

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 -

平成 29 ~ 令和元年度 総合研究報告書

研究代表者 相磯 成敏

令和 2(2020)年 3 月

研究報告書目次

目次

・ 総合研究報告	
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
研究代表者	相磯 成敏
分担研究報告書	
分担研究課題：ナノマテリアルの病理組織学的評価研究 相磯 成敏	… 23
分担研究報告書	
分担研究課題：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	… 65
分担研究報告書	
分担研究課題：ナノマテリアルの組織負荷量の測定 大西 誠	… 83
分担研究報告書	
分担研究課題：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	… 98
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	… 152

平成 29-令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
総合研究報告書

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な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、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。

平成 29 年度に実施した MWNT-7 (長繊維貫通型)の実験は肺曝露量が十分でなかったため翌年度に再実験を実施した。このため、平成 30 と令和元年度に実施した MWNT-7、TiO₂ (粒状凝集型) 及び MWCNT-N (毛玉状凝集型)の実験で必要な情報を収集した。研究の結果、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は肺に急性炎症を惹起させない低負荷量域のナノマテリアルの曝露が行われたことが示された。この低負荷量域の曝露では粒子状のものが曝露される TiO₂ 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 塗抹細胞の形態学的解析及び病理組織学的解析の多面的な検討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貫通する状態となる。「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。病理組織学的評価の分担研究を進める中で、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学的検査を追加した。これらの解析によって、マクロファージによるナノマテリアルの貪食で想定される3つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報の収集を企画した。

B. 研究方法

平成 29 年度から 3 年間の研究期間に、三種類のモデルナノマテリアルから各年度に 1 物質を検体とした対照群、低濃度、高濃度群の三群構成でマウス吸入曝露実験を行い、そこから得た肺のサンプルを用いて肺負荷量、免疫機能、病理組織評価からカテゴリーに分類の基盤となる情報の整備を計画した。

研究班のベースとなるマウス吸入曝露実験は分担研究者の高橋(国立医薬品食品衛生研究所 Natinal Institute of Helth science、以下 NIHS)が行い、解剖と採材には分担研究者が協働参画し、サンプルをそれぞれの所属施設にて研究目的にあった解析を行った。モデルナノマテリアルとして球状粒子の TiO_2 、及び長繊維の MWCNT の MWNT-7 と MWCNT-N の 3 種類を選択した。 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。各モデルナノマテリアルは、吸入曝露実験を分担した高橋が肺の深部にまで到達可能なサイズのエアロゾルとするために分散処理 (Taquann 法) を行って吸入曝露実験に供試した。

年次計画に沿って、初年度(平成 29 年度)に「長繊維貫通型」のモデルナノマテリアルとして選定した MWNT-7 の実験から研究をスタートさせた。この実験は、肺負荷量の解析で曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断して、平成 30 年度に「長繊維貫通型」モデルの MWNT-7(再実験)と「粒状凝集型」モデルの TiO_2 の実験を行い、令和元年度に「毛玉状凝集型」モデルの MWCNT-N の高濃度と低濃度群の吸入曝露実験を実施した。吸入曝露実験の年次研究計画を以下に示す。

平成 29 年度は、MWNT-7(「長繊維貫通型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を、対照群(キャリアーエア吸入)、低用量群($1\text{mg}/\text{m}^3$)、高用量群

($3\text{mg}/\text{m}^3$)の三群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 4 匹、免疫機能評価に 5 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。この実験は前述したように曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断し、翌年に再度 MWNT-7($3\text{mg}/\text{m}^3$)の吸入曝露実験を行って必要なデータを収集した。

平成 30 年度は、 TiO_2 (「粒状凝集型」モデル)と MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験を行った。

実験は、対照群(キャリアーエア吸入)、 TiO_2 $30\text{mg}/\text{m}^3$ 曝露群、MWNT-7 $3\text{mg}/\text{m}^3$ 曝露群の 3 群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 3 匹、免疫機能評価に 6 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。

なお、この年度は、国立医薬品食品衛生研究所の移転に伴い吸入曝露実験の開始に遅延を生じたため、免疫機能と病理組織学的評価に関する解析は令和元年度まで継続実施した。

令和元年度は、MWCNT-N(「粒状凝集型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を行った。対照群、MWCNT-N 低用量群($1\text{mg}/\text{m}^3$)、高用量群($3\text{mg}/\text{m}^3$)の三群構成で曝露実験を実施し、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週での各解剖期に、肺負荷量 3 匹、病理組織検査に 3 匹、免疫機能評価に 6 匹を割り当てた。各解剖期に採取した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。

上記、年次計画に沿って各分担研究を以下のように実施した。

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 直噴全身曝露吸入装置 ver. 2.0(平成 29 年度の研究)、または ver. 3.0(平成 30、令和元年度の研究)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^3) 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。

吸入曝露実験に供試する検体の分散化処理過程で平成 29 年に目開き $25\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7 (T-CNT7#25) と、平成 30 年に目開き $53\mu\text{m}$ 金属製フィルターでろ過した MWNT-7 (T-CNT7#53) のエアロゾルの性状の違いについて、アルミナフィルターに吸着させたエアロゾルを 2,500 倍の倍率で 50 視野 ($51\mu\text{m} \times 38\mu\text{m}$) を観察し、共有結合した状態のエアロゾル (Aggregates) と、複数の繊維が絡まったエアロゾル (Agglomerates) の数、およびその比率を比較した。

2. ナノマテリアルの組織負荷量の測定 (大西)

肺組織での MWNT-7、MWCNT-N、並びにの TiO_2 の沈着量を以下の方法で測定して、組織負荷量のデータを収集した。平成 30 と令和元年度には縦隔組織の検体沈着量も併せて測定した。

多層カーボンナノチューブの MWNT-7 と 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 MWCNT 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。

TiO_2 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)

平成 29 年度に実施した MWNT-7 の吸入曝露実験で、フローサイトメトリー (FACSCant BD Biosciences) による BALF、脾臓及び頸部リンパ節の単核球のリンパ球表面マーカーの発現解析、肺組織の mRNA の発現解析、気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中の各種サイトカインのマルチプレックス解析を実施した。

フローサイトメトリー解析では、蛍光色素標識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、FACSCant BD Biosciences で発現を解析した。肺組織の mRNA 発現解析では、肺組織の一部から全 RNA を抽出、逆転写反応により得た cDNA をから CD204, MARCO, CD36, SRB1, F4/80, CD68, iNOS, MMP-12, β -actin の mRNA を定量化した。気管支肺胞洗浄液 (BALF) 中のサイトカインの解析では、曝露後 8 週に採取した BALF について Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) 用いて 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- γ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 alpha, TNF- alpha, VEGF, FGF basic についてマルチプレックス解析を実施した。

平成 30 と令和元年度に実施した TiO_2 、MWNT-7、及び MWCNT-N の吸入曝露実験も、フローサイトメトリー解析、BALF 細胞と肺組織の mRNA の発現解析、BALF 中の各種サイトカインのマルチプレックス解析を実施した。BALF フローサイトメトリー (FACSCant BD Biosciences) 解析は平成 29 年度と同じ項目で実施した。mRNA の発現解析は肺組織の RNA の発現解析に加えて、BALF 細胞についても解析を行うことで BALF 細胞と肺組織をセットにした解析を計画した。mRNA 発現の解析項目についても見直しを行い、CD204, Col IV, GM-CSF, IL-6, IL-33, TIMP-1, VEGF, MMP12, β -actin, SRB1, Cox2 とした。BALF 中の各種サイトカインの解析では、平成 29 年度と同じ Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) 用いたマルチプレックス解析を、曝露後 0、1、

4、8週各解剖期に採取したBALFについて実施した。

4. 病理組織学的評価研究(相磯)

平成29年度のMWNNT-7を検体とした研究では、吸入曝露後0、1、4、8週に採取した肺を病理組織学的に検索した。また、Ⅱ型肺胞上皮細胞の増生の解析をsurfactant protein C(SP-C)の免疫染色で、MWNT-7貪食マクロファージの肺内局在をMWCNTに結合することが報告されているスカベンジャー受容体Macrophage receptor with collagenous structure(MARCO)の免疫染色を行って解析した。

平成30と令和元年度に実施したTiO₂、MWNT-7、及びMWCNT-Nを検体とした実験で採取したBALF、肺組織、及び縦隔の組織について以下の検索を行った。

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

肺の病理組織学的検査では、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けた灌流固定と、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長に渡り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。

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

平成29年度のMWNNT-7を検体とした吸入曝露実験での曝露データを示す。

低用量群は質量濃度(平均値±SD): 1.4 ± 0.1 mg/m³;CPCカウント(平均値±SD): 960 ± 80 /cm³、高用量群は質量濃度(平均値±SD): 960 ± 80 /cm³;CPCカウント(平均値±SD): 2340 ± 238 /cm³であった。この年度は、の吸入曝露実験は、目標濃度を達成し、安定した濃度で推移したデータが示されたが、エアロゾルの粒度分布を示すMMADのデータは得られなかった。

平成 30 年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験研究での曝露データを示す。

平成 30 年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験は、質量濃度 : $34.8 \pm 3.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 \pm SD) ; CPC カウント : $560,817 \pm 56,441/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD) ; MMAD : 893 ~ 1,060nm (σ_g : 3.5 ~ 4.2、平均値 : 975.3 nm) であった。SMPS で測定したエアロゾルの粒度分布は、粒子径の中央値 : 149.4 nm、平均値 : 177.6 nm であった。エアロゾル化効率を計算すると 34.8% であった。

平成 30 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験研究での曝露データを示す。

平成 30 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験は、質量濃度 : $3.0 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ (平均値 \pm SD) ; CPC カウント : $1,449 \pm 155/\text{cm}^3$ (平均値 \pm SD) ; MMAD : 522 ~ 1,114nm (σ_g : 5.3 ~ 7.9) であった。エアロゾル化効率を計算すると 78.9% であった。

令和元年度の MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験の曝露データを示す。

低用量群は質量濃度(平均値 \pm SD) : $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$; CPC カウント(平均値 \pm SD) : $503 \pm 150/\text{cm}^3$; MMAD は 640 ~ 3,708nm (σ_g : 8.6 ~ 34.0)、高用量群は質量濃度(平均値 \pm SD) : $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/cm}^3$; CPC カウント(平均値 \pm SD) : $1,107 \pm 246/\text{cm}^3$; MMAD は 1,617 ~ 3,474 nm (σ_g : 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。吸入曝露装置の曝露チャンパ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 ~ 200 μm 程度の大きさであった。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、エアロゾルの状態から再凝集する可能性が考えられた。

吸入曝露実験に供試する検体の分散化処理過程で平成 29 年に目開き 25 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#25)と、平成 30 年に目開き 53 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#53)のエアロゾルの性状を比較した結果は、Aggregates(共有結合した状態のエアロゾル)の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 0.5 個/視野、1.4 個/視野、Agglomerates(複数の繊維が絡まったエアロゾル)の数は、T-CNT7#25、T-CNT7#53 それぞれ 1.5 個/視野、4.1 個/視野であった。想定されたように、T-CNT7#53 は T-CNT7#25 よりも Aggregates および Agglomerates の数が多く観察された。一方、Aggregates と Agglomerates の比はフィルターのサイズに係らず、それぞれ 25% と 75% と同じ割合であった。

本実験において定期解剖した全ての個体の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

平成 29 年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験の肺負荷量データを示す。

1 mg/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 6.30 $\mu\text{g/g}$ 、1 週目では 4.59 $\mu\text{g/g}$ 、4 週目では 5.42 $\mu\text{g/g}$ 、8 週目では 5.39 $\mu\text{g/g}$ でやや減少傾向であった。また、3 mg/m^3 曝露のマウスの肺当りの肺負荷量は、曝露直後では 10.15 $\mu\text{g/g}$ 、1 週目では 9.98 $\mu\text{g/g}$ 、4 週目では 10.84 $\mu\text{g/g}$ 、8 週目では 10.25 $\mu\text{g/g}$ で一定に推移した。対照群(0 mg/m^3)の肺での MWNT-7 測定値は 0.00 $\mu\text{g/g}$ であった。以上ことから、Taquann 法にて分散処理を施した MWNT-7 を全身吸入装置により曝露後、1、4 および 8 週後における肺内の MWNT7 の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m^3 曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m^3 曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定の傾向を示した。先行研究(H26-化学-一般-003)の知見と照合して、この年度の吸入曝露実験は、曝露後 0 週の沈着量は異常値と判断した。

平成30年度に実施したTiO₂ 30 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は150.11 ± 9.05 μg/g、曝露後1週は112.47 ± 13.94 μg/g、曝露後4週は63.05 ± 7.21 μg/g、曝露後8週は25.85 ± 11.36 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/6で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は曝露終了後約3.5週であった。縦隔でのTiO₂測定値は0.00μg/gであった。対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)の肺と縦隔のTiO₂の測定値は0.00μg/gであった。

平成30年度に実施したMWNT-7 3 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は29.04 ± 6.16 μg/g、曝露後1週は21.33 ± 2.01 μg/g、曝露後4週は13.68 ± 1.62 μg/g、曝露後8週は9.15 ± 2.17 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は曝露終了後約3.5週であった。

縦隔及び対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)ではMWNT-7は検出されなかった(測定値は0.00μg/g)。

令和元年度に実施したMWNT-7を検体とした吸入曝露実験の肺負荷量データを示す。

MWCNT-N 1.3 mg/m³曝露のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週は14.38 μg/g、曝露後1週は10.96 μg/g、曝露後4週は5.73 μg/g、曝露後8週は3.77 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の約1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は約3.5週であった。

MWCNT-N 0.6 mg/m³曝露群のマウスの肺 1g 当りの肺負荷量は、曝露後0週に8.84 μg/g、曝露後1週に5.51 μg/g、曝露後4週に2.69 μg/g、曝露後8週は2.41 μg/gであった。8週後の負荷量は曝露後0週の負荷量の1/3で、経時的に減衰する傾向が認められた。半減期は約3.5週であった。

なお、MWCNT-N 1.3 mg/m³と0.6 mg/m³曝露群とも、縦隔及び対照群(0 mg/m³、キャリアーエア吸入)では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%; TiO₂:17%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TiO₂(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TiO₂曝露群(曝露濃度:30 mg/m³)、MWNT-7曝露群(同:3 mg/m³)、MWCNT-N曝露群(同:1.3 mg/m³)の値は、それぞれ25.85、9.15、3.77μgで、TiO₂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29年度のMWNT-7を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF細胞のフローサイトメトリー解析で、曝露後0週の変化として、生細胞の減少、肺胞マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁺F4/80⁺)の減少、好酸球、単球、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加が示された。曝露後1週には、BALF中の生細胞の減少がみられなくなり、肺胞マクロファージの減少(高用量群、有意)、単球と好酸球の増加(高用量群、有意)が示された。曝露後4週には、1週後と同様に、肺

肺マクロファージの減少(高用量群、有意)、単球、好酸球の増加(高用量群、有意)が示された。曝露後8週まで、肺マクロファージの減少、好酸球と単球の増加が示された。肺マクロファージのスカベンジャー受容体(CD36、CD163)の発現に検体の曝露による大きな変化は示されなかった。肺組織の mRNA 発現では曝露後0週に CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現上昇(有意)、曝露後1週に MARCO の mRNA 発現の上昇(有意)、曝露後4週に CD204、iNOS の mRNA の上昇(有意)が示された。MMP12 mRNA の発現は、どの解剖期においても上昇が示された(低用量群、高用量群とも有意)。曝露後8週の解剖で採取した BALF 中のサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子に関して、マルチプレックス解析を実施すると、4種類の因子が検出され、VEGF あるいは IL-12 が MWNT-7 の吸入曝露で増加することが判明した。

脾臓、頸部リンパ節では、リンパ節において、曝露後4週で、M1 の低下、M2 の上昇が確認された以外、特段の変化は見られなかった。

平成30年度の MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF 細胞のフローサイトメトリー解析の結果は、MWNT-7 の曝露で曝露後0週に生細胞の減少、肺マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁻F4/80⁺)の減少、好酸球の増加、単球、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加、M2 マクロファージ(CD206⁺)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。

肺マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻)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。肺マクロファージ(CD11c⁺CD11b⁻、F4/80⁺、CD11b⁻F4/80⁺)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⁺)の増加は、曝露後1週に回復した。単球と CD11b⁺F4/80⁺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。

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。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)。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。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)。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)。

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。

平成30年度の TiO₂ を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

BALF 細胞のフローサイトメトリー解析の結果は、TiO₂ の曝露で BALF 中の免疫担当細胞への影響は示されなかった。

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、TiO₂ 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、TiO₂ 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は、TiO₂ 曝露による変化は示されなかった。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、TiO₂ 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、TiO₂ 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は、TiO₂ 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。TiO₂ 曝露では曝露後 0 週に IL-4 の発現上昇が示された。

令和元年度の MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験の結果を示す。

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⁺CD11b⁻)の分画が占める割合はほぼ一定のレベルで推移し、対照的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- γ 、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 29 年度の MWNT-7 の吸入曝露実験で、病理組織学的には肺胸腔内や肺組織に MWNT-7 と MWNT-7 貪食マクロファージを認めた程度で、好中球浸潤を伴う炎症所見や毒性所見を認めなかった。型肺泡上皮細胞の特異抗体である SP-C の免疫染色を行ったが、型肺泡上皮細胞の増生は示されなかった。Masson's trichrome 染色を行ったが、肺の線維化病変は MWNT-7 曝露後 8 週の標本においても認められなかった。MWNT-7 に結合すると報告があるマクロファージのスカベンジャー受容体 MARCO の免疫染色で MWNT-7 貪食マクロファージが MARCO 陽性所見を示すことが確認された。また、MARCO 陽性マクロファージは曝露後 0 週では肺内に広く分布するが、次第に肺泡管・細気管支とその周囲に集まる様子が認められた。

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、順にその結果を記した。

平成 30 と令和元年度の実験で採取した 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した。

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。

TiO₂ 曝露群では、マクロファージに TiO₂ 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、TiO₂ 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。TiO₂ 曝露実験では Type B マクロファージの出現は少ないが、TiO₂ 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、TiO₂ 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、TiO₂ 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が相互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。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 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。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 は少なかった。

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 μm 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して、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 がびまん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。

平成 30 年度と令和元年度の実験で採取し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。

TiO₂ 曝露群では、肺内に認められる TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 stain 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。

TiO₂ 曝露群では、極めて稀に TiO₂ 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 30 μm 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 20 μm 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 倍まで拡大して観察した結果、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

ナノマテリアルの肺泡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 を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験を、目標濃度においてエアロゾル化した検体を安定した濃度推移で曝露することができた。しかしながら、MWCNT-N は目標濃度の半分程度であった。

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。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、繊維径が細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り再凝集していることが想定された。これについては、分担研究において、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。そこで、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 の繊維長は MWNT-7 とほぼ同等であるが、MWNT-7 に比較して繊維径が細く絡まりやすいため、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。

吸入曝露実験では、鼻腔のフィルター機能によって除去される粗大な粒子を予め除去して、肺深部の肺胞まで到達可能な粒子径の検体をエアロゾル化して曝露する必要がある。本研究班の吸入曝露実験で検体の分散化処理に用いた Taquann 法では、大型の凝集体を除去するため金属製フィルターにて濾過する工程がある。平成 29 年度の実験では、Taquann 法の開発における先行研究と同じ目開き 25 μm 金属製フィルターを用いたが、平成 30 と令和元年の実験では、細気管支から肺胞管まで到達可能な、荒い検体を得る事を目的として目開き 53 μm のフィルターを使用した。実際にエアロゾル化した粒子の形状を観察した結果、Taquann 法で分散化処理をした MWNT-7 には粗大成分として、共有結合した状態の凝固体(Aggregates)と複数の線維が絡まった凝集体(Agglomerates)が存在し、その比率は目開き 25 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#25)と目開き 53 μm 金属製フィルターでろ過した MWNT-7(T-CNT7#53)は同じであったが、それぞれの単位面積当たりの個数は T-CNT7#25 よりも T-CNT7#53 の方が多いことが示された。粗大成分の増加によって末梢域まで入る凝集成分も増えるとしたら肺病変の形成に T-CNT7#25 と T-CNT7#53 は異なった影響を示す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/m³ 群 1.3mg/m³ 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

こ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 TiO₂ と MWNT-7 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の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。TiO₂ 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、TiO₂ 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 TiO₂ の曝露で違いが生じていた。肺組織においても MWCNT-7 と TiO₂ 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。TiO₂ 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。平成 29 と 30 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⁺F4/40⁺, CD11b⁻F4/80⁺) に関しても、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 TiO₂ 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 TiO₂ を貪食したマクロファージや TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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、TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ の存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、TiO₂ 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、TiO₂ 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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 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 μm)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 TiO₂ 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 TiO₂ 貪食マク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生じると考えられた。本研究班の吸入実験は 30mg/m³ 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。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 TiO₂ 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 μm 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 ± 74 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、May-Grünwald Giemsa 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 の単離繊維や強靭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靭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靭な 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 の強靭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の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 μm よりも小さな外来異物の侵入が可能で、肺胞には 1 乃至 2 μm よりも小さな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 μm 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 μm 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も大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 μm までの凝集体が含まれていたと考えられ、そのうち 5 μm よりも小さな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、強靭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 μm 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よう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 μm 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-5-3,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 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 μ 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-5-3,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-6-2, 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-7-3,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 TiO₂、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 μ m 程度であった(分担研究:図-7-2,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-7-2,C)、獣毛や肺胞マクロファージの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⁺CD11b⁻, F4/80⁺, Cd11c⁺F4/80⁺) 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⁺F4/80⁺) 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 TiO₂ 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。」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の単離繊維と強靱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 の強靱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。MWNT-7 貪食における MARCO の関与は平成 29 年度の病理組織学的評価研究での免疫染色の結果でも明確に示された。粒子状の TiO₂ 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 の強靱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-Grunwald 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 TiO₂ 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 TiO₂ 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的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。

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る。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とその σ_g 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塗抹細胞形態学的解析及び病理組織学的検索から、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TiO₂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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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

学会発表

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

○ Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno: Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

○ 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

○ 相磯成敏、佐々木俊明、大西誠、梅田ゆみ、菅野純: 経気道暴露された多層カーボンナノチューブのリンパ路による肺外移送、第 32 回発癌病理研究会、2017 年 8 月 24 日(滋賀県大津市)

○ 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄: 多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会、2018 年 4 月 28 日(東京)

○ 高橋祐次: ナノ材料の安全性確保に関する生物試験の現状と課題、第 58 回澱粉研究懇談会、招待講演、2018 年 6 月 8 日(静岡県伊東市)

○ 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄: 全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響、第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌市)

○ 高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第 19 回日本毒性学会生涯教育講習会、2018 年 7 月 17 日(大阪)

○ 菅野 純: ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018 年 7 月 18 日(大阪)

○ 高橋祐次、相磯成敏、大西誠、石丸直澄、菅野純: マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第 45 回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018 年 7 月

18 日(大阪)

○ 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)

○ 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 年 12 月 3 日(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)

○ 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)

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

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

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

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

平成 29～令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
分担研究報告書

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

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

研究要旨

工業的ナノマテリアルの開発と産業応用が急速に進む中、製造者、使用者の健康被害を防止するための規制決定に必要となる基礎的かつ定量的有害性情報が得られる評価法の構築が必要とされている。我々がこれまでに実施してきた実験動物を用いたナノマテリアルの吸入曝露による呼吸器毒性に関する先行研究から、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の胞体内での蓄積様式を「長繊維貫通型*」、「毛玉状凝集型*」及び「粒状凝集型*」の3つの様式に分類すると、それぞれの蓄積様式によって Frustrated phagocytosis (異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)の程度が異なると予測した。そこで、これらの3種類のモデルナノマテリアルを吸入曝露したマウスの肺について、研究を分担した病理組織学的な側面から異物を貪食したマクロファージの胞体内での異物の蓄積様式と、それによって誘発される肺病変を関連付けたナノマテリアルのカテゴリー評価に資する情報の収集を企画した。

平成29年度に実施した MWNT-7 (長繊維貫通型) の実験は肺曝露量が十分でなかったため翌年度に再実験を実施した。このため、平成30と令和元年度に実施した MWNT-7、TiO₂ (粒状凝集型) 及び MWCNT-N (毛玉状凝集型) の実験で必要な情報を収集した。

研究の結果、各モデルナノマテリアルの吸入曝露実験は肺に急性炎症を惹起させない低負荷量域のナノマテリアルの曝露が行われたことが示された。この低負荷量域の曝露では粒子状のものが曝露される TiO₂ と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なり、さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることを明らかにした。以上、本研究では、3種類の異なる物理化学的性状を示すナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起こさない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、吸入曝露による毒性発現量における研究での情報収集が必要と考える。

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

A. 研究目的

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

国際的に、ナノマテリアルの物理化学的特性、製品運命、曝露評価などを基盤とした有害性のカテゴリー評価が提案されているが、ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり、かつ有害性発現が最も懸念される吸入曝露におけるin vivo生体反応を反映させるものとはなっていない。先行研究(H26-化学-一般-003)及び(独)日本バイオアッセイセンターで実施されたMWNT-7の発がん試験の成果(Par tFibre Toxicol, 2016)に基づき、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージがナノマテリアルを貪食した際の反応を3つの様式に分類した。すなわち、「長繊維貫通型」:マクロファージのサイズを超える長い単一の繊維では長繊維が胞体を通る状態となる。「毛玉状凝集型」:柔軟性に富む繊維はマクロファージの胞体内に毛玉状の凝集塊として貯留されると予測される。「粒状凝集型」:マクロファージより小さな粒子は凝集塊として貯留される。「長繊維貫通型」においては、マクロファージは線維を分解できずにFrus ta ed phagocytosis(異物処理の際にサイトカイン類や反応性化学物質がマクロファージの細胞外に放出される現象)を示しつつアポトーシスに至り繊維は放出され、次のマクロファージに受け継がれ、同様のサイクルが繰り返される。この現象による各種の細胞ストレスが繊維発がん機序の発端として提唱されている。「毛玉状凝集型」と「粒状凝集型」においては、マクロファージの胞体内の蓄積がある量を超えると、Frus ta ed phagocytosisを引き起こし、最終的にマクロファージはアポトーシスに至ると考えられるが、そこ

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

この知見に基づき、平成30年度と令和元年度は病理組織学的評価の分担研究にBALF塗抹での白血球百分比と塗抹細胞の形態学的検索、BALF採取後にホルマリンで浸漬固定した組織標本の病理組織学的検索の追加、曝露したナノマテリアルの肺から縦隔部への移行を検索する目的で縦隔組織負荷量の測定と縦隔の病理組織検査を追加した。これらの解析によって、マクロファージによるナノマテリアルの貪食で想定される3つの蓄積様式に基づくカテゴリーに分類の基盤となる情報の収集を企画した。

B. 研究方法

平成29年度から3年間の研究期間に、三種類のモデルナノマテリアルから各年度に1物質を検体とした対照群、低濃度、高濃度群の三群構成でマウス吸入曝露実験を行い、そこから得た肺のサンプルを用いて肺負荷量、免疫機能、病理組織評価からカテゴリーに分類の基盤となる情報の整備を計画した。

研究班のベースとなるマウス吸入曝露実験は分担研究者の高橋(国立医薬品食品衛生研究所 Natinal Institute of Health science、以下NIHS)が行い、解剖と採材には担研究者が協働参画し、サンプルをそれぞれの所属施設にて研究目的にあった解析を行った。また、平成30と令和元年度のNIHSでのBALF採取

では日本バイオアッセイ研究センター血液生化学検査室の斎藤美佐江室長と近藤ひとみ技術専門役が専門家として参画した。

モデルナノマテリアルとして球状粒子の TiO₂、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。TiO₂ 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。各モデルナノマテリアルは、吸入曝露実験を分担した高橋が肺の深部にまで到達可能なサイズのエアロゾルとするために分散処理(Taquann 法)を行って吸入曝露実験に供試した。

年次計画に沿って、初年度(平成 29 年度)に「長繊維貫通型」のモデルナノマテリアルとして選定した MWNT-7 の実験から研究をスタートさせた。この実験は、肺負荷量の解析で曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断して、平成 30 年度年に「長繊維貫通型」モデルの MWNT-7(再実験)と「粒状凝集型」モデルの TiO₂ の実験を行い、令和元年度に「毛玉状凝集型」モデルの MWCNT-N の高濃度と低濃度群の吸入曝露実験を実施した。吸入曝露実験の年次研究計画を以下に示す。

平成 29 年度は、MWNT-7(「長繊維貫通型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を、対照群(キャリアーエア吸入)、低用量群(1mg/m³)、高用量群(3mg/m³)の三群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、病理組織検査用として 4 匹を割り当てた。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した(図 1)。この実験は前述したように曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断し、翌年に再度 MWNT-7(3mg/m³)の吸入曝露実験を行って必要なデータを収集した。

平成 30 年度は、TiO₂(「粒状凝集型」モデル)と MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験を行った。

実験は、対照群(キャリアーエア吸入)、TiO₂ 30mg/m³ 曝露群、MWNT-7 3mg/m³ 曝露群の 3 群構成で行い、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週の各解剖期に、病理組織検査用として 3 匹を割り当てた(図 2)。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した。

なお、この年度は、国立医薬品食品衛生研究所の移転に伴い吸入曝露実験の開始に遅延を生じたため、研究を分担した病理組織学的評価に関する解析は令和元年度まで継続実施した。

令和元年度は、MWCNT-N(「粒状凝集型」モデル)を検体とした吸入曝露実験を行った。対照群、MWCNT-N 低用量群(1mg/m³)、高用量群(3mg/m³)の三群構成で曝露実験を実施し、それぞれ曝露後 0、1、4、8 週での各解剖期に、病理組織検査用に 3 匹を割り当てた。各解剖期に採取したサンプルは所属施設にて解析した。

上記、年次計画に沿って本分担研究を以下のように実施した。

B-1 平成 29 年度の研究

平成 29 年度の MWNT-7 を検体とした研究では、吸入曝露後 0、1、4、8 週に採取した肺を病理組織学的に検索した。また、型肺胞上皮細胞の増生の解析を surfactant protein C(SP-C)の免疫染色で、MWNT-7 貪食マクロファージの肺内局在を MWCNT に結合することが報告されているスカベンジャー受容体 Macrophage receptor with collagenous structure(MARCO)の免疫染色を行って解析した。

B-1-1 病理組織標本作製

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

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

免疫染色条件を以下に示した。

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

B-1-2 病理組織学的検査

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

B-2 平成 30 - 令和元年度の研究

平成 30 と令和元年度に実施した TiO₂、MWNT-7、及び MWCNT-N を検体とした実験で採取した BALF、肺組織、及び縦隔の組織について以下の検索を行った。

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

肺の病理組織学的検査では、気道内に吸引された検体の人為的移動を避けた灌流固定と、BALF 採取後の右肺をホルマリンに浸漬固定した二通りの固定材料を用いた肺の病理組織標本作製し、詳細な形態学的検索を行った。吸入肺曝露した検体の肺から縦隔への移行の状態を調べる目的で縦隔部の組織全に渡り 3mm 幅で切り出した組織切片について詳細な形態学的検索を行った。

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

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

BALF 細胞と病理組織標本の詳細な検索では、通常の病理組織学的検査で使用される 4 倍 ~ 40 倍の対物レンズを用いた観察に加えて、100 倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oiliris、開口数 1.35、分解能 0.25μm、OLYMPUS)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がない Tagged Image File Format (TIF) で保存、画像処理ソフト「Adobe Photoshop」で横 80 x 縦 60mm、解像度 600 pixel/inch の psd.形式とし、さらに縦横 4 倍に拡大して、拡大倍率 2000 倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

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

B-2-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

B-2-1-(1) BALF の採取

免疫機能評価用に割り当てた各群 6 匹のマウスから BALF を採取した。採取方法は、あらかじめ 0.8 ~ 1.0 ml の生理食塩水(大塚)を充填した 1ml のシリンジ(SS-01T 針無しシリンジ、TERUMO)をマウス 1 匹につき 2 本用意した。安楽死をさせたマウスの気管にサーフロー留置針(SR-OT1851C、TERUMO)を留置、この留置針に生理食塩水(大塚)を充填したシリンジを繋ぎ、可動式の押子(プランジャ)を注意深く押し引きして洗浄液(BALF)を回収した。1 本目のシリンジを用いた BALF の採取を終えると、留置針に 2 本目のシリンジを繋ぎ替えて、同様の操作を繰り返して BALF を採取した。1 本目のシリンジと 2 本目のシリンジから回収した BALF を合わせて、一匹のマウスから計 1.2 ~ 1.8 ml/匹の BALF を得た(表 3)。

B-2-1-(2) BALF 塗抹標本の作製

採取した BALF から 300 μl を分取して、マウス 1 匹につき 2 枚の塗抹標本作成した。具体的には、分取した BALF 300μl/匹をスライドガラス 2 枚に 150 μl/

匹ずつを滴下し、Thermo Shandon Cytospin 3 (Marshall Scientific LLC、700 rpm 5 分) でスライドガラスに均一に塗抹、メタノール固定し、塗抹未染色標本を作製した。塗抹未染色標本を所属機関に持ち帰り、May-Grünwald Giemsa (MG) 染色を行った。2 枚ずつ作製した BALF 塗抹標本のうち 1 枚を解析用とし、1 枚を予備とした。

B-2-2 病理組織標本の作製

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

B-2-2-(1) 肺の還流固定標本の作製

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

B-2-2-(2) 肺の浸漬固定標本の作製

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

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

B-2-2-(3) 縦隔の病理組織標本の作製

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

B-2-3 BALF 塗抹の検索

BALF 塗抹標本に観察される免疫担当細胞 (肺胞マクロファージ、単球、好中球、好酸球) の計数と百分比の算出、肺胞マクロファージにおける吸入曝露

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

B-2-3-(1) 白血球分画 (白血球百分比)

