細胞以上集合し、その中央部に T-CNT の凝集体

が存在する所見が認められた。こうした肺胞マクロファージの集合体は対照群と T-TiO₂ 曝露群に認められなかった。この変化を詳細に観察する中で、検体を貪食した肺胞マクロファージの周囲を非貪食マクロファージが取り囲むように配列し、周囲の非貪食マクロファージの細胞質が中央部の貪食マクロファージの胞体内に入り込むと思われる所見を認めた(図 13-J)。BALF 塗抹標本を仔細に観察すると、通常みられるマクロファージや単球、好酸球とは形態学的に異なる多様な細胞が多数存在していた。肺胞マクロファージで T-CNT7 を貪食しているものはおおむね円形、May-Grunwald-Giemsa 染色で幾分紫色を帯びた淡青色に染まる円形の胞体を有する。核は円形で濃赤紫色を呈し、胞体の中央に位置するものもあるが、辺縁部に偏在するものもある。個々のマクロファージが貪食している T-CNT7 の数は比較的少ないことが多い(図 13-A, B, L, N)。一方、検体を貪食していないと思われるマクロファージは検体を貪食した肺胞マクロファージよりも小型で、核・細胞質比が大きく、細胞質の色調は赤紫を帯び、細胞の形は円形のものから複雑に伸長したものまで様々であった。濃赤紫色に染色された核構造物が細胞質内に拡がる所見も認められ(図 13-M)、これと同質の核構造物の変化を起こしていると考えられる肺胞マクロファージが 2 つの T-CNT7 貪食マクロファージの間に介在している所見((図 13-N)も認められた。さらに、検体貪食肺胞マクロファージと非貪食肺胞マクロファージが鎖状に繋がって延びていると考えられる所見(図 13-D)、パラフィン包埋・HE 染色標本で細気管支内に認められた検体貪食マクロファージも多数の貪食マクロファージと非貪食マクロファージの集合体となっている所見など、様々な形態を示すマクロファージが肺内に吸引された T-CNT7 の処理にかかわっている可能性が示唆された。

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

C4-1: フローサイトメトリー解析

生細胞

T-CNT7 曝露で BALF 中の生細胞の低下が曝露直後(0 週)から 4 週まで持続、8 週で回復していた

CD11c⁺CD11b⁻肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で肺胞マクロファージ(AM)の低下が曝露直後(0 週)から 4 週まで持続、8 週で回復していた。

CD11b⁻F4/80⁺肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に低下がみられ、その影響が 8 週まで持続
T-TiO₂ 曝露では減少なし

単球

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週まで増加が続き、その影響が 8 週まで持続していた。
T-TiO₂ 曝露では、対照群と変化はなかった

F4/80⁺肺胞マクロファージ

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に減少がみられ、その影響が 8 週まで持続
T-TiO₂ 曝露では減少なし

CD206⁺マクロファージ in AM(CD11c⁺CD11b⁻) (M2 マクロファージの性格を有する)

T-CNT7 曝露で 0 週のみ増加
T-TiO₂ 曝露では増加なし。

CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ (M1 マクロファージの性格を有する)

T-CNT7 曝露で 0 週から 4 週に 1 週をピークとした増加がみられ、その影響が 8 週まで持続した
T-TiO₂ 曝露では明確な増加なし

好酸球

好酸球は BALF 細胞全体で占める割合が低率であること考えると T-CNT7 曝露で 0 週と 1 週に増加し、4 週と 8 週では対照群のレベルに低下した。

T-TiO₂ 曝露では、曝露の影響はなかった。

T-CNT7 曝露での増加は繊維状のナノマテリアル
に対しての初期の免疫反応に關与している可能
性がある。

CD36 in AM (スカベンジャー受容体)

T-CNT7 曝露で 0 週のみ増加

T-TiO₂ 曝露でも 0 週のみ T-CNT7 曝露と同程度
増加

CD36 in CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ(スカベンジャ ー受容体)

肺胞マクロファージ全体での発現量とほぼ同じで
あったことから CD36 はこの分画における発現が
T-CNT7 と T-TiO₂ に対する反応の鍵になると考えら
れた

CD163 in AM (スカベンジャー受容体)

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い
(マクロファージの 5% 以下の発現) ため曝露に
よる影響は低いと考えられた

CD136 in CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ(スカベンジャ ー受容体)

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い(マク
ロファージの 5% 以下の発現) ため曝露による影響
は低いと考えられた。(図 6B)

C 4 - 2 : 定量化 RT-PCR 法による解析

MMP12

・BALF 細胞での発現

T-CNT7 曝露で 1 週をピークとした増加

T-TiO₂ 曝露では、変化なし

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で 1 週に強いピークを有する増加
(図 8A)

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加が見られたが、

T-CNT7 と約 9 倍の開きが見られた)

CD204(class A scavenger receptor)

・BALF 細胞での発現

T-CNT7 曝露で 1 週をピークとした増加(図 7B)

T-TiO₂ 曝露では、変化なし

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で 1 週にピークを有する増加(図 8B)

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する。

GM-CSF

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、明確な変化なし

IL-6

肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

IL-33

肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

TIMP-1

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露では 1 週に増加

T-TiO₂ 曝露では、1 週に増加するがバラツキが大
きく注意を要する

Col type 4

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露で変化なし

T-TiO₂ 曝露でも変化なし

VEGF

・肺組織での発現

T-CNT7 曝露、T-TiO₂ 曝露とも発現率が低い(マクロファージの5%以下の発現)ため曝露による影響は低いと考えられた。

D. 考察

ナノマテリアルの組織負荷量の測定

肺組織内負荷量の測定結果から、T-TiO₂ については曝露直後、1、4 および 8 週後における肺当りの T-TiO₂ の負荷量(曝露濃度 30 mg/m³)は 150.11 ± 9.05 μg/g、112.47 ± 13.94 μg/g、63.05 ± 7.21 μg/g 及び 8 週目では 25.85 ± 11.36 μg/g であった。曝露後 4 週での肺負荷量は曝露直後の肺負荷量の 42.8%で、4 週間で肺に入ったもののうちの半分以上(57.2%)が肺からクリアランスされていて、本実験の吸入曝露条件では、マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。病理組織学的検査で T-CNT7 は、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(曝露濃度 3 mg/m₃)は 29.04 ± 6.16 μg/g、21.33 ± 2.01 μg/g、13.68 ± 1.62 μg/g、9.15 ± 2.17 μg/g で減衰傾向が認められたものの、4 週と 8 週後の負荷量はそれぞれ曝露終了日(0 週)の値の 47.1%、31.5%であり、肺内に吸引された T-CNT7 は T-TiO₂ に比べてクリアランスされにくいことが示された。

病理組織学的評価研究

T-TiO₂ 曝露群では、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかったことから、本実験での曝露条件下ではマクロファージによって完全貪食される T-TiO₂ 曝露群に病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

一方、マクロファージによって不完全貪食される T-CNT7 曝露群は、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした肺泡域での肺泡壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺泡管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられ、肉芽腫の中に長径で

20μm を超える大きな T-CNT の凝集塊も散見された。こうした変化は曝露終了後 8 週に Masson trichrome 染色で示された膠原線維の増生所見に移行し、T-CNT7 は増生した膠原線維の中に埋没されていると考えられた。一方、病理組織学的な変化がみられなかった T-TiO₂ 曝露群には Masson trichrome 染色で膠原線維の増生所見は認められなかった。

気管支肺泡洗浄液の回収率は最も低い場合で 75%、大多数は 80%以上であることが示され、気管支肺泡洗浄液採取は良好であった。

BALF 塗抹で曝露終了時(0 週)、1、4 週での各群の細胞を分類すると、BALF 塗抹細胞のほとんど全てがマクロファージであった。マクロファージ以外の細胞でカウントされたものとして分葉核好中球があるが、分葉核好中球は対照群で認められたものではなく、T-TiO₂ 曝露群の 4 週で 0.2%、T-CNT7 曝露群の 1 週で 4.0%、同 4 週で 1.1%であり、気管支肺泡洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみられた程度で病理組織学的にも急性の炎症を示す変化は認められなかった。

BALF 塗抹の観察で T-TiO₂ 曝露群は、0 週か 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。一方、T-CNT7 曝露群では曝露終了時(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した。この検体非貪食マクロファージは曝露終了時(0 週)に減少した肺泡マクロファージの数を補填するものと考えられている。

ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響

BALF フローサイトメトリー解析で T-CNT7 だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは T-CNT7 曝露直後(0 週)から 4 週まで生細胞と肺泡マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、CD11b⁻F4/80⁺)の低下、同時期における単球の増加、T-CNT7 曝露後早い段階での M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺マクロファージ、M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージ、好

酸球の増加であった。

生細胞と肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、CD11b⁻F4/80⁺)の低下が曝露直後(0週)から4週まで持続し、8週には対照群の水準まで回復していた。一方、単球の増加が生細胞と肺胞マクロファージが低下した0週から4週の期間に認められ、その影響が8週まで持続していた。T-CNT7の曝露によって細胞死に陥った肺胞マクロファージを肺胞内の恒常性維持のため細胞数の増加した可能性が考えられる。この細胞増加は組織常在型のマクロファージの増加によるものか、末梢由来の単球から分化して増加したのかは不明であり、今後の課題である。

M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージが0週から4週に1週をピークとした増加がみられ、その影響が8週まで持続した。また、M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージの増加が0週のみを示された。

CD11b⁺F4/80⁺マクロファージについては、MWCNT 曝露後1年の肺で CD11b^{high}+F4/80 マクロファージが増加し、線維化に関係する MMP12 を産生することが報告されている(Otsuka et al.,2018)。今年度の研究で CD11b^{high} 分画を含 CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージや M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージが T-CNT7 曝露後の早い段階から増加していたことは、肺の線維化に係るマクロファージの分画が T-CNT7 の吸入曝露による免疫反応に重要な役割を果たしていると考えられた。また、好酸球の増加も T-CNT7 曝露後0週と1週という早い段階でみられていて、繊維状のナノマテリアルの曝露に対しての初期の免疫反応に関与している可能性がある。

スカベンジャー受容体については、BALF の FCM 解析でカテゴリー評価の要因となるものを見いだせなかった。 Class B 受容体である CD36 は曝露直後(0週)に T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露の両群で同程度の発現増加みられたことから、カテゴリー評価の指標にはならないと考えられた。CD3 の発現は全肺胞マクロファージ全体(CD11c⁺CD11b⁻)の発現と CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの発現量がほぼ同じであったことから CD3 の発現は CD11b⁺F4/80⁺分画によ

るものと考えられた。同じく Class B 受容体である CD136 については T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露ともに明確な発現増加は示されなかった。

BALF フローサイトメトリー解析で TiO₂ だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは見いだせなかった。

定量化 RT-PCR 法による解析で T-CNT7 だけに明確な変化が示されてカテゴリー評価の要因になり得ると考えられたのは MMP12 だけであった。

MMP12 は、BALF 細胞と肺組織の両方に T-CNT7 曝露で1週をピークとした増加認められ、T-TiO₂ にも肺組織で1週に増加が見られたが、T-CNT7 と約9倍の開きが見られた。

Class A 受容体である CD204 は BALF 細胞での発現で T-CNT7 曝露群だけに曝露後1週をピークとした増加認められているが、肺組織での発現では T-CNT7 曝露群と T-TiO₂ 曝露群の両方に1週をピークとした増加認められた。但し、T-TiO₂ 曝露群の発現にバラツキが大きいので、今後の検討が必要である。

サイトカインの定量化 RT-PCR 法による解析では肺組織の解析までこれまでに終了しているが BALF 細胞での発現解析を残している。カテゴリー評価の指標としての判断は今後の解析が待たれる。現在、カテゴリー評価の要因として候補は GM-CSF を考えている。

GM-CSF は T-CNT7 曝露で、肺組織に曝露後1週をピークとした増加認められた。T-TiO₂ 曝露でも明確な変化が示されなかった。

IL-6 と TIMP-1 は T-CNT7 曝露で、肺組織に曝露後1週をピークとした増加認められ、T-TiO₂ 曝露でも、曝露後1週に発現の増加を認めるが値のバラツキが大きく今後の検討課題である。

なお、BALF 細胞での mRNA 発現解析には、マルチプレックス解析の実施も予定している。

T-CNT7 曝露群の詳細な病理標本の観察で、曝

露終了日(0週)から肺胞マクロファージと推定される細胞が増生・伸長して末梢気道の上皮組織や上皮組織下の間質に連続する所見など認められ、T-CNT7曝露後の早い時期から fibrous な形態で長く伸長するマクロファージの活発な動きが肉芽腫を形成している可能性も考えられた。こうした所見は BALF 塗抹の詳細な形態観察でも類似した所見が認められた。また、免疫機能評価でも M2 マクロファージの性格を有する CD206⁺マクロファージや M1 マクロファージの性格を有する CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加、TIMP-1 の mRNA 発現が T-CNT7 曝露後の早い時期に認められていることも T-CNT7 曝露後肉芽腫形成に関与する可能性も考えられた。

肺組織での負荷量測定結果で T-CNT7 曝露後直後(0週)から4週の期間に肺内に吸引された T-CNT7 がクリアランスされにくいことや、BALF の FCM 解析での生細胞減少と肺胞マクロファージの低下などの現象も肉芽腫の成り立ちと係わっている可能性が考えられた。本研究での曝露条件下では T-CNT7 の吸入曝露で肺に好中球の浸潤を伴う炎症性変化が起こらなかったことから肺胞マクロファージが炎症性反応を誘発するサイトカインを放出/漏出している可能性は低く、あったとしてもその発現の強度は小さいと考えられた。一方、肉芽腫の形成と線維化を誘導するサイトカインを放出/漏出している可能性が考えられた。

以上、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンを曝露したマウスの肺では肺胞マクロファージの運動機能についての影響はみられていないと考えられた。MWNT-7 を曝露したマウスの肺では二酸化チタン曝露と比べてクリアランスされにくいことが示された。病理組織学的に二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化であった。加えて、免疫機能評価で BALF フローサイトメトリー解析での生細胞と肺胞マクロファージの低下、単球、M1 及び M2 マクロファージ、好酸球の増加、MMP12 の mRNA 発現増加を抽出した。NM の有害性

発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析による要因の絞り込みと、発現強度の把握を試みる。

E. 結論

NM の有害性発現を引き起こす要因の分類として、肺内負荷量の推移、病理学的評価では肉芽腫と線維化病変の形成が候補になると考えられた。免疫機能評価では、ナノマテリアル曝露後に肺免疫環境の急激な変化が生じている可能性も示唆されることから、肉芽腫形成に係るパラメータについて H30 年度のサンプルで追加解析により発現強度を把握したうえで要因の絞り込みを行う。

次年度は「毛玉状凝集様式」について吸入曝露実験を実施して研究成果をとり纏める。

F. 研究発表

1. 発表論文

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure

to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One*. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci*. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. *Journal of Occupational Health*, 60:10-30, 2018

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.

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

Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2

019 Apr;121:29-41 doi: 10.5152/eurjrheum.2019.18137.

Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2018.02594.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10):e0205702, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0205702

Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018 doi: 10.1111/jop.12756

Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, **Ishimaru N**, Kudo Y. Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(5):E1462, 2018 doi: 10.3390/ijms19051462

Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation*. 2018 Aug;41(4):1172-1181. doi:10.1007/s10753-018-0764-0.2 .

石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂第3版(2018年) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 病理と臨床 36(6), 580-585, 2018

牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群研究の最前線 細胞 50(10), 528-531, 2018

石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞 医学のあゆみ Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップ
セミナー：肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性：肺毒性を中心として、
第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、
2018.7.17 (大阪)

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18 (大阪)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18 (大阪)

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

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual

Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

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)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

梅田ゆみ、笠井辰也、山野莊太郎、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、2018.8.29(御殿場)

Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo:
Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International Sjogren's Syndrome Symposium, Washington DC, April 18-21, 2018

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing resident macrophages enhance autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Masako Saito, Satoko Kujiraoka, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Hidehiro Kishimoto, Naozumi Ishimaru: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Akiko Yamada, Aya Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Jonathan Sprent, and Naozumi Ishimaru. NF- κ B2 Controls the Migratory Activity of Memory T Cells to the Target Tissues in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺におけるIL-33の発現とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルにおけるNotchシグナルの役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄 DNAライセンス因子CDT1の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 Emi1の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔癌におけるPeriostinスプライシングバリエーションの同定とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers

differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第17回四国免疫フォーラム 徳島 2018.6.30

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 分子病理学研究会37はがくれシンポジウム 佐賀 2018.7.7

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 先端歯学スクール2018 東京 2018.8.23-24

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 第29回日本臨床口腔病理学会総会 東京 2018.8.25-26

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018.9.5-7

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat 香川 (リゾートホテル オリビアン小豆島) 2018.9.20-22

Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12

新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期曝露による

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

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

3. その他

なし

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

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

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

2. 実用新案登録

なし

. 分担研究報告

平成30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 病理検査室 室長

研究要旨

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(M ϕ)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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M ϕ 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基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指す。今年度の研究では、三種類の NM 蓄積様式モデルのうち「粒状凝集様式」のモデルとして二酸化チタンと、「長繊維貫通様式」のモデルとして選択した MWNT-7 で、マウスを用いた吸入曝露実験を高橋(国立医薬品食品衛生研究所)の分担で実施した。吸入曝露終了日(曝露後0週、1週、4週及び8週)の定期解剖で採取したサンプルの病理組織学的評価を行い、NM のカテゴリー評価基盤の整備において、肺胞マクロファージの胞体内で異なる蓄積様式を示す三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルの特徴的な有害性発現に関連する要因を抽出した。結果として、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化病変を抽出した。

A. 研究目的

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(M ϕ)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の開発を目的とする。具体的には、肺内に吸引され貪食された NM の肺胞 M 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基盤の整備を目指して、三種類のモデル NM をマウスに中期吸入曝露を行って得られる肺サンプルについて肺負荷量、病理組織学的評価及び免疫機能評価の観点から有害性発現に関連する要因の分類とその強度スケールの構築を目指し、本分担研究ではそのうちの病理組織学的評価を担当した。

B. 研究方法

病理組織学的評価研究は吸入曝露実験を担当する高橋ら(国立医薬品食品衛生研究所毒性部)から肺と縦隔の組織の提供を受けて実施した。

吸入曝露実験で提供されたサンプルの概要は次の通り。「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン (AMT-600、テイカ)と、MWNT-7 を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 ver.3.0)を用いて C57BL/NcrSlc 雄性マウスに、それぞれ 30 mg/m³、3 mg/m³ の濃度設定で 2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の吸入曝露を行った。MWNT-7 は Taquann 法による高分散処理の過程において粗大な成分が多く、肺の肉芽腫や線維化病変が起こりやすいと想定される 53 μm のメッシュで濾過した検体(以下、T-CNT7#53)を使用した(図 1)。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病理組織学的評価に用いる肺と縦隔の組織をサンプリング、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)で約 3 分灌流固定後、同組成固定液(4% PFA)にて一晩浸漬固定(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)に交換して保存された材料の提供を受けた。気管支肺胞洗浄液(BALF)の採取と塗抹標本の作製は、定期解剖で免疫機能評価の分担(石丸)と協働で BALF を採取した際、免疫機能評価に割り当てた各解剖期の 6 匹のうちの 3 匹について実施した。気管

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 1.6ml の生理食塩水(大塚)を流し込みシリンジを静かに上下させることによって肺とシリンジの間を 3 回往復させた後、洗浄液を回収した。生理食塩水の注入量は 0 週に 2mL としたが、その際の肺が膨らむ状況から 1 週以降は 1.6mL とした。回収した BALF から 150μL を分取してサイトスピンを用いてスライドガラスに塗抹、メタノール固定後、May-Grunwald-Giemsa 染色を行って解析に供試した(図 2)。BALF 採取後の右肺の状態について病理組織標本を作成して確認した。残った BALF と BALF 採取後の左肺は免疫機能評価(分担:石丸)による BALF 細胞の FCM 解析と肺組織の定量化 RT-PCR 法による mRNA 発現を解析に供試した。

B-1 病理組織標本作製

肺と縦隔の組織を図 3 に示す部位を切り出し、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)、vimentin 免疫染色(anti-vimentin antibody EPR3776, abcam)を作製し、光学顕微鏡を用いて病理組織検査に供した。

B-2 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-TiO₂ 及び T-CNT7 の沈着と組織反応、T-TiO₂ 及び T-CNT7 の吸入曝露と肺の線維化病変の関係性を中心に病理組織学的検査を実施した。通常の病理組織学的検査に加えて、100 倍(油浸)の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア(Adobe Photoshop CS5)でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を丁寧に調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない組織変化の病因学的な意義について検討した。

B-3 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

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で吸入曝露した検体(T-TiO₂または T-CNT7)の貪食率を調べて経時的推移を調べた。また、BALF 塗抹標本に観察される肺胞マクロファージについての詳細な形態学的解析を行った。

B-3 - 1 BALF 塗抹細胞の百分比

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503~624細胞につい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-3 - 2 BALF 塗抹標本に観察される肺胞マクロファージにおける検体の貪食率

B-3 - 2 で肺胞マクロファージと分類した細胞について、検体(T-TiO₂または T-CNT7)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について検討した。

B-3 - 3 BALF 塗抹肺胞マクロファージの詳細な形態学的解析

通常の観察に加えて、100倍(油浸)の対物レンズを使用した詳細観察を実施した。この詳細観察では撮影した写真画像をグラフィックデザインソフトウェア(Adobe Photoshop CS5)でデジタル拡大、適正露出の写真では認識できない組織変化についてアンダー側の露出域を丁寧に調べて光学顕微鏡を用いた目視での観察では認識できない形態学的な変化を含めて、病因学的な意義について検討した。

(倫理面への配慮)

本分担任研究における動物実験は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並

びに苦痛の軽減に関する基準(平成18年環境省告示第88号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成19年6月1日日本学会議)、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 病理組織標本作製

B-1 に記した方法により病理組織標本を作製した。

C-2 病理組織学的検査

(1) T-TiO₂ 曝露群の病理組織変化

曝露終了日(0週)から曝露終了後8週までいずれの解剖期にも毒性病変を認めなかった(図4)。

肺内でのT-TiO₂粒子の存在の程度については、通常使用する40倍の対物レンズによる観察では、粒子の存在はほとんど認識できなかったが、100倍の対物レンズを用いて精査すると少ないながらも肺内に吸引されたTiO₂粒子の存在を確認することができた(図5)。HE染色を施した病理組織標本ではTiO₂粒子を認識することは困難であったが、BALF塗抹標本ではほとんどすべての肺胞マクロファージの細胞質内で容易に観察できた。本実験での曝露条件下ではT-TiO₂を貪食したマクロファージによる病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

(2) T-CNT7 曝露群の病理組織変化

曝露終了日(0週)から曝露終了後8週までいずれの解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした

肺泡域での肺泡壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺泡管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられた。肉芽腫の中に認められる T-CNT7 の凝集塊には長径で 20 μ m を超える大きなもの(図 7)も散見された。

(3) Masson trichorm 染色結果

Masson trichorm 染色で肺線維化の状況を調べた。その結果、T-TiO₂ 曝露群では対照群と比べて変化が見られなかった。一方、T-CNT7 曝露群で曝露終了後 8 週に Masson trichorm 染色で青色に染色された膠原線維の増生所見を認めた。その部位は末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺泡管の胞隔で顕著な肥厚がみられたところと一致していた(図 8、9)。また増生した膠原線維の中に T-CNT7 が埋没している所見も認められた(図 9)。

