

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

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 -

令和元年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 相磯 成敏

令和2(2020)年3月

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	・・・3
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 —	・・・4
相磯 成敏	
． 分担研究報告書	・・・20
1． ナノマテリアルの病理組織学的評価研究	
相磯 成敏	・・・ 21
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	・・・62
3． ナノマテリアルの組織負荷量の測定	
大西 誠	・・・75
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	・・・ 86
． 研究成果の刊行物に関する一覧表	・・・104

・ 総括研究報告書

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
総括研究報告書

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

研究代表者 相磯 成敏  
独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部長

研究要旨

工業的ナノマテリアルの開発と産業応用が急速に進む中、製造者、使用者の健康被害を防止するための規制決定に必要となる基礎的かつ定量的有害性情報が得られる評価法の構築が必要とされている。我々がこれまでに実施してきた実験動物を用いたナノマテリアルの吸入曝露による呼吸器毒性に関する先行研究から、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の胞体内での蓄積様式を「長繊維貫通型\*」、「毛玉状凝集型\*」及び「粒状凝集型\*」の3つの様式に分類すると、それぞれの蓄積様式によって Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)の程度が異なると予測した。そこで、これらの3種類のモデルナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺についてマクロファージの胞体内での異物の蓄積様式と、それによって誘発される肺病変を関連付けたナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の収集を企画した。令和元年度は MWCNT-N (毛玉状凝集型) を吸入曝露した肺の解析を実施するとともに、前年度に実験を行った TiO<sub>2</sub> (粒状凝集型) と MWNT-7 (長繊維貫通型) の解析も継続した。研究の結果、肺負荷量と病理組織学的な解析結果から各モデルナノマテリアルの吸入曝露実験では肺に急性炎症を惹起させない低負荷量域のナノマテリアルの暴露が行われたことが示された。この低負荷量域の曝露では粒子状のものが曝露される TiO<sub>2</sub> と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることを肺負荷量の解析、免疫システムの変動の解析、BALF 塗抹細胞形態学的解析及び病理組織学的の多面的な解析によって明らかにした。

以上、本研究では、3種類の異なる物理化学的性状を示すナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における研究での情報収集が必要と考える。

---

(\*)「貫通」とは、繊維が比較的太く強直でありマクロファージの細胞径よりも長い場合、マクロファージが貪食した際に繊維の一端または両端が細胞膜を貫通して細胞外に突出した像を呈する状況を指す。「粒状凝集」とは、マクロファージに対して十分に小さな粒子が細胞質内に高密度に凝集して貪食される状況を指す。「毛玉状凝集」とは、柔軟性の高い細い繊維が細胞質内で丸く絡まり、毛玉状に凝集する状況を指す。

研究分担者氏名・所属施設および所属施設における職名(50音順)

相磯 成敏:独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター病理検査部  
病理検査部長

石丸 直澄:徳島大学大学院医歯薬学研究部・教授

大西 誠:独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター試験管理部  
技術専門役

高橋 祐次:国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部・室長

## A. 研究目的

ナノマテリアルの産業応用が急速に進展している中、健康被害を防止するための規制決定に必要な基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法の構築が必要である。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つであるMWNT-7についてはIARCでグループ2Bの評価がなされたが、他のMWCNTは情報不足のため評価がなされていない。MWCNT一つとっても多様な特性を有しており、他の多種多様な素材、粒子径、イオン化傾向、表面活性等が複雑に影響して有害性を発現するナノマテリアルの全容は未解明のままである。

国際的に、ナノマテリアルの物理化学的特性、製品運命、曝露評価などを基盤とした有害性のカテゴリー評価が提案されているが、ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり、かつ有害性発現が最も懸念される吸入曝露における *in vivo* 生体反応を反映させるものとはなっていない。先行研究(H26-化学-一般-003)及び(独)日本バイオアッセイセンターで実施されたMWNT-7の発がん試験の成果(Part Fibre Toxicol, 2016)に基づき、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の反応を3つの様式に分類した。すなわち、「長繊維貫通型」:マクロファージのサイズを超える長い単一の繊維では長繊維が胞体を通る状態となる。「毛玉状凝集型」:柔軟性に富む繊維はマクロファ

ージの胞体内に毛玉状の凝集塊として貯留されると予測される。「粒状凝集型」:マクロファージより小さな粒子は凝集塊として貯留される。「長繊維貫通型」においては、マクロファージは繊維を分解できずに Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)を示しつつアポトーシスに至り、繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。この現象による各種の細胞ストレスが繊維発がん機序の発端として提唱されている。「毛玉状凝集型」と「粒状凝集型」においては、マクロファージの胞体内の蓄積がある量を超えると、Frustrated phagocytosisを引き起こし、最終的にマクロファージはアポトーシスに至ると考えられるが、そこに至る過程は蓄積物の性状により異なる。したがって、曝露量とサイトカインの種類と放出量の関係は異なると想定される。本研究では、当初、これらの3つの貪食反応を誘発するモデルを用い、マクロファージが発現する受容体、産生する各種サイトカインを明らかにし、異物を貪食したマクロファージの胞体内での蓄積様式と誘発される肺病変を関連付けすることで、ナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の整備を企図した。研究を進める中で、中間年度に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取して、BALF塗抹で肺胞マクロファージを形態学的にサブミクロンレベルで検索すると、これまでマクロファージによる異物処理は単独で行われることを想定していたものとは異なり、マクロファージが集団で異物を処理にあたる知見を得た。

この知見に基づき、平成30年度と令和元年度は病理組織学的評価の分担研究にBALF塗抹での白血球百分比と塗抹細胞の形態学的検索、BALF採取後にホルマリンで浸漬固定した組織標本の病理組織学的検索の追加、曝露したナノマテリアルの肺から縦隔部への移行を検索する目的で縦隔組織負荷量の測定と縦隔の病理組織検査を追加した。

本年度は令和元年度の吸入曝露物質とした「毛玉状凝集型」モデルに加えて、平成30年度に吸入曝露実験を行った「粒状凝集型」モデルと「長繊維貫通型」モデルについても解析を継続して、マクロファ

ジによるナノマテリアルの貪食で想定される3つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報整備を企画した。

## B. 研究方法

モデルナノマテリアルとして球状粒子のTiO<sub>2</sub>、及び長繊維の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のMWNT-7とMWCNT-Nの3種類を選択した。TiO<sub>2</sub>は良く分散した球状粒子で一次粒子の径は30nmとされ、二次粒子も貪食した肺胞マクロファージの胞体内に完全に納まるサイズである。MWNT-7の原体には単離繊維と単離繊維が絡まった凝集体、及び製造時に生じた凝固体が混在している。MWCNT-Nの原体は肉眼観察で黒色のフレーク状を呈し、走査電子顕微鏡による観察では不織布状となっているが、分散化処理をしたものではナノサイズの幅の単離繊維とそれが緩やかに絡まった凝集体が混在している。

令和元年度は、MWCNT-N(日機装株式会社、NIHS 保有)を0(キャリアーエア吸入)、0.6と1.3 mg/m<sup>3</sup>の濃度でC57BL/NcrSlc雄性マウスにカートリッジ直噴式全身曝露吸入装置であるTaquann直噴式全身曝露吸入装置を用いて、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の曝露を行い、曝露終了日(0週)、1週、4週及び8週後に解剖・採材を行って、それぞれの分担研究の目的にあった解析を行った。また、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 石丸)と病理組織学的評価研究(分担 相磯)では平成30年度に吸入曝露実験を実施したTiO<sub>2</sub>とMWNT-7について継続解析を行った。30年度に吸入曝露実験はTiO<sub>2</sub>とMWNT-7を、それぞれ3、30mg/m<sup>3</sup>の濃度で令和元年度と同様、C57BL/NcrSlc雄性マウスにTaquann直噴式全身曝露吸入装置(ver. 3.0)を用いて、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の曝露を行い、曝露終了日(0週)、1、4週及び8週後に解剖・採材を行った。

3種類のモデルナノマテリアルは肺の深部にまで到達可能なサイズの粒子を揃えるため、Taquann法による分散処理を行って吸入曝露実験に供試した。

各分担研究者の研究方法を以下に示した。

## 1. ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究(高橋)

先行研究で開発した高分散乾燥検体を得るTaquann法で処理した検体を、Taquann直噴式全身曝露吸入装置 ver. 3.0を用いて吸入曝露実験を実施した。曝露チャンパー内のエアロゾル濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m<sup>3</sup>)測定を並行して行った。エアロゾルの粒度分布はMicro-Orifice Uniform Deposit Impactors(MOUDI)を用いた。

動物は、C57BL/NcrSlc雄性12週齢を使用し、2hr/day/week、5週間(合計10時間)の全身曝露吸入を行い、曝露終了日(0週)、1、4週及び8週後に定期解剖を行ってナノマテリアルの組織負荷量の測定、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究、及び病理組織学的評価研究の分担研究に生体サンプル提供した。

## 2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定(大西)

MWCNT-N(T-CNTN)の肺内と縦隔での沈着量を測定して負荷量のデータを収集した。

多層カーボンナノチューブの一種で「毛玉状凝集型」モデルとして選定したMWCNT-Nの負荷量の測定はホルマリンで固定した組織をアルカリ溶液で溶解し、溶解液中に含まれる多層カーボンナノチューブをBenzo[ghi]perylene(BgP)をマーカーとした蛍光強度を高速液体クロマトグラフ(HPLC)で測定、検量線から求めた直線回帰式を用いて検体の組織内沈着量を求めた。

なお、平成30年度に報告した「長繊維貫通型」モデルとして選定したMWNT-7は令和元年度のMWCNT-Nと同様にBenzo[ghi]perylene(BgP)をマーカーとして利用した方法で測定した。「粒状凝集型」モデルの二酸化チタンは冷凍保存した組織を強酸で溶解し、原子吸光の測定値を検量線から求めた直線回帰式を用いて検体の組織内沈着量を求めた。

## 3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究(石丸)

吸入曝露実験で得られたサンプルについて、以下の解析を行った。

フローサイトメータ解析による BALF、頸部リンパ節、脾臓を用いたリンパ球表面マーカーの発現解析、マルチプレックス解析による BALF を用いた各種サイトカインの解析、定量化 RT-PCR 法による BALF と肺サンプルを用いた mRNA 発現量の解析を実施した。

MWCNT-7 と TiO<sub>2</sub> の全身吸入曝露による影響に関して、BALF 細胞のフローサイトメータ解析の結果は、すでに報告している(平成 30 年度報告書)。今年度はその継続解析として、BALF 中の各種サイトカイン濃度をマルチプレックス解析した。

#### 4. 病理組織学的評価研究(相磯)

平成 30 年度の吸入曝露実験のスケジュールの関係で、平成 30 年度物質の「粒状凝集型」モデルの TiO<sub>2</sub> と「長繊維貫通型」モデルの MWNT-7 を曝露して得たサンプルの解析を令和元年度に継続実施し、令和元年度物質の「毛玉状凝集型」モデルとした MWCNT-N の解析と併せて、マクロファージがナノマテリアルを貪食する結果、想定される 3 つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報整備を企画した。

BALF 塗抹を材料にした検索では、白血球百分比と塗抹細胞の詳細な形態学的検索を行った。

肺の病理組織学的検査では、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けた灌流固定と、気道を介し肺内に固定液を注入した浸漬固定の二通りの固定材料を用いた肺の病理組織標本作製し、詳細な形態学的検索を行った。吸入肺曝露した検体の肺から縦隔への移行の状態を調べる目的で縦隔部の組織全に渡り 3mm 幅で切り出した組織切片について詳細な形態学的検索を行った。

BALF 細胞と病理組織標本の詳細な検索では、通常の病理組織学的検査で使用される 4 倍～40 倍の対物レンズを用いた観察に加えて、対物レンズ 100 倍(油浸)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がない Tagged Image File Format (TIF) で保存、画像処理ソフト「Adobe Photoshop」で横 80 x 縦

60mm、解像度 600 pixel/inch の psd.形式とし、さらに縦横 4 倍に拡大して、拡大倍率 2000 倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

縦隔の病理組織学的検索でもナノマテリアルの沈着を疑う所見に対し、当該病理組織標本のカバーガラスを外して走査型電子顕微鏡によるサブミクロンレベルの検索を行った。

#### (倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、遺伝子組換え生物等の使用等の規則による生物多様性の確保に関する法律(平成 15 年法律第 97 号)及び日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程(平成 28 年 4 月 1 日)、国立医薬品食品衛生研究所では国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程(平成 19 年 4 月 1 日)を遵守した。

#### C. 研究結果

各分担研究の結果を以下に示した。

##### 1. ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

MWCNT-N の全身曝露吸入を計画に従って実施し、曝露後 0、1、4 おび 8 週後にサンプリングして各分担研究者に提供した。MWCNT-N の曝露濃度は 1、3mg/m<sup>3</sup> を目標としたが、実際に曝露できた濃度は目標濃度の約半分であった。

MWCNT-N の吸入曝露実験の曝露濃度(質量濃度)は低濃度、高濃度群それぞれ  $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、平均 CPC カウントは、低濃度群、高濃度群それぞれ  $503 \pm 150/\text{cm}^3$ 、 $1,107 \pm 246/\text{cm}^3$  であった。空気動学的質量中位径(MMAD)は低濃度群、高濃度群それぞれ  $640 \sim 3,708 \text{ nm}$ ( $\text{g}: 8.6 \sim 34.0$ )、 $1,617 \sim 3,474 \text{ nm}$ ( $\text{g}: 11.5 \sim 26.7$ )であった。吸入曝露装置の曝露チャンバーからサンプリングした MWCNT-N のエアロゾルの形状を確認したところ、単離繊維とともに毛玉状に凝集しているものも認められ、その直径(長軸)は  $8 \sim 200 \mu\text{m}$  程度の大きさであった。実験期間を通して、質量濃度は目標濃度の約半分であり、エアロゾル化効率は 30% 未満であった。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。

## 2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

MWCNT-N  $1.3 \text{ mg/m}^3$  曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後 0 週で  $14.38 \mu\text{g/g}$ 、1 週で  $10.96 \mu\text{g/g}$ 、4 週で  $5.37 \mu\text{g/g}$ 、8 週は  $3.77 \mu\text{g/g}$  であった。曝露後 0 週から 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は 0 週の約  $1/3$  となる減衰が示された。半減期は約 3.5 週であった。

MWCNT-N  $0.6 \text{ mg/m}^3$  曝露群のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後 0 週で  $8.84 \mu\text{g/g}$ 、1 週で  $5.51 \mu\text{g/g}$ 、4 週で  $2.69 \mu\text{g/g}$ 、8 週は  $2.41 \mu\text{g/g}$  であった。曝露後 0 週から 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は 0 週の約  $1/3$  となる減衰が示された。半減期は約 3.5 週であった。

なお、MWCNT-N  $1.3 \text{ mg/m}^3$  と  $0.6 \text{ mg/m}^3$  曝露群の縦隔と対照群(キャリアーエア吸入)の肺と縦隔に MWCNT-N は検出されなかった。

令和元年度と平成 30 年度の解析結果と併せて、3 つのタイプのモデルナノマテリアルによる呼吸器への生体影響について肺負荷量の観点から比較解析した結果を以下に示した。

研究班で実施した吸入曝露の条件下での検体の肺負荷量は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期は約 3.5 週間であり、各モデルナノマテリアルの吸

入曝露実験を行った肺は、マクロファージによる肺からのクリアランスが阻害されない負荷状態であったことが示された。また、曝露後 0 週を基準としたときの曝露後 8 週の検体の肺内残存率は MWNT-7: 32%; MWCNT-N: 27%;  $\text{TiO}_2$ : 17% で、曝露後 0 週での検体負荷量のおおよそ 30% ~ 15% が肺内に残存していることが示された。肺内残存率は MWNT-7 が最も多く、MWNT-7 は肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。残存率でみると  $\text{TiO}_2$ (粒状凝集型)は MWNT-7 と MWCNT-N よりもクリアランスされ易く、曝露後 0 週の肺負荷量の  $1/6$  程度が 8 週後の肺内に残存していた。一方、肺 1g 当たりの検体沈着量でみると、曝露後 8 週の  $\text{TiO}_2$  曝露群(曝露濃度:  $30 \text{ mg/m}^3$ )、MWNT-7 曝露群(同:  $3 \text{ mg/m}^3$ )、MWCNT-N 曝露群(同:  $1.3 \text{ mg/m}^3$ )の値は、それぞれ  $25.85$ 、 $9.15$ 、 $3.77 \mu\text{g}$  で、 $\text{TiO}_2$  曝露群の沈着量が最も多く、MWNT-7 群の 2.8 倍であった。

各モデルナノマテリアルとも対照群の肺と縦隔、曝露群の縦隔に検体の沈着は検出されなかった。

## 3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

平成 30 年度の研究で積み残しとなった MWNT-7 と  $\text{TiO}_2$  の吸入曝露実験で採取したサンプルについての、BALF 細胞並びに肺組織(BALF 採取後)における遺伝子発現解析と BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析を令和元年度に実施した。

なお、考察に必要な平成 30 年度に報告した BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析結果を付記した。

BALF 細胞での mRNA 発現は次の通り。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-7 曝露で MMP12 と IL-6 の mRNA 発現が増加したが、 $\text{TiO}_2$  曝露では MMP12 と IL-6 の mRNA 発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MWCNT-7 曝露で CD204 と MARCO の mRNA 発現が上昇する傾向にあった(有意差なし)。 $\text{TiO}_2$  曝露で CD36 の mRNA 発現が曝露後 4 週と 8



週で上昇した。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、MWCNT-7 で Cox2 の mRNA 発現が曝露後 0 週に上昇(有意)し、1 週にも有意な上昇がみられた。

肺組織での mRNA 発現は次の通り。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-7 曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 1、4 週で有意に上昇、IL-6 の mRNA 発現が曝露後 1 週に上昇した。TiO<sub>2</sub> 曝露で IL-6 の mRNA 発現が曝露後 1 週に上昇した。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MWCNT-7 曝露で MARCO、CD204、CD36 の mRNA 発現が曝露後、1 週に上昇した(MARCO で有意差あり、CD204 と CD36 には有意差なし)。TiO<sub>2</sub> 曝露で CD204 と CD36 の mRNA 発現が曝露後、1 週に上昇した(有意差なし)。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、MWCNT-7 曝露で iNOS と Cox2 の mRNA 発現が上昇した。iNOS の mRNA 発現は曝露後 0 週に大きく上昇(有意)、Cox2 の mRNA 発現は曝露後 1 週に上昇が示された(有意)。TiO<sub>2</sub> 曝露では iNOS と、Cox2 の mRNA 発現上昇はなかった。

BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析は次の通り。MWCNT-7 の曝露によって、曝露後 0 週に VEGF および IL-12 の濃度が上昇(有意差無し)、IL-12 は曝露後 8 週においても発現上昇が示された。TiO<sub>2</sub> 曝露では曝露後 0 週に IL-4 の発現上昇が示された。

.....

< 付記 > BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析(平成 30 年度報告)

MWNT-7 の曝露で曝露後 0 週に生細胞の減少、肺泡マクロファージ(CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>、F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>)の減少、好酸球の増加、単球、CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの増加、M2 マクロファージ(CD206<sup>+</sup>)の増加が示された。これらの変化は、その後、次のような経時的推移を示した。

肺泡マクロファージ(CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>)の減少は、4 週以降に漸増して 8 週に対照群のレベルに回復した。肺泡マクロファージ(CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>、F4/80<sup>+</sup>、CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>)の減少は、4 週まで減少が持続、8 週

に回復した。好酸球の増加は、曝露後 1 週まで増加、4 週以降低下して対照群のレベルに回復した。M2 マクロファージ(CD206<sup>+</sup>)の増加は、曝露後 1 週に回復した。単球と CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>マクロファージの増加は、曝露後 1 週をピークに 8 週まで持続した。

TiO<sub>2</sub> の曝露では、BALF 中の免疫担当細胞への影響はなかった。

.....

令和元年度の、MWCNT-N の吸入曝露実験で採取したサンプルを用いて、BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析、BALF 細胞並びに肺組織(BALF 採取後)における遺伝子発現解析、BALF 中の各種サイトカイン濃度のマルチプレックス解析を実施した。

BALF 中の免疫担当細胞のフローサイトメトリー解析の結果は次の通りである。MWCNT-N の曝露後 0 週に生細胞の割合に変化はなく、好酸球、単球、各肺泡マクロファージ分画の割合に有意な影響はなかった。曝露後 1、4、8 週においても BALF 分画細胞の割合に変化はなかった。曝露後の経時的変化においても、肺泡マクロファージ(CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>)の分画が占める割合はほぼ一定のレベルで推移し、対照群と比較して大きな変化はなかった。肺泡マクロファージの各種スカベンジャー受容体の CD36、CD163、及び CD206 の発現に MWCNT-N 曝露による影響は認められなかった。

BALF 細胞での mRNA 発現は次の通りである。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-N の曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 0 週の低濃度群、曝露後 1 週の低濃度群と曝露後 8 週の高濃度群で上昇が示された(いずれも有意差無し)。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現については、MWCNT-N の曝露で MARCO の mRNA 発現が各週で上昇(有意差無し)、SRB1 の mRNA 発現が曝露後 0、4、8 週週で上昇(有意差無し)が示された。

肺組織での mRNA 発現は次の通りである。炎症関連酵素・サイトカインの発現は、MWCNT-N の曝露で MMP12 の mRNA 発現が曝露後 0、4、8 週の全ての解析週で有意な上昇が示された。スカベンジャー受容体関連遺伝子の発現は、MARCO の mRNA 発現

が曝露後 1、2 週で上昇(有意差あり:曝露後 0、1 週での低濃度、高濃度曝露群)が示されたが、SRB1 の mRNA 発現には、曝露後 0、1、4、8 週のどの解析週にも MWCNT-N 曝露の影響はなかった。酸化ストレス関連遺伝子の発現で、Cox2 の mRNA 発現増加が曝露後 0 週の低濃度および高濃度曝露群で示された(有意差あり)。他の解析週では Cox2 の mRNA 発現に MWCNT-N 曝露の影響はなかった。

なお、MWNT-7 で発現の増加が示された IL-6 mRNA は、いずれの解析週も MWCNT-N 曝露の影響はなかった。

BALF 中の各種サイトカイン濃度を調べたマルチプレックス解析の結果は次の通りである。

下記 20 項目の解析のなかで、MWCNT-N の曝露による変化が示されたのは、曝露後 1 週に高濃度群で VEGF の上昇(有意差無し)だけであった 解析項目:IL-1 alpha、IL-1 beta、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-10、IL-12 (p40/p70)、IL-13、IL-17、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 、IP-10、KC、MIG、MCP-1、MIP-1 alpha、TNF- alpha、VEGF、FGF basic

#### 4. 病理組織学的評価研究

病理組織学的研究は、平成 30 年度から肺の病理組織学的解析に BALF の形態学的解析と縦隔の病理組織検査を追加して、BALF の形態学的解析、肺と縦隔の病理組織検査を実施した。以下、順にその結果を記す。

BALF の形態学的解析では、白血球百分比と BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析を行った結果を以下に示す。

白血球百分比を調べた結果では、三種類のモデルナノマテリアルの曝露実験で採取した BALF 細胞のほとんど全てがマクロファージであることが示され、急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はなかった。

塗抹細胞の詳細な形態学的解析を行った結果、以下のことが判明した。

TiO<sub>2</sub> 曝露群では、マクロファージに TiO<sub>2</sub> を貪食したものと非貪食のものが認められた。貪食能示す肺胞マクロファージを Type A 肺胞マクロファージ(以下、

Type A マクロファージ)、貪食能示さない肺胞マクロファージを Type B 肺胞マクロファージ(以下、Type B マクロファージ)と称した。Type A マクロファージには単独で存在するものと複数が相互に接触ないし接合したクラスターとして存在するものが認められ、クラスターを形成する Type A マクロファージは、胞体の好塩基性の色調が強かった。Type A 肺胞マクロファージは、TiO<sub>2</sub> を内包した状態で変性所見を認めるものや、核クロマチンの核外への伸び出しなどの形態変化をしたものも認められた。TiO<sub>2</sub> 曝露実験では Type B マクロファージの出現は少ないが、TiO<sub>2</sub> を貪食した Type A マクロファージの中には Type B マクロファージと接合したものや、形態が変化した別の Type A マクロファージに付着するものがみられた。

MWNT-7 曝露群にも検体を貪食する Type A マクロファージと非貪食の Type B マクロファージが認められた。貪食によって様々な長さや太さの繊維状物質を胞体内に蓄積した Type A マクロファージは、TiO<sub>2</sub> で見られたものよりも強く青紫を帯び、細胞突起を伸ばしたのも認められた。MWNT-7 を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも多く、TiO<sub>2</sub> で認められたものよりも胞体は大型化し、胞体の色調は好塩基性が顕著で濃青紫を呈した。二核以上の多核細胞や多核巨細胞、クラスターを構成するマクロファージ同士が細胞突起を伸ばして強固に接合した所見も認められた。多核巨細胞にはラングハンス型巨細胞の様に核が辺縁に沿って馬蹄形に配列するものも認められた。MWNT-7 の凝集塊を囲む 4~10 細胞程度の Type A マクロファージのクラスターを基本単位として、それらが融合することにより長径が 100  $\mu$ m を超える大きなクラスターを形成したものが認められた。一方、Type B マクロファージについては、細かい MWNT-7 のトラップを示唆する所見が示された。MWNT-7 の曝露では、Type A と Type B が混在するクラスターでは Type A の方が主体占め、Type B はすくなかった。

MWCNT-N 曝露群にも検体を貪食した Type A マクロファージと非貪食の Type B マクロファージが認められた。Type A マクロファージに貪食されて胞体内に取り込まれた MWCNT-N は当初に予測したような毛

玉状凝集ではなく、細く長い繊維の状態が存在していた。MWCNT-N を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも認められたが、MWNT-7 で認められたものに比較して胞体の大型化や濃青紫に染色される好塩基性は顕著ではなく、二核以上の多核細胞の出現はほとんど認められなかった。MWCNT-N においても、Type B マクロファージによる細かい検体のトラップを示唆する所見が認められた。本研究で曝露された MWCNT-N のエアロゾルには直径(長軸)が 8~200  $\mu\text{m}$  程度の凝集体が存在することが確認されており(吸入曝露分担 高橋)、緩やかに絡まって広がった凝集体(Type B マクロファージの胞体よりも、面積において大きな広がりをもつ)に対する異物処理では、Type B マクロファージがクラスターを形成することで、より広い面積で検体をトラップしていると考えられる所見がみられた。MWCNT-N では Type A と Type B マクロファージが混在して大きなクラスターを形成したケースが多く、集簇したマクロファージの核は、クラスターの中央部に不規則にオーバーラップするように密集し、多数の MWCNT-N がび漫性に付着している様子が認められた。MWCNT-N では MWNT-7 でみられた多核巨細胞や、胞体が著しく肥大し濃青紫色を呈する Type A マクロファージが検体の凝集塊を取り囲むクラスターは認められなかった。

肺の病理学組織的評価で以下の結果を得た。

三種類のモデルナノマテリアルの曝露で、曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期にも肺に好中球浸潤を伴う急性炎症、その他明確な毒性影響を認めなかった。

肺組織の詳細な形態学的解析で得た結果の中から、カテゴリー評価考える上で重要と思われるものを以下に示した。

TiO<sub>2</sub> 曝露群では、肺内に認められる TiO<sub>2</sub> 貪食したマクロファージは少なく、灌流固定をした肺であっても曝露後 0 週に TiO<sub>2</sub> 貪食したマクロファージが散見された程度であった。曝露後 8 週の肺には TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージの残留をほとんど認めなかった。BALF 採取後に浸漬固定した曝露後 8 週の肺の標本で

TiO<sub>2</sub> が肺内に固着されている状況を精査した。病理組織学的検査で常用する観察倍率では病変を確認することができないが、対物 100 倍で撮影した肺組織の画像を、デジタル拡大を行って詳細に検索すると、マクロファージが貪食した TiO<sub>2</sub> を胞体内に保有した状態で肺組織に付着、それに対する毛細血管の増加などの極めて微小な組織学的変化が起きていることが判明した。

MWNT-7 曝露群では、曝露後 0 週から 8 週までの各解剖期で、細気管支から肺胞管に至る気腔内に MWNT-7 を貪食した肺胞マクロファージによる島状集簇塊など MWNT-7 を取り込んだ肉芽腫性病変の形成が顕著に認められた。BALF 塗抹所見と病理組織所見から、MWNT-7 を貪食したマクロファージは大・小のクラスターを形成して肺組織に付加・固着されることが示された。曝露後 8 週の肺(浸漬固定標本)に、細気管支から続く肺胞管の内腔が末梢に向かうほど広く拡張し、肺気腫を思わせる所見を認めた。最も強く内腔拡張がみられる肺胞管末梢側の端部に肺胞壁の肥厚を認め、この肥厚部には煙状の淡灰色の不定形物質がマクロファージにオーバーラップするように沈着した所見を認め、煙状の淡灰色の不定形物質は光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

曝露後 8 週の肺に気道周囲の間質組織に Masson trichrome 染色で青色に染まる領域の増加を認め、好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見がなくても膠原繊維の軽度な増加が起こることが示された。

MWCNT-N 曝露群では、MWCNT-N を吸入曝露した肺は、灌流固定標本、浸漬固定標本ともに常用される倍率での病理組織検査では目立った変化は認められなかった。100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支から肺胞管に至る領域で複数の肺胞マクロファージが MWCNT-N を囲んだ小型の集簇巣を認めた。その分布は MWCNT-N 曝露群と基本的に同様であったが、顕微鏡で認識するのは困難であった。MWCNT-N を囲んだ肺胞マクロファージの小型集簇巣の内部に透けるような不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着

物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた。

縦隔組織の詳細な形態学的解析を行った結果、以下の知見を得た。

常用される倍率での病理組織検査では、三種類のモデルナノマテリアルの吸入曝露で縦隔に目立った変化を認めなかった。100倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で以下の所見を認めた。

TiO<sub>2</sub>曝露群では、極めて稀にTiO<sub>2</sub>貪食マクロファージが縦隔組織内で線維(膠原線維、細網線維)に付着していた。

MWNT-7曝露群では、MWNT-7貪食マクロファージが単独またはクラスターを形成して縦隔の疎性結合織に付着していた。縦隔組織内に認めたMWNT-7貪食マクロファージのクラスターはBALF塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと類似した形態を示した。肺から縦隔に移行できるサイズに上限があるようで、縦隔に移行したクラスターの最も幅が広いところで30µm程度で、縦隔内に比較的多く認められる獣毛の断面(毛髄質の細胞と毛皮質の染色性とを失う)の径は20µm程度であった。縦隔部リンパ節に曝露後0週に少数の細いMWNT-7が認められ、曝露後8週ではその数が増加している様子が示された。縦隔部リンパ節には、MWNT-7曝露群の縦隔の疎性結合組織内に認められたようなMWNT-7貪食マクロファージのクラスターは認められなかった。

MWCNT-N曝露群では、極めて稀にマクロファージと灰色を帯びた煙状の不定形物質が縦隔の組織と癒合したと考えられる所見が認められ、この不定形物質をMWCNT-Nと推定して、当該病理組織標本のカバーガラスを外した組織切片を透過型電子顕微鏡で2000倍まで拡大した観察した結果、光学顕微鏡で観察された灰色を帯びた煙状の不定形物質と同様の形状、大きさの固形物が縦隔の組織と癒合している所見を認めた。

#### D. 考察

各分担研究者の研究成果は下記のように考察さ

れた。

### 1. ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

吸入チャンバー内のMWCNT-Nのエアロゾルの形状を確認すると単離繊維とともに凝集体も多く認められた。MWCNT-NはMWNT-7に比較して繊維径が細く、分散されてエアロゾル化したMWCNT-Nが、再凝集する可能性が考えられた。

MWCNT-Nは、原末の形状からエアロゾル化は非常に困難と考えられたが、Taquann法により高分散検体が得られ、また、Taquann吸入曝露装置Ver3.0によりエアロゾル化が可能であった。しかし、質量濃度は低用量、高用量ともに目標濃度の半分程度であった。MWCNT-NはMWNT-7に比較して繊維径が細いため、検体の分散化処理(Taquann法)過程でtert-ブチルアルコール(TB)懸濁液を金属製フィルターでろ過する際に、フィルターに絡まりやすく濾過効率が低いことを経験している。MWCNT-Nはエアロゾル化したものがチャンバー内で細い繊維が絡まりあって再凝集している可能性が考えられた。

MWCNT-Nの繊維長はMWNT-7とほぼ同等であるが、繊維径は細く絡まりやすいため、分散されてエアロゾル化したものが再凝集する可能性が考えられた。

### 2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定

曝露終了日、1、4および8週後における肺の検体沈着量を測定して、休薬期間における肺負荷量の経時的な推移を調べた。その結果、0.6mg/m<sup>3</sup>群1.3mg/m<sup>3</sup>群とも曝露終了後8週後の肺負荷量は曝露直後の約1/3に減衰し、半減期は約3.5週間であり、マクロファージによる肺からのクリアランスの障害を起さない負荷状態であったことが示された。

令和元年度は平成30年度に実施したTiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)とMWNT-7(T-CNT7)の測定結果と併せて、3つのタイプのモデルナノマテリアルによる肺負荷量の推移について比較解析を行った。その結果、実施した吸入曝露条件下で、肺での検体負荷量の推移

は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約 3.5 週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスが阻害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また 3 つのタイプのモデルナノマテリアル全体としてみると、曝露終了後 8 週間には曝露終了時の負荷量のおおよそ 30% ~ 15% の検体が肺内に残存していることが示された。残存率は MWNT-7 が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub> は MWCNT (MWNT-7, MWCNT-N) と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の約 1/6 が肺内に残存していることが示された。

### 3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

平成 30 年度に令和元年度まで継続した MWCNT-7 または二酸化チタンを曝露した肺の遺伝子発現解析の結果、BALF 細胞における MMP12 mRNA 発現は、これまでの報告と同様に、MWCNT-7 の曝露で大きく上昇し、逆に、TiO<sub>2</sub> の曝露では MMP12 mRNA の発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体遺伝子あるいは酸化ストレスに参与する Cox2 遺伝子の発現にも MWCNT-7 と TiO<sub>2</sub> の曝露で違いが生じていた。肺組織においても MWCNT-7 と TiO<sub>2</sub> の曝露でそれぞれの遺伝子発現に違いが確認されたことから、ナノマテリアルの性状の違いがマクロファージを中心とした肺免疫の反応性が大きく影響を受けることが判明した。BALF 中の各種サイトカインの濃度に関して、検出できたのが VEGF、IL-12、IL-4 であり、MWCNT-7 の曝露後 0 週に VEGF と IL-12 の濃度の上昇があった。TiO<sub>2</sub> とのナノマテリアルの性状の相違によってサイトカイン分泌にも影響がでることがわかった。

また、今年度の研究では フローサイトメータを用いた細胞分画の解析では、BALF 細胞中の生細胞の割合は MWCNT-N 曝露では影響が観察されなかった。H29 および H30 年度に実施した MWCNT-7 を用いた曝露実験では、曝露後 BALF 細胞の生細胞の割合が急激に減少し、その後経時的に増加していたが、MWCNT-N 曝露では生細胞の割合に関して、

各解析週で曝露による影響は観察されなかった。この所見は MWCNT-N と MWCNT-7 の形状の相違が起因しているものと考えられた。

BALF 細胞中の好酸球、単球、肺泡マクロファージあるいは肺泡マクロファージの各分画 (F4/80, CD11b<sup>+</sup>F4/40<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>) に関して、各解析週で MWCNT-N の曝露による影響は観察されなかった。このことも、MWCNT-7 との相違点としてあげられた。

肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現に関しては、細胞表面上の発現には大きな変化は認められなかったが、BALF 細胞あるいは肺組織における MARCO および SRB1 mRNA の発現が MWCNT-N 曝露で変化していたことから、カーボンナノマテリアルの処理にスカベンジャー受容体が関与していることが示唆された。

カーボンナノチューブの吸入曝露により肺泡マクロファージあるいは MMP12 の発現が上昇することが明らかになっている。今年度の実験においても、BALF 細胞あるいは肺組織の MMP12 mRNA 発現は MWCNT-N 曝露によって上昇した。一方で、MWCNT-7 曝露での BALF 細胞の mRNA 発現は対照群に比較して約 100 倍程度の増加が認められたのに対して、MWCNT-N 曝露では 10 倍程度であることから、ナノマテリアルの形状によって MMP12 の発現自体にも影響があることが明らかになった。

BALF 中のサイトカインの濃度に関しては、アッセイ系での検出限界の問題もあり、今回は VEGF のみの結果となった。MWCNT-7 曝露においても VEGF の濃度は高くなっていたので、程度の差はあるものの MWCNT-N 曝露による肺傷害に対する修復の機転が作動しているものと推測できる。

MWCNT-N の吸入曝露によって、MWCNT-7 曝露に比較して肺泡傷害は軽度であり、肺のマクロファージを中心とした免疫システムに大きな影響を与えていない可能性が考えられた。

### 4. 病理組織学的評価研究

粒子状ナノマテリアルの TiO<sub>2</sub> は、曝露後 8 週の通常の観察倍率による病理組織検査で還流固定を行った病理組織標本、BALF 採取後に浸漬固定を行っ

た病理組織標本のいずれにおいても肺内に  $\text{TiO}_2$  を貪食したマクロファージや  $\text{TiO}_2$  粒子はほとんど認められず、炎症等の肺毒性影響は見られなかった。この結果について当初、マウスの肺内に吸引された  $\text{TiO}_2$  の大部分が肺胞マクロファージに貪食されて肺外に移送され、病理組織学的にも肺内に残留する  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージは殆ど認められなかったことから、肺内に残留する  $\text{TiO}_2$  は MWNT-7 とは比較にならないほど少なく、毒性学的にも問題になるものではないと考えていた。しかし、組織負荷量測定を分担した大西の結果から曝露後 8W における肺 1g 当たり  $\text{TiO}_2$  の残存量は MWNT-7 群曝露群の 2.8 倍であることが示された。

BALF 塗抹標本の精査で、 $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージは変性によって膨化・透明化した胞体内に  $\text{TiO}_2$  を包含した状態で BALF 中に存在することが判明し、変性によって膨化・透明化した胞体を有する  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージが肺胞壁などの肺組織に付着して存在すると推察された。肺内に残存した  $\text{TiO}_2$  の所在を顕微鏡の対物レンズを 40 倍から 100 倍 (油浸) に替えて撮影した画像をデジタル拡大して仔細に観察すると、 $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージが肺胞壁に取り付いたまま器質化され、当該の肺胞壁の粗造化、毛細血管の新生と考えられる所見を認めた。また、 $\text{TiO}_2$  を曝露したマウスに、一匹ではあるが限局性の肉芽腫性病変に多数の  $\text{TiO}_2$  が含まれていた。この病変も将来、膠原線維に埋没した状態で  $\text{TiO}_2$  が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

肺の最も重要な機能は肺胞壁の「空気 血液関門」を通して行われる酸素と炭酸ガスの交換である。「空気 血液関門」は Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管内皮細胞及び基底膜で構成される。Ⅱ型肺胞上皮細胞の細胞質はきわめて薄く ( $0.5 \mu\text{m}$ ) 引き伸ばされて肺胞毛細血管に密着し、基底膜を両者が共有することでガスの通過を容易にする構造となっている。

肺胞壁に  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージが付着すると、肺胞壁でのガス交換が阻害されるため、付着した  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージが器質化されて、それを足場として Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管がセットで表層に新生される肺胞壁のリモデリングが生じると考え

られた。本研究班の吸入実験は  $30\text{mg}/\text{m}^3$  の濃度で 1 日に 2 時間の曝露を週 1 回、5 週間にわたって繰り返したもので、1 週間に 2 時間の曝露を 1 回行う程度であれば、次週の曝露までの間に Ⅱ型肺胞上皮細胞と毛細血管によるリモデリングは完了して肺胞壁の塑造化と新生毛細血管が所見として認識される程度の極めて微弱な変化として現れたものと考えられた。それぞれの変化は微弱なものであっても、こうした変化が肺胞域全域に生じていると想定すると、かなりの量の  $\text{TiO}_2$  が肺胞壁に沈着していると考えられる。

繊維状ナノマテリアルの MWNT-7 と MWCNT-N では、吸入曝露した繊維の物理学的性状が異なり、繊維の太さと長さ、凝集体の性状の違いによって異物処理に係る肺胞マクロファージの種類と処理方法が異なることが判明した。吸入曝露でエアロゾル化される Taquann 法で分散化処理を行った MWNT-7 には、単離した繊維と単離繊維が絡まった凝集体、製造時の焼成の際にできる凝固体が含まれる。

エアロゾル化された単離繊維には、50 nm 程度の細いものから  $1\mu\text{m}$  を超える太いものまで様々な幅の繊維が含まれ、平均幅と標準偏差は  $115 \pm 74 \text{ nm}$  (Taquahashi et.al., JST, 2013;38(4):619-28) で、凝集体は鉄よりも強靱とされている MWNT-7 の太い繊維と細い繊維が複雑に絡まった強靱な構造となっている。

一方、多層カーボンナノチューブのなかでも、グラフェンシートの巻数が少ない MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、SEM 画像では単離した繊維の幅はほぼ均一な様相を呈し、凝集体は細く均一な幅の単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造となっている。

本分担研究で形態学的に BALF 中の肺胞マクロファージを二種類に大別した。ひとつは Type A としたもので胞体が貪食によって肥大し、MG 染色で肥大した胞体が青紫を呈した。Type A マクロファージは MWNT-7 の単離繊維や強靱な凝集体を貪食するとともに、自身で貪食できない大きく強靱な凝集体の処理には、Type A マクロファージが集団で取り囲み、凝集体をクラスターの中心部に包み込む。こうしたクラス

ターを細気管支末梢に付加することでマクロファージが単独で処理することが困難な強靱な MWNT-7 の凝集体を線維化組織の中に埋没させて異物処理を行っていると考えられた。この際に細気管支側の間質から線維芽細胞など線維化に係る細胞が進出することで、線維の増生を促進すると考えられた。BALF 塗抹で MWNT-7 の強靱な凝集体を囲む肥大した Type A マクロファージには、胞体が著しく肥大した多核細胞やラングハンス型巨細胞に類似した核の配列をした多核巨細胞が認められた。これらの Type A マクロファージのクラスターが細気管支終末部に付加された後、線維の増生が進むと MWNT-7 のラット吸入曝露試験で報告されているラングハンス型巨細胞に類似した核配列を示す肉芽腫や線維化病変など MWNT-7 を曝露した肺に特徴的な病態に移行すると考えられた。MWNT-7 を曝露した肺で病理組織学的に異物肉芽腫などの病変がみられるのは細気管支から肺胞管に沿った領域である。この領域には経気道で径 5  $\mu\text{m}$  よりも小さい外来異物の侵入が可能で、肺胞には 1 乃至 2  $\mu\text{m}$  よりも小さい異物しか到達できないとされている。

Taquann 法による検体の分散化処理で平成 29 年度の吸入実験は目開き径 25 $\mu\text{m}$  金属メッシュを濾過に使用したが、平成 30 年度と令和元年度の吸入実験では目開き径を 53 $\mu\text{m}$  のものを使用した。Taquann 法で分散化処理した検体は、先行研究で分散化処理の過程で使用する篩の目の径を超える大きさの凝集体はないことが確認されている(厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業、23-化学-一般-005)。このため平成 30 年度と令和元年度に曝露した検体のエアロゾルは径 53 $\mu\text{m}$  までの凝集体が含まれていたと考えられ、そのうち 5 $\mu\text{m}$  よりも小さいものが呼吸によってマウスの肺の肺胞管まで到達したものが Type A マクロファージによる貪食、クラスター形成による集団処理が行われたと考えられた。このことは、強靱な構造の凝集体が含まれる MWNT-7 の処理を目的と考えられる異物肉芽腫がこの領域に好発することと符合した。

細気管支末梢に接合できなかったクラスターは MWNT-7 の凝集体を包含したまま壊死に陥り、ムコ

シリアリーエスカレーションによって喀痰のように排泄されると推定された。

Type B とした小型のマクロファージは、May-Grünwald Giemsa 染色で胞体が淡桃色を呈し、胞体が青紫に染まる Type A マクロファージとは異なる染色性を示した。Type B とした小型のマクロファージは顕微鏡で視認できるサイズの繊維を明確に貪食している所見は認められず、Type B マクロファージの胞体の外側に分泌される基質のような不定形物質による繊維状ナノファイバーのトラップが推測された。

BULK の MWNT-7 は繊維幅が 100 nm よりも小さいものが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占め、線維長は 5 $\mu\text{m}$  よりも短いものが 52.3% (T. Kasai, et.al.,2014) で、その大多数が光学顕微鏡では視認できないサイズの狭義のナノ繊維である。MWNT-7 と MWCNT-N とともに BALF 塗抹で Type B マクロファージの胞体の外側に分泌されている不定形物質に繊維幅が凡そ 100 nm 程度のナノ繊維がトラップされている様子が観察されたこともこの仮説と符合する。前述したように MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、SEM 画像では単離した繊維の幅はほぼ均一の様相を呈し、凝集体は細く均一な幅の単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造となっている。MWNT-N の吸入曝露実験では、吸入曝露チャンバー内で細く長い繊維が緩やかに絡まった綿菓子のような凝集体が形成されたと考察している(高橋)。本分担研究の BALF 塗抹で幅 30 $\mu\text{m}$  よりも広い範囲に広がった MWNT-N の凝集体を 3 つのマクロファージがクラスターを作って集団でトラップしていると考えられる所見がみられた(分担研究:図-3-3,F)。この所見は異物処理の対象とする MWNT-N の凝集体の広がりが Type B マクロファージより大きいため、Type B マクロファージ単独での異物処理は無理とマクロファージが判断して複数の Type B マクロファージによる協同作業が選択されたものと考えられた。また、30 $\mu\text{m}$  よりも広い範囲に広がった網状の凝集体を Type A マクロファージが貪食して胞体の中に引きこむのも難しく、Type A マクロファージによる貪食ではなく、複数の Type B マクロファージによる協同作業が選択されたものと考えられた。以上のことを勘案すると、肺胞マクロファージに

よる繊維状ナノファイバーの異物処理では、処理の対象となるナノファイバーの物理学的性状(太さ、長さ、凝集体の性状)によって、異物処理にあたるマクロファージの種類と、それによる処理方法が異なると考えられた。

さらに大きな範囲に広がる MWNT-N の凝集体には、Type A と Type B のマクロファージが協働する混合クラスターを形成して異物処理にあたると考えられた(分担研究:図-3-3,J, K)。

これまで報告されている多くの情報は粗大な繊維を貪食するマクロファージ(本研究の Type A マクロファージ)の単独の働きに関するもので、複数のマクロファージによる集団処理には関心が向けられてこなかったが、本研究で得た知見では、粗大な繊維の異物処理は Type A マクロファージの集団処理が主体になっていると考えられ、繊維幅が 100nm よりも細かい繊維状ナノマテリアルは肺胞の末端まで肺内に広く吸引され、その処理には Type B マクロファージによる集団処理の関与が示唆された。繊維幅が 100 nm よりも細かいナノファイバーを光学顕微鏡で視認することは不可能であるが、MWNT-7 曝露群に拡張した肺胞管に面した肺胞域に限局性マクロファージの増生部が存在し、そこに煙状で淡灰色の不定形物質がオーバーラップするように沈着した所見が認められた(分担研究:図-4-2,P)。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であると考えられた(分担研究:図-5-3,E, F)ことから、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

今後は粒子径分布で大多数を占める細かい繊維状ナノマテリアルによる呼吸器毒性に注目する必要がある。macrophage extracellular traps (METs) のようなマクロファージの外来異物の処理機構についても検討してみる必要がある。

MWNT-7 曝露群では曝露後 8 週の気管支周囲の間質組織内に Masson trichrome 染色で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原線維の増加が示唆さ

れた。この部位に膠原線維が増加したメカニズムとして、気道内や肺胞域での肺胞マクロファージの挙動とは異なる可能性が考えられ、今後の解明が必要である。

本研究でモデルナノマテリアルとして選定した TiO<sub>2</sub>、MWNT-7、MWCNT-N はいずれも肺胞マクロファージがクラスターを形成して肺から縦隔に移行、縦隔内に付着して器質化されるものがあることが示された。縦隔に移行した肺胞マクロファージのクラスターは BALF 塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと同様の形態を示したが、その最も幅が広いところで 30 μm 程度であった(分担研究:図-5-2,C)。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面も多く認められた。こうした獣毛の断面の径と肺胞マクロファージのクラスターの径はほぼ等しく(分担研究:図-5-2,C)、獣毛や肺胞マクロファージが肺から縦隔に移行する流路の存在が示唆された。今後、肺から縦隔に移行する流路の解明とこれまで意識されてこなかった縦隔機能の研究が必要と考える。

## 5. 分担研究における総合的な考察

BAL の FCMM 解析で、MWCNT-7 は、曝露後 0 週に BALF 細胞の生細胞、肺胞マクロファージ (CD11c<sup>+</sup>CD11b<sup>-</sup>, F4/80<sup>+</sup>, Cd11c<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) が減少し、4 週以降に漸増して 8 週には対照群のレベルまで回復することが示された。単球と単球の性格を有する肺胞マクロファージ (CD11b<sup>+</sup>F4/80<sup>+</sup>) は曝露後 1 週をピークとした増加が 8 週まで持続した。一方、MWCNT-N と TiO<sub>2</sub> には、これらの変化が示されなかった。研究報告の目的に記した「長繊維貫通型」においては、マクロファージは線維を分解できずに Frustrated phagocytosis を示しつつアポトーシスに至り繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。」とする仮説にもとづくと、これらの免疫担当細胞の変化は、MWCNT-7 を貪食した肺胞マクロファージが細胞死に陥るため、BALF 細胞での割合が減少し、その後に単球や単球の性格を有する肺胞マクロファージの増加によって曝露後 0 週に減少した肺胞マクロファージが補填されたとする理解



が一般的であるが、病理組織学的評価研究から MWNT-7 を吸入曝露した肺では MWNT-7 の単離繊維と強靭な構造の凝集体の処理を目的として、肺胞マクロファージがクラスターを形成し、そのクラスターが肺組織に付着して肉芽腫性病変が形成されることが示された。この知見から免疫制御システムへの影響評価で示された FCM 解析結果を検討すると、クラスターを形成して肺組織に付着した BALF の肺胞マクロファージは FCM では生細胞とは認識されないため、FCM 解析の結果は生細胞と肺胞マクロファージの減少として示されたと考えられた。

遺伝子発現解析で、炎症関連酵素と酸化ストレス関連マーカーに繊維状ナノマテリアルの MWNT-7 と MWCNT-N で共通した遺伝子発現が示された。炎症関連酵素の MMP12 mRNA の強い発現が MWNT-7 曝露群の BALF 細胞と肺組織の両方に認められ、MWCNT-N 曝露群にも弱い発現が BALF 細胞と肺組織の両方に認められた。酸化ストレス関連マーカーの iNOS と Cox2 mRNA の発現が MWNT-7 曝露群の BALF 細胞に、Cox2 mRNA の発現が MWCNT-N 曝露群の肺組織に認められた。これらの遺伝子は MWCNT-N 曝露群よりも MWNT-7 曝露群で強く発現していて、BALF 塗抹や病理組織の詳細な検索で、MWNT-7 の強靭な構造の凝集体の処理にあたる Type A マクロファージが細気管支や肺胞管の気腔内に形成した大きなクラスターが肺組織に付加され、それによって生じる肺の組織構造のリモデリングに関係した変化と考えられた。MWCNT-N についても MWNT-7 よりは弱い同種の組織変化が起きていると考えられた。

スカベンジャー関連遺伝子にも MWNT-7 曝露群と MWCNT-N 曝露群に共通した MARCO の発現が見られた。粒子状の TiO<sub>2</sub> 曝露群では、繊維状ナノマテリアルとは異なる CD204 と CD36 の mRNA の発現が示された。

BALF 塗抹の詳細観察で、MWNT-7 の強靭な構造の凝集体が含まれる検体を貪食した Type A マクロファージに認められた著しい胞体の肥大、May-Grünwald Giemsa 染色での胞体の強い好塩基の色調、多核巨細胞の出現などの所見は Frustrated

phagocytosis を反映した変化と考えられ、免疫機能評価で示された MMP12 mRNA の強発現も MWNT-7 を貪食した Type A マクロファージによる肺組織のリモデリングに関係した変化と推察された。BALF 中のサイトカインを Multiplex 解析した結果でも炎症関連 VEGF が MWNT-7 と MWCNT-N 曝露群に認められ、粒子状の TiO<sub>2</sub> 曝露群に VEGF の変化は検出されなかった。

以上、粒子状物質が曝露される TiO<sub>2</sub> と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが肺負荷量の解析、免疫システムの変動を解析、BALF 塗抹細胞形態学的解析及び病理組織学的の多面的な解析によって示されナノマテリアルの物理学的性状に基づく生体マクロファージの異物処理様式によるカテゴリー評価の可能性が強く示唆された。炎症関連サイトカインの発現 (IL-6、IL-12、IL-4) は、どの検体曝露群においても顕著な発現の上昇は示されなかった (有意差なし)。本研究の吸入曝露条件下では、各検体とも病理組織学的に検体を貪食したマクロファージによる微小な組織学的な変化を生じていたが、免疫学的に炎症関連の遺伝子変化も小さいものであった。

当初の研究計画では外来異物を貪食した生体マクロファージの胞体内で異物の蓄積状態によって「長繊維貫通型」、「毛玉状凝集型」及び「粒状凝集型」の3種類のモデルを想定した。すなわち、異物を貪食するマクロファージ単独の働きだけの単純なものであった。しかし、実際に肺内で繰り広げられる外来異物の処理は、当初想定したような単純なものではなく、マクロファージは肺内に侵入した外来異物の物理化学的性状(形状、長さ、幅、硬さ、量)に応じて最も効率的で肺に炎症等の付加をかけない異物処理方法を選択している様子の一端が本研究で見えて来た。

本研究で、異なる物理化学的特徴を持つ3種類のナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量曝露域での有害性のカテゴリー評価の

基盤となる情報を収集することができた。今後、毒性発現量での量・反応関係を考慮した情報収集が必要と考える。

なお、吸入曝露実験で曝露濃度を複数設定して量反応関係を押さえるには、エアロゾル化する検体の粒子径を呼吸によって肺深部に到達可能な大きさに揃え、各濃度群の粒子径も同じ粒径に揃える必要があり、本年度の MWCNT-N の吸入曝露実験では高濃度群と低濃度群の MMAD と の値が大きく異なる結果となった。絡まりやすい繊維状のナノマテリアルの吸入曝露実験結果で量 反応関係を求めるには、この点について留意する必要がある。

## E. 結論

ナノマテリアルの吸入曝露実験を行って採取した肺のサンプルについて、肺負荷量の解析、免疫システムの変動を解析、BALF 塗抹細胞形態学的検索及び病理組織学的検索から、実際に肺内で繰り返される外来異物の処理は、当初想定したような単純なものではなく、マクロファージは肺内に侵入した外来異物の物理化学的性状(形状、長さ、幅、硬さ、量)に応じて異物処理方法を選択している様子が示された。3 種類のモデルナノマテリアルを肺に炎症を惹起しない低負荷量でマウスを用いた吸入曝露実験を行った結果、粒子状物質が曝露される TiO<sub>2</sub> と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なる結果を得た。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが示された。

以上、本研究では、3 種類の異なる物理化学的性状を示すナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起ささない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における研究での情報収集が必要と考える。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

○ Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno,

Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

○ Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Akihiko Hirose and Jun Kanno,

A long-term whole-body inhalation study of multi-walled carbon nanotube in mice with an improved dispersion and inhalation system, the 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, at the Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA, March 17, 2020, Abstract Number/Poster Board number: 2104/ P452, Poster (Cancelled due to COVID-19)

○ 新垣理恵子, 牛尾綾, 大塚邦紘, 工藤保誠, 石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ吸入曝露初期の肺胞マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月(東京)

○ Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonary immune cells at the early stage, 第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月(福岡)

○ 高橋祐次: 新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発-、JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)

○ 相磯成敏、山野壮太郎、梅田ゆみ、近藤ひとみ、齋藤美佐江、高信健司、妹尾英樹、菅野純:異なる物理学的性状のナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺と縦隔における肺胞マクロファージの挙動. 第36回日本毒性病理学会学術集会、2020年2月14日(東京)

#### **H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

## . 分担研究報告

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究  
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

分担研究課題名: 病理組織学的評価研究

分担研究者	相磯 成敏	独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部長
研究協力者	梅田 ゆみ	同 病理検査室長
	山野 荘太郎	同 病理検査室主任研究員

## 研究要旨

工業的ナノマテリアルの開発と産業応用が急速に進む中、製造者、使用者の健康被害を防止するための規制決定に必要となる基礎的かつ定量的有害性情報が得られる評価法の構築が必要とされている。我々がこれまでに実施してきた実験動物を用いたナノマテリアルの吸入曝露による呼吸器毒性に関する先行研究から、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の胞体内での蓄積様式を「長繊維貫通型\*」、「毛玉状凝集型\*」及び「粒状凝集型\*」の3つの様式に分類すると、それぞれの蓄積様式によって Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)の程度が異なると予測した。そこで、これらの3種類のモデルナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺について、研究を分担した病理組織学的な側面から異物を貪食したマクロファージの胞体内での異物の蓄積様式と、それによって誘発される肺病変を関連付けたナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の収集を企画した。令和元年度は MWCNT-N (毛玉状凝集型)を吸入曝露した肺の解析を実施するとともに、前年度に実験を行った TiO<sub>2</sub> (粒状凝集型)と MWNT-7 (長繊維貫通型)の解析も継続した。本研究で実施した吸入曝露実験では、病理組織所見とBALF塗抹の白血球百分比の結果から肺に病理学的な急性炎症を惹起させない低負荷量域で曝露が行われたことが示された。低負荷量域のナノマテリアルの曝露で肺に及ぼす影響を収集できたことが示された。粒子状物質である TiO<sub>2</sub>と、分散した単離繊維とその凝集体である MWNT-7や MWCNT-N では肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることを明らかにした。以上、本研究によって、3種類のモデルナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における病理組織学的研究での情報収集が必要と考える。

---

(\*)「貫通」とは、繊維が比較的太く強直でありマクロファージの細胞径よりも長いため、マクロファージが貪食した際に繊維の一端または両端が細胞膜を貫通して細胞外に突出した像を呈する状況を指す。「粒状凝集」とは、マクロファージに対して十分に小さな粒子が細胞質内に高密度に凝集して貪食される状況を指す。「毛玉状凝集」とは、柔軟性の高い細い繊維が細胞質内で丸く絡まり、毛玉状に凝集する状況を指す。

## A. 研究目的

ナノマテリアルの産業応用が急速に進展している中、健康被害を防止するための規制決定に必要な基礎的かつ定量的な情報が得られる評価法の構築が必要である。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7 については IARC でグループ 2B の評価がなされたが、他の MWCNT は情報不足のため評価がなされていない。MWCNT 一つとっても多様な特性を有しており、他の多種多様な素材、粒子径、イオン化傾向、表面活性等が複雑に影響して有害性を発現するナノマテリアルの全容は未解明のままである。

国際的に、ナノマテリアルの物理化学的特性、製品運命、曝露評価などを基盤とした有害性のカテゴリー評価が提案されているが、ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり、かつ有害性発現が最も懸念される吸入曝露における *in vivo* 生体反応を反映させるものとはなっていない。先行研究(H26-化学-一般-003)及び(独)日本バイオアッセイセンターで実施された MWNT-7 の発がん試験の成果(Part Fibre Toxicol, 2016)に基づき、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の反応を3つの様式に分類した。すなわち、「長繊維貫通型」:マクロファージのサイズを超える長い単一の繊維では長繊維が胞体を通る状態となる。

「毛玉状凝集型」:柔軟性に富む繊維はマクロファージの胞体内に毛玉状の凝集塊として貯留されると予測される。「粒状凝集型」:マクロファージより小さな粒子は凝集塊として貯留される。「長繊維貫通型」においては、マクロファージは繊維を分解できずに Frustrated phagocytosis(異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)を示しつつアポトーシスに至り、繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。この現象による各種の細胞ストレスが繊維発がん機序の発端として提唱されている。「毛玉状凝集型」と「粒状凝集型」においては、マクロファージの胞体内の蓄積がある量を超えると、Frustrated phagocytosis を引き起こし、最終的にマクロファージはアポトーシスに至ると考えられるが、

そこに至る過程は蓄積物の性状により異なる。したがって、曝露量とサイトカインの種類と放出量の関係は異なると想定される。本研究では、当初、これらの3つの貪食反応を誘発するモデルを用い、マクロファージが発現するレセプター、産生する各種サイトカインを明らかにし、異物を貪食したマクロファージの胞体内での蓄積様式と誘発される肺病変を関連付けすることで、ナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の整備を企図した。研究を進める中で、中間年度に気管支肺胞洗浄液(BALF)を採取して、BALF 塗抹で肺胞マクロファージを形態学的にサブミクロンレベルで検索すると、これまでマクロファージによる異物処理は単独で行われることを想定していたものとは異なり、マクロファージが集団で異物を処理にあたる知見を得た。

この知見に基づき、平成30年度と令和元年度は病理組織学的評価の分担研究に BALF 塗抹での白血球百分比と塗抹細胞の形態学的検索、BALF 採取後にホルマリンで浸漬固定した組織標本の病理組織学的検索の追加、曝露したナノマテリアルの肺から縦隔部への移行を検索する目的で縦隔組織負荷量の測定と縦隔の病理組織検査を追加した。

本年度は令和元年度の吸入曝露物質とした「毛玉状凝集型」モデルに加えて、平成30年度に吸入曝露実験を行った「粒状凝集型」モデルと「長繊維貫通型」モデルについても解析を継続して、マクロファージによるナノマテリアルの貪食で想定される3つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報整備を企画した。

## B. 研究方法

モデルナノマテリアルとして球状粒子の  $\text{TiO}_2$ 、及び長繊維の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の MWNT-7 と MWCNT-N の3種類を選択した。 $\text{TiO}_2$  は良く分散した球状粒子で一次粒子の径は 30nm とされ、二次粒子も貪食した肺胞マクロファージの胞体内に完全に納まるサイズである。MWNT-7 の原体には単離繊維と単離繊維が絡まった凝集体、及び製造時に生じた凝固体が混在している。MWCNT-N の原体は肉眼観察で黒色のフレーク状を呈し、走査電子

顕微鏡による観察では不織布状となっているが、分散化処理をしたものではナノサイズの幅の単離繊維と、それが緩やかに絡まった凝集体が混在している。(表 1)。

令和元年度は、MWCNT-N(日機装株式会社、NIHS 保有)を0(キャリアーエア吸入)、0.6 と 1.3 mg/m<sup>3</sup> の濃度で C57BL/NcrSlc 雄性マウスにカートリッジ直噴式全身曝露吸入装置である Taquann 直噴全身曝露吸入装置(ver. 3.0)を用いて、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の曝露を行い、曝露終了日(0 週)、1 週)、4 週及び 8 週後に解剖・採材を行って、気管支肺胞洗浄液(BALF)並びに肺と縦隔を採取して分担研究の目的である病理組織学的評価に供試した(図 1)。また、平成 30 年度に吸入曝露実験を実施した TiO<sub>2</sub>と MWNT-7 について継続解析を行った。

平成 30 年度の吸入曝露実験は TiO<sub>2</sub>と NWNT-7 を、それぞれ 3、30mg/m<sup>3</sup> の濃度で令和元年度と同様、C57BL/NcrSlc 雄性マウスに Taquann 直噴全身曝露吸入装置(ver. 3.0)を用いて、2hr/day/week、5 週間(合計 10 時間)の曝露を行い、曝露終了日(0 週)、1、4 週及び 8 週後に解剖・採材を行った(図 1)。

本研究のベースとなるマウス吸入曝露実験は分担研究者である高橋(国立医薬品食品衛生研究所 National Institute of Health science、以下 NIHS)が行い、解剖と採材には各分担研究者が協同参画し、サンプルをそれぞれの所属施設にて研究目的にあった解析を行った。3 種類のモデルナノ材料は肺の深部にまで到達可能なサイズの粒子を揃えるため、NIHS で Taquann 法による分散処理を行って吸入曝露実験に供試した。BALF 採取と塗抹標本の作製では日本バイオアッセイ研究センター・血液生化学検査室の斎藤美佐江室長と近藤ひとみ技術専門役が専門家として参画した。

## B-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

### B-1-(1) BALF の採取

免疫機能評価用に割り当てた各群 6 匹のマウスか

ら BALF を採取した。採取方法は、あらかじめ 0.8 ~ 1.0 ml の生理食塩水(大塚)を充填した 1ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ、TERUMO)をマウス 1 匹につき 2 本用意した。安楽死をさせたマウスの気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C、TERUMO)を留置、この留置針に生理食塩水(大塚)を充填したシリンジを繋ぎ、可動式の押子(プランジャ)を注意深く押し引きして洗浄液(BALF)を回収した。1 本目のシリンジを用いた BALF の採取を終えると、留置針に 2 本目のシリンジを繋ぎ替えて、同様の操作を繰り返して BALF を採取した。1 本目のシリンジと 2 本目のシリンジから回収した BALF を合わせて、一匹のマウスから計 1.2 ~ 1.8 ml/匹の BALF を得た(表 2)。

### B-1-(1) BALF 塗抹標本の作製

採取した BALF から 300 µl を分取して、マウス 1 匹につき 2 枚の塗抹標本を作成した。具体的には、分取した BALF 300µl/匹をスライドガラス 2 枚に 150 µl/匹ずつを滴下し、Thermo Shandon Cytospin 3 (Marshall Scientific LLC、700 rpm 5 分)でスライドガラスに均一に塗抹、メタノール固定し、塗抹未染色標本を作製した。塗抹未染色標本を所属機関に持ち帰り、May-Grünwald Giemsa(MG)染色を行った。2 枚ずつ作製した BALF 塗抹標本のうち 1 枚を解析用とし、1 枚を予備とした。

## B-2 病理組織標本の作製

気道内に吸引された検体の人為的移動を避けた灌流固定と、気道を介し肺内に固定液を注入した浸漬固定の二通りの固定材料を用いて肺の病理組織標本を作製した。

### B-2-(1) 肺の還流固定標本の作製

病理組織学的評価に割り当てた各群 3 匹のマウスの左右の肺を 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)で灌流固定し、常法により病理組織標本を作製、解析に供試した(灌流固定は高橋の分担で実施)。

### B-2-(1) 肺の浸漬固定標本の作製

BALFを採取した各群6匹のマウスの右肺を10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(ナカライテスク)で浸漬固定、常法により病理組織標本を作製、解析に供試した。

なお、BALFを採取後の左肺は免疫機能評価での遺伝子発現解析に供試した(分担:石丸)。

### B-2-(3) 縦隔の病理組織標本の作製

4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を灌流固定した縦隔を用いて常法により病理組織標本を作製、解析に供試した(灌流固定は高橋の分担で実施)。

### B-3 BALF塗抹の検索

BALF塗抹標本に観察される免疫担当細胞(肺胞マクロファージ、単球、好中球、好酸球)の計数と百分比の算出、肺胞マクロファージにおける吸入曝露した検体(T-TiO<sub>2</sub>、T-CNT7、T-CNT-N)の貪食率を調べて経時的推移を調べた。また、BALF塗抹標本に観察される肺胞マクロファージについての詳細な形態学的解析を行った。

#### B-3-(1) 白血球分画(白血球百分比)

各解剖期(n=3)のBALF塗抹細胞の分画を計数して500細胞当たりの百分比の平均値を求めた。具体的には、BALF塗抹細胞の計数は40倍の対物レンズを装着した光学顕微鏡を用いて目視によって、一匹当たり500以上の細胞を観察して肺胞マクロファージ、単球、好中球、好酸球に分類し、それぞれの細胞数を集計、それを500細胞当りに換算した。

#### B-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の推移

塗抹標本の肺胞マクロファージを検体(T-TiO<sub>2</sub>、T-CNT7、T-CNT-N)を貪食しているものと非貪食のものに分けて計数し、両者の比率の経時的推移を調べた。具体的には、光学顕微鏡下で肺胞マクロファージ500個以上について高分散化処理を行った検体を貪食したものと非貪食のものを区別し、500個当たり貪食率として集計、曝露を終了した日(0W)から曝露

終了後8週までの貪食率の経時的推移を調べた(n=3)。

#### B-3-(3) BALF塗抹細胞の詳細検索

BALF塗抹細胞を下記の方法により光学顕微鏡で詳細に検索した。

BALF塗抹細胞を100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がないTagged Image File Format(TIF)で保存、画像処理ソフトAdobe Photoshopで横80x縦60mm、解像度600pixel/inchのpsd形式とし、さらに縦横4倍に拡大して、拡大倍率2000倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

### B-4 病理学組織学的検索

#### B-4-(1) 肺の病理組織学的検査

令和元年度計画のMWCNT-Nの吸入曝露実験に加えて、平成30年度の研究計画の遅れにより十分な解析ができなかったTiO<sub>2</sub>、MWNT-7を併せて、曝露後0、1、4、8週の肺について肺内における検体(T-TiO<sub>2</sub>、T-CNT7、T-CNT-N)の沈着と組織反応の状態を詳細に検索した。検索では、通常の病理組織学的検査で使用される4倍~40倍の対物レンズを用いた観察に加えて、100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がないTagged Image File Format(TIF)で保存、画像処理ソフトAdobe Photoshopで横80x縦60mm、解像度600pixel/inchのpsd形式とし、さらに縦横4倍に拡大して、拡大倍率2000倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

今年度の分担研究ではBALF塗抹標本で観察された像と、灌流固定標本およびBALF採取後の浸漬固定標本での組織像を突合させて、肺内に吸引されたモデルナノ材料に対するマクロファージの特徴的な生体反応について形態学的に調べた。

#### B-4-(2) 縦隔の病理組織学的検査

呼吸によってマウスの肺内に吸引された各モデル



ナノマテリアルが縦隔の組織中に移行するかを病理組織学的に調べた。縦隔部を全長に渡り 3mm 幅で切り出し、病理組織標本を作製して、肺内に吸入されたナノマテリアル若しくはナノマテリアル貪食マクロファージの肺から縦隔部への移行を病理組織学的に調べた。観察に際しては、肺の病理組織検査と同様、通常の病理組織学的検査に加えて、100 倍の対物レンズ(UPlanApo, 100x, Oiliris、開口数 1.35、分解能 0.25 $\mu$ m、OLYMPUS)を使用した詳細観察を実施した。

#### B-5 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

病理組織学的検査で縦隔にナノマテリアルの沈着を疑う所見を認めた際に、当該病理組織標本のカバーガラスを外した組織切片に白金蒸着を施し走査型電子顕微鏡(日立 SU8000)で 2000 倍まで拡大した観察を行った。