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

B-2-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の推移

塗抹標本の肺胞マクロファージを検体 (T-TiO₂、T-CNT7、T-CNT-N) を貪食しているものと非貪食のものに分けて計数し、両者の比率の経時的推移を調べた。具体的には、光学顕微鏡下で肺胞マクロファージ 500 個以上について高分散化処理を行った検体を貪食したものと非貪食のものを区別し、500 個当たり貪食率として集計、曝露を終了した日 (0W) から曝露終了後 8 週までの貪食率の経時的推移を調べた (n=3)。

B-2-3-(3) BALF 塗抹細胞の詳細検索

BALF 塗抹細胞を下記の方法により光学顕微鏡で詳細に検索した。

BALF 塗抹細胞を 100 倍の対物レンズ (UPlanApo、100x、Oillris、開口数 1.35、分解能 0.25 μ m、OLYMPUS) を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がない Tagged Image File Format (TIF) で保存、画像処理ソフト「Adobe Photoshop」で横 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。

B-2-4 病理学組織的検索

B-2-4-(1) 肺の病理組織学的検査

令和元年度計画のMWCNT-Nの吸入曝露実験に加えて、平成30年度の研究計画の遅れにより十分な解析ができなかったTiO₂、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-TiO₂、T-CNT7、T-CNT-N)の沈着と組織反応の状態を詳細に検索した。検索では、通常の病理組織学的検査で使用される4倍～40倍の対物レンズを用いた観察に加えて、100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)を用いて撮影した画像を、圧縮によるデータの棄損がないTagged Image File Format(TIF)で保存、画像処理ソフト「Adobe Photoshop」で横80 x 縦60mm、解像度600 pixel/inchのpsd形式とし、さらに縦横4倍に拡大して、拡大倍率2000倍相当のサブミクロンレベルの検索を行った。

今年度の分担研究ではBALF塗抹標本で観察された像と、灌流固定標本およびBALF採取後の浸漬固定標本での組織像を突合させて、肺内に吸引されたモデルナノ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-2-4-(2) 縦隔の病理組織学的検査

呼吸によってマウスの肺内に吸引された各モデルナノ材料が縦隔の組織中に移行するかを病理組織学的に調べた。縦隔部を全長に渡り3mm幅で切り出し、病理組織標本作製して、肺内に吸入されたナノ材料若しくはナノ材料貪食マクロファージの肺から縦隔部への移行を病理組織学的に調べた。観察に際しては、肺の病理組織検査と同様、通常の病理組織学的検査に加えて、100倍の対物レンズ(UPlanApo、100x、Oillris、開口数1.35、分解能0.25μm、OLYMPUS)を使用した詳細観察を実施した。

B-2-5 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

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

(倫理面への配慮)

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

C. 研究結果

C-1 平成29年度の研究

平成29年度のMWNT-7の吸入曝露実験で、病理組織学的には肺腔内や肺組織にMWNT-7とMWNT-7貪食マクロファージを認めた程度で、好中球浸潤を伴う炎症所見や毒性所見を認めなかった。

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

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

C-2 平成 30 - 令和元年度の研究

C-2-1 気管支肺胞洗浄液(BALF)採取と塗抹標本の作製

C-2-1-(1) BALF の採取

免疫機能評価(分担 石丸)に割り当てた各群 6 匹のマウスから BALF を 1.2 ~ 1.8ml / 匹を採取した。BALF 回収率は 75.4% ~ 90.5%、平均回収率 84.0%であった(表 3)。

C-2-1-(2) BALF 塗抹標本の作製

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

C-2-2 病理組織標本の作製

以下の標本を作製した。

C-2-2-(1) 肺の還流固定標本

C-2-2-(2) 肺の浸漬固定標本

C-2-2-(3) 縦隔の病理組織標本

C-2-3 BALF 塗抹の検索

C-2-3-(1) 白血球分画(白血球百分比)

TiO₂(T-TiO₂)曝露群

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

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

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

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

解剖期 0、1、4 週に採取した各群の BALF 塗抹細

胞はほとんど全てがマクロファージであった。急性炎症が示唆される分葉核好中球の増加はごく僅かであった(表 4)。

C-2-3-(2) 肺胞マクロファージの検体貪食率の経時的推移

TiO₂(T-TiO₂)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 TiO₂を貪食し、4 週から非貪食マクロファージが少数出現した(図 4 左)。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

吸入曝露を終了した 0 週で約 80%のマクロファージが MWNT-7 を貪食、以後漸減し曝露終了後 8 週での貪食率は約 20%であった。一方、吸入曝露を終了した 0 週から非貪食のものも約 20%程度存在し、その後、漸増した(図 4 中)。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

吸入曝露を終了した 0 週での貪食率が約 20%、8 週間後には全て非貪食となった(図 4 右)。

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

C-2-3-(4) BALF 塗抹細胞の詳細な形態学的解析

TiO₂(T-TiO₂)曝露群

TiO₂貪食マクロファージと非貪食マクロファージ

TiO₂を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に径 1 ~ 2 μm 程度の異物粒子の他に大凡 0.1μm 程度のナノサイズのものも数多く存在する様子が認められた。これらの粒子はマクロファージが貪食した TiO₂と考えられ、製造メーカー公表による一次粒径が 30nm であることから、マクロファージの胞体内の粒子は一次粒子が粒状凝集した二次粒子に相当するものと考えられた(図 5-1 A)。一方、肺胞マクロファージには TiO₂の貪食を示さないものも認めた。TiO₂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、TiO₂を貪食した肺胞マクロファージと接合したのも認められた(図5-1B)。TiO₂の貪食能を示す肺胞マクロファージをType A 肺胞マクロファージ(以下、Type A マクロファージ)、貪食能を示さない肺胞マクロファージをType B 肺胞マクロファージ(以下、Type B マクロファージ)と称し、その形態学的特徴を表に示した(表5)。

Type A マクロファージの相互接触/接合

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

Type A マクロファージの変性

TiO₂を貪食したType A 肺胞マクロファージに、胞体の膨化と淡明化が認められた。それらの中には胞体の中に水腫状様の小胞が現れる(図5-1E、F)、胞体の輪郭の張りを失って不整な凹凸を示すもの(図5-1G)、など変性所見が認められた。貪食したTiO₂粒子が胞体内に充満して肥大したケースでは、胞体の淡明化と核の染色性低下、細胞質と核の輪郭が不整になるなど細胞死の状態か、もしくはそれに近い状態にあると考えられた(図5-1G)。これらの所見から、クラスターを形成したものは、クラスター全体が変性に陥ることが示された。

Type A 肺胞マクロファージの形態変化

単独で存在するTiO₂を貪食したType A マクロファージに、核クロマチンの核内分布の変化、核内に水腫様小胞の出現、極度に偏在した核クロマチンの核外への伸び出し、さらには細胞外への伸び出しなど核を中心としたType A マクロファージの形態変化が認められた(図5-1H、I、J、k、M、N)。また、核膜を

失った核が断片化したものもみられた(図5-1O)。

Type A マクロファージが他のマクロファージに付着

TiO₂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、TiO₂を貪食したType A マクロファージの中にはType B マクロファージが接合するものがみられた(図5-1K、L)。

TiO₂を貪食したType A マクロファージの中には胞体から伸び出し突起で他のマクロファージ(形態が変化したType A マクロファージと推定)への付着がみられた(図5-1P)。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

単独で存在するT-CNT7 貪食マクロファージ(Type A)

MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた(図5-2A、B)。MWNT-7を貪食した肺胞マクロファージをTiO₂の場合と同様に、Type A マクロファージと称した。Type A マクロファージには細胞突起を伸ばしたのも認められた(図5-2B)。

Type A マクロファージのクラスター形成

MWNT-7を貪食したType A マクロファージにはクラスターを形成したのも多く認められ、TiO₂で認められたものよりも胞体の大型化と濃青紫に染色される好塩基性が顕著で、クラスターの中心部のマクロファージには二核以上の多核細胞も認められた(図5-2C、D、E)。クラスターの外周部に位置するマクロファージからクラスターの内部に位置する大型で多核のマクロファージの胞体内に細胞突起を伸ばして強固に接合した所見も認められた(図5-2C、D)。相互に接触/接合したType A マクロファージは、いずれも類似した形態、染色性を示し、向かい合うマクロファージの辺縁部に好塩基性の線状斑が現れる(図5-2C)など、Type A マクロファージ相互の同期が示唆された。多核巨細胞にはラングハンス型巨細胞の様に核が辺縁に沿って馬蹄形に配列するもの(図5-2E)

も認められた。塗抹標本で観察されたマクロファージのクラスターは、構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

Type A マクロファージのクラスターの融合

MWNT-7 の凝集塊を囲む 4~10 細胞程度の Type A マクロファージのクラスターを基本単位として、それらが融合することにより長径が 100 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 5-2, F)。このクラスターには Type B マクロファージも少数集まり、核から胞体の外に淡赤紫の不定形物質が長く尾を引く Type B マクロファージが認められた。構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体構造をとっていると考えられた。

病理組織所見でも、幾つかの小規模なマクロファージの集簇塊が肺胞管内で集合・癒合した島状のマクロファージの集簇塊が肺胞管を塞ぐ所見が認められており、その対応した BALF 塗抹所見と考えられた。(図 5-2, F 右上挿図)。

Type B マクロファージによる細かい MWNT-7 のトラップ

径 16 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 5-2 G)。

Type A と Type B マクロファージが混在したクラスター

MWNT-7 曝露群で認められた肺胞マクロファージクラスターは、MWNT-7 の凝集塊を中心部に据え、肺胞マクロファージがロゼット状に配列した円形のもの (図 5-2 H) と肺胞マクロファージが鎖状に連なったもの (図 5-2 I) が認められた。両タイプとも Type A と Type B が混在していたが、Type A がプレドミナントで、Type B はマイナーであった。また、両タイプとも塗抹標本の観察で構成するマクロファージの重なりがほとんど認められないことから、ほぼ一層の扁平な立体

構造をとっていると考えられた。

MWCNT-N (T-CNT-N) 曝露群

MWCNT-N 貪食肺胞マクロファージ (Type A)

MWCNT-N を貪食した肺胞マクロファージは胞体の色調が青紫を帯び、胞体内に様々な長さや太さの繊維状物質が存在する様子が認められた (図 5-3 A, B, C)。Type A マクロファージに貪食されて胞体内に取り込まれた MWCNT-N は細く長い状態で存在し、毛玉状に凝集していないことが示された。

Type A 肺胞マクロファージのクラスター形成

MWCNT-N を貪食した Type A マクロファージにはクラスターを形成したのも認められたが、MWNT-7 で認められたものに比較して胞体の大型化や濃青紫に染色される好塩基性は顕著ではなく、クラスターの中心部のマクロファージには二核以上の多核細胞の出現はほとんど認められなかった (図 5-3, D, E)。

Type B マクロファージによる細かい MWCNT-N のトラップ

ひとつのマクロファージの胞体よりも広い範囲で緩やかに絡まった MWCNT-N (凝集体) には、Type B マクロファージが小さなクラスターを形成してより広い面積で検体をトラップすることを示唆する所見がみられた (図 5-3 F, G)。Type B マクロファージの核から胞体外にイソギンチャクの触手のような好塩基性の紐状構造物がたなびき、淡桃色の不定形物質に繊維径約 200 nm の細かい MWCNT-N をトラップしていると考えられた所見が認められた (図 5-3 H)。

このタイプのマクロファージは図 5-3 I に示したマクロファージがアクティブになったものと考えられた。

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

Type A と Type B マクロファージが混在して大きなクラスターを形成したケースも認められた (図 5-3 J, K)。

MWCNT-N ではこうした二つのタイプのマクロファージが混在したクラスターが多く、大きなものでは短

径が 60 μm 、長径が 80 μm を超えるサイズものもみられた(図 5-3 J、K)。集簇したマクロファージの核は、クラスターの中央部に不規則にオーバーラップするように密集し、多数の T-CNTN がび漫性に付着している様子が認められた(図 5-3 J、K)。

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

C-2-4 病理学的解析

C-2-4-(1) 肺の病理組織学的検査

TiO₂ (T-TiO₂) 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 TiO₂ 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 TiO₂ を貪食したマクロファージが散見され(図 6-1 A 左)、それを対物 100 倍で観察するとマクロファージの胞体内と肺組織の上に TiO₂ 粒子を認めた(図 6-1 A 右)。

灌流固定をした曝露後 8 週の肺には TiO₂ 貪食マクロファージの残留はほとんど認められず(図 6-1 B 左)、拡大を上げて対物 100 倍で観察しても TiO₂ 貪食したマクロファージと TiO₂ 粒子を僅かに肺組織に認めただけであった(図 6-1 B 右)。

肺負荷量の測定結果(分担:大西)によると肺 1g 当たりに含まれる検体の量(質量)は MWNT-7 よりも TiO₂ の方が多く、曝露後 8 週の TiO₂ 値は MWNT-7 の 3 倍であることが示された(図 6-1 C)。

TiO₂ 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-TiO₂ 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 TiO₂ 貪食マクロファージが肺胞壁と癒合する様子が認められた(図 6-1 D 上)。この画像をデジタル拡大して詳細に観察すると、肺胞マクロファ

ージが細胞突起を長く伸長させて、相互に接合した網の目に TiO₂ 貪食マクロファージがトラップされるように癒合している状況が示された(図 6-1 D)。

肺内に残留した TiO₂

粗造化した肺胞壁の表層に TiO₂ 貪食マクロファージが径 0.7 μm の細胞突起を伸ばして付着する(図 6-1 E)など、肺胞マクロファージの積み重なりや毛細血管の増加によって、肺胞壁表面構造が限局性に複雑となり粗造化する所見が認められた(図 6-1 E、F)。

TiO₂ 貪食マクロファージによる肉芽腫性病変

TiO₂ 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 TiO₂ を包含した病変部は、将来、TiO₂ を埋め込んで器質化されると考えられた(図 6-1 G)。

TiO₂ 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 TiO₂ 貪食マクロファージが径 0.6 μm の突起を伸ばして接合している所見が認められた(図 6-1 H)。

MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群

炎症性変化

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

細気管支から肺胞管に至る気腔内で肺胞マクロファージによる島状集簇の形成

灌流固定をした肺には曝露後 0 週から 8 週までのいずれの解剖期においても細気管支から肺胞管にかけて気腔内に MWNT-7 を貪食したマクロファージの島状集簇塊を比較的頻繁に認めた。マクロファージの島状集簇塊は大きなものは長径で 100 μm を超えるものも存在したが、多くは 30 ~ 60 μm であった(図 6-2 A、B、C、D、E、F、G、H)。

細気管支内での肺胞マクロファージによる異物の集

団処理

図 6-2 I と J の左の写真は病理組織学的検査で常用される倍率で観察したもので、MWNT-7 貪食した肺胞マクロファージが細気管支内腔を上皮に沿って遡上している所見として認識されるものであった。これを対物 100 倍のレンズを用いて撮影した TIF 画像を縦横 4 倍に拡大すると(図 6-2 I と J の右の写真)、複数の肺胞マクロファージの集団による異物処理が行われ、マクロファージは変性、壊死に陥っている様子が示された。

細気管支内で MWNT-7 を貪食した大型のマクロファージと小型のマクロファージが鎖状に連なった所見が認められた。これと同様の所見が BALF 塗抹においても大型の Type A と小型の Type B マクロファージの連鎖が認められた(図 6-2 K 挿図)。

肺胞マクロファージの増生による終末部細気管支内腔の架橋

肺の細気管支内腔で細気管支上皮の表層に集簇もしくは増生していると考えられるマクロファージが繋がって終末細気管の内腔を細線維で架橋する所見を認めた(図 6-2 L)。さらに太い帯状に集簇して細気管支上皮間を架橋した部位においても、架橋部の表層に細長く伸びた複数のマクロファージが繋がってできたと考えられる細線維に細かな MWNT-7 が多数付着した所見を認めた(図 6-2 M)。帯状に集簇もしくは増生したと考えられるマクロファージは PU.1 と CD11c の二重免疫染色によって骨髄由来の肺胞マクロファージであることが示された。

細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

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

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に径 40 μ m の集簇塊が認められた(図 6-2 N 左)。この集簇塊は主として MWNT-7 を貪食したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)と小型で N/C 比が大きいマクロファージ(同、Type B マクロファージに相当)からなり、MWNT-7 貪食マクロ

ファージの胞体から伸長した径約 1 μ m の細胞突起で既存の細気管支や肺胞と 3 箇所接合する所見が認められた(図 6-2 N 右)。

浸漬固定をした曝露後 0 週の肺で、細気管支末端部に長径 84 μ m、短径 60 μ m で内部に MWNT-7 の凝集塊を包含したマクロファージ(BALF 塗抹の Type A マクロファージに相当)を中心として、複数のマクロファージが比較的ゆるやかに相互に接合した病巣を認めた(図 6-2 O)。この集簇巣にも約 1 μ m の細胞突起で既存の細気管支上皮に接合している所見が認められた(図 6-2 O)。

肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質(T-CNT7)の沈着

気道や肺胞内に存在するマクロファージを洗い流した浸漬固定標本肺の組織を観察すると、曝露後 8 週の浸漬固定標本に、細気管支から続く肺胞管の内腔が末梢に向かうほど広く拡張し、肺気腫を思わせる所見を認めた。最も強く内腔拡張がみられる肺胞管末梢側の端部に肺胞壁の肥厚を認め、その肥厚部から幅が約 3 μ 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 - ムを構築したと思われる所見を認めた。当該部には好中球の浸潤などの急性炎症を示す病理組織所見はなかった(図 6-2 P)。この肺胞壁の肥厚部には煙状で淡灰色の不定形物質がマクロファージにオーバーラップするように沈着した所見が認められた。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の肺や縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であることが示され、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

細気管支周囲間質での膠原繊維の増加

本実験の吸入曝露は間歇曝露方式で実施、肺には好中球の浸潤などの急性炎症の病理所見は認められないものの、曝露後 8 週に気道周囲の間質組織に Masson trichrome stain で青色に染まる領域の増加が認められ、膠原繊維の軽度な増加が示唆された

(図 6-2Q)。細気管支周囲の間質内に MWNT-7 貪食マクロファージが鎖状に連なった状態で線維性構造物に付着している所見が認められた。後述の縦隔への肺泡マクロファージのクラスターや獣毛の移行と併せて、同部位に生じた膠原繊維の増加との関係が示唆された(図 6-2R)。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

炎症性変化

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

MWCNT-N 沈着病変の肺内分布

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

細気管支内での肺泡マクロファージによる異物の集団処理

100 倍の対物レンズ(油浸)を用いた詳細観察で、細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺泡管に MWCNT-N を囲んだ肺泡マクロファージの集簇巣(図 6-3 A、B、C)を認め、小型の集簇巣(図 6-3B、C)の内部に不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、MWCNT-N を包含し、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた(図 6-3B、C)。仔細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察した。クラスター外周の途切れている部分をマクロファージから伸び出したと考えられる径 2 μ m の細線維が繋ぐ所見が認められた(図 6-3C)。

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

C-2-4-(2) 縦隔の病理組織学的検査

TiO₂(T-TiO₂)曝露群

炎症性変化

TiO₂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 TiO₂ 貪食マクロファージが縦隔や心嚢膜を構成する細い線維(膠原線維、細網線維)に付着している所見を認めた(図 7-1 A、B)。細い線維に付着した TiO₂ 貪食マクロファージは、胞体の染色性の低下と核や胞体内部の構造が不明瞭となった所見が認められた(図 7-1 A、B)。縦隔内に複数の大型の貪食マクロファージからなるクラスターは認められなかった。

MWNT-7(T-CNT7)曝露群

炎症性変化

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

縦隔の疎性結合織に移行した MWNT-7 貪食マクロファージ

100 倍の対物レンズを用いた詳細観察で、MWNT-7 貪食マクロファージが単独、またはクラスターを形成した状態(図 7-2 C、D)で縦隔の疎性結合織に付着した所見を認めたが、縦隔に移行した所見は極めて稀であった。

クラスターはBALF塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターに類似した形態を示したが、クラスターの最も幅が広いところで30 μ m程度であった。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面が比較的多く認められ、図7-2 C(右上)に示した獣毛の断面の径は20 μ mであった。

縦隔部のリンパ節に移行したMWNT-7 貪食マクロファージ

縦隔部リンパ節に曝露後0週に少数の細いMWNT-7が認められ(図7-2 E)、曝露後8週ではその数が増加している様子が示された(図7-2 F)。縦隔部リンパ節には、MWNT-7曝露群の縦隔の疎性結合組織内に認められたようなMWNT-7 貪食マクロファージのクラスターは認められなかった。

MWCNT-N(T-CNT-N)曝露群

炎症性変化

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

縦隔の疎性結合織に認められたMWCNT-N

100倍の対物レンズを用いて撮影した画像をデジタル拡大した詳細観察で、極めて稀にマクロファージと灰色を帯びた煙状の不定形物質が縦隔の組織と癒合しと考えられる所見が認められ、この不定形物質をMWCNT-Nと推定した(図7-3 E)。

C-2-5 走査型電子顕微鏡による超微細形態検査

病理組織学的検査で縦隔にMWCNT-Nと推定される物質が認められたHE染色標のカバーガラスを外した組織切片を透過型電子顕微鏡で2000倍まで拡大した観察した結果、光学顕微鏡で観察された灰色を帯びた煙状の不定形物質と同様の形状、大きさの固形物が縦隔の組織と癒合している所見が認められた(図7-3 F)。固形物が縦隔の組織と癒合していることから病理組織学的変化で認められた所見は器質化が進んでいると考えられた。

D. 考察

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

D-1 粒子状ナノマテリアル

TiO₂ 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TiO₂を貪食したマクロファージやTiO₂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TiO₂の大部分が肺泡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TiO₂ 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TiO₂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TiO₂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、TiO₂ 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TiO₂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TiO₂ 貪食マクロファージが肺胞壁などの肺組織に付着して存在すると推察された。

肺胞域での病理組織学的変化

肺内に残存したTiO₂の所在を顕微鏡の対物レンズを40倍から100倍に替えて撮影した画像をデジタル拡大して仔細に観察すると、TiO₂ 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、TiO₂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TiO₂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 TiO₂ が肺組織に固着される機転を辿ると考えられた。

TiO₂ を暴露したマウス肺における病態形成メカニズム

肺の最も重要な機能は肺胞壁の「空気 血液関門」を通して行われる酸素と炭酸ガスの交換である。「空気 血液関門」は 型肺胞上皮細胞と毛細血管内皮細胞及び基底膜で構成される。 型肺胞上皮細胞の細胞質はきわめて薄く(0.5μm)引き伸ばされて肺胞毛細血管に密着し、基底膜を両者が共有することでガスの通過を容易にする構造となっている。肺胞壁に TiO₂ 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 TiO₂ 貪食マクロファージが器質化されて、それを足場として

型肺胞上皮細胞と毛細血管がセットで表層に新生される肺胞壁のリモデリングが生じると考えられた。

本研究班の吸入実験は 30mg/m³ の濃度で 1 日に 2 時間の暴露を週 1 回、5 週間にわたって繰り返したもので、1 週間に 2 時間の暴露を 1 回行う程度であれば、次週の暴露までの間に 型肺胞上皮細胞と毛細血管によるリモデリングは完了して肺胞壁の塑造化と新生毛細血管が所見として認識される程度の極めて微弱な変化として現れたものと考えられた。

D-2 繊維状ナノマテリアル

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

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

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

本分担研究で形態学的に BALF 中の肺胞マクロファージを二種類に大別した。ひとつは Type A としたもので胞体が貪食によって肥大し、MG 染色で肥大

した胞体が青紫を呈した。Type A マクロファージは MWNT-7 に含まれる単離繊維の粗大な束や細かな単離繊維を貪食するとともに、自身で貪食できない粗大な単離繊維の束を集団で取り囲むことでクラスター内に包み込み、クラスターごと細気管支末梢に接合・付加させると考えられた。これによってマクロファージは、単独での処理が困難な粗大の繊維性ナノマテリアルの束を一気に線維化組織に埋没させる異物処理を行い、その際に細気管支周囲の間質から線維芽細胞など線維化に係る細胞が進出することで、線維化を促進すると考えられた。粗大で強靱な凝集体を処理するケースではクラスターの中心部の MWNT-7 の凝集体を囲むように肥大した Type A マクロファージが配列し、MWNT-7 のラット吸入暴露試験で報告されているラングハンス型巨細胞に類似した核の配列が認められる等、MWNT-7 を暴露した肺に特徴的な所見として知られる肉芽腫形成の要因になると考えられる所見が認められた。細気管支末梢に接合できなかったクラスターは粗大の繊維性ナノマテリアルの束を包含したまま壊死に陥り、ムコシリアリーエスカレーションによって喀痰のように気管外に排泄されると推定された。

もうひとつは Type B とした小型のマクロファージで、May-Grünwald Giemsa 染色で胞体が淡桃色を呈した。Type B とした小型のマクロファージは顕微鏡で視認できるサイズの繊維状ナノマテリアルを明確に貪食している所見は認められず、Type B マクロファージの胞体の外側に分泌される基質のような不定形物質によるトラップが推測された。BULK の MWNT-7 は繊維径が 100nm よりも小さいものが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占め、線維長は 5μm よりも短いものが 52.3% (T. Ksai, *et.al.*, 2014) で、その大多数が光学顕微鏡では視認できないサイズである。MWNT-7 と MWCNT-N とともに BALF 塗抹で Type B マクロファージの胞体の外側に分泌されている不定形物質に繊維幅が凡そ 100 nm 程度のナノ繊維がトラップされている様子が観察されたこともこの仮説と符合する。これまで報告されている多くの情報は粗大な繊維を貪食するマクロファージ(本研究の Type A マクロファージ)の単独の働きに関するもので、複数のマクロファージ

による集団処理には関心が向けられてこなかったが、本研究で得た知見では、粗大な繊維の異物処理は Type A マクロファージの集団処理が主体になっていると考えられ、繊維幅が 100nm よりも細い狭義の繊維状ナノマテリアルは肺胞の末端まで肺内に広く吸引され、その処理には Type B マクロファージによる集団処理の関与が示唆された。

Type B マクロファージによる繊維幅が 100 nm よりも細い繊維状ナノマテリアルの集団処理の状況は、不織布状の製品を分散化処理によってナノファイバーにした MWCNT-N (T-CNT-N) の吸入曝露実験での BALF 塗抹の詳細な観察においても、Type B マクロファージ周囲の不定形分泌物に繊維状ナノマテリアルがトラップされ、Type B と Type A マクロファージの混合クラスターでは広域に繊維状ナノマテリアルをトラップする様子が示された。繊維幅が 100 nm よりも細い狭義のナノファイバーを光学顕微鏡で視認することは不可能であるが、MWCNT-N 曝露群では細気管支上皮終末部とそれに繋がる肺胞管に認められた小型集簇巢の内部に不定形混濁物の沈着が認められた。この不定形混濁沈着物はマクロファージの細胞質との境界が不明瞭で、近隣のマクロファージにもインク染みのように広がっていた。詳細に観察すると、クラスターを構成する小型のマクロファージの腹面から薄く広がり、透けるような不定形混濁物質に MWCNT-N が包含されると推察された。これと同様のインク染みのような広がりが MWNT-7 曝露群の肺胞に認められた。MWNT-7 のケースでは、拡張した肺胞管に面した肺胞域に限局性マクロファージの増生部が存在し、そこに煙状で淡灰色の不定形物質がオーバーラップするように沈着した所見が認められた。この煙状で淡灰色の不定形物質は MWCNT-N 曝露群の縦隔にも認められており、縦隔内に認めた沈着物については走査型電子顕微鏡による観察で固形物であることが示され、光学顕微鏡で形状を認識することができないサイズの検体が凝集したものであることが示唆された。

このように繊維幅が 100 nm よりも細いナノファイバーは Type B マクロファージによってトラップされて肺

胞域に付着することが示唆されたが、光学顕微鏡でその実態を認識できなかったため、これまで毒性学的に注目されてこなかったと考えられた。MWNT-7 の場合、繊維径が 100nm よりも小さいナノファイバーが全繊維の 68.8% (n=200 fibers) を占める (T. Ksai, *et.al.*, 2014) ことから、今後は粒子径分布で大多数を占める細かい繊維状ナノマテリアルによる呼吸器毒に注目する必要がある。macrophage extracellular traps (METs) のようなマクロファージの外来異物の処理機構についても検討してみる必要がある。

線維化病変の形成

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

肺から縦隔への移行について

本研究でモデルナノマテリアルとして選定した TiO₂、MWNT-7、MWCNT-N はいずれも肺胞マクロファージがクラスターを形成して肺から縦隔に移行、縦隔内に付着して器質化されるものがあることが示された。

縦隔に移行した肺胞マクロファージのクラスターは BALF 塗抹の観察や病理組織検査で肺内にみられたクラスターと同様の形態を示したが、その最も幅が広いところで 30 μm 程度であった。また、縦隔内に、染色性と毛髄質の細胞を失った獣毛の断面も多く認められた (図 7-4)。こうした獣毛の断面の径と肺胞マクロファージのクラスターの径はほぼ等しく、獣毛や肺胞マクロファージが肺から縦隔に移行する流路の存在が示唆された。今後、肺から縦隔に移行する流路の解明とこれまで意識されてこなかった縦隔機能の研究が必要と考える。

E. 結論

3 種類のモデルナノマテリアルを肺に炎症を惹起し

ない低負荷量でマウスを用いた吸入曝露実験を行った。その結果、粒子状物質が曝露される TiO₂ と、分散した単離繊維とその凝集体が曝露される MWNT-7 や MWCNT-N では 肺内での肺胞マクロファージによる処理様式が異なることが示された。さらに、繊維状の MWNT-7 と MWCNT-N においても、“太さ”や“柔軟性”の違いによって肺胞マクロファージによる処理方式が異なることが示唆された。本研究で、3 種類モデルナノマテリアルについて肺に炎症性変化を起ささない低負荷量域での有害性のカテゴリー評価の基盤となる情報を収集することができた。今後、毒性発現量での量・反応関係を考慮した情報収集が必要と考える。さらなる研究を実施することにより、ナノマテリアルの安全性評価で、カテゴリー評価によるスクリーニングが可能となると期待される。ナノマテリアルによる生体影響を形態学的に研究するにあたっては、今後、縦横高さのいずれかが 100 nm よりも小さな狭義のナノマテリアルの影響に目を向ける必要がある。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

論文発表

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

学会発表

○ 相磯成敏、佐々木俊明、大西誠、梅田ゆみ、菅野純: 経気道曝露された多層カーボンナノチューブのリンパ路による肺外移送、第 32 回発癌病理研究

会、2017 年 8 月 24 日(滋賀県大津市)

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

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

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

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 吸入曝露実験に供試した検体の物理化学的性状

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

表2 病理検査結果 (H29年度)

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

(+: 当該所見あり - : 当該所見なし)

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

表3 気管支肺胞洗浄液 (BALF) の採取量

群名称 (曝露濃度)	項目	TiO ₂ (30mg/m ³)		MWNT-7 (3mg/m ³)		MWCNT-N (0.6mg/m ³)		MWCNT-N (1.3mg/m ³)	
		平均	SD	平均	SD	平均	SD	平均	SD
OW	注入量(ml)	2.0	-	2.0	-	2.0	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.6	0.06	1.6	0.02	1.7	0.09	1.6	0.04
	回収率(%)	78.7	3.21	80.0	0.87	87.3	4.73	82.2	2.02
1W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	1.6	-
	回収量(ml)	1.3	0.09	1.4	0.03	1.3	0.06	1.7	0.11
	回収率(%)	82.3	5.32	88.8	1.57	83.8	3.77	85.3	5.30
4W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.3	0.13	1.3	0.03	1.3	0.07	1.6	0.04
	回収率(%)	80.0	8.20	83.8	2.01	81.8	4.07	81.8	1.89
8W	注入量(ml)	1.6	-	1.6	-	1.6	-	2.0	-
	回収量(ml)	1.2	0.25	1.4	0.06	1.4	0.05	1.6	0.04
	回収率(%)	75.4	15.52	85.2	3.77	87.1	2.89	87.5	1.80

表4 BALFの白血球分画

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

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

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

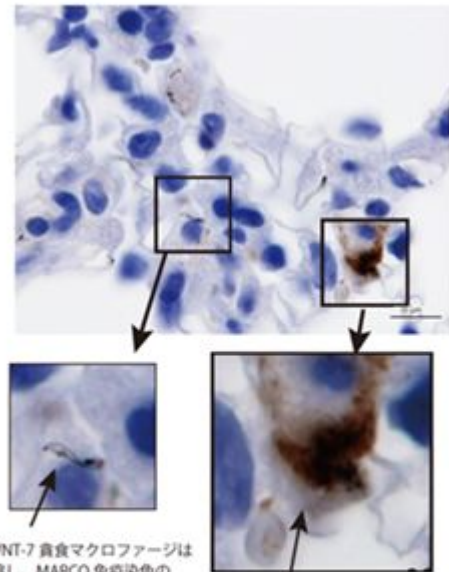
表5 Type A と Type B マクロファージの形態学的特徴

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

*: 光学顕微鏡レベルでの観察



図1 実験デザイン (H29年度)