(4) T-CNT7 曝露群の詳細観察

T-CNT7 曝露群の詳細観察で肺泡マクロファージと推定される細胞が増生・伸長して末梢気道の上皮組織や上皮組織下の間質に連続する所見が認められた。この変化では vimentin 免疫染色で上皮組織に間葉系細胞が侵入していると思われる所見が(図 10)認められているが、肺泡マクロファージの表面抗原マーカー等の免疫染色での確認までは行っていない。T-CNT7 の曝露によって長く伸長する fibrous な形態をとるマクロファージの活発動きが肉芽腫を形成している可能性も考えられ、今後、免疫染色等を実施して、「長繊維細胞質貫通」タイプの NM に特徴的な所見候補と考えられる肉芽腫の発生との係わりを検証していく。

C-3 BALF 塗抹細胞の形態学的解析

実験全体を通して気管支肺泡洗浄液の平均回収率は、0 週と 8 週の対照群は、それぞれ 78.7%と 75.4%であったが、それ以外はいずれも 80%以上と良好であった(図 11)。

C-3-1 BALF 塗抹細胞の百分比

各群の 0、1、4 週での BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。

マクロファージ以外の細胞でカウントされたものは以下の通り。

対照群	:	該当なし
T-TiO ₂ 曝露群:4 週		分葉核好中球 0.2%、 単球 0.1%
T-CNT7 曝露群:0 週		単球 0.4% リンパ球 0.1%
1 週		分葉核好中球 4.0%、 単球 0.2% 好酸球 0.1%
4 週		分葉核好中球 1.1 単球 0.6%、 好酸球 0.2% リンパ球 6.1%

気管支肺泡洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみとめられているだけで急性の炎症性変化としては微弱なもので、病理組織学的には認められなかった。

C-3-2 BALF 塗抹肺泡マクロファージにおける検体の貪食率

T-TiO₂ 曝露群は、0 週から 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。

T-CNT7 曝露群では曝露終了(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した(図 11)。

C-3-3 BALF 塗抹肺泡マクロファージの詳細な形態学的解析

T-CNT7 曝露群の BALF 塗抹標本にマクロファージが 10 細胞以上集合し、その中央部に T-CNT の凝集体が存在する所見が認められた。こうした肺泡マクロ

ファージの集合体は対照群と T-TiO₂ 曝露群に認められなかった。この変化を詳細に観察する中で、検体を貪食した肺泡マクロファージの周囲を非貪食マクロファージが取り囲むように配列し、周囲の非貪食マクロファージの細胞質が中央部の貪食マクロファージの胞体内に入り込むと思われる所見を認めた(図 13 J)。BALF 塗抹標本を仔細に観察すると、通常みられるマクロファージや単球、好酸球とは形態学的に異なる多様な細胞が多数存在していた。肺泡マクロファージで T-CNT7 を貪食しているものはおおむね円形、May-Grunwald-Giemsa 染色で幾分紫色を帯びた淡青色に染まる円形の胞体を有する。核は円形で濃赤紫色を呈し、胞体の中央に位置するものもあるが、辺縁部に偏在するものもある。個々のマクロファージが貪食している T-CNT7 の数は比較的少ないことが多い(図 13-A, B, L, N)。一方、検体を貪食していないと思われるマクロファージは検体を貪食した肺泡マクロファージよりも小型で、核・細胞質比が大きく、細胞質の色調は赤紫を帯び、細胞の形は円形のものから複雑に伸長したのまで様々であった。濃赤紫色に染色された核構造物が細胞質内に広がる所見も認められ(図 13-M)、これと同質の核構造物の変化を起こしていると考えられる肺泡マクロファージが 2 つの T-CNT7 貪食マクロファージの間に介在している所見(図 13-N)も認められた。さらに、検体貪食肺泡マクロファージと非貪食肺泡マクロファージが鎖状に繋がって延びていると考えられる所見(図 13-D)、パラフィン包埋・HE 染色標本で細気管支内に認められた検体貪食マクロファージも多数の貪食マクロファージと非貪食マクロファージの集合体となっている所見(図 13-C)など、様々な形態を示すマクロファージが肺内に吸引された T-CNT7 の処理にかかわっている可能性が示唆された。

D. 考察

T-TiO₂ 曝露群では、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期にも毒性病変を認められなかったことから、本実験での曝露条件下ではマクロファージによって完全貪食される T-TiO₂ 曝露群に病理組織学的な変化は起こらないことが示された。

一方、マクロファージによって不完全貪食される T-CNT7 曝露群は、曝露終了日(0 週)から曝露終了後 8 週までいずれの解剖期でも末梢気道周囲間質と同部を中心とした肺泡域での肺泡壁の肥厚と T-CNT7 の存在を認めた。特に末梢気道周囲間質および末梢気道に続く肺泡管の胞隔に顕著な肥厚箇所が散見され、これらの変化はマクロファージの集簇による肉芽腫と考えられ、肉芽腫の中に長径で 20 μ m を超える大きな T-CNT の凝集塊も散見された。こうした変化は曝露終了後 8 週に Masson trichrome 染色で示された膠原線維の増生所見に移行し、T-CNT7 は増生した膠原線維の中に埋没されていると考えられた。一方、病理組織学的な変化がみられなかった T-TiO₂ 曝露群には Masson trichrome 染色で膠原線維の増生所見は認められなかった。

気管支肺泡洗浄液の回収率は最も低い場合で 75%、大多数は 80%以上であることが示され、気管支肺泡洗浄液採取は良好であった。

BALF 塗抹で曝露終了時(0 週)、1、4 週での各群の細胞を分類すると、BALF 塗抹細胞のほとんど全てがマクロファージであった。マクロファージ以外の細胞でカウントされたものとして分葉核好中球があるが、分葉核好中球は対照群で認められたものはなく、T-TiO₂ 曝露群の 4 週で 0.2%、T-CNT7 曝露群の 1 週で 4.0%、同 4 週で 1.1%であり、気管支肺泡洗浄液での分葉核好中球の出現は T-CNT7 曝露後 1 週に 4%の出現がみられた程度で病理組織学的にも急性の炎症を示す変化は認められなかった。

BALF 塗抹の観察で T-TiO₂ 曝露群は、0 週から 4 週までほとんどすべての肺泡マクロファージが検体粒子を貪食していることが示された。一方、T-CNT7 曝露群では曝露終了時(0 週)から検体を貪食していない肺泡マクロファージが 20%程度認められ、曝露終了後の時間経過とともに検体非貪食マクロファージの割合が増加した。この検体非貪食マクロファージは曝露終了時(0 週)に減少した肺泡マクロファージの数を補填するものと考えている。

E. 結論

肺胞マクロファージの胞体内で異なる蓄積様式を示す三種類のモデルのうち「粒状凝集様式」と「長繊維貫通様式」のモデルの特徴的な有害性発現に連関する要因として、本実験の吸入曝露条件では、二酸化チタンの曝露で特徴的な所見は肺に毒性変化が見られないことであり、MWNT-7 の曝露で特徴的な所見としては曝露後の早い時期から MWNT-7 を巻き込んだ肉芽腫形成とその後の線維化病変を抽出することができた。

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、近藤ひとみ、妹尾英樹、高信健司 並びに国立医薬品食品衛生研究所 毒性部の辻昌貴、森田紘一の各氏からの技術的支援を頂き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) 高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)
- (2) 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、2018.8.29(御殿場)

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

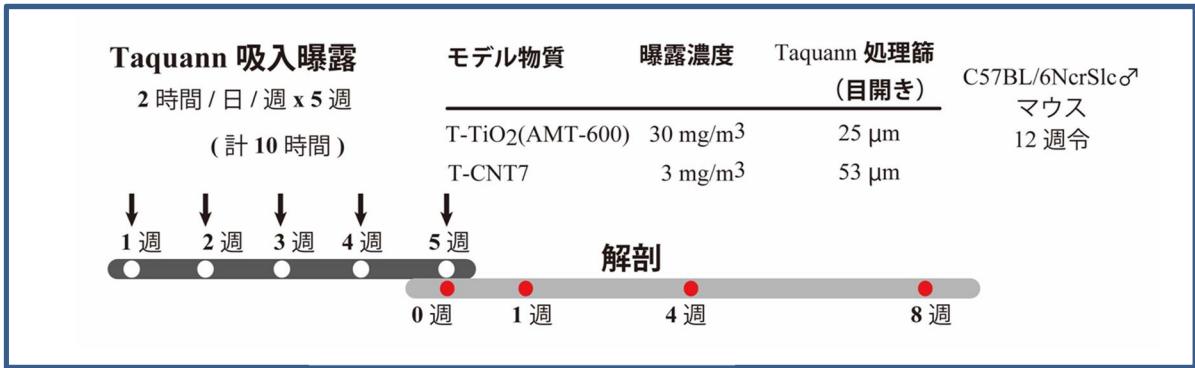


図 1 実験デザイン

May-Grunwald-Giemsa 染色	May-Grunwald-Giemsa 染色抹
1) May-Grunwald-Giemsa 染色イソフルラン麻酔下で気管から両肺に生理食塩水(大塚)を注入 注入量 0 週 : 2ml 1、4、8 週: 1.6mL 2) 洗浄 3) 回収した BALF から 150 μL を分取 4) サイトスピン (Shandon cytospin2、700rpm、5分) で スライドガラスに均一に散布 (塗抹)	1) メタノール固定 1 分 2) 3% May-Grunwald 液 30 分 3) pH6.4 Buffer* 液で rinse 4) 5% Giemsa 液 30 分 5) pH6.4 Buffer* 液で rinse 6) 乾燥・封入 染色は一枚ずつ手染め * : pH6.4 Buffer は 10 倍希釈で使用

図 2 気管支肺胞洗浄液塗抹標本の作製

肺の切り出し 胸腺・縦隔部の切り出し

右肺: 右肺の全ての葉を付けた状態で水平に切り出した

左肺: 長軸と平行に 3 切片を切り出した

図 3 病理組織標本作成 (切り出し)