(倫理面への配慮)

本分担研究における動物実験を実施するにあたり、科学的及び動物愛護的配慮を十分行い、動物の愛護及び管理に関する法律(昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準(平成 18 年環境省告示第 88 号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針(平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン(平成 19 年 6 月 1 日日本学会会議)、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 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の

作製

#### C-1-(1) BALF の採取

免疫機能評価(分担 石丸)に割り当てた各群 6 匹のマウスから BALF を 1.2 ~ 1.8ml / 匹を採取した。BALF 回収率は 75.4% ~ 90.5%、平均回収率 84.0%であった(表 2)。

#### C-1-(2) BALF 塗抹標本の作製

塗抹標本を各個体につき 2 枚ずつ作製し、1 枚を解析用、1 枚を予備とした。

### C-2 病理組織標本の作製

以下の標本を作製した。

#### C-2-(1) 肺の還流固定標本

#### C-2-(2) 肺の浸漬固定標本

#### C-2-(3) 縦隔の病理組織標本

### C-3 BALF 塗抹の検索

#### C-3-(1) 白血球分画(白血球百分比)

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

解剖期 0、1、4 週に採取した各群の BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はごく僅かであった(表 3)。

##### MWNT-7(T-CNT7)曝露群

解剖期 0、1、4 週に採取した各群の BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加は曝露終了後 1 週で 4.0%であり、変化としては弱いものであった(表 3)。

##### MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

解剖期 0、1、4 週に採取した各群の BALF 塗抹細胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はごく僅かであった(表 3)。

#### C-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の経時的推移

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

吸入曝露を終了した 0 週から 100% のマクロファージが TiO<sub>2</sub> を貪食し、4 週から非貪食マクロファージが少数出現した (図 2 左)。

#### MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群

吸入曝露を終了した 0 週で約 80% のマクロファージが MWNT-7 を貪食、以後漸減し曝露終了後 8 週での貪食率は約 20% であった。一方、吸入曝露を終了した 0 週から非貪食のものも約 20% 程度存在し、その後、漸増した (図 2 中)。

#### MWCNT-N (T-CNT-N) 曝露群

吸入曝露を終了した 0 週での貪食率が約 20%、8 週間には全て非貪食となった (図 2 右)。

なお、MWCNT-N 曝露実験の高濃度群は MWNT-7 と同じ濃度の曝露を計画していたが、実際の吸入曝露実験では、曝露濃度、肺負荷量ともに MWNT-7 の約 1/2 であった (高橋、大西の分担報告を参照)。

#### C-4 BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析

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

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

TiO<sub>2</sub> を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に径 1~2 μm 程度の異物粒子の他に大凡 0.1 μm 程度のナノサイズのものも数多く存在する様子が認められた。これらの粒子はマクロファージが貪食した TiO<sub>2</sub> と考えられ、製造メーカ公表による一次粒径が 30nm であることから、マクロファージの胞体内の粒子は一次粒子が粒状凝集した二次粒子に相当するものと考えられた (図 3-1 A)。一方、肺胞マクロファージには TiO<sub>2</sub> の貪食を示さないものも認めた。TiO<sub>2</sub> の貪食を示さない肺胞マクロファージは、核/細胞質比が大きく、胞体の輪郭が不明瞭、胞体は好塩基性色素のアズール B への染色性が弱く、淡桃色~淡い紫色を呈し、TiO<sub>2</sub> を貪食した肺胞マクロファージと接合したのも認められた (図 3-1 B)。TiO<sub>2</sub> の貪食能示す肺胞マクロファージを Type A 肺胞マクロファージ (以下、Type A マクロファージ)、貪食能示さない肺胞マクロファージを Type B 肺胞マクロファージ

(以下、Type B マクロファージ) と称し、その形態学的特徴を表に示した (表 4)。

##### Type A マクロファージの相互接触/接合

BALF 塗抹には Type A マクロファージが単独で存在するものと複数が相互に接触ないし接合したクラスターとして存在するものが認められた。クラスターを形成する Type A マクロファージは、いずれも胞体の好塩基性の色調が強く、マクロファージが向かい合う辺縁部には相互に呼応するように好塩基性の線状斑が現れるなど、クラスターを構成する Type A マクロファージが同期して異物処理を行うことが示唆された (図 3-1 C、D)。

##### Type A マクロファージの変性

TiO<sub>2</sub> を貪食した Type A 肺胞マクロファージに、胞体の膨化と淡明化が認められた。それらの中には胞体の中に水腫状様の小胞が現れる (図 3-1 E、F)、胞体の輪郭の張りを失って不整な凹凸を示すもの (図 3-1 G)、など変性所見が認められた。貪食した TiO<sub>2</sub> 粒子が胞体内に充満して肥大したケースでは、胞体の淡明化と核の染色性低下、細胞質と核の輪郭が不整になるなど細胞死の状態か、もしくはそれに近い状態にあると考えられた (図 3-1 G)。これらの所見から、クラスターを形成したものは、クラスター全体で変性に陥ることが示された。

##### Type A 肺胞マクロファージの形態変化

単独で存在する TiO<sub>2</sub> を貪食した Type A マクロファージに、核クロマチンの核内分布の変化、核内に水腫様小胞の出現、極度に偏在した核クロマチンの核外への伸び出し、さらには細胞外への伸び出しなど核を中心とした Type A マクロファージの形態変化が認められた (図 3-1 H、I、J、k、M、N)。また、核膜を失った核が断片化したものもみられた (図 3-1 O)。

##### Type A マクロファージが他のマクロファージに付着

TiO<sub>2</sub> 曝露実験では、MWNT-7 や MWCNT-N の曝露実験よりも Type B マクロファージの出現が少ない

が、TiO<sub>2</sub>を貪食した Type A マクロファージの中には Type B マクロファージが接合するものがみられた(図 3-1 K, L)。

TiO<sub>2</sub>を貪食した Type A マクロファージの中には胞体から伸び出し突起で他のマクロファージ(形態が変化した Type A マクロファージと推定)への付着がみられた(図 3-1 P)。

#### MWNT-7(T-CNT7)曝露群

##### 単独で存在する T-CNT7 貪食マクロファージ(Type A)

MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた(図 3-2 A、B)。MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージを TiO<sub>2</sub>の場合と同様に、Type A マクロファージと称した。Type A マクロファージには細胞突起を伸ばしたのも認められた(図 3-2 B)。

##### Type A マクロファージのクラスター形成

MWNT-7を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも多く認められ、TiO<sub>2</sub>で認められたものよりも胞体の大型化と濃青紫に染色される好塩基性が顕著で、クラスターの中心部のマクロファージには二核以上の多核細胞も認められた(図 3-2 C、D、E)。クラスターの外周部に位置するマクロファージからクラスターの内部に位置する大型で多核のマクロファージの胞体内に細胞突起を伸ばして強固に接合した所見も認められた(図 3-2 C、D)。相互に接触/接合した Type A マクロファージは、いずれも類似した形態、染色性を示し、向かい合うマクロファージの辺縁部に好塩基性の線状斑が現れる(図 3-2、C)など、Type A マクロファージ相互の同期が示唆された。多核巨細胞にはラングハンス型巨細胞の様に核が辺縁に沿って馬蹄形に配列するもの(図 3-2 E)も認められた。塗抹標本で観察されたマクロファージのクラスターは、構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

##### Type A マクロファージのクラスターの融合

MWNT-7の凝集塊を囲む4~10細胞程度の Type A マクロファージのクラスターを基本単位として、それらが融合することにより長径が100 μmを超える大きなクラスターを形成したものが認められた(図 3-2、F)。このクラスターには Type B マクロファージも少数集まり、核から胞体の外に淡赤紫の不定形物質が長く尾を引く Type B マクロファージが認められた。構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

病理組織所見でも、幾つかの小規模なマクロファージの集簇塊が肺胞管内で集合・癒合した島状のマクロファージの集簇塊が肺胞管を塞ぐ所見が認められており、その対応したBALF塗抹所見と考えられた。(図 3-2、F 右上挿図)。

##### Type B マクロファージによる細かい MWNT-7 のトラップ

径16 μmの MWNT-7 凝集塊を中心部に据えた Type B マクロファージのクラスターで、胞体の外に流れ出たように見える淡桃色の不定形物質の中に繊維径約200nmの細かい MWNT-7 が認められ、淡桃色の不定形物質による異物のトラップが示唆された(図 3-2 G)。

##### Type A と Type B マクロファージが混在したクラスター

MWNT-7 曝露群で認められた肺胞マクロファージクラスターは、MWNT-7の凝集塊を中心部に据え、肺胞マクロファージがロゼット状に配列した円形のもの(図 3-2 H)と肺胞マクロファージが鎖状に連なったもの(図 3-2 I)が認められた。両タイプとも Type A と Type B が混在していたが、Type A がブレイドミナントで、Type B はマイナーであった。また、両タイプとも塗抹標本の観察で構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

#### MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

### MWCNT-N 貪食肺胞マクロファージ (Type A)

MWCNT-N を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた(図 3-3 A、B、C)。Type A マクロファージに貪食されて胞体内に取り込まれた MWCNT-N は細く長い状態で存在し、毛玉状に凝集していないことが示された。

### Type A 肺胞マクロファージのクラスター形成

MWCNT-N を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも認められたが、MWNT-7 で認められたものに比較して胞体の大型化や濃青紫に染色される好塩基性は顕著ではなく、クラスターの中心部のマクロファージには二核以上の多核細胞の出現はほとんど認められなかった(図 3-3、D、E)。

### Type B マクロファージによる細かい MWCNT-N のトラップ

ひとつのマクロファージの胞体よりも広い範囲で緩やかに絡まった MWCNT-N(凝集体)には、Type B マクロファージが小さなクラスターを形成してより広い面積で検体をトラップすることを示唆する所見がみられた(図 3-3 F、G)。Type B マクロファージの核から胞体外にイソギンチャクの触手のような好塩基性の紐状構造物がたなびき、淡桃色の不定形物質に繊維径約 200 nm の細い MWCNT-N をトラップしていると考えられた所見が認められた(図 3-3 H)。

このタイプのマクファージは図 3-3 I に示したマクファージがアクティブになったものと考えられた。

### Type A と Type B マクロファージが混在したクラスターによる MWCNT-N の広域トラップ

Type A と Type B マクロファージが混在して大きなクラスターを形成したケースも認められた(図 3-3 J、K)。

MWCNT-N ではこうした二つのタイプのマクロファージが混在したクラスターが多く、大きなものでは短径が 60  $\mu\text{m}$ 、長径が 80  $\mu\text{m}$  を超えるサイズものもみられた(図 3-3 J、K)。集簇したマクロファージの核は、クラスターの中央部に不規則にオーバーラップするよ

うに密集し、多数の MWCNT-N がび漫性に付着している様子が認められた(図 3-3 J、K)。

MWCNT-N では MWNT-7 でみられた多核巨細胞や、胞体が著しく肥大し濃青紫色を呈する Type A マクロファージが検体の凝集塊を輪状に取り囲むクラスタは認められなかった。

## C-3 病理学的解析

### C-3-1 肺の病理組織学的検査

#### C-3-1-1 $\text{TiO}_2$ (T- $\text{TiO}_2$ ) 曝露群 炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も好中球浸潤を伴う急性炎症、その他明確な毒性影響を認めなかった。

### 肺内の $\text{TiO}_2$ 貪食肺胞マクロファージ

灌流固定をした曝露後 0 週の肺には  $\text{TiO}_2$  を貪食したマクロファージが散見され(図 4-1 A 左)、それを対物 100 倍で観察するとマクロファージの胞体内と肺組織の上に  $\text{TiO}_2$  粒子を認めた(図 4-1 A 右)。

灌流固定をした曝露後 8 週の肺には  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージの残留はほとんど認められず(図 5-1 B 左)、拡大を上げて対物 100 倍で観察しても  $\text{TiO}_2$  貪食したマクロファージと  $\text{TiO}_2$  粒子を僅かに肺組織に認めただけであった(図 4-1 B 右)。

肺負荷量の測定結果(分担:大西)によると肺 1g 当たりに含まれる検体の量(質量)は MWNT-7 よりも  $\text{TiO}_2$  の方が多く、曝露後 8 週の  $\text{TiO}_2$  値は MWNT-7 の 3 倍であることが示された(図 4-1 C)。

### $\text{TiO}_2$ 貪食マクロファージ (Type A) の肺胞域への固着

BALF 採取後に浸漬固定した曝露後 8 週の肺の標本で T- $\text{TiO}_2$  が肺内に固着されている状況を精査した。対物 100 倍で観察すると肺胞壁に胞体の輪郭や核が不鮮明な  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージが肺胞壁と癒合する様子が認められた((図 5-1 C 上)。この画像をデジタル拡大して詳細に観察すると、肺胞マクロファージが細胞突起を長く伸長させて、相互に接合した網の目に  $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージがトラップされるよ

うに癒合している状況が示された(図 4-1 D)。

#### 肺内に残留した TiO<sub>2</sub>

粗造化した肺胞壁の表層に TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが径 0.7 $\mu$ m の細胞突起を伸ばして付着する(図 4-1 E)など、肺胞マクロファージの積み重なりや毛細血管の増加によって、肺胞壁表面構造が限局性に複雑となり粗造化する所見が認められた(図 4-1 E、F)。

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

TiO<sub>2</sub> を曝露群の一匹に、限局性の肉芽腫性病変を認め、粒子径は 100nm 程度のもので認識できた。この多数の TiO<sub>2</sub> を包含した病変部は、将来、TiO<sub>2</sub> を埋め込んで器質化されると考えられた(図 4-1 G)。

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

灌流固定 8W の細気管支上皮に細気管支内腔の TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが径 0.6 $\mu$ m の突起を伸ばして接合している所見が認められた(図 4-1 H)。

#### MWNT-7(T-CNT7)曝露群

#### 炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も好中球浸潤を伴う急性炎症、その他明確な毒性影響を認めなかった。

#### 細気管支から肺胞管に至る気腔内で肺胞マクロファージによる島状集簇の形成

灌流固定をした肺には曝露後 0 週から 8 週までのいずれの解剖期においても細気管支から肺胞管にかけて気腔内に MWNT-7 を貪食したマクロファージの島状集簇塊を比較的頻繁に認めた。マクロファージの島状集簇塊は大きなものは長径で 100  $\mu$ m を超えるものも存在したが、多くは 30~60  $\mu$ m であった(図 4-2 A、B、C、D、E、F、G、H)。

#### 細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

図 4-2 I と J の左の写真は病理組織学的検査で

常用される倍率で観察したもので、MWNT-7 貪食した肺胞マクロファージが細気管支内腔を上皮に沿って遡上している所見として認識されるものであった。これを対物 100 倍(油浸)のレンズを用いて撮影した TIF 画像を縦横 4 倍に拡大すると(図 4-2 I と J の右の写真)、複数の肺胞マクロファージの集団による異物処理が行われ、マクロファージは変性、壊死に陥っている様子が示された。

細気管支内で MWNT-7 を貪食した大型のマクロファージと小型のマクロファージが鎖状に連なった所見が認められた。これと同様の所見が BALF 塗抹においても大型の Type A と小型の Type B マクロファージの連鎖が認められた(図 4-2 K 挿図)。

#### 肺胞マクロファージの増生による終末部細気管支内腔の架橋

肺の細気管支内腔で細気管支上皮の表層に集簇もしくは増生していると考えられるマクロファージが繋がって終末細気管の内腔を細線維で架橋する所見を認めた(図 4-2L)。さらに太い帯状に集簇して細気管支上皮間を架橋した部位においても、架橋部の表層に細長く伸びた複数のマクロファージが繋がってできたと考えられる細線維に細かな MWNT-7 が多数付着した所見を認めた(図 4-2M)。帯状に集簇もしくは増生したと考えられるマクロファージは PU.1 と CD11c の二重免疫染色によって骨髄由来の肺胞マクロファージであることが示された。

#### 細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

MWNT-7 を吸入曝露した肺の細気管支終末部に肉芽腫性病変の初期像と考えられる変化が認められた。

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に径 40 $\mu$ m の集簇塊が認められた(図 4-2 N 左)。この集簇塊は主として MWNT-7 を貪食したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)と小型で N/C 比が大きいマクロファージ(同、Type B マクロファージに相当)からなり、MWNT-7 貪食マクロファージの胞体から伸長した径約 1 $\mu$ m の細胞突起で既存の細気管支や肺胞と 3 箇所接合する所見が

認められた(図 4-2 N 右)。

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に長径 84 $\mu$ m、短径 60 $\mu$ m で内部に MWNT-7 の凝集塊を包含したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)を中心として、複数のマクロファージが比較的ゆるやかに相互に接合した病巣を認めた(図 4-2 O)。この集簇巣にも約 1 $\mu$ m の細胞突起で既存の細気管支上皮に接合している所見が認められた(図 4-2 O)。

### 肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質(T-CNT7)の沈着

気道や肺胞内に存在するマクロファージを洗い流した浸漬固定標本肺の組織を観察すると、曝露後 8 週の浸漬固定標本に、細気管支から続く肺胞管の内腔が末梢に向かうほど広く拡張し、肺気腫を思わせる所見を認めた。最も強く内腔拡張がみられる肺胞管末梢側の端部に肺胞壁の肥厚を認め、その肥厚部から幅が約 3 $\mu$ m の突起が肺胞管の内周に沿って延伸、肺胞管の内周に線維性のフレームを構築したと思われる所見を認めた。当該部には好中球の浸潤などの急性炎症を示す病理組織所見はなかった(図 4-2 P)。この肺胞壁の肥厚部には煙状で淡灰色の不定形物質がマクロファージにオーバーラップするように沈着した所見が認められた。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の肺や縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であることが示され、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

### 細気管支周囲間質での膠原繊維の増加

本実験の吸入曝露は間歇曝露方式で実施、肺には好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見は認められないものの、曝露後 8 週に気道周囲の間質組織に Masson trichrome stain で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原繊維の軽度な増加が示唆された(図 4-2 Q)。仔細に観察すると、細気管支周囲の間質内に MWNT-7 貪食マクロファージが鎖状に連なった

状態で線維性構造物に付着している所見が認められた(図 4-2 R)。後述の縦隔への肺胞マクロファージのクラスターや獣毛の移行と併せて、同部位に生じた膠原繊維の増加との関係が示唆された。

### MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

#### 炎症性変化

曝露後 0、1、4、8 週のいずれの解剖期も好中球浸潤を伴う急性炎症の所見を認めなかった。

### MWCNT-N 沈着病変の肺内分布

MWCNT-N を吸入曝露した肺は、灌流固定標本、浸漬固定標本ともに 4 倍～40 倍の対物レンズを用いた病理組織検査では目立った変化は認められなかった。100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支から肺胞管に至る領域で複数の肺胞マクロファージが MWCNT-N を囲んだ小型の集簇巣を認めた。その分布は MWCNT-N 曝露群と基本的に同様であったが、MWCNT-N と比べて集簇巣の数と病変部を探す際の目印となる MWNT-7 の量が少ないことから、顕微鏡で認識するのは困難であった。

### 細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺胞管に MWCNT-N を囲んだ肺胞マクロファージの集簇巣(図 5-3 A、B、C)を認め、小型の集簇巣(図 4-3B、C)の内部に不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、MWCNT-N を包含し、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた(図 4-3B、C)。

仔細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察した。クラスター外周の途切れている部分をマクロファージから伸び出したと考えられる径 2 $\mu$ m の細線維が繋ぐ所見が認められた(図 4-3C)。

不定形混濁沈着物のなかで比較的大きなものでは断面が底辺 13 $\mu\text{m}$ 、高さ 6 $\mu\text{m}$  の三角形を呈する T-CNTN の凝集塊 (図 4-3D)、小さなものでは断面が底辺 8 $\mu\text{m}$ 、高 3 $\mu\text{m}$  の三角形を呈する凝集塊 (図 5-3E) がマクロファージの外縁に接してみられた。細気管支上皮表面に接して存在する 2 つのマクロファージの一方が胞体を延ばして他方に接合、その腹面に不定形混濁物質が認められ、MWCNT-N を包含していた (図 4-3F)。また、MWNT-7 のケースと同様、マクロファージ集簇部の表層に多くの MWCNT-N が沈着した所見も認められた (図 4-3G)。

### C-3-2 縦隔の病理組織学的検査

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

##### 炎症性変化

TiO<sub>2</sub> を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

100 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、極めて稀に TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが縦隔や心嚢膜を構成する細い線維 (膠原線維、細網線維) に付着している所見を認めた (図 5-1 A、B)。細い線維に付着した TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージは、胞体の染色性の低下と核や胞体内部の構造が不明瞭となった所見が認められた (図 5-1 A、B)。縦隔内に複数の大型の貪食マクロファージからなるクラスターは認められなかった。

#### MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群

##### 炎症性変化

MWNT-7 を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

##### 縦隔の疎性結合織に移行した MWNT-7 貪食マクロファージ

100 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、MWNT-7 貪食マクロファージが単独、またはクラスターを形成した状態 (図 5-2 C、D) で縦隔の疎性結合

織に付着した所見を認めたが、縦隔に移行した所見は極めて稀であった。

クラスターは BALF 塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターに類似した形態を示したが、クラスターの最も幅が広いところで 30 $\mu\text{m}$  程度であった。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面が比較的多く認められ、図 5-4 C (右上) に示した獣毛の断面の径は 20 $\mu\text{m}$  であった。

##### 縦隔部のリンパ節に移行した MWNT-7 貪食マクロファージ

縦隔部リンパ節に曝露後 0 週に少数の細い MWNT-7 が認められ (図 5-2 E)、曝露後 8 週ではその数が増加している様子が示された (図 5-2 F)。

縦隔部リンパ節には、MWNT-7 曝露群の縦隔の疎性結合組織内に認められたような MWNT-7 貪食マクロファージのクラスターは認められなかった。

#### MWCNT-N (T-CNT-N) 曝露群

##### 炎症性変化

MWCNT-N を吸入曝露したマウスの縦隔に 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた病理組織学的検査では炎症性病変等の目立った変化は認められなかった。

##### 縦隔の疎性結合織に認められた MWCNT-N

100 倍の対物レンズを用いて撮影した画像をデジタル拡大した詳細観察で、極めて稀にマクロファージと灰色を帯びた煙状の不定形物質が縦隔の組織と癒合しと考えられる所見が認められ、この不定形物質を MWCNT-N と推定した (図 5-3 E)。

### C-4 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

病理組織学的検査で縦隔に MWCNT-N と推定される物質が認められた HE 染色標のカバーガラスを外した組織切片を透過型電子顕微鏡で 2000 倍まで拡大した観察した結果、光学顕微鏡で観察された灰色を帯びた煙状の不定形物質と同様の形状、大きさの固形物が縦隔の組織と癒合している所見が認められた (図 6-3 F)。固形物が縦隔の組織と癒合していることから病理組織学的変化で認められた所見は器質

化が進んでいると考えられた。

#### D. 考察

肺の組織構造とナノマテリアル並びにマロファージの位置関係を保存する灌流固定病理組織標本(perfusion fixation 標本、PF 標本)、気管支肺胞洗浄液(Bronchoalveolar Lavage Fluid、BALF)の塗抹標本(BALF 塗抹標本)、BALF採取後の肺の浸漬固定病理組織標本を用いた解析をおこなった。

##### D-1 粒子状ナノマテリアル

粒子状のモデルとして選定した  $\text{TiO}_2$  が肺胞マロファージに貪食されて、以下のように肺胞壁に沈着する様子を捕らえることができた。

##### $\text{TiO}_2$ の肺内残留様式

曝露後 8 週の通常の観察倍率による病理組織検査で還流固定を行った病理組織標本、BALF 採取後に浸漬固定を行った病理組織標本のいずれにおいても肺内に  $\text{TiO}_2$  を貪食したマロファージや  $\text{TiO}_2$  粒子はほとんど認められず、炎症等の毒性影響は見られなかった。この結果について当初、マウスの肺内に吸引された  $\text{TiO}_2$  の大部分が肺胞マロファージに貪食されて肺外に移送され、病理組織学的にも肺内に残留する  $\text{TiO}_2$  貪食マロファージは殆ど認められなかったことから、肺内に残留する  $\text{TiO}_2$  は MWNT-7 とは比較にならないほど少なく、毒性学的にも問題になるものではないと考えていた。しかし、組織負荷量測定を分担した大西の結果から曝露後 8 週における肺 1g 当たり  $\text{TiO}_2$  の残存量は MWNT-7 群曝露群の 2.8 倍であることが示された。BALF 塗抹標本の精査で、 $\text{TiO}_2$  貪食マロファージは変性によって膨化・透明化した胞体内に  $\text{TiO}_2$  を包含した状態で BALF 中に存在することが判明し、変性によって膨化・透明化した胞体を有する  $\text{TiO}_2$  貪食マロファージが肺胞壁などの肺組織に付着して存在すると推察された。

##### 肺胞域での病理組織学的変化

肺内に残存した  $\text{TiO}_2$  の所在を顕微鏡の対物レン

ズを 40 倍から 100 倍(油浸)に替えて撮影した画像をデジタル拡大して仔細に観察すると、 $\text{TiO}_2$  貪食マロファージが肺胞壁に取り付いたまま器質化され、当該の肺胞壁の粗造化、毛細血管の新生と考えられる所見を認めた。また、 $\text{TiO}_2$  を曝露したマウスに、一匹ではあるが限局性の肉芽腫性病変に多数の  $\text{TiO}_2$  が含まれていた。この病変も将来、膠原繊維に埋没した状態で  $\text{TiO}_2$  が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

##### $\text{TiO}_2$ を曝露したマウス肺における病態形成メカニズム

肺の最も重要な機能は肺胞壁の「空気 血液関門」を通して行われる酸素と炭酸ガスの交換である。「空気 血液関門」は Ⅰ型肺胞上皮細胞と毛細血管内皮細胞及び基底膜で構成される。Ⅰ型肺胞上皮細胞の細胞質はきわめて薄く(0.5 $\mu\text{m}$ )引き伸ばされて肺胞毛細血管に密着し、基底膜を両者が共有することでガスの通過を容易にする構造となっている。肺胞壁に  $\text{TiO}_2$  貪食マロファージが付着すると、肺胞壁でのガス交換が阻害されるため、付着した  $\text{TiO}_2$  貪食マロファージが器質化されて、それを足場として Ⅰ型肺胞上皮細胞と毛細血管がセットで表層に新生される肺胞壁のリモデリングが起こると考えられた。

本研究班の吸入実験は 30 $\text{mg}/\text{m}^3$  の濃度で 1 日に 2 時間の曝露を週 1 回、5 週間にわたって繰り返したもので、1 週間に 2 時間の曝露を 1 回行う程度であれば、次週の曝露までの間に Ⅰ型肺胞上皮細胞と毛細血管によるリモデリングは完了して肺胞壁の塑造化と新生毛細血管が所見として認識される程度の極めて微弱な変化として現れたものと考えられた。

##### D-2 繊維状ナノマテリアル

繊維状のモデルナノマテリアルとして選定した MWNT-7 と MWCNT-N の物理学的性状には下記のような違いがあり、繊維の太さと長さ、凝集体の性状の違いによって異物処理に係る肺胞マロファージの種類と処理方法が異なることが判明した。

MWNT-7 は鉄よりも強靱とされていて、太い繊維と細い繊維、それらが複雑にからまった強靱な構造の



凝集体が混在する。

MWNT-N は MWNT-7 よりも繊維幅が細く、一本一本の繊維の幅はほぼ均一で、単離繊維が緩やかに絡まった柔軟な構造の凝集体が混在する。

本分担研究で形態学的に BALF 中の肺胞マクロファージを二種類に大別した。ひとつは Type A としたもので胞体が貪食によって肥大し、May-Grünwald Giemsa 染色 (MG 染色) で肥大した胞体が青紫を呈した。Type A マクロファージは MWNT-7 に含まれる単離繊維の粗大な束や細かな単離繊維を貪食するとともに、自身で貪食できない粗大な単離繊維の束を集団で取り囲むことでクラスター内に包み込み、クラスターごと細気管支末梢に接合・付加させると考えられた。これによってマクロファージは、単独での処理が困難な粗大の繊維性ナノマテリアルの束を一括して線維化組織に埋没させる異物処理を行い、その際に細気管支周囲の間質から線維芽細胞など線維化に係る細胞が進出することで、線維化を促進すると考えられた。粗大で強固な凝集体を処理するケースではクラスターの中心部の MWNT-7 の凝集体を囲むように肥大した Type A マクロファージが配列し、MWNT-7 のラット吸入曝露試験で報告されているラングハンス型巨細胞に類似した核の配列が認められる等、MWNT-7 を曝露した肺に特徴的な所見として知られる肉芽腫形成の要因になると考えられる所見が認められた。細気管支末梢に接合できなかったクラスターは粗大の繊維性ナノマテリアルの束を包含したまま壊死に陥り、ムコシリアリーエスカレーションによって喀痰のように気管外に排泄されると推定された。

もうひとつは Type B とした小型のマクロファージで、Type B は MG 染色で胞体が淡桃色を呈した。Type B とした小型のマクロファージは顕微鏡で視認できるサイズの繊維状ナノマテリアルを明確に貪食している所見は認められず、Type B マクロファージの胞体の外側に分泌される基質のような不定形物質によるトラップが推測された。BALF 塗抹の詳細な観察で、Type B マクロファージ周囲の不定形分泌物に繊維状ナノマテリアルがトラップされ、Type B と Type A マクロ

ファージの混合クラスターでは広域に繊維状ナノマテリアルをトラップする様子が示された。繊維幅が 100 nm よりも細いナノファイバーを光学顕微鏡で視認することは不可能であるが、MWCNT-N 曝露群では細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺胞管に認められた小型集簇巢の内部に不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた。詳細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察された。これと同様のインク染みのような広がりが MWNT-7 曝露群の肺胞に認められた。MWNT-7 のケースでは、拡張した肺胞管に面した肺胞域に限局性マクロファージの増生部が存在し、そこに煙のような淡灰色の不定形物質がオーバーラップするように沈着した所見が認められた。この煙状の淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であることが示され、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。このように繊維幅が 100 nm よりも細いナノファイバーは Type B マクロファージによってトラップされて肺胞域に付着することが示唆されたが、光学顕微鏡でその実態を認識できなかったため、これまで毒性学的に注目されてこなかったと考えられた。

これまで報告されている多くの情報は粗大な繊維を貪食するマクロファージ(本研究の Type A マクロファージ)の単独の働きに関するもので、複数のマクロファージによる集団処理には関心が向けられてこなかったが、本研究で得た知見では、粗大な繊維の異物処理は Type A マクロファージの集団処理が主体になっていると考えられ、繊維幅が 100nm よりも細い繊維状ナノマテリアルは肺胞の末端まで肺内に広く吸引され、その処理には Type B マクロファージによる集団処理の関与が示唆された。MWNT-7 の場合、BULK の MWNT-7 は繊維径が 100nm よりも小さいものが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占め、線維長

は 5 $\mu$ m よりも短いものが 52.3% (T. Ksai, et.al.,2014) で、その大多数が光学顕微鏡では視認できないサイズであることから、今後は粒子径分布で大多数を占める細かい繊維状ナノマテリアルによる呼吸器毒に注目する必要がある。macrophage extracellular traps (METs) のようなマクロファージの外来異物の処理機構についても検討してみる必要がある。

### 線維化病変の形成

MWNT-7 曝露群では曝露後 8 週の気管支周囲の間質組織内に Masson trichrome 染色で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原線維の増加が示唆された。この部位に膠原線維が増加したメカニズムとして、気道内や肺胞域での肺胞マクロファージの挙動とは異なる可能性が考えられ、今後の解明が必要である。

### 肺から縦隔への移行について

本研究でモデルナノマテリアルとして選定した TiO<sub>2</sub>、MWNT-7、MWCNT-N はいずれも肺胞マクロファージがクラスターを形成して肺から縦隔に移行、縦隔内に付着して器質化されるものがあることが示された。

縦隔に移行した肺胞マクロファージのクラスターは BALF 塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと同様の形態を示したが、その最も幅が広いところで 30  $\mu$ m 程度であった。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面も多く認められた。こうした獣毛の断面の径と肺胞マクロファージのクラスターの径はほぼ等しく、獣毛や肺胞マクロファージが肺から縦隔に移行する流路の存在が示唆された。今後、肺から縦隔に移行する流路の解明とこれまで意識されてこなかった縦隔機能の研究が必要と考える。

### E. 結論

3 種類のモデルナノマテリアルを肺に炎症を惹起しない低負荷量でマウスを用いた吸入曝露実験を行った。その結果、粒子状物質が曝露される TiO<sub>2</sub> と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージに

よる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが示唆された。本研究で、3 種類のモデルナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、毒性発現量での量・反応関係を考慮した情報収集が必要と考える。さらなる研究を実施することにより、ナノマテリアルの安全性評価で、カテゴリー評価によるスクリーニングが可能となると期待される。

### F. 健康危機情報

なし

### G. 研究発表

論文発表

なし

学会発表

加納浩和、笠井辰也、齋藤新、平井繁行、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、竹内哲也、三角恭兵、福島昭治、菅野純：メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性、第 92 回日本産業衛生学会、2019 年 5 月（名古屋）

○ 相磯成敏、山野壮太郎、梅田ゆみ、近藤ひとみ、齋藤美佐江、高信健司、妹尾英樹、菅野純：異なる物理学的性状のナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺と縦隔における肺胞マクロファージの挙動。第 36 回日本毒性病理学会学術集会、2020 年 2 月 14 日（東京）

### H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3.その他

なし

表1 吸入曝露実験に供試した検体の物理化学的性状

TiO <sub>2</sub> (T-TiO <sub>2</sub> )		MWNT-7 (T-CNT7)	
結晶形	アナターゼ	繊維径	7 - 170 nm
TiO <sub>2</sub> 含量	98 %	繊維長	1 - 19 μm
一次粒径	30 nm	分散処理検体の形状	太さがの強靱な単離繊維と強靱な凝集体が混在
pH	弱酸性	マクロファージの胞体内での蓄積	長繊維がマクロファージの胞体を通
比表面積	52 cm <sup>2</sup> /g		
MWCNT-N (T-CNTN)			
原末の形状	黒色フレーク状、不織布状 (SEM)		
分散処理検体の形状	柔らかく柔軟な単離繊維、単離繊維が緩やかに絡まった凝集体		
マクロファージの胞体内での蓄積	毛玉状凝集 (予想)		

表2 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取量

群名称 (曝露濃度)	対照群 (0mg/m <sup>3</sup> )	TiO <sub>2</sub> (30mg/m <sup>3</sup> )		MWNT-7 (3mg/m <sup>3</sup> )		群名称 (曝露濃度)	対照群 (0mg/m <sup>3</sup> )	MWCNT-N (0.6mg/m <sup>3</sup> )		MWCNT-N (1.3mg/m <sup>3</sup> )	
		平均	SD	平均	SD			平均	SD	平均	SD
0W	注入量(ml)	2.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.6	0.06	1.8	0.02	1.7	0.09	1.6	0.07	1.6	0.04
	回収率(%)	78.7	3.21	90.0	0.87	87.3	4.73	82.2	4.16	81.7	3.62
1W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.3	0.09	1.4	0.03	1.3	0.06	1.7	0.10	1.8	0.04
	回収率(%)	82.3	5.32	85.8	1.57	83.5	3.77	84.5	4.77	89.2	1.89
4W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.3	0.13	1.3	0.03	1.3	0.07	1.7	0.06	1.7	0.04
	回収率(%)	80.0	8.20	83.5	2.01	81.5	4.07	85.8	2.89	82.6	0.56
8W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.2	0.25	1.4	0.06	1.4	0.05	1.8	0.01	1.7	0.05
	回収率(%)	75.4	15.52	85.2	3.77	87.1	2.89	88.3	0.56	84.8	2.25