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

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

図2-2 病理組織学的検査：MARCO免疫染色

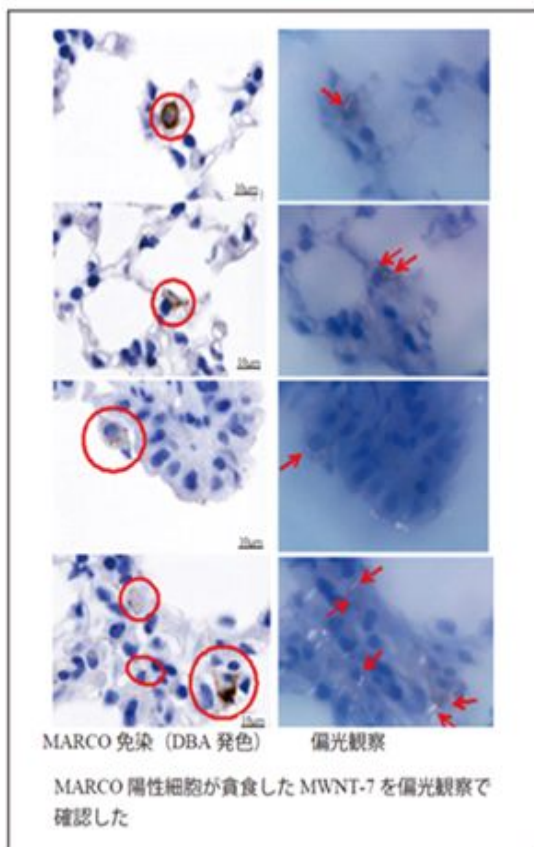
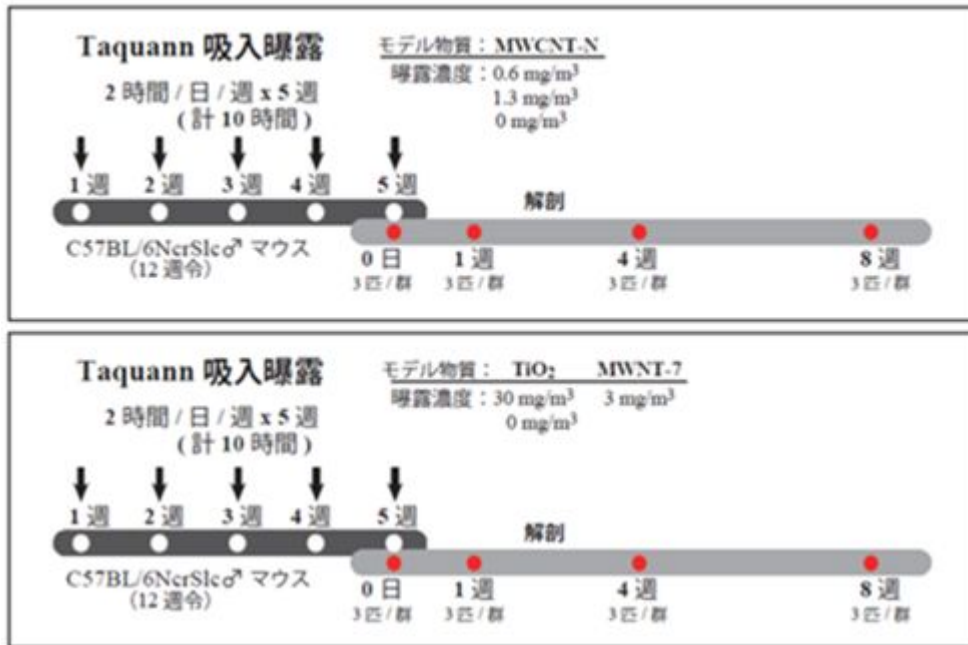


図2-1 病理組織学的検査：MARCO免疫染色



病理組織学的検査

- ・肺と縦隔の灌流固定組織：3匹
 (4% Paraformaldehyde phosphate Buffer Solution)
- ・気管支肺胞洗浄液 (BALF) 採取後の右肺の浸漬固定組織：6匹
 (10% Formaldehyde Phosphate Buffer Solution)
- ・Masson trichrome 染色、Vimentin 免疫染色

BALF 塗抹標本でのマクロファージの形態観察

- ・塗抹：3匹 (May-Grunwald Giemsa 染色)

病理組織標本と BALF 塗抹標本の観察では、100 倍の対物レンズ (Oil) を使用、撮影画像を photoshop で拡大 (最大で 2000 倍相当)、露出を変化させた観察を実施。

図3 実験デザイン

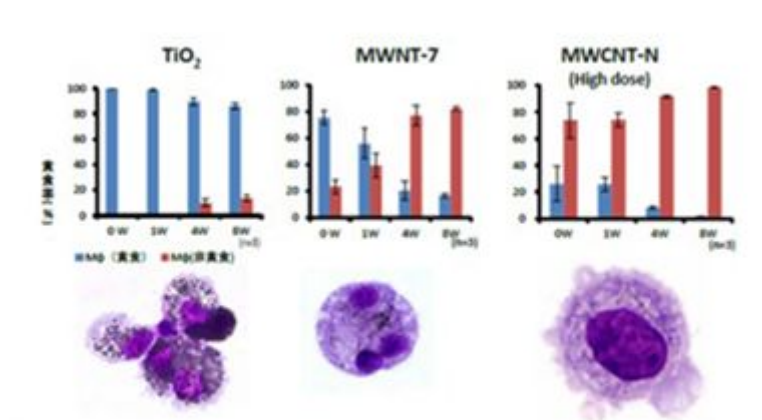


図4 マクロファージの検体食食率の経時的推移

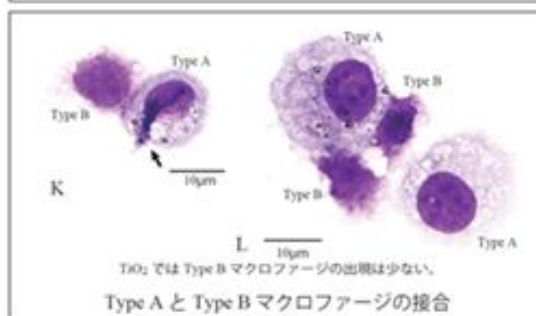
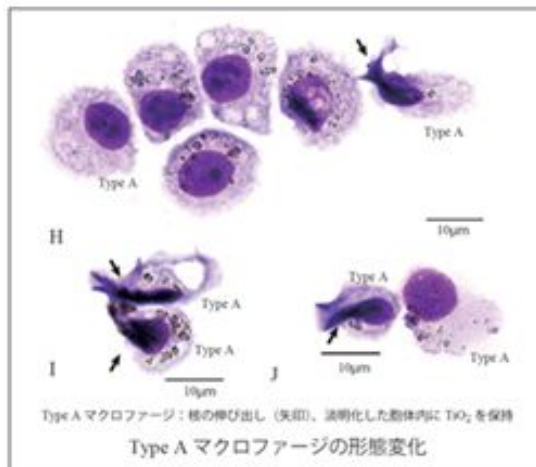
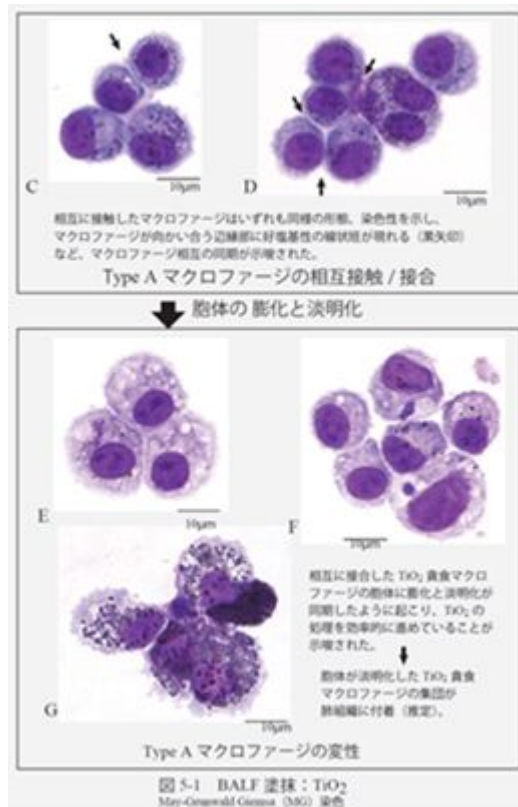
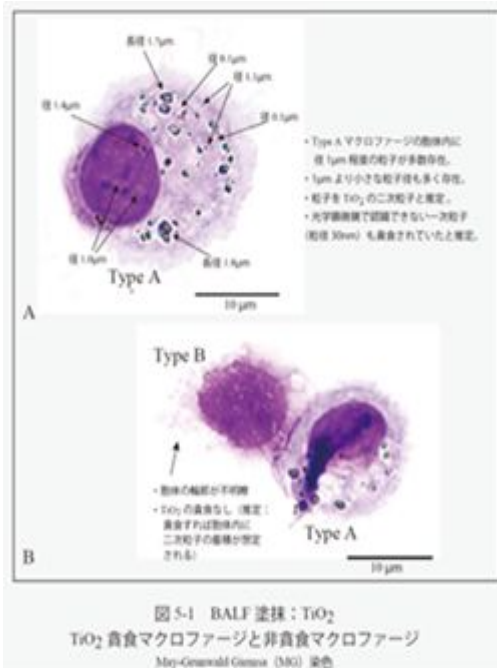
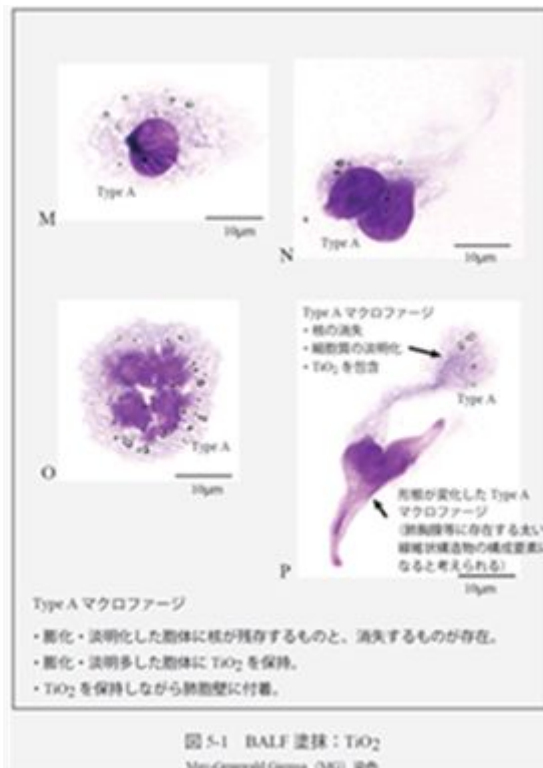
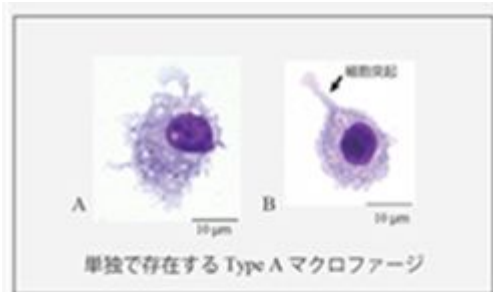
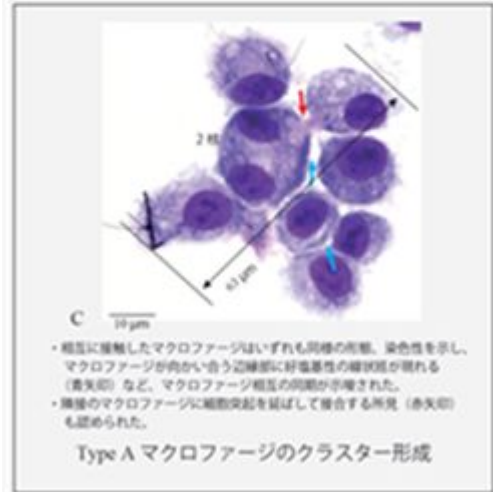


図 5-1 BALF 塗抹: TiO₂
May-Grunwald Giemsa (MG) 染色





単独で存在する Type A マクロファージ

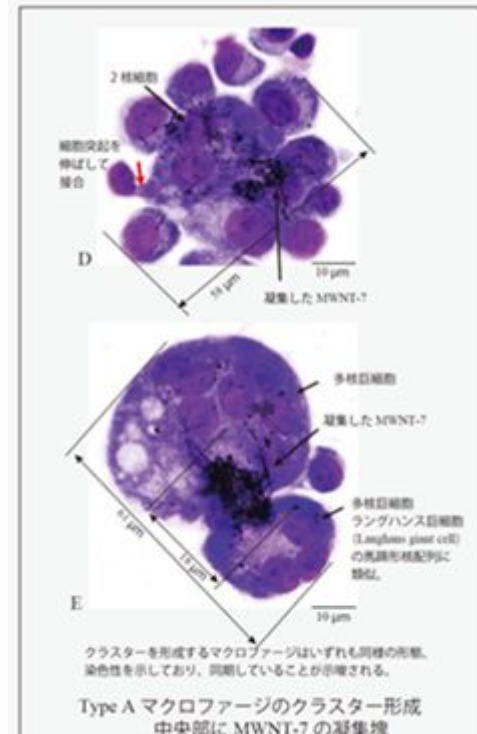


- 相互に接触したマクロファージはいずれも同様の形態、染色性を示し、マクロファージが向かい合う辺縁部に好塩基性の線状物が現れる (黒矢印) など、マクロファージ相互の同期が示唆された。
- 隣接のマクロファージに細胞突起を伸ばして接合する所見 (赤矢印) も認められた。

Type A マクロファージのクラスター形成

図 5-2 BALF 塗抹：T-CNT7

May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色

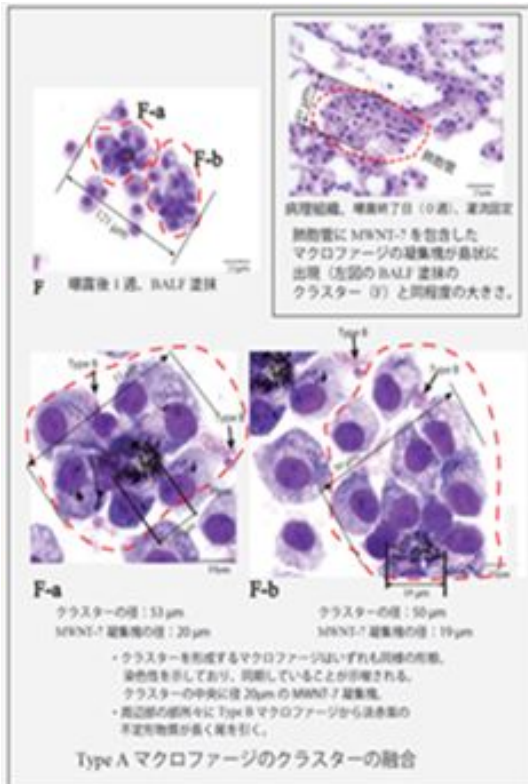


クラスターを形成するマクロファージはいずれも同様の形態、染色性を示しており、同期していることが示唆される。

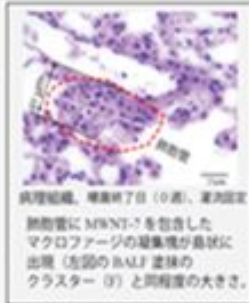
Type A マクロファージのクラスター形成
中央部に MWNT-7 の凝集塊

図 5-2 BALF 塗抹：MWNT-7

May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



F 曝露後 1 週、BALF 塗抹



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

F-a クラスターの径：53 μm
MWNT-7 凝集塊の径：20 μm

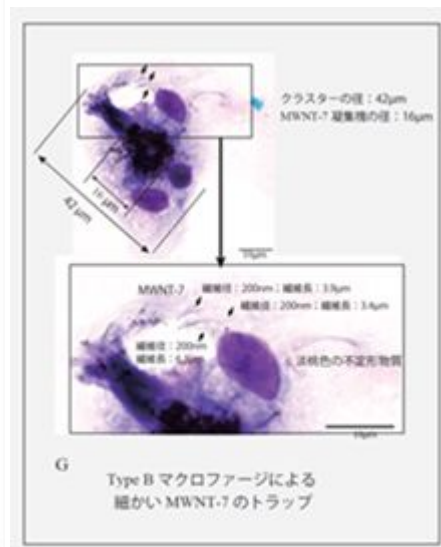
F-b クラスターの径：50 μm
MWNT-7 凝集塊の径：19 μm

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

Type A マクロファージのクラスターの融合

図 5-2 BALF 塗抹：MWNT-7

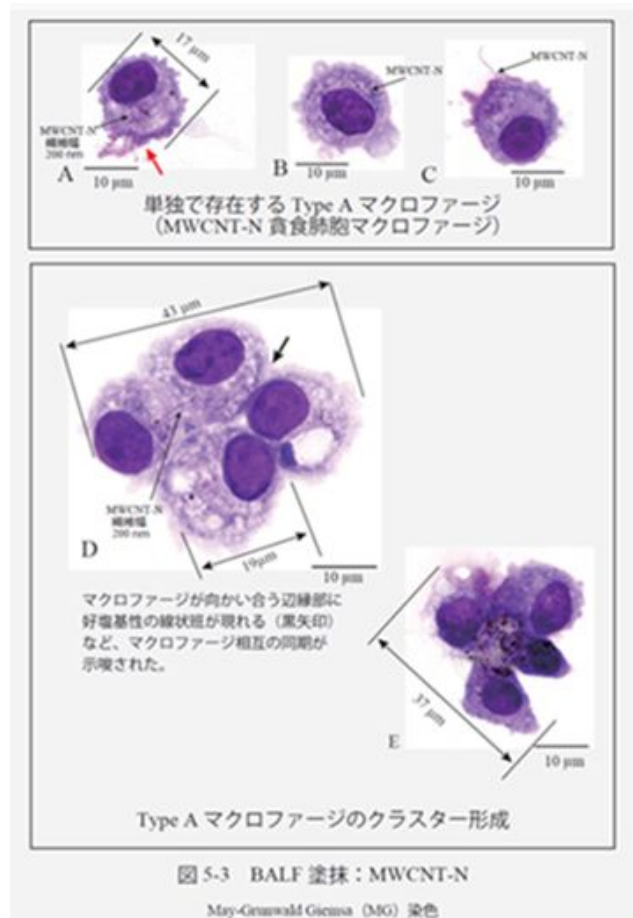
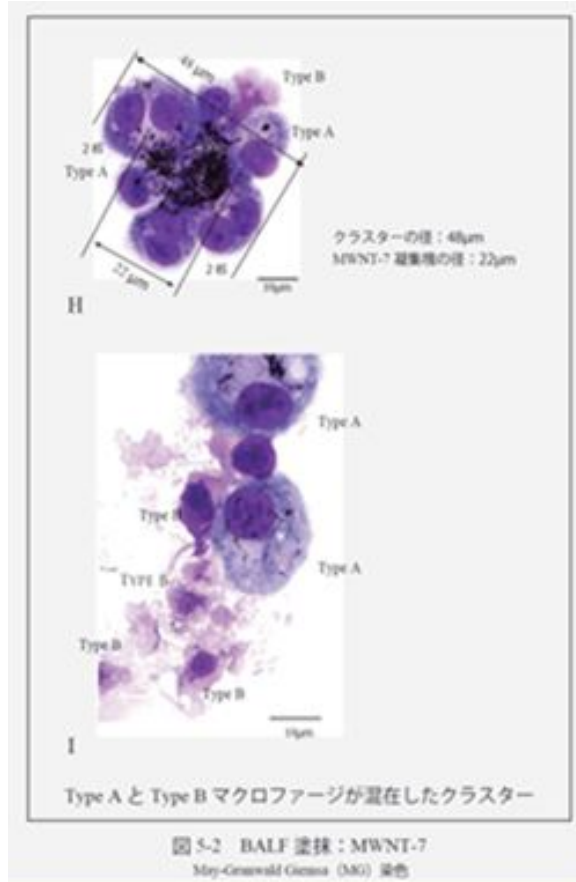
May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



Type B マクロファージによる
細かい MWNT-7 のトラップ

図 5-2 BALF 塗抹：T-CNT7

May-Grunwald Giemsa (MGG) 染色



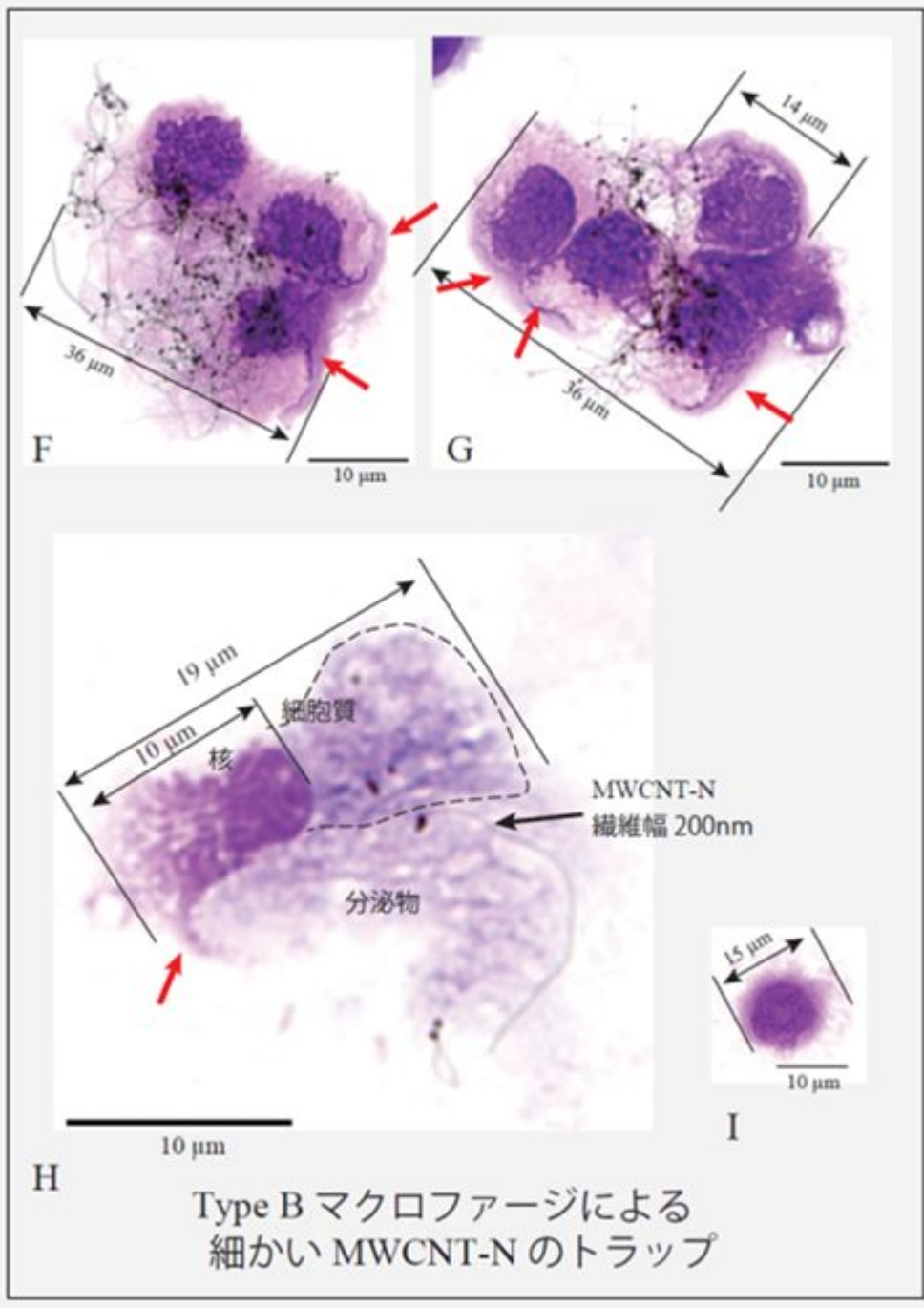


図 5-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

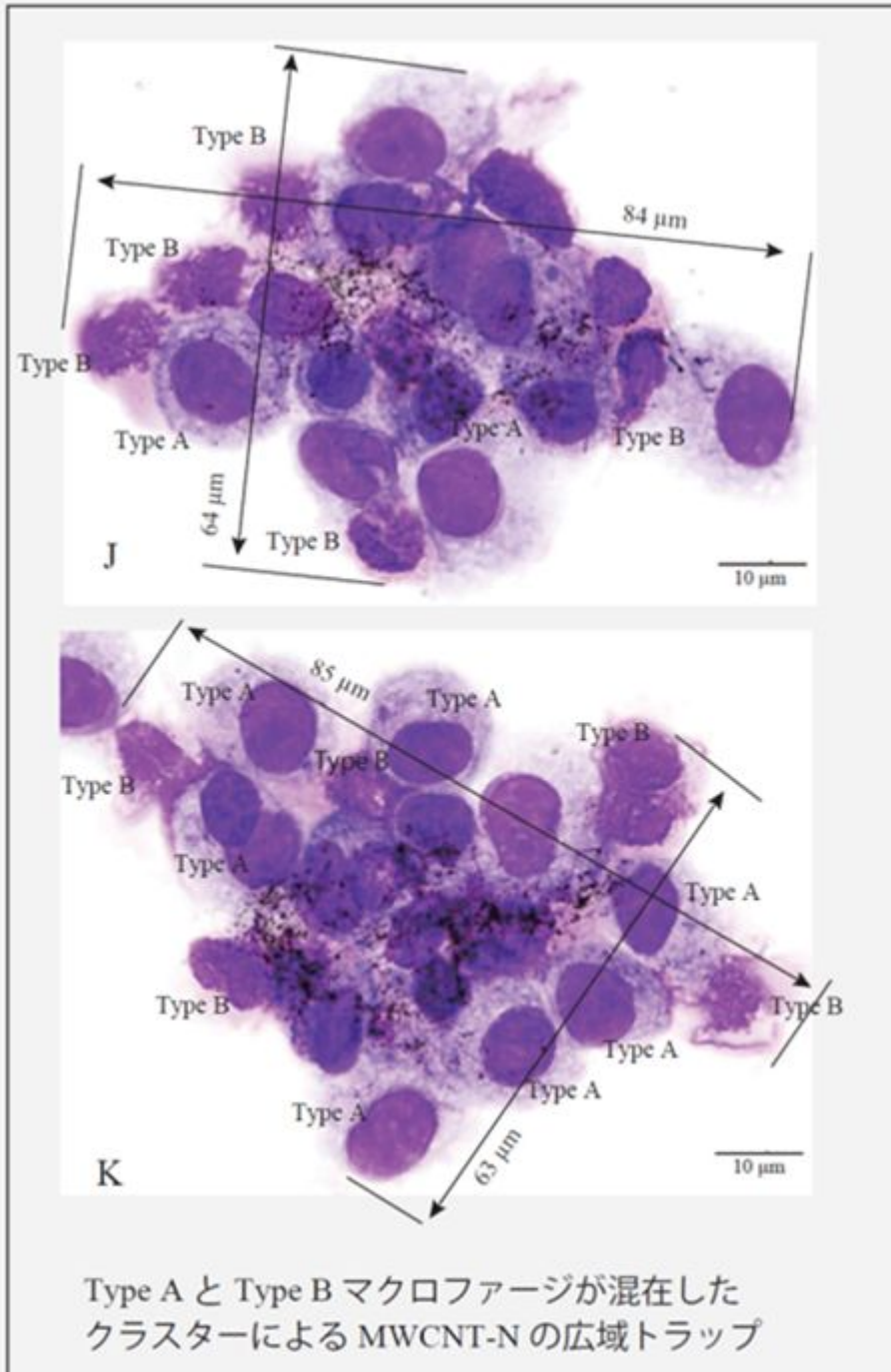


図 5-3 BALF 塗抹：MWCNT-N

May-Grunwald Giemsa (MG) 染色

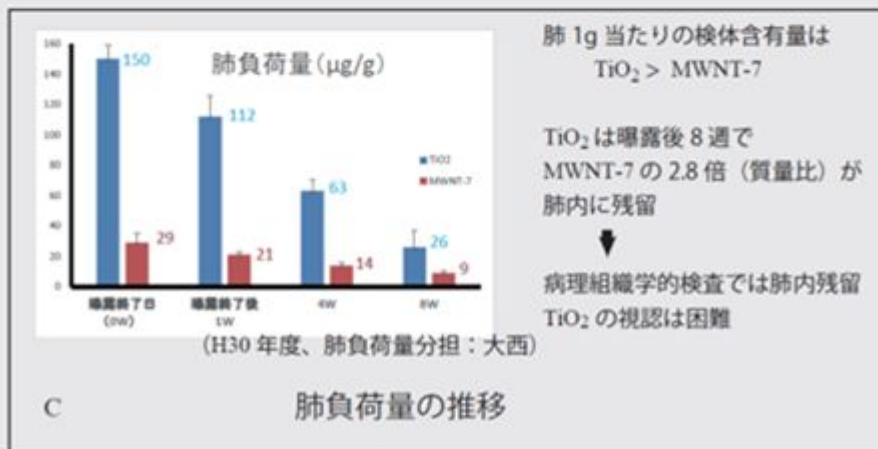
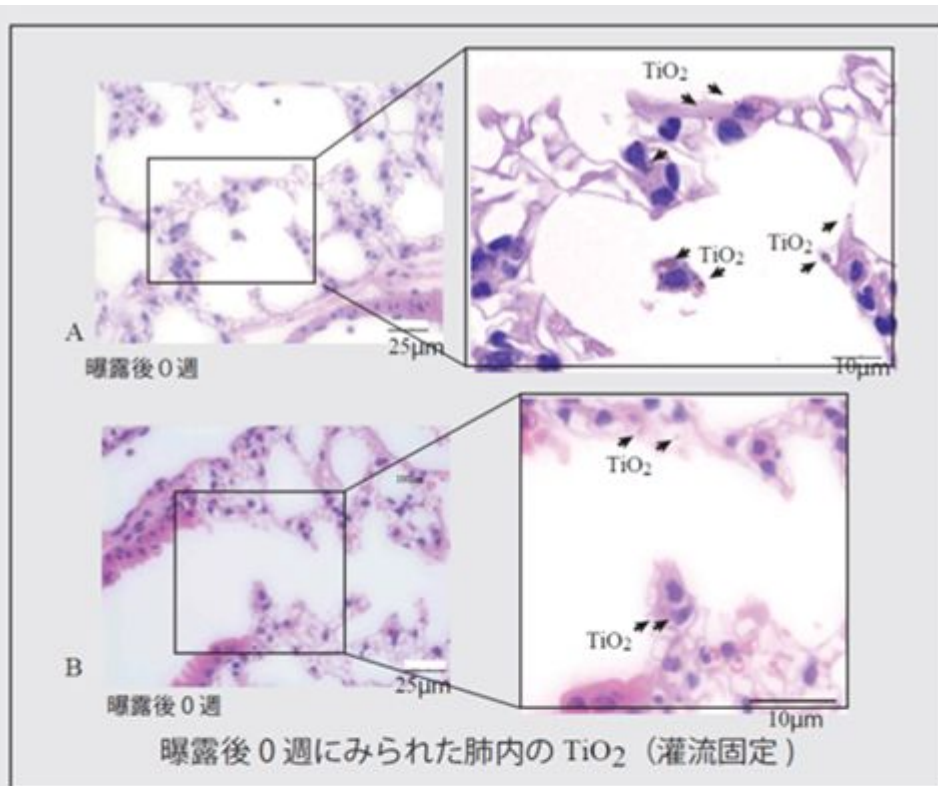
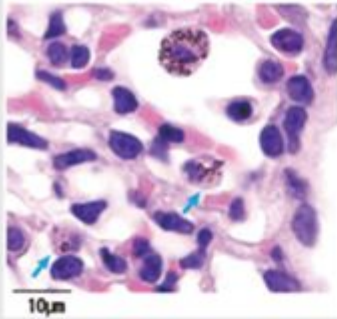
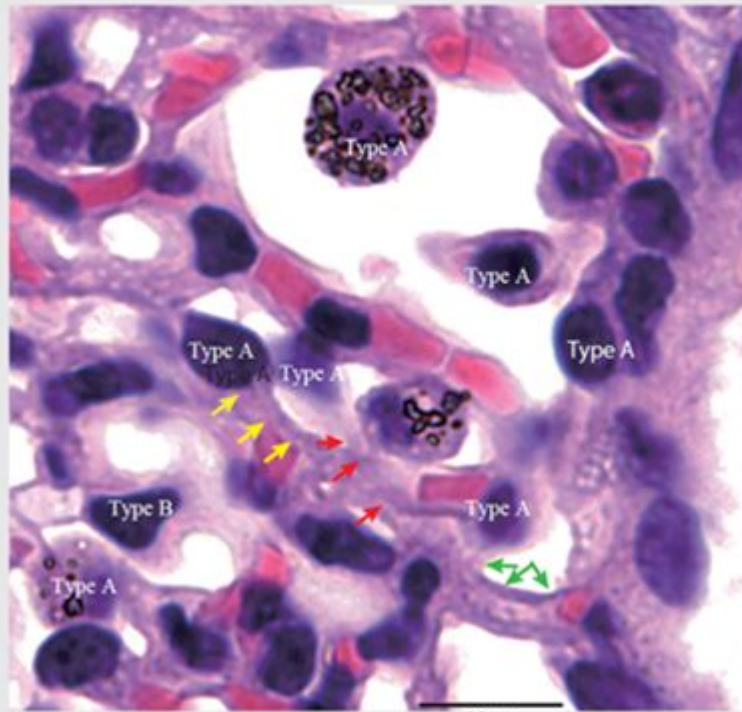


図 6-1 病理組織：TiO₂



- ・光学顕微鏡下で視認できる肺内残留 TiO₂ は MENT-7 と比べて極めて少ない。
- ・TiO₂ 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)