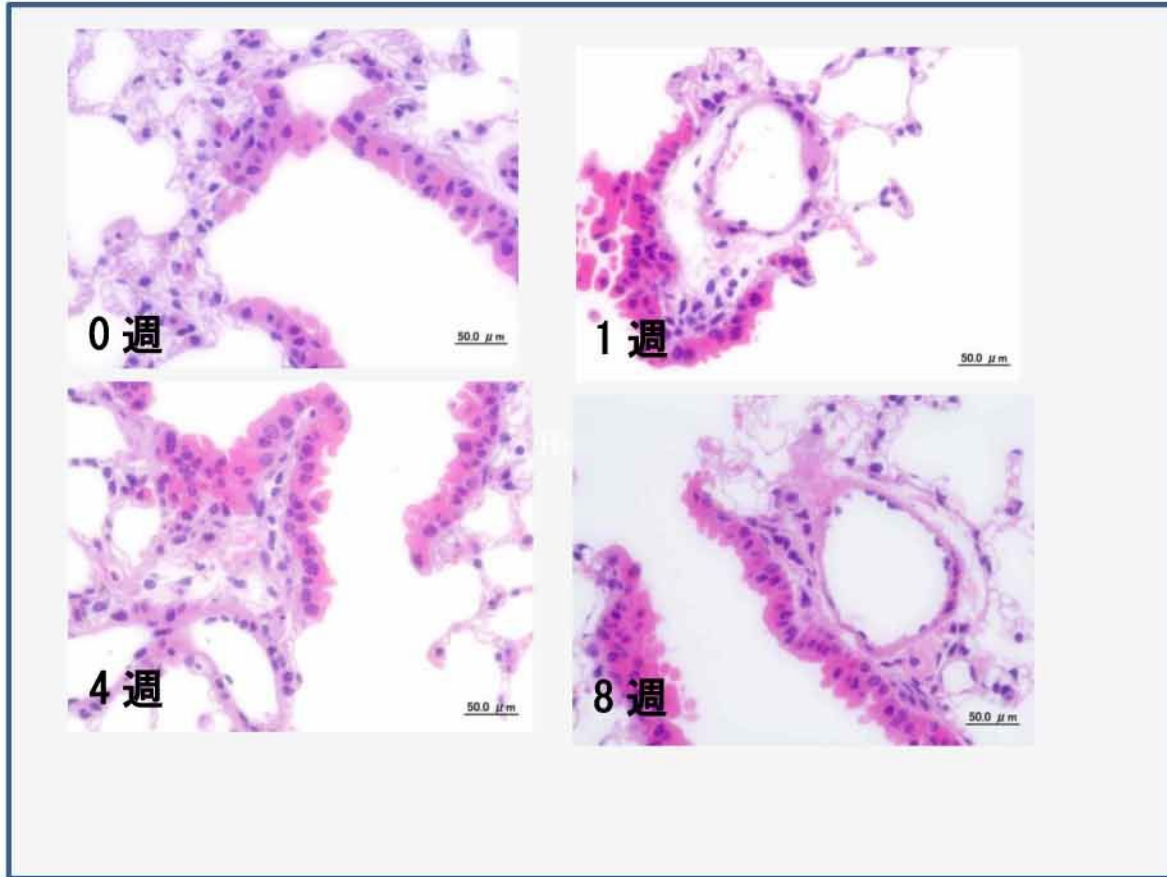


図 4 T-TiO₂ 吸入曝露群の病理組織像

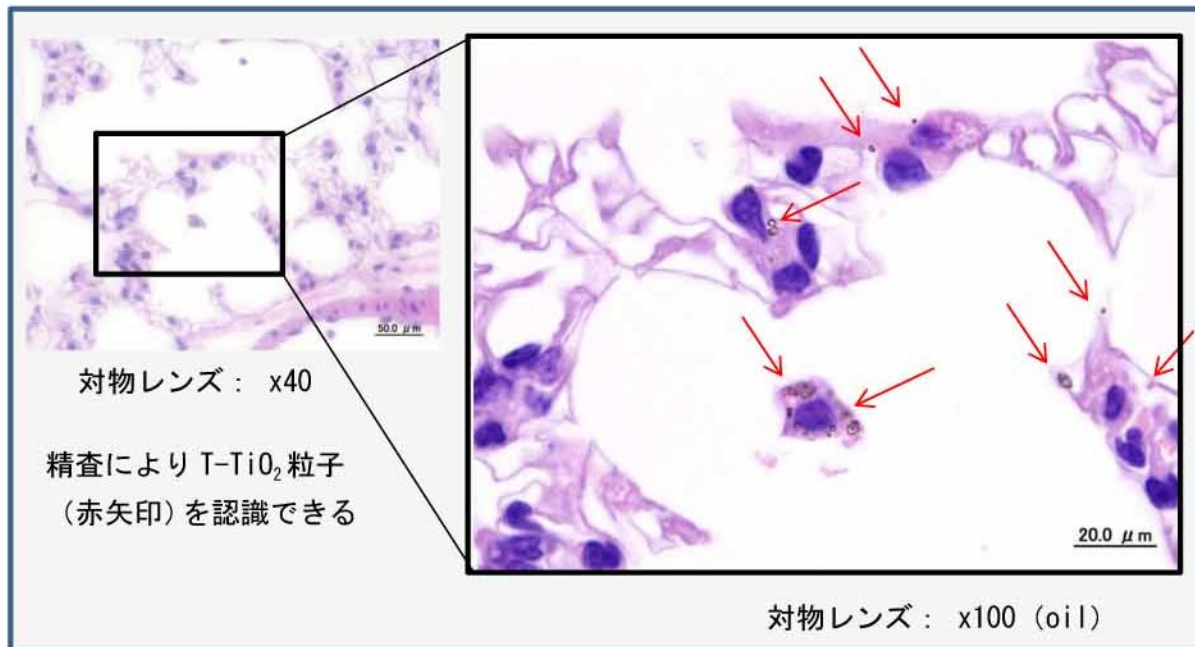


図 5 肺内の T-TiO₂

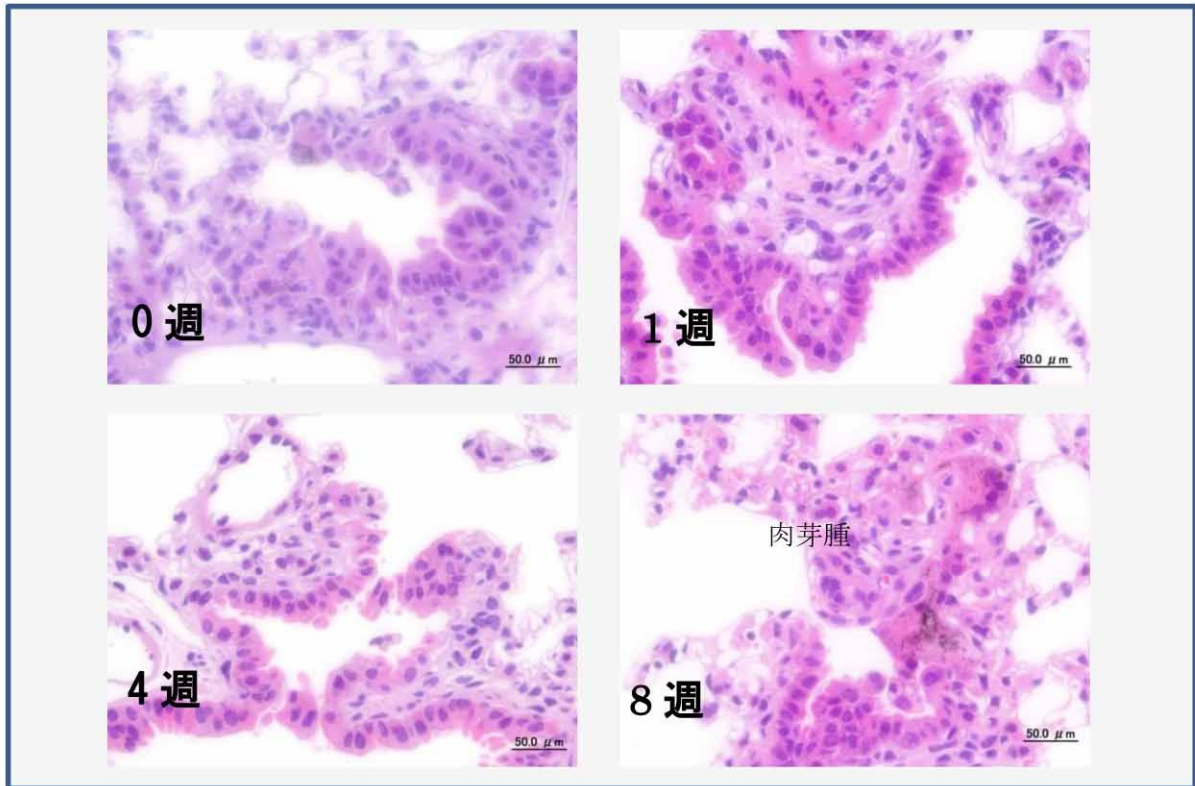


図 6 T-CNT7 吸入曝露群の病理組織像

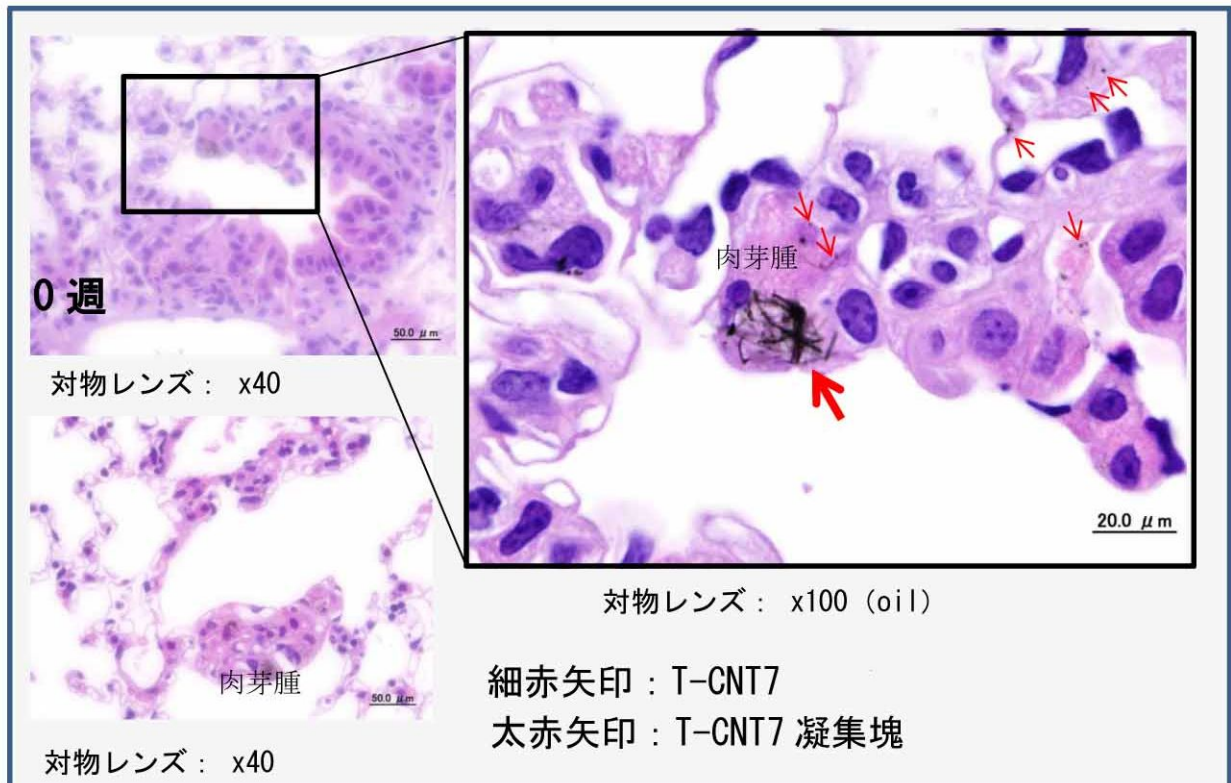


図 7 肺内の T-CNT7、肉芽腫形成

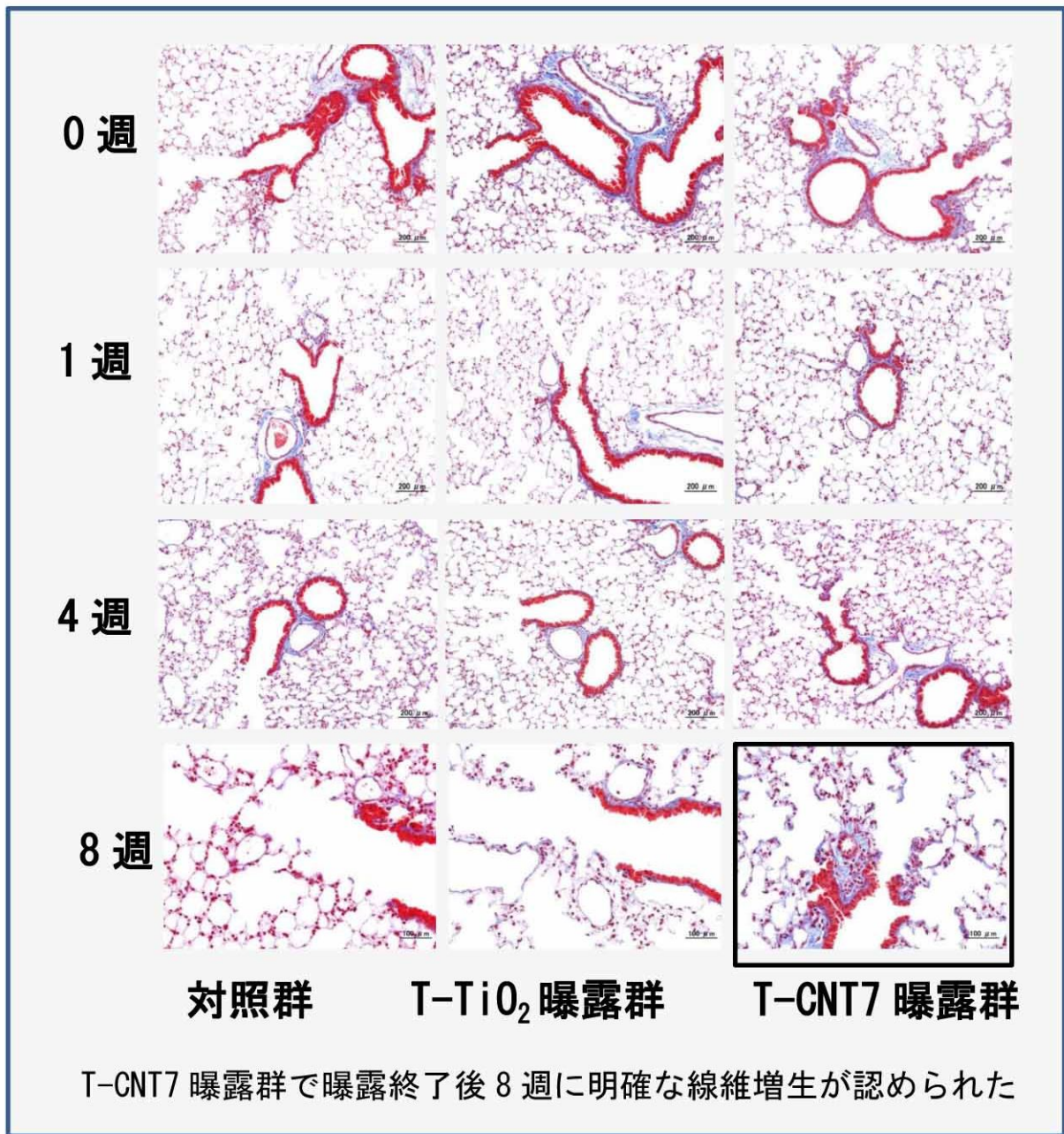


図 8 Masson trichrom 染色

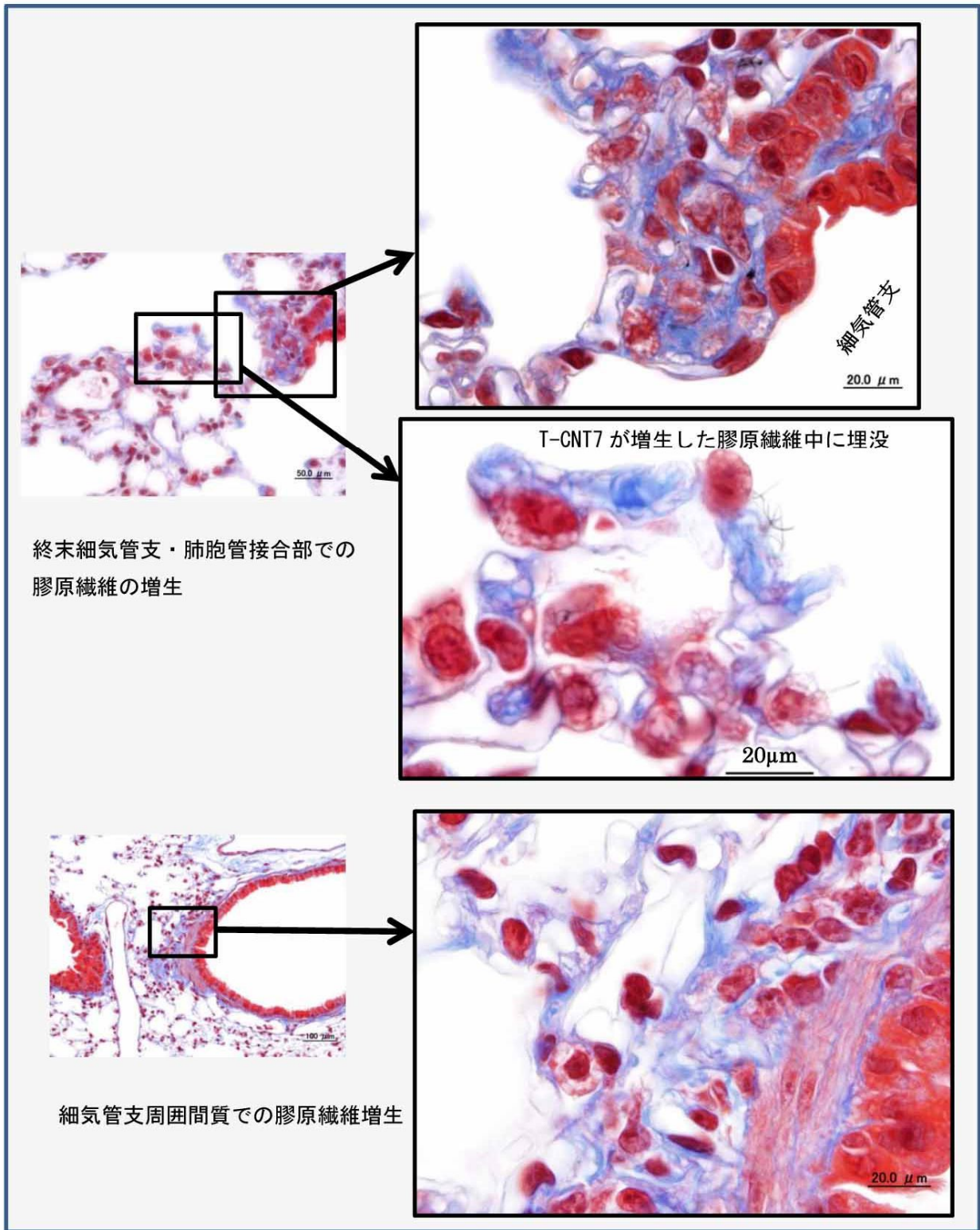
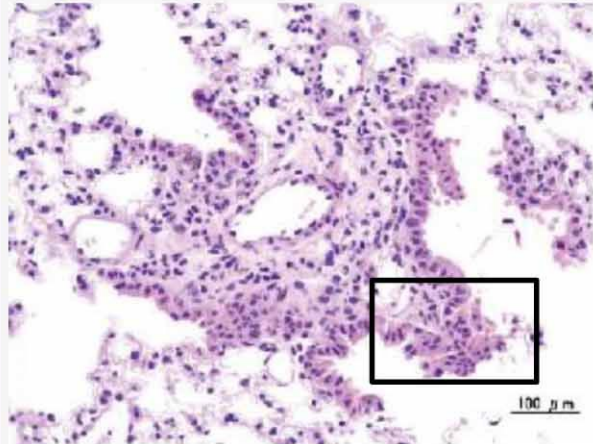
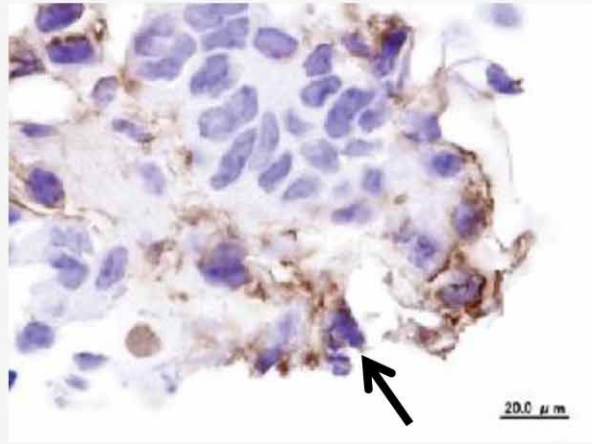


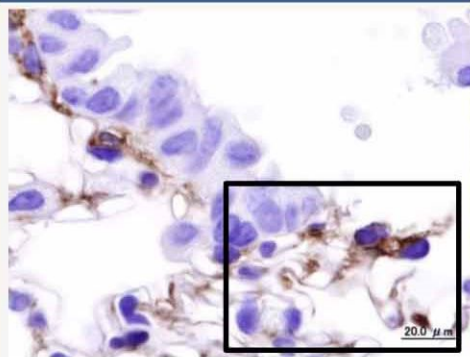
図 9 T-CNT7 曝露終了後 8 週での詳細観察
(Masson trichrom 染色)



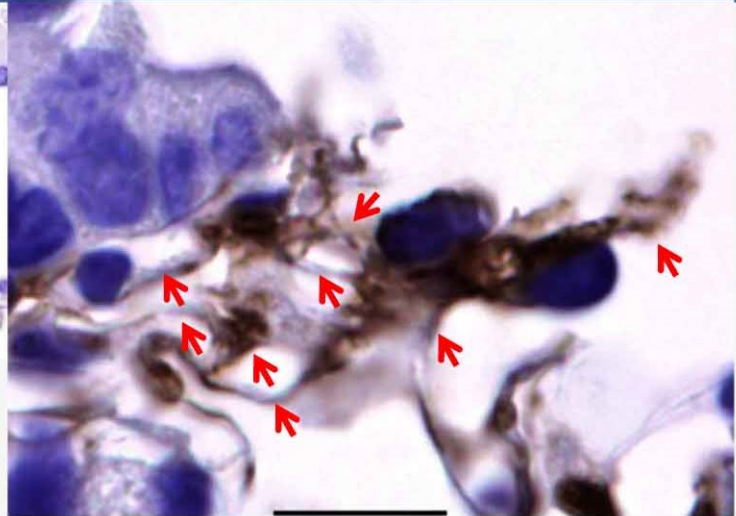
末梢気道周囲間質の肥厚
(HE)



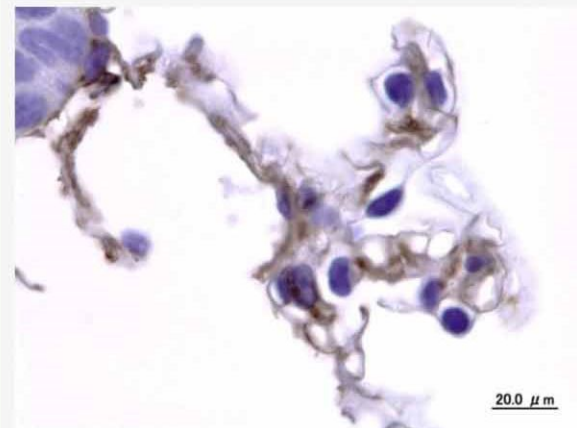
左枠内の vimentin 免疫



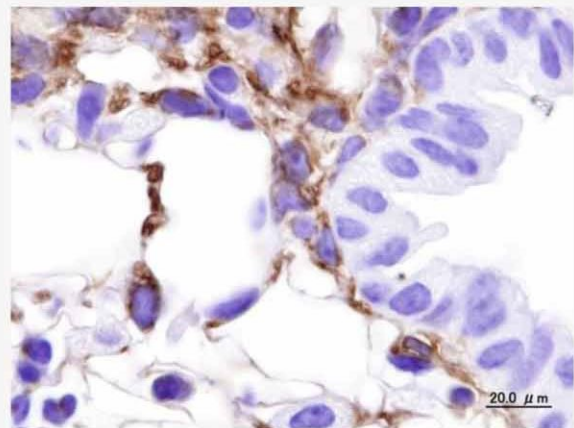
vimentin 免疫



赤矢印：vimentin 陽性の細胞突起が複雑に絡みあう。



vimentin 免疫



vimentin 免疫

図 10 T-CNT7 曝露群の詳細観察

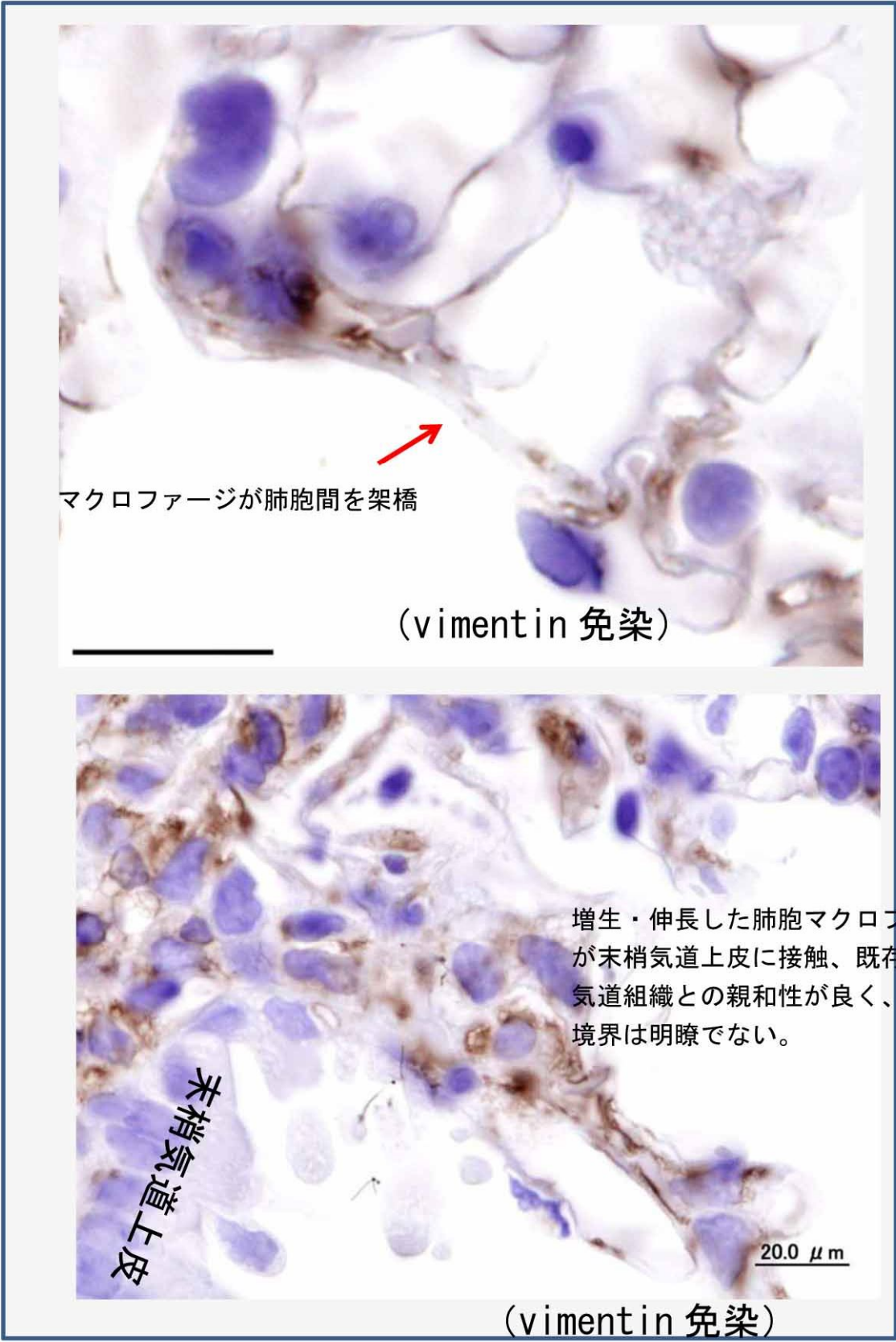


図 10 T-CNT7 曝露群の詳細観察 (続)

表 1 病理組織学的検査結果の総括

A T-TiO₂曝露群

病理組織所見 (所見の強さ 2+: 顕著、+: 軽微)	0 週	1 週	4 週	8 週
<T-TiO>				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の末梢気道				
T-TiO ₂ (非食食/食食)	+	+	+	+
T-TiO ₂ 食食マクロファージ	+	+	+	+
肉芽腫(T-TiO ₂ /T-TiO ₂ 食食マクロファージの集簇)				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の間質組織(血管/リンパ管周囲)				
T-TiO ₂ /T-TiO ₂ 食食マクロファージ				
肥厚				
線維増生				
● 肺胞				
T-TiO ₂ (非食食/食食)	+	+	+	+
T-TiO ₂ 食食マクロファージ	+	+	+	+
肉芽腫(T-TiO ₂ /T-TiO ₂ 食食マクロファージの集簇)				
肺胞壁の肥厚				
線維増生				

B T-CNT7 曝露群

病理組織所見 (所見の強さ 2+: 顕著、+: 軽微)	0 週	1 週	4 週	8 週
<T-TCNT7>				
● 終末細気管支・肺胞管接合部の末梢気道				
T-CNT7(非食食/食食)	2+	2+	2+	2+
T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肉芽腫(T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージの集簇)	2+	2+	2+	2+
● 終末細気管支・肺胞管接合部の間質組織(血管/リンパ管周囲)				
T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肥厚				2+
線維増生				2+
● 肺胞				
T-CNT7(非食食/食食)	2+	2+	2+	2+
T-CNT7食食マクロファージ	2+	2+	2+	2+
肉芽腫(T-CNT7/T-CNT7食食マクロファージの集簇)				2+
肺胞壁の肥厚				2+
線維増生				2+

気管支肺胞洗浄液の注入量と回収率

Day0	対照群		T-TiO ₂		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	2.0		2.0		2.0	
回収量(ml)	1.6	0.064	1.8	0.017	1.7	0.095
回収率(%)	78.7	3.215	90.5	0.866	87.3	4.726

1W	対照群		T-TiO ₂		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.3	0.085	1.4	0.025	1.3	0.060
回収率(%)	82.3	5.316	85.8	1.573	83.5	3.767

4W	対照群		T-TiO ₂		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.3	0.131	1.3	0.032	1.3	0.065
回収率(%)	80.0	8.197	83.5	2.009	81.5	4.067

8W	対照群		T-TiO ₂		T-CNT7	
	平均	SD	平均	SD	平均	SD
注入量(ml)	1.6		1.6		1.6	
回収量(ml)	1.2	0.248	1.4	0.060	1.4	0.046
回収率(%)	75.4	15.516	85.2	3.767	87.1	2.887

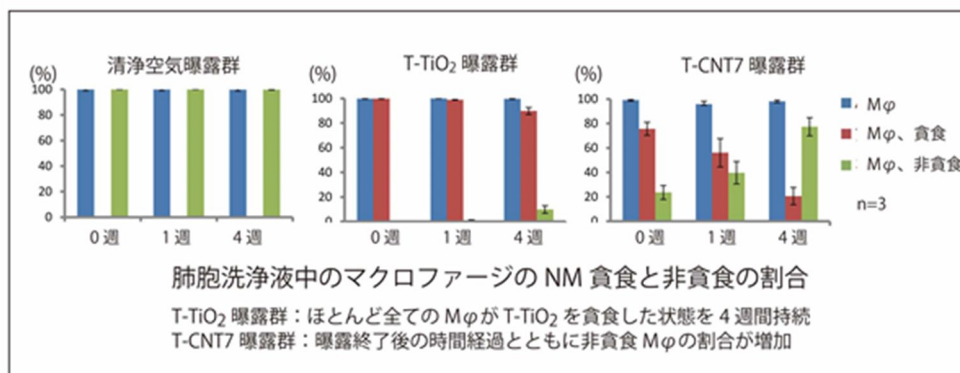
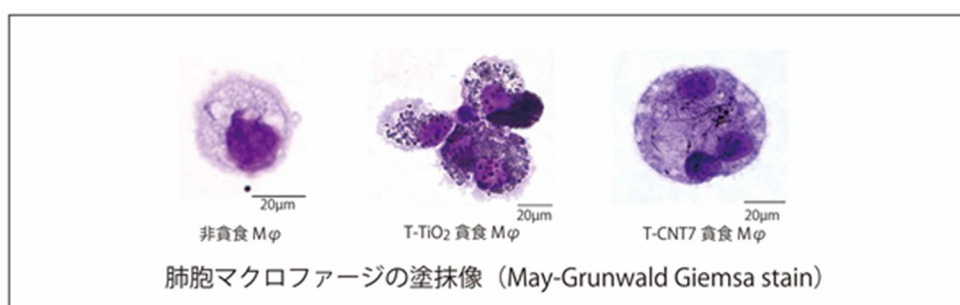