表3 BALFの白血球分画

群名称 (曝露濃度)	曝露後 週数	n	白血球分画 (百分比)					
			AM	Seg	Mono	Eo	Lym	Total
Control (0mg/m <sup>3</sup> )	0W	3	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	1W	3	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
	4W	3	99.8	0.1	0.1	0.0	0.0	100.0
	8W	3	100.0	0.0	0.0	0.0	0.0	100.0
TiO <sub>2</sub> (34.8mg/m <sup>3</sup> )	0W	3	99.8	0.0	0.2	0.0	0.0	100.0
	1W	3	99.9	0.1	0.0	0.0	0.0	100.0
	4W	3	99.7	0.2	0.1	0.0	0.0	100.0
	8W	3	99.8	0.1	0.1	0.0	0.0	100.0
MWNT-7 (3.0mg/m <sup>3</sup> )	0W	3	99.2	0.3	0.4	0.0	0.1	100.0
	1W	3	95.8	4.0	0.2	0.1	0.0	100.0
	4W	3	98.0	1.1	0.8	0.2	0.1	100.0
	8W	3	99.3	0.8	0.1	0.1	0.0	100.0
MWCNT-N (1.3mg/m <sup>3</sup> )	0W	3	99.6	0.3	0.1	0.0	0.0	100.0
	1W	3	98.9	0.3	0.7	0.0	0.1	100.0
	4W	3	99.5	0.1	0.3	0.0	0.0	100.0
	8W	3	99.7	0.4	0.8	0.0	0.1	100.0
MWCNT-N (0.6mg/m <sup>3</sup> )	0W	3	99.6	0.1	0.3	0.0	0.1	100.0
	1W	3	99.6	0.2	0.2	0.0	0.0	100.0
	4W	3	99.2	0.3	0.4	0.0	0.1	100.0
	8W	3	99.4	0.3	0.2	0.0	0.0	99.9

AM: Alveolar macrophage; Seg: Segmental neutrophil; Mono: monocyte; Eo: eosinophil; Lym: lymphocyte

表4 Type A と Type B マクロファージの形態学的特徴

	大きさ	核/細胞質比	胞体の染色性	貪食*
Type A	大	小	青紫色～濃青紫色	有り
Type B	小	大	淡桃色～淡紫色	無し

\*: 光学顕微鏡レベルでの観察





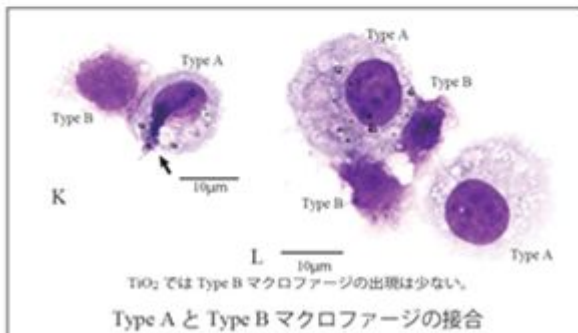
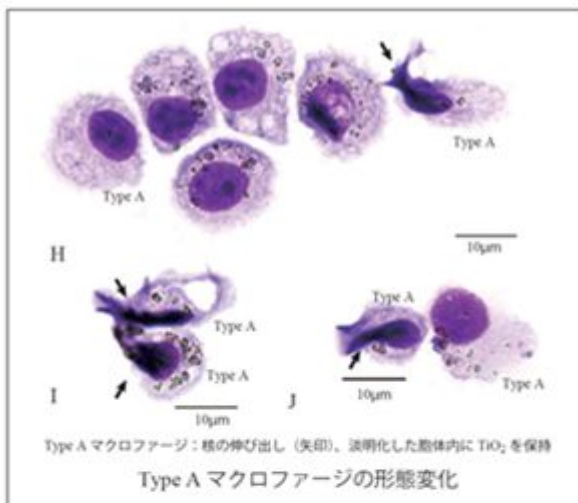


図 3-1 BALF 塗抹：TiO<sub>2</sub>  
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

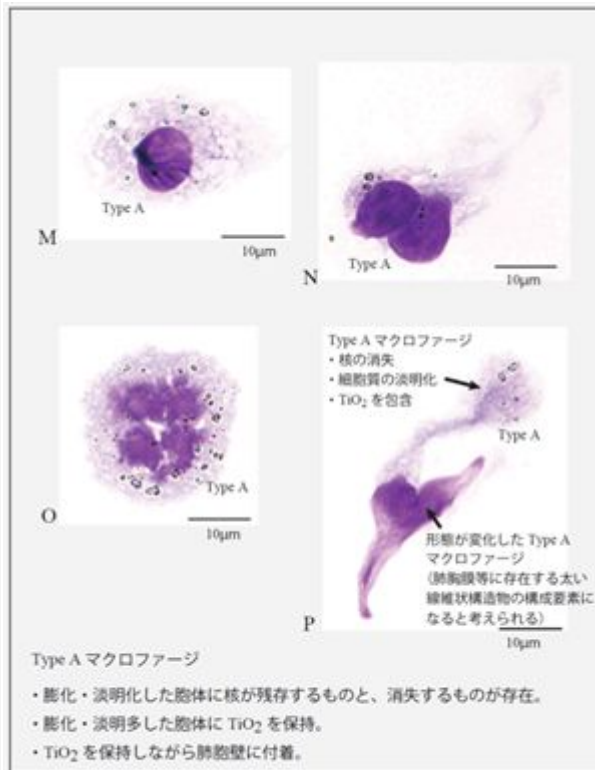
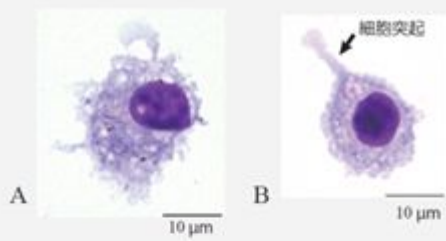
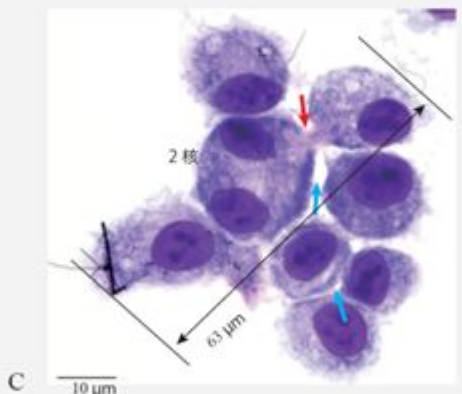


図 3-1 BALF 塗抹：TiO<sub>2</sub>  
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色



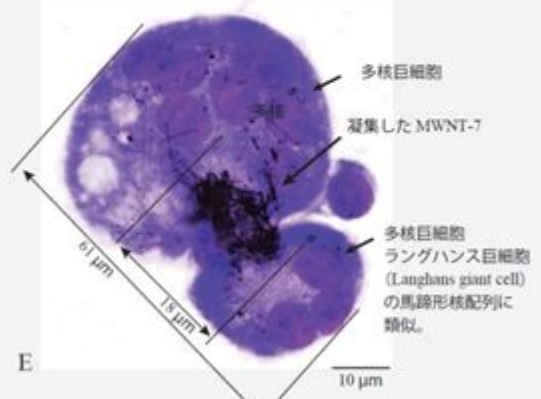
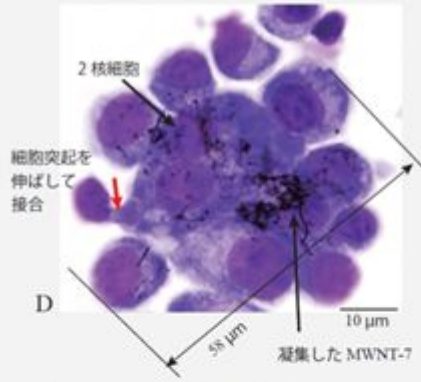
単独で存在する Type A マクロファージ



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

Type A マクロファージのクラスター形成

図 3-2 BALF 塗抹：MWNT-7  
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色



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

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

図 3-2 BALF 塗抹：MWNT-7  
May-Grünwald Giemsa (MG) 染色



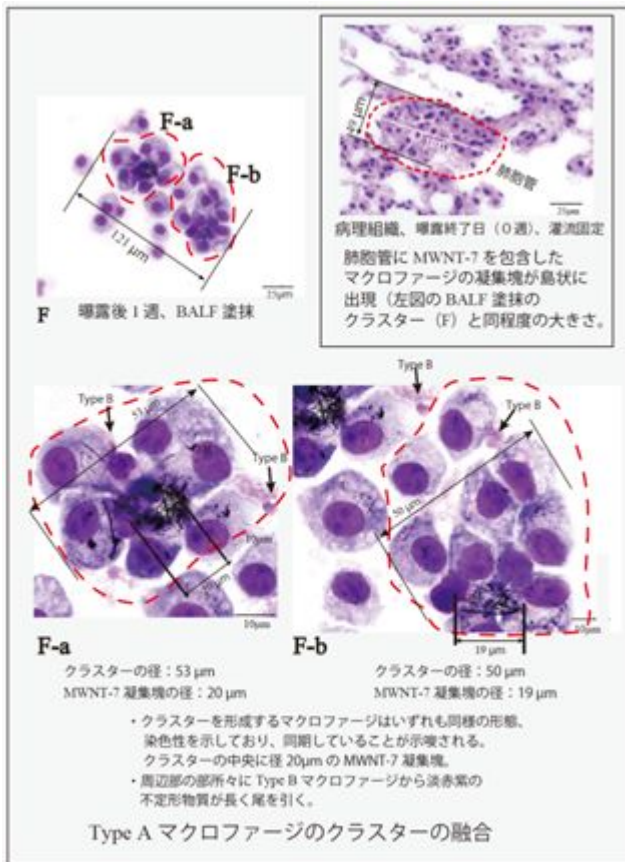


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7  
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

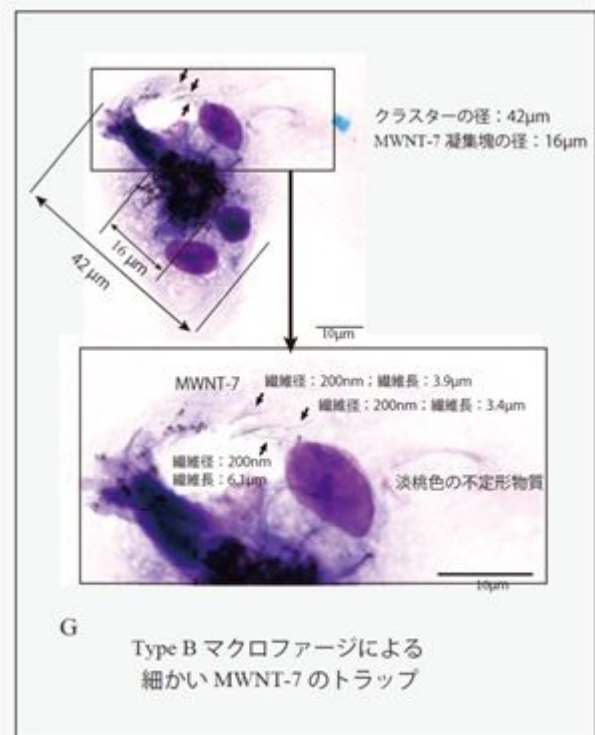


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7  
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

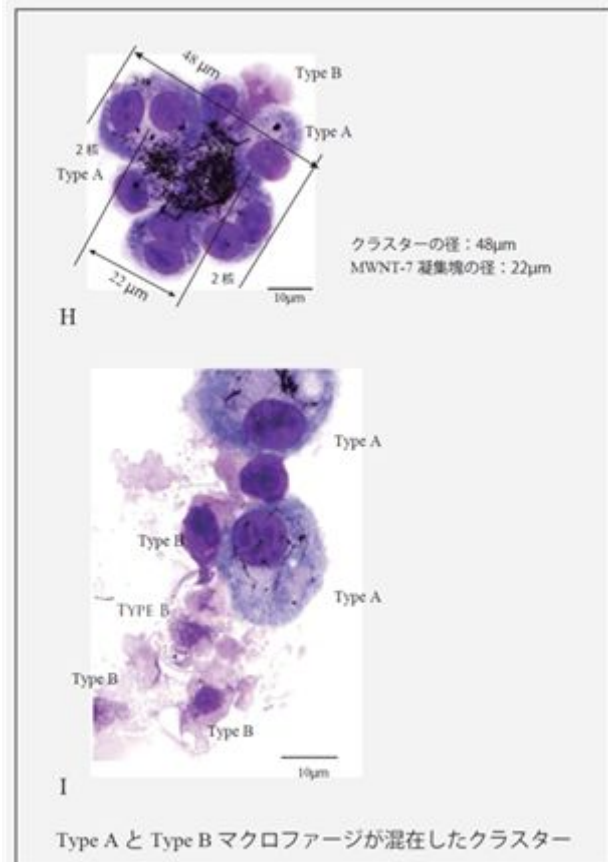


図 3-2 BALF 塗抹: MWNT-7  
 May-Grünwald Giemsa (MG) 染色

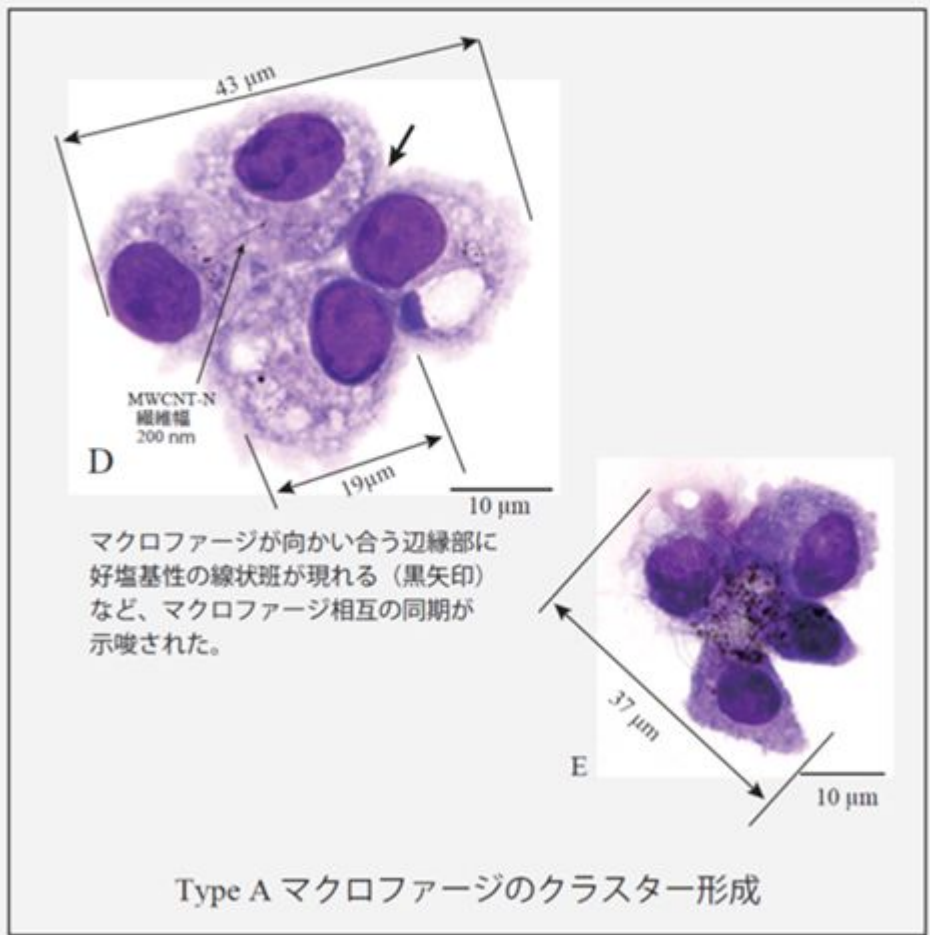
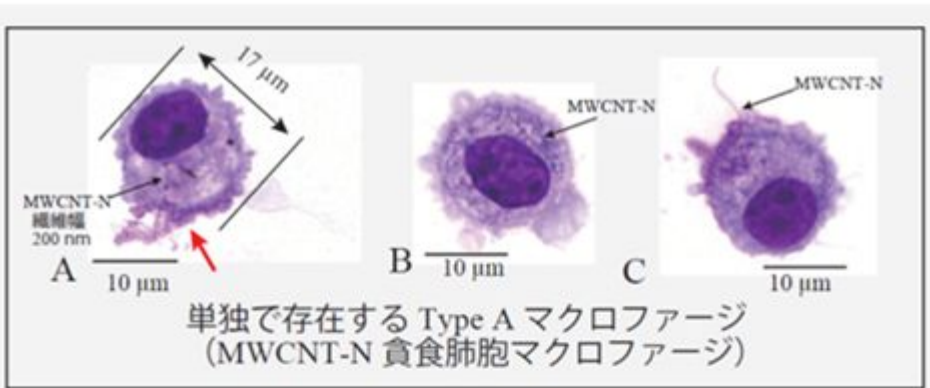


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

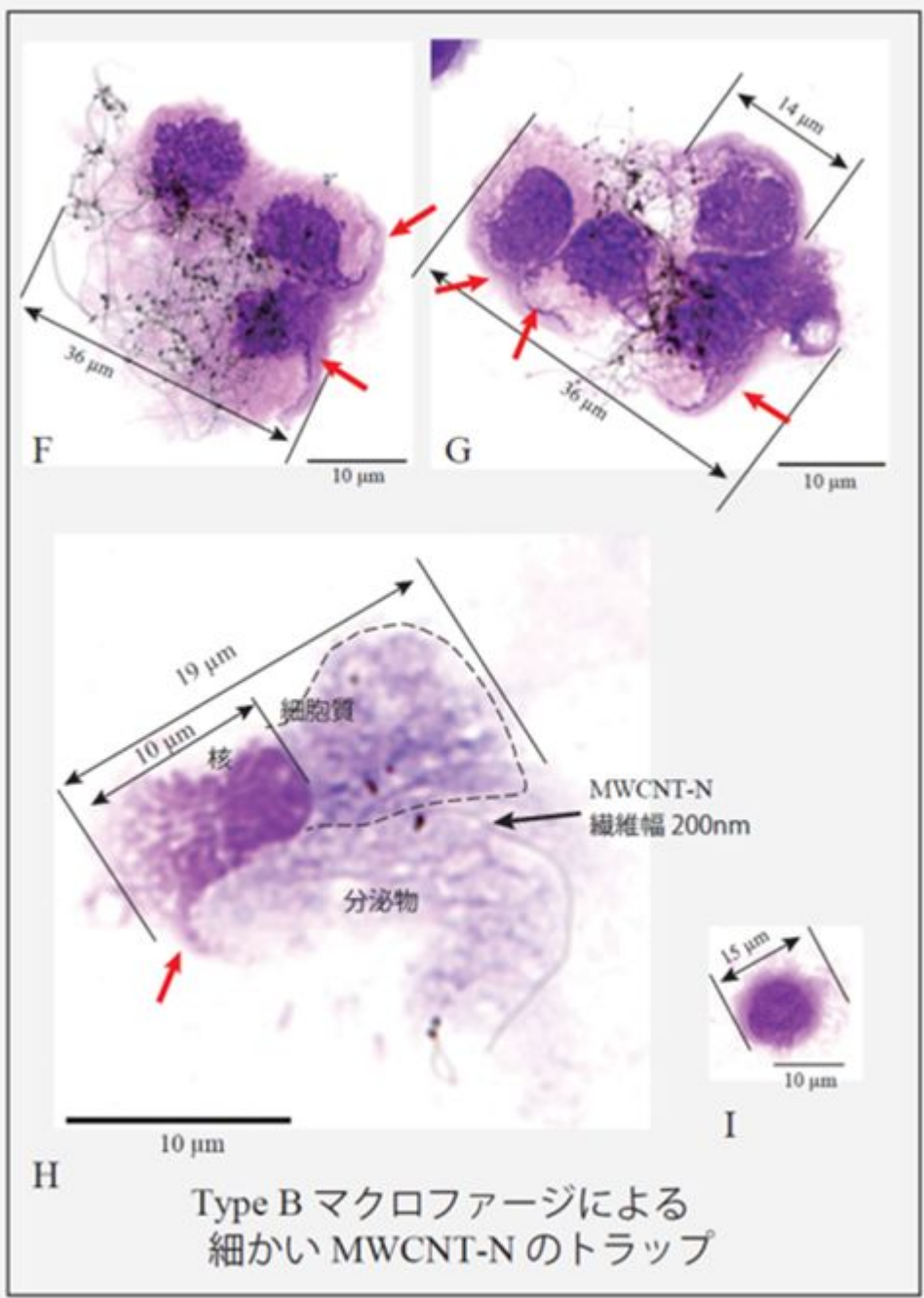


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N  
May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

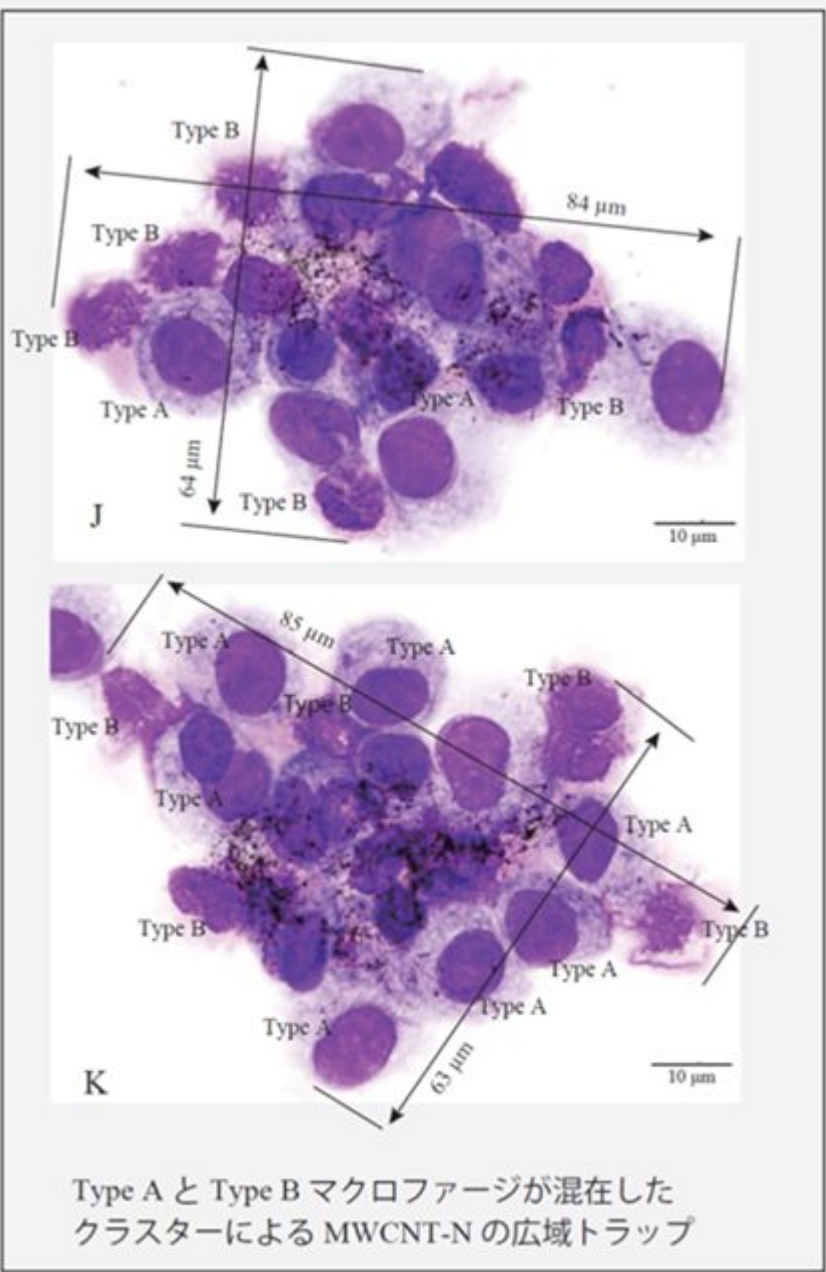


図 3-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

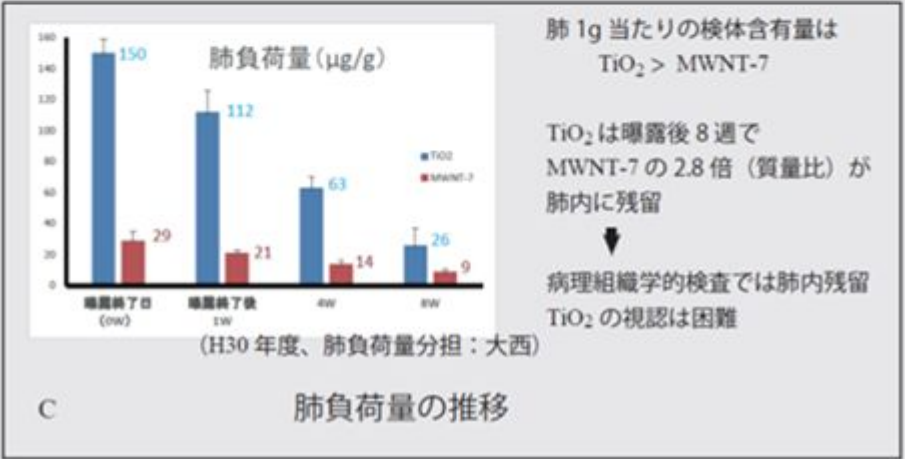
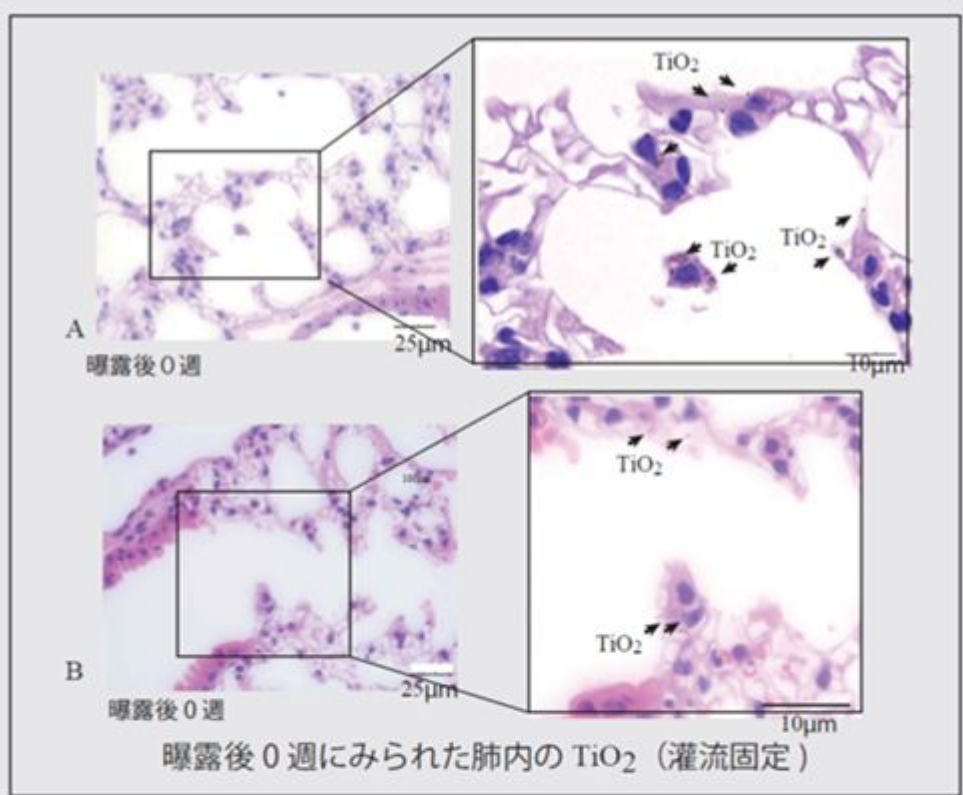
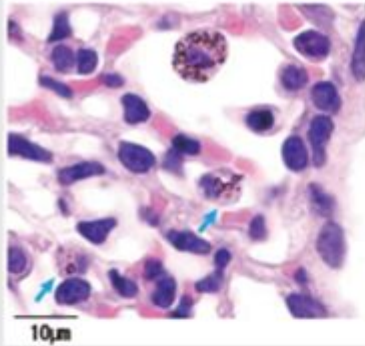
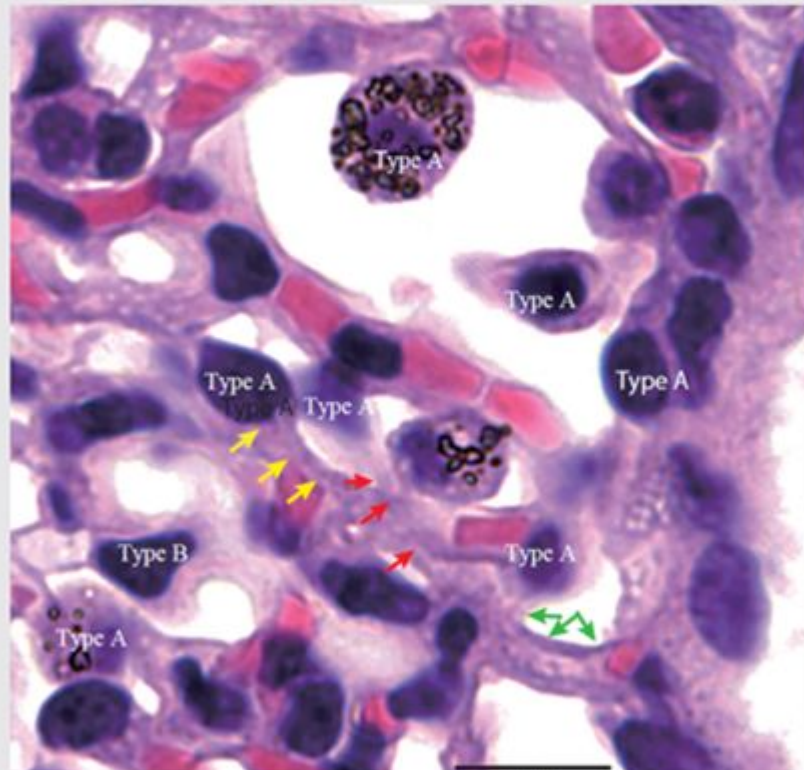


図 4-1 病理組織： $\text{TiO}_2$



- ・光学顕微鏡下で視認できる肺内残留 TiO<sub>2</sub> は MENT-7 と比べて極めて少ない。
- ・TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージ 肺胞壁に癒合 (青矢印)

対物 100 x (油浸) で観察した曝露後 8 週の肺胞域 (浸漬固定)

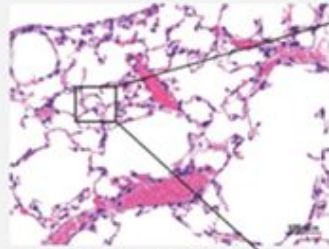


D

上の写真 (対物 100 x で撮影) を拡大、さらに Adobe Photoshop で明るさ -100% に調整して細部を可視化  
細胞突起を長く伸長 (矢印: 黄、赤、緑) させ相互に接合した網の目に TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージがトラップされるように癒合。  
Type B マクロファージ (図左下) の関与は少ない

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

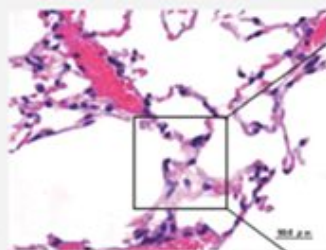
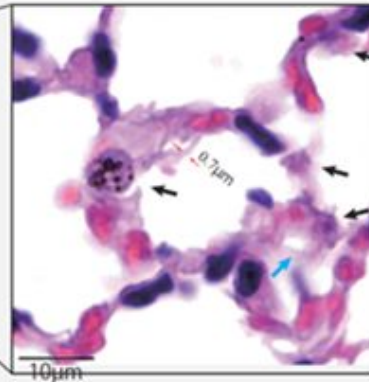
図 4-1 病理組織: TiO<sub>2</sub>



E

曝露後8週、浸漬固定

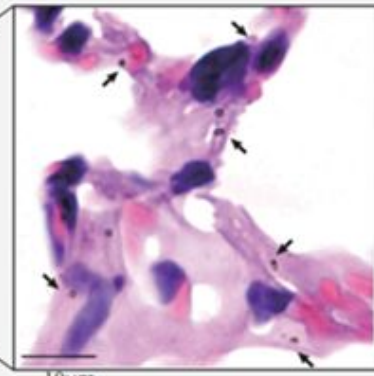
- $\text{TiO}_2$  貪食マクロファージ (黒矢印) の肺胞壁への付着
- 肺胞壁の粗造化
- 微小な肺胞類似構造 (青矢印) の出現
- 局所的な毛細血管の増加



F

曝露後8週、浸漬固定、肺胞

- 多くの  $\text{TiO}_2$  粒子が存在 (黒矢印)
- 粒子径は  $1\mu\text{m}$  以下
- 付加組織とともに肺組織に付着。
- 局所的な毛細血管増加 (新生)



肺内に残留した  $\text{TiO}_2$

図 4-1 病理組織： $\text{TiO}_2$

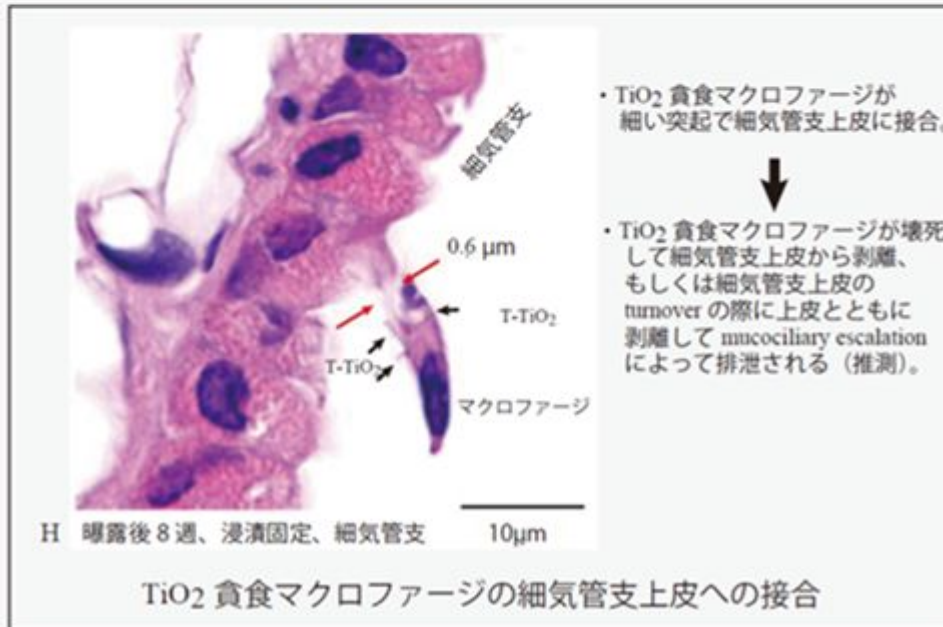
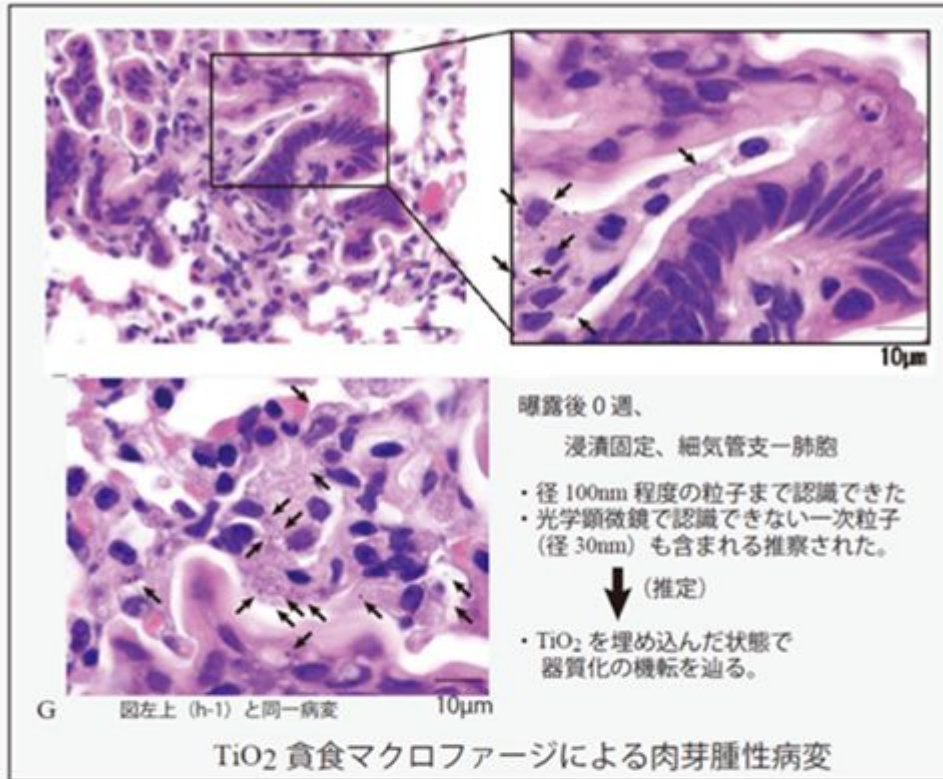