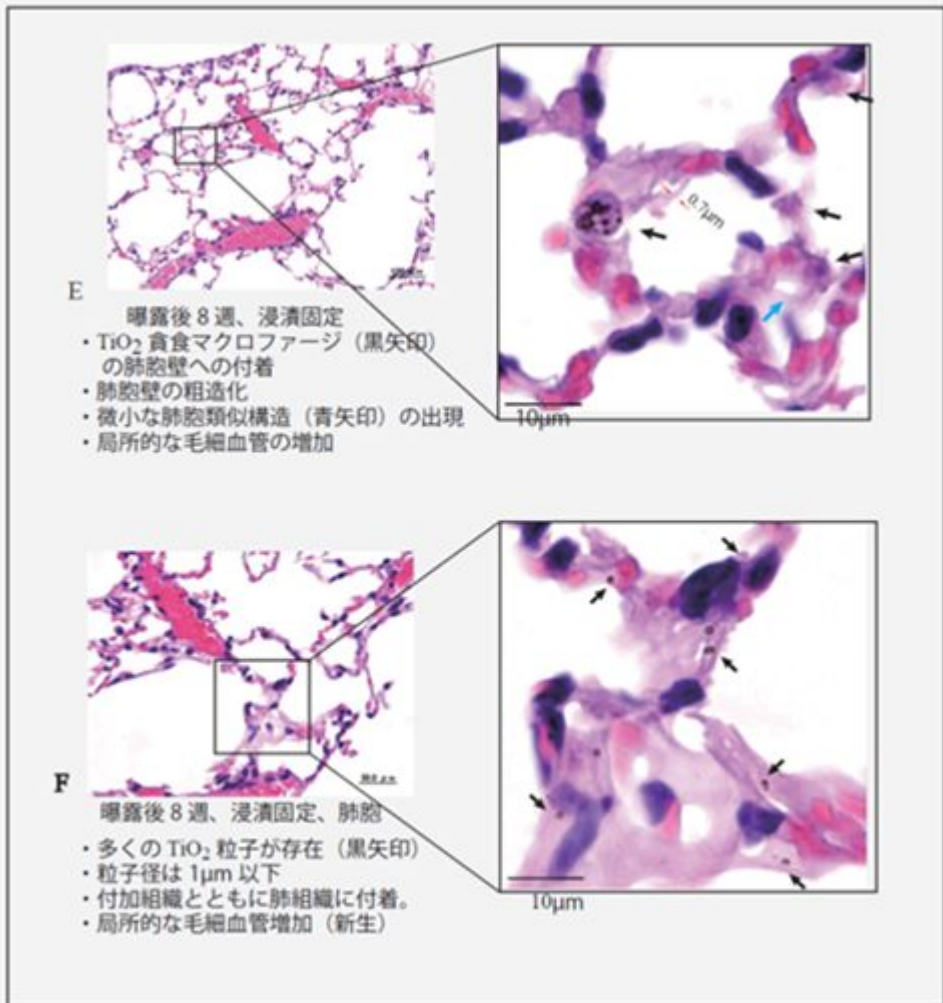


D

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 TiO₂ 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

TiO₂ 貪食マクロファージ (Type A) の肺胞域への固着

図 6-1 病理組織: TiO₂



肺内に残留した TiO_2

図 6-1 病理組織： TiO_2

曝露後0週、
浸漬固定、細気管支-肺胞

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

↓ (推定)

- ・TiO₂ を埋め込んだ状態で器質化の機転を辿る。

G 図左上 (h-1) と同一病変 10µm

TiO₂ 貪食マクロファージによる肉芽腫性病変

- ・TiO₂ 貪食マクロファージが細い突起で細気管支上皮に接合。

↓

- ・TiO₂ 貪食マクロファージが壊死して細気管支上皮から剥離、もしくは細気管支上皮の turnover の際上皮とともに剥離して mucociliary escalation によって排泄される (推測)。

H 曝露後8週、浸漬固定、細気管支 10µm

TiO₂ 貪食マクロファージの細気管支上皮への接合

図 6-1 病理組織：TiO₂

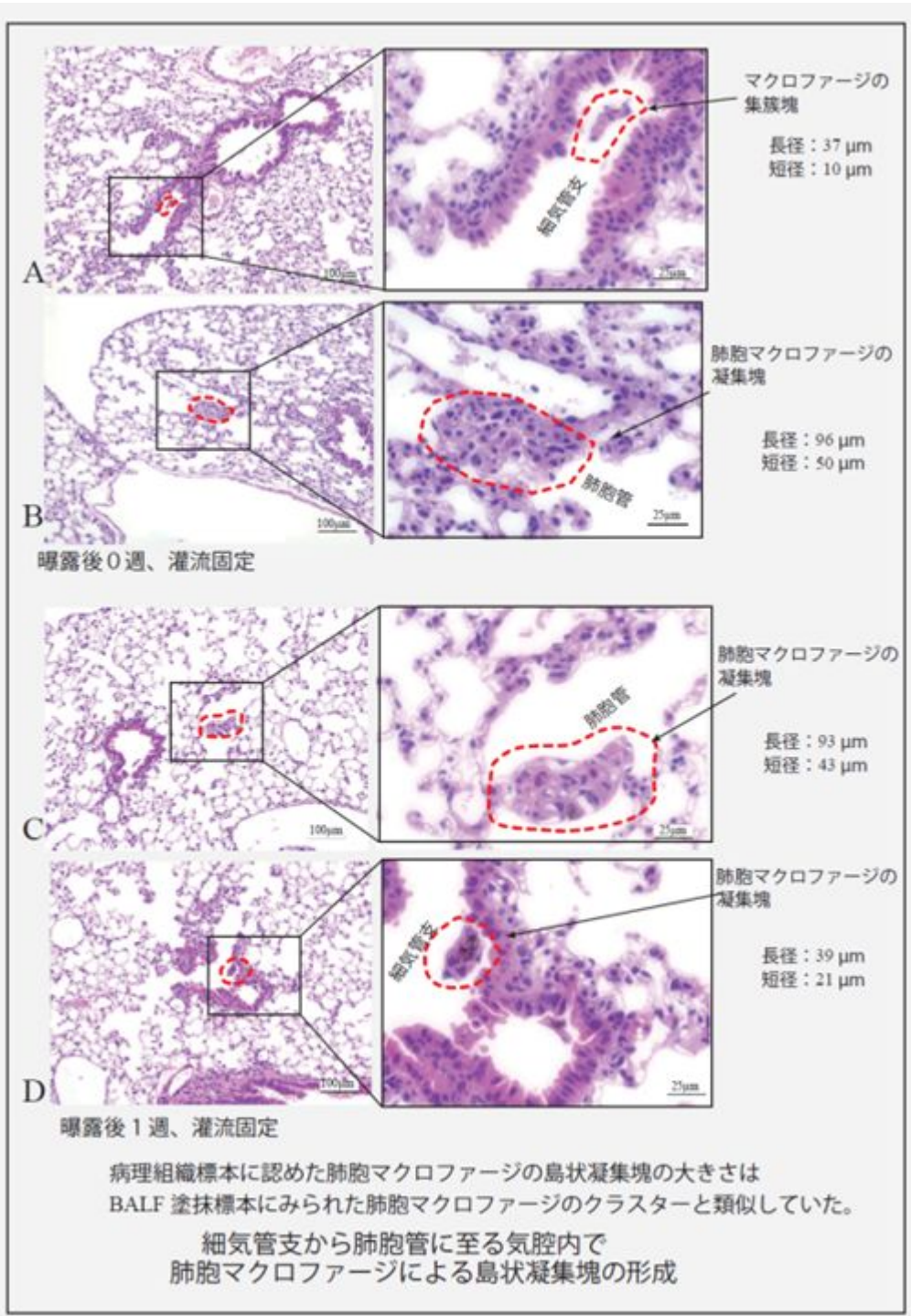


図6-2 病理組織：MWNT-7

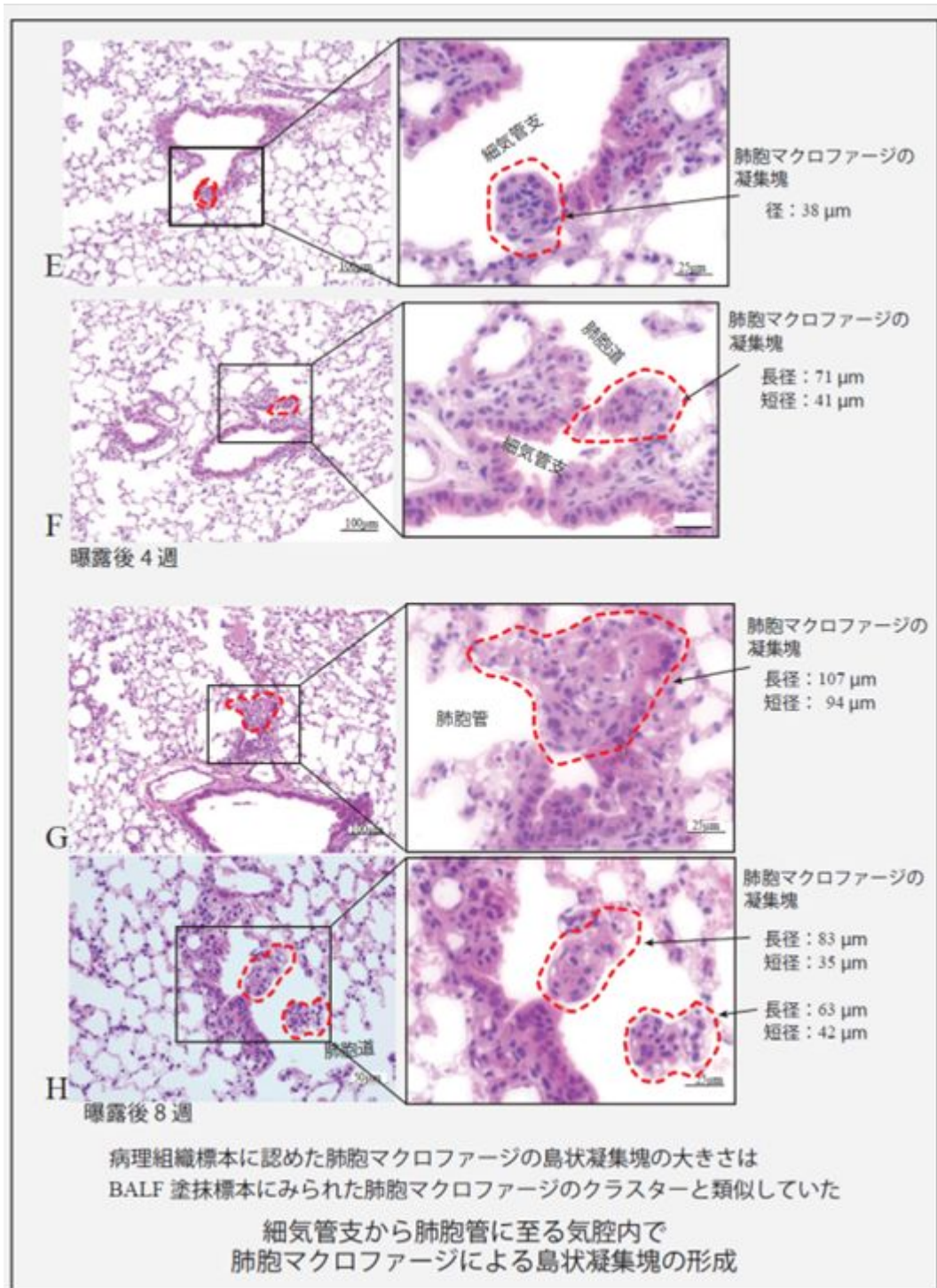
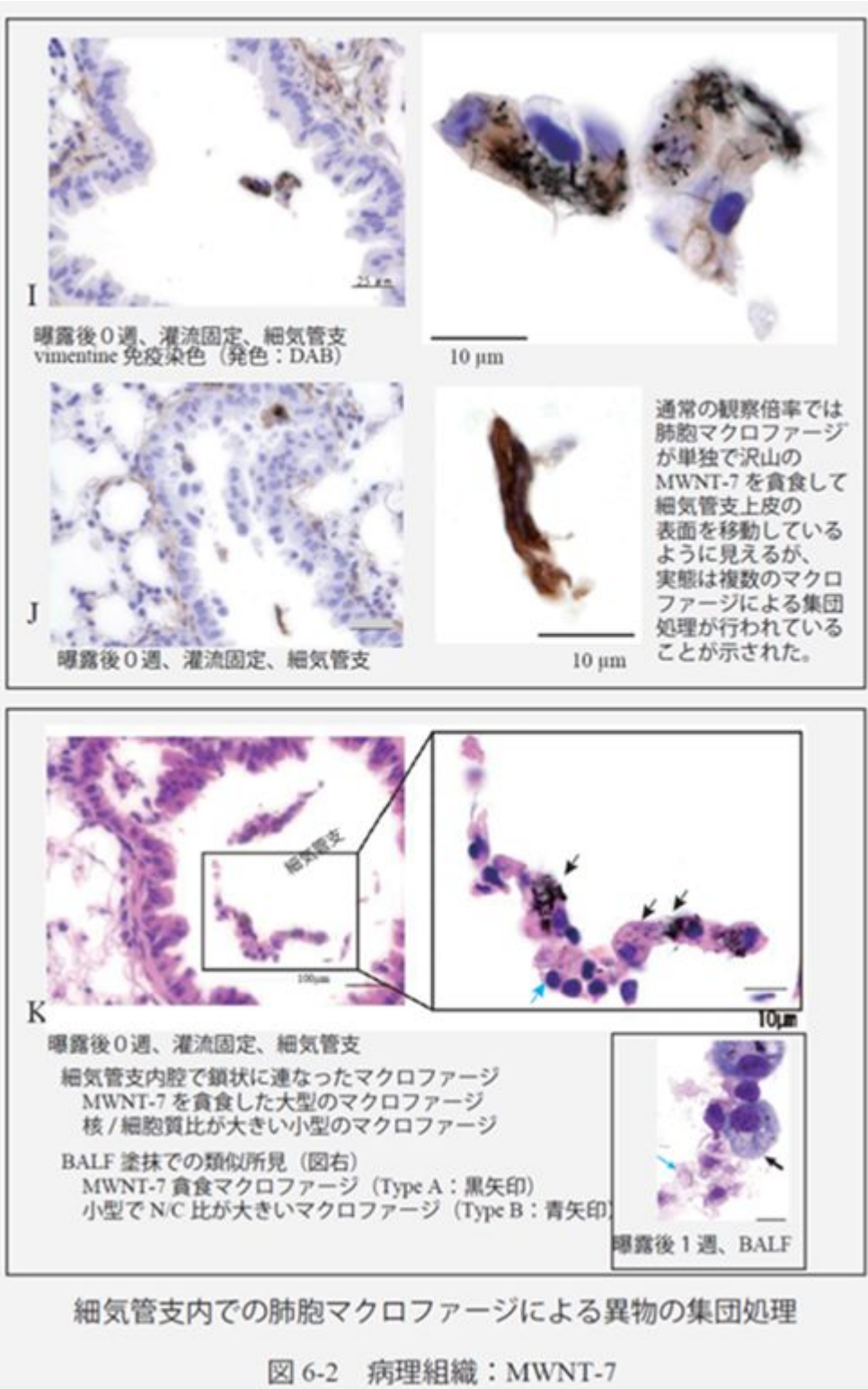
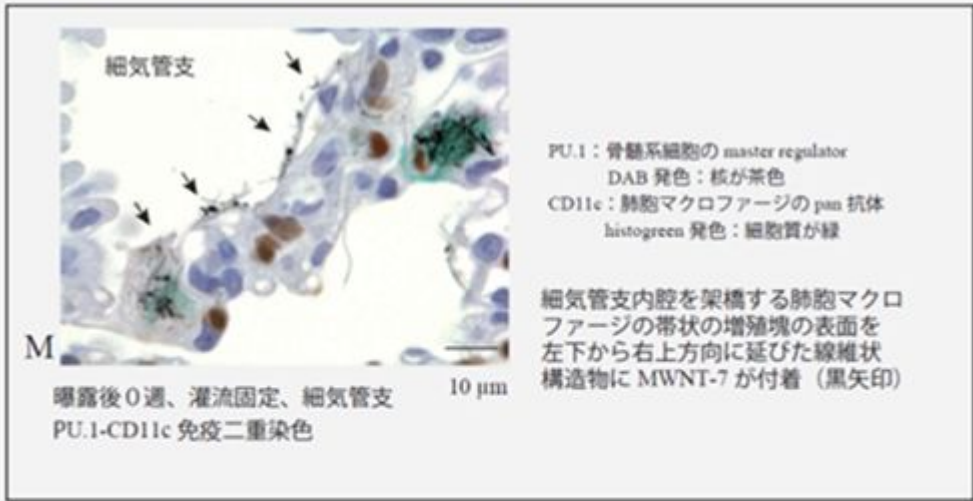
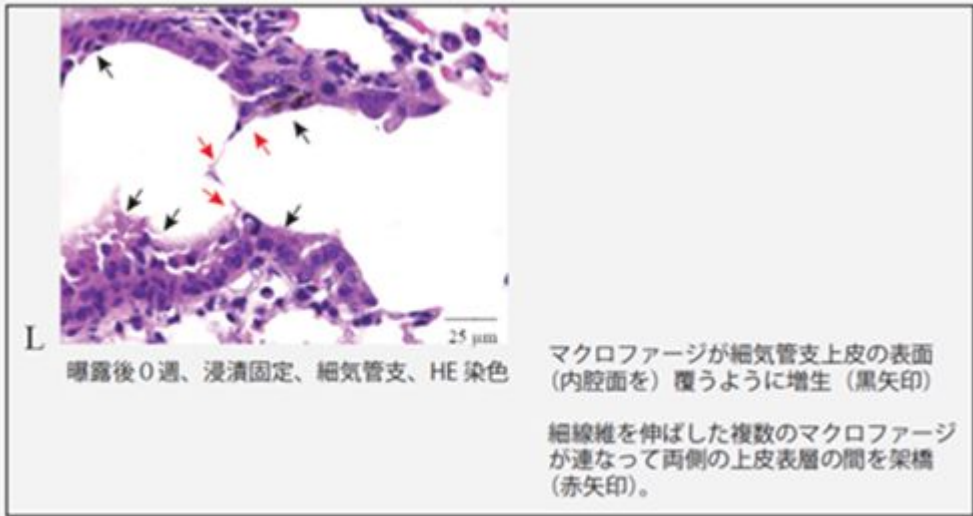


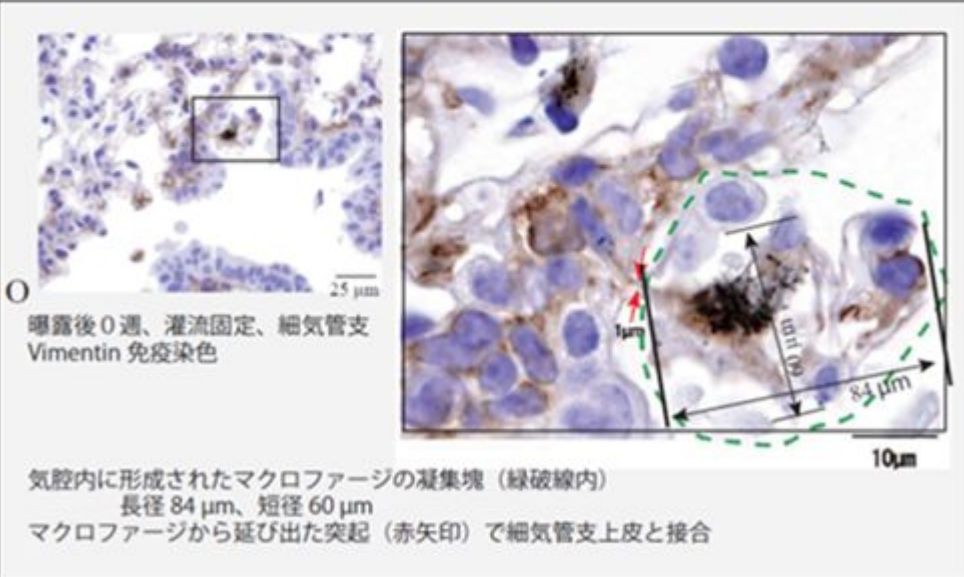
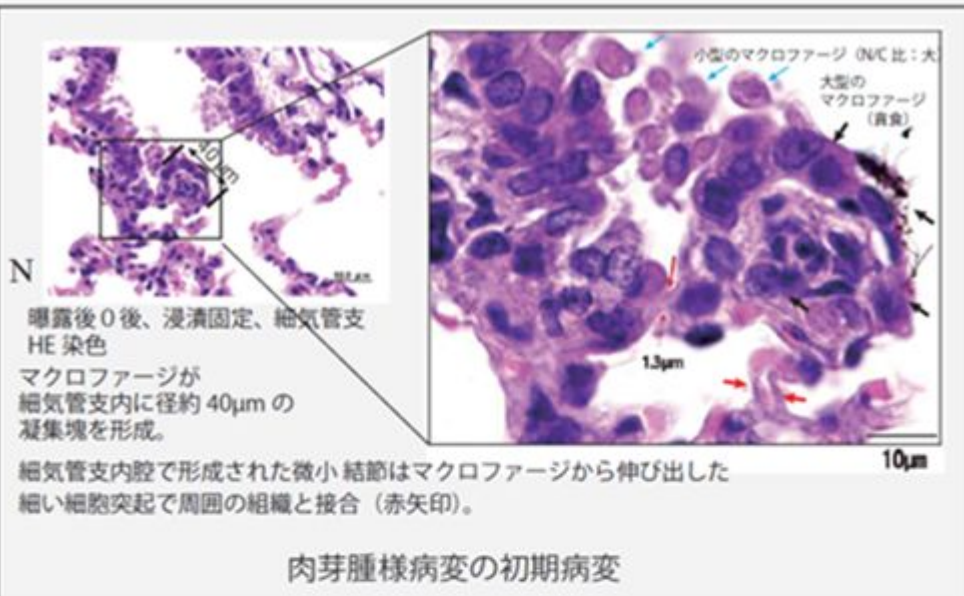
図 6-2 病理組織：MWNT-7





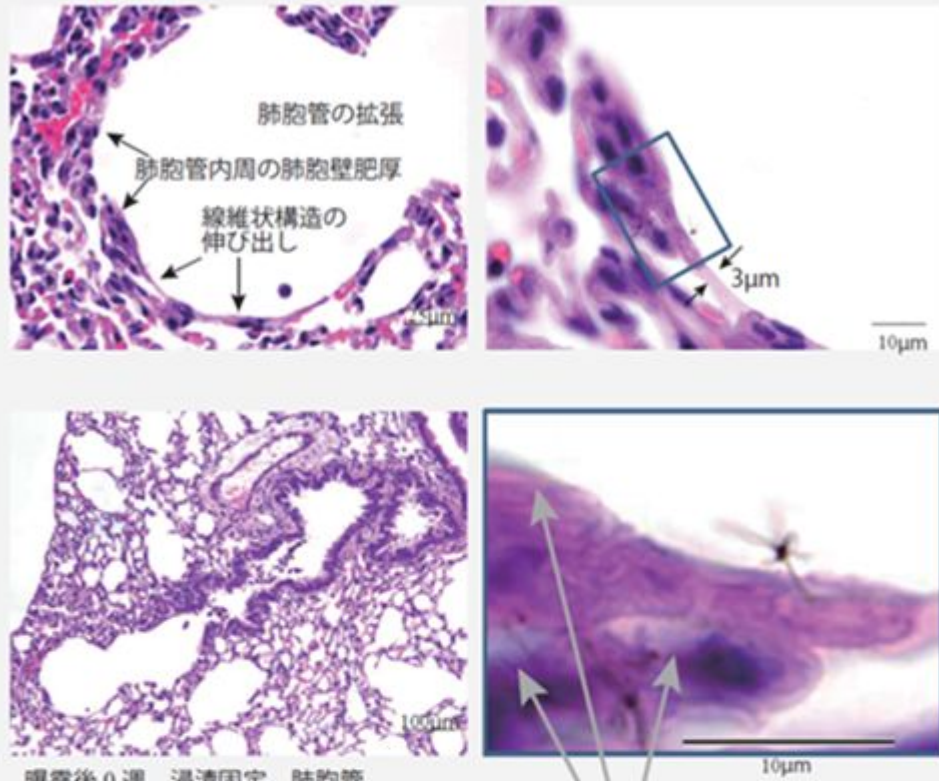
肺胞マクロファージの増生による細気管支内腔の架橋

図 6-2 病理組織: MWNT-7



細気管支終末部での肉芽腫性病変の形成

図 6-2 病理組織：MWNT-7



P 曝露後 0 週、浸漬固定、肺胞管

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

肺胞管の拡張、肺胞に淡灰色不定形物質 (MWNT-7) の沈着

図 6-2 病理組織：MWNT-7

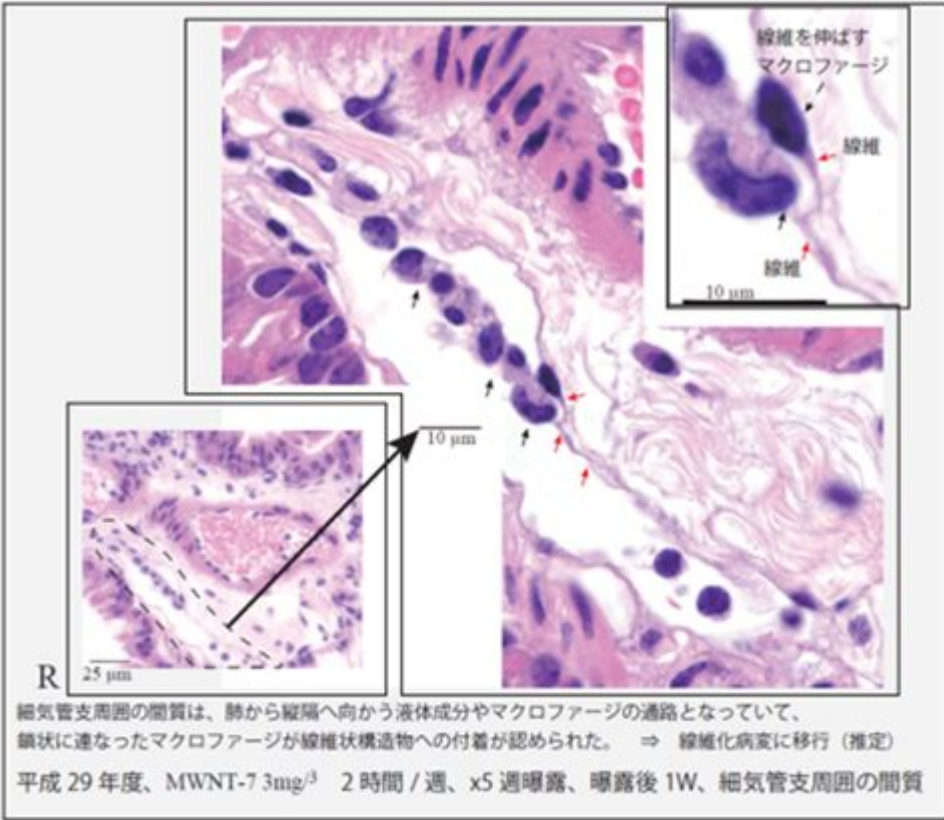
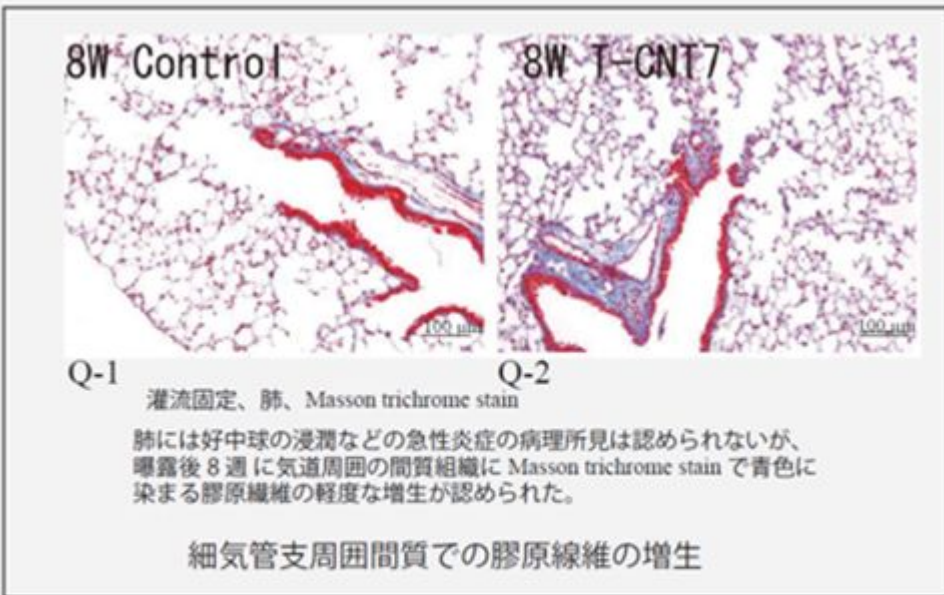


図 6-2 病理組織：MWNT-7

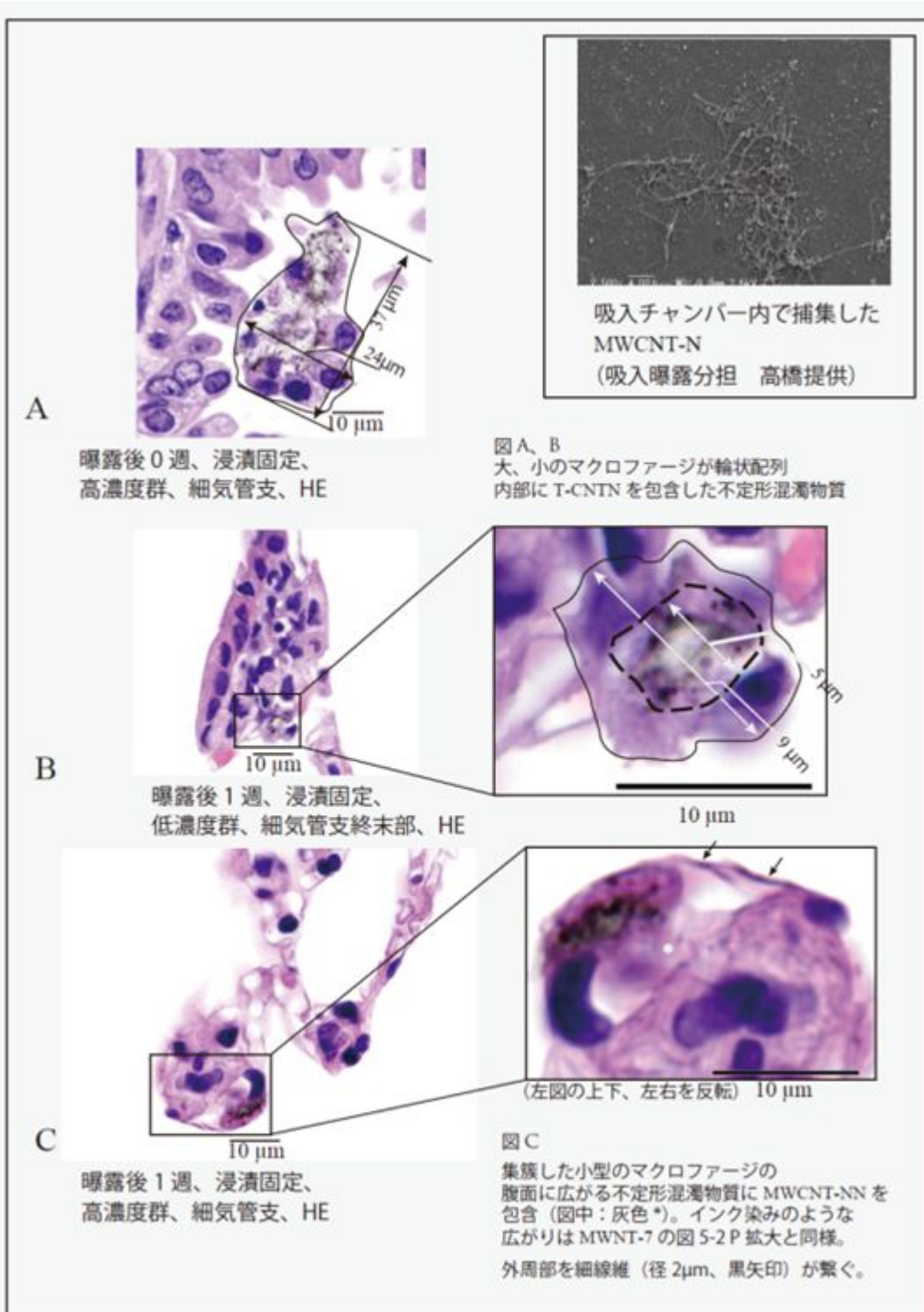
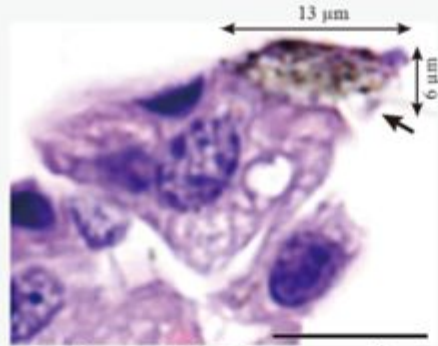
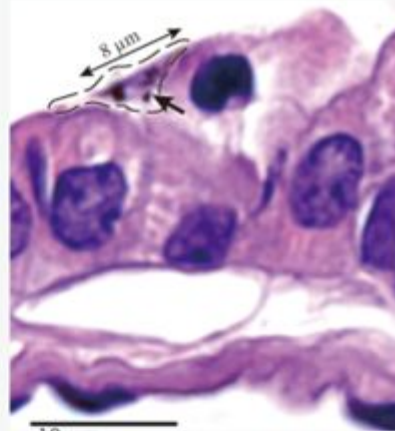