図 11 BALF マクロファージのNM 貪食と非貪食の割合

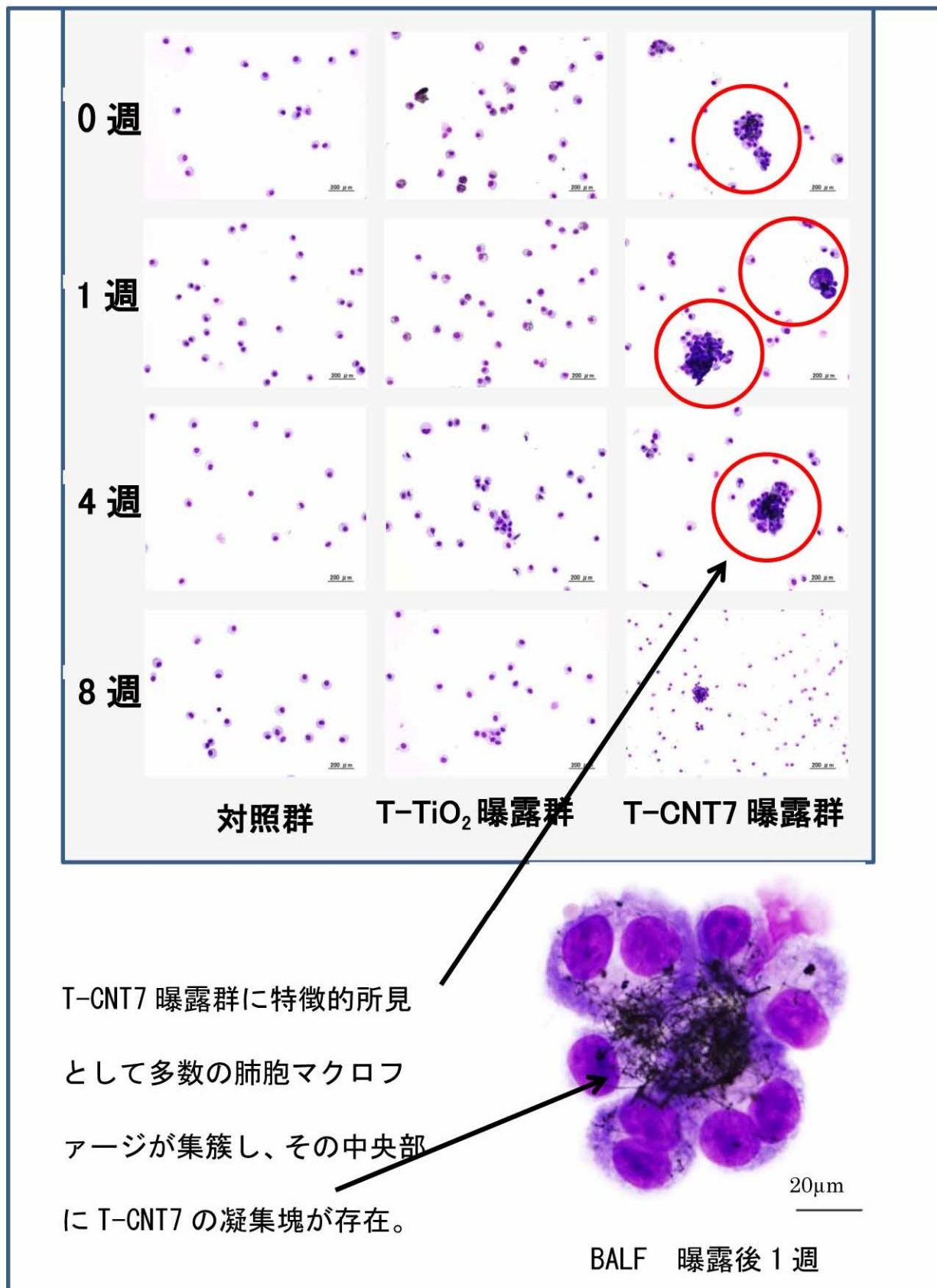


図 12 BALF 塗抹

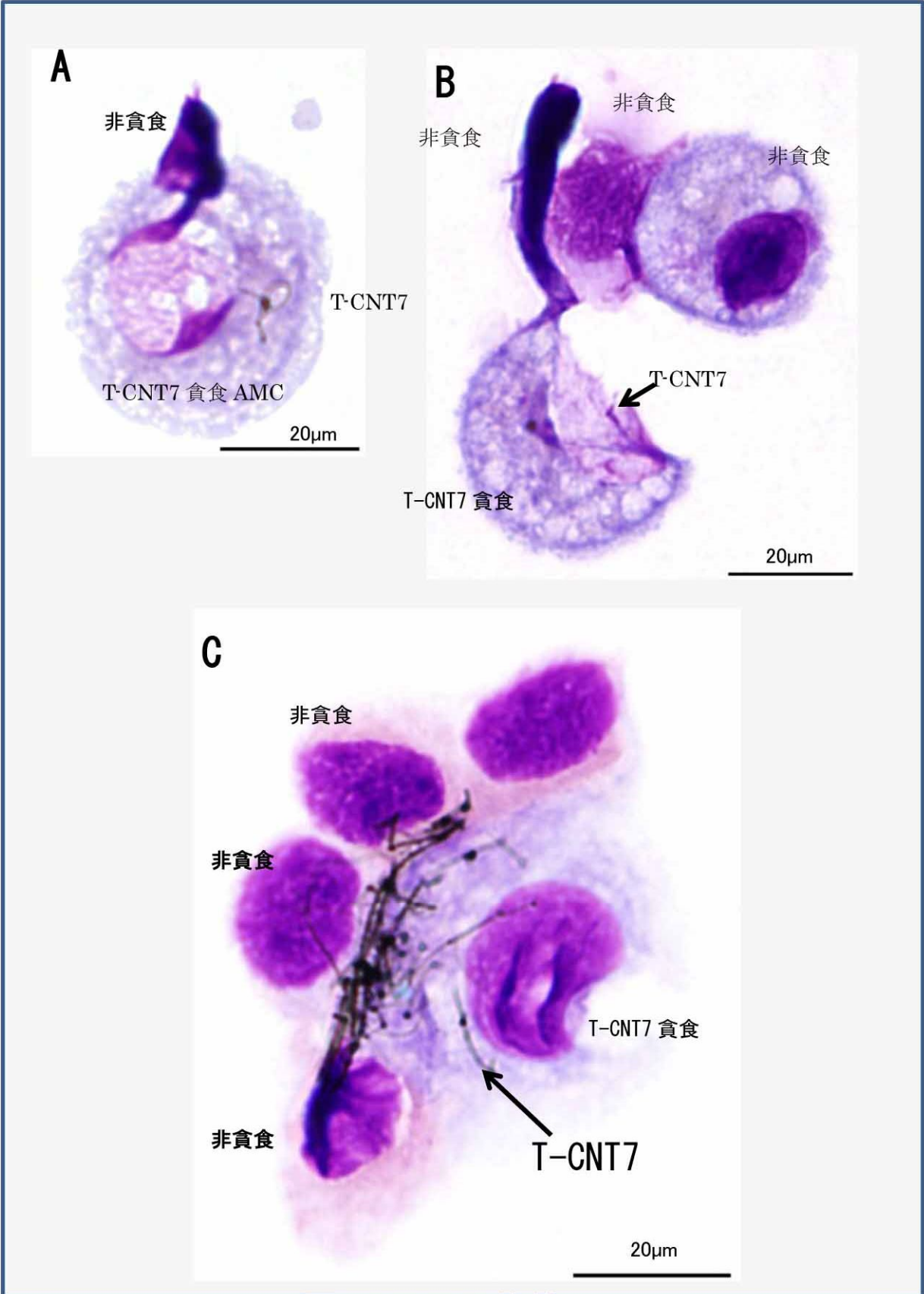
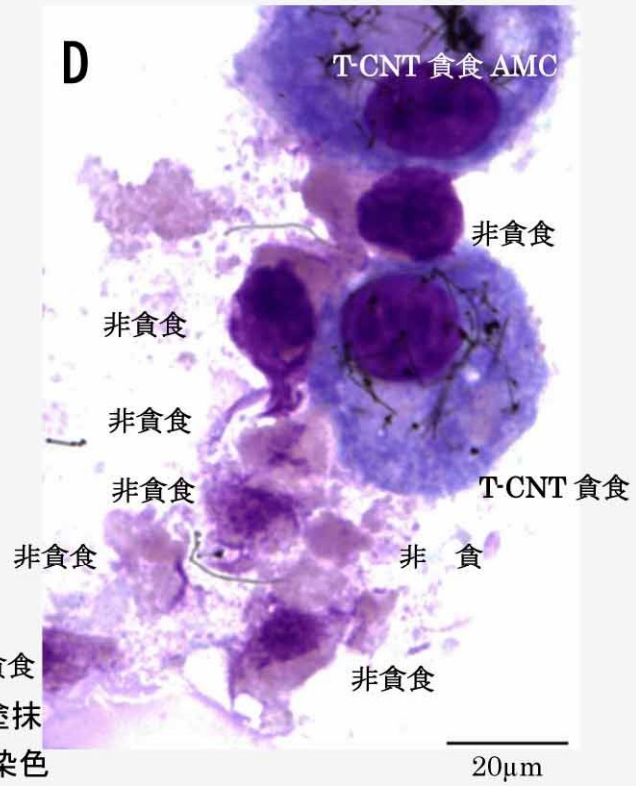
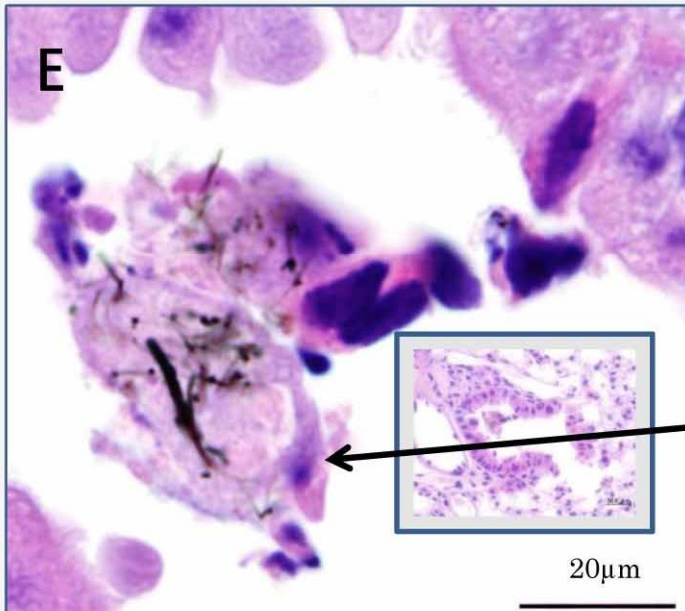


图 13 BALF 塗抹

- 肺胸腔内で T-CNT7 貪食 AMC と非貪食 AMC が鎖状に繋って伸長している可能性が示された



T-CNT7 曝露後 1 週の BALF 塗抹 AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色 photoshop で露出をアンダー (-90) に調整



T-CNT7 曝露後 0 週
パラフィン包埋、HE 染色



T-CNT7 曝露後 0 週の BALF 塗抹 AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色

図 13 BALF 塗抹

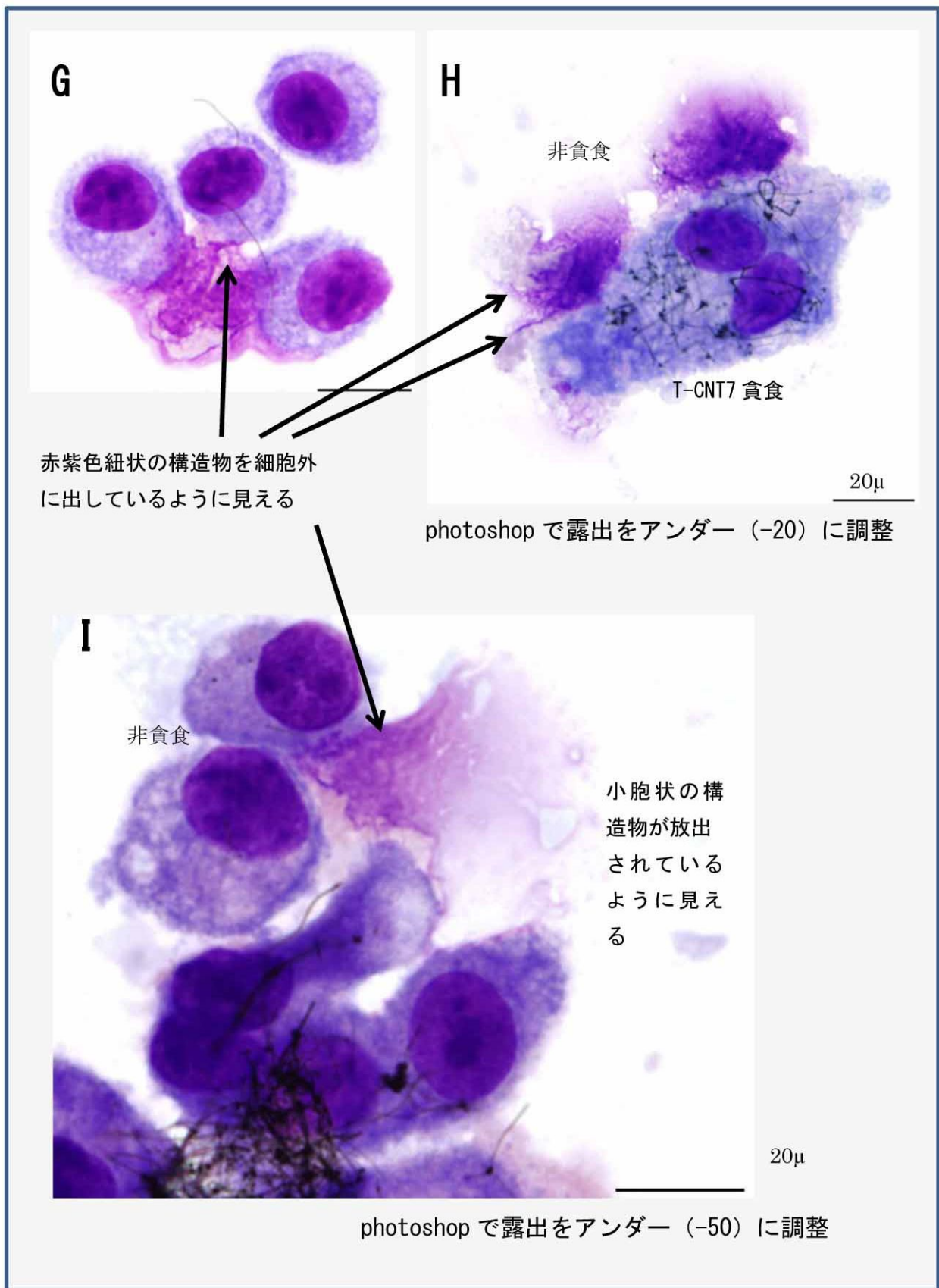
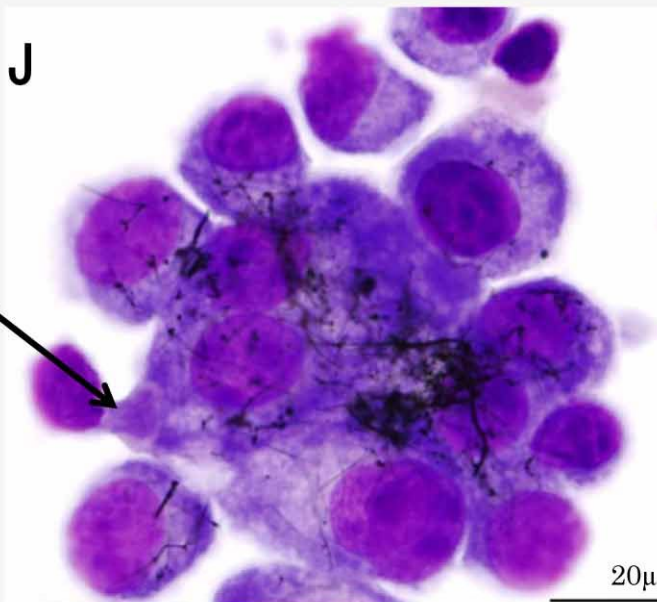
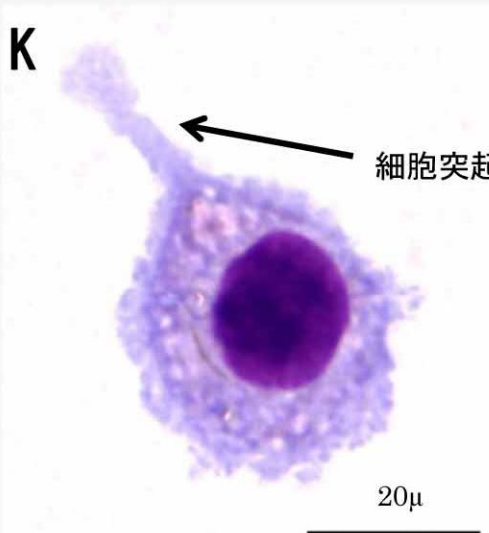


図 13 BALF 塗抹

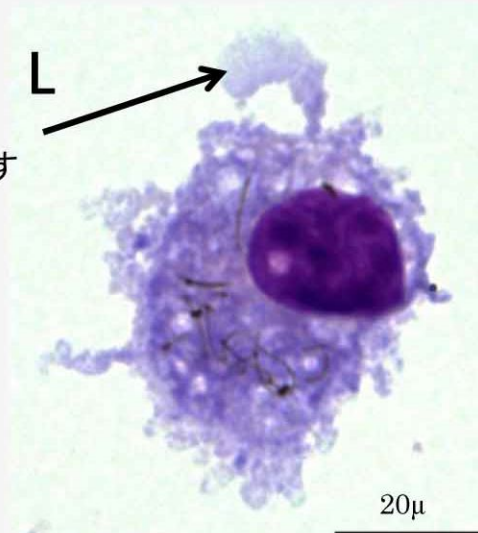
細胞突起を伸ばして他の肺胞マクロファージに接合する



T-CNT7 曝露後 1 週の BALF 塗抹
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色
photoshop で露出をアンダー (-20) に調整



T-CNT7 曝露後 4 週の BALF 塗抹
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色
photoshop で露出をアンダー (-20) に調整



T-CNT7 曝露後 4 週の BALF 塗抹
AMC、May-Grunwald-Giemsa 染色
photoshop で露出をアンダー (-90) に調整

図 13 BALF 塗抹

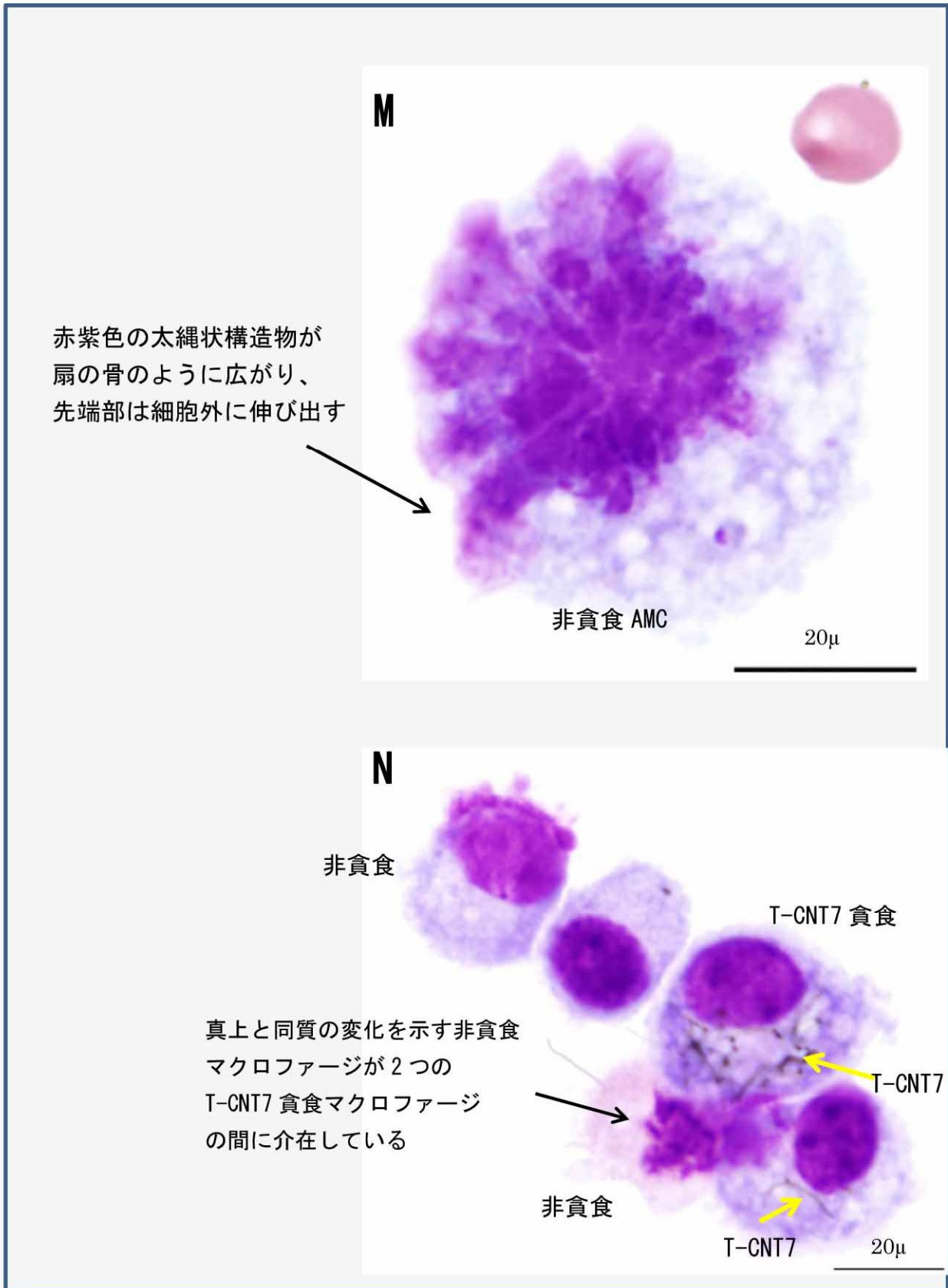


図 13 BALF 塗抹

気管支肺胞洗浄液塗抹

<T-CNT7>

貪食率： 0週でT-CNT7貪食マクロファージが80%、非貪食が20%程度
曝露後の時間経過とともに非貪食Mφの割合が増加

付記 10細胞以上のT-CNT7貪食マクロファージと非貪食マクロファージが接合した集合体
(中央部にT-CNT7の凝集塊が存在)

<T-TiO₂>

貪食率： ほとんど全てのマクロファージがTiO₂を貪食
0週～1週まで貪食率100%、4週に非貪食マクロファージロファジの比率増加

表2 気管支肺胞洗浄液塗抹検査結果の総括

平成30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	横田 理	同 主任研究官
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をサンプリングし研究協力者に提供することを担当した。H30年度は、粒状凝集のモデルとして AMT-600 (一次粒径 30 nm、テイカ、T-TiO₂)と、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を高分散処理(Taquann法)する際の濾過工程において、先行研究で使用してきた金属製フィルターよりも大きな目開き(53 μm)を使用することで粗大な成分の割合を多くした(T-CNT7#53)。吸入曝露実験には、先行研究において開発した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 ver.3.0)を用いた。動物は、C57BL/NcrSlc 雄性 12 週齢を使用し、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1、4 および 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。5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 34.8 ± 3.1 mg/m³、3.0 ± 0.1 mg/m³、平均 CPC カウントは、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 560,817 ± 56,441/cm³、1,449 ± 155/cm³であった。MMAD は T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ 893 ~ 1,060nm(σg:3.5 ~ 4.2)、522 ~ 1,114 nm(σg:5.3 ~ 7.9)であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移による吸入曝露が達成された。

A. 研究目的

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。

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 25 μm のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行った(以下、T-CNT7#25)。

引き続き H30年度では、「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン(AMT-600、テイカ)と、粗大な成分が多いと想定される MWNT-7を 53 μm のメッシュで濾過した検体を使用した。

検体は、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 ver.3.0)を用いて吸入曝露を行った。動物は、C57BL/NcrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度を、二酸化チタンは 30 mg/m^3 、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 $^{\circ}\text{C}$ 、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)。

本分担研究で使用した二酸化チタン及び MWNT-7 ともに Taquann 法処理を行った。

(1) 二酸化チタン

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

以下の性状はテイカ株式会社のウェブサイトの情報である。

結晶形	アナターズ
TiO ₂ 含量	98%
一次粒径	30 nm
pH	弱酸性
比表面積	52 m ² /g

二酸化チタンは、ガラス製メディウム瓶内で TB と混合し 1 mg/mL の懸濁液とした。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz) に 15 分静置して分散処理を行い、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μm) で濾過した。濾液を液体窒素で凍結・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 を昇華させて乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理を行った二酸化チタンを T TiO₂ と記載する。

(2)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	繭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バ

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に行った。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 53 μm) 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。

H29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用いているが、H30 年度ではタングル状成分が多いと想定される目開き 53 μm の金属製フィルターを用いた。以下、目開き 25 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と記載する。T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状については、予備試験において、曝露チャンバー内のエアロゾルをアルミナフィルター (ワットマン、孔径 0.02 μm、25mm, Anodisc) に吸着させてサンプリングし、オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間オスミウムコートを行い走査型電子顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で 2,500 倍、加速電圧 2~2.8kV の条件で観察した。

B-2.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

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージと PET 製インナーケージを使用した。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 (RAIR HD SUPER MOUSE 750™

個別換気式飼育装置(特型)を使用した。飼育条件は、温度;25±1、湿度;55±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。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェファードシヤック(Shepherd Specialty Papers社)をケージ内に設置した。

(3)群構成

対照群、T-TiO₂群(目標濃度30 mg/m³)、T-CNT7#53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25匹であることから、各群を25匹のサブグループ(Sub-group A、Sub-group B)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Ver3.0を使用した(共同開発 柴田科学株式会社)(図3)。

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。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25 mL、内寸:直径20 mm高さ80 mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている(図4)。

カートリッジへの検体の充填は、T-TiO₂では1mg/mLの懸濁液13mLを各カートリッジに、T-CNT7#53では0.05 mg/mLの懸濁液を各カートリッジに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。すなわち、T-TiO₂は13 mg/カートリッジ、T-CNT7#53では0.5 mg/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:43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端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32.5 L/min(基礎換気流量;29.5 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4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30本のカートリッジを使用した。なお、Ver.2.5までは手動にてカートリッジの交換、噴射を行っていたが、Ver3.0からは完全自動化されている。

曝露チャンバー内の温度、湿度並びに圧力変動を曝露時間の2時間を通してモニタリングした。

(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、Ver3.0用に改変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、メインチャンバー内に設置した円筒形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25匹収容が可能である。曝露チャンバーはアクリル製のアウターチャンバーとPET樹脂で作製したインナーチャンバー(直径660 mm、高さ477 mm)の二重構造となっており、検体

が触れるインナー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。メインチャンバーの上部は円錐状となってサブチャンバーに接続されており、メインチャンバーの気積 179 L である。

(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エアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 (mg/m^3) 測定を並行して行った。

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。

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。

先行研究において、CPC による MWCNT の測定では 1×10^3 個/mL 程度の粒子数測定であっても、一時的に低値で推移することが散見されたことから、T-CNT7#53 群では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。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 100 nm 程度であるが、繊維長は 10 μm を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