図 4-1 病理組織：TiO<sub>2</sub>



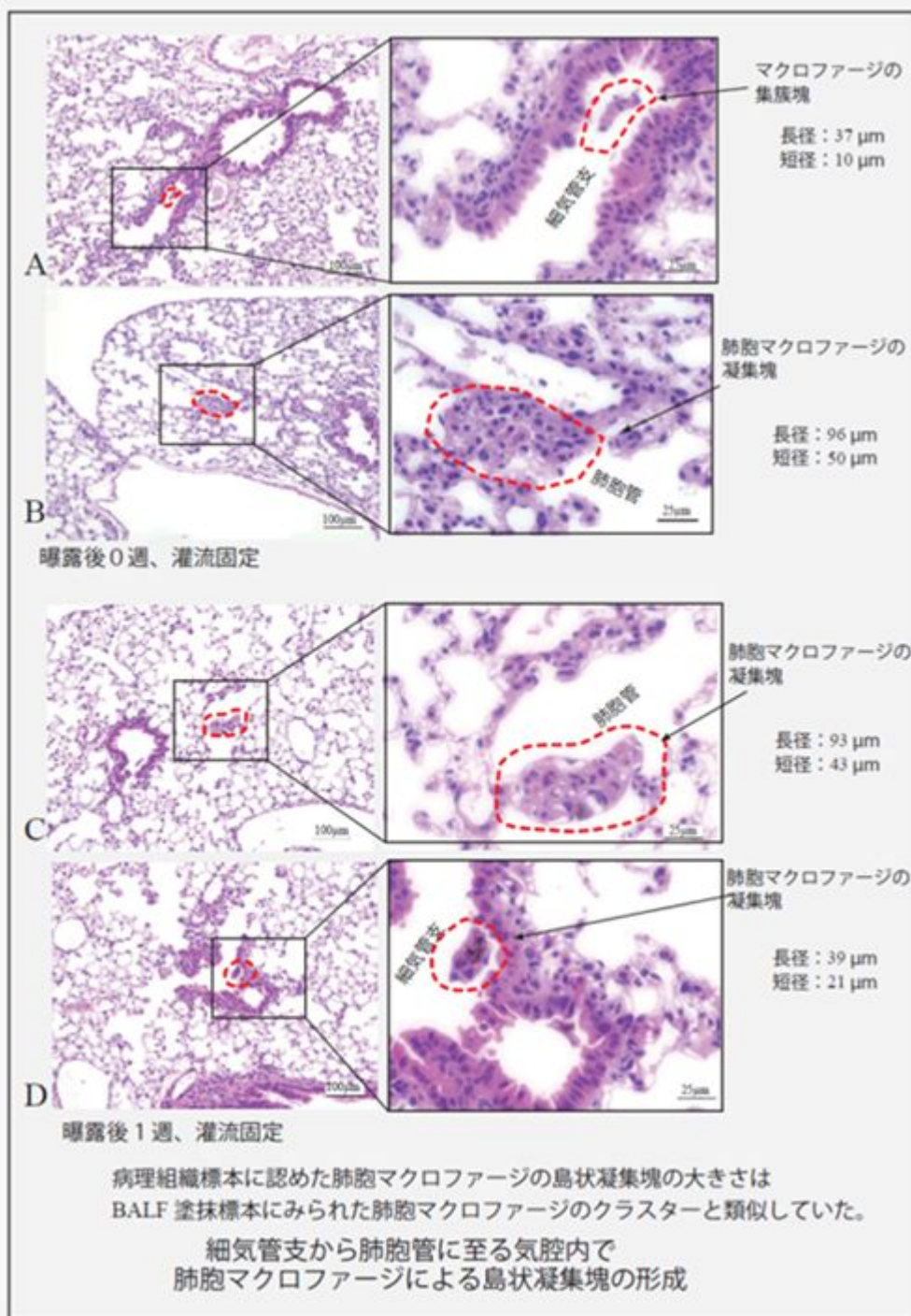


図 4-2 病理組織：MWNT-7

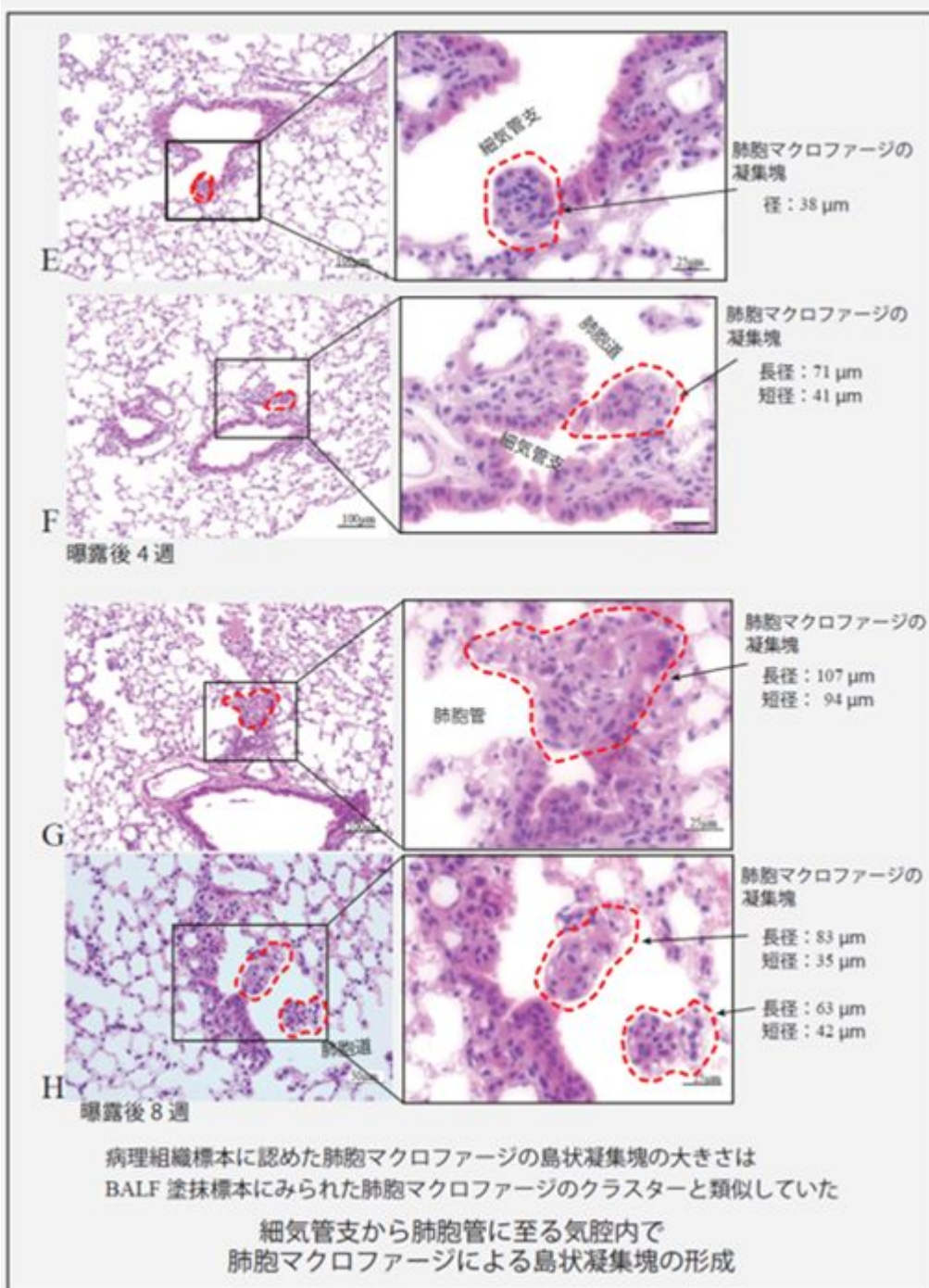
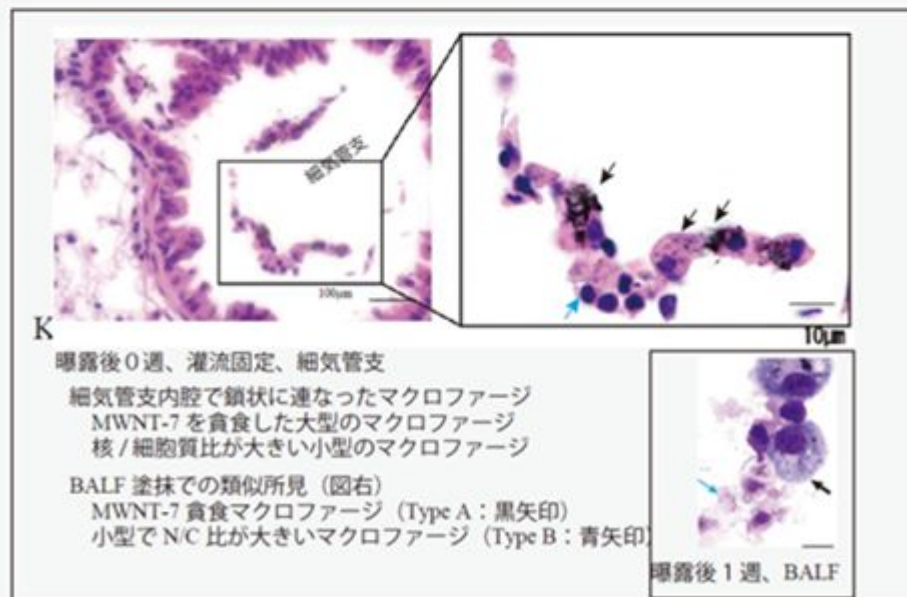
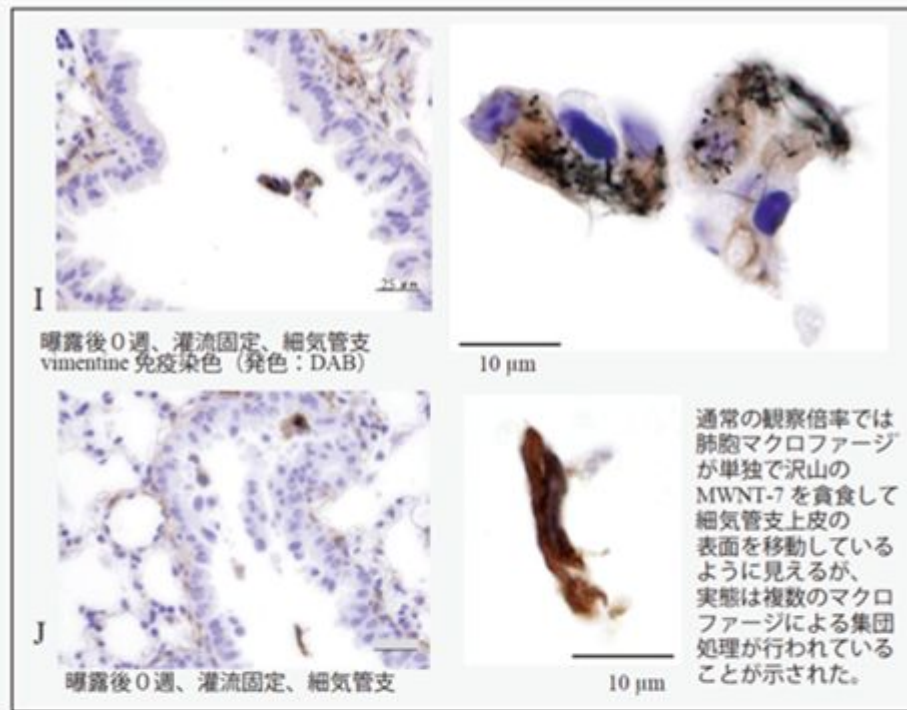
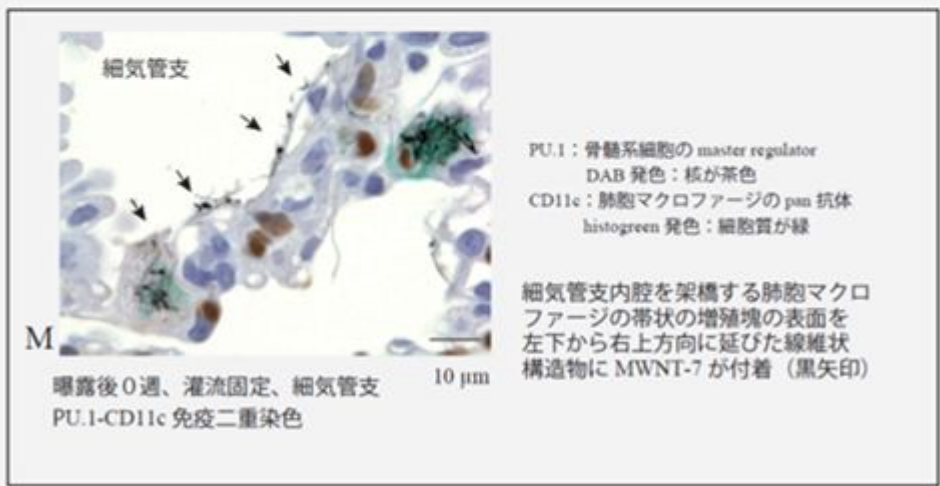
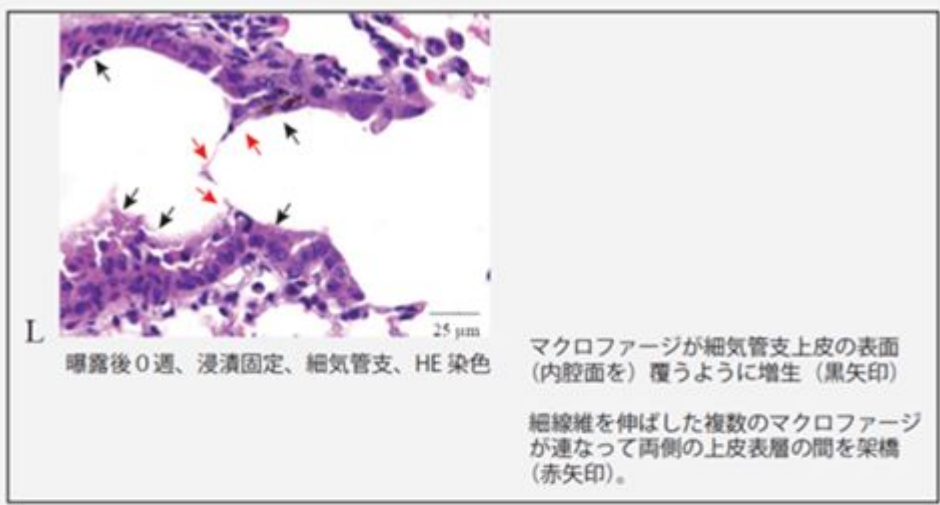


図 4-2 病理組織：MWNT-7



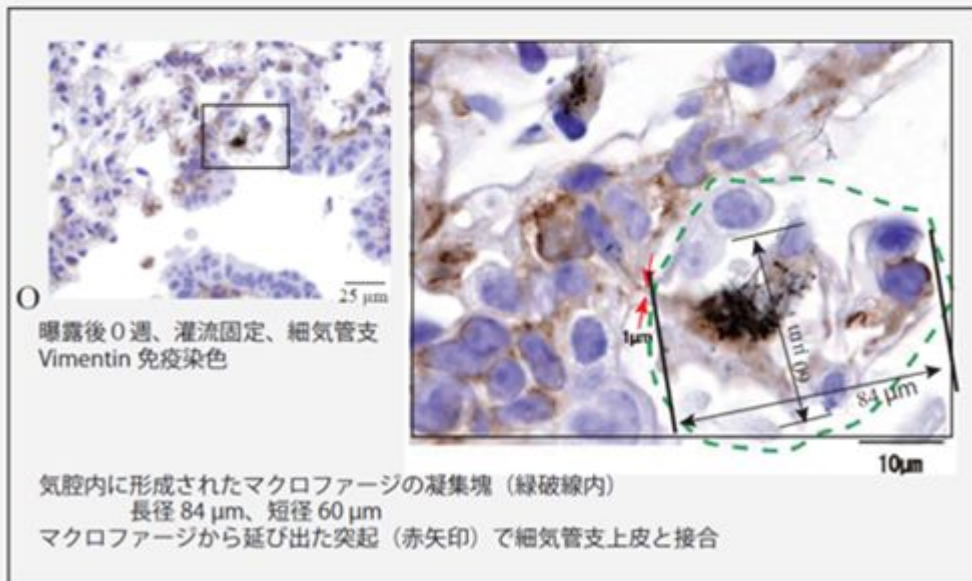
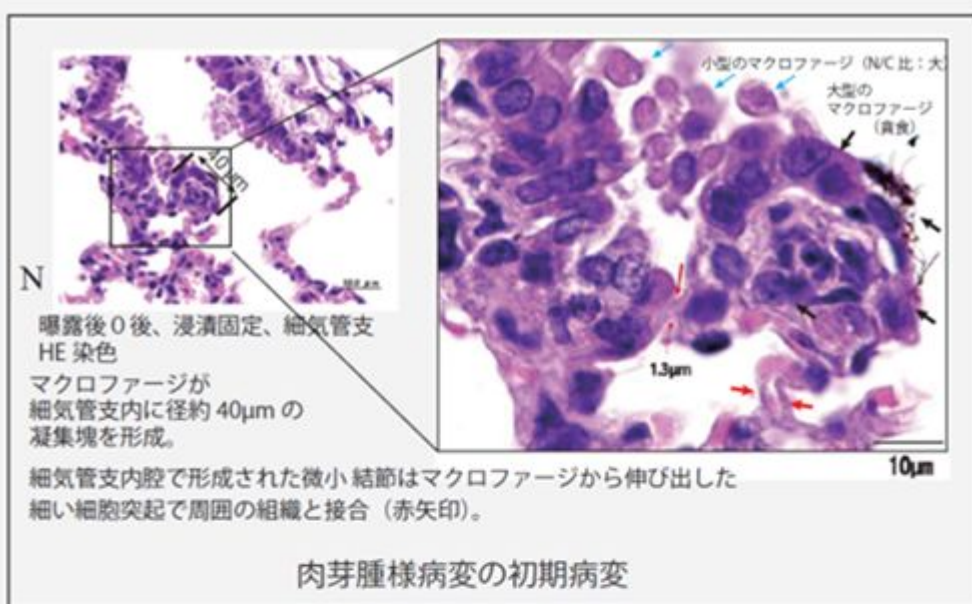
細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集団処理

図 4-2 病理組織: MWNT-7



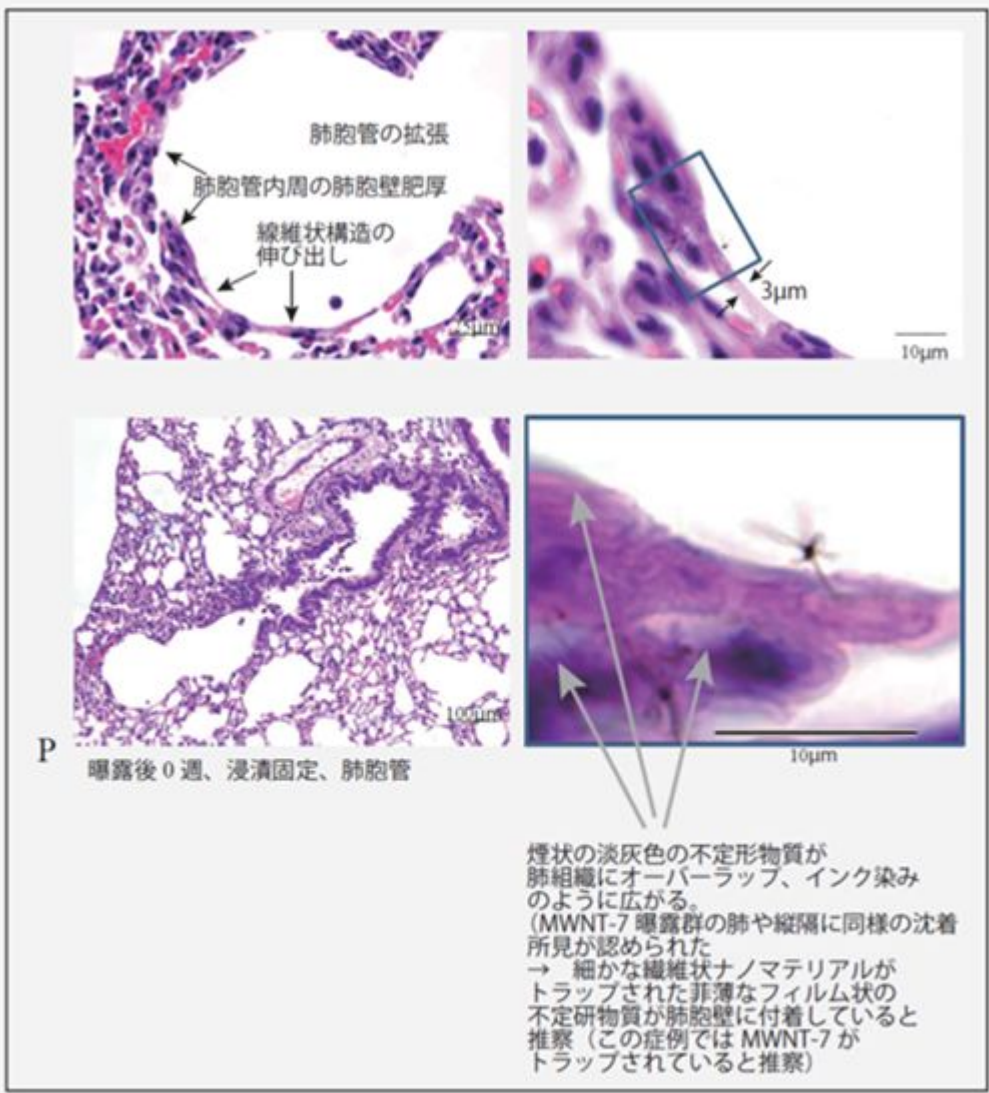
肺胞マクロファージの増生による細気管支内腔の架橋

図 4-2 病理組織: MWNT-7



細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

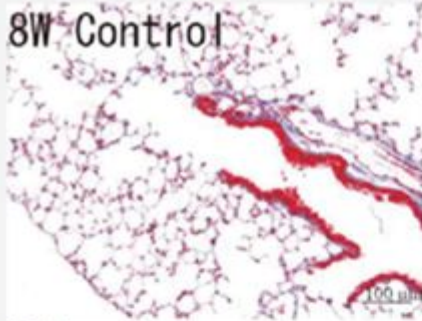
図 4-2 病理組織：MWNT-7



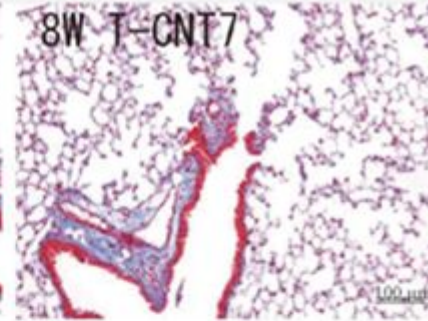
肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質 (MWNT-7) の沈着

図 4-2 病理組織：MWNT-7

8W Control



8W T-CNT7



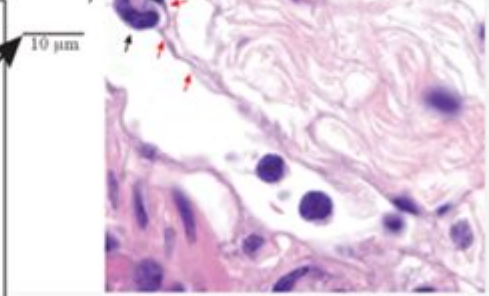
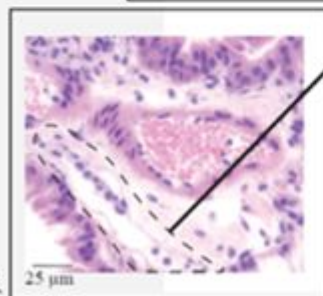
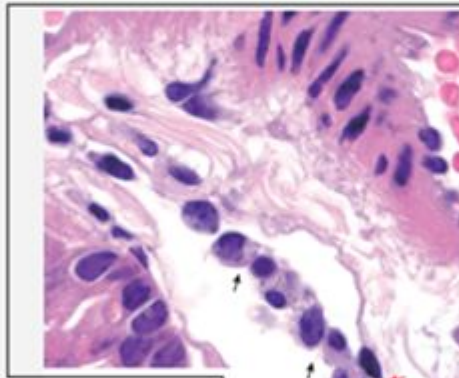
Q-1

灌流固定、肺、Masson trichrome stain

Q-2

肺には好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見は認められないが、曝露後8週に気道周囲の間質組織に Masson trichrome stain で青色に染まる膠原繊維の軽度な増生が認められた。

細気管支周囲間質での膠原線維の増生



R

細気管支周囲の間質は、肺から縦隔へ向かう液体成分やマクロファージの通路となっていて、鎖状に連なったマクロファージが線維状構造物への付着が認められた。⇒ 線維化病変に移行（推定）  
平成 29 年度、MWNT-7 3mg<sup>3</sup> 2 時間 / 週、x5 週曝露、曝露後 1W、細気管支周囲の間質

図 4-2 病理組織：MWNT-7

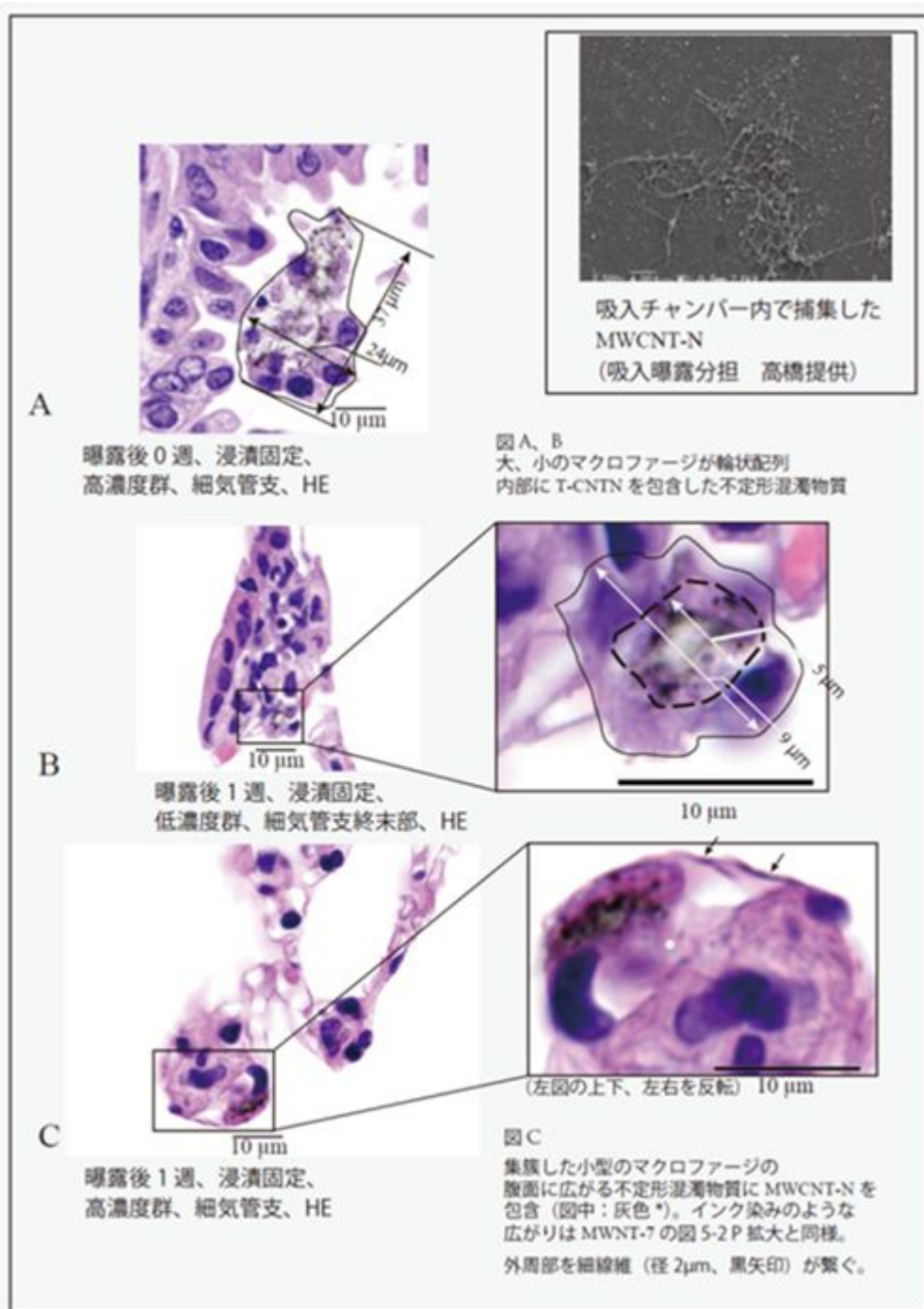


図 4-3 病理組織：MWCNT-N



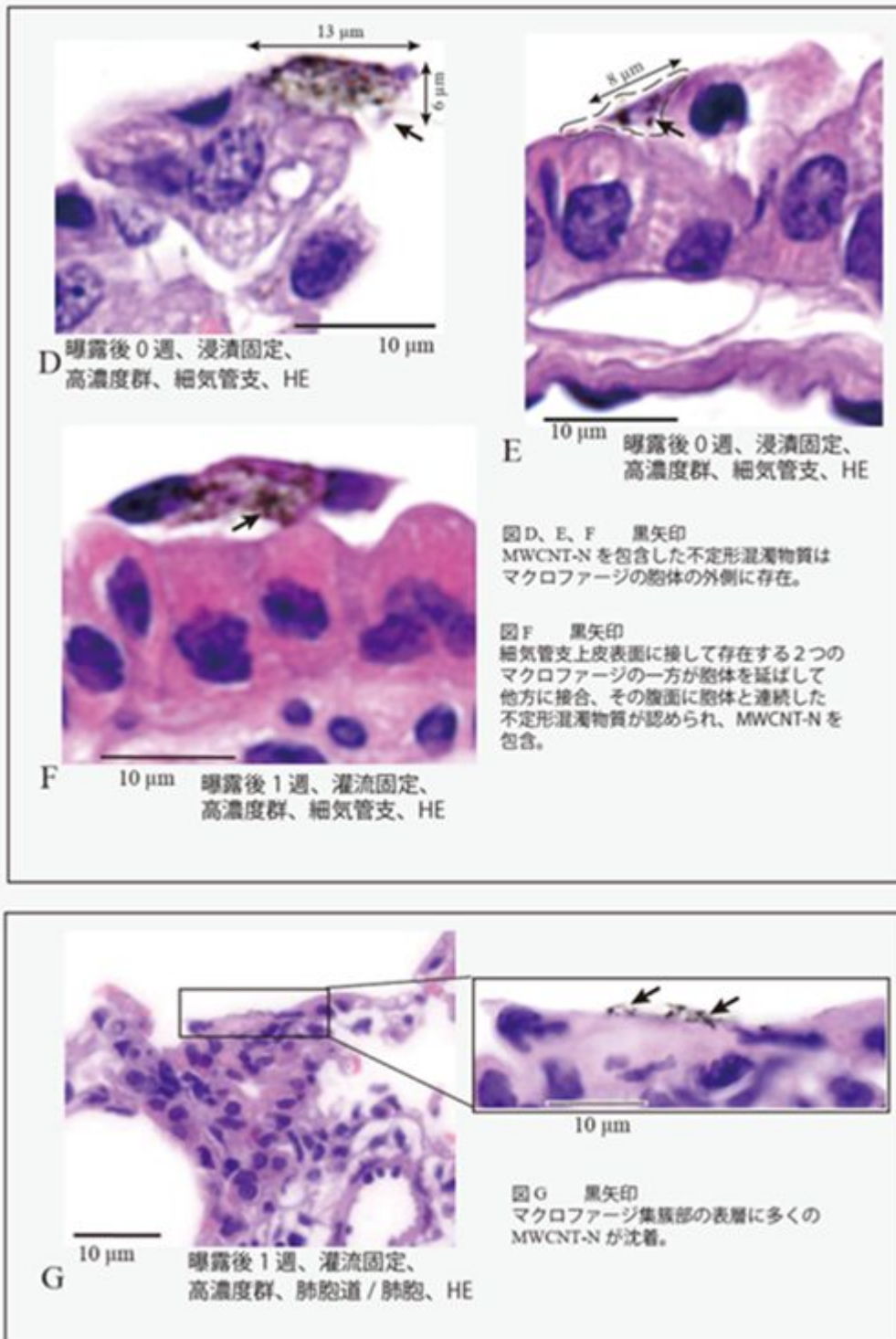
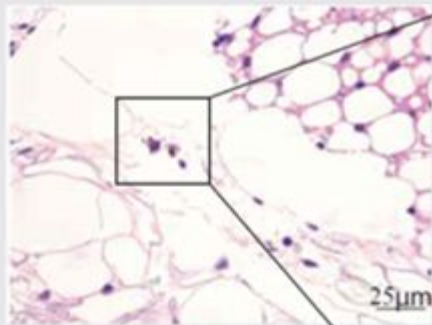
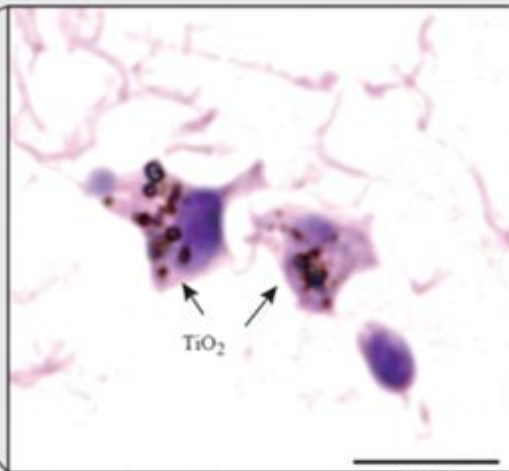