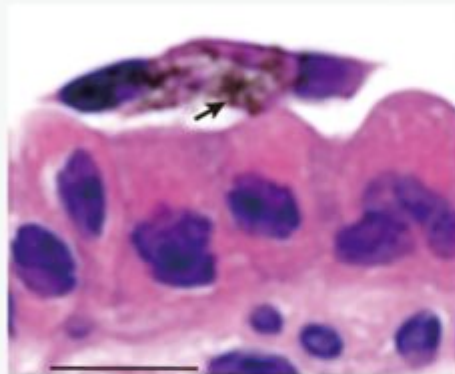
図 6-3 病理組織：MWCNT-N



D 曝露後0週、浸漬固定、
高濃度群、細気管支、HE 10 μm



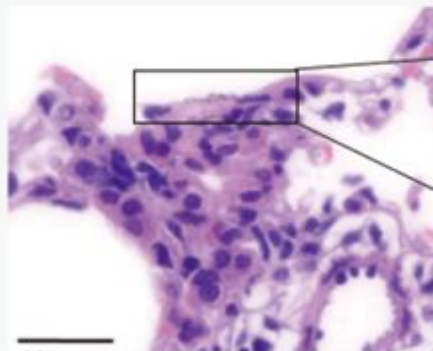
E 曝露後0週、浸漬固定、
高濃度群、細気管支、HE 10 μm



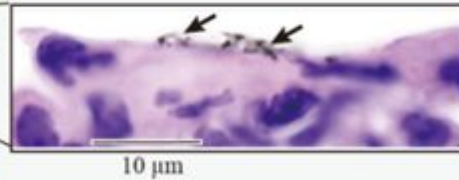
F 曝露後1週、灌流固定、
高濃度群、細気管支、HE 10 μm

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

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

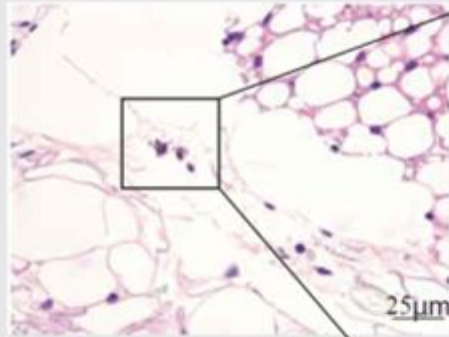


G 曝露後1週、灌流固定、
高濃度群、肺泡道 / 肺泡、HE 10 μm



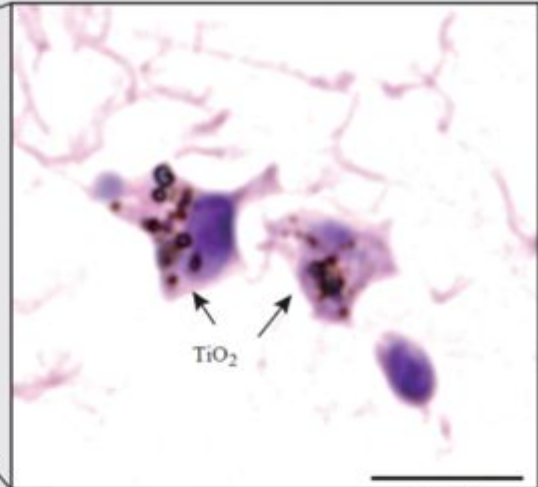
図G 黒矢印
マクロファージ集簇部の表層に多くの
MWCNT-N が沈着。

図 6-3 病理組織：MWCNT-N



A

曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE

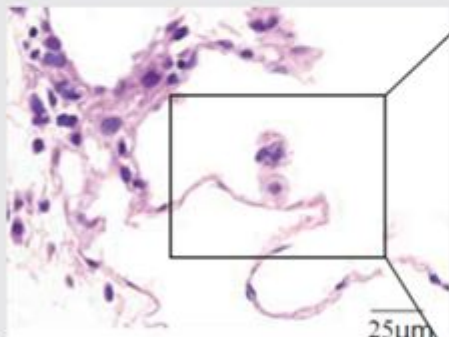


TiO₂

TiO₂

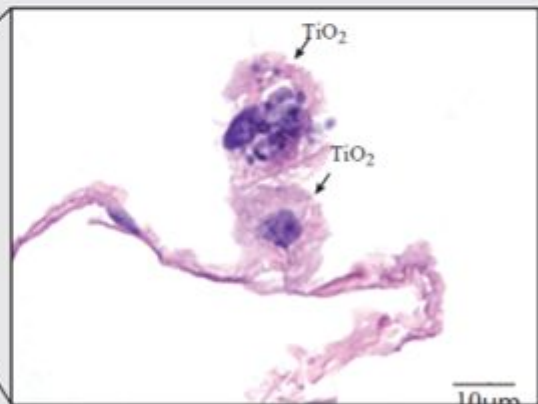
10μm

TiO₂ 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



TiO₂

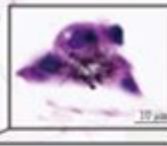
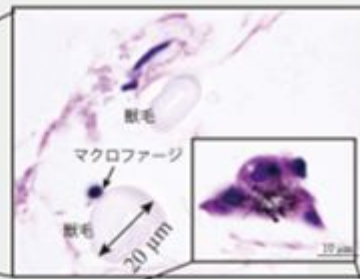
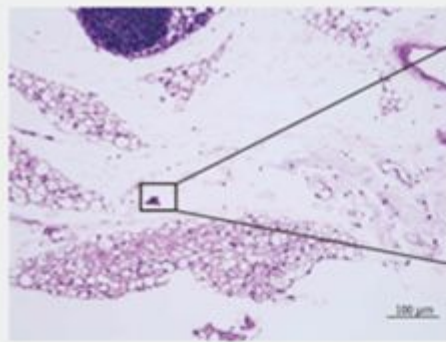
TiO₂

10μm

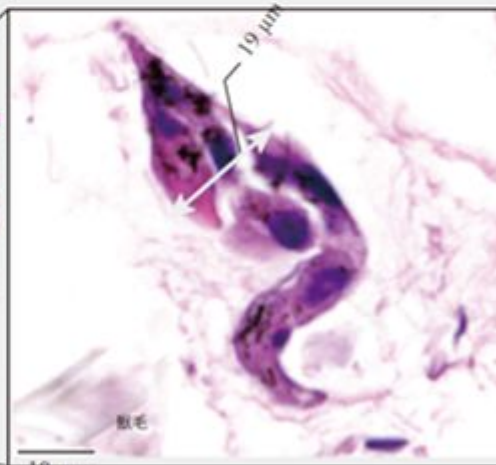
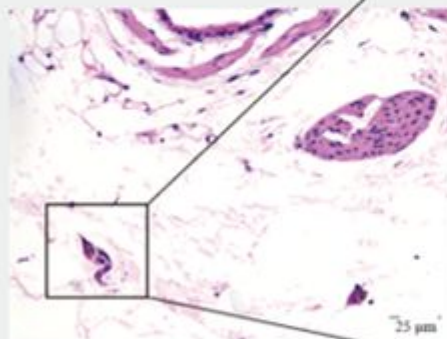
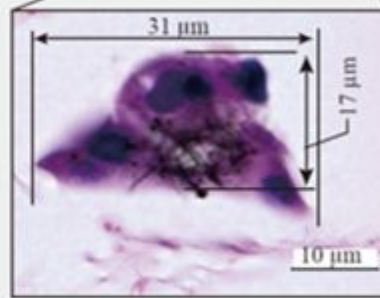
TiO₂ 貪食マクロファージが心嚢膜に付着

縦隔での沈着

図 7-1 病理組織：TiO₂



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

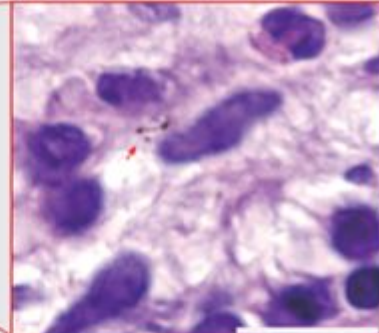
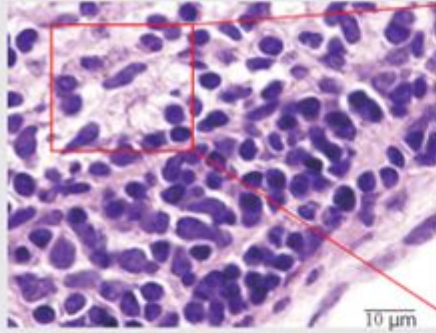


D
曝露後0週、灌流固定、縦隔、HE
MWNT-7 貪食マクロファージのクラスター

MWNT-7 貪食マクロファージが縦隔内の疎性結合組織に付着

縦隔での沈着

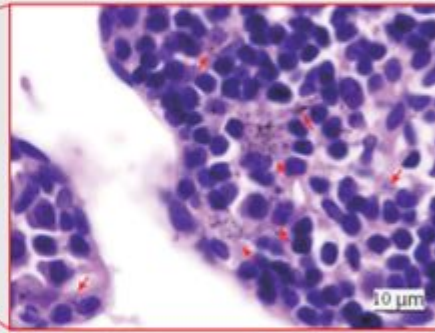
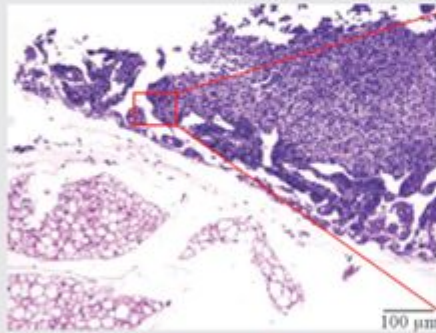
図 7-2 病理組織：MWNT-7



E 曝露後0週、灌流固定、
縦隔のリンパ節、HE

赤矢印：MWNT-7

10 μm



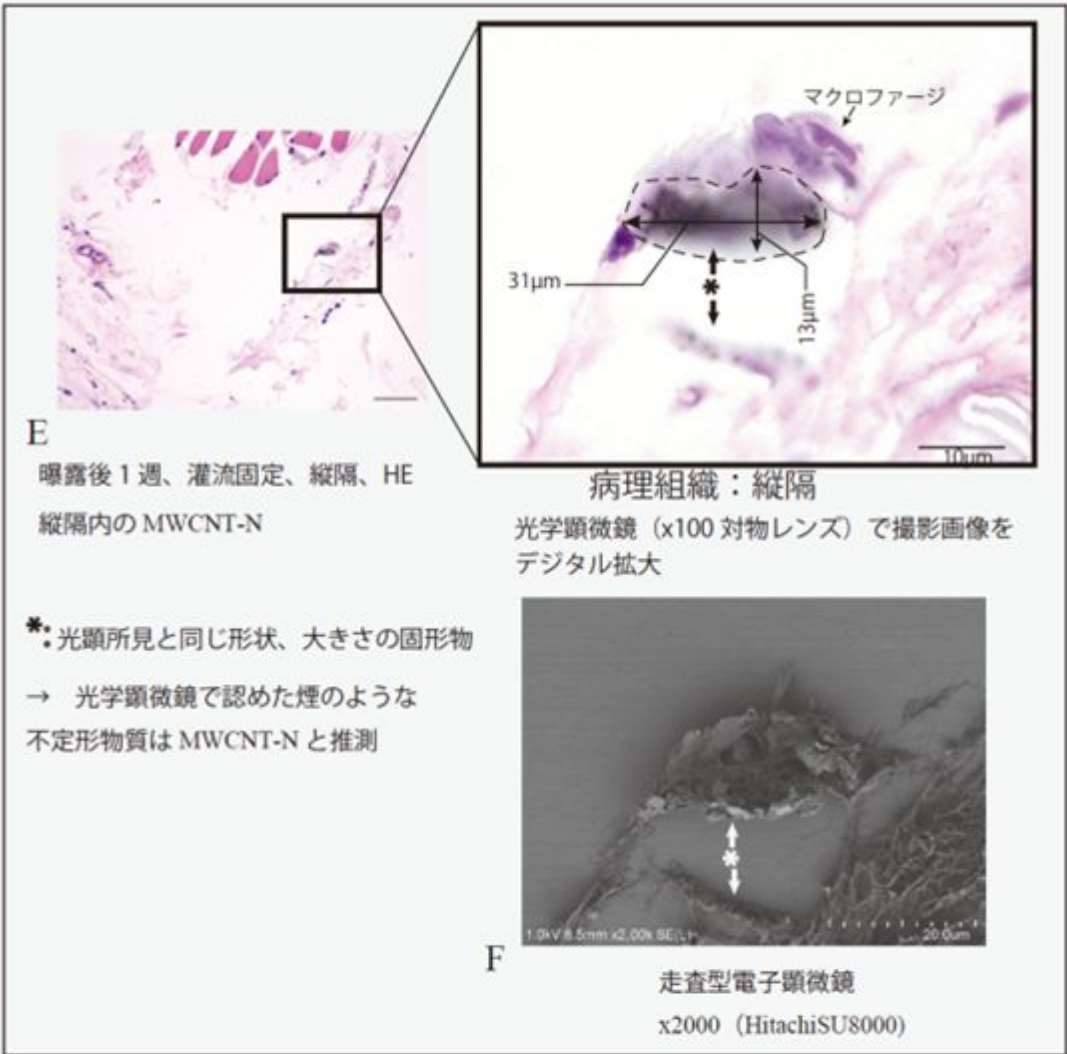
F 曝露後8週、灌流固定、
縦隔のリンパ節、HE

赤矢印：MWNT-7
細いMWNT-7が多数存在
(曝露後0週よりも増加)

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

縦隔リンパ節での沈着

図 7-2 病理組織：MWNT-7



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 7-3 病理組織：MWCNT-N

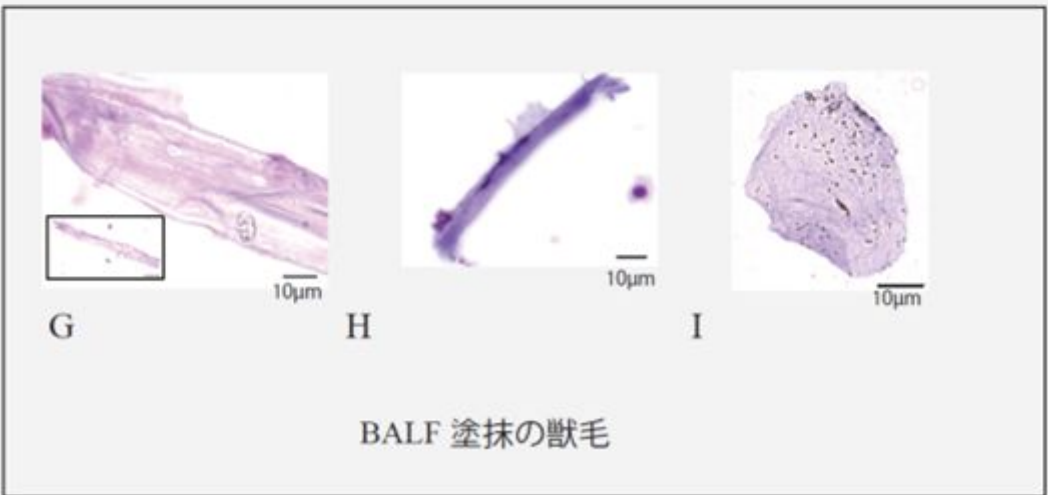
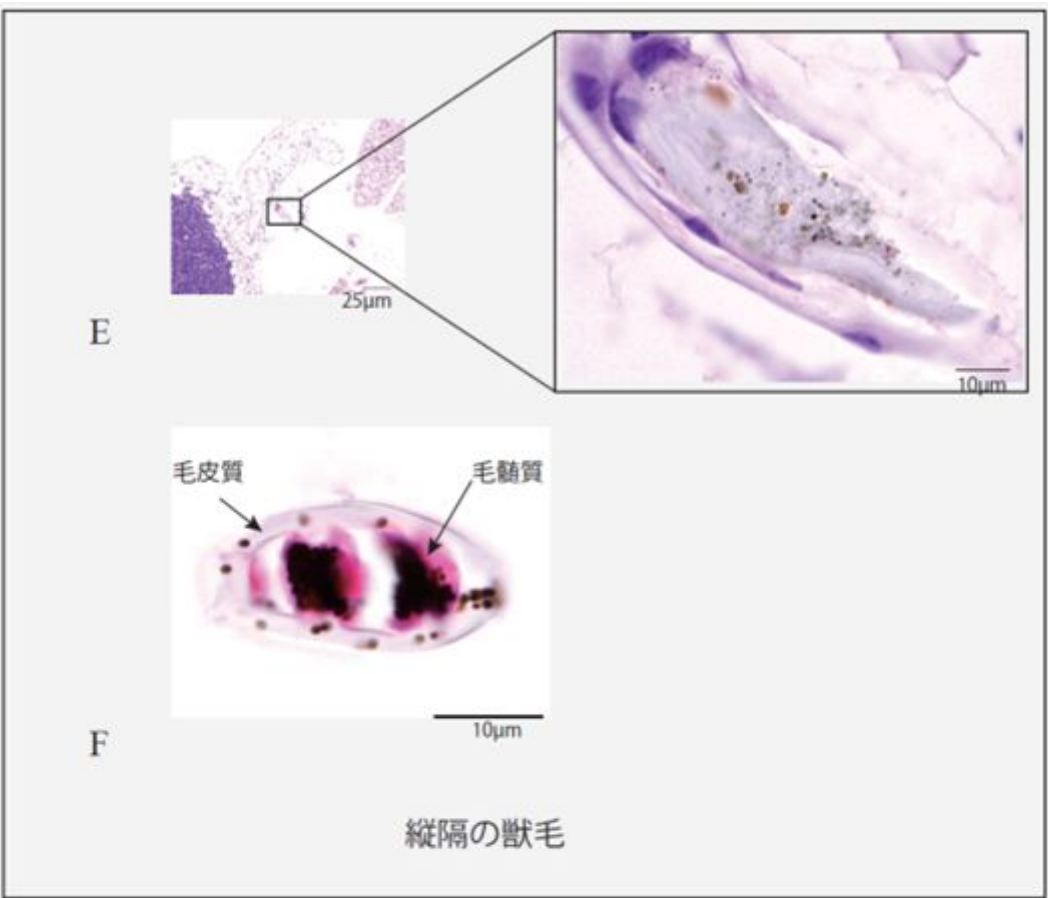


図 7-4 対照群の獣毛

平成 29-令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
分担研究報告書

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

分担研究課題: ナノマテリアルの吸入曝露実験及び組織負荷量の研究

分担研究者	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター 毒性部 室長
研究協力者	横田 理	同 主任研究官
研究協力者	高木 篤也	同 動物管理室 室長
研究協力者	菅野 純	独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長

研究要旨

本研究の目的は、工業的ナノマテリアルの非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、ナノマテリアルの肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式(長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集)と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。本分担研究では、モデルとなるナノマテリアルの全身曝露吸入実験を行い、各分担研究に生体サンプルを提供した。検体は何れも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.2.0 及び 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 おび 8 週後の定期解剖で採取した試料を各分担研究に提供した。平成 29 年度は長繊維貫通のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7(三井)を 25 μ m の金属性フィルターでろ過した検体を使用した。平成 30 年度は粒状凝集のモデルとして (AMT-600、一次粒径 30 nm TAYCA)と、MWNT-7(三井)を 53 μ m の金属性フィルターを使用することで粗大な成分の割合を多くした検体を使用した。令和元年度は毛玉状凝集のモデルとして MWCNT の一つである MWCNT-N を検体とした。MWCNT-N を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験でエアロゾル化した検体を目標濃度において安定した濃度推移で曝露することができた。MWCNT-N は目標濃度の約半分であった。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いため、吸入曝露装置内でエアロゾルの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、工業的ナノ材料の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目し生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。具体的には、肺胞マクロファージ胞体内の蓄積様式（長繊維貫通、毛玉状凝集、粒状凝集）と蓄積量を基に、Frustrated phagocytosis 誘発の程度に着目したカテゴリー評価を試みる。本分担研究は肺胞マクロファージ胞体内で蓄積様式が異なる3種類のモデルナノ材料をエアロゾル化して吸入暴露実験を行い、肺と縦隔の組織負荷量の解析、病理学的評価及び免疫機能評価の各分担研究で解析に供試する肺、縦隔等の生体サンプルの提供を目的とした。

B. 研究方法

年次計画として、平成 29 年度はマクロファージ胞体内に取り込まれたマクロファージの3種の蓄積様式のうち、「長繊維貫通型」のモデルとして多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の一つである MWNT-7 (MITSUI & Co.,LTD.) を選択した。MWNT-7 は、先行研究において開発した Taquann 法により 25 μm のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行った。

平成 30 年度は「粒状凝集」のモデルとして二酸化チタン (AMT-600、TAYCA CO.,LTD.) と、凝集成分が多いと想定される MWNT-7 を 53 μm のメッシュで濾過した検体を使用した。

令和元年度は、毛玉状凝集のモデルとして MWCNT のひとつである MWCNT-N を検体とした。検体は、Taquann 法により 53 μm のメッシュを用いて濾過し高分散処理を行い、カートリッジ直噴式全身曝露吸入装置 (Taquann 直噴式全身曝露吸入装置 ver.3.0) を用いて吸入曝露を行った。動物は、C57BL/NcrSlc 雄性 12 週齢を使用し、目標濃度は低濃度群 1 mg/m^3 、高濃度群 3 mg/m^3

設定し、2hr/day/week、5 週間（合計 10 時間）の全身曝露吸入を行い、曝露終了直後、1 週後、4 週後及び 8 週後に定期解剖を行ってサンプリングして病理組織学的評価、免疫機能評価用に供した。

B-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

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

粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要なファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は上部気道で効果的に除去される。一方、ナノ材料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 MWNT-7 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。先行研究において、凝集成分による影響が少なく、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 1)。

(1) 二酸化チタン

二酸化チタンは AMT-600 を使用した。

結晶形 アナターズ
 TiO₂ 含量 98%
 一次粒径 30 nm
 pH 弱酸性
 比表面積 52 m²/g
 (テイカ株式会社のウェブサイトの情報)

二酸化チタンは、ガラス製メディウム瓶内で TB と混合し 1 mg/mL の懸濁液とした。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発振周波数 34kHz) に 15 分静置して分散処理を行い、金属製フィルター(セイシン企業、目開き 25 μm)で濾過した。濾液を液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて乾燥検体を得た。以下、Taquann 法処理を行った二酸化チタンを T TiO₂ と表記する。

(2)MWNT-7

多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 を使用した。Taquann 法処理の際に使用する金属製フィルターの目開きを変えることで、粒子の粗さが異なる 2 種類の検体を調製した。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)
 長さ 1-19 μm (> 5 μm 27.5%)
 繊維数 3.55×10¹¹ 本/g
 形状 繭状凝集体を含む単離繊維
 化学組成 炭素純度 99.5%以上
 鉄:3500 ppm
 硫黄:470 ppm
 塩素:20 ppm
 フッ素:<5 ppm
 臭素:<40 ppm
 (東京都健康安全研究センターによる測定値)

MWNT-7 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力

40W、発振周波数 34kHz) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 53 μm) で濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプにより減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

MWNT-7 の吸入曝露実験は平成 29 と 30 年度に実施した。平成 29 年度では、目開き 25 μm の金属製フィルターを用い、より凝集状成分の少ない分散性の高い検体を得た。平成 30 年度は、目開き 53 μm の金属製フィルターを用い、凝集成分を多く含む比較的粗い粒子を含む検体を調製した。以下、目開き 25 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#25、目開き 53 μm 金属フィルターで Taquann 法処理を行った MWNT-7 を T-CNT7#53 と表記した。T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状については、予備試験において、曝露チャンバー内のエアロゾルをアルミナフィルター(ワットマン、孔径 0.02 μm、25mm, Anodisc) に吸着させてサンプリングし、オスミウムコーター(HPC-1 SW 型、真空デバイス)により 5 秒間オスミウムコートを行い走査型電子顕微鏡(VE-9800、KEYENCE)で 2,500 倍、加速電圧 2~2.8kV の条件で観察した。

(3)MWCNT-N

MWCNT-NはNIKKISO Co., LTD.で生産されていたMWCNTである。MWNT-7に比較して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(TB)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 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 で一晩凍結した。約 60 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。

B-2.マウス全身曝露吸入実験

(1)動物

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

(2)飼育条件

飼育ケージは、ポリカーボネイト製のアウトターケージと PET 製インナーケージを使用した。紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 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 ± 1 、湿度; $55 \pm 5\%$ 、換気回数; 約 20 回/h、照明時間; 8 時 ~ 20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

ケージ内の環境を改善する目的で、シェファード

シャック (Shepherd Specialty Papers 社) をケージ内に設置した。

(3)群構成

平成 29 年度物質の MWNT-7 (T-CNT7) は、対照群、T-CNT7#25 の低濃度と高濃度群の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。低濃度と高濃度群の目標濃度をそれぞれ 1 mg/m^3 、 3 mg/m^3 に設定した。各群 48 匹のマウスを使用し、病理組織用に 16 匹、組織沈着量測定用に 12 匹、免疫機能実験用に 20 匹を割り当てた。

平成 30 年度物質の TiO_2 (T-TiO₂) と MWNT-7 (T-CNT7) は、対照群、T-TiO₂、T-CNT7#53 の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。T-TiO₂ と T-CNT7#53 の目標濃度をそれぞれ 30 mg/m^3 と 1 mg/m^3 に設定した。各群 48 匹のマウスを、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。

令和元年度物質の MWCNT-N (T-CNTN) は、対照群、T-CNTN の低濃度と高濃度群の 3 群構成で吸入曝露実験を実施した。低濃度と高濃度群の目標濃度をそれぞれ 1 mg/m^3 、 3 mg/m^3 に設定した。各群 48 匹のマウスを、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。

各吸入曝露実験は曝露チャンバーに収容できるマウスの匹数が 25 匹であることから、各群を 25 匹のサブグループ (Sub-group A, Sub-group B) に分け、1 日 2 時間 (10:00 ~ 12:00) の週 1 回の吸入曝露を 5 週間反復し、合計 10 時間の曝露を行った (表 1)。

(4)ダスト発生装置

検体のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 及び 3.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社) (図 2)。平成 29 年度は Ver2.0 を使用し MWNT-7 (T-CNT7#25) の実験を行った。国立医薬品食品衛生研究所の川崎市への移転に伴い、平成 30 年度に Ver3.0 を用いて TiO_2 (T-TiO₂) と MWNT-7 (T-CNT#53) 及び MWCNT-N (T-CNTN) の実験を行った。基本的

なダスト発生原理は同一であるため、以下、Ver3.0 について記載する。この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジはインナーカートリッジとアウターカートリッジから構成される。検体を収容するインナーカートリッジ(容量:25 mL、内寸:直径 20 mm 高さ 80 mm)はステンレス製であり、これを樹脂製のアウターカートリッジに収容して使用する。カートリッジのキャップ部には圧縮空気を注入するセンターノズルと、エアロゾル噴出孔が設計されている(図 3)。

カートリッジへの検体の充填は、T-TiO₂ では 1mg/mL の懸濁液 13mL、MWCNT では低濃度群は 0.025 mg/mL の懸濁液、高濃度群では 0.05 mg/mL の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達成した。

噴射装置は、サブチャンバー(容量:43 L)に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから側方に煙突状のダクトを設け、その先端部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターが接続されている。煙突部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ曝露チャンバーに導く構造となっている。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.4 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 3 回の噴射を行った。曝露チャンバーの総換気流量は 32.5 L/min (基礎換気流量; 29.5 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC); 1.5 L/min、質量濃度測定; 1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、曝露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ 4 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2 時間の吸入曝露実験において、合計 30 本のカー

トリッジを使用した。なお、Ver.2.5 までは手動にてカートリッジの交換、噴射を行っていたが、Ver3.0 からは完全自動化されている。

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

(5) 曝露チャンバー

動物を収容し検体を曝露する曝露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを、Ver3.0 用に改変したものを使用した。(共同開発 柴田科学株式会社、特許所得済)。動物は、メインチャンバー内に設置した円筒形ステンレス金網製のケージに個別に収容、マウスを最大 25 匹収容可能である。曝露チャンバーはアクリル製のアウターチャンバーと PET 樹脂で作製したインナーチャンバー(直径 660 mm、高さ 477 mm)の二重構造となっており、検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている。メインチャンバーの気積 179 L で、上部は円錐状となって噴射装置から続くサブチャンバーに接続されている。

(6) 曝露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

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

相対濃度測定は、対応濃度 3×10⁵ 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 1×10³ 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 では 10 倍希釈して CPC による測定を行った。CPC の測定原理では、理論上、測定セル内で一つの粒子だけを検出する構造となっているが、MWCNT のように繊維径は 100 nm 程度であるが、繊維長は 10 μm を超える粒子が含まれているため、測定セル内で繊維が重なり、過小評価されると想定される。

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

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 ϕ 55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂バインダ - ガラス繊維フィルター (Model TX40HI20-WW、 ϕ 55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm): 99.9%、東京ダイレック) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学) に接続して 1.5 L/min の流量で曝露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min \times 120min = 180 L から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。

(7) エアロゾルの粒度分布

エアロゾルの粒度分布は、二つの方法で実施した。一つは、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 TiO₂ では 10 分、MWCNT では 20 分とした。各分級ステージには専用のアルミホイルにシリコンオイルを塗布し

たものを装着し検体を回収した。尚、シリコンオイル塗布アルミホイルは、使用前に 50 のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。マイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用してアルミホイルの質量を、MOUDI 装着前と、MWCNT 回収後に測定し、その差分を検体質量とした。

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

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

(8) 解剖

肺組織のサンプリングのため、曝露終了直後 (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（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)TiO₂(T-TiO₂)の吸入曝露実験

T-TiO₂の5日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度（Sub-Group A×5回、Sub-Group B×5回、計10回）は34.8±3.1 mg/m³（平均値±SD）であった。平均CPCカウント（同10回）は560,817±56,441/cm³（平均値±SD）であった（図4、図5）。

MMADは893～1,060nm（σg:3.5～4.2）であり、全体の平均（5回）は、975.3 nmであった（図5、表2）。SMPSの測定では、1回の吸入曝露実験で約30のデータが生成され、合計150程度のデータが得られたが、ほとんど同様の値を示していた。代表例として、Sub-Group Bの三回目のデータを示した（図5）。粒子径の中央値は149.4 nm、平均値は177.6 nmであった。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量は、390 mgである。2時間の曝露チャンバーの総換気量は3.9 m³であることから名目上の濃度は100 mg/m³と計算される。実際に測定し

た濃度の平均は34.8 mg/m³から、エアロゾル化効率を計算すると34.8%であった。

(2)MWNT-7(T-CNT7)の吸入曝露実験

T-CNT7#25の5日間反復全身曝露吸入実験における平均質量濃度（平均値±SD）は、低用量群、高用量群それぞれ1.4±0.1 mg/m³、3.2±0.3 mg/m³であった。平均CPCカウント（平均値±SD）はそれぞれ、960±80/cm³、2340±238/cm³であった。実験期間を通して、目標濃度を達成し、安定した濃度推移が得られた（表2）。

T-CNT7#53の5日間反復全身曝露吸入実験における全体の平均質量濃度（Sub-Group A×5回、Sub-Group B×5回、計10回）は3.0±0.1 mg/m³であった。平均CPCカウント（同10回）は1,449±155/cm³であった（図8）。MMADは522～1,114 nm（σg:5.3～7.9）であり、5回の平均は、788.2 nmであった（図7、表2）。

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

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

合であった(図8)。

(3) 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 $0.6 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、 $1.3 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ 、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。MMADは低濃度群、高濃度群それぞれ $640 \sim 3,708\text{nm}$ ($\sigma_g:8.6 \sim 34.0$)、 $1,617 \sim 3,474 \text{ nm}$ ($\sigma_g:11.5 \sim 26.7$)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9、図10、表2)。

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(図11、12)。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。

(5) 剖検所見

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

D. 考察

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

Taquann法では、大型の凝集体を除去するため金属製フィルターにて濾過する工程がある。Taquann法の開発における先行研究では、目開き $25 \mu\text{m}$ のフィルターを用いてきたが、より荒い検体を得る事を目的として目開き $53 \mu\text{m}$ のフィルターを使用した。実際にエアロゾル化した粒子の形状を観察した結果、T-CNT7には粗大成

分として、共有結合した状態の凝固体(Aggregates)と複数の線維が絡まった凝集体(Agglomerates)が存在し、その比率はT-CNT7#25とT-CNT7#53ともに同じであったが、それぞれの単位面積当たりの個数はT-CNT7#25よりもT-CNT7#53の方が多いことが示された。粗大成分の増加によって末梢域まで入る凝集成分も増えるとしたら肺病変の形成にT-CNT7#25とT-CNT7#53は異なった影響を示す可能性が考えられた。

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動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となった。

酸化チタンに関しては、Ver2.5 でのエアロゾル化効率は 35%程度であり、Ver3.0 での向上は見られなかった。その理由の一つは、酸化チタンは MWCNT に比較して金属面に付着しやすく、また微細な粒子であるため、加圧によって凝集しやすいことがあげられる。全ての検体に上方から均等に加圧空気が吹き付けられると、インナーカートリッジの中心に位置する検体はインナーカートリッジの底面に押し付けられることによって凝集し残存する可能性が考えられる。実際に、インナーカートリッジの底部に酸化チタンの残存がみられた。この点については乱流が生じるように圧縮空気の吹き出し口を非対称に加工することで改善できるかもしれない。もう一つの理由は、粒子の比重が大きいため、沈降速度が速く、サブチャンバー内でトラップされる割合が多い可能性がある。実際に、サブチャンバーの内面には多く検体が付着している様子がうかがえた。この粒子は、比較的、粒径が大きいと想定されることから、本研究の目的とする高分散検体を動物に曝露するという目的は達成されていると考えられる。

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

MWCNT-N に関しては、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を得られ、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、繊維径が細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り再凝集していることが想定された。MWCNT-N は繊維径が細く柔らかいため、Taquann 法処理における金属製フィルターにも絡まりやすく、濾過効率は低い。

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 を除き、5 日間の反復全身曝露吸入実験を、目標濃度においてエアロゾル化した検体を安定した濃度推移で曝露することができた。しかしながら、MWCNT-N は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、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計画解剖・採材を行い、病理組織評価、免疫機能評価及び肺負荷量測定の各分担研究に供した。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた辻昌貴氏、森田紘一氏、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

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

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

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, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno.: A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of

Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018, Poster

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

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

○ 高橋祐次: ナノ材料の安全性確保に関する生物試験の現状と課題、第58回澱粉研究懇談会、招待講演、2018年6月8日(静岡県伊東市)

○ 高橋祐次、トキシコロジスト・ブラッシュアップセミナー: 肺・呼吸器の毒性変化を考えるナノマテリアルの毒性: 肺毒性を中心として、第19回日本毒性学会生涯教育講習会、2018年7月17日(大阪)