T-TiO₂ 群では、目標濃度が CPC の測定上限を超えると想定されることから、15 倍希釈して測定を行った。

また、質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi 55$ mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダ - ガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、 $\phi 55$ mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 99.9%、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 L/min \times 120min = 180 L から 1 m^3 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。

(7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、二つの方法で実施した。一つは、T-TiO₂ と T-CNT7#53 とともに Micro-Orifice Uniform Deposit Impactors (MOUDI) を用いた Mass Median Aerodynamic Diameter (MMAD) である。10 L/min の流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Model 125 Nano MOUDI、KANOMAX、分級サイズ; No.1; 10 μm 、No.2; 5.6 μm 、No.3; 3.2 μm 、No.4; 1.8 μm 、No.5; 1.0 μm 、No.6; 0.56 μm 、No.7; 0.32 μm 、No.8; 0.1 μm 、No.9; 0.10 μm 、No.10; 0.056 μm 、No.11; 0.032 μm 、No.12; 0.018 μm 、No.13; 0.01 μm) に導いた。吸引時間は T-TiO₂ では 10 分、T-CNT7#53 は 20 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50 のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

もう一つの方法は、粒子の電気移動度によって測定する Scanning Mobility Particle Sizer (SMPS、Model 3034、サンプリング流量: 1.0 L/min、TSI、MN、USA) である。SMPS は粒子径の測定範囲が 10~500 μm であるため、T-TiO₂ のみを対象とした。エアロゾル濃度が SMPS の測定上限を超える濃度と想定されるため、25 倍希釈して測定を行った。

エアロゾルの粒度分布測定は、測定機器の数が限られること、曝露チャンバーの気積が約 180L と比

較的小さいため、測定機器のサンプリング流量を加味した流量調整が必要となることから、測定回数を限定して行った。具体的な曝露実験とエアロゾル測定スケジュールを表 2 に示した。

(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 週間 (1W)、4 週間 (4W) 及び 8 週間 (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、喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、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。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、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。流量は点滴調節器により適宜調節した。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

実験施設内で実施しており、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#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状
アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 ($51 \mu\text{m} \times 38 \mu\text{m}$) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。その結果、Aggregates の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 0.5 個/視野、1.4 個/視野、Agglomerates の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 1.5 個/視野、4.1 個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 よりも Aggregates および Agglomerates の数が多く観察された。一方、Aggregates と Agglomerates の比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ 25% と 75% と同じ割合であった (図 5)。

(2) T-TiO₂ 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 6)。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-TiO₂ の 5 日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度 (Sub-Group A × 5 回、Sub-Group B × 5 回、計 10 回) は $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 ± SD) であった。平均 CPC カウント (同 10 回) は $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 ± SD) であった (図 7、図 8)。

MMAD は $893 \sim 1,060 \text{ nm}$ (σ : 3.5 ~ 4.2) であり、全体の平均 (5 回) は、 975.3 nm であった (図 8)。

SMPS の測定では、1 回の吸入曝露実験で約 30 のデータが生成され、合計 150 程度のデータが得られたが、ほとんど同様の値を

示していた。代表例として、Sub-Group Bの三回目のデータを示した(図8)。粒子径の中央値は149.4 nm、平均値は177.6 nm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、390 mgである。2時間の曝露チャンバーの総換気量は3.9 m³であることから名目上の濃度は100 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度の平均は34.8 mg/m³から、エアロゾル化効率を計算すると34.8%であった。

(3) 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6)。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全体の平均質量濃度(Sub-Group A×5回、Sub-Group B×5回、計10回)は3.0±0.1 mg/m³であった。平均CPCカウント(同10回)は1,449±155/cm³であった(図9、図10)。

MMADは522~1,114 nm(σg:5.3~7.9)であり、5回の平均は、788.2 nmであった(図10)。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、15 mgである。2時間の曝露チャンバーの総換気量は3.9 m³であることから名目上のエアロゾル濃度は3.8 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度の平均値3.0 mg/m³から、エアロゾル化効率を計算すると78.9%であった。

(4) 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。

Taquann法では、大型の凝集体を除去するため金属製フィルターにて濾過する工程がある。これまで、目開き25 μmのフィルターを用いてきたが、今年度の研究では、より荒い検体を目開き53 μmのフィルターを用いた。実際にエアロゾル化した粒子の形状を観察した結果、T-CNT7#53はT-CNT7#25に比較して、タングル状の成分が含まれていたが、その比率は同じであった。タングル状成分はマクロファージに貪食された際に、毛玉状に凝集することが想定されるため、T-CNT7#25とは異なった影響を示す可能性がある。

Taquann吸入曝露装置は、Ver3.0を使用した。Ver2.5からの主な改良点は、カートリッジの装填・噴射の自動化、カートリッジへの圧縮空気注入方向をカートリッジ後方から前方へ変更、カートリッジをインナーカートリッジとアウターカートリッジの二重構造に変更、マウスの収納匹数を16匹から25匹へ増加、メインチャンバーの昇降に空気圧と金属バネを用いたサポートシステムの導入、である。Ver2.5以前は実験者が時間を確認しながら手でカートリッジの装填・噴射を行っていたが、Ver3.0で完全に自動化されたことから、実験者の負担が減り、より多くのカートリッジを使用することが可能となった。そのため、酸化チタンのように比重の大きな検体でも噴射インターバルを短くすることにより安定したエアロゾルの発生が可能となった。

カートリッジの二重構造化は、コストダウンと検体調製の効率化に大きく寄与した。カートリッジへの検体充填作業のボトルネックは溶媒回収型真空ポンプを使用した乾燥過程である。多数のカートリッジを準備することができれば効率的な充填作業、短いインターバルでのエアロゾル発生、並びにより長い曝露時間を設定することが可能となる。Ver3.0のインナーカートリッジは検体の充填を担う部分であり、ステンレス製

の単純なチューブ構造である。そのため、大量生産が可能となりコストダウンが図れた。アウターカートリッジは噴射部分を担う。この部分は構造が複雑であるため高価であるが、噴射終了後にインナーカートリッジを交換することで使いまわしが可能である。

MWCNT に関しては、カートリッジへの圧縮空気噴射方向を見直しはエアロゾル発生効率の向上に寄与したと考えられる。Ver2.5までのカートリッジでは、MWNT-7 のエアロゾル化効率は 40%程度であるが、Ver3.0 では 80%程度とこれまでの 2 倍の効率を得られた。Ver2.5 までのカートリッジは、後方から圧縮空気を注入するため、圧縮空気が直接吹き付けられないスライドバルブの上部に検体の残存が散見されていた。Ver3.0 では前方からインナーカートリッジの底に向けて圧縮空気を注入するため、すべての検体に均等に圧縮空気を吹き付けることが可能となり、エアロゾル化の効率が向上したと考えられる。

酸化チタンに関しては、Ver2.5 でのエアロゾル化効率は 35%程度であり、Ver3.0 での向上は見られなかった。その理由には 2 つの理由が考えられる。一つは、酸化チタンは MWCNT に比較して金属面に付着しやすく、また微細な粒子であるため、加圧によって凝集しやすい。全ての検体に上方から均等に加圧空気が吹き付けられると、インナーカートリッジの中心に位置する検体はインナーカートリッジの底面に押し付けられることによって凝集し残存する可能性が考えられる。実際に、インナーカートリッジの底部に酸化チタンは検体の残存がみられた(MWCNT には残存が認められない)。そのため、乱流が生じるように圧縮空気の吹き出し口を非対称に加工することで改善できるかもしれない。もう一つの理由は、粒子の比重が大きいため、沈降速度が速く、サブチャンバー内でトラップされる割合が多い可能性がある。実際に、サブチャンバーの内面には多く検体が付着している様子が見られた。この粒子は、比較的、粒径が大きいと想定されることから、本研究の目的とする高分散検体を動物に曝露するという目的は達成されていると考えられる。

Ver3.0 におけるこれらの改良点は、実験者の負担

を減じ、効率的な吸入曝露実験の実施が可能となった。

E. 結論

一次粒径 30 nm の酸化チタンを 25 μm のフィルターで濾過し Taquann 法処理した検体 (T-TiO₂)、及び MWNT-7 を 53 μm のフィルターで濾過し Taquann 法処理した検体 (T-CNT7#53) をマウス 5 日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $3.0 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは、T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ 、 $1,449 \pm 155/\text{cm}^3$ であり実験期間を通して安定した濃度推移が得られた。MMAD は T-TiO₂ 群、T-CNT7#53 群それぞれ $893 \sim 1,060 \text{ nm}$ ($\sigma_g: 3.5 \sim 4.2$)、 $522 \sim 1,114 \text{ nm}$ ($\sigma_g: 5.3 \sim 7.9$) であった。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

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats. Arch Toxicol. 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R,

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

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. Cancer Sci. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

2. 学会発表

高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー：肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性：肺毒性を中心として、第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、2018.7.17（大阪）

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18（大阪）

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18（大阪）

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

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi,

Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

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

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

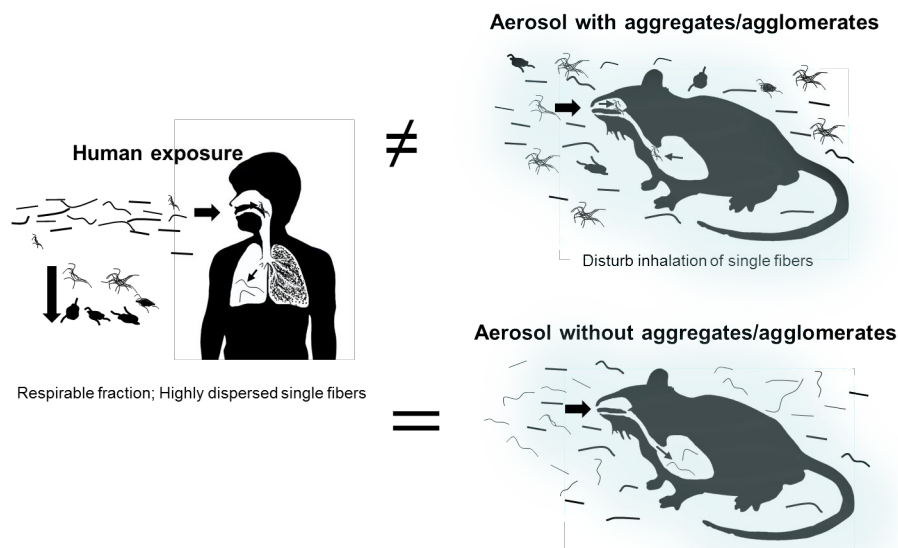


図1 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価方法

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パ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。

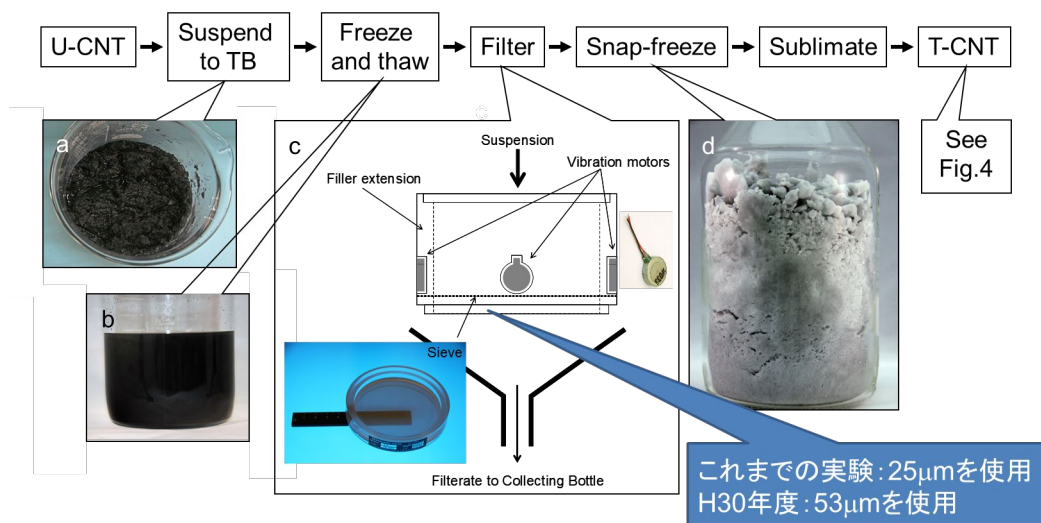


図 2 Taquann 法の概要

(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 をシャー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) 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 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。H30 年度は、目開き $53\text{ }\mu\text{m}$ の金属製フィルターを用いた。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure				
		N	Day 0	1W	4W	8W
Control 0 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
AMT-600 30 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
MWNT-7 #53um 3 mg/m ³ 2hr/D/W×5W Total 10hr	- Lung Burden	12	3	3	3	3
	- Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
	- Immune function					
	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)	24	6	6	6	6
	Pulmonary interstitium mRNA					
	Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	Consist of two sub-groups, A&B			
Total number of animals		144				

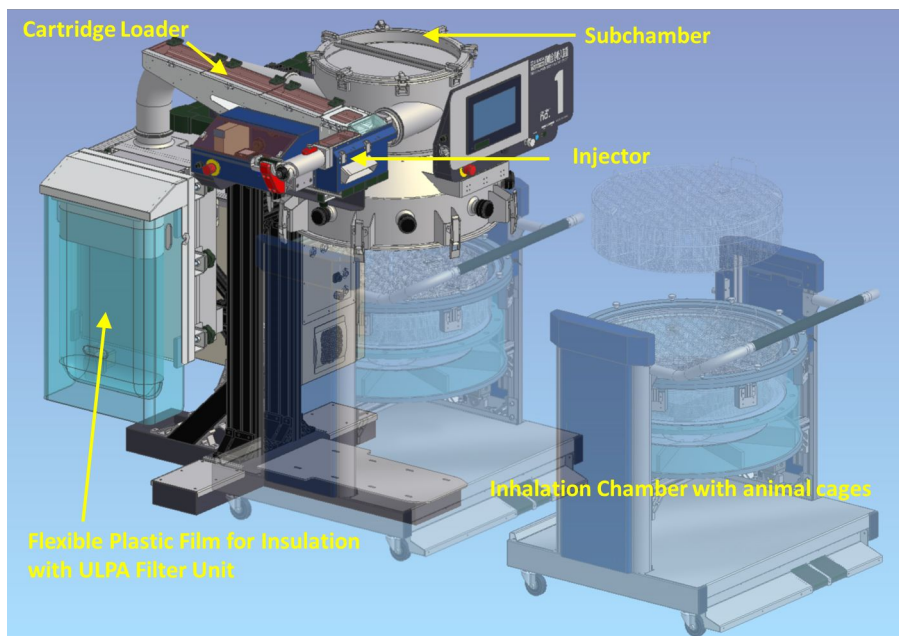


図3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 3.0)

噴射装置は、サブチャンバー（容量：43 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側方に煙突状のダクトを設け、その先端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、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。



図4 Taquann 直噴全身曝露吸入装置のカートリッジ

検体を収容するインナーカートリッジ（容量：25 mL、内寸：直径 20 mm 高さ 80 mm）はステンレス製であり、これを樹脂製のアウトターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズ

ルと、エアロゾル噴出孔が設計されている。

表 2 曝露実験とエアロゾル測定スケジュール

Group	Sub-Group A	Sub-Group B
	Tuesday	Wednesday
Control	CPC	CPC
T-TiO ₂	Mass Concentration	Mass Concentration
	CPC	CPC
	MOUDI	SMPS
T-CNT7#53	Mass Concentration	Mass Concentration
	CPC	CPC
		MOUDI

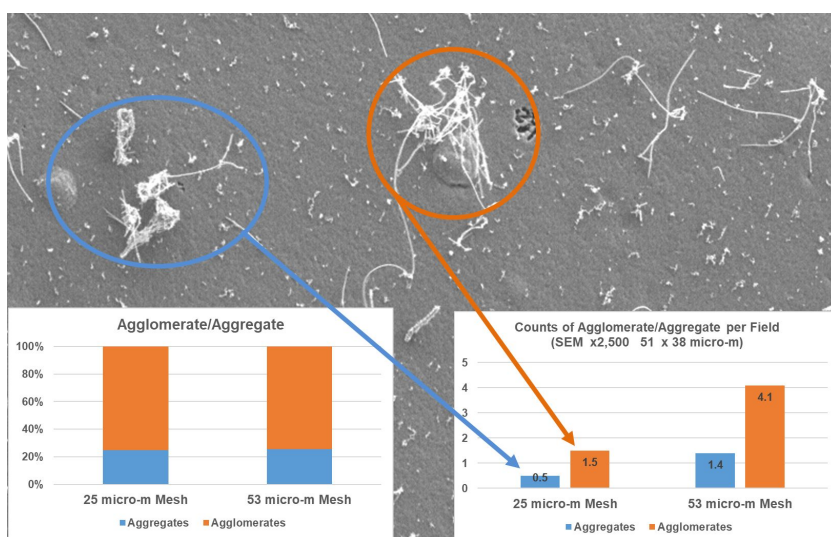


図 5 T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状比較

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 (51 μm × 38 μm) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。

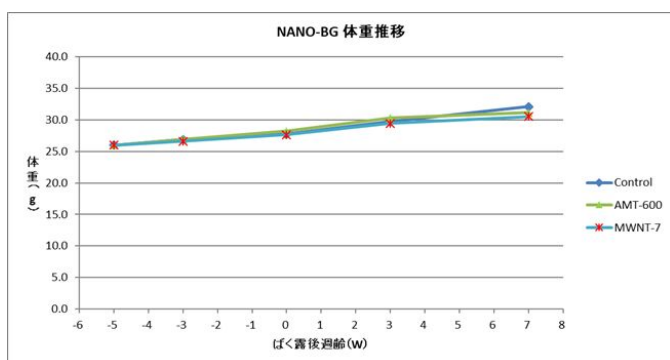


図 6 吸入曝露後の体重推移

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。

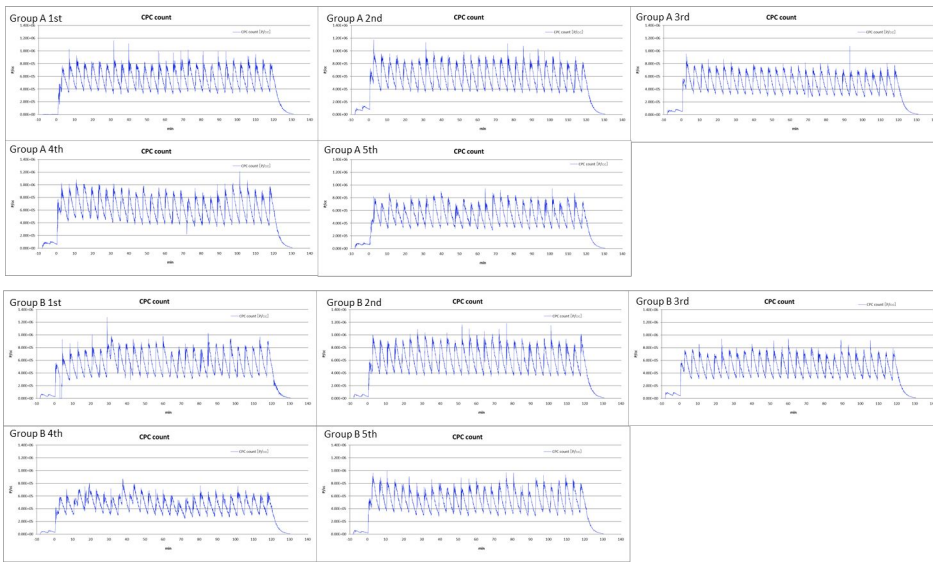


図7 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化

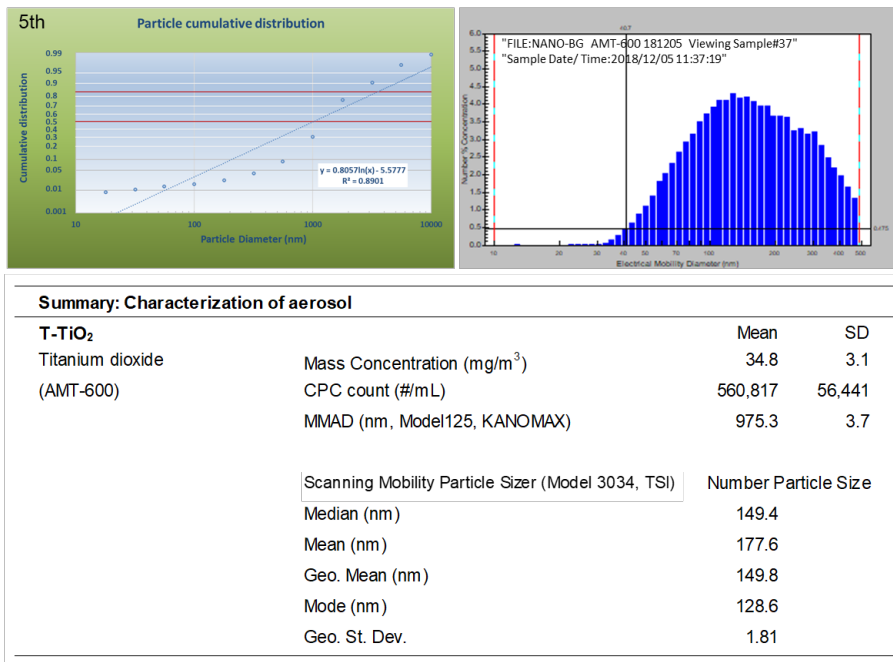


図8 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

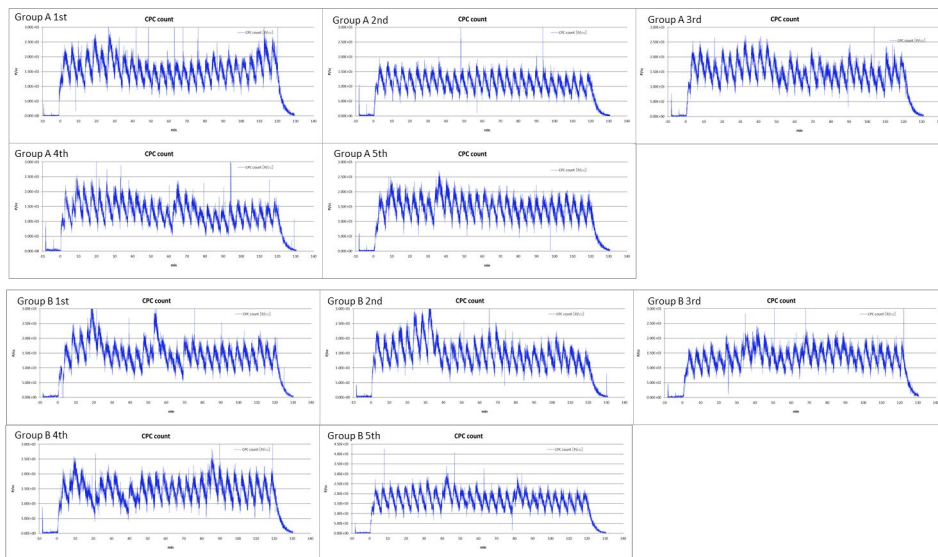
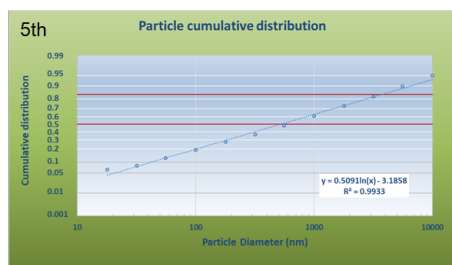


図9 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



Summary: Characterization of aerosol			
T-CNT7#53		Mean	SD
MWCNT	Mass Concentration (mg/m ³)	3.0	0.1
(MWNT-7 53 μm Mesh Filtered)	CPC count (#/mL, Model3776,TSI)	1,449	155
	MMAD (nm, Model125, KANOMAX)	788.2	7.0