図 4-3 病理組織：MWCNT-N



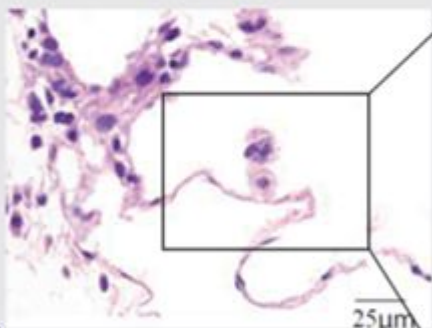
A

曝露後 0 週、灌流固定、縦隔、HE



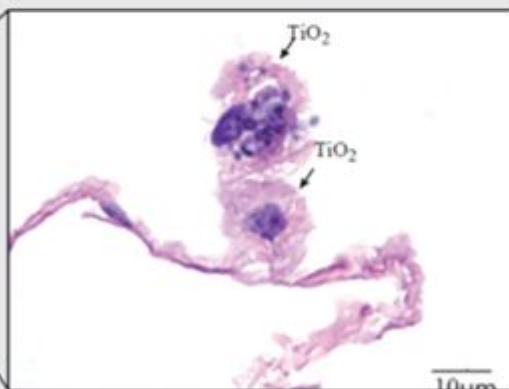
10μm

TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが縦隔内の疎性結合組織に付着



B

曝露後 8 週、灌流固定、  
高濃度群、縦隔 (心嚢膜)、HE

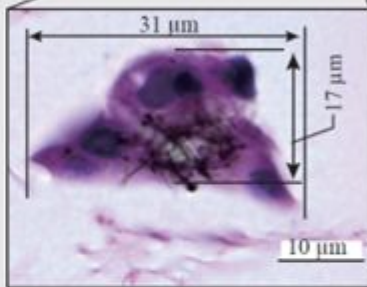
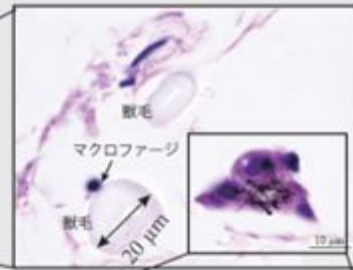
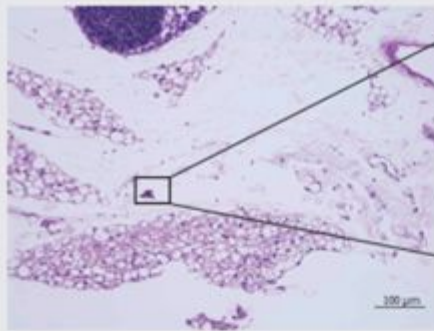


10μm

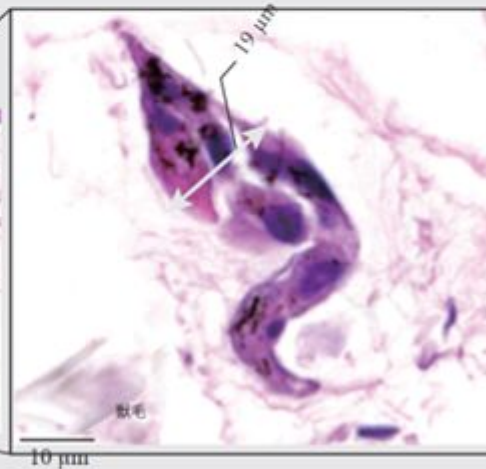
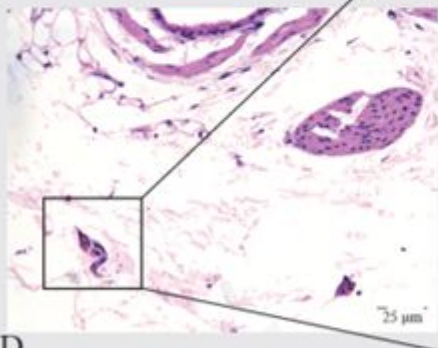
TiO<sub>2</sub> 貪食マクロファージが心嚢膜に付着

縦隔での沈着

図 5-1 病理組織：TiO<sub>2</sub>



C  
曝露後1週、灌流固定、縦隔、HE  
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

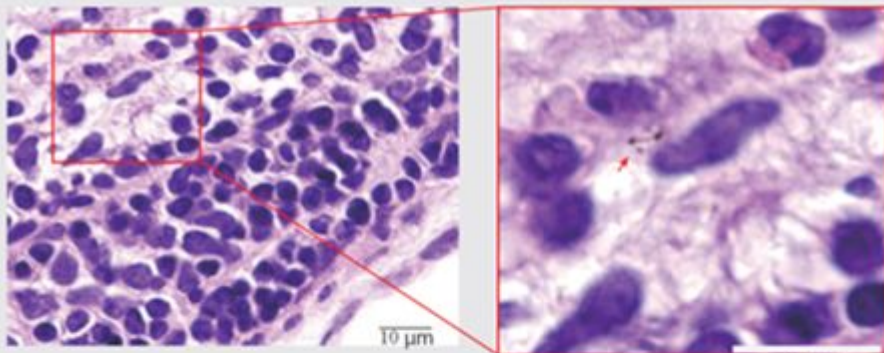


D  
曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE  
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

MWNT-7 貪食マクロファージが縦隔内の疎性結合組織に付着

縦隔での沈着

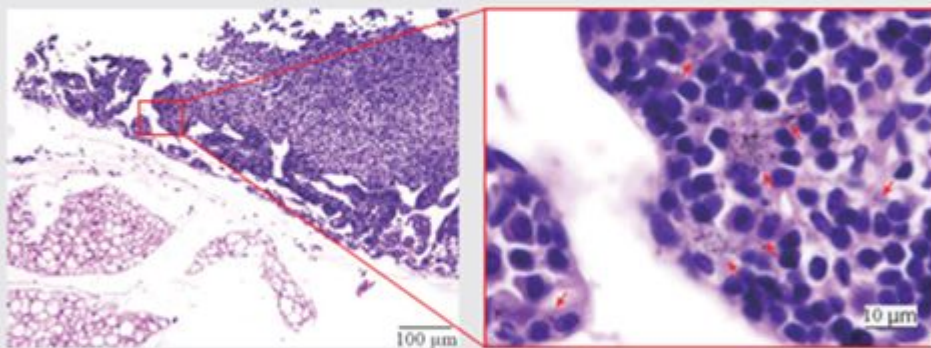
図 5-2 病理組織：MWNT-7



E 曝露後0週、灌流固定、  
縦隔のリンパ節、HE

赤矢印：MWNT-7

10 μm



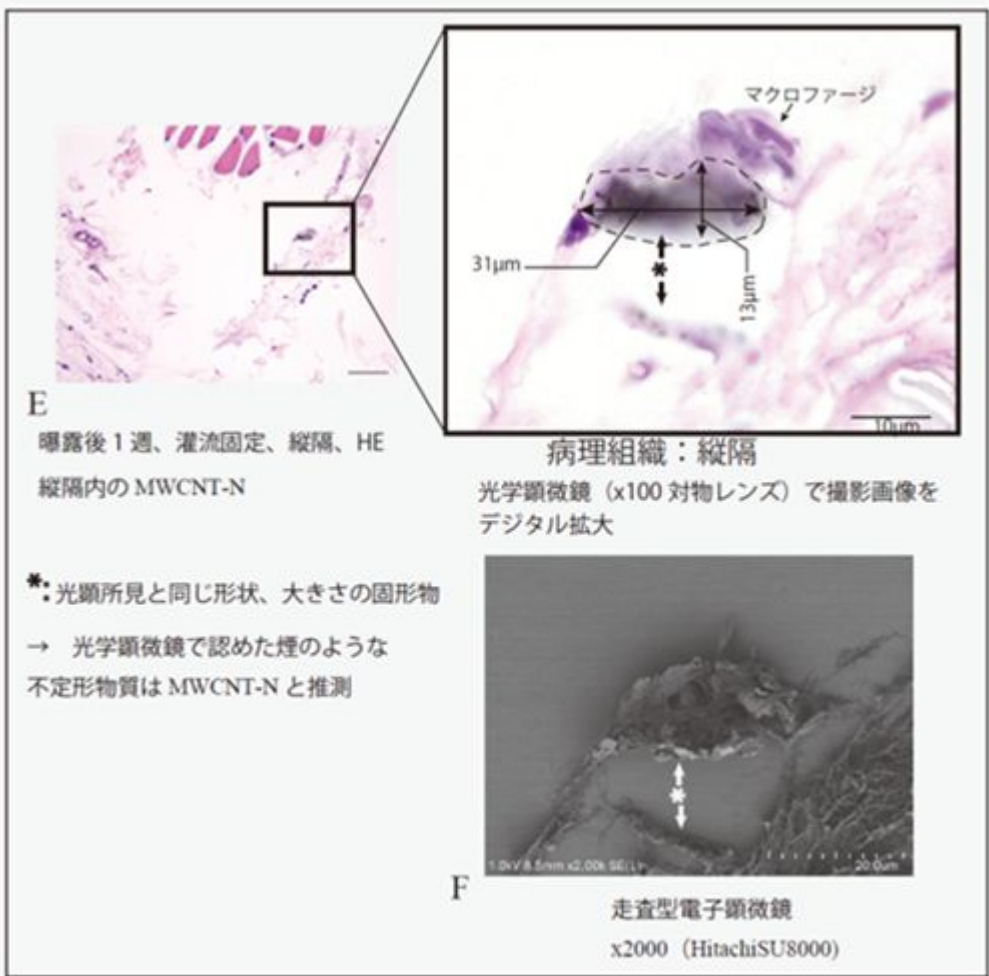
F 曝露後8週、灌流固定、  
縦隔のリンパ節、HE

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

肺に急性炎症の所見が認められなかった本実験は、縦隔のリンパ節に  
細かいMWNT-7の移行が認められ、MWNT-7の凝集体の移行は認められなかった。

縦隔リンパ節での沈着

図 5-2 病理組織：MWNT-7



E  
曝露後1週、灌流固定、縦隔、HE  
縦隔内のMWCNT-N

病理組織：縦隔  
光学顕微鏡 (x100 対物レンズ) で撮影画像を  
デジタル拡大

\*: 顕微鏡所見と同じ形状、大きさの固形物  
→ 光学顕微鏡で認めた煙のような  
不定形物質はMWCNT-Nと推測

F  
走査型電子顕微鏡  
x2000 (HitachiSU8000)

MWCNT-N がマクロファージとともに縦隔内の疎性結合組織に付着

図 5-3 病理組織：MWCNT-N

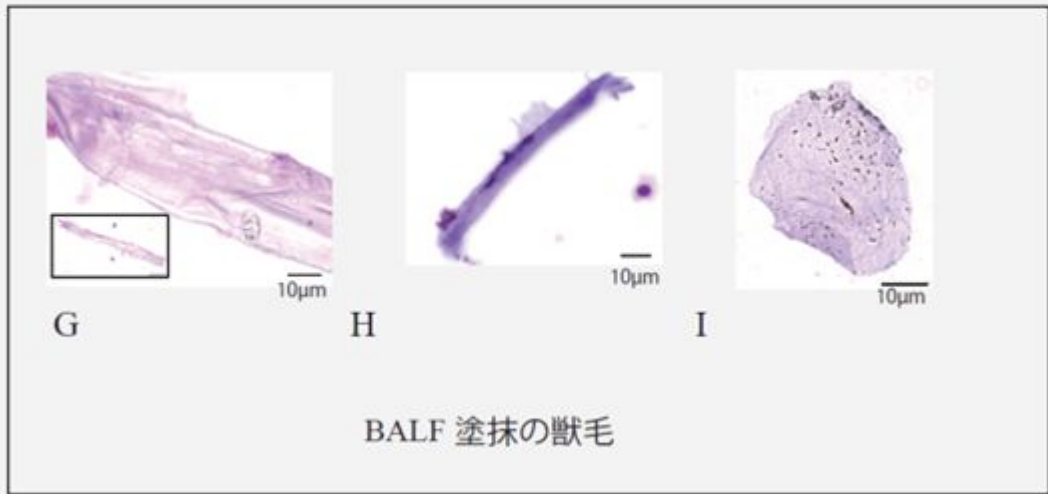
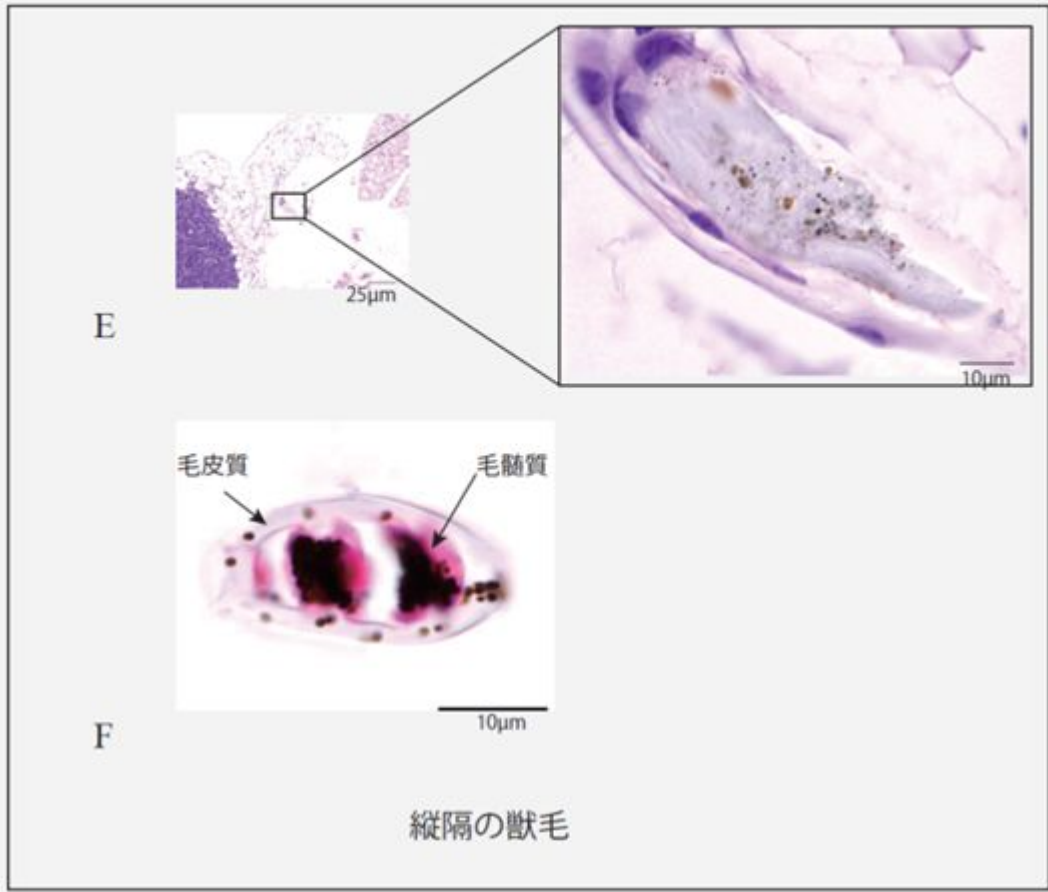


図 5-4 对照群の獣毛

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究  
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

分担研究課題名: 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。令和元年度の本分担研究では、肺胞マクロファージ胞体内で毛玉状凝集が想定される MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした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した。検体は先行研究で開発した高分散乾燥検体を得る Taquannh 法処理を行い、吸入曝露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試料を採取した。これらの試料は、組織(肺と縦隔)負荷量の測定、病理組織学的評価および免疫機能評価の分担研究者に提供した。曝露濃度は 1、3 mg/m<sup>3</sup> を目標としたが、実際の曝露濃度は目標濃度の約半分であった。吸入チャンバー内の Taquann 処理によって高分散した乾燥検体 MWCNT-N (T-CNTN) のエアロゾルの形状を確認したところ、細繊維が緩やかに絡み合い凝集している様子が確認された。MWCNT-N は MWNT-7 に比較して繊維径が細いため、前年度に吸入曝露実験を行った MWNT-7 とは異なり、吸入曝露装置内でエアロゾル化した状態から細繊維が絡み合って再凝集する可能性が考えられた。

## 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。

3ヵ年の研究班計画の最終年度となる令和元年度の本分担研究では、肺胞マクロファージ胞体内で毛玉状凝集が想定される MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした全身曝露吸入実験を行い、定期解剖により試料を採取し、肺と縦隔の組織負荷量の解析、病理組織学的評価および免疫機能評価用に分担研究者に提供した。

## B. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

MWCNT-N 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定める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノマテリアルの全身曝露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。また、検体に用いた MWCNT には製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。ヒトが現実的に曝露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。ヒトと比較して細い気道径を有するマウスを用いた吸入実験では、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害あるいは肺胞病変を修飾する可能性がある。そのため、実験動物からヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を

使用する必要がある(図1)。以上の点から、先行研究において、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離繊維のみからなる分散性の高い検体を得る処理法(Taquann 法、特許取得済)を独自に開発した。

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

### (3) MWCNT-N

MWCNT-N は NIKKISO CO.,LTD で生産されていた MWCNT である。MWCNT-N の原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相と呈している。粉末～繭状凝集体の外観を呈する MWNT-7 (MITSUI & CO., LTD.) とは大きく異なり、分散性は極めて低い。そのため Taquann 法で分散溶媒として使用する tert-ブチルアルコールへの分散工程においては、より高出力の超音波を短時間照射することにより懸濁液を得た。

MWCNT-N の原末 500 mg をビーカーに入れ、35°C に加温して溶解した TB 約 250mL を加えてステンレス製の小型ホイッパーで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらホイッパーで攪拌し TB がシャーベット状になった状態で MWCNT-N と TB を十分に混和し 1,000 mL 容量のメディウム瓶に移し、-25°C で一晩凍結した。約 60°C に加温した TB を添加し全量を 1,000mL とした。

凍結再融解した MWCNT-N の TB 懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置



BIORUPTOR®UCD-250HSA (コスモ・バイオ株式会社)にて、160W の出力で 30 秒間の超音波照射を 6 回繰り返す、MWCNT-N が十分に懸濁した混合液を得た。以降、T-CNT#53 と同様に濾過、凍結・固化、TB の分離を行い、分散性の高い乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理(目開き 53  $\mu\text{m}$  金属フィルターを使用)を行った MWCNT-N を T-CNTN と記載した。

## **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 を含めてナノ材料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 5 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;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、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、シェパードシヤック (Shepherd Specialty Papers 社)をケージ内に設置した。

### (3)群構成

HEPA フィルターを通した清浄空気のみを送気した群 (対照群)、T-MWCNTN 曝露群 (低濃度群、高濃度群)の 3 群構成とした。曝露目標濃度は低濃度群と高濃度群、それぞれ 1、3  $\text{mg}/\text{m}^3$  と設定した。T-CNTN を検体各群当たり 48 匹のマウスを使用、病

理組織用に 12 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 24 匹を割り当てた (表 1)。曝露チャンパ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

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver 3.0 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パーから構成される。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、MWCNT-N の低濃度群は 0.025  $\text{mg}/\text{mL}$  の TB 懸濁液、高濃度群では 0.05  $\text{mg}/\text{mL}$  の TB 懸濁液を各カートリッジに 10 mL 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行った。

噴射装置は、サブチャンパー (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、サブチャンパ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、サブチャンパー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンパ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。曝露チャンパーの総換気流

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、カートリッジの交換、噴射は完全自動化で実施した。

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 OUTER チャンバーと PET 樹脂で作製した INNER 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 INNER チャンバーは交換可能であり、検体の変更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おり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<sup>3</sup>)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度  $3 \times 10^5$  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  $1 \times 10^3$  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、MWCNT-N では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、φ55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂バインダ - ガラス繊維フィルター(Model TX40HI20-WW、φ55mm、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  $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$  から  $1 \text{ m}^3$  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、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 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°C 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。

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

肺と縦隔、顎下リンパ節のサンプリングのため、曝露終了直後(0W)、1 週後(1W)、4 週後(4W)及び 8 週後(8W)に定期解剖を行った。

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、気道内に吸引された検体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(フジフィルム和光純薬工業、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生理食塩水を 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) MWCNT-N (T-CNTN) の吸入曝露実験

5日間反復全身曝露吸入実験において、質量濃度は低濃度群、高濃度群それぞれ $0.6\pm 0.1$  mg/m<sup>3</sup>、 $1.3\pm 0.2$  mg/m<sup>3</sup>、平均CPCカウントは、低濃度群、高濃度群それぞれ $503\pm 150$ /cm<sup>3</sup>、 $1,107\pm 246$  /cm<sup>3</sup>であった。MMADは低濃度群、高濃度群それぞれ $640\sim 3,708$ nm( $\sigma$ :8.6 ~ 34.0)、 $1,617\sim 3,474$  nm( $\sigma$ :11.5 ~ 26.7)であった。実験期間を通して、質量濃度は目標濃度の約半分であり、エアロゾル化効率は30%未満であった(図5、図6)。

吸入曝露装置の曝露チャンバーからサンプリングしたMWCNT-Nのエアロゾルの形状を確認したところ、毛玉状に凝集している様子が確認され、その直径(長軸)は8~200 $\mu$ m程度の大きさであった(図7)。MWCNT-Nの繊維長はMWNT-7とほぼ同等であるが、繊維径は細く絡まりやすいため、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた(図8)。

### (2) 剖検所見

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

## D. 考察

ナノマテリアルの吸入曝露実験においては、検体の凝集が問題となるが、これまでの研究において Taquann 法と Taquann 全身曝露吸入装置はこれを解決する手段として有効であることを示してきた。

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-N は、原末の形状からエアロゾル化は非常に困難と考えられたが、Taquann 法により高分散検体が得られ、また、Taquann 吸入曝露装置 Ver3.0 によりエアロゾル化が可能であった。質量濃度は低用量、高用量ともに目標濃度の半分程度であった。その理由として、MWCNT-N は繊維径が細く柔らかいため、エアロゾル化した段階においてチャンバー内で繊維が絡まりあい再凝集していることが想定された。

この性状のため、高分散化した乾燥検体 (T-CNTN) を得るための Taquann 法処理過程においても金属製フィルターにも絡まりやすく、濾過効率も低い。

## E. 結論

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ため、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を実施した。MWCNT-N (T-CNTN) は目標濃度の約半分であった。その原因として MWCNT-N は繊維径が細いため、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた。吸入曝露を行ったマウスの定期解剖を行い、病理組織評価および免疫機能評価及び肺と縦隔の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、相田麻子氏に深く感謝する。

## 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.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Part Fibre Toxicol. 2019 Sep 2;16(1):34.

## 2. 学会発表

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Improved aerosol generation method and newly designed whole body rodent inhalation apparatus for the testing of nanomaterials in human-relevant exposure scenario, 15th IUTOX International Congress of Toxicology (ICTXV), Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii, USA, July 16, 2019, Poster

高橋祐次、新素材の毒性評価-工業的ナノマテリアルの高分散性小規模全身ばく露吸入装置の開発、JST-CRDS 2019 年度 科学技術未来戦略 WS、2019.12.3 (東京)

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Makiko Kuwagata, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A long-term whole-body inhalation study of multi-walled carbon nanotube in mice with an improved dispersion and inhalation system, the 59th Annual Meeting of the Society of Toxicology, at the Anaheim Convention Center, Anaheim, California, USA, March 17, 2020, Abstract Number/Poster Board number: 2104/ P452, Poster (Cancelled due to COVID-19)

## H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

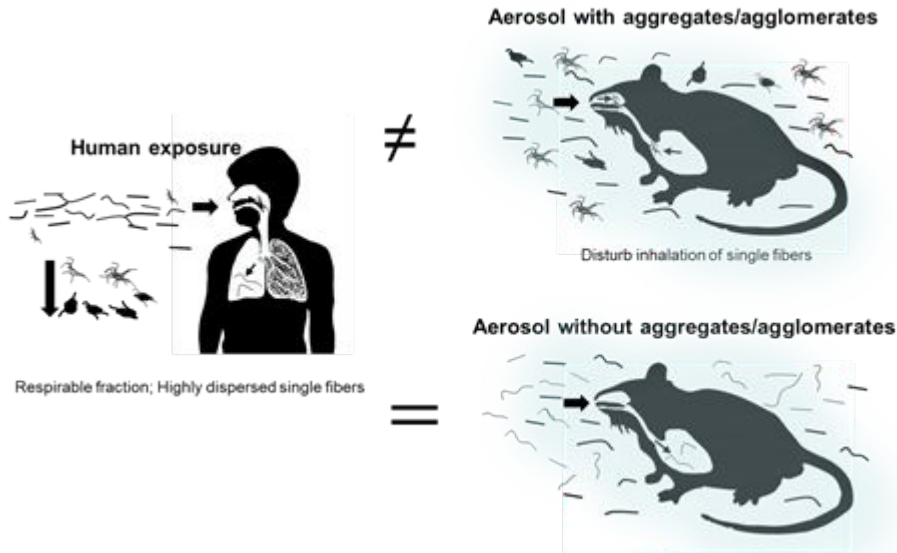
なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



**図1 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価方法**

粒子状物質の吸入において、粒径分布は内径が徐々に狭くなる鼻腔から肺胞に至る各部位への沈着量を決める重要な因子である。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。ヒトが現実的にナノマテリアルに曝露される環境下では、緩徐な風速であるため気相にナノマテリアルの凝集体/凝固体は速く沈降する。また、ヒトの上気道は長いため、凝集体/凝固体が効果的に取り除かれて肺胞レベルには高度に分散されたものが優先的に到達すると想定される。一方、実験動物を用いた粉体の吸入曝露試験では、エアロゾルの均一性を保つためチャン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。

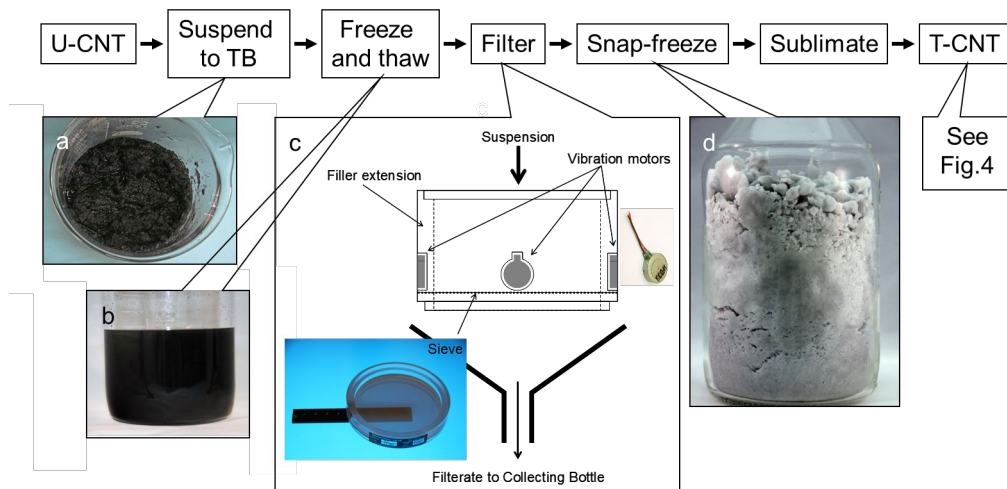


図 2 Taquann 法の概要

(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)  $-25^{\circ}\text{C}$  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:  $17.6\text{ m/s}^2$ ) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。MWCNT-N の Taquann 法処理に使用した Sieve は目開き  $53\mu\text{m}$  のものを使用した。Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表 1 群構成

Group	Examinations	Necropsy after inhalation exposure				
		N	0W	1W	4W	8W
<b>Control</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
0 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
2hr/D/W x 5W	• Immune function	20	5	5	5	5
Total 10 hr	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex) Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>MWCNT-N Low</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
Target Conc. 1 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
Actual Conc. 0.6mg/m <sup>3</sup>	• Immune function	20	5	5	5	5
2hr/D/W x 5W	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)					
Total 10 hr	Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>MWCNT-N High</b>	• Lung Burden	12	3	3	3	3
Target Conc. 3 mg/m <sup>3</sup>	• Histopathology(perfusion)	16	4	4	4	4
Actual Conc. 1.3mg/m <sup>3</sup>	• Immune function	20	5	5	5	5
2hr/D/W x 5W	BALF(Cytospin, Flow cytometry, Multiplex)					
Total 10 hr	Pulmonary mRNA Spleen, Lymph node					
	Subtotal	48	divide into two subgroups, A and B			
<b>Total number of animals</b>		<b>144</b>				

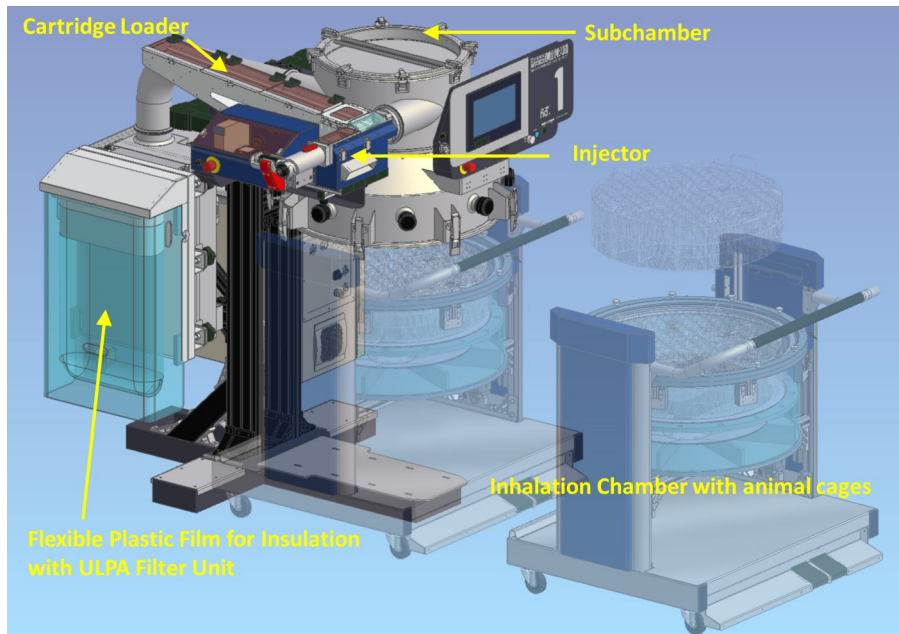


図3 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 3.0)

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ercart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。



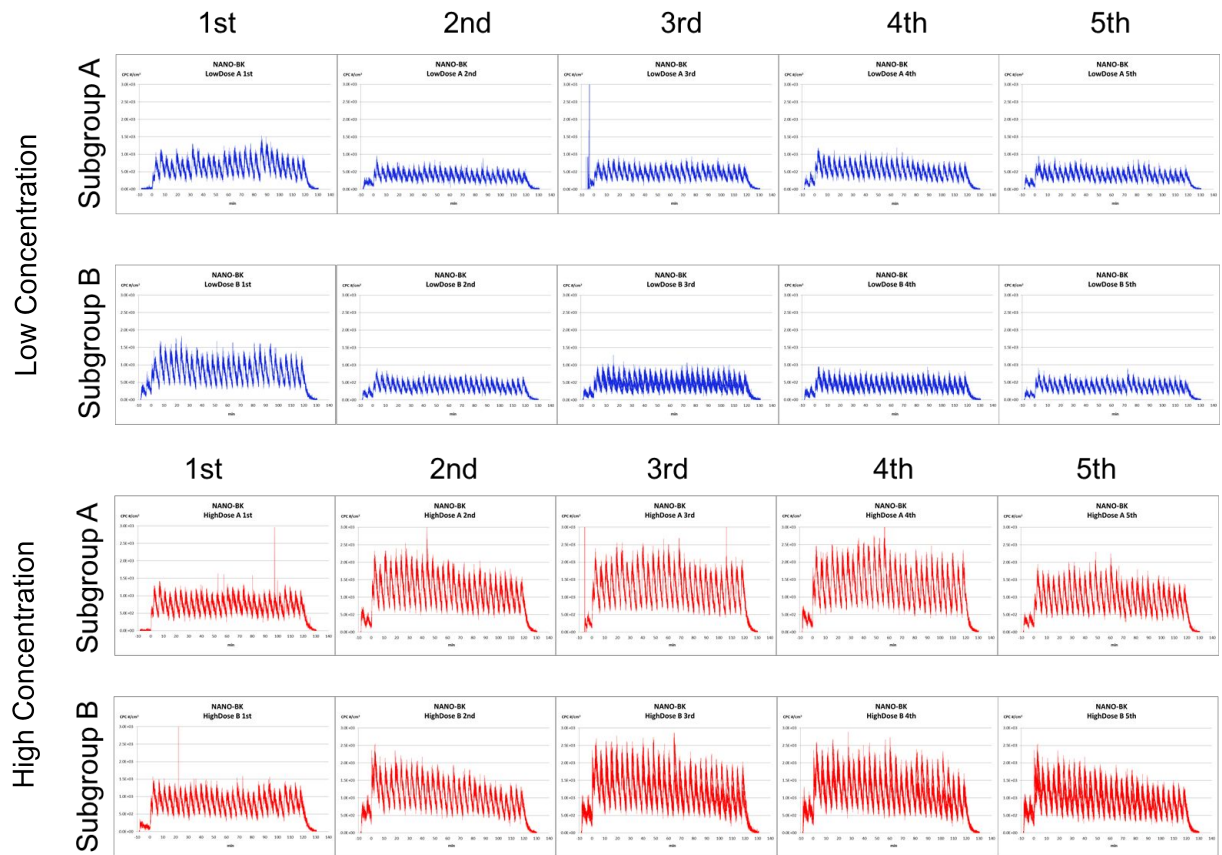
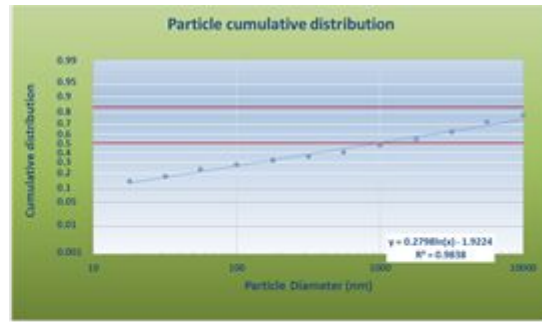
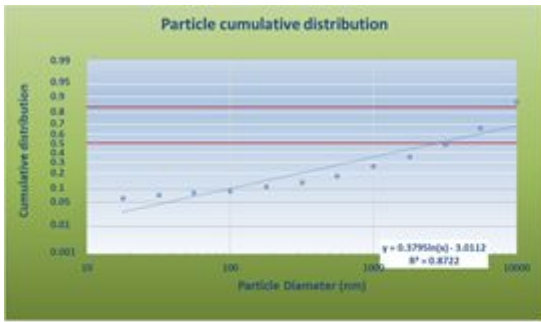


図5 T-CNTNの吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
467	1564	2792	33.935