○ 高橋祐次、相磯成敏、大西誠、石丸直澄、菅野純: マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回

日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018年7月
18日(大阪)

○ 菅野 純: ナノマテリアルの吸入曝露による発
がん性研究、第45回日本毒性学会学術年会、シン
ポジウム、2018年7月18日(大阪)

○ 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年12月3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

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

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

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

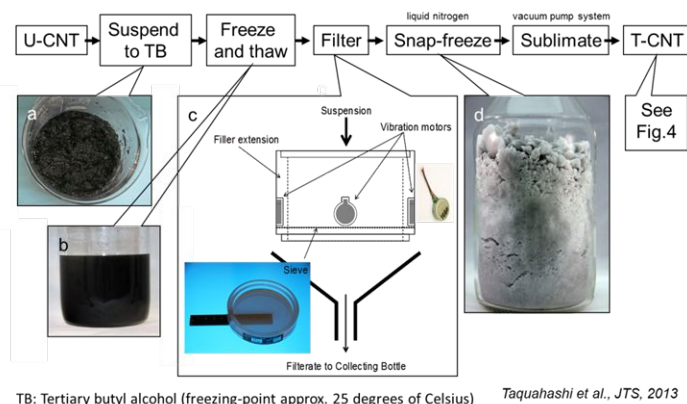


図 1 Taquann 法の概要

(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 で一晩凍結したのち再融解を行う。(c) 金属製フィルター (セイシン企業) で濾過し大型の凝集体を除く。濾過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量: 17.6 m/s²) をリムに 4 個装着し、フィルターを振動させる。(d) 濾液は直ちに液体窒素で凍結・固化し固相のまま溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る。
 Taquahashi et al., JTS, 2013;38 (4) :619-28

表 1 群構成

Examinations	N	Necropsy after inhalation exposure			
		Day 0	1W	4W	8W
• Lung Burden	12	3	3	3	3
• Histopathology(perfusion)	12	3	3	3	3
• Immune function					
BALF	24	6	6	6	6
Pulmonary interstitium mRNA					
Spleen, Lymph node					
48		Divided into two sub-groups, A&B			

Target concentration

- T-TiO₂ 30 mg/m³
- T-CNT7#25 Low concentration 1 mg/m³, High concentration 3 mg/m³
- T-CNT7#53 High concentration 3 mg/m³
- MWCNT-N Low concentration 1 mg/m³, High concentration 3 mg/m³
- Control Clean air (Filtered with HEPA filter)

Exposure

2hr/day/week for 5 weeks (Total 10 hours)

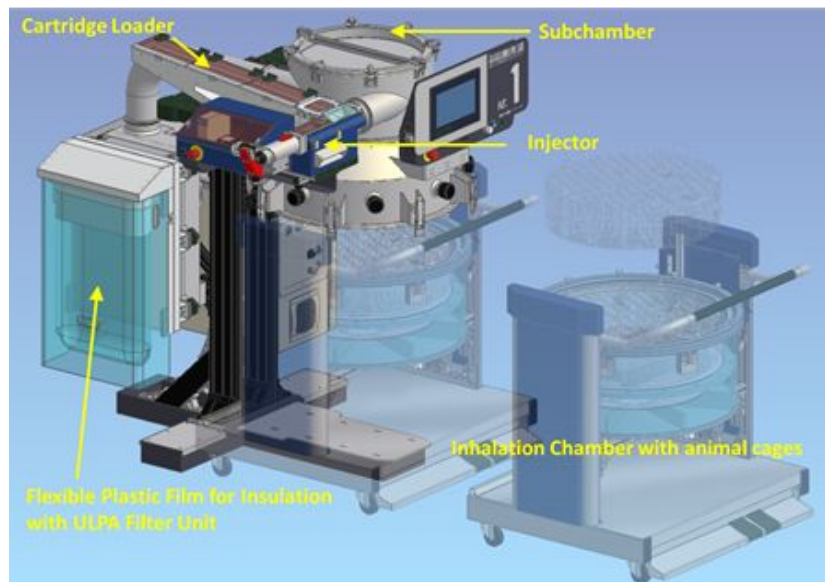


図 2 Taquann 直噴全身曝露吸入装置の模式図 (Ver 3.0)

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 3 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。

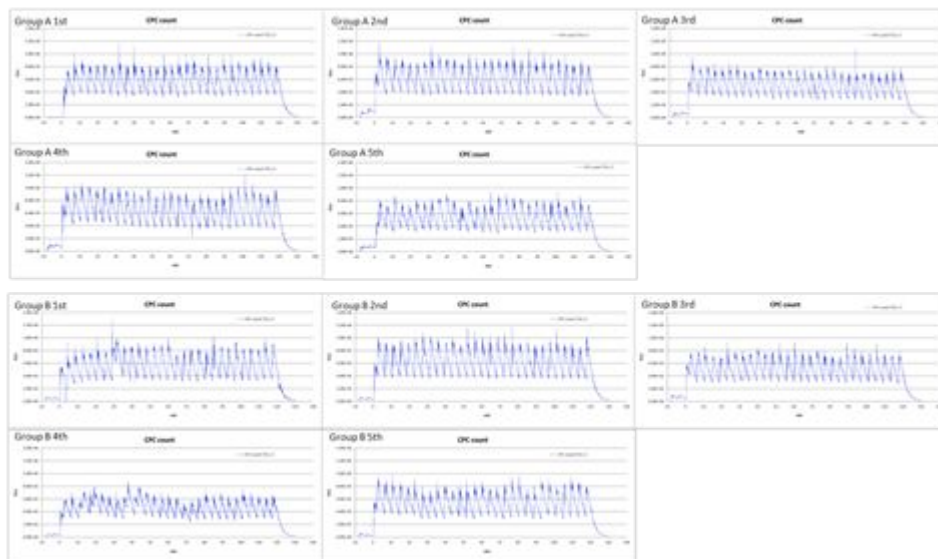


図4 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化

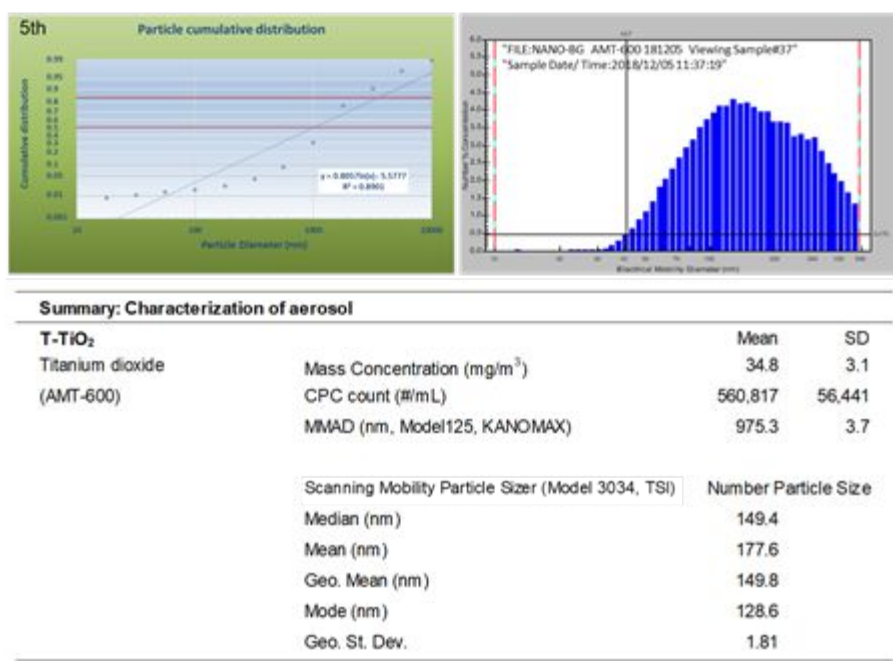


図5 T-TiO₂の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

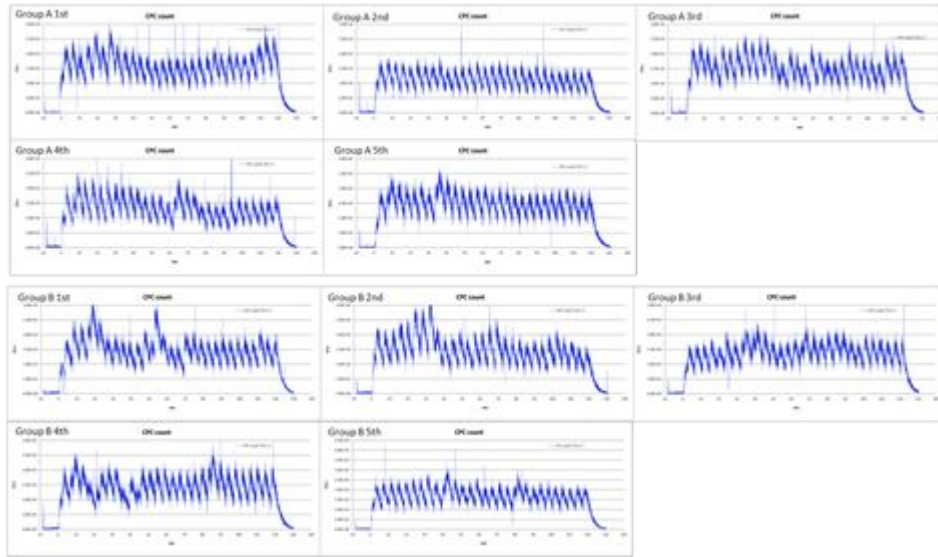
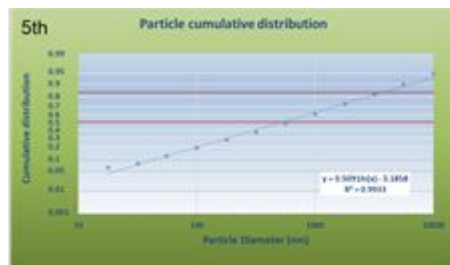


図6 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるCPCカウントの経時的変化



Summary: Characterization of aerosol			
T-CNT7#53		Mean	SD
MWCNT	Mass Concentration (mg/m ³)	3.0	0.1
(MWN7-7 53 μm Mesh Filtered)	CPC count (#/mL, Model3776, TSI)	1,449	155
	MMAD (nm, Model125, KANOMAX)	788.2	7.0

図7 T-CNT7#53の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

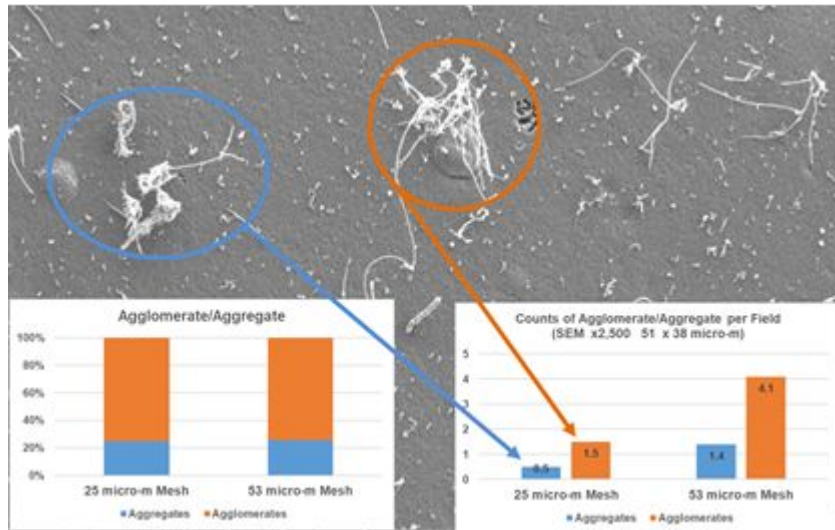


図8 T-CNT7#25 と T-CNT7#53 のエアロゾルの性状比較

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

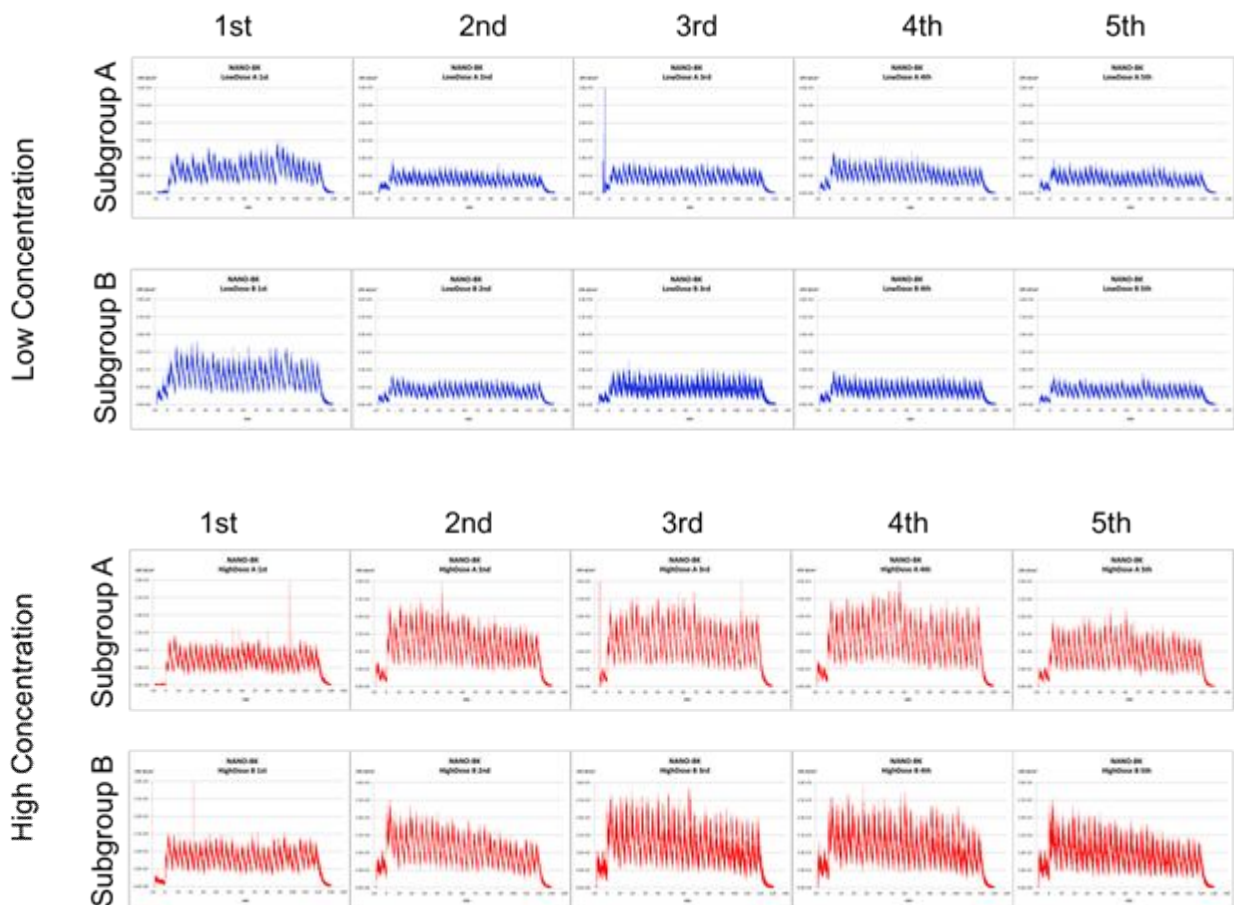
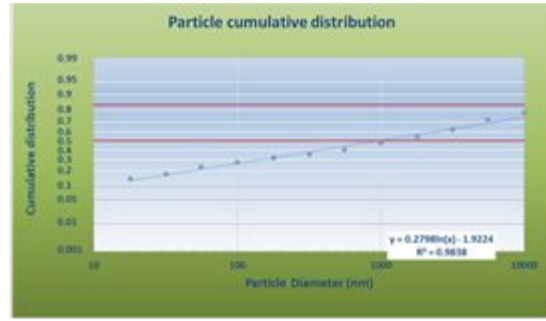
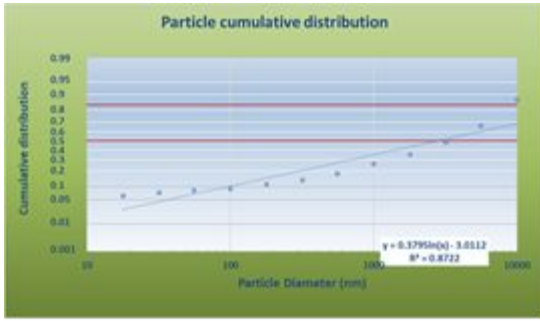


図9 MWCNT-N の吸入曝露実験における CPC カウントの経時的変化



Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
467	1564	2792	13.935

Total Mass (ug)	Concentration (ug/m3)	MMAD (nm)	Deviation (σg)
481	1610	964	35.649

		1st	2nd	3rd	4th	5th	Average	SD
Low Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	0.5	0.7	0.8	0.7	0.5	0.6	0.1
	CPC Average(0-120min, #/cm ³)	747	364	511	496	399	503	150
	MMAD (nm)	964	964	1,685	640	3,708	1,592	1,243
High Dose	Mass Concentration (mg/m ³)	1.3	1.5	1.4	1.2	0.9	1.3	0.2
	CPC Average(0-120min, #/cm ³)	787	1157	1332	1336	923	1,107	246
	MMAD(nm)		1,617	2,504	2,792	3,474	2,597	770

図 10 MWCNT-N の吸入曝露実験におけるエアロゾル特性

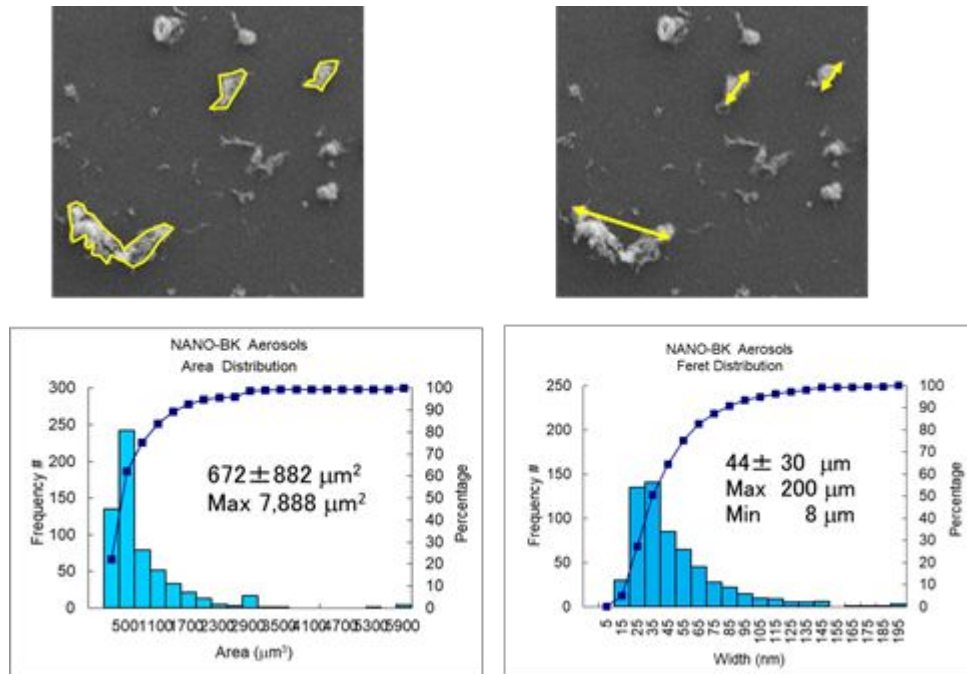


図 11 MWCNT-N のエアロゾル形状 (凝集成分)

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。

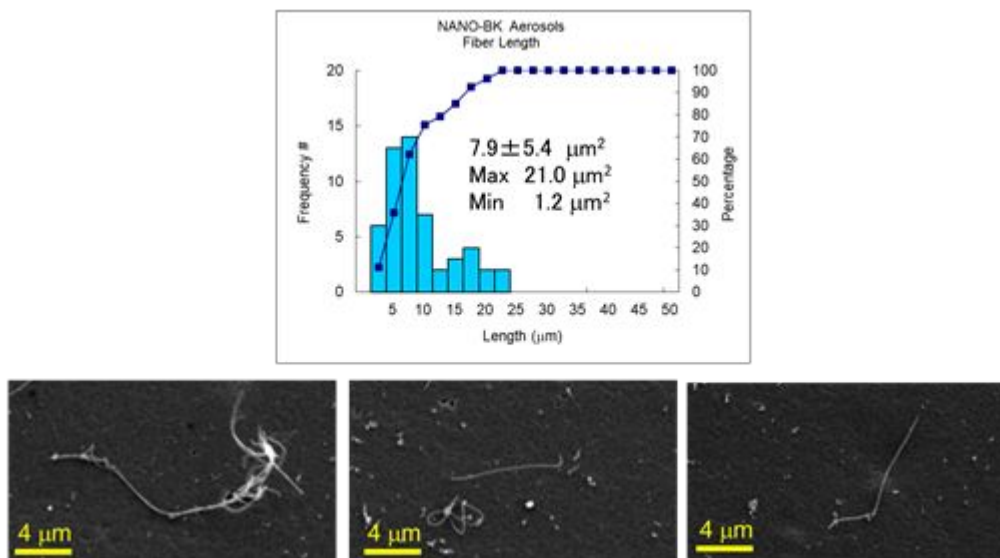


図 12 MWCNT-N のエアロゾル形状（繊維状成分）

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。

表 2 H29-R1 に実施した吸入曝露実験のエアロゾル特性のまとめ

Year	Test Substances	Mass Concentration (mg/m ³)	CPC ¹⁾ (count per minutes)	MMAD ²⁾ (nm)
H29	MWNT-7 (T-CNT7#25,Low dose)	1.4	960	NA ³⁾
	MWNT-7 (T-CNT7#25,High dose)	3.2	2,340	NA
H30	TiO ₂ (T-TiO ₂)	34.8	560,817	975.3
	MWNT-7 (T-CNTN7#53,High dose)	3.0	1,449	788.2
R1	MWCNT-N (T-CNT,Low dose)	0.6	503	1,592
	MWCNT-N (T-CNT,High dose)	1.3	1,107	2,597

1): Condensation Particle Counter; 2): Mass Median Aerodynamic Diameter
3): Not Avail

平成 29 ~ 令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
分担研究報告書

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

分担研究課題: 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によって、モデルナノマテリアルによる肺負荷量とクリアランスの違いを調べた。研究班として、モデルナノマテリアルに「細胞質貫通型*」として多層カーボンナノチューブの MWNT-7、「粒状凝集型*」として二酸化チタンの AMT600、「毛玉状凝集型*」として多層カーボンナノチューブの MWCNT-N を選定し、それぞれ分散処理を行ったものをエアロゾル化して吸入曝露を行い、肺負荷量、免疫機能評価、病理学的評価の各分担研究に肺のサンプルを提供した(分担 高橋)。初年度に MWNT-7 を検体とした吸入曝露実験をおこなったが、曝露終了時の肺負荷量が十分でなかった。このため、中間年度に MWNT-7 (再実験) と二酸化チタン、最終年度に MWCNT-N を検体とした吸入曝露実験を実施した。それによって得た肺のサンプルを用いて検体の肺負荷量の推移を比較解析した。その結果、実施した吸入曝露条件下での肺負荷量の推移は、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、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。TiO₂ 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。

(*)「貫通」とは、繊維が比較的太く強直であり M ϕ の細胞径よりも長い場合、M ϕ 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、M ϕ 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まり絡まり、毛玉状に凝集する状況を指す。

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し、3 つのタイプのモデルナノマテリアルとして選定した TiO₂(T-TiO₂)、MWNT-7(T-CNT7)、MWCNT-N(T-CNTN)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

平成 29 年度から 3 年間、毎年 1 物質ずつモデルナノマテリアルのマウスを用いた吸入曝露実験（分担 高橋）を行い検体の肺内沈着量を測定、肺負荷量のデータを収集した（図 1A,B,C）。

平成 30 と令和元年度には縦隔の沈着量も併せて測定した。

B-1：測定対象物質の各年度計画

H29 年度吸入曝露実験： MWNT-7

対照群、低用量群(1mg/m³)、高用量群(3mg/m³)の三群構成で曝露実験を実施し、肺負荷量を解析した。Tquann 法による分散処理の過程で 25μm の金属性フィルターでろ過した検体（以下、T-CNT7(#25)と表示）を使用（図 1A）。

この実験は曝露終了時の肺負荷量が不十分であったと判断し、翌年に高用量群の再実験を行った。

H30 年度吸入曝露実験： TiO₂、MWNT-7

対照群、TiO₂ 30mg/m³ 曝露群、MWNT-7 3mg/m³ 曝露群の 3 群構成で行い、それぞれ曝露終了後 0、1、4、8 週での解剖期に、各群 3 匹を割り当てた。MWNT-7 は Tquann 法による分散処理の過程で 53 μm の金属性フィルターを使用した再実験（以下、T-CNT7(#53)と表示）することで粗大な成分の割合を多くした検体をエアロゾル化してマウスに吸入曝露した（図 1B）。

R1 年度吸入曝露実験：MWCNT-N

対照群、MWCNT-N 低用量群(1mg/m³)、高用量群(3mg/m³)の三群構成で曝露実験を実施し、そ

れぞれ曝露終了後 0、1、4、8 週での解剖期に、各群 3 匹を割り当てた（図 1C）。

B-2：肺内沈着量の測定

多層カーボンナノチューブの MWNT-7 と MWCNT-N については 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に HPLC 測定値を代入して検体の肺内沈着量を求めた。二酸化チタンは原子吸光の測定値を検量線から求めた直線回帰式に代入して検体の肺内沈着量を求めた。

B-2-(1) 多層カーボンナノチューブの測定

（MWNT-7 と MWCNT-N に共通）

以下の手順で実施した（図 2）。

組織溶解液の調製

80 に加温した超純水 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 で加温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 検量線溶液（C1～C5、C1～C6）の調製

平成 30 年度物質の MWNT-7(T-CNT7#53)と令和元年度物質の MWCNT-N(T-CNT7N)の沈着量測定では、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-C、D; 図 3-C、D)。平成 29 年度物質の MWNT-7(T-CNT7#25)も同様に 6 段階希釈液の検量線溶液(C1～C6)を調整した(表 1-A; 図 3-A)。

) MWCNT 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。

) 検量線溶液 C5 の調製

) 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、2 mL 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。

マーカー溶液の調製

200 mL 容のメスフラスコに Benzo[ghi]perylene(BgP) マーカー約 1 mg 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 加え混合撹拌した溶液 2.5 mL を Tw-sol 50 mL に加え混合撹拌し、マーカー溶液とした。

MWCNT 組織負荷量の測定

) 肺と縦隔のサンプルの採取と溶液調整

図 1 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研究班共通の実験デザインを示した。Taquan 処理された MWCNT-N を吸入曝露したマウスの構成を対照群 (0 mg/m³) と 2 投与群 (0.6、1.3 mg/m³) とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週目 合計 60 検体) とした。曝露は 1 日に 2 時間 (10:00 ~ 12:00)

週に 1 日の曝露を 5 週間繰り返し、各群 2 時間 × 5 回の計 10 時間の吸入曝露を行った。5 回 (計 10 時間) の曝露を終了した日を day 0 (0W) とし、0W の午後 2:00 ~ 6:00 に初回の解剖、その後、1 週、4 週、8 週に各群 3 匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、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開胸し、腋窩動脈の切断により放血して安楽死させてから肺及び縦隔を摘出した。その肺は、10%ホルムアルデヒド・リン酸緩衝液で浸漬したサンプルを所属施設 (日本バイオアッセイ研究センター) に持ち帰り、組織負荷量の測定まで室温で保管した。

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に 1 か月以上浸透した試料の肺及び縦隔を 2 mL の組織溶解液 (B-2-(1)-) 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 の測定

図 2 に肺および縦隔組織中の MWCNTN 測定手順の前処理を示した。

B-2-(1)- 項で調製した各溶液 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 0.2 mL を加えタッチミキサーで 10 秒間撹拌し、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 0.2 mL 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 秒間撹拌した。その後、B-2-(1)- 項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 分間撹拌させた後、0.4 µm のフィルター (ワットマン : GE Healthcare UK Ltd) でろ過したフィルター上の MWCNT をポンチ (8 mm) でくり抜き、PP 試験管に入れ、アセトニ

トリル 1 mL を加え、タッチミキサーで 10 秒間
攪拌・抽出し、その溶液中の MWCNT を HPLC
で測定した。

HPLC の測定条件(MWNT-7 と MWCNT-N の各
測定で共通) 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 × 内径 : 1.7 μm、100 mm ×
2.1 mm

カラム温度 : 40

検出器 : 蛍光検出器 (励起波長 : 294 nm、蛍
光波長 : 410 nm)

試料注入量 : 5 μL

移動相組成 : アセトニトリル : メタノール :
蒸留水 = 75 : 20 : 5

移動相流量 : 0.5 mL/min

) 肺内及び縦隔の T-CNTN の沈着量計算方

MWCNT-N 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 : μg) 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 : μg/g) と平均値及び標準偏差を求
めた。

B-2-(2) チタン (Ti) の測定

以下の手順で実施した。

組織溶解液の調製

) チタン検量線溶液(C1 ~ C7)の調製

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

1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈した(検
量線 C5 : 0.2 μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸
水 1mL を加え 2 倍希釈した(検量線 C3 : 0.1
μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加
え 2 倍希釈した(検量線 C2 : 0.05 μg/mL)。その
溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加え 2 倍希釈し
た(検量線 C1 : 0.025 μg/mL)。さらに、チタン標
準液の 100 倍希釈液 0.3 mL に 3 %硫酸水で 9.7
mL を加え 33.3 倍希釈した(検量線 C6 : 0.3
μg/mL)。その溶液 1 mL に 3 %硫酸水 1mL を加
え 2 倍希釈した(検量線 C4 : 0.15μg/mL) (表
1-B ; 図 3-B)。

TiO₂ 肺負荷量の測定

) 肺と縦隔のサンプルの採取と溶液調整

Taquann 処理された酸化チタンを吸入曝露し
たマウスの構成を対照群(0 mg/m³)と投与群(30
mg/m³)とし、各 3 検体の曝露直後、1、4、8 週
目 合計 24 検体)とした。曝露は 1 日に 2 時間
(10:00 ~ 12:00) 週に 1 日の曝露を 5 週間繰り
返し、各群 2 時間 × 5 回の計 10 時間の吸入曝露
を行った。5 回(計 10 時間)の曝露を終了した日
を day 0 (0W) とし、0W の午後 2:00 ~ 6:00 に
初回の解剖、その後、1 週、4 週、8 週に各群 3
匹ずつをイソフルランによる吸入麻酔下で、酸化
チタンのサンプリング材料への汚染を防ぐため
局所の被毛を除去して開胸し、腋窩動脈の切断に
より放血して安楽死させてから肺及び縦隔を摘
出した。その肺及び縦隔は、冷凍保存したサンプ
ルを日本バイオアッセイ研究センター (JBRC)
に持ち帰り、組織負荷量の測定のために保管した。

なお、平成 30 年度の吸入曝露実験では
MWNT-7 (T-CNT7) 曝露群と TiO₂ (T-TiO₂) 曝
露群に共通の対照群を設置した。MWNT-7 と
TiO₂ の沈着量の測定には、それぞれ HPLC と原
子吸光で測定するため、サンプルの処理方法及び
検量線を得るためるための溶液調整の手順が異
なる。このため対照群のマウスの左肺を MWNT-7
の測定用に、右肺を TiO₂ の測定用に用いた。

B-5-2-1：チタン検量線溶液(C1～C7)の調製

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

）試料の前処理と原子吸光光度計による測定

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

原子吸光光度計による測定条件を次に示した。

測定機器：日立製作所 Z-5010 原子吸光光度計

原子化法：グラファイトアトマイザー

使用ガス：アルゴン

吸収波長：チタン；364.3nm

原子化温度：2700

試料注入法：オートサンプラー

試料注入量：10 µL

）肺内及び縦隔の MWCNT の沈着量の計算方

チタンの検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の原子吸光で測定した吸光度値を直線回帰式に代入し、チタンの測定値を求めた。酸化チタン中のチタンの含有率は 60%であることから、原子吸光で測定したチタン量から換算して酸化チタン量として計算した。この値に希釈倍率を乗じることにより、酸化チタンの個体当りの沈着量(単位：µg)と、それらの 3 匹当りの平均値及び標準偏差を求めた。また、各肺及び縦隔の重量で除することにより肺及び縦隔の g 当りの値(単位：µg/g)とそれらの平均値及び標準偏差を求めた。

C . 研究結果及び考察

C-1: 検量線

H29年度物質： T-CNT7 (#25)

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

H30年度物質： T-TiO₂

Taquann処理されたT-TiO₂の検量線を図 3-B に示した。T-TiO₂の濃度と吸光度は、相関係数0.9978であり、T-TiO₂を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、T-TiO₂は0.025～0.4 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

H30年度物質： T-CNT7 (#53)

Taquann処理されたT-CNT7 (#53) の検量線を図 3-Cに示した。T-CNT7の濃度とマーカの面積値は、相関係数0.9938であり、T-CNT7を測定するために、良好な直線性を示した。これらの

ことから、T-CNT7は0.2～1.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

R1年度物質：T-CNTN

Taquann処理されたT-CNTNの検量線を図3-Dに示した。MWCNT-Nの濃度とマーカの面積値は、相関係数0.9965であり、MWCNT-N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、MWCNT-Nは0.4～2.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

C-2: マウス肺内の肺負荷量

H29年度物質：T-CNT7 (#25)