図10 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

平成 30 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: ナノマテリアル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

ナノマテリアルの曝露による肺内のナノマテリアルの負荷量の測定は、ナノマテリアル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カーボンナノチューブ(T-CNT7)及び酸化チタン(T-TiO₂)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 または T-TiO₂ の負荷量を測定することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。その結果、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、3 mg/m³ 曝露において 29.04 ± 6.16 μg/g、21.33 ± 2.01 μg/g、13.68 ± 1.62 μg/g 及び 8 週目では 9.15 ± 2.17 μg/g であり、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/3 の減衰傾向であった。また、Taquann 法にて分散処理を施した T-TiO₂ の全身吸入曝露により、肺内の T-TiO₂ を原子吸光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 TiO₂ の負荷量は、30 mg/m³ 曝露において 150.11 ± 9.05 μg/g、112.47 ± 13.94 μg/g、63.05 ± 7.21 μg/g 及び 8 週目では 25.85 ± 11.36 μg/g であり、曝露直後に比較して 8 週後の負荷量は約 1/6 の減衰傾向であり、T-CNT に比較して T-TiO₂ の肺負荷量の減衰傾向は大きかった。

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、曝露したナノマテリアル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、ナノマテリアルの生体影響を評価することである。

平成30年度の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(T-CNT7)または酸化チタン(T-TiO₂)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

B-1: 試験材料

B-1-1: 多層カーボンナノチューブ(T-CNT7)

試薬名: T-CNT7

前処理: Taquann 処理 (53μm メッシュ使用)

保管条件: 室温

B-1-2: 酸化チタン(T-TiO₂)

試薬名: T-TiO₂

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:T-CNT7

B-2-1-1：高速液体クロマトグラフ(HPLC)

メーカー：ウォータース

形式：Acquity UPLC

B-2-1-2：電子天秤

メーカー：(株)日本シイベルワグナー

形式：AE163

B-2-1-3：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-2-1-4：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-2-1-5：超音波分散機

メーカー：タイテック株式会社

形式：VP-30S

B-2-2: T-TiO₂

B-2-2-1：原子吸光光度計

メーカー：日立製作所

形式：Z-5010

B-3：試薬

B-3-1：T-CNT7

B-3-1-1：アセトニトリル

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：HPLC 用

B-3-1-2：メタノール

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：HPLC 用

B-3-1-3：Benzo[ghi]perylene(BgP)

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：試薬特級

B-3-1-4：TWEEN 80

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

B-3-1-5：水酸化カリウム

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：試薬特級

B-3-1-6：ドデシル硫酸ナトリウム

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：試薬特級

B-3-1-7：EDTA 2 Na

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：試薬特級

B-3-1-8：アスコルビン酸ナトリウム

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：試薬特級

B-3-1：T-TiO₂

B-3-1-1：濃硫酸

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

形式：特級

B-3-1-2：硝酸

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

B-3-1-3：超純水

メーカー：富士フイルム和光純薬株式会社

B-4：測定条件

B-4-1：T-CNT7

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 mmφ

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-4-2：T-TiO₂

測定機器：日立製作所 Z-5010 原子吸光光度計

原子化法：グラファイトアトマイザー

使用ガス：アルゴン

吸収波長：チタン；364.3nm

原子化温度：2700

試料注入法：オートサンプラー

試料注入量：10 μL

B-5：溶液調製

B-5-1：T-CNT7

B-5-1-1：組織溶解液の調製

あらかじめ 80 ℃ に加温した超純水 140mL に 10g の KOH を加えた。その溶液に 1%SDS 水溶液 20mL 及び 1%EDTA2Na20mL をそれぞれ加えた。その後、アスコルビン酸 4g 添加し、超純水で 200mL にメスアップし、80 ℃ で加温することにより溶解状態とし、組織溶解液を調製した。

B-5-1-1：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、0.1% Tween 水溶液 (Tw-sol) 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 回繰り返し、最後に Tw-sol で 100 mL にメスアップした。その溶液を超音波分散機により 1 分間、超音波分散した。(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た。

B-5-1-2：検量線溶液 C5 の調製

B-5-1 項で調製した T-CNT7 原液 0.2 mL を 15 mL 容のフタ・メモリ付の PP チューブに採取し、Tw-sol により 10 mL にメスアップし、1 分間超音波分散した。(検量線溶液 C5：1 µg/mL)

B-5-1-3：検量線溶液 (C1～C5) の調製

B-5-2 項で調製した検量線溶液 C5 を採取し、2mL 容の遠心分離用チューブに入れ、さらに Tw-sol をそれぞれの量を添加して検量線溶液 (C1～C5) を作成した(表 1)。

B-5-1-4：マーカー溶液の調製

200mL 容のメスフラスコに Benzo[ghi]perylene(BgP)マーカー約 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 のマーカー原液(5.0 µg/mL)とした(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 Tw-sol 50 mL に加え混合攪拌し、マーカー

溶液とした。

B-5-2：T-TiO₂

B-5-2-1：チタン検量線溶液(C1～C7)の調製

1000µg/mL のチタン標準溶液 0.1mL に 3 %硫酸水 0.9mL を加え 10 倍希釈し、さらに、その溶液 0.1mL に 3 %硫酸水を 0.9 mL 加えチタン標準液の 100 倍希釈液とした。チタン標準液の 100 倍希釈液 0.4mL に 3 %硫酸水で 9.6 mL を加え 25 倍希釈した(検量線 C7：0.4 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C5：0.2 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C3：0.1 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C2：0.05 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C1：0.025 µg/mL)。さらに、チタン標準液の 100 倍希釈液 0.3 mL に 3 %硫酸水で 9.7 mL を加え 33.3 倍希釈した(検量線 C6：0.3 µg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C4：0.15µg/mL)。

B-6：測定試料

B-6-1：T-CNT7

B-6-1-1：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) と投与群 (3 mg/m³) とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週目 (合計 24 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及び縦隔を摘出した。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-6-2：T-TiO₂

B-6-2-1：測定試料

図 1 に本研究の実験デザインを示した。Taquann 処理された酸化チタンを吸入曝露したマウスの構成を対照群（0 mg/m³）と投与群（30 mg/m³）とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週目（合計 24 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、酸化チタン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及び縦隔を摘出した。その肺及び縦隔は、冷凍保存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

B-7-1：T-CNT7

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及び縦隔を 2 mL の組織溶解液（B-5-1-1）で 60 °C で 24 時間かけて溶解した。なお、気相部分は窒素ガスで置換した。溶解した組織溶液は 60 秒間超音波分散した。その溶液中の T-CNT7 の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し、60 秒間超音波分散した。

B-8：試料の前処理と HPLC による測定

B-8-1：T-CNT7

図 2 に T-CNT7 の前処理について示した。B-5-1-3 及び B-7 項で調製した各溶液 1 mL は 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 分間遠心分離した。その上澄み液を除去し、それぞれに濃塩酸 0.2mL を加えタッチミ

キサーで 10 秒間攪拌し、12000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液を除去し濃硫酸 0.2mL を加え、残渣を分解し、タッチミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、12.4 項で調製したマーカール溶液 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、0.4 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 mm）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 で測定した。

B-8-2：T-TiO₂

100mL 容のガラス容器で冷凍保存した試料の肺及び縦隔は、蒸留水、濃硫酸、硝酸を 3：3：1 の比率で加え攪拌し、270 °C に加熱したホットプレート上で 90 分間加熱した。加熱終了後、室温になるまで放置し、3 %硫酸水を加えメスアップし、希釈原液とした。その後、その希釈原液に 3 %硫酸水で希釈し、原子吸光度計により測定した。

B-9：肺内及び縦隔の T-CNT7 の沈着量の計算方

B-9-1：T-CNT7

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た。肺及び縦隔の 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、各肺及び縦隔の重量で除することにより g 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た。

B-9-2：T-TiO₂

チタン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た。肺及び縦隔の原子吸光で測定した吸光度値を直線回帰式に代入し、チタンの測定値を求めた。酸化チタン中のチタンの含有率は 60%であることから、原子吸光で測定したチタン量から換算して酸化チタン量として計算した。こ

の値に希釈倍率を乗じることにより、酸化チタンの個体当りの沈着量（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、各肺及び縦隔の重量で除することにより肺及び縦隔のg当りの値（単位： $\mu\text{g/g}$ ）とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

C. 研究結果及び考察

C-1: T-CNT7の検量線

Taquann処理されたT-CNT7の濃度とマーカの面積値は、相関係数0.9938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0.2～1.0 $\mu\text{g/mL}$ 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: T-TiO₂の検量線

Taquann処理されたT-TiO₂の濃度と吸光度は、相関係数0.9978であり、T-TiO₂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-TiO₂は0.025～0.4 $\mu\text{g/mL}$ の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

C-3: マウス肺内のT-CNT7の肺及び縦隔の負荷量

表2及び図3に、Taquann処理されたT-CNT7を吸入曝露したマウス肺内のT-CNT7の肺及び縦隔の負荷量の結果を示した。その結果、3 mg/m^3 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では29.04 ± 6.16 $\mu\text{g/g}$ 、1週目では21.33 ± 2.01 $\mu\text{g/g}$ 、4週目では13.68 ± 1.62 $\mu\text{g/g}$ 、8週目では9.15 ± 2.17 $\mu\text{g/g}$ で減衰傾向が認められ、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/3の減衰傾向であった。なお、3 mg/m^3 曝露のマウスの縦隔及び0 mg/m^3 曝露のマウスの肺及び縦隔の組織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、本測定法による沈着量は減衰の傾向を示した。

C-4: マウス肺内のT-TiO₂の肺及び縦隔の負荷量

表3及び図4に、Taquann処理されたT-TiO₂を吸入曝露したマウス肺内のT-TiO₂の肺及び縦隔の負荷量の結果を示した。その結果、30 mg/m^3 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では150.11 ± 9.05 $\mu\text{g/g}$ 、1週目では112.47 ± 13.94 $\mu\text{g/g}$ 、4週目では63.05 ± 7.21 $\mu\text{g/g}$ 、8週目では25.85 ± 11.36 $\mu\text{g/g}$ であり、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/6の減衰傾向が認められた。なお、30 mg/m^3 曝露のマウスの縦隔及び0 mg/m^3 曝露のマウスの肺及び縦隔の組織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、本測定法による沈着量は減衰の傾向を示した。

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、3 mg/m^3 曝露において29.04 ± 6.16 $\mu\text{g/g}$ 、21.33 ± 2.01 $\mu\text{g/g}$ 、13.68 ± 1.62 $\mu\text{g/g}$ 及び8週目では9.15 ± 2.17 $\mu\text{g/g}$ であり、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/3の減衰傾向であった。また、Taquann法にて分散処理を施したT-TiO₂の全身吸入曝露により、肺内のT-TiO₂を原子吸光法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-TiO₂の負荷量は、30 mg/m^3 曝露において150.11 ± 9.05 $\mu\text{g/g}$ 、112.47 ± 13.94 $\mu\text{g/g}$ 、63.05 ± 7.21 $\mu\text{g/g}$ 及び8週目では25.85 ± 11.36 $\mu\text{g/g}$ であり、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/6の減衰傾向であり、T-CNTに比較してT-TiO₂の減少傾向は大きかった。なお、T-CNT7及びT-TiO₂の縦隔における負荷量は認められなかった。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M. Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Journal of Occupational Health, 60:10-30, 2018

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-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)

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

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

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	C5採取量 (mL)	Tw-sol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

図 1 実験デザイン

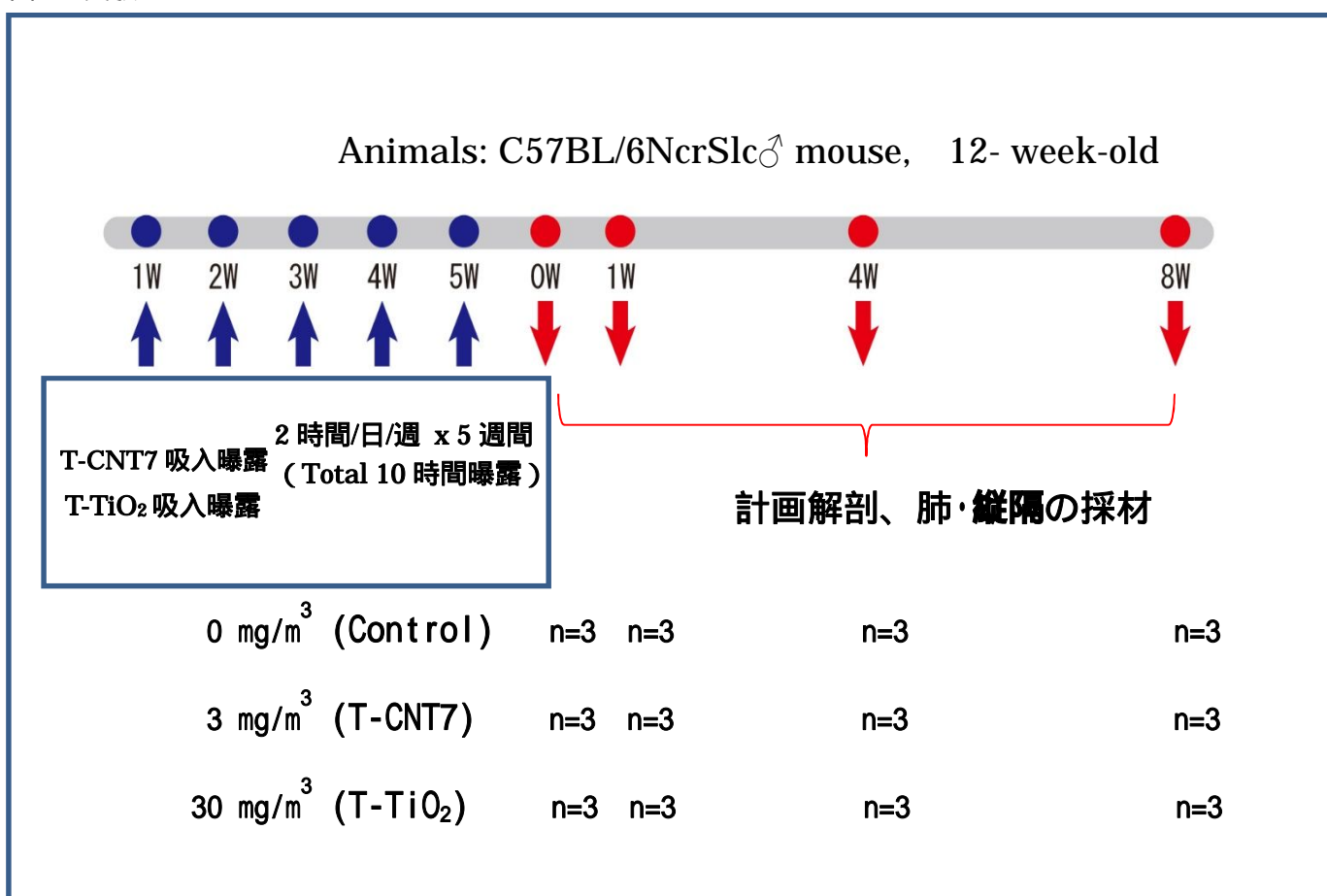


図 2 T-CNT7 の前処理

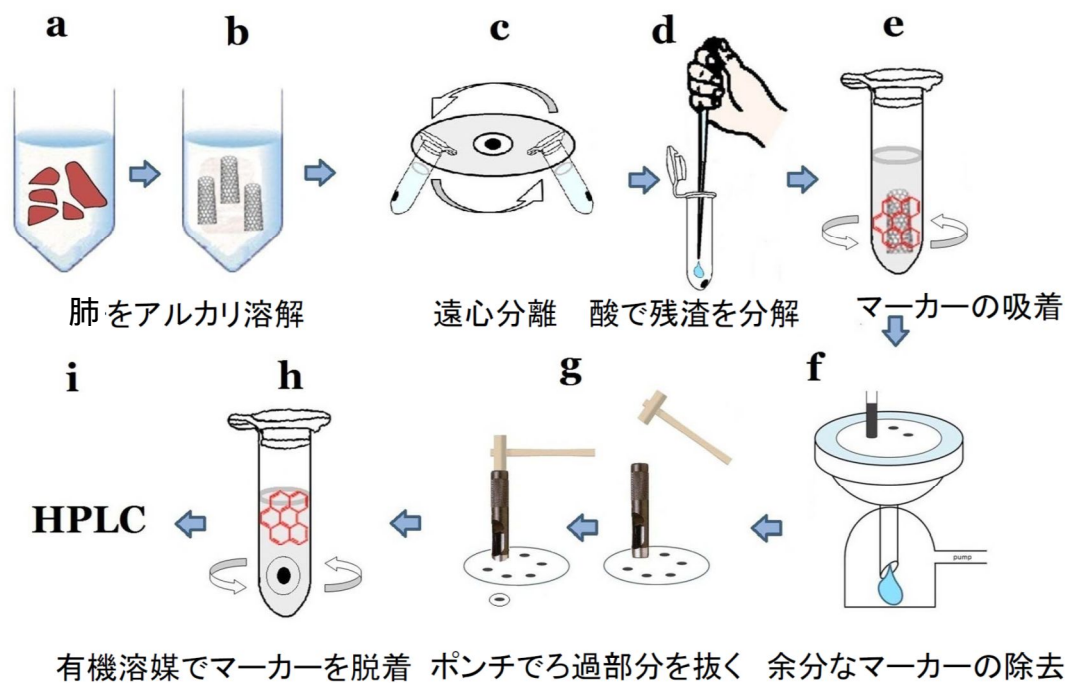


表 2 T-CNT7 の沈着量の分析結果

曝露濃度と曝露後期間	T-CNT7 絶対量(μg)	SD(μg)	T-CNT7 組織当り(μg/g)	SD(μg/g)
肺 0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 3 mg/m ³ -0 週	3.98	0.67	29.04	6.16
肺 3 mg/m ³ -1 週	3.04	0.25	21.33	2.01
肺 3 mg/m ³ -4 週	2.12	0.18	13.68	1.62
肺 3 mg/m ³ -8 週	1.38	0.36	9.15	2.17
縦隔 0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

図 3 肺内 T-CNT7 の沈着量の分析結果

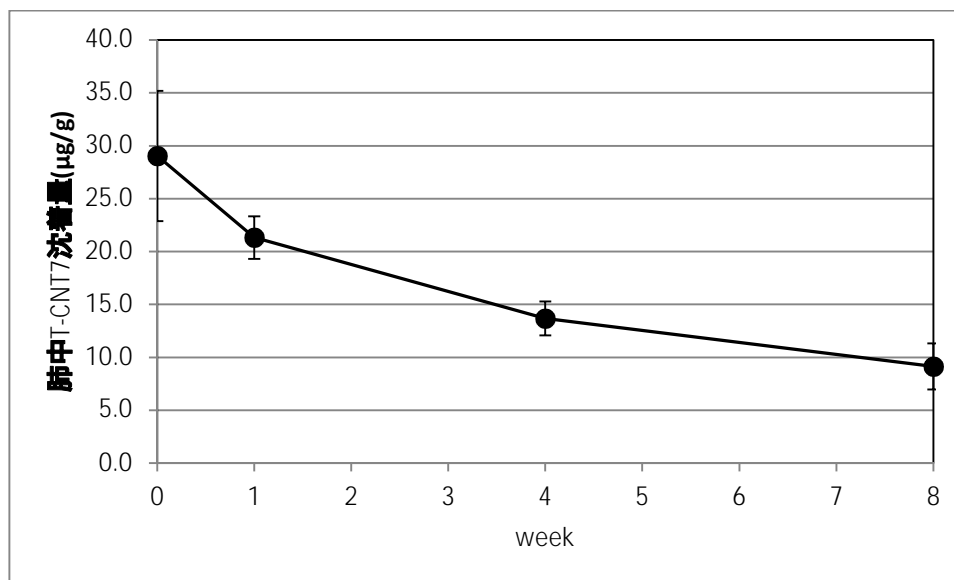
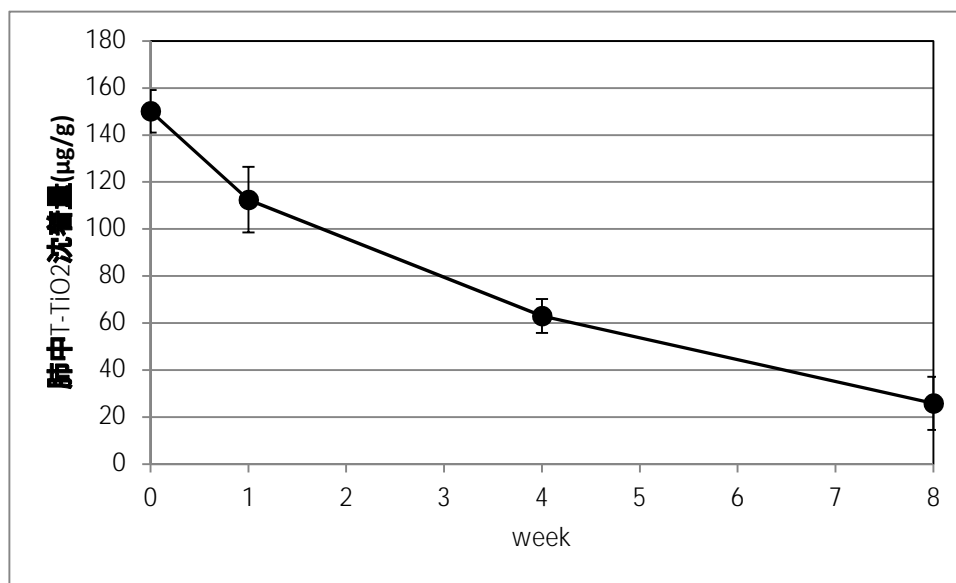


表 3 T-TiO₂の沈着量の分析結果

曝露濃度と曝露後期間	T-TiO ₂ 絶対量(μg)	SD(μg)	T-TiO ₂ 組織当り(μg/g)	SD(μg/g)
肺 0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 30 mg/m ³ -0 週	18.61	1.58	150.11	9.05
肺 30 mg/m ³ -1 週	14.11	1.62	112.47	13.94
肺 30 mg/m ³ -4 週	8.13	0.89	63.05	7.21
肺 30 mg/m ³ -8 週	3.48	1.82	25.85	11.36
縦隔 0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00 </td <td>0.00</td>	0.00
縦隔 30 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

図 4 肺内 T-TiO₂の沈着量の分析結果



平成 30 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、Taquann 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) ならびに二酸化チタン (T-TiO₂) を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、0、1、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 の曝露直後では肺胞マクロファージの生細胞数は減少し、その後細胞数が回復することがわかったが、マクロファージサブセットでは M1 型のマクロファージの割合が増加していた。また、T-CNT7 の曝露によって好酸球ならびに単球の細胞数が増加することが判明した。一方で、ナノマテリアルの吸入曝露によって肺胞マクロファージにおける CD36 などのスカベンジャー受容体を介した反応が重要であることが示された。加えて、T-CNT ならびに T-TiO₂ 曝露によって、肺胞洗浄液細胞における MMP12 遺伝子の発現亢進が見られた。さらに、肺組織での遺伝子変化では T-CNT7 および T-TiO₂ の曝露で共通の遺伝子変化 (MMP12, CD204, IL-6, IL-33, TIMP-1 などの上昇) とともに異なった遺伝子の変化も観察された。異なったナノマテリアルの曝露によって、肺組織内での免疫反応は関連遺伝子の発現に影響が及ぶことが判明した。したがって、ナノマテリアルの形態あるいは性状によって肺胞マクロファージの処理反応は異なっており、繊維状の多層カーボンナノチューブは貪食反応に異常を来し「Frustrated phagocytosis」が誘導されている可能性が考えられた。ナノマテリアルに対する肺免疫システムの影響評価について今後さらに多角的な検討が必要であると考えられる。