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
482	1610	964	35.649

MWCNT-N (T-CNTN)		1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Low Dose	Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )	0.5	0.7	0.8	0.7	0.5	0.6	0.1
	CPC Average(0-120min, #/cm <sup>3</sup> )	747	364	511	496	399	503	150
	MMAD (nm)	964	964	1,685	640	3,708	1,592	1,243
	σg	8.6	35.6	11.0	12.1	34.0	20.0	13.0
High Dose	Mass Concentration (mg/m <sup>3</sup> )	1.3	1.5	1.4	1.2	0.9	1.3	0.2
	CPC Average(0-120min, #/cm <sup>3</sup> )	787	1157	1332	1336	923	1,107	246
	MMAD(nm)	NA	1,617	2,504	2,792	3,474	2,597	770
	σg (nm)	NA	11.5	14.4	13.9	26.7	17.0	7.0

図6 T-CNTN の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

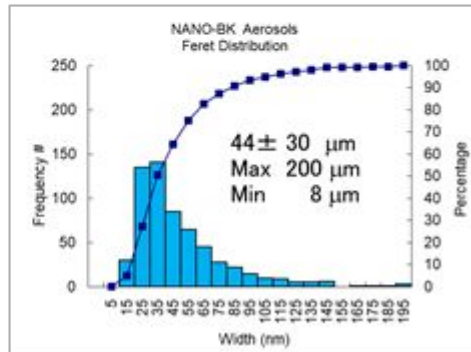
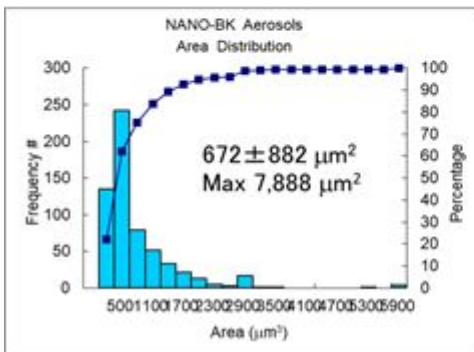
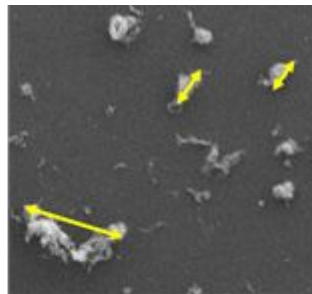
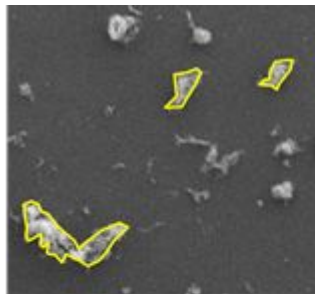
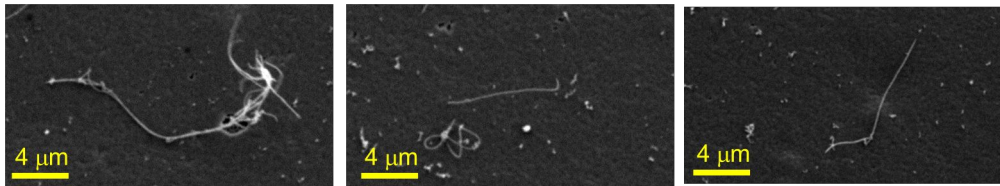
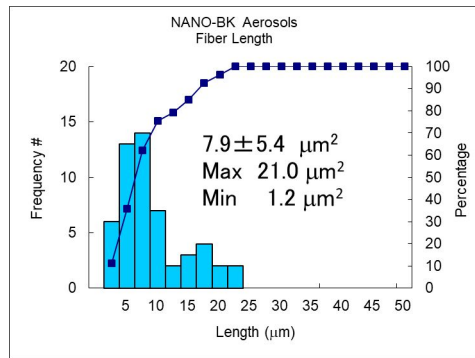


図7 MWCNT-N のエアロゾル形状 (凝集成分)

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 50 倍の倍率で観察し繊維が絡まったエアロゾル(Agglomerates)の面積及び直径(長軸)を測定した。



**図 8 MWCNT-N のエアロゾル形状（繊維状成分）**

アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルのうち、単離した繊維状のエアロゾルを 2500 倍の倍率で観察し、繊維長を測定した。

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究  
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

分担研究課題名: ナノマテリアルの組織負荷量の測定

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

### 研究要旨

本分担研究は、肺胞マクロファージの貪食・蓄積様式が異なると予想されたモデルナノマテリアルをマウスに吸入曝露して曝露後の休薬期間における肺内沈着量の推移を調べることで、肺負荷量とクリアランスにモデルナノマテリアルによる違いを調べることを目的とした。年次計画の最終年度にあたる令和元年度は「モデルナノマテリアル」にマクロファージの胞体内で毛玉状に凝集して蓄積されると想定された多層カーボンナノチューブの MWCNT-N を高分散化処理した T-CNTN を検体とした吸入曝露実験を研究班で実施した(分担 高橋)。吸入曝露は 0.0、0.6、1.3、mg/m<sup>3</sup> 曝露群の 3 群構成で、マウスに週 1 回、午前中に 2 時間の曝露を 5 週間繰り返す間歇曝露とした。曝露終了日、1、4 および 8 週間における肺の検体沈着量を測定して、休薬期間における肺負荷量の経時的な推移を調べた。その結果、0.6mg/m<sup>3</sup> 群 1.3mg/m<sup>3</sup> 群とも休薬後 8 週後の肺負荷量は曝露直後の約 1/3 に減衰し、半減期は約 3.5 週間であり、マクロファージによる肺からのクリアランスの阻害を起こさない負荷状態であったことが示された。

また、令和元年度は平成 30 年度に実施した TiO<sub>2</sub> (T-TiO<sub>2</sub>) と MWNT-7 (T-CNT7) の測定結果と併せて、3 つのタイプのモデルナノマテリアルによる肺負荷量の推移について比較解析を行った。その結果、実施した吸入曝露条件下で、肺での検体負荷量の推移は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約 3.5 週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスが阻害が起きない曝露条件で実施されたことが示された。また 3 つのタイプのモデルナノマテリアル全体としてみると、曝露終了後 8W の休薬後には曝露終了時の負荷量のおおよそ 30% ~ 15% の検体が肺内に残存していることが示された。残存率は MWNT-7 が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub> は MWCNT (MWNT-7、MWCNT-N) と比べてクリアランスされ易いが、曝露終了時の負荷量の約 1/6 が肺内に残存していることが示された。

## A. 研究目的

ヒトにおける主要な曝露経路となる吸入曝露で、高効率な有害性評価手法の基盤となる情報の整備を目的とした吸入曝露実験を、研究班として平成 29 年度から令和元年度の三ヵ年の研究期間で実施した。本分担研究は、その中で肺負荷量の解析を担当、令和元年度は多層カーボンナノチューブのひとつ MWCNT-N を検体として吸入曝露実験を実施、検体の肺内沈着量を経時的に調べ、平成 30 年度に実施した TiO<sub>2</sub>(T-TiO<sub>2</sub>)と MWNT-7(T-CNT7)の解析結果と併せて、3 つのタイプのモデルナノマテリアルによる呼吸器への影響について肺負荷量の観点から比較解析をおこなうことを目的とした。また、吸入曝露によって肺に入ったナノマテリアルのクリアランスを考える時、その移行先と想定される縦隔での検体の沈着量を調べることで、縦隔への移行状況を把握することも目的に加えた。

## B. 研究方法

令和元年度は MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験(分担 高橋)の肺を材料として MWCNT-N (T-CNTN)の肺内沈着量を測定、肺負荷量のデータを収集した(図 1 A)。また、併せて採取した縦隔を材料として縦隔での沈着量を測定した。

解析に用いた検体は吸入曝露実験(分担 高橋)で採取したものをホルマリン固定して解析に供試するまで室温で保存した。

### 準備

#### )組織溶解液の調製

80 ℃に加熱した超純水 140mL に 10g の KOH を加え、その溶液に 1%SDS 水溶液を 20mL と 1%EDTA2Na 20mL を加えた。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 ℃で加熱することにより溶解状態として組織溶解液を調製した。

#### )MWCNT-N の原液を調整

MWCNT-N 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)(MWCNT-N 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。

#### ) 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-1: 検量線

#### MWCNT 検量線溶液(C1~C5)の調製

肺と縦隔組織中の MWCNT の沈着量を測定する前日に、検量線を得る為に必要な MWCNT の 5 段階希釈液の検量線溶液(C1~C5)を以下、 の手順で調整した(表 1、図 3)。

#### 検量線溶液 C5 の調製

準備-)で調製した MWCNT 原液 0.4 mL を 15 mL 容のフタ・メモリ付の PP チューブに採取し、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 C5:2 µg/mL)

#### 検量線溶液 (C1~C4)の調製

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 C1~C4 を作成した。C1~C5 を検量線溶液とした。

## B-2: 肺および縦隔の検体沈着量の測定

以下 ~ の手順で測定した。

### 肺と縦隔のサンプルの採取と溶液調整

図 1-A に国立医薬品食品衛生研究所毒性部・高橋室長の分担研究で実施した吸入曝露実験のデザインを示した。吸入曝露実験は Taquann 処理によって原体 (MWCNT-N) を分散した T-CNTN を検体とし、群構成を対照群 ( $0 \text{ mg/m}^3$ ) と  $0.6$ 、 $1.3 \text{ mg/m}^3$  の 3 群構成とした。曝露は 1 日に 2 時間 ( $10:00 \sim 12:00$ )、週に 1 日の曝露を 5 週間繰り返す計 10 時間 ( $2 \text{ 時間} \times 5 \text{ 回}$ ) の吸入曝露を行った。5 回の曝露を終了した日 (day 0) の午後  $2:00 \sim 6:00$  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腋窩動脈の切断により放血して安楽死させてから肺と縦隔を摘出した。肺と縦隔は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬して所属施設 (日本バイオアッセイ研究センター) に持ち帰り、測定まで室温で保管した。

なお、解剖時の採材では MWCNT-N 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から開胸するなど、検体のコンタミンに細心の注意を払った。

10% 中性リン酸緩衝ホルマリン液に 1 か月以上浸透して十分固定した肺と縦隔は 2 mL の組織溶解液 (準備-) で 24 時間 60 に保って溶解した。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 MWCNT-N 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。

### HPLC (high performance liquid chromatography) による MWCNT-N (T-CNTN) の測定

図 2 に肺および縦隔組織中の T-CNTN 測定手順の前処理を示した。

準備-) で調製した各溶液 1 mL を 12000 rpm で 10 分間遠心分離、その上澄み液を除去した沈渣に TW-mixture 1 mL を添加して 12000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を除去した沈渣に濃塩酸 0.2mL を加えタッチミキサーで 10 秒間攪拌し、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。上澄み液を除去した沈

渣に濃硫酸 0.2mL を加えて沈渣に含まれる T-CNTN 以外の肺組織を分解し、タッチミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、準備-) で調製したマーカー溶液 1 mL を添加し、10 秒間超音波分散し、振とう機で 15 分間攪拌させた後、 $0.4 \mu\text{m}$  のフィルター (ワットマン: GE Healthcare UK Ltd) でろ過したフィルター上の MWCNT をポンチ ( $8 \text{ mm}\phi$ ) 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、その溶液中の T-CNTN を HPLC で測定した。

HPLC の測定条件を次に示した。

HPLC: ウォーターズ Acquity UPLC

カラム: Acquity BEH C18 (ウォーターズ)

カラム粒径、長さ  $\times$  内径:  $1.7 \mu\text{m}$ 、 $100 \text{ mm} \times 2.1 \text{ mm}\phi$

カラム温度: 40

検出器: 蛍光検出器 (励起波長:  $294 \text{ nm}$ 、蛍光波長:  $410 \text{ nm}$ )

試料注入量:  $5 \mu\text{L}$

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:  $0.5 \text{ mL/min}$

### 肺内及び縦隔の T-CNTN の沈着量の計算

T-CNTN 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-CNTN の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、T-CNTN の肺個体当りの沈着量 (単位:  $\mu\text{g}$ ) と、3 匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、肺または縦隔の重量で除することにより g 当りの沈着量 (単位:  $\mu\text{g/g}$ ) と平均値及び標準偏差を求めた。

### (附) 使用機器と試薬

・高速液体クロマトグラフ (HPLC)

メーカー: ウォーターズ

形式: Acquity UPLC

- ・電子天秤  
メーカー：(株)メトラー・トレード  
形式：AE163
- ・振とう機  
メーカー：サーマル化学産業株式会社  
形式：TS-100
- ・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
- ・超音波分散機  
メーカー：タイテック株式会社  
形式：VP-30S
- ・アセトニトリル  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：HPLC 用
- ・メタノール  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：HPLC 用
- ・Benzo[ghi]perylene(BgP)  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：試薬特級
- ・TWEEN 80  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社
- ・水酸化カリウム  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：試薬特級
- ・ドデシル硫酸ナトリウム  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：試薬特級
- ・EDTA 2Na  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：試薬特級
- ・アスコルビン酸ナトリウム  
メーカー：富士フィルム和光純薬株式会社  
試薬グレード：試薬特級

## C. 研究結果及び考察

### C-1: 検量線

Taquann 処理された T-CNTN の検量線を図 3 に示した。T-CNTN の濃度とマーカの面積値は、相関

係数 0.9965 であり、T-CNTN 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-CNTN は 0.4 ~ 2.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  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: 肺および縦隔の負荷量

表 2 と図 4 に Taquann 処理された T-CNTN を吸入曝露したマウス肺と縦隔の T-CNTN の負荷量を示した。1.3  $\text{mg}/\text{m}^3$  曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露直後では 14.38  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、1 週目では 10.96  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、4 週目では 5.73  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、8 週目では 3.77  $\mu\text{g}/\text{g}$  で曝露直後から曝露後 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は曝露直後の約 1/3 の減衰が示された(表 3)。半減期は曝露終了後約 3.5 週であった(図 4)。

0.6  $\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露直後では 8.84  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、1 週目では 5.51  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、4 週目では 2.69  $\mu\text{g}/\text{g}$ 、8 週目では 2.41  $\mu\text{g}/\text{g}$  で曝露直後から曝露後 8 週に向かう減衰傾向が認められ、8 週後の負荷量は曝露直後の約 1/3 の減衰が示された(表 3)。半減期は曝露終了後約 3.5 週であった(図 4)。

なお、1.3  $\text{mg}/\text{m}^3$  と 0.6  $\text{mg}/\text{m}^3$  曝露群の縦隔と対照群(キャリアーエア吸入)の肺と縦隔に T-CNTN は検出されなかった。

令和元年度物質の MWCNT-N(T-CNTN)と平成 30 年度物質の  $\text{TiO}_2$ (T-TiO<sub>2</sub>)と MWNT-7(T-CNT7)の解析結果と併せて、3 つのタイプのモデルナノマテリアルによる呼吸器への生体影響について肺負荷量の観点から比較解析結果を以下に示した。

研究班で実施した吸入曝露の条件下での検体の肺負荷量は、いずれのモデルナノマテリアルも半減期が約 3.5 週間であり、各吸入曝露実験はマクロファージによる肺からのクリアランスの阻害を起こさない負荷状態であったことが示された(図 4)。また、曝露終了後 8W の休薬期間を置いた時点での曝露終了直後(0W)に対する検体の残存率は MWNT-7: 32%; MWCNT-N: 27%;  $\text{TiO}_2$ : 17% で、曝露終了時の負荷量のおおよそ 30% ~ 15% の検体が肺内に残存していることが示された(表 3)。残存率は MWNT-7 が

最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub>は残存率でみるとMWCNT(MWNT-7、MWCNT-N)と比べてクリアランスされ易く、暴露終了時の負荷量の1/6程度が肺内に残存していた。一方、肺1g当たりの検体沈着量はTiO<sub>2</sub>(30 mg<sup>β</sup>)、MWNT-7(3 mg<sup>β</sup>)、MWCNT-N(1.3 mg<sup>β</sup>)の各群でそれぞれ25.85、9.15、3.77 μgで、暴露濃度がMWNT-7(3 mg<sup>β</sup>)群より10倍高いTiO<sub>2</sub>(30 mg<sup>β</sup>)群の沈着量が最も多く、MWNT-7群の2.8倍であった。

各モデルナノ材料とも対照群の肺と縦隔、曝露群の縦隔に検体の沈着は検出されなかった。

#### D. 結論

TiO<sub>2</sub>、MWNT-7、MWCNT-Nをマウスに計10時間の間歇吸入曝露をおこない、曝露後8週までの休薬期間に定期的に肺と縦隔を採材して検体の肺負荷量の推移を比較解析した。

その結果、いずれの吸入曝露実験もマクロファージによる肺からのクリアランスの阻害が起きない曝露が実施されたことが示された。

また3つのタイプのモデルナノ材料全体としてみると、曝露終了後8週の休薬後には曝露終了時の負荷量のおおよそ30%～15%の検体が肺内に残存していることが示された。残存率はMWNT-7が最も多く、肺からクリアランスされにくい状態で肺内に存在していることが示唆された。TiO<sub>2</sub>はMWCNT(MWNT-7、MWCNT-N)と比べてクリアランスされ易いが、暴露終了時の負荷量の約1/6が肺内に残存していることが示された。暴露濃度がMWNT-7(3 mg<sup>β</sup>)群より10倍高いTiO<sub>2</sub>(30 mg<sup>β</sup>)群の沈着量が最も多く、MWNT-7群の2.8倍であった。いずれの検体でも縦隔における沈着は検出できなかった。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

なし

##### 1. 論文発表

なし

##### 2. 学会発表

大西誠、後藤裕子、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、武田知起、東久保一郎、菅野純：フィルター捕集したカーボンブラックのHPLCを用いた微量定量法の開発、第92回日本産業衛生学会、2019年5月(名古屋)

加納浩和、笠井辰也、齋藤新、平井繁行、鈴木正明、梅田ゆみ、妹尾英樹、大西誠、竹内哲也、三角恭兵、福島昭治、菅野純：メタクリル酸ブチルのラット及びマウスへの吸入ばく露による発がん性及び慢性毒性、第92回日本産業衛生学会2019年5月(名古屋)

大西誠、東久保一郎、後藤裕子、川本俊弘、菅野純：HPLCを用いたカーボンブラック粉塵の微量定量法の開発、第59回日本労働衛生工学会、2019年11月(福島県郡山市)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

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

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし



**表 1 検量線溶液を調製するための溶液調製量**

令和元年度物質：T-CNTN			
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	0.4
溶液C2	0.2	0.8	0.8
溶液C3	0.4	0.6	1.2
溶液C4	0.6	0.4	1.6
溶液C5	0.8	0.2	2.0

**表 2 肺内沈着量の分析結果**

**A 令和元年度物質：T-CNTN**

曝露濃度 曝露後期間	MWCNT-N 肺当たり量( $\mu\text{g}$ )		MWCNT-N 1g 当たり重量( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	
		SD		SD
肺 0 $\text{mg}/\text{m}^3$ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 $\text{mg}/\text{m}^3$ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 $\text{mg}/\text{m}^3$ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 $\text{mg}/\text{m}^3$ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0.6 $\text{mg}/\text{m}^3$ -0 週	1.36	0.36	8.84	2.23
肺 0.6 $\text{mg}/\text{m}^3$ -1 週	0.88	0.38	5.51	2.19
肺 0.6 $\text{mg}/\text{m}^3$ -4 週	0.44	0.15	2.69	0.94
肺 0.6 $\text{mg}/\text{m}^3$ -8 週	0.37	0.15	2.41	0.89
肺 1.3 $\text{mg}/\text{m}^3$ -0 週	2.29	0.50	14.38	3.36
肺 1.3 $\text{mg}/\text{m}^3$ -1 週	1.82	0.15	10.96	1.27
肺 1.3 $\text{mg}/\text{m}^3$ -4 週	0.87	0.35	5.73	2.27
肺 1.3 $\text{mg}/\text{m}^3$ -8 週	0.64	0.18	3.77	1.01

曝露濃度 曝露後期間	MWCNT-N 縦隔当たり量( $\mu\text{g}$ )		MWCNT-N 1g 当たり重量( $\mu\text{g}/\text{g}$ )	
		SD		SD
縦隔 0 $\text{mg}/\text{m}^3$ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00

縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

**B 平成30年度物質：T-TiO<sub>2</sub>**

曝露濃度 曝露後期間	T-TiO <sub>2</sub>		T-TiO <sub>2</sub>	
	肺当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -0 週	18.61	1.58	150.11	9.05
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -1 週	14.11	1.62	112.47	13.94
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -4 週	8.13	0.89	63.05	7.21
肺 30 mg/m <sup>3</sup> -8 週	3.48	1.82	25.85	11.36

曝露濃度 曝露後期間	T-TiO <sub>2</sub>		T-TiO <sub>2</sub>	
	縦隔当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 30 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

C 平成30年度物質：T-CNT7（#53）

曝露濃度 曝露後期間	T-CNT7		T-CNT7	
	肺当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	3.98	0.67	29.04	6.16
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	3.04	0.25	21.33	2.01
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	2.12	0.18	13.68	1.62
肺 3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	1.38	0.36	9.15	2.17

)

曝露濃度 曝露後期間	T-CNT7		T-CNT7	
	縦隔当たり量(μg)	SD	1g 当たり重量(μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m <sup>3</sup> -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

表 3 曝露終了後 8 週における肺内の検体沈着量

検体名 (曝露量)	肺内沈着量 ( $\mu\text{g}/\text{肺 } 1\text{g}$ )		8W 残存率 ( $8\text{W}/0\text{W}\times 100$ )	実施年度
	0W	8W		
T-TiO <sub>2</sub> ( $30\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	150.11	25.85	32%	平成 30
T-CNT7 ( $3\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	29.04	9.15	17%	平成 30
T-CNTN ( $0.6\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	8.84	2.41	27%	令和 1
T-CNTN ( $1.3\text{mg}/\text{m}^3$ 、2 時間 x10 回)	14.38	3.77	27%	令和 1

T-CNT7(平成 29 年度実施)は 0W の値が異常と判断、データ不採用

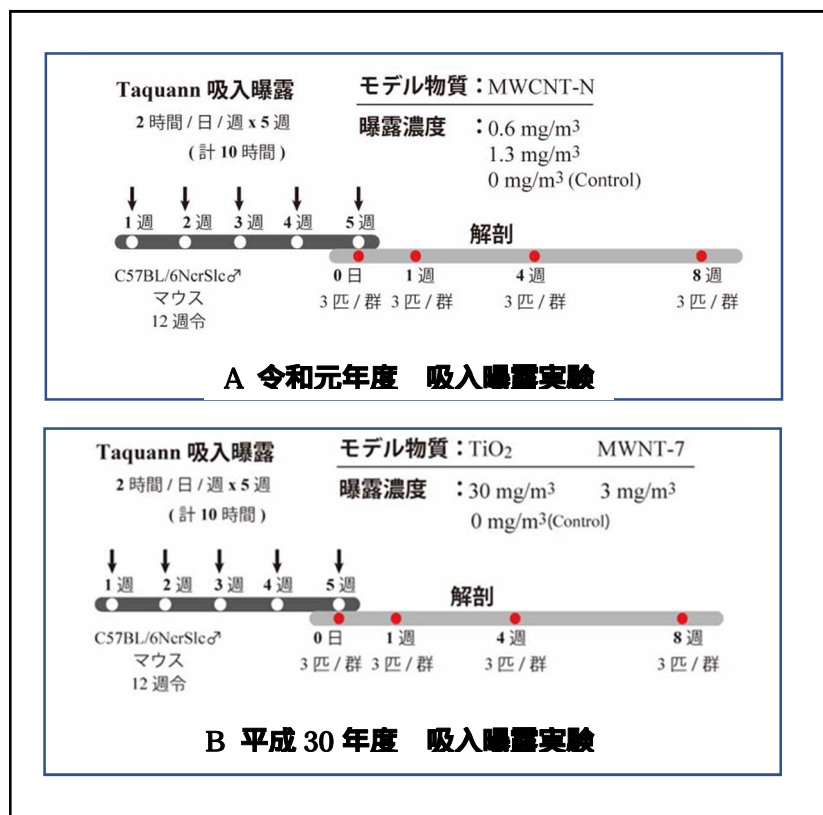


図1 実験デザイン

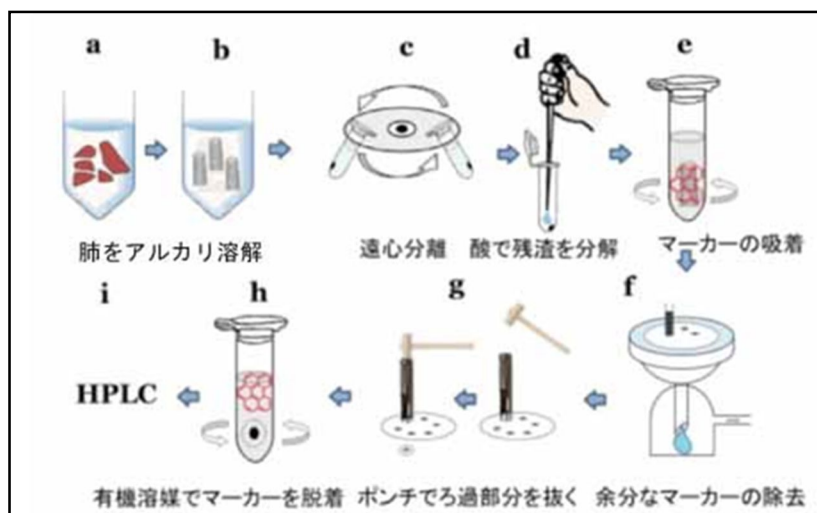


図2 組織中のMWCNT測定手順(前処理)

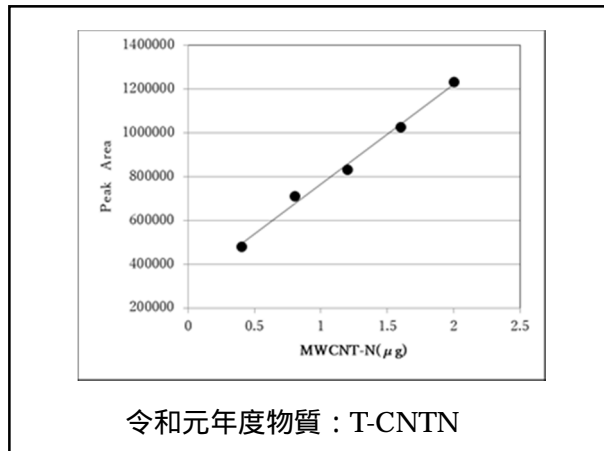


図 3 検量線

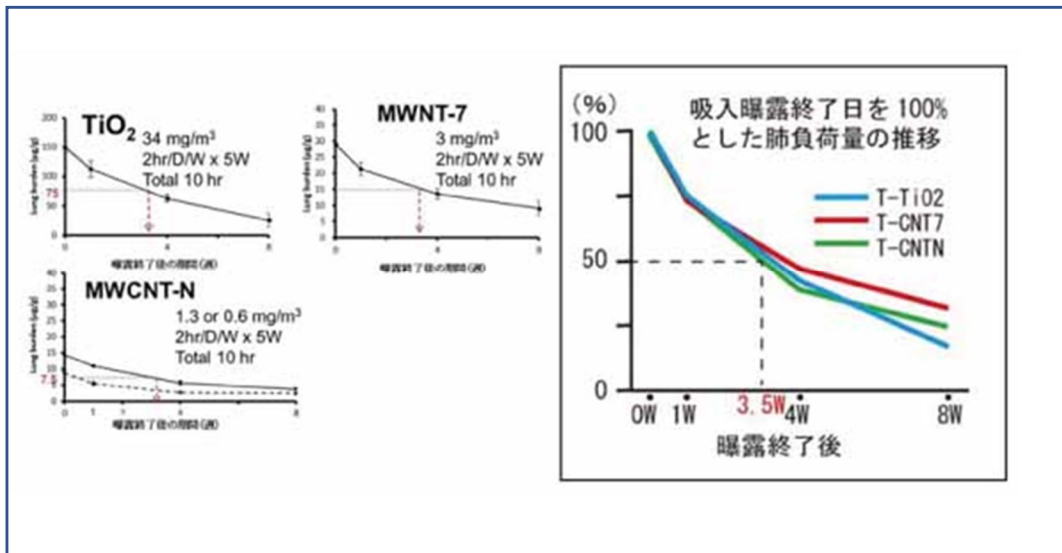


図 4 平成 30～令和元年度物質  
TiO<sub>2</sub> (T-TiO<sub>2</sub>)、MWNT-7 (T-CNT7#53)、MWCNT-N (T-CNTN)  
の肺負荷量の経時的推移

令和元年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名: ナノマテリアルの吸入曝露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究  
-生体内マクロファージの機能に着目した有害性カテゴリー評価基盤の構築-

分担研究課題名: 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

### 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。今年度は、H30年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )の全身吸入曝露実験の継続解析した結果から、ナノマテリアルの性状の相違によって肺胞マクロファージの関連遺伝子の発現に大きく影響が観察された。加えて、形状の異なった多層化カーボンナノチューブ(MWCNT-N)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。MWCNT-Nの吸入曝露によって肺胞マクロファージを含むBALF細胞の各分画に大きな影響は観察されなかった。MWCNT-Nの曝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あるいはMMP12の発現に変動が見られたが、MWNT-7曝露で観察された変化よりも小さかった。以上のことから、カーボンナノチューブの形状によって、肺の免疫反応は多く異なっていることが明らかとなった。

### A. 研究目的

本研究事業は、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 年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )の全身吸入曝露実験において、BALF内の各種サイトカイン濃度の測定、BALF細胞あるいは肺組織

のスカベンジャー受容体関連遺伝子、酸化ストレス関連遺伝子の発現に関して検討を加えた。

令和元年度の分担研究では分散処理を施した多層化カーボンナノチューブを用い、全身吸入装置により一定期間ナノマテリアルを曝露後、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。特に、肺胞マクロファージに焦点を当てて、ナノマテリアルの曝露による初期の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

### 平成 30 年度実験の継続研究

#### ・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-TiO<sub>2</sub>) 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た。

#### ・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80℃ にて保存する。各サンプルから 5µL を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、L-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic。

#### ・MWNT-7, TiO<sub>2</sub> (AMT-600)

多層化カーボンナノチューブは MWNT-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 MWNT-7 (T-CNT7、3mg/m<sup>3</sup>; 2hr/day/week、5 週間) AMT-600 (T-TiO<sub>2</sub>、30mg/m<sup>3</sup>; 2hr/day/week、5 週間) を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアエア吸入とした。

#### ・定量 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNeasy 液に浸漬し、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'-ATTTCCCCGGCAAAGTTCAG-3', reverse, 5'-AACGGAGTCTCATGCAGTAGA-3', MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', TIMP-1; forward, 5'-GCAAAGAGCTTTCTCAAAGACC-3', reverse, 5'-AGGGATAGATAAACAGGGAAACACT-3', VEGF; forward, 5'-CTGTGCAGGCTGCTGTAACG-3', reverse, 5'-GTTCCCGAAACCCTGAGGAG-3', β-actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTTCAGGGGG-3'.