表2-Aと図4にTaquann処理されたT-CNT7 (#25)を吸入曝露したマウス肺内負荷量の測定結果を示した。

1 mg/m³曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では6.30 µg/g、1週目では4.59 µg/g、4週目では5.42 µg/g、8週目では5.39 µg/gでやや減少傾向であった。また、3 mg/m³曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では10.15 µg/g、1週目では9.98 µg/g、4週目では10.84 µg/g、8週目では10.25 µg/gで一定に推移した。対照群(0 mg/m³)の肺でのT-CNT7 (#25)測定値は0.00µg/gであった。以上のことから、Taquann法にて分散処理を施したT-CNT7 (#25)を全身吸入装置により曝露後、1、4および8週後における肺内のT-CNT7の負荷量の時間に伴う曝露後の推移は、1 mg/m³曝露群の沈着量はやや減少傾向であったが、3 mg/m³曝露群の沈着量は、本測定法による沈着量はほぼ一定の傾向を示した(図4)。先行研究(H26-化学-一般-003)の知見と照合して、この年度の吸入曝露実験は曝露終了直後(0W)の沈着の異常値と判断した。

H30年度物質：T-TiO₂

表2-B及び図5にTaquann処理されたT-TiO₂を吸入曝露したマウス肺内のT-TiO₂の肺及び縦隔の負荷量の結果を示した。その結果、30 mg/m³曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直

後では150.11 ± 9.05 µg/g、1週目では112.47 ± 13.94 µg/g、4週目では63.05 ± 7.21 µg/g、8週目では25.85 ± 11.36 µg/gであり、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/6の減衰傾向が認められた(表3)。半減期は曝露終了後約3.5週であった(図5)。縦隔でのT-TiO₂測定値は0.00µg/gであった。対照群(0 mg/m³)の肺と縦隔でのT-TiO₂の測定値は0.00µg/gであった。

H30年度物質：T-CNT7 (#53)

表2-Cと図5にTaquann処理されたT-CNT7 (#53)を吸入曝露したマウス肺内負荷量の測定結果を示した。3 mg/m³曝露のマウスの肺1g当りの肺負荷量は、曝露直後では29.04 ± 6.16 µg/g、1週目では21.33 ± 2.01 µg/g、4週目では13.68 ± 1.62 µg/g、8週目では9.15 ± 2.17 µg/gで減衰傾向が認められ、曝露直後に比較して8週後の負荷量は約1/3の減衰傾向であった(表3)。半減期は曝露終了後約3.5週であった(図5)。

縦隔でのT-CNT7 (#53)測定値と対照群(0 mg/m³)の肺でのT-CNT7 (#53)測定値は0.00µg/gであった。

R1年度物質：T-CNTN

表2-Dと図5にTaquann処理されたMWCNT-N(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 mg/m³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 µg/g、1週目では10.96 µg/g、4週目では5.73 µg/g、8週目では3.77 µg/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5)。

0.6 mg/m³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 µg/g、1週目では5.51 µg/g、4週目では2.69 µg/g、8週目では2.41 µg/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5)。

なお、1.3 mg/m³と0.6 mg/m³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。

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の障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、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%;TiO₂:17%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。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。TiO₂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1/6程度が肺内に残存していることが示された。

D. 結論

研究班で実施した吸入曝露実験は、実施した条件下での肺負荷量の推移は、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の障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、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。TiO₂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1/6程度が肺内に残存していることが示された。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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

2. 学会発表

大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純：N-SHOt Cycloneによる多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第44回日本毒性学会学術年会、2017年7月

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

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

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

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

A H29 年度物質：T-CNT7 (#25)				D R1 年度物質：T-CNTN			
試料名	C6採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 (μg/mL)	試料名	C5採取量 (mL)	Tw-sol添加量 (mL)	濃度 (μg/mL)
溶液C1	0.1	0.9	0.2	溶液C1	0.1	0.9	0.4
溶液C2	0.2	0.8	0.4	溶液C2	0.2	0.8	0.8
溶液C3	0.4	0.6	0.8	溶液C3	0.4	0.6	1.2
溶液C4	0.6	0.4	1.2	溶液C4	0.6	0.4	1.6
溶液C5	0.8	0.2	1.6	溶液C5	0.8	0.2	2.0
溶液C6	1.0	0.0	2.0				

表 2 肺内沈着量の分析結果

A 平成29年度物質：T-CNT7 (#25)

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

B 平成30年度物質： T-TiO₂

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

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

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 ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
肺 3 mg/m ³ -0 週	3.98	0.67	29.04	6.16
肺 3 mg/m ³ -1 週	3.04	0.25	21.33	2.01
肺 3 mg/m ³ -4 週	2.12	0.18	13.68	1.62
肺 3 mg/m ³ -8 週	1.38	0.36	9.15	2.17

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 ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00

縦隔 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 3 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00

D 令和元年度物質：T-CNTN

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

(続)

曝露濃度 曝露後期間	MWCNT-N		MWCNT-N	
	縦隔当たり量 (μg)	SD	1g 当たり重量 (μg/g)	SD
縦隔 0 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 0.6 mg/m ³ -8 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m ³ -0 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m ³ -1 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m ³ -4 週	0.00	0.00	0.00	0.00
縦隔 1.3 mg/m ³ -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残存率

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 ₂ ($30\text{mg}/\text{m}^3$ 、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

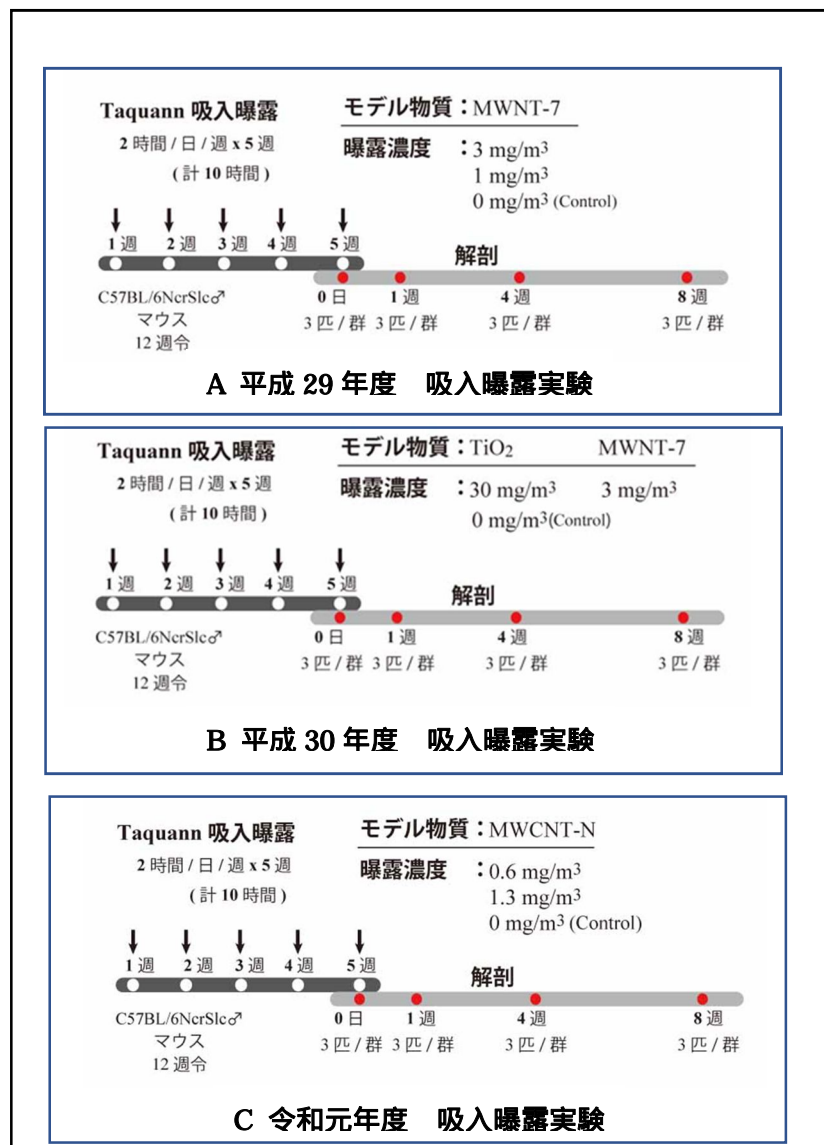


図 1 実験デザイン

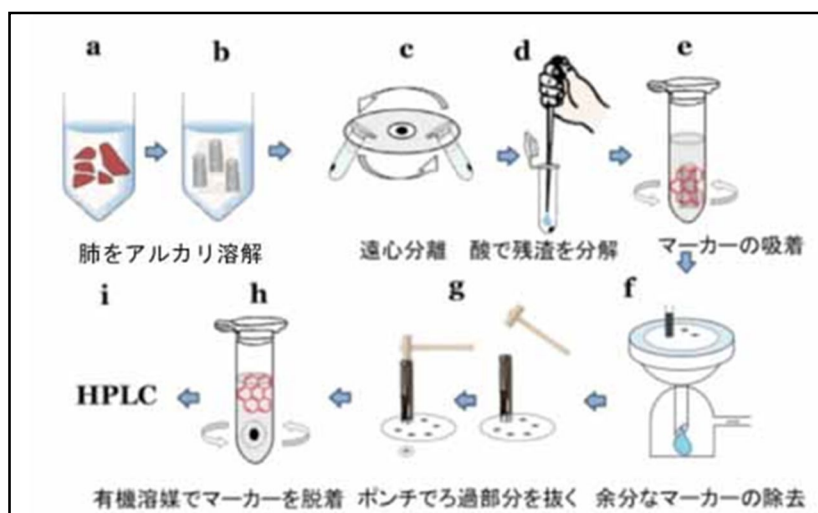


図 2 組織中の MWCNT 測定手順 (前処理)

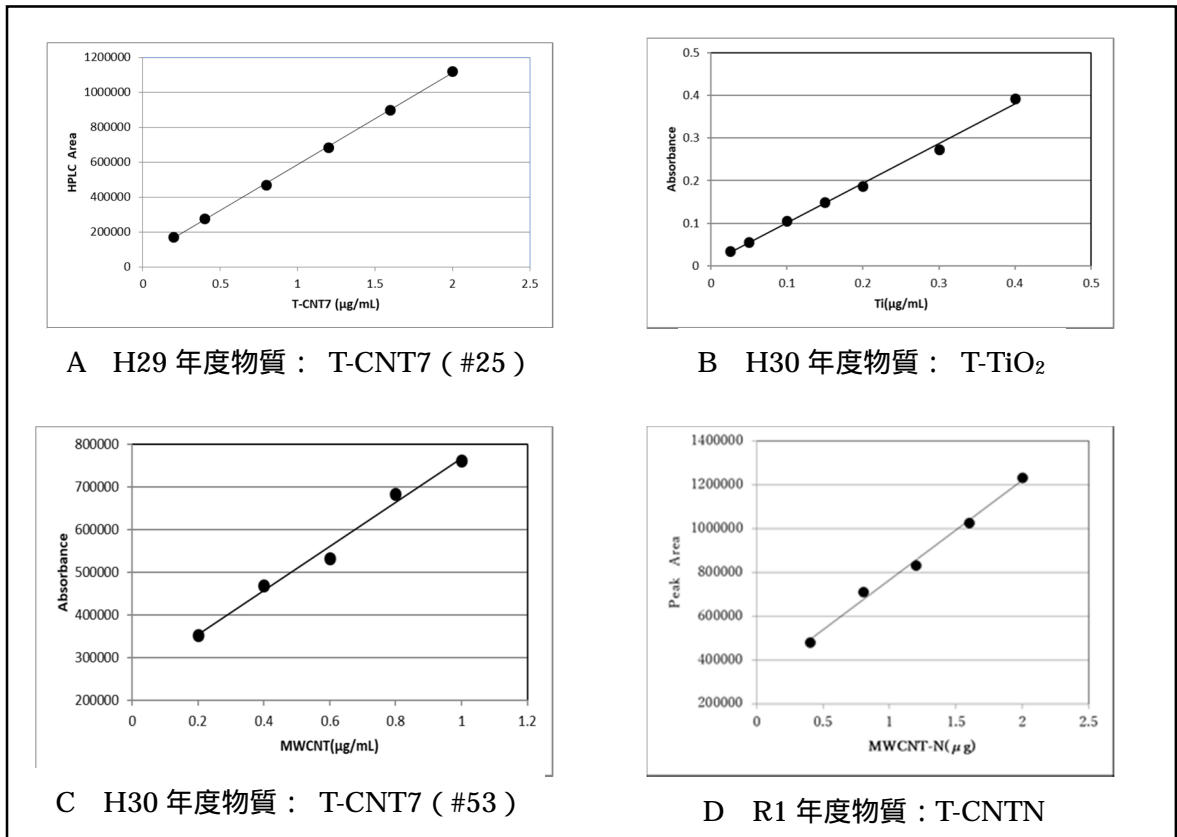


図 3 検量線

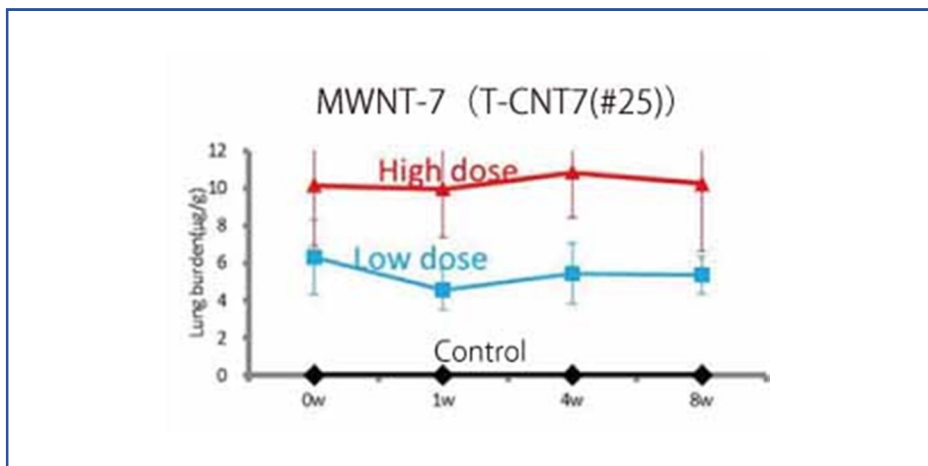


図 4 平成 29 年度物質 MWNT-7 (T-CNT7#25) の肺負荷量の経時的推移

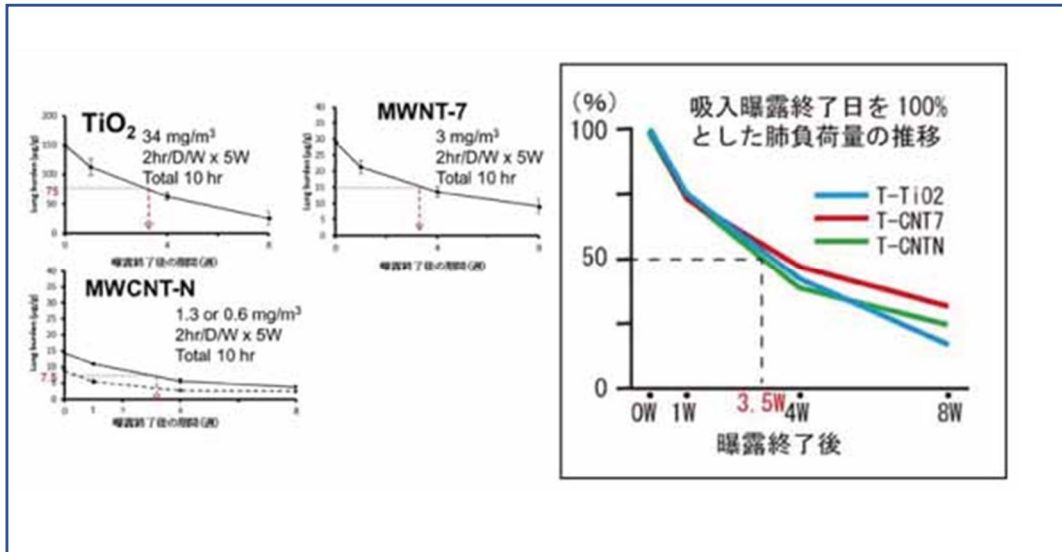


図 5 平成 30～令和元年度物質
 TiO_2 (T-TiO₂)、MWNT-7 (T-CNT7#53)、MWCNT-N (T-CNTN)
 の肺負荷量の経時的推移

平成 29～令和元年度 厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
分担研究報告書

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

分担研究課題: ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

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

研究要旨

ナノマテリアルの曝露によるマクロファージを中心とした免疫システムの制御機構は不明な点が多い。本研究では、Taquann 法にて分散処理を施したナノマテリアルを用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、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。平成 29 年度および平成 30 年度には、多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) および二酸化チタン (TiO_2) の全身吸入曝露を実施した。令和元年度には MWCNT-N の全身吸入曝露を行い、形状の異なる多層カーボンナノチューブの肺免疫への影響を検討した。MWNT-7 の曝露直後には、肺胞マクロファージ分画は大きく減少しその後、経時的に分画の割合が回復してくることが明らかになったが、 TiO_2 あるいは MWCNT-N の吸入曝露ではそのような反応は見られなかった。さらに、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。MWNT-7 曝露では肺胞マクロファージのスカベンジャー受容体、線維化に關与する MMP12、修復に關与するサイトカインあるいは酸化ストレス關連因子の発現が上昇することが明らかになったが、 TiO_2 ならびに MWCNT-N の曝露ではそれらの因子の発現の変動は少なかった。以上のことから、ナノマテリアルの性状および形状によって、肺胞マクロファージを中心とした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 (NM) の非意図的曝露経路であり有害性発現が最も懸念される吸入曝露において、異物除去に重要な役割を果たすマクロファージの *in vivo* 生体内反応に着目した生体影響を評価することにより、国際的に通用する高速で高効率な有害性スクリーニング評価手法を開発することである。

平成 29 年度の分担研究では、分散処理を施した多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) を用い、全身吸入装置により一定期間曝露後、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの曝露による生体影響評価を検討した。

平成 30 年度の分担研究では、分散処理を施した多層カーボンナノチューブ (MWNT-7) ならび

に二酸化チタン (TiO₂) を用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、0、1、2、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの暴露による生体影響評価を検討した。特に、肺胞マクロファージに焦点を当てて、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に検討を加えた。

令和 1 年度の分担研究では、MWCNT-N を用い、全身吸入装置により一定期間異なったナノマテリアルを暴露後、0、1、4 および 8 週後における肺組織における免疫システムの変動を解析することで、ナノマテリアルの暴露による生体影響評価を検討した。特に、肺胞マクロファージに焦点を当てて、ナノマテリアルの形状あるいは性状の違いによる免疫反応の影響に関して詳細に解析を実施した。

B. 研究方法

平成 29 年度

マウス

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 5 匹ずつ (5×3×4=60 匹) で多層化カーボンナノチューブを吸入暴露装置 (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。

・ T-CNT7

多層化カーボンナノチューブは MWNT-7 (三井) を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により供与された Taquann 処理 MWNT-7 (T-CNT7) 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。低濃度群は 1 mg /

m³、1 日 2 時間 (週 1 回×5) の計 10 時間吸入した。高濃度群は 2 mg / m³、1 日 2 時間 (週 1 回×5) の計 10 時間の吸入とした。

・ フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83% 塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針 (SR-OT1851C, TERUMO) を留置し、1ml のシリンジ (SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO) に 1ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7) された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

・ 定量化 RT-PCR 法

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。CD204, forward, 5'-TGGTCCACCTGGTGCTCC-3', and reverse, 5'-ACCTCCAGGGAAGCCAATTT-3'; MARCO: forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-3'; CD36: forward, 5'-TGGCCTTACTTGGGATTGG-3', and reverse, 5'-CCAGTGTATATGTAGGCTCATCCA-3'; SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3';

F4/80: forward, 5'-CTTTGGCTATGGGCTTCCAGTC-3', and reverse, 5'-GCAAGGAGGACAGAGTTTATCGTG-3'; CD68: forward, 5'-TCTTGGGAACACTACACGTGGGC-3', and reverse, 5'-CGGATTTGAATTTGGGCTTG-3'; iNOS: forward, 5'-CTGCAGCACTTGGATCAGGAACCTG-3' and reverse, 5'-GGGAGTAGCCTGTGTGCACCTGGAA-3'; MMP-12: forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3' and reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3'; β -actin, forward, 5'-GTGGGCCGCTCTAGGCACCA-3', and reverse, 5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

・マルチプレックス解析

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

平成 30 年度

・マウス

12 週齢の C57BL/6 (雄) を用い、各群 6 匹ずつで多層化カーボンナノチューブ (T-CNT7) あるいは二酸化チタン (T-TiO₂) を吸入暴露装置 (国立医薬品食品衛生研究所) により吸入を実施し、吸入後 0 週、1 週、4 週及び 8 週で適切に屠殺後解析を行った。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施した。

・MWNT-7, TiO₂ (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/m³; 2hr/day/week, 5 週間) AMT-600 (T-TiO₂, 30mg/m³; 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。

・フローサイトメトリー解析

頸部リンパ節、脾臓は摘出後、保存液に浸漬し、冷蔵保存した。リンパ節に関しては、ガラスホモジナイザー、メッシュフィルターを用い、単核球を採取した。脾臓に関してはホモジナイズ後、0.83% 塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、濾過を行った。また、肺胞洗浄液中の単核球を採取するために、気管にサーフロー留置針 (SR-OT1851C, TERUMO) を留置し、1ml のシリンジ (SS-01T 針無しシリンジ, TERUMO) に 1ml の PBS を流し込み、回収後、洗浄、遠心する。蛍光色素標識 (fluorescein isothiocyanate : FITC, phycoerythrin : PE, Peridinin chlorophyll protein-cyanin 5.5 : PE-Cy5.5, PE-cyanin 7 : PE-Cy7, allophycocyanin : APC, APC-Cy7) された各種リンパ球表面マーカー CD3, CD4, CD8, CD19, CD45.2, CD11b, F4/80, CCR2 (CD192), CD206, CD36, CD163 に対する抗体 (eBioscience, San Diego, CA) にて染色、0.9%-PFA-PBS で固定後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を解析した。

・定量化 RT-PCR 法

BALF 細胞および肺組織の一部を RNeasy 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'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'.

令和1年度

・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/m³ 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。

・定量化 RT-PCR 法

BALF細胞および肺組織の一部をRNAlaterに浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR反応によって各遺伝子mRNAを定量化した。転写レベルは7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems)を用いた。IL-6; forward, 5'-GATGGATGCTACCAAAGTGGAT-3', reverse, 5'-CCAGGTAGCTATGGTACTCCAGA-3', MMP12; forward, 5'-TGGTATTCAAGGAGATGCACATTT-3', reverse, 5'-GGTTTGTGCCTTGAAAACCTTTTAGT-3', SRB1: forward, 5'-GGCTGCTGTTTGCTGCG-3', and reverse, 5'-CTGCTTGATGAGGGAGGG-3'; forward, 5'-AGAAAGGGAGACACTGGAAGC-3', and reverse, 5'-CCTCTGGAGTAACCGAGCAT-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。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 である。

C. 研究結果

平成 29 年度

正常 C57BL/6 雄 (12 週齢) マウスに MWNT-7 (対照群、低濃度群、高濃度群) を全身吸入装置にて、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (H29 図 1)。各群は 5 匹ずつとした。

H29 図 2 に示すように、MWNT-7 暴露後 0 週、CD11c および CD11b を用い、肺胞洗浄液中 (BALF) の免疫細胞 (肺胞マクロファージ: CD11c⁺CD11b⁻、単球: CD11c⁺CD11b⁺、好酸球: CD11c⁻CD11b⁺) をフローサイトメーターにて解析すると、肺胞マクロファージが減少することが明らかになった。一方で、単球、好酸球に関しては MWNT-7 暴露によって割合が増加していた。さらに、肺胞マクロファージを CD11b および F4/80 にて展開すると、MWNT-7 暴露によって割合が減少することがわかった (H29 図 2、H29 図 3A)。暴露後 0 週では、BALF 中の生細胞の割合は減少することがわかった (H29 図 3A)。この時点では、肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトに大きな偏りは観察されなかった (H29 図 3A)。

暴露後 1 週では、BALF 中の生細胞の割合に変化は見られなくなり (H29 図 3B)、高濃度暴露群で肺胞マクロファージが有意に減少している (H29 図 2、図 3B)。単球、好酸球に関しては、高濃度群で有意に増加した (H29 図 3B)。また、肺胞マクロファージは高濃度暴露群で M1 へのシフトが見られた (H29 図 3B)。

暴露後 4 週では、1 週後と同様に、肺胞マクロファージ数は高濃度群で有意に減少していた (H29 図 2、

図 4A)。また、単球、好酸球に関しても、高濃度暴露群で有意に増加した状態が続いていた (H29 図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 へのシフトは明らかではなかった (H29 図 4A)。

暴露後 8 週でも、MWNT-7 の高濃度暴露群で、肺胞マクロファージの減少、好酸球、単球の増加が確認された (H29 図 2、H29 図 4A)。肺胞マクロファージの M1/M2 分化は高濃度暴露群で M1 へのシフトが抑制されていた (H29 図 4B)。

MWNT-7 の吸入暴露による常在型肺胞マクロファージの変化を経時的に観察すると、高濃度群では 0 ~ 8 週まで有意に低下していた (H29 図 5A)。好酸球に関しては 0 ~ 8 週後でいずれにおいても対照に比較して、高濃度群で有意に増加していた (H29 図 5B)。経時的には 1 週で増加し、その後 8 週まで徐々に減少することがわかる (H29 図 5B)。単球に関しては、対照群に比較して、低濃度、高濃度ともどの時期においても有意に割合が増加していた (H29 図 6A)。経時的には暴露後 1 週から徐々に低下する傾向にあった (H29 図 6A)。一方、M2 型マクロファージはどの群とも経時的に増加していたが、群間での差は認められなかった (H29 図 6B)。

MWNT-7 暴露による肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体 (CD36、CD163) の発現の変化をフローサイトメーターにて解析したところ、大きな変化は観察できなかった (H29 図 8)。また、肺組織における各種スカベンジャー受容体、MMP12 などの mRNA 発現を定量 RT-PCR にて解析すると、MWNT-7 暴露後 0 週での CD204、MARCO、iNOS の mRNA 発現の有意な上昇 (H29 図 9A)、1 週では MARCO の mRNA の有意な上昇 (図 9B)、4 週では CD204、iNOS の mRNA の有意な上昇 (図 9C) が観察された。MMP12 mRNA に関しては、どの時期においても低濃度、高濃度のいずれの群も MWNT-7 暴露によって有意に上昇することがわかった。

BALF 中のサイトカイン、ケモカインあるいは増殖因子に関して、マルチプレックス解析を実施すると、4 種類の因子が検出され、VEGF あるいは IL-12 が MWNT-7 吸引暴露によって増加することが判明した (H29 図 10)。

脾臓、頸部リンパ節における B 細胞、CD4T 細胞 CD8T 細胞の割合に関しては、T-CNT7 暴露によってどの時期においても影響は見られなかった (H29 図 11A、H29 図 11B)。さらに、CD4 及び CD8T 細胞における活性化マーカー (CD44/CD62L) を検討したところ、脾臓、頸部リンパ節において、どの時期でも MWNT-7 の暴露で変化は確認されなかった (H29 図 12A、図 12B)。

脾臓、リンパ節における単球、マクロファージ、樹状細胞の割合を検討したところ、MWNT-7 暴露後のどの時期においてもそれぞれの分画に変化は認められなかった (H29 図 13A、H29 図 13B)。さらに、脾臓、頸部リンパ節におけるマクロファージにおける M1/M2 マーカー (CD192/CD206) を検討したところ、脾臓では MWNT-7 暴露で変化は見られなかったが (H29 図 14A)、リンパ節において、暴露後 4 週で、M1 の低下、M2 の上昇が確認された (H29 図 14B)。

BALF 中のマクロファージの貪食状態などを細胞のフローサイトメータによる解析結果から、細胞の大きさにて評価すると、MWNT-7 暴露群で細胞の大きさに大きな変化は認められなかった (H29 図 15A、B、C)。

平成 30 年度

正常 C57BL/6 雄 (12 週齢) マウスに MWNT-7 暴露群、TiO₂ 暴露群および対照群として、暴露後 0 週、1 週、4 週および 8 週後に解析を実施した (H30 図 1A)。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⁻CD19⁻7AAD⁻細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺胞マクロファージ (AM)、好酸球 (E)、単球 (M) に分類した (H30 図 1B)。さらに、AM 分画を CD192/CD206 で展開することによって M1 (CD192) あるいは M2 (CD206) マクロファージサブセットの検出を行った (H30 図 1B)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討してみた。通常、肺胞マクロファージは F4/80⁺CD11b⁻ の表現型を示し、前年度までの報告では MWNT-7 の吸入暴露で F4/80⁺CD11b⁺ あるいは CD11b^{high} の分画が増加することがわかっている。この分画は M1 マ

クロファージの性格を有していることも知られている。BALF 中の各免疫担当細胞についてフローサイトメータによる解析では、暴露直後 (0 週) で生細胞 (alive) が MWNT-7 暴露で低下しており、肺胞マクロファージ (AM) においても MWNT-7 暴露で低下していた (H30 図 2A)。一方で、好酸球、単球は MWNT-7 暴露で増加していた (H30 図 2A)。TiO₂ 暴露では、対照群と変化はなかった (H30 図 2A)。さらに、肺胞マクロファージ表面マーカーで検討すると、MWNT-7 暴露で F4/80⁺肺胞マクロファージあるいは CD11b⁻F4/80⁺肺胞マクロファージは、対照群あるいは TiO₂ 暴露群に比較して減少するものの、CD206⁺ あるいは CD11b⁺F4/80⁺マクロファージは逆に増加することがわかった (H30 図 2A)。

肺胞マクロファージのこれらの BALF 細胞の分画の傾向は暴露後 1 週、4 週まで続くが、MWNT-7 暴露後 1 週では肺胞マクロファージ中の CD206⁺マクロファージ (M2) の増加が見られなくなり、暴露後 4 週でも同様であった (H30 図 2B、C)。MWNT-7 暴露後 4 週では好酸球の増加が見られなくなった (図 2C)。暴露後 8 週では、各群で大きな変化が見られなくなったが、MWNT-7 暴露で単球の増加、CD11b⁺F4/80⁺マクロファージの増加は続いていた (H30 図 2D)。

ナノマテリアル暴露後の経時的変化を検討すると、肺胞マクロファージは対照群で大きな変化はないが、暴露後 8 週でやや減少傾向が見られた (H30 図 3A)。TiO₂ 暴露群では 8 週まで変化は見られなかった (H30 図 3A)。MWCNT-7 暴露群では減少した肺胞マクロファージは 4 週、8 週へと経時的に増加していた (H30 図 3A)。

MWNT-7 暴露で特徴的な好酸球の経時的変化に関しては暴露後 0 週、1 週まで増加し、4 週、8 週で低下し、対照群と差が見られなくなった (H30 図 3B)。単球の変化では MWNT-7 暴露で増加が 4 週まで続き、8 週では低下していた (H30 図 3C)。

肺胞マクロファージの各分画についての経時的変化を検討すると、M2 型肺胞マクロファージは対照群、TiO₂ 暴露群でばらつきはあるものの、8 週まで低い割合を維持していた (H30 図 4B)。さらに、M1 型マクロファージに含まれる CD11b⁺F4/80⁺マクロファージに

関しては、TiO₂ 曝露群において曝露後 8 週で低下していることがわかった(H30 図 4B)。また、MWNT-7 曝露群では、曝露後 0 週、1 週と増加した後、4 週、8 週と低下していた(H30 図 4A)。

ナノマテリアルの曝露による変化で、肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体が重要な役割を果たしていることが知られていることから、肺泡マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現を検討すると、対照群において曝露直後で 20%程度が陽性であった発現が 1 週以降はほぼ発現が認められなかった(H30 図 5A)。TiO₂ 曝露群では、曝露直後に対照群よりも高い CD36 発現を示し、1 週後以降で発現は見られなくなった(H30 図 5A)。MWNT-7 曝露においても同様の発現変化が観察された(H30 図 5A)。CD11b⁺F4/80⁺マクロファージにおいても CD36 の発現はナノマテリアルの曝露直後で発現が亢進するが、1 週以降ではほぼ発現が見られなくなった(H30 図 5B)。0 週での TiO₂ 曝露群と MWNT-7 曝露では CD36 の発現に差は見られなかった(H30 図 5A, B)。また、スカベンジャー受容体の一つである CD163 の発現に関しても経時的に検討したが、若干の時間的な変化は見られるもののマクロファージの 5%以下の発現しか見られなかった(H30 図 6A, B)。

ナノマテリアル曝露による BALF 細胞における各種 mRNA 発現に関して定量 RT-PCR にて検討したところ、昨年の MWNT-7 曝露で変動のあった MMP12 遺伝子に関して、対照群、TiO₂ 曝露群では変化は見られなかったが、MWNT-7 曝露群で 0 週および 1 週で発現上昇が観察され、4 週、8 週では発現が低下するものの対照群よりは高い値を維持していた(H30 図 7A)。さらに、スカベンジャー受容体の一つである CD204 においても MWNT-7 曝露によって発現が上昇し、曝露後 1 週では高い発現を示した後、4 週以降で発現低下が見られた(H30 図 7B)。

肺組織における様々な遺伝子の mRNA 発現に関しては、MMP12 mRNA 発現は MWNT-7 曝露後 1 週で高い値を示していた(H30 図 8A)。CD204 mRNA は TiO₂ 曝露後 1 週で上昇し、それ以降は低下していた(H30 図 8B)。MWNT-7 曝露では直後から発

現が増加し、4 週で一旦低下し、8 週で再び上昇していた(H30 図 8B)。

肺組織における GM-CSF mRNA 発現は MWNT-7 曝露後 1 週で上昇していたがその後は低下した(H30 図 9A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO₂ および MWNT-7 曝露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(H30 図 9B)。IL-33 mRNA 発現においても、TiO₂ および MWNT-7 曝露後 1 週で一過性に発現の上昇がみとめられた(H30 図 10A)。慢性炎症の線維化に關与する Col IV mRNA はナノマテリアルの曝露で変動は認められなかった(H30 図 10B)。