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 (Mφ) 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 30 年度の実験では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブならびに二酸化チ

タンを用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、0、1、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、ナノマテリアルの暴露による生体影響評価を検討した。特に、肺胞マクロファージに焦点を当て、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に検討を加えた。

B. 研究方法

・マウス

12週齢のC57BL/6(雄)を用い、各群6匹ずつで多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)あるいは二酸化チタン(T-TiO₂)を吸入暴露装置(国立医薬品食品衛生研究所)により吸入を実施し、吸入後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、ナノマテリアルの暴露・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。

・MWCNT-7, TiO₂ (AMT-600)

多層化カーボンナノチューブはMWCNT-7(保土ヶ谷化学)、二酸化チタンはAMT-600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, 3mg/m³; 2hr/day/week, 5週間)AMT-600(T-TiO₂, 30mg/m³; 2hr/day/week, 5週間)を用いた。対照群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。

・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

BALF細胞および肺組織の一部を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',	reverse,
5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3',	Col IV; forward,
5'-ATGCCCTTTCTCTTCTGCAA-3',	reverse,
5'-GAAGGAATAGCCGATCCACA-3',	GM-CSF;
forward,	5' -CCTGGAGCAAGTGAGGAAGA-3',
reverse,	5'-CAGCTTGTAGGTGGCACACA-3',
IL-6;	forward,
5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3',	reverse,
5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3',	IL-33; forward,
5'-ATTTCCCCGCAAAGTTCAG-3',	reverse,
5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3',	MMP12;
forward,	5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3',
reverse,	5'-GGTTTGTGCCTTGAAAAGTCTTTAGT-3',
TIMP-1;	forward,
5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3',	reverse,
5'-AGGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3',	VEGF; forward,
5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3'	reverse,
5'-GTTCCCCGAAACCCTGAGGAG-3',	β-actin;

forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

C. 研究結果

正常 B6 雄 (12 週齢) マウスに T-CNT7 暴露群、T-TiO₂ 暴露群および対照群として、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (図 1A)。各群は 6 匹ずつとする。

BALF 細胞のフローサイトメータ解析についてのゲーティングは FSC/SSC から生細胞を分離し、シングル細胞のみにゲート後、CD3⁻CD19⁻7AAD⁻細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺胞マクロファージ (AM)、好酸球 (E)、単球 (M) に分類した (図 1B)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1 (CD192) あるいは M2 (CD206) マクロファージサブセットの検出を行った (図 1B)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討してみた。通常、肺胞マクロファージは F4/80⁺CD11b⁻ の表現型を示し、前年度までの報告では T-CNT7 の吸入暴露で F4/80⁺CD11b⁺ あるいは CD11b^{high} の分画が増加することがわかっている。この分画は M1 マクロファージの性格を有していることも知られている。

BALF 中の各免疫担当細胞についてフローサイトメータによる解析では、暴露直後 (0 週) で生細胞 (alive) が T-CNT7 暴露で低下しており、肺胞マクロファージ (AM) においても T-CNT7 暴露で低下していた (図 2A)。一方で、好酸球、単球は T-CNT7 暴露で増加していたが、(図 2A) 好酸球は全体として割合が低く、0 週ならびに 1 週での変化にとどまっていたことから、繊維状のナノマテリアルに対する初期の免疫反応に関与している可能性がある。T-TiO₂ 暴露では、対照群と変化はなかった (図 2A)。さらに、肺胞マクロファージ表面マーカーで検討すると、T-CNT7 暴露で F4/80⁺肺胞マクロファージあるいは CD11b⁻F4/80⁺肺胞マクロファージは、対照群あるいは AMT-600 暴露群に比較して減少するものの、CD206⁺ あるいは CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージは逆に増加することがわかる (図 2A)。

肺胞マクロファージのこれらの BALF 細胞の分画の傾向は暴露後 1 週、4 週まで続くが、T-CNT7 暴露後 1 週では肺胞マクロファージ中の CD206⁺ マクロファージ (M2) の増加が見られなくなり、暴露後 4 週でも同様であった (図 2B, C)。T-CNT7 暴露後 4 週では好酸球の増加が見られなくなった (図 2C)。暴露後 8 週では、各群で大きな変化が見られなくなったが、T-CNT7 暴露で単球の増加、CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージの増加は続いていた (図 2D)。

ナノマテリアル暴露後の経時的变化を検討すると、肺胞マクロファージは対照群で大きな変化はないが、暴露後 8 週でやや減少傾向が見られた (図 3A)。T-TiO₂ 暴露群では 8 週まで変化は見られなかった (図 3A)。T-CNT7 暴露群では減少した肺胞マクロファージは 4 週、8 週と経時的に増加していた (図 3A)。

T-CNT7 暴露で特徴的な好酸球の経時的变化に関しては暴露後 0 週、1 週まで増加し、4 週、8 週で低下し、対照群と差が見られなくなった (図 3B)。単球の変化では T-CNT7 暴露で増加が 4 週まで続き、その影響が 8 週まで持続していた (図 3C)。

肺胞マクロファージの各分画についての経時的变化を検討すると、M1 型マクロファージに含まれる CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージに関しては、T-CNT7 暴露群では、暴露後 0 週、1 週での増加が目立ち、4 週、8 週と低下していた (図 4A)。T-TiO₂ 暴露群では対照群に比較して、CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージの増加は軽微であった (図 4A)。いずれの群でも暴露後 1 週以降では CD11b⁺F4/80⁺ マクロファージの割合は経時的に減少していた (図 4A)。

一方、M2 型肺胞マクロファージは対照群、T-TiO₂ 暴露群でばらつきはあるものの、8 週まで低い割合を維持していた (図 4B)。

ナノマテリアルの暴露による変化で、肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体が重要な役割を果たしていることが知られていることから、肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現を検討すると、対照群において暴露直後で 20% 程度が陽性であった発現が 1 週以降はほぼ発現が認められなかった (図 5A)。T-TiO₂ 暴露

群では、暴露直後に対照群よりも高い CD36 発現を示し、1 週後以降で発現は見られなくなった(図 5A)。T-CNT7 暴露においても同様の発現変化が観察された(図 5A)。CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおいても CD36 の発現はナノマテリアルの暴露直後で発現が亢進するが、1 週以降ではほぼ発現が見られなくなった(図 5B)。0 週での T-TiO₂ 暴露群と T-CNT7 暴露では CD36 の発現に差は見られなかった(図 5A, B)。また、スカベンジャー受容体の一つである CD163 の発現に関しても経時的に検討したが、若干の時間的な変化は見られるもののマクロファージの 5% 以下の発現しか見られなかったことから CD163 分子の発現に両マテリアルの影響は低いものと考えられる(図 6A, B)。

ナノマテリアル暴露による BALF 細胞における各種 mRNA 発現に関して定量 RT-PCR にて検討したところ、昨年の T-CNT7 暴露で変動のあった MMP12 遺伝子に関して、対照群、T-TiO₂ 暴露群では変化は見られなかったが、T-CNT7 暴露群で 0 週および 1 週で発現上昇が観察され、4 週、8 週では発現が低下するものの対照群よりは高い値を維持していた(図 7A)。さらに、スカベンジャー受容体の一つである CD204 においても T-CNT7 曝露によって発現が上昇し、暴露後 1 週では高い発現を示した後、4 週以降で発現低下が見られた(図 7B)。

肺組織における様々な遺伝子の mRNA 発現に関しては、MMP12 mRNA 発現は T-CNT7 暴露後 1 週で高い値を示していた(図 8A)。CD204 mRNA は T-TiO₂ 曝露後 1 週で上昇し、それ以降は低下していた(図 8B)。T-CNT7 暴露では直後から発現が上昇し、4 週で一旦低下し、8 週で再び上昇していた(図 8B)。また、MMP12 mRNA 発現に関しては、T-CNT7 暴露後 1 週では肺組織の方が相対的に発現量が高いことがわかる(図 7A, 8A)。加えて、CD204 mRNA 発現に関しては、T-CNT-7 暴露後 1 週で、BALF 細胞での発現が肺組織よりも相対的に高い発現を示していた(図 7B, 8B)。

肺組織における GM-CSF mRNA 発現は T-CNT7 暴露後 1 週で上昇していたがその後は低下した(図 9

A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(図 9B)。IL-33 mRNA 発現においても、T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇がみとめられた(図 10A)。慢性炎症の線維化に關与する Col IV mRNA はナノマテリアルの暴露で変動は認められなかった(図 10B)。

TIMP-1 mRNA 発現では T-TiO₂ および T-CNT7 暴露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(図 11A)。VEGF mRNA 発現はばらつきはあるものの、大きな変化は認められなかった(図 11B)。

D. 考察

今年度の実験では正常 B6 雄マウスに二酸化チタン(T-TiO₂)および多層化カーボンナノチューブ(T-CNT7)を Taquann 処理によって分散性を高めた上で、全身吸入暴露装置にて 4 週間にわたって暴露を行なった。暴露後、0 週、1 週、4 週および 8 週における肺を中心とした免疫担当細胞の動態と異なったナノマテリアル吸入暴露による免疫反応の違いを詳細に検討した。

ナノマテリアルの 4 週間の暴露直後(0 週)では、T-CNT7 の暴露群では BALF 細胞の生存割合が対照群、T-TiO₂ 暴露群に比較して、有意に低くなっていた。このことは昨年までの研究結果と一致している。T-TiO₂ 暴露群では形態学的に顆粒状異物を貪食した肺胞マクロファージが多く観察されている(相磯班内データ)。一方で、T-CNT7 は針状あるいは繊維状の形態のナノマテリアルであり、貪食しようとした肺胞マクロファージは細胞死を生じている可能性が考えられた。従来よりナノマテリアルの貪食と「Frustrated phagocytosis」との関連性が報告されてきたが、T-CNT7 暴露後に肺胞マクロファージによるナノマテリアルの貪食反応が進む過程で、エキソサートーシスの亢進、小胞体やゴルジ装置などの細胞小器官に機能的あるいは形態的变化から Frustrated phagocytosis が誘導され、その後、細胞死が生じ、処理しきれなかったナノマテリアルに対して新たに肺胞マクロファージの反応が繰り返しながら、肺全体の免

疫反応に変化が生じている可能性が考えられる。

暴露直後以降、T-CNT7 暴露群では BALF 細胞数あるいは肺胞マクロファージ数が回復し、暴露後 8 週ではほぼ対照群、T-TiO₂ 暴露群と大差はなくなっていた。T-CNT7 暴露にて細胞死に陥った肺胞マクロファージは肺組織内での恒常性維持あるいは貪食しきれなかったナノマテリアルの処理のために肺胞内で細胞数が増加している可能性が考えられる。組織常在型マクロファージが増加したのかあるいは末梢由来の単球から分化することで細胞数が増加したのかは不明であり、今後の課題である。

多層化カーボンナノチューブの暴露後 1 年での肺胞マクロファージのフェノタイプとして、CD11b^{high}F4/80⁺マクロファージが増加し、線維化に関係する MMP12 を産生することが報告されている [Otsuka et al. G. 発表論文 1. 発表論文 (3)]。今回の実験においても CD11b^{high} 分画を含む CD11b⁺ 分画が T-CNT7 暴露群で増加していたことから、暴露後早い段階からこのユニークな分画が多層化カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫反応に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、明確な CD11b^{high} 分画への変化はさらに加齢的な変化が必要であることが考えられた。

T-CNT7 暴露での変化で重要な所見として、好酸球数の増加である。通常、好酸球はアレルギー反応、寄生虫感染などの免疫反応においてその役割が知られているが、ナノマテリアルの暴露による好酸球の役割に関してはよく知られていない。IL-13 など好酸球が産生するサイトカインあるいはケモカインなどの産生を検討する必要性がある。

T-TiO₂ および T-CNT7 の両者ともに暴露後に肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現が亢進していた。このことはナノマテリアルの形状ならびに性状に関わらずスカベンジャー受容体がナノマテリアルに対する免疫反応に重要な働きをしていることが示された。CD35 の発現は肺胞マクロファージ全体と CD11b⁺F4/80⁺マクロファージとでほぼ発現量が同じであったことから、この分画における CD36 の発現がナノマテリアルの反応

に鍵になる可能性が示された。

BALF 細胞の遺伝子変化として、T-CNT7 暴露群で MMP12 および CD204 mRNA 発現が上昇していた。MMP12 に関してはこれまでの報告に一致しており、T-CNT の暴露によって肺胞マクロファージの産生する MMP12 が肺の線維化病変に関与しているものと考えられる。また、CD204 に関してはスカベンジャー受容体の一つとして知られており、T-CNT の暴露に関連する分子として注目できる。また、T-CNT7 暴露で BALF 細胞の CD204 mRNA 発現が肺での発現よりも高い発現であったことから、肺胞マクロファージにおける CD204 分子の発現は重要であることが示唆される。

肺組織における遺伝子変化に関しては、BALF 細胞と同様に、MMP12 ならびに CD204 mRNA 発現の上昇が見られたが、肺組織への肺胞マクロファージの残存あるいは肺胞マクロファージ以外の間質の細胞の変化が反映されている可能性が考えられた。また、T-TiO₂ 暴露でも CD204 mRNA の発現上昇が見られたことから、何らかの間質細胞への影響が考えられた。特に、MMP12 mRNA の発現に関しては、T-CNT7 暴露後 1 週で BALF 細胞よりも肺組織で相対的に高い発現を示していたことは、肺胞マクロファージでの MMP12 の役割に加え、肺組織における別の細胞における MMP12 の発現がナノマテリアルの暴露時における肺全体の反応に影響を示している可能性が考えられた。

肺組織でのサイトカインの変化に関しては、T-CNT7 暴露 1 週間で一過性に GM-CSF ならびに IL-6 mRNA 発現が上昇しているが、BALF 細胞での発現の解析が必要である。また、T-TiO₂ 暴露と T-CNT7 暴露で IL-33 mRNA 発現が一過性に上昇していることも BALF 細胞での発現の解析が待たれる。TIMP-1 mRNA 発現に関しても両方のマテリアルで一過性に上昇しており、ナノマテリアル暴露での肺免疫に重要な役割を果たしている可能性が示された。暴露後 1 週での遺伝子変化がナノマテリアルの暴露の初期反応を反映している可能性があるが、単回暴露など実験の条件を考慮した実験計画が今後の課題

である。

一方で、今回の実験における組織学的検討ならびに BALF 細胞の解析で、T-CNT7 暴露によって末梢気道あるいは肺胞における異物貪食細胞の変性、集簇、間質での線維化など多彩な所見が観察されたが、フローサイトメータや遺伝子発現解析の結果で見られたような肺胞マクロファージの一過性の分画変化、遺伝子発現変化を反映しているか否かはさらなる今後の検討が必要であると考え。さらに、T-CNT7 に比較して T-TiO₂ 暴露では組織学的に大きな変化が見られなかった点は、免疫学的解析結果と一致していたことから、ナノマテリアルの形状や性状による肺における免疫反応の違いが示されている。

また、「Frustrated phagocytosis」が今回の研究でどのように関与しているのかを明らかにするためにも、今後の実験計画での暴露プロトコール、解析項目に細胞小器官の解析などより詳細な内容を加える必要がある。

E. 結論

1. ナノマテリアルの形態あるいは性状によって肺胞マクロファージの処理反応は異なっており、繊維状の多層化カーボンナノチューブは貪食反応が正常に機能できない可能性がある。
2. 多層化カーボンナノチューブの暴露直後では肺胞マクロファージ数は減少し、その後細胞数が回復することがわかった。
3. 多層化カーボンナノチューブの暴露によって好酸球の細胞数が増加することが判明した。
4. ナノマテリアルの吸入暴露によって肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体を介した反応が重要であることが示された。
5. ナノマテリアルの性状や形態の違いによって、BALF 細胞あるいは肺組織での遺伝子の発現変化が異なっていることがわかった。
6. 種々のナノマテリアルの暴露によって肺での免疫機能評価には BALF 細胞の細胞表面マーカーや遺伝子発現の変化の検討が重要であることがわかった。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E. Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone*. 2019 Apr;121:29-41 doi: 10.5152/eurjrheum.2019.18137.

(2) Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N. CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren's syndrome. *Front Immunol* 9:2594, 2018 doi: 10.3389/fimmu.2018.02594.

(3) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One* 13(10):e0205702, 2018 doi: 10.1371/journal.pone.0205702

(4) Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study. *J Oral Pathol Med* 47(7):710-718, 2018 doi: 10.1111/jop.12756

(5) Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y. Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma. *Int J Mol Sci* 19(5):E1462, 2018 doi: 10.3390/ijms19051462

(6) Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M. Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells. *Inflammation*. 2018

Aug;41(4):1172-1181. doi:10.1007/s10753-018-0764-0.2 .

(7) 石丸直澄、林良夫：口唇腺生検病理診断 シェーグレン症候群の診断と治療マニュアル 改訂 第 3 版 (2018 年) 70-75 ISBN978-4-7878-2369-4

(8) 石丸直澄：膠原病の病理—今日的視点から—唾液腺病変 病理と臨床 36(6), 580-585, 2018

(9) 牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群研究の最前線 細胞 50(10), 528-531, 2018

(10) 石丸直澄、山田安希子：シェーグレン症候群における制御性 T 細胞 医学のあゆみ Vol.268, No.13 1241-1245, 2019

学会発表

(1) Naozumi Ishimaru, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Yasusei Kudo: Contributions of CXCL12 and its receptor to the T cell autoimmune response in a Sjögren's syndrome murine model. 14th International Sjogren's Syndrome Symposium, Washington DC, April 18-21, 2018

(2) Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing resident macrophages enhance autoimmune lesions in a mouse model of Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(3) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Masako Saito, Satoko Kujiraoka, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Hidehiro Kishimoto, Naozumi Ishimaru: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(4) Rieko Arakaki, Mie Kurosawa, Akiko Yamada,

Aya Ushio, Satoko Kujiraoka, Kunihiro Otsuka, Takaaki Tsunematsu, Yasusei Kudo, Jonathan Sprent, and Naozumi Ishimaru. NF- κ B Controls the Migratory Activity of Memory T Cells to the Target Tissues in a Mouse Model of Sjögren's Syndrome by Regulating Expression of CXCR4. 11th International Congress on Autoimmunity, Lisbon, May 16-20, 2018

(5) 石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(6) 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(7) 中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺におけるIL-33の発現とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(8) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

(9) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.21

(10) 沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルにおけるNotchシグナルの役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23

(11) 常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大

- 塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄 DNAライセンシング因子CDT1の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (12) 西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 Emi1の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (13) 梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 口腔癌におけるPeriostinプライミングバリエーションの同定とその役割 第107回日本病理学会総会 札幌(ロイトン札幌) 2018.6.23
- (14) Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018
- (15) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 第17回四国免疫フォーラム 徳島 2018.6.30
- (16) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパーT細胞の役割 分子病理学研究会37はがくれシンポジウム 佐賀 2018.7.7
- (17) 大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 先端歯学スクール2018 東京 2018.8.23-24
- (18) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 Ascl2を介した濾胞ヘルパーT細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に關与する 第29回日本臨床口腔病理学会総会 東京 2018.8.25-26
- (19) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第60回歯科基礎医学会学術大会 福岡 2018.9.5-7
- (20) 大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (21) 牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄 CCL22産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第27回日本シェーグレン症候群学会 小倉 2018.9.14-15
- (22) Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat 香川(リゾートホテルオリビアン小豆島) 2018.9.20-22
- (23) Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (24) Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing

macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第47回日本免疫学会学術集会 福岡
2018.12.10-12

- (25) Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第47回日本免疫学会学術集会 福岡 2018.12.10-12
- (26) 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京
- (27) 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
- (28) 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

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

図1A 実験計画

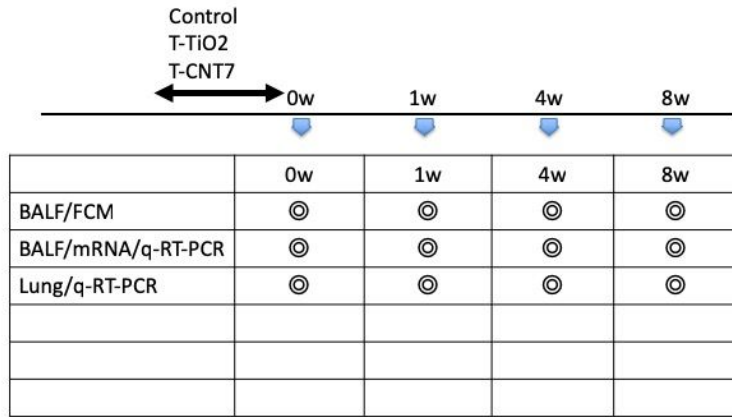
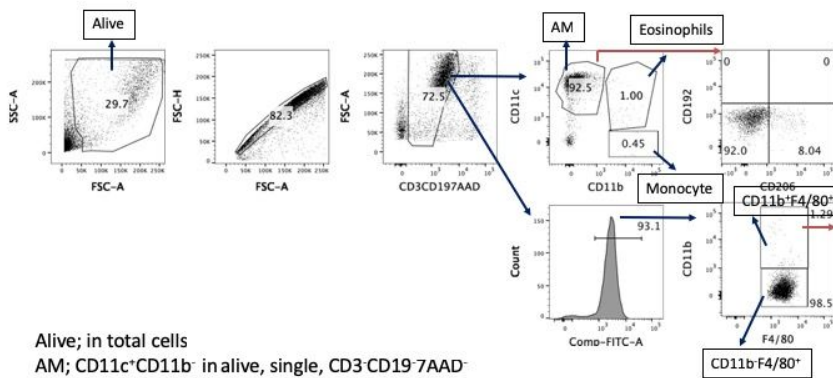


図1B フローサイトメータ解析
(ゲーティングストラテジー)



Alive; in total cells
 AM; CD11c⁺CD11b⁻ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 Eosinophils; CD11c⁺CD11b⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 Monocyte; CD11c⁻CD11b⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻
 F4/80⁺; F4/80⁺ in alive, single, CD3⁺CD19⁻7AAD⁻