### 令和 1 年度の研究

#### ・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 (MWCNT-N/30 ナノクラス CNT) 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た。



・MWCNT-N

国立食品衛生研究所にて Taquann 処理された MWCNT-N (0, 1.0, 3.0 mg/m<sup>3</sup> 2hr/D/W×5w Total 10hr) を用いた。対象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 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNA later 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。IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTT-3', MARCO, forward, 5'-

AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; SRB1, forward, 5'-GGCTGCTGTTTCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; Cox2, forward, 5'-AGGAGACATCCTGATCCTGGT-3', and reverse, 5'-GTTTCAGCCTGGCAAGTCTTT-3'; β-actin; forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

・マルチプレックス解析

BALF を遠心後、上清を -80°C にて保存する。各サンプルから 5μL を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) マニュアルに従って実施した。解析項目は、L-1 alpha, IL-1 beta, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN-γ, IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic。

## C. 研究結果

### 平成 30 年度の継続研究

多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) および二酸化チタン (TiO<sub>2</sub>) の全身吸入暴露による影響に関して、BALF 細胞のフローサイトメータ解析の結果は、すでに報告している (H30 年度報告書)。今年度はその継続解析として、BALF 中の各種サイトカイン濃度に関して、マルチプレックス解析を実施した (図 1A、1B)。MWNT-7 の暴露によって、直後に VEGF および IL-12 の濃度が上昇していた (有意差無し)。また、IL-12 に関しては MWNT-7 暴露後 8 週においてもその発現が上昇していた (図 1B)。TiO<sub>2</sub> 暴露では直後に IL-4 発現が上昇していた (図 1B)。また、BALF 細胞における MMP12 mRNA および IL-6 mRNA に関して、MWNT-7 暴露で発現が増加していた (図 2A)。TiO<sub>2</sub> 暴露では、MMP12 mRNA、IL-6 mRNA、F4/80 mRNA ならびに CD206 mRNA 発現に変化は見られなかった (図 2A)。また、MWNT-7 暴露でも、F4/80 mRNA および CD206 mRNA 発現に変化は認められなかった (図 2A)。

スカベンジャー受容体関連遺伝子の BALF 細胞で発現を定量 PCR にて検討すると、CD204 および MARCO の発現が MWNT-7 暴露で上昇する傾向にあった(図 2B、有意差なし)。また、CD36 mRNA 発現が AMT-600 暴露で暴露後 4 週、8 週で上昇していた(図 2B)。SRB1 ならびに CD68 mRNA 発現はそれぞれの暴露で変化は認められなかった(図 2B)。さらに、酸化ストレス関連遺伝子として、Cox2 mRNA 発現を検討してみると、MWNT-7 の暴露直後と 4 週に発現が上昇することが明らかになった(図 2C、暴露直後は大きく上昇し有意、暴露後 4 週も有意)。さらに、肺組織における各種遺伝子発現を検討すると、MWNT-7 暴露後、1、4 週で MMP12 mRNA 発現が有意に上昇していた(図 3A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO<sub>2</sub> ならびに MWNT-7 暴露後 1 週にて、その発現が上昇することがわかった(図 3A)。F4/80 mRNA および CD206 mRNA 発現に関しては有意な変化は認められなかった(図 3A)。

肺組織でのスカベンジャー受容体関連遺伝子の発現に関しては、CD204 mRNA 発現は AMT-600 ならびに MWNT-7 暴露後、1 週にてその発現が高くなっていた(図 3B、有意差なし)。MARCO mRNA 発現に関しては、MWNT-7 暴露後、1 週での発現が上昇していた(図 3B、有意差あり  $p < 0.05$ )。CD36 mRNA 発現に関しては、TiO<sub>2</sub> および MWNT-7 暴露後 1 週で、上昇していた(図 3B)。SRB1 および CD68 mRNA 発現に関しては、それぞれの暴露で大きな変化は認められなかった(図 3B)。

肺組織における iNOS mRNA ならびに Cox2 mRNA 発現では、MWNT-7 の暴露直後に iNOS mRNA 発現が大きく上昇することがわかった(図 3C、有意差あり)。Cox2 mRNA 発現は MWNT-7 暴露 1 週にて有意に上昇することが判明した(図 3C)。

## R1 年度の研究

正常 C57BL/6 雄(12 週齢)マウスに低濃度 MWCNT-N 暴露群、高濃度 MWCNT-N 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 4)。各群は 6 匹ずつ

とした。

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<sup>-</sup>CD19<sup>-</sup>7AAD<sup>-</sup>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 5)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1(CD163)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 5)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討した(図 5)。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)の割合に変化はなく、好酸球、単球、各肺胞マクロファージ分画の割合に有意な影響は観察されなかった(図 6、7)。暴露終了後 1 週でも、それぞれの BALF 分画細胞の割合に変化は見られなかった(図 6、8)。加えて、暴露終了後 4 週および 8 週においても、それぞれの分画に変化は認められなかった(図 6、9、10)。

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的群で大きな変化はみられなかった(図 11)。また、肺胞マクロファージにおける各種スカベンジャー受容体(CD36, CD163, CD206)の発現をフローサイトメータ解析にて確認すると、8 週目での対照群が CD206 の発現が高くなっているが(有意差なし)、他の解析週において MWCNT-N 暴露による影響は確認できなかった(図 12)。

さらに、BALF 細胞におけるスカベンジャー受容体(SRB1, MARCO)の mRNA 発現を定量 RT-PCR 解析にて検討したところ、各週にて MARCO の発現が MWCNT-N 暴露にてその発現が上昇していた(有意差無し)(図 13)。また、SRB1 mRNA の発現も 0 週目、4 週目、8 週目にて MWCNT-N 暴露により、発現が上昇していた(有意差無し)(図 13)。肺組織における MARCO あるいは SRB1 mRNA 発現を検討すると、MARCO に関しては 1 週目、2 週目で MWCNT-N 暴露によりその発現が上昇していた(有意差あり：0 週およ

び1週での低濃度、高濃度暴露群)(図14)。SRB1に関しては、各解析週においてMWCNT-N暴露による影響は確認できなかった(図14)。

加えて、酸化ストレス関連遺伝子(IL-6, Cox2)の発現を確認すると、0週目のMWCNT-N暴露にてCox2 mRNA発現が増加していた(有意差あり:低濃度および高濃度暴露群)が、他の解析週ではMWCNT-N暴露の影響は観察できなかった(図15)。

カーボンナノチューブの暴露により、肺胞マクロファージにおけるMMP12の発現が上昇することが知られていることから(Otsuka et al. 2018 PLoS One)、BALF細胞におけるMMP12 mRNAの発現を定量RT-PCRにて検討すると、0週目の低濃度MWCNT-N暴露、1週目の低濃度暴露、8週での高濃度暴露において、上昇した(有意差無し)(図16)。また、肺組織のMMP12 mRNA発現を検討すると、全ての解析週において、MWCNT-N暴露によって発現が有意に上昇していることがわかった(有意差あり)(図16)。

BALF中の各種サイトカインをマルチプレックス解析にて検討すると、検出できたサイトカインはVEGFであり、1週目の高濃度MWCNT-N暴露群で上昇していた(有意差無し)(図17)。

#### D. 考察

昨年度に実施した多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO<sub>2</sub>)の全身吸入暴露実験の解析を継続して行った。BALF中の各種サイトカインの濃度に関して、検出できたのがVEGF、IL-12、IL-4であり、MWNT-7暴露にて、その直後にVEGFとIL-12の濃度の上昇があった。TiO<sub>2</sub>とのナノマテリアルの性状の相違によってサイトカイン分泌にも影響がでることがわかった。また、BALF細胞におけるMMP12 mRNA発現に関しては、これまでの報告と同様に、MWNT-7の暴露にて大きく上昇することが判明し、逆に、TiO<sub>2</sub>暴露ではMMP12 mRNAの発現に変化は見られなかった。スカベンジャー受容体遺

伝子あるいはCox2遺伝子の発現にもMWNT-7とTiO<sub>2</sub>の暴露で違いが生じていた。肺組織においてもMWNT-7とTiO<sub>2</sub>の暴露でそれぞれの遺伝子発現に違いが確認されたことから、ナノマテリアルの性状の違いがマクロファージを中心とした肺免疫の反応性が大きく影響を受けることが判明した。

今年度は昨年度まで使用した多層カーボンナノチューブとは形状の異なるMWCNT-NをTaquan処理後に全身吸入装置を用いて、継続暴露後0週、1週、4週、8週での肺における免疫システムの解析を実施した。BALF細胞のマクロファージを中心にMWCNT-Nの暴露によるその分画、関連分子および遺伝子の発現に関して、免疫学的手法を用いて検討を加えた。

フローサイトメータを用いた細胞分画の解析では、BALF細胞中の生細胞の割合はMWCNT-N暴露では影響が観察されなかった。H29およびH30年度に実施したMWNT-7を用いた暴露実験では、暴露後BALF細胞の生細胞の割合が急激に減少し、その後経時的に増加していたが、MWCNT-N暴露では生細胞の割合に関して、各解析週で暴露による影響は観察されなかった。この所見はMWCNT-NとMWNT-7の形状の相違が起因しているものと考えられる。

BALF細胞中の好酸球、単球、肺胞マクロファージあるいは肺胞マクロファージの各分画(F4/80, CD11b<sup>+</sup>F4/40<sup>+</sup>, CD11b<sup>-</sup>F4/80<sup>+</sup>)に関しても、各解析週でMWCNT-Nの暴露による影響は観察されなかった。このことも、MWNT-7との相違点としてあげられる。

肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の発現に関しては、細胞表面上の発現には大きな変化は認められなかったが、BALF細胞あるいは肺組織におけるMARCOおよびSRB1 mRNAの発現がMWCNT-N暴露で変化していたことから、カーボンナノマテリアルの処理にスカベンジャー受容体が関与していることが示唆される。

カーボンナノチューブの吸入暴露により肺胞マクロファージあるいはMMP12の発現が上昇することが明らかになっている(Otsuka K, et al., PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702)。今

年度の実験においても、BALF 細胞あるいは肺組織の MMP12 mRNA 発現は MWCNT-N 暴露によって上昇した。一方で、MWNT-7 暴露での BALF 細胞の mRNA 発現は対照群に比較して約 100 倍程度の増加が認められたのに対して、MWCNT-N 暴露では 10 倍程度であることから、ナノマテリアルの形状によって MMP12 の発現自体にも影響があることが明らかになった。

BALF 中のサイトカインの濃度に関しては、アッセイ系での検出限界の問題もあり、今回は VEGF のみの結果となった。MWNT-7 暴露においても VEGF の濃度は高くなっていたので、程度の差はあるものの MWCNT-N 暴露による肺傷害に対する修復の機転が作動しているものと推測できる。

MWCNT-N の吸入暴露によって、MWNT-7 暴露に比較して肺胞傷害は軽度であり、肺のマクロファージを中心とした免疫システムに大きな影響を与えていない可能性が考えられた。

## E . 結論

1. MWNT-7 と AMT-600 の全身吸入暴露によって、肺胞マクロファージの関連遺伝子の発現に違いが観察された。
2. MWCNT-N の全身吸入暴露によって、肺胞マクロファージ分画に大きな影響は観察されなかった。
3. MWCNT-N 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の発現に変化がみられたが、MWNT-7 の暴露に比較して軽度であった。
4. MWCNT-N の暴露によって、肺胞マクロファージに MMP12 の発現が上昇していたが、MWNT-7 の暴露に比較して軽度であった。
5. MWCNT-N の吸入暴露によって酸化ストレスを経由した影響が示唆された。
6. MWCNT-N の暴露による肺胞傷害後に VEGF を介した修復機転が働いている可能性が示された。
7. ナノマテリアルの性状によって暴露後の肺での免疫反応は大きく異なっていることが示され

た。

## F . 健康危機情報

なし

## G . 研究発表

### 論文発表

Yuyama K, Nakamura Y, Yateyama R, Arakaki R, Tsutsui T, Ishimaru N. : Study of the pharmacokinetics of riodytyol-6-C-β-d-glucoside, a flavonoid of rooibos (*Aspalathus linearis*) extract, after its oral administration in mice. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci* 2019, 1137:121881

Miyazaki A, Sugimoto A, Yoshizaki K, Kawarabayashi K, Iwata K, Kurogoushi R, Kitamura T, Otsuka K, Hasegawa T, Akazawa Y, Fukumoto S, Ishimaru N, Iwamoto T. : Coordination of WNT signaling and ciliogenesis during odontogenesis by piezo type mechanosensitive ion channel component 1. *Sci Rep*. 2019, 9(1):14762

Shikama Y, Kurosawa M, Furukawa M, Ishimaru N, Matsushita K. : Involvement of adiponectin in age-related increases in tear production in mice. *Aging*. 2019, 1(19):8329-8346

Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Sato M, Kisoda S, Shao W, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N. : Ascl2-Regulated Follicular Helper T Cells promote Autoimmunity in a Murine Model for Sjögren's Syndrome. *Am J Pathol*. 2019, 9440(19):30712-6

Arakaki R, Ushio A, Kisoda S, Sato M, Nakamura Y, Yuyama K, Tateyama R, Morishita S, Monoi N, Kudo Y, Ishimaru N. : Novel effects of rooibos extract on tear and saliva secretion mediated by the muscarinic acetylcholine receptor 3 in mice. *J Oral Biosci*. 2019, 61(3):179-182

Arakaki R, Ushio A, Otsuka K, Kudo Y, Ishimaru

N. : A novel method for measuring small amounts of saliva in mice. *Oral Sci Int.* 2019, 16(3):178-180

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- $\kappa$ B pathway disturbs endochondral ossification. *Bone.* 2019, 121:29-41

牛尾綾、大塚邦紘、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄 : CCL22 と自己免疫疾患臨床免疫・アレルギー科 71 (5) : 1-7, 2019

石丸直澄、山田安希子 : シェーグレン症候群の病態機序と制御性 T 細胞 医学のあゆみ 268 (13) : 1241-1245, 2019

大塚邦紘、石丸直澄 : シェーグレン症候群における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 臨床免疫・アレルギー科 73: 241-248, 2020

学会発表

○新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄 : 多層化カーボンナノチューブ吸入暴露初期の肺胞マクロファージの動態 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

松倉春奈、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疾患モデルにおける肺病変の解析 第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

牛尾綾、新垣理恵子、佐藤真美、工藤保誠、石丸直澄 : シェーグレン症候群病態形成における CCL22 産生マクロファージの役割、第 108 回日本病理学会学術集会、2019 年 4 月 (東京)

Rieko Arakaki, Mami Sato, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Role of IL-33 and its receptor in pathogenesis of Sjögren's

syndrome, 第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

○Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Effect of multi-wall carbon nanotube exposure on pulmonary immune cells at the early stage、第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

Aya Ushio, Mami Sato, Rieko Arakaki, Aya Ushio, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: Analysis of pulmonary lesions in a murine model of Sjögren's syndrome、第 48 回日本免疫学会学術集会、2019 年 12 月 (福岡)

#### 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 1A 実験計画 (H30年度継続実験)

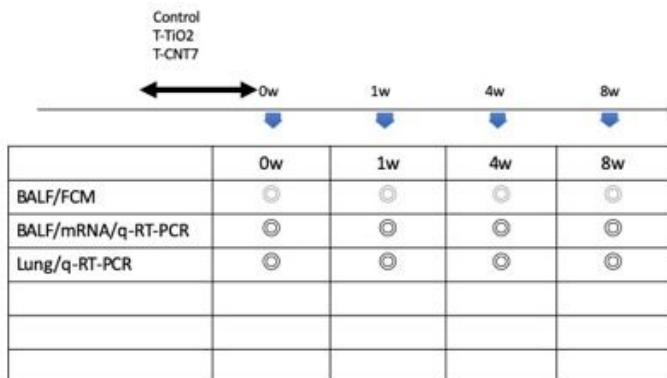
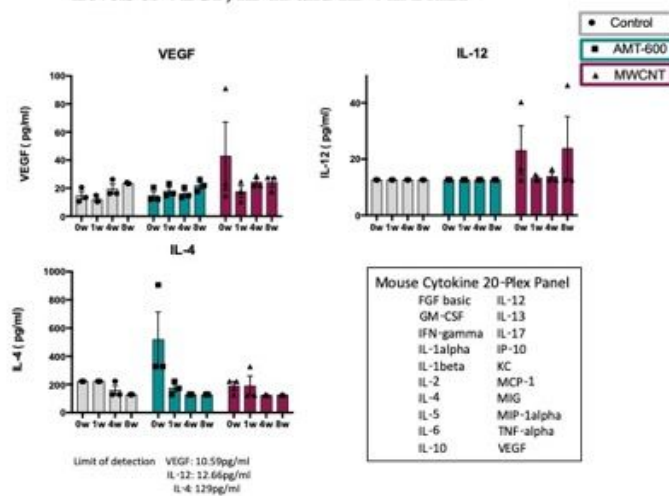


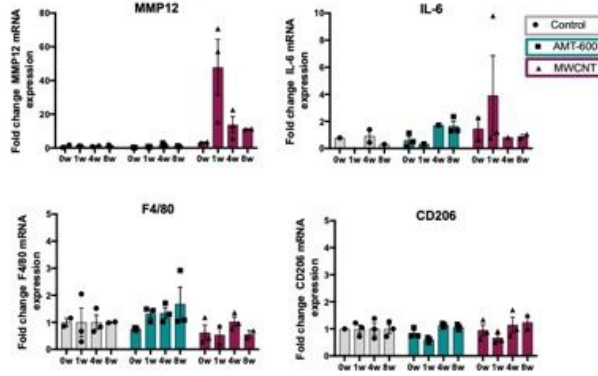
図 1B Levels of VEGF, IL-12 and IL-4 in BALF



平均±標準偏差にて示す (n=3)。

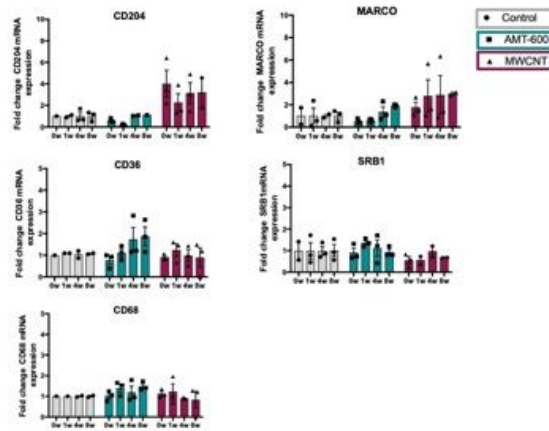
2A

Gene expression of MMP12, IL-6 and macrophage marker (F4/80, CD206) in BLAF cells



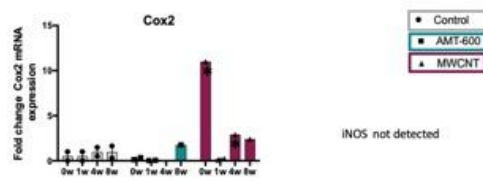
2B

Gene expression of scavenger receptors in BLAF cells



2C

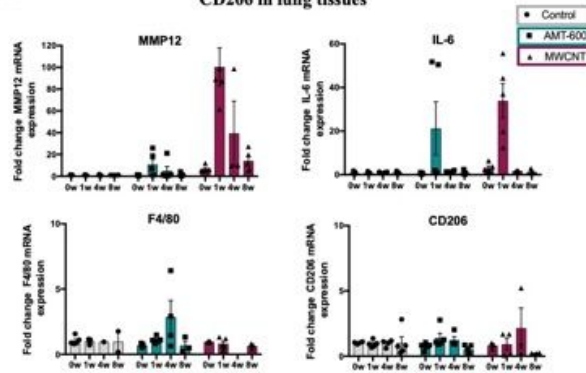
Gene expression of Cox2 in BLAF cells



平均 ± 標準偏差にて示す (n=3)。\*p < 0.05

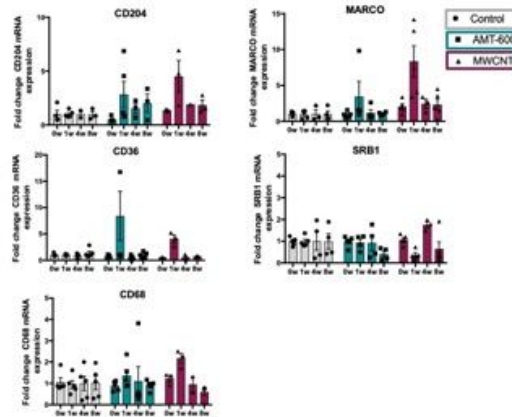
3A

Gene expression of MMP12, IL-6, F4/80 and CD206 in lung tissues



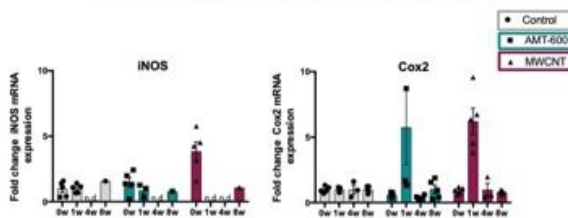
3B

Gene expression of Scavenger receptors in lung tissues



3C

Gene expression of iNOS and Cox2 in lung tissues

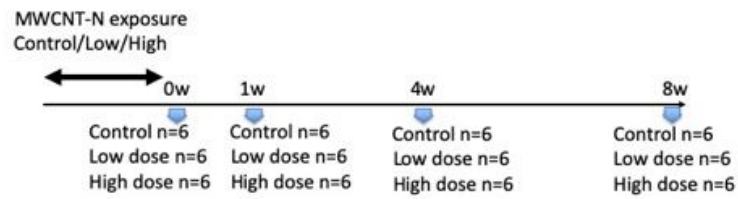


平均±標準偏差にて示す (n=3)。



図 4. 実験計画

### Experimental Schedule



	0w	1w	4w	8w
BALF/FCM/Cytology (n=3)	○	○	○	○
BALF/PCR (n=3)	○	○	○	○
BALF/Multiplex (n=3)	○	○	○	○
CLN/FCM/PCR (n=6)	○	○	○	○
Spleen/FCM/PCR (n=6)	○	○	○	○
Lung/PCR (n=6)	○	○	○	○

図 5. フローサイトメータ解析

### Gating strategy

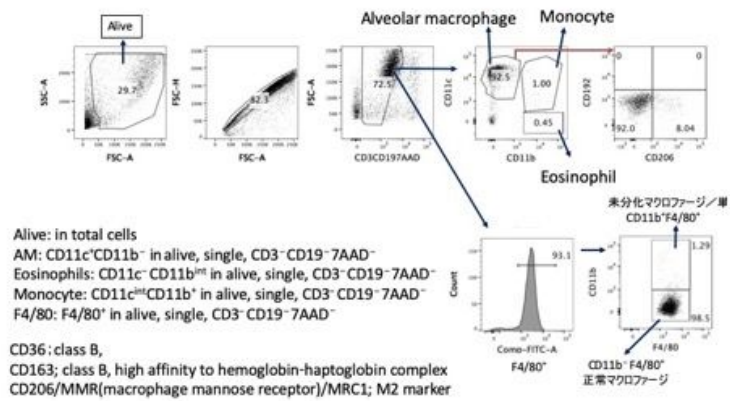


図 6 . MWCNT-N暴露後0～8週目でのBALF細胞分画

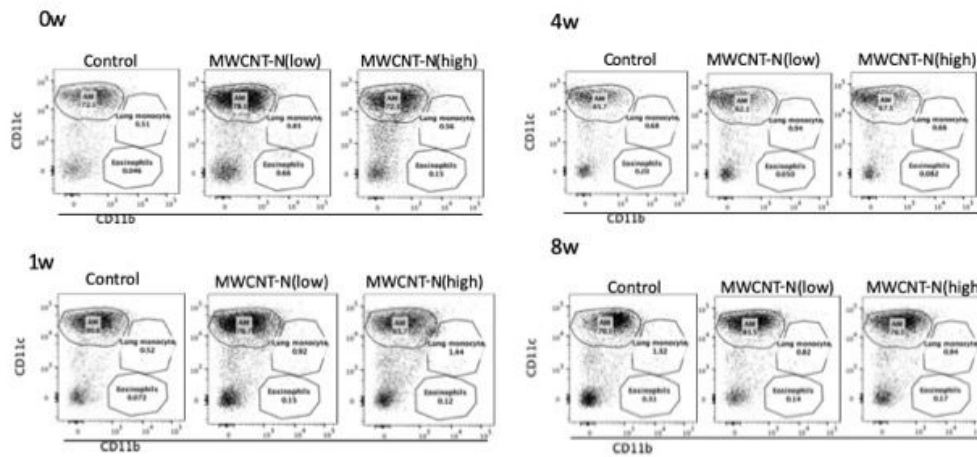
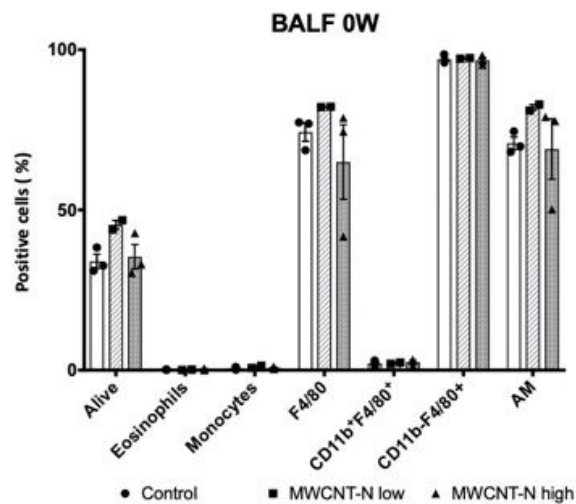


図2に示すようなGating方法にてCD11c/CD11bの展開により、肺胞マクロファージ、単球、好酸球分画の割合を定量化した。図は代表的なデータを示す。

図 7 . MWCNT-N暴露後0週目でのBALF細胞分画



各分画の割合を平均±標準偏差で示す (N=3)。

図 8 . MWCNT-N暴露後 1 週目でのBALF細胞分画

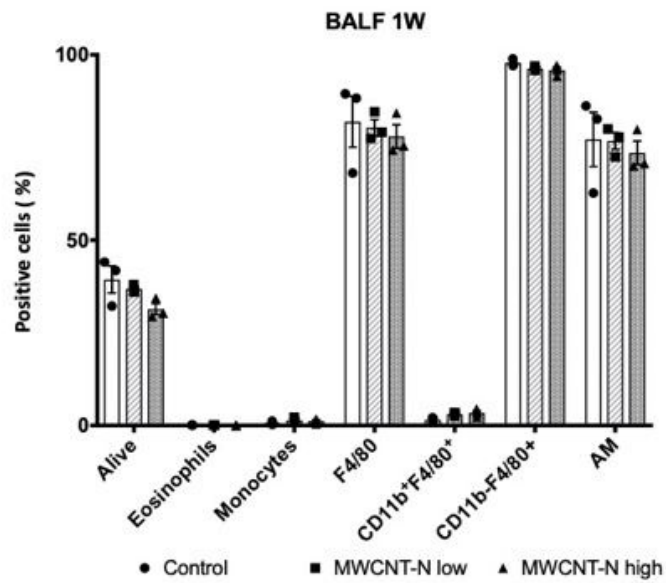
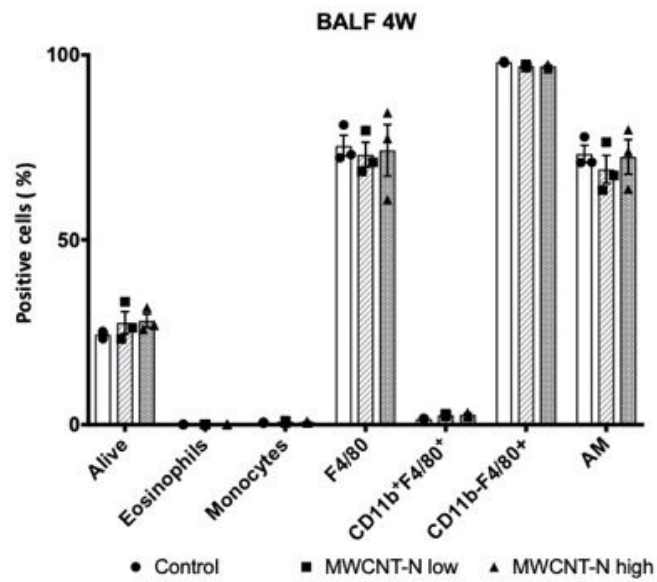


図 9 . MWCNT-N暴露後 4 週目でのBALF細胞分画



各分画の割合を平均±標準偏差で示す (N=3)。

図 1 0. MWCNT-N暴露後 8 週目でのBALF細胞分画

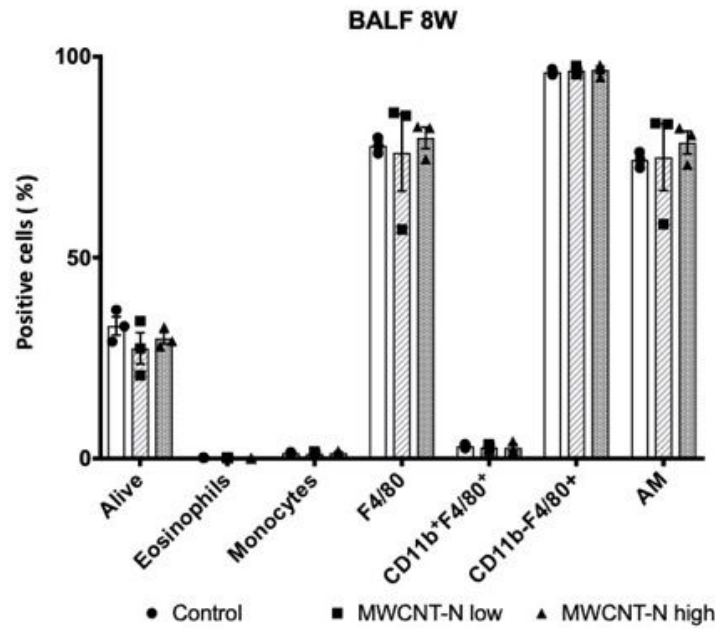
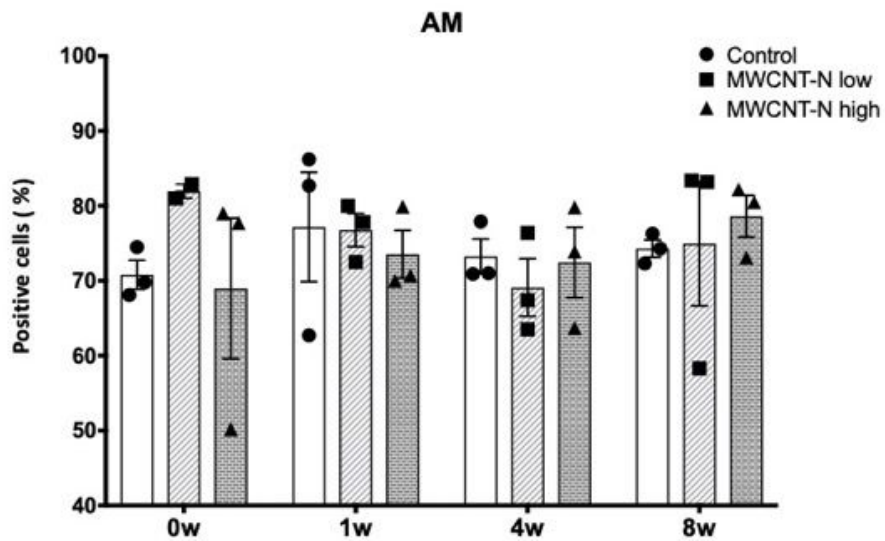
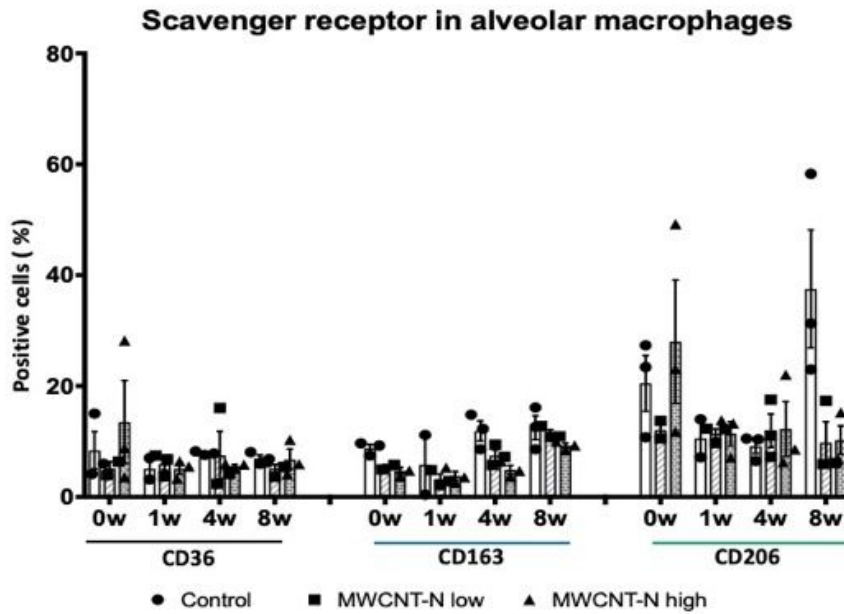


図 1 1. MWCNT-N暴露後の肺胞マクロファージの経時的変化



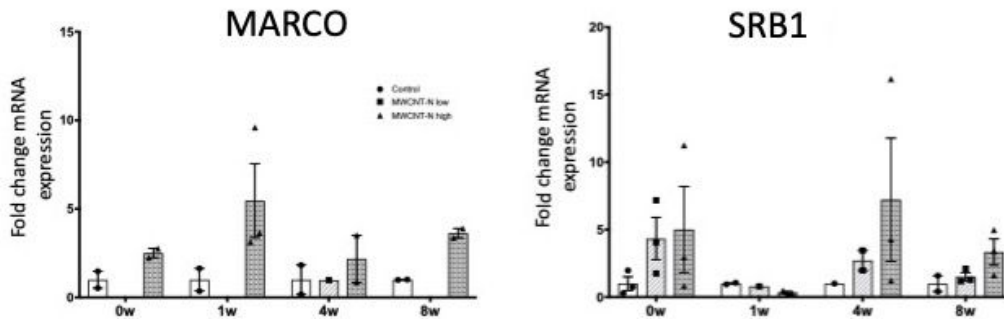
肺胞マクロファージ分画の割合を平均±標準偏差で示す (n=3)。

図 1 2. 肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体



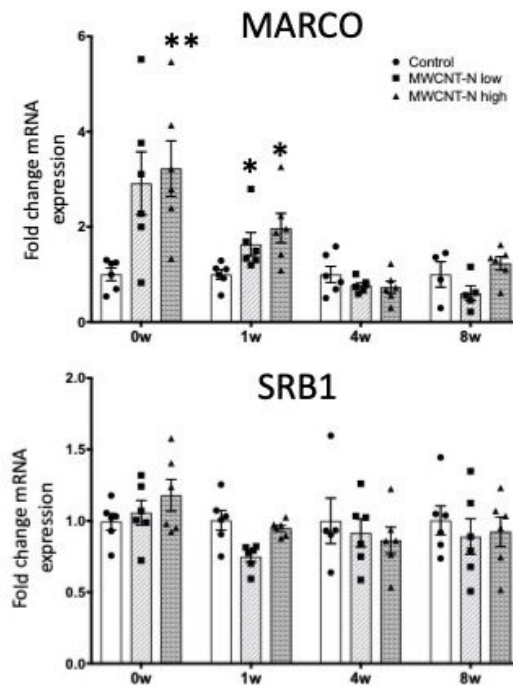
暴露後、0～8週目での肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体（CD36, CD163, CD206）の発現をフローサイトメータにて解析し、それぞれの発現を平均±標準偏差で示す（n=3）。

図 1 3. BALF細胞におけるスカベンジャー受容体



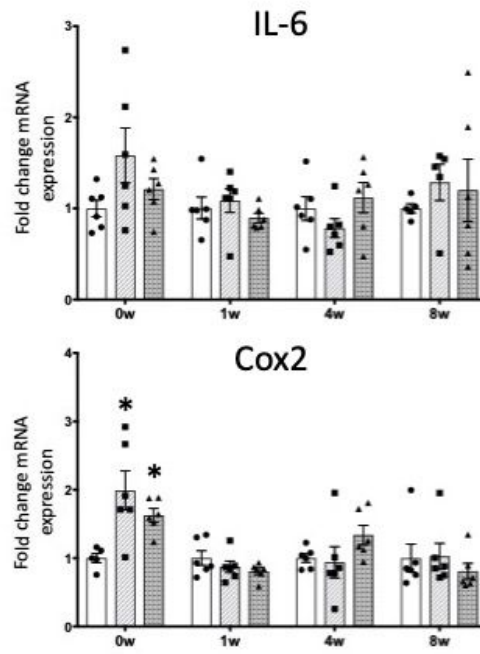
BALF細胞におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。

図 1 4. 肺組織におけるスカベンジャー受容体



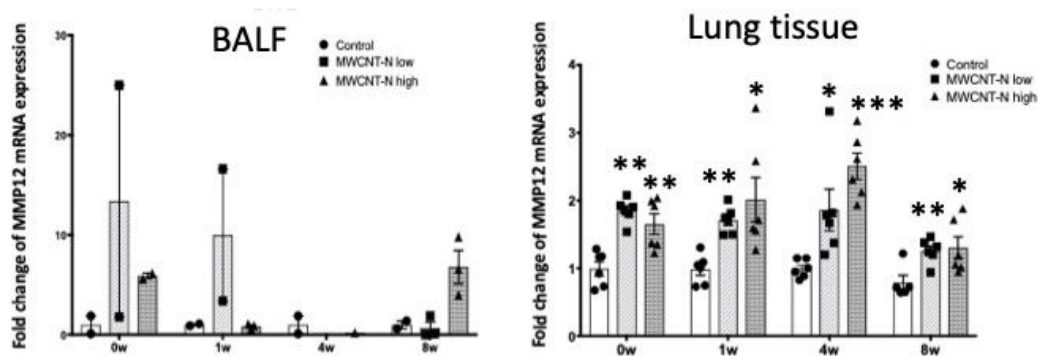
肺組織におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。\*p < 0.05, \*\*p < 0.005, vs control.

図 1 5. 肺組織における酸化ストレス関連遺伝子



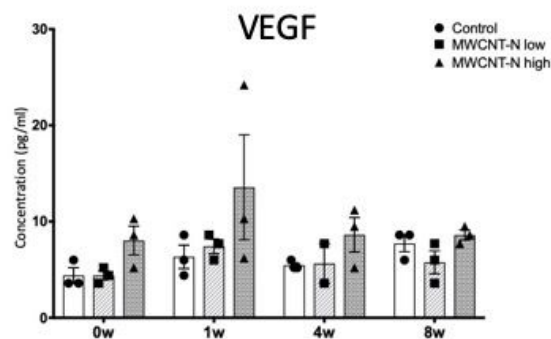
肺組織における酸化ストレス関連遺伝子mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3) 。\*p< 0.05, vs control.

図 1 6 . BALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現



BALF細胞および肺組織におけるMMP12 mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す（BALF: n=3, Lung tissue: n=6）。\* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.005$ , \*\*\* $p < 0.0005$  vs control.

図 1 7 . MWCNT-N暴露によるBALF中のVEGF発現



BALF中の各種サイトカイン濃度をマルチプレックス法にて定量化した。平均±標準偏差にて示す（n=3）。



## 研究成果の刊行に関する一覧表

該当論文なし

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年

令和2年 3月 31日

厚生労働大臣 殿

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 所長代理  
氏名 相 磯 成 敏



次の職員の令和元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 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暴露によるヒト健康影響の評価手法に関する研究
- 3. 研究者名 (所属部局・職名) 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病理検査部長

(氏名・フリガナ) アイソ イナシ 相磯 成敏

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 checked="" 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。

国立医薬品食品衛生研究所長 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

印

次の職員の令和元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-
- 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。

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

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 所長代理  
 氏名 相 磯 成 敏 印

次の職員の令和元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 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—(H29-化学-一般-003)
3. 研究者名 (所属部局・職名) 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役  
 (氏名・フリガナ) 大西 誠
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 checked="" 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。

厚生労働大臣 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



次の職員の令和元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 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) 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

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 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。