TIMP-1 mRNA 発現では TiO₂ および MWNT-7 曝露後 1 週で一過性に発現の上昇が観察された(H30 図 11A)。VEGF mRNA 発現はばらつきはあるものの、大きな変化は認められなかった(H30 図 11B)。

令和 1 年度(H30 年度継続研究)

多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)および二酸化チタン(TiO₂)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(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(H30 継続 図 1A、1B)。MWNT-7 の曝露によって、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 曝露後 8 週においてもその発現が増加していた(H30 継続 図 1B)。TiO₂ 曝露では直後に IL-4 発現が増加していた(H30 継続 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 曝露で発現が増加していた(H30 継続 図 2A)。TiO₂ 曝露では、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(H30 継続 図 2A)。また、MWNT-7 曝露でも、F4/80 mRNA および CD206 mRNA 発現に変化は認められなかった(H30 継続 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 曝露で上昇する傾

向にあった(H30 継続 図 2B、有意差なし)また、CD36 mRNA 発現が TiO₂ 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(H30 継続 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 の暴露直後に大きくその発現が上昇することが明らかになった(H30 継続 図 2C)。

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(H30 継続 図 3A)。IL-6 mRNA 発現に関しては、TiO₂ 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(H30 継続 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(H30 継続 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 TiO₂ 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(H30 継続 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(H30 継続 図 3B、有意差あり $p < 0.05$)。CD36 mRNA 発現に関しては、TiO₂ および MWNT-7 暴露後 1 週で、上昇していた(H30 継続 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(H30 継続 図 3B)。

肺組織における iNOS mRNA ならびに Cox2 mRNA 発現では、MWNT-7 の暴露直後に大きく上昇することがわかった(H30 継続 図 3C)。Cox2 mRNA 発現は AMT-600 および MWNT-7 暴露 1 週にて有意に上昇することが判明した(H30 継続 図 3C)。

令和 1 年度

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(R1 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⁻CD19⁻7AAD⁻細胞から CD11c/CD11b にて展開することによって、肺胞マクロファージ(AM)、好酸球(E)、単球(M)に分類した(R1 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(R1 図 5)。一方で、F4/80 と CD11b をマーカーとした分画も検討した(R1 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(R1 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(R1 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(R1 図 6、9、10)。

ナノマテリアル暴露後の経時的変化を検討すると、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(R1 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(R1 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)(R1 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)(R1 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 (R1 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 (R1 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 週目の低濃度 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 (R1 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、上昇していた (有意差無し) (R1 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) (R1 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) (R1 図 17)。

D. 考察

平成 29 年度

MWNT-7 の吸入暴露により、8 週まで肺胞マクロファージ (CD11b^{low}) の割合は有意に減少するのに対し (高濃度群)、好酸球、単球あるいは CD11b^{high} マクロファージは増加することがわかった。また、MWNT-7 の吸入暴露により M1/M2 のバランスに変動が生じていた。一方で、MWNT-7 暴露により肺組織におけるスカベンジャーレセプターの mRNA 発現の変動が生じる可能性が示されたことから、ナノマテリアルの肺胞マクロファージによる処理にスカベンジャー受容体に関係していることが示唆された。

肺組織における MMP12 の mRNA 発現は MWNT-7 の暴露で有意に増加することが示され

たが、昨年度までの研究 (平成 28 年度今井田班報告済) でも、MWNT-7 の暴露後 1 年経過した時点で MMP12 の発現亢進が持続していたことから、MWNT-7 暴露後、初期から長期に渡って MMP12 の発現が上昇するものと考えられる。さらに、MWNT-7 暴露によって、IL-12 および VEGF などのサイトカインや成長因子が BALF 中で上昇が確認された。

平成 30 年度の実験では正常 B6 雄マウスに二酸化チタン (TiO₂) および多層化カーボンナノチューブ (MWNT-7) を Taquann 処理によって分散性を高めた上で、全身吸入暴露装置にて 4 週間にわたって暴露を行なった。暴露後、0 週、1 週、4 週および 8 週における肺を中心とした免疫担当細胞の動態と異なったナノマテリアル吸入暴露による免疫反応の違いを詳細に検討した。

ナノマテリアルの 4 週間の暴露直後 (0 週) では、MWNT-7 の暴露群では BALF 細胞の生存割合が対照群、TiO₂ 暴露群に比較して、有意に低くなっていた。このことは昨年までの研究結果と一致している。TiO₂ 暴露群では形態学的に顆粒状異物を貪食した肺胞マクロファージが多く観察されている (相磯班内データ)。一方で、MWNT-7 は針状あるいは繊維状の形態のナノマテリアルであり、貪食しようとした肺胞マクロファージは細胞死を生じている可能性が考えられた。

その後、MWNT-7 暴露群では BALF 細胞数あるいは肺胞マクロファージ数が回復し、暴露後 8 週ではほぼ対照群、TiO₂ 暴露群と大差はなくなっていた。MWCNT-7 暴露にて細胞死に陥った肺胞マクロファージは肺組織内での恒常性維持あるいは貪食しきれなかったナノマテリアルの処理のために肺胞内で細胞数が増加している可能性が考えられる。組織常在型マクロファージが増加したのかあるいは末梢由来の単球から分化することで細胞数が増加したのかは不明であり、今後の課題である。

多層化カーボンナノチューブの暴露後 1 年での肺胞マクロファージのフェノタイプとして、CD11b^{high} F4/80⁺ マクロファージが増加し、線維化

に關係する MMP12 を產生することが報告されている (Otsuka et al. *PLoS One*, 2018)。今回の実験においても CD11b^{high} 分画を含む CD11b⁺分画が T-CNT7 暴露群で増加していたことから、暴露後早い段階からこのユニークな分画が多層化カーボンナノチューブの吸入暴露による免疫反応に重要な役割を果たしていることが考えられた。また、明確な CD11b^{high} 分画への変化はさらに加齢的な変化が必要であることが考えられた。

MWNT-7 暴露での変化で重要な所見として、好酸球数の増加である。通常、好酸球はアレルギー反応、寄生虫感染などの免疫反応においてその役割が知られているが、ナノ材料の暴露による好酸球の役割に関してはよく知られていない。IL-13 など好酸球が產生するサイトカインあるいはケモカインなどの產生を検討する必要がある。

TiO₂ および MWNT-7 の両者ともに暴露後に肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体の一つである CD36 の発現が亢進していた。このことはナノ材料の形状ならびに性状に関わらずスカベンジャー受容体がナノ材料に対する免疫反応に重要な働きをしていることが示された。

BALF 細胞の遺伝子変化として、MWNT-7 暴露群で MMP12 および CD204 mRNA 発現が上昇していた。MMP12 に関してはこれまでの報告に一致しており、MWNT-7 の暴露によって肺胞マクロファージの產生する MMP12 が肺の線維化病変に関与しているものとする。また、CD204 に関してはスカベンジャー受容体の一つとして知られており、CNT の暴露に関連する分子として注目できる。

肺組織における遺伝子変化に関しては、BALF 細胞と同様に、MMP12 ならびに CD204 mRNA 発現の上昇が見られたが、肺組織への肺胞マクロファージの残存あるいは肺胞マクロファージ以外の間質の細胞の変化が反映されている可能性が考えられた。また、TiO₂ 暴露でも CD204 mRNA の発現上昇が見られたことから、何らかの間質細胞

への影響が考えられた。

肺組織でのサイトカインの変化に関しては、MWNT-7 暴露 1 週間で一過性に GM-CSF ならびに IL-6 mRNA 発現が上昇しているが、BALF 細胞での発現の解析が必要である。また、TiO₂ 暴露と MWNT-7 暴露で IL-33 mRNA 発現が一過性に上昇していることも BALF 細胞での発現の解析が待たれる。TIMP-1 mRNA 発現に関しても両方の材料で一過性に上昇しており、ナノ材料暴露での肺免疫に重要な役割を果たしている可能性が示された。

令和 1 年度

前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 (TiO₂) 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。TiO₂ とのナノ材料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、TiO₂ 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 TiO₂ の暴露で違いが生じていた。肺組織においても MWNT-7 と TiO₂ 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、ナノ材料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。

令和元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 Taqqan 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⁺F4/40⁺, CD11b⁻F4/80⁺) に関して、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 暴露で変化していたことから、カーボンナノチューブ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暴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 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。

E. 結論

平成 29 年度

MWNT-7 の吸入暴露によって、肺泡マクロファージは MWNT-7 の処理によって細胞死を介して、細胞数が減少し、その後 M1/M2 分化の不均衡が生じる。また、いくつかの肺泡マクロファージが発現する分子がナノマテリアルの生体内反応のマーカーになる可能性がある。

平成 30 年度

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

令和 1 年度

MWNT-7 と TiO₂ の全身吸入暴露によって、肺泡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。一方で、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。また、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。一方で、MWCNT-Nの暴露によって、肺胞マクロファージで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。

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。また、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。したがって、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

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

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

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

Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y.:Essential role of CCL21 in establishment

of central self-tolerance in T cells. *J Exp Med*. 2017 214:1925-1935

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

YoshioHayashi,NaozumiIshimaru.Autoimmunity Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. *Handbook of Immunosenescence* 1-11, 2017

Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y.:Aurora Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 18:199-213

Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M.: Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 41:1172-1181

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

石丸直澄: 口腔免疫とその異常、*CLINICAL CALCIUM* 27(10):21-26, 2018

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

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

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

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

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

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

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

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

Yuyama K, Nakamura Y, Yateyama R, Arakaki R, Tsutsui T, Ishimaru N.: Study of the pharmacokinetics of eriodictyol-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 clligenesis 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, 11(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-κB 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

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、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日 (東京)

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

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

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

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

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

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

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

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

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

石丸直澄: シェーグレン症候群における自己反応性獲得機序の解明 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日 (札幌)

○ 新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、工藤保誠、石丸直澄：全身吸入曝露による多層化カーボンナノチューブの肺胞マクロファージへの影響 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

中山慎一郎、新垣理恵子、牛尾綾、大塚邦紘、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルマウス唾液腺における IL-33 の発現とその役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄：CCL22 産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に関与する 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

沼田雪乃、大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルにおける Notch シグナルの役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、小川博久、常山幸一、石丸直澄：DNA ライセンシング因子 CDT1 の新規ユビキチン分解制御機構とその意義の解明 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

西條早紀、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：Emil の過剰発現による人工口腔癌幹細胞の作成 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

梅田将旭、常松貴明、大塚邦紘、牛尾綾、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：口腔癌における Periostin スプライシングバリエーションの同定とその役割 第 107 回日本病理学会総会、2018 年 6 月 23 日(札幌)

Tsunematsu T, Ishimaru N, Kudo Y: APC/C-Cdh1-mediated degradation of Borealin triggers differentiation of pluripotent stem cells. FASEB meeting "Ubiquitin and Cellular Regulation" Snowmass Village, CO, USA, June 22, 2018

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 第 17 回四国免疫フォーラム、2018 年 6 月 30 日(徳島)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：シェーグレン症候群疾患モデルの自己免疫病変における濾胞ヘルパー T 細胞の役割 分子病理学研究会 37 はがくれシンポジウム、2018 年 7 月 7 日(佐賀)

大塚邦紘、山田安希子、牛尾綾、新垣理恵子、齋藤雅子、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、石丸直澄：Ascl2 を介した濾胞ヘルパー T 細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 先端歯学スクール、2018 年 8 月 23-24 日(東京)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：Ascl2 を介した濾胞ヘルパー T 細胞分化異常が自己免疫疾患の病態形成に関与する 第 29 回日本臨床口腔病理学会総会、2018 年 8 月 25-26 日(東京)

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：第 60 回歯科基礎医学学会学術大会、2018 年 9 月 5-7 日（福岡）

大塚邦紘、山田安希子、齋藤雅子、牛尾綾、木曾田暁、常松貴明、工藤保誠、新垣理恵子、石丸直澄：第 27 回日本シェーグレン症候群学会、2018 年 9 月 14-15 日（小倉）

牛尾綾、新垣理恵子、大塚邦紘、山田安希子、工藤保誠、石丸直澄：CCL22 産生唾液腺マクロファージはシェーグレン症候群の病態形成に關与する 第 27 回日本シェーグレン症候群学会、2018 年 9 月 14-15 日（小倉）

Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Aya Ushio, Rieko Arakaki, Takaaki Tsunematsu, Masako Saito, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru : Impairment of the differentiation into follicular helper T cell through Ascl2 enhances autoimmune lesions in a mouse model for Sjögren's syndrome. 2018 Tokushima Bioscience Retreat、2018 年 9 月 0-22 日（香川小豆島）

Kunihiro Kunihiro, Akiko Yamada, Masako Saito, Aya Ushio, Takaaki Tsunematsu, Rieko Arakaki, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: A crucial role of follicular helper T cells in autoimmunity of a mouse model for Sjögren's syndrome. 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

Aya Ushio, Rieko Arakaki, Kunihiro Otsuka, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, and Naozumi Ishimaru: CCL22-producing macrophages promote T cell autoimmunity in the target organ of Sjögren's syndrome. 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

Rieko Arakaki, Shinichiro Nakayama, Aya Ushio, Kunihiro Otsuka, Satoshi Kisoda, Takaaki

Tsunematsu, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Naozumi Ishimaru: The role of the cleaved form IL-33 in pathogenesis of Sjögren's syndrome (SS). 第 47 回日本免疫学会学術集会、2018 年 12 月 10-12 日（福岡）

○ 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第 106 回日本病理学会総会、2018 年 4 月 28 日（東京）

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

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

○ 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（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, 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

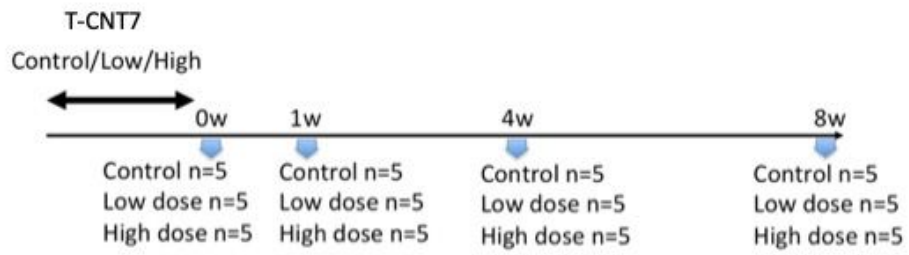
2. 実用新案登録

なし

3. その他

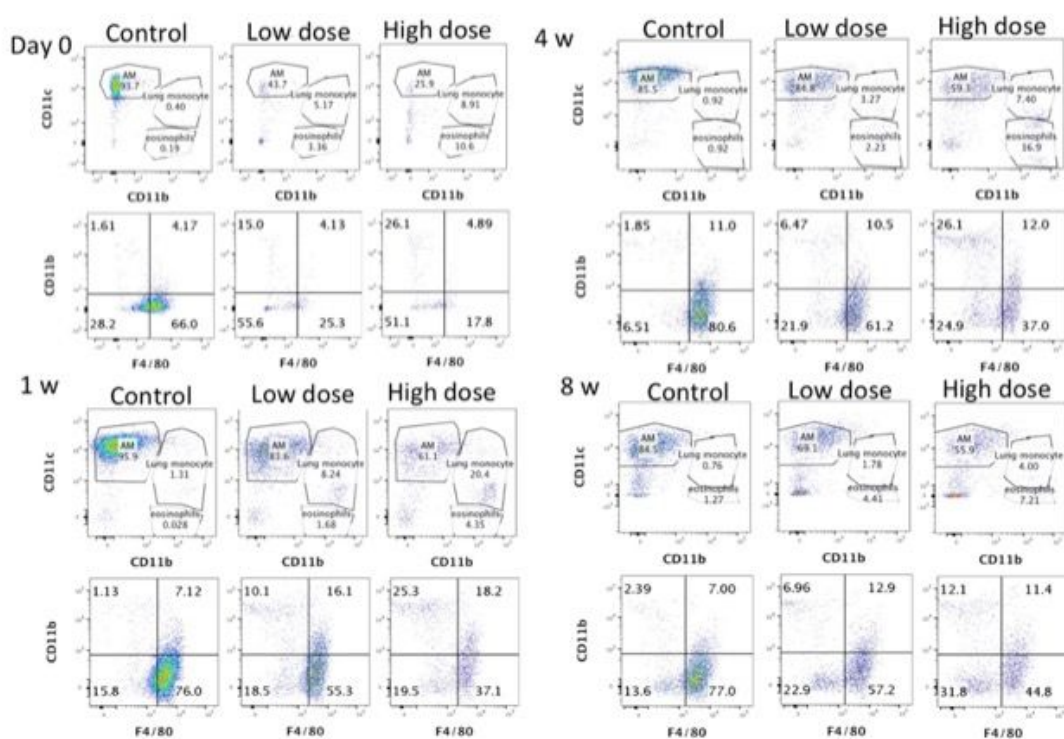
なし

Experimental Schedule

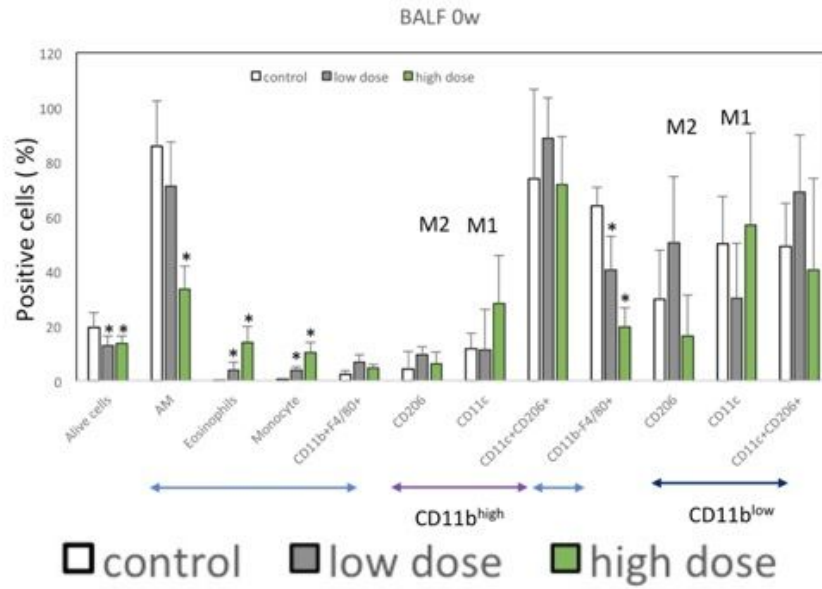


	0w	1w	4w	8w
BALF/FCM	⊙	⊙	⊙	⊙
BALF/Multiplex				⊙
CLN/FCM	○	○	○	○
Spleen/FCM	○	○	○	○
Lung/q-RT-PCR	⊙	⊙	⊙	⊙

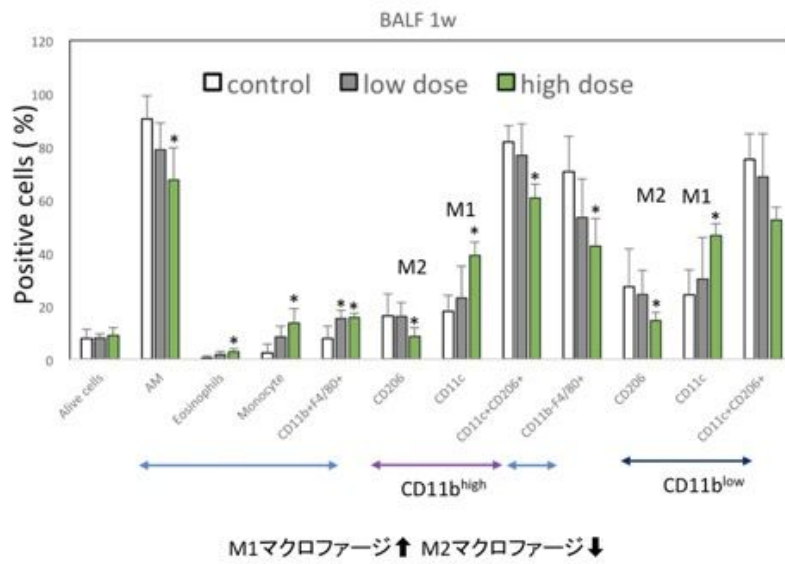
T-CNT7吸入暴露による肺胞洗浄液中の免疫細胞の変化



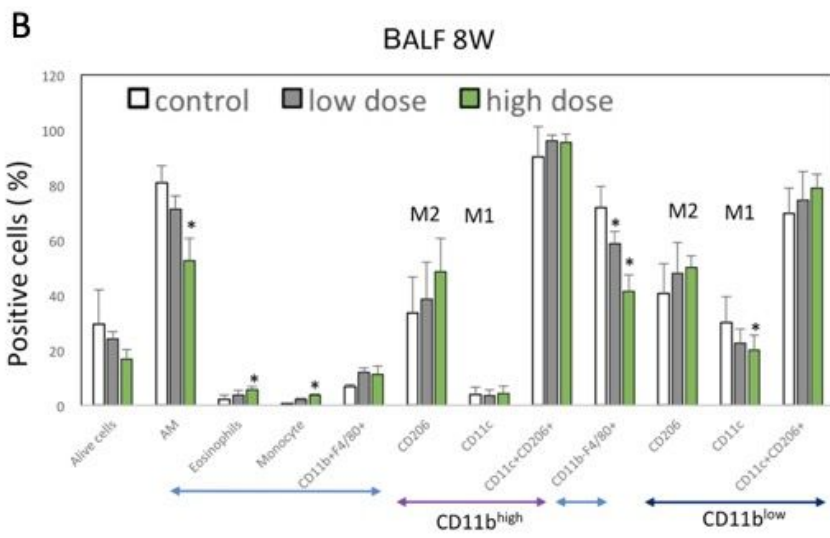
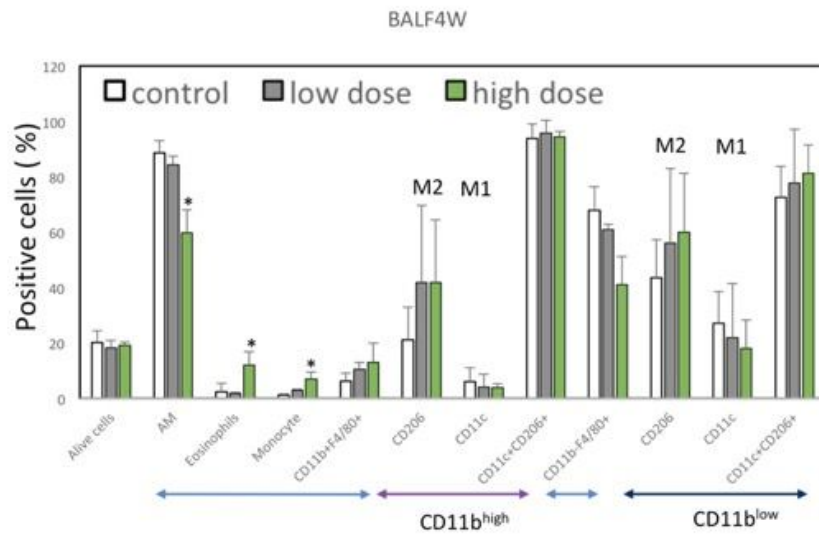
A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



B 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する

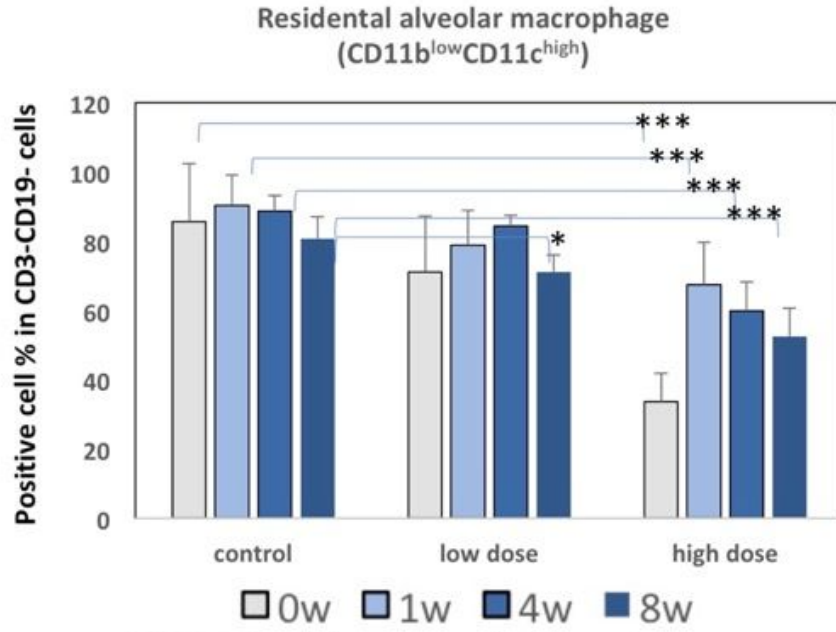


A 肺胞マクロファージは減少し、好酸球、単球は増加する



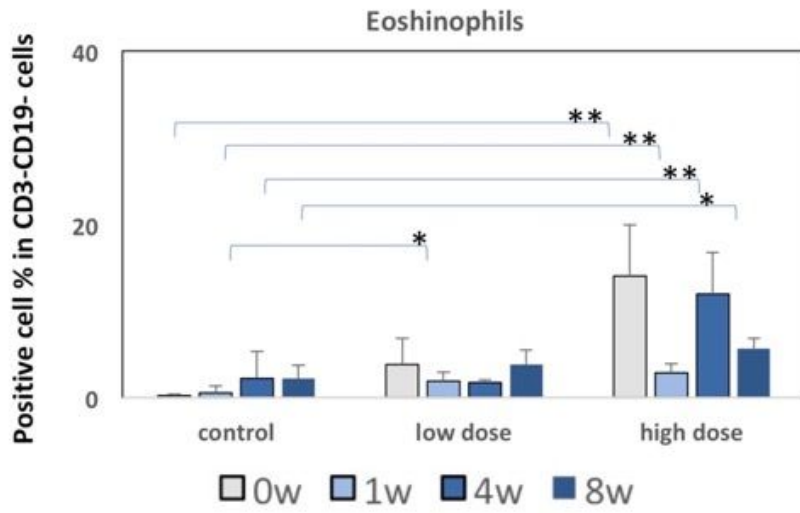
M1マクロファージ↓

A



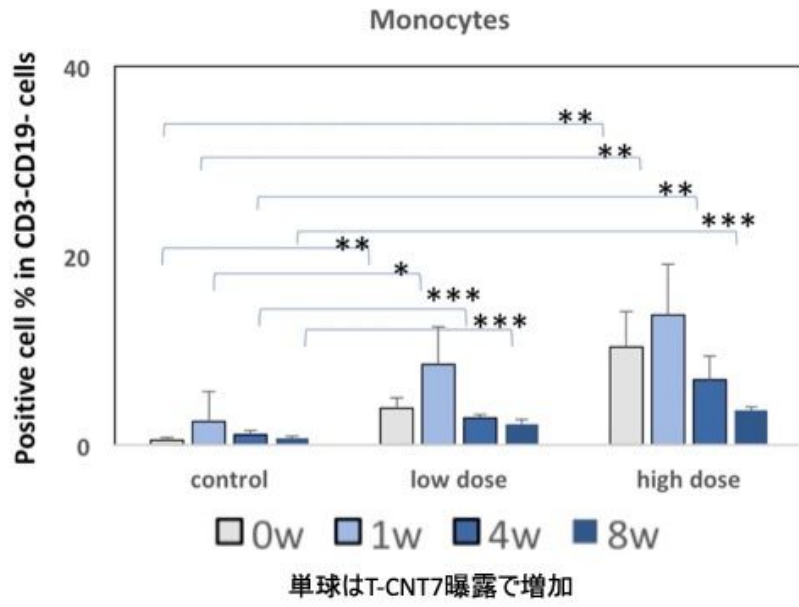
B

暴露後8週まで肺胞マクロファージは減少してま (high dose)

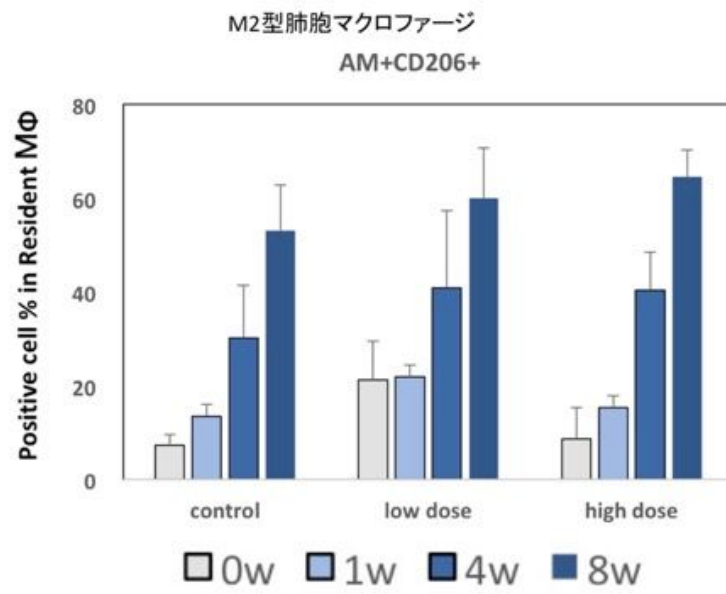


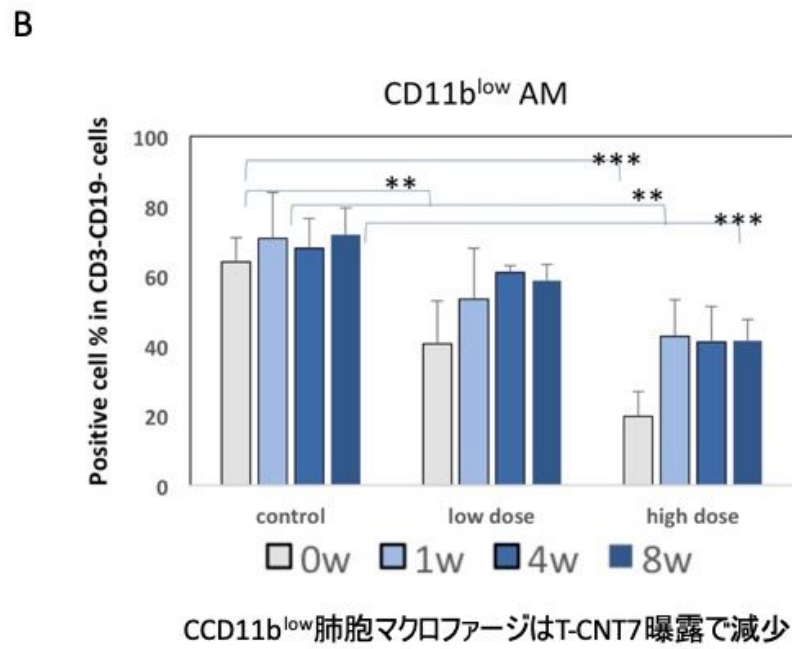
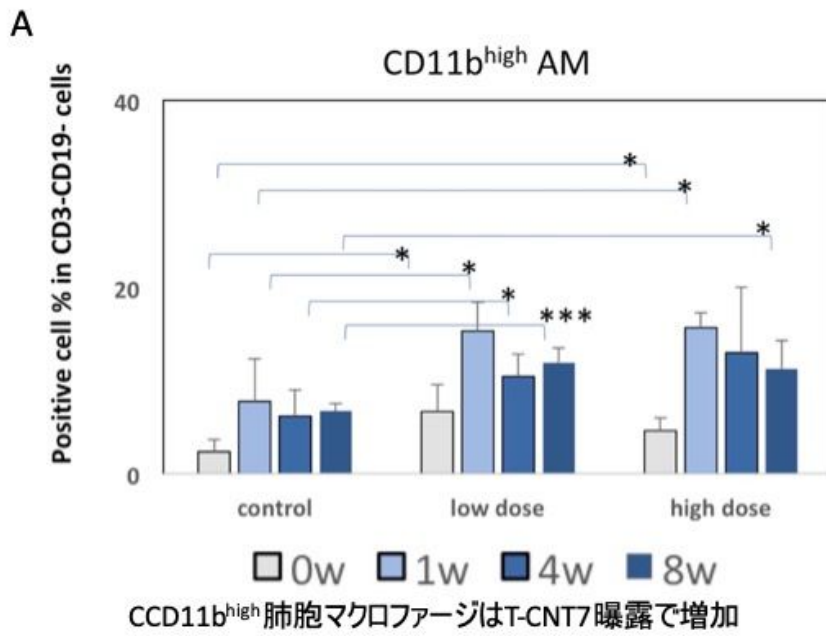
好酸球はT-CNT7曝露で増加

A

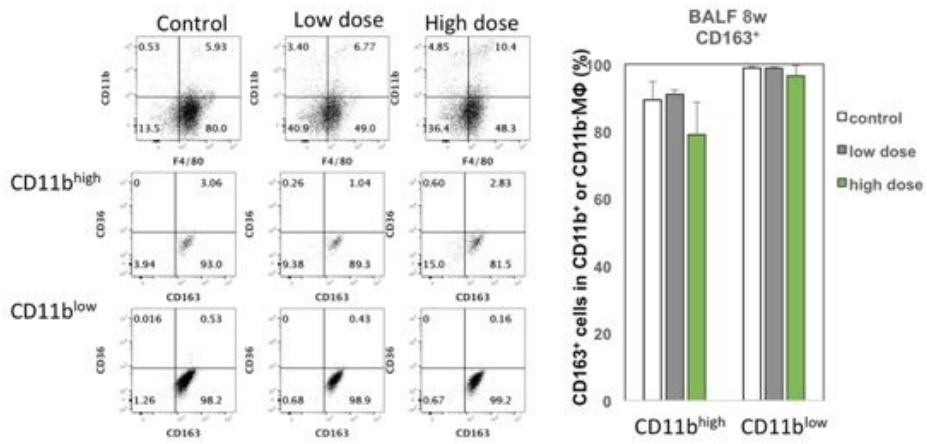