図2A BALF中の各細胞分画

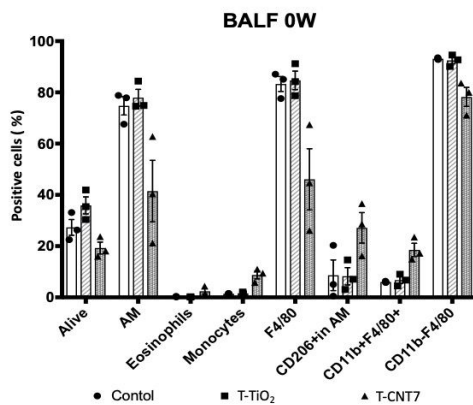


図2B BALF中の各細胞分画

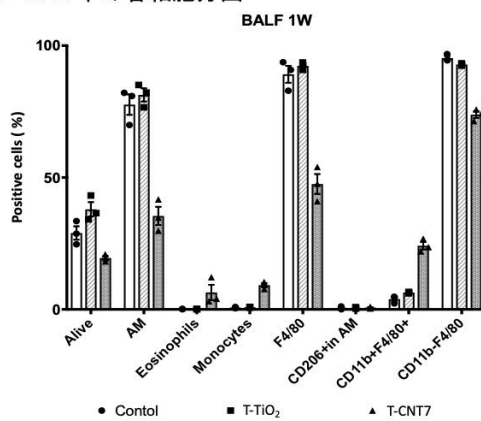


図2C BALF中の各細胞分画

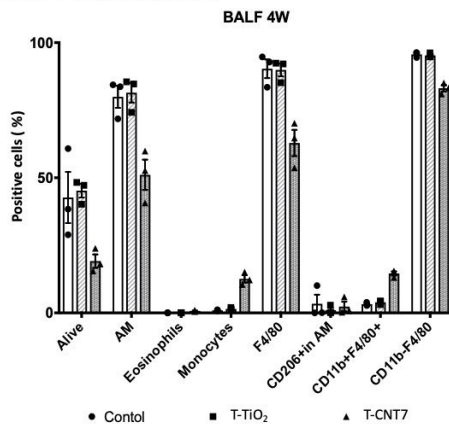


図2D BALF中の各細胞分画

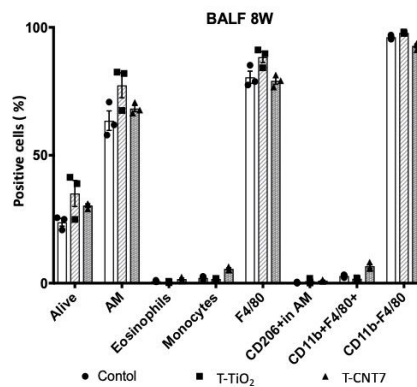


図3A

肺胞マクロファージの経時的変化

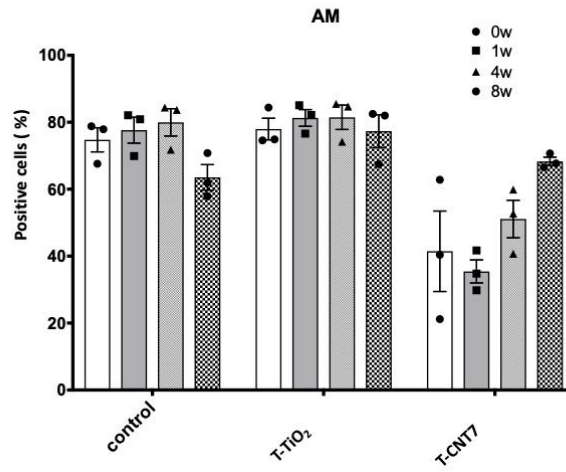


図3B

好酸球の経時的変化

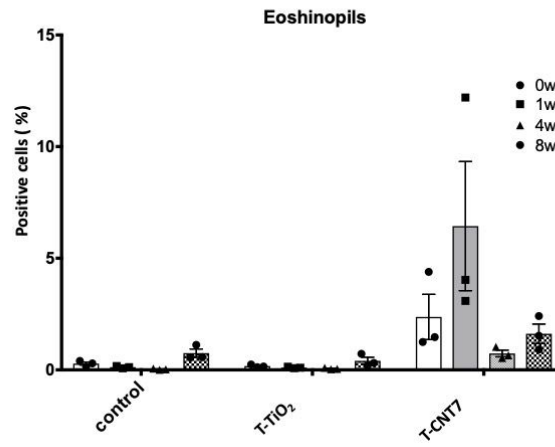


図3C

単球の経時的変化

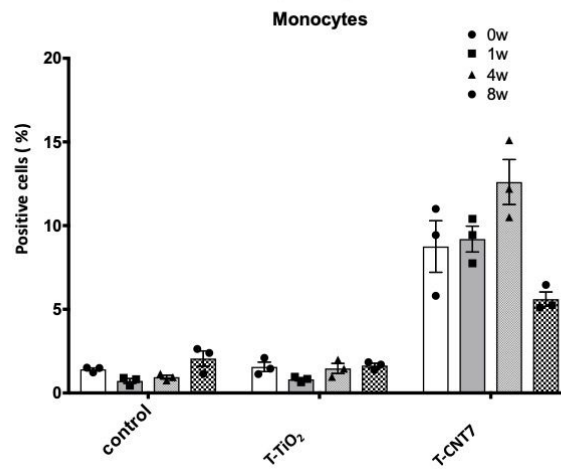


図4A CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージの経時的変化

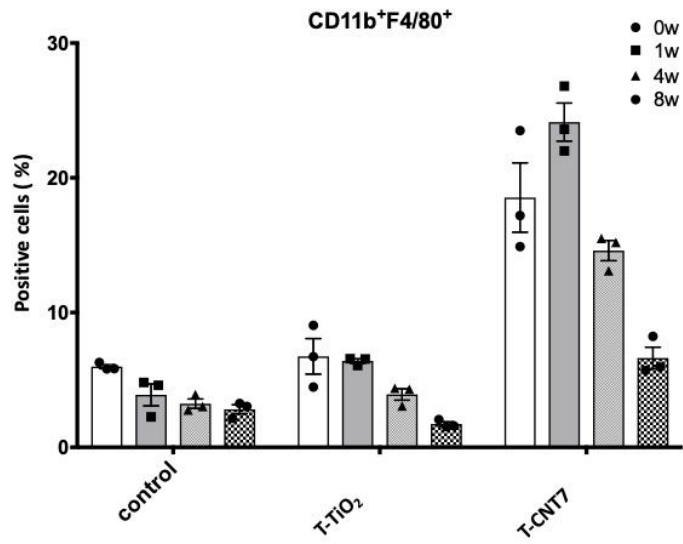


図4B M2型肺胞マクロファージの経時的変化

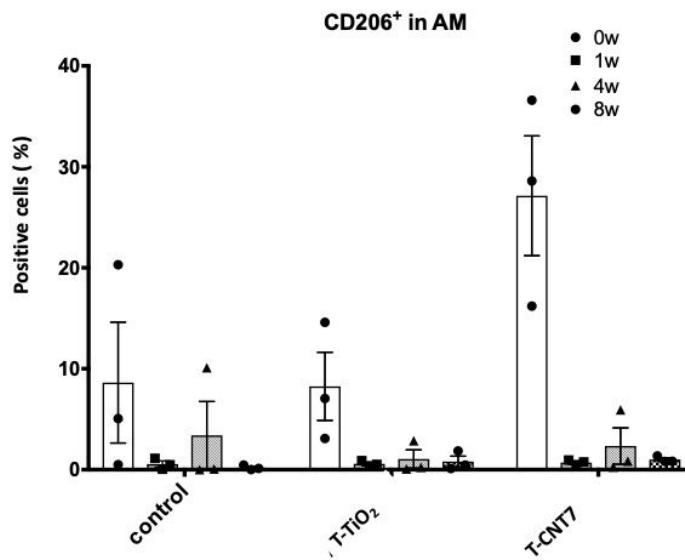


図5A

肺胞マクロファージにおけるCD36の経時的変化

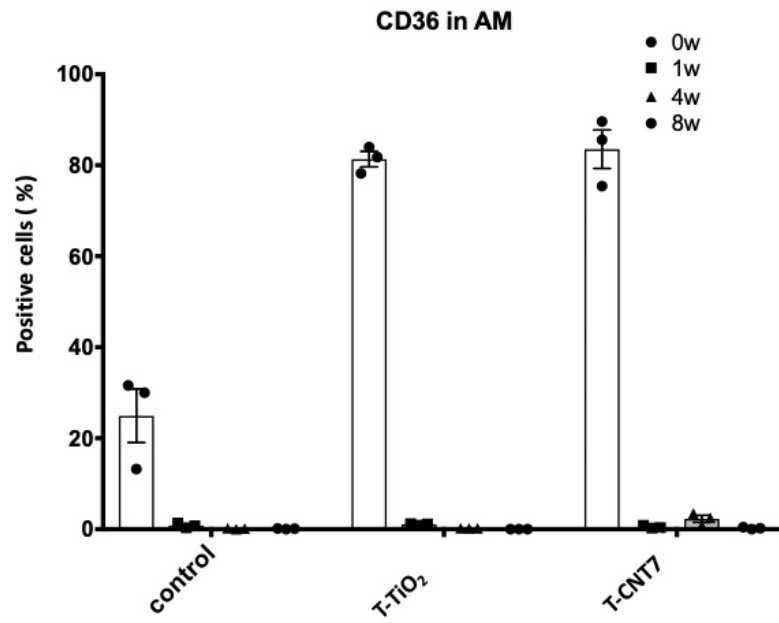


図6A 肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化

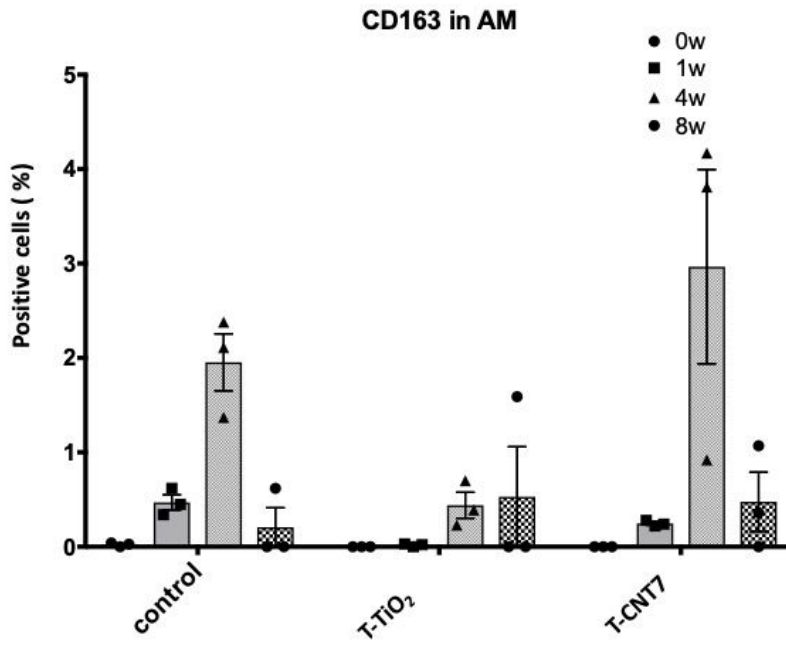
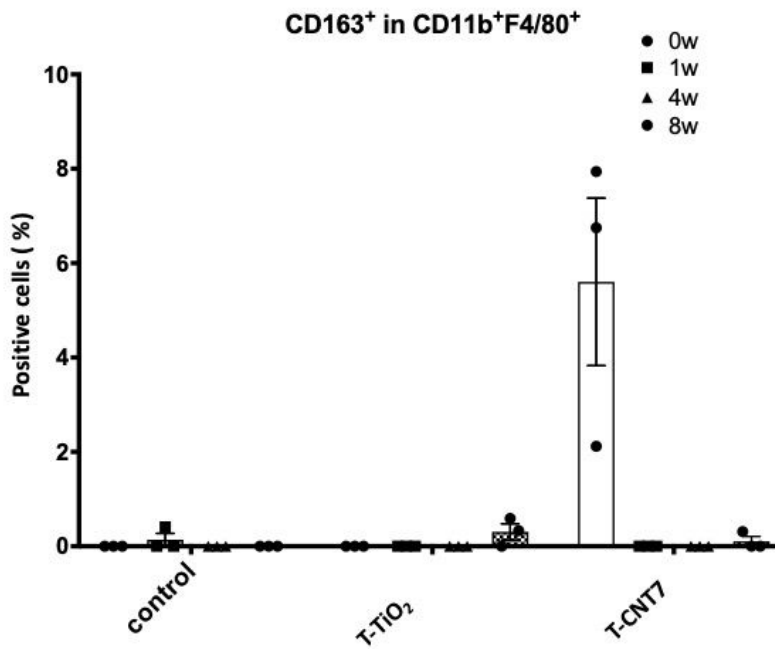


図6B CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化



BALF細胞におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

図7A

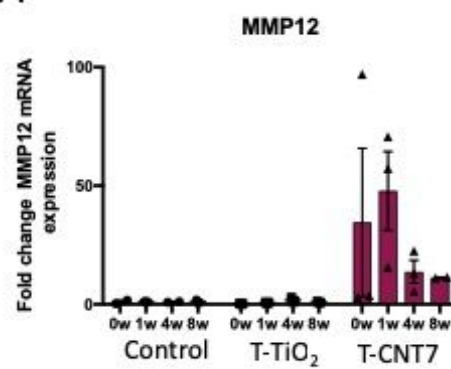
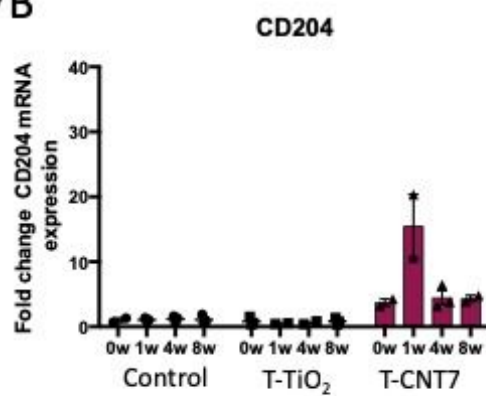
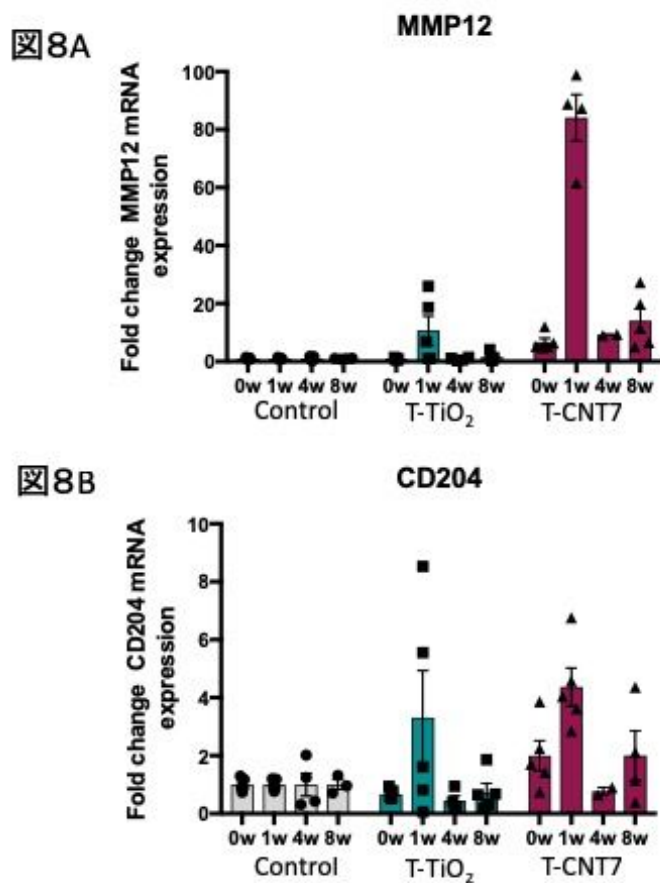


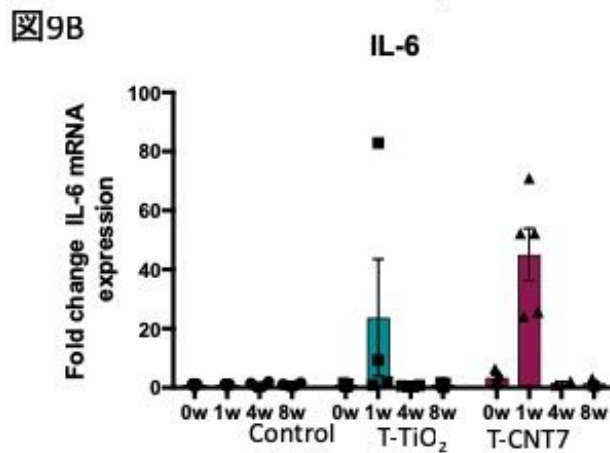
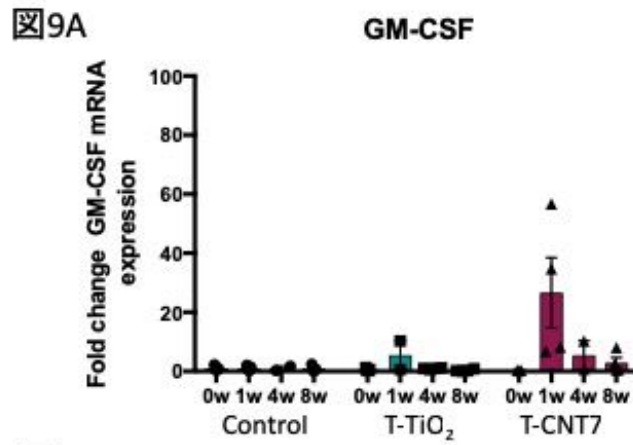
図7B



肺組織におけるMMP12およびCD204 mRNA発現



肺組織におけるGM-CSFおよびIL-6 mRNA発現



肺組織におけるIL-33およびColIV mRNA発現

図10A

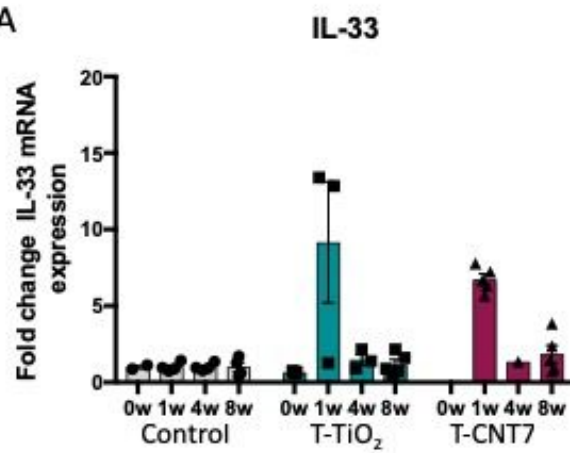
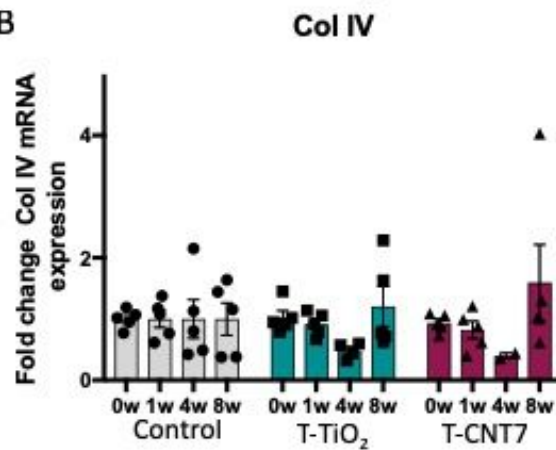


図10B



肺組織におけるTIMP-1およびVEGF mRNA発現

図11A

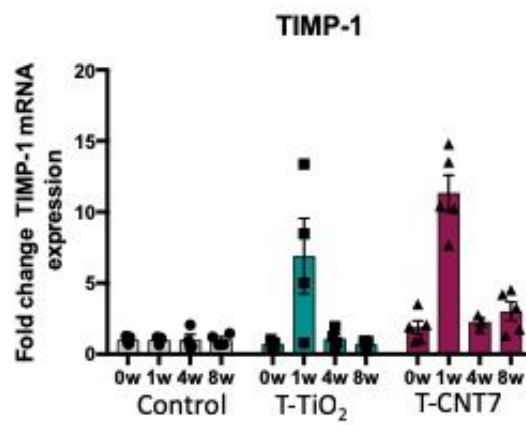
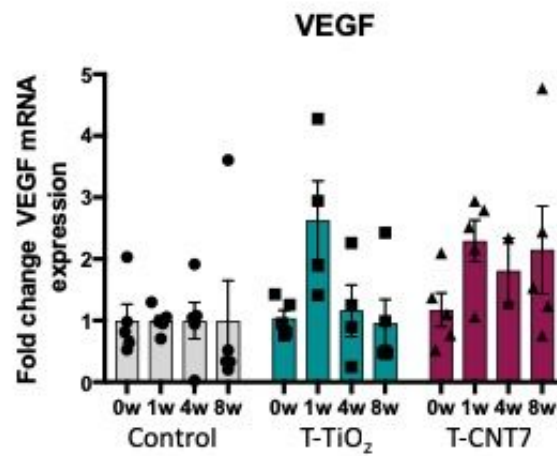


図11B



研究成果の刊行に関する一覧表

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 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	28;59 (2)	112-121	2017
Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Tsuda H, Takahashi S.	Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats.	Arch Toxicol..	93(4)	909-920	2019
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One	13(10) :	e0205702	2018
Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Tsuda H, Takahashi S.	Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats.	Cancer Sci..	109(7)	2164-2177	2018

Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto M.	Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment.	Journal of Occupational Health	60	10-30	2018
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 multiwalled carbon nanotube in rats	Particle and Fibre Toxicology	13	53	2016
Nakatomi C, Nakatomi M, Matsubara T, Komori T, Doi-Inoue T, Ishimaru N, Weih F, Iwamoto T, Matsuda M, Kokabu S, Jimi E.	Constitutive activation of the alternative NF- κ B pathway disturbs endochondral ossification.	Bone	121	29-41	2019
Ushio A, Arakaki R, Otsuka K, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Aota K, Azuma M, Ishimaru N.	CCL22-Producing Resident Macrophages Enhance T Cell response in Sjögren' syndrome	Front Immunol	9	2594	2018
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One	13(10)	e0205702	2018
Aota K, Yamanoi T, Kani K, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M.	Inverse correlation between the number of CXCR3+ macrophages and the severity of inflammatory lesion in Sjögren's syndrome salivary glands: A pilot study.	J Oral Pathol Med	47(7)	710-718	2018

Siriwardena SBSM, Tsunematsu T, Qi G, Ishimaru N, Kudo Y.	Invasion-related factors as potential diagnostic and therapeutic targets in oral squamous cell carcinoma.	Int J Mol Sci	19(5)	E1462	2018
Aota K, Kani K, Yamanoi T, Nakashiro KI, Ishimaru N, Azuma M.	Distinct Regulation of CXCL10 Production by Cytokines in Human Salivary Gland Ductal and Acinar Cells.	Inflammation	41(4)	1172-1181	2018
石丸直澄、林良夫	口唇腺生検病理診断 シェー グレン症候群の診断と治療マ ニュアル	医学書出版	改定第 3 判	70-75	2018
石丸直澄	膠原病の病理—今日的視点か ら—唾液腺病変	病理と臨床	36(6)	580-585	2018
牛尾綾、大塚邦紘、新 垣理恵子、工藤保誠、 石丸直澄	シェーグレン症候群研究の最 前線	細胞	50(10)	528-531	2018
石丸直澄、山田安希子	シェーグレン症候群における 制御性 T 細胞	医学のあゆみ	Vol. 268, No.13	1241-1245	2019

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 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
所属研究機関長 職名 所長
氏名 菅野 純 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
- 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— (H29-化学-一般-003)
- 研究者名 (所属部局・職名) 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 部長
(氏名・フリガナ) 相磯 成敏 (アイソ シゲトシ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管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	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

国立医薬品食品衛生研究所 殿

機関名 国立医薬品食品衛生研究所

所属研究機関長 職名 所長

氏名 奥田 晴宏



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
2. 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-
3. 研究者名 (所属部局・職名) 安全性生物試験研究センター 毒性部 第三室・室長
(氏名・フリガナ) 高橋 祐次・タカハシ ユウジ

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管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	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	国立医薬品食品衛生研究所	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 4月 16日

厚生労働大臣
(国立医薬品食品衛生研究所長) 殿
(国立保健医療科学院長)

機関名 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
所属研究機関長 職名 所長
氏名 菅野 純



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
- 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—評価基盤の構築— (H29-化学-一般-003)
- 研究者名 (所属部局・職名) 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
(氏名・フリガナ) 大西 誠 (オオニシ マコト)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管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	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	公益財団法人ヒューマンサイエンス振興財団	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

平成31年 3月12日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 徳島大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 野地 澄 晴 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 研究課題名 ナノマテリアル吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究－生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築－
- 研究者名 (所属部局・職名) 大学院医歯薬学研究部・教授
(氏名・フリガナ) 石丸 直澄・イシマル ナオズミ
- 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管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	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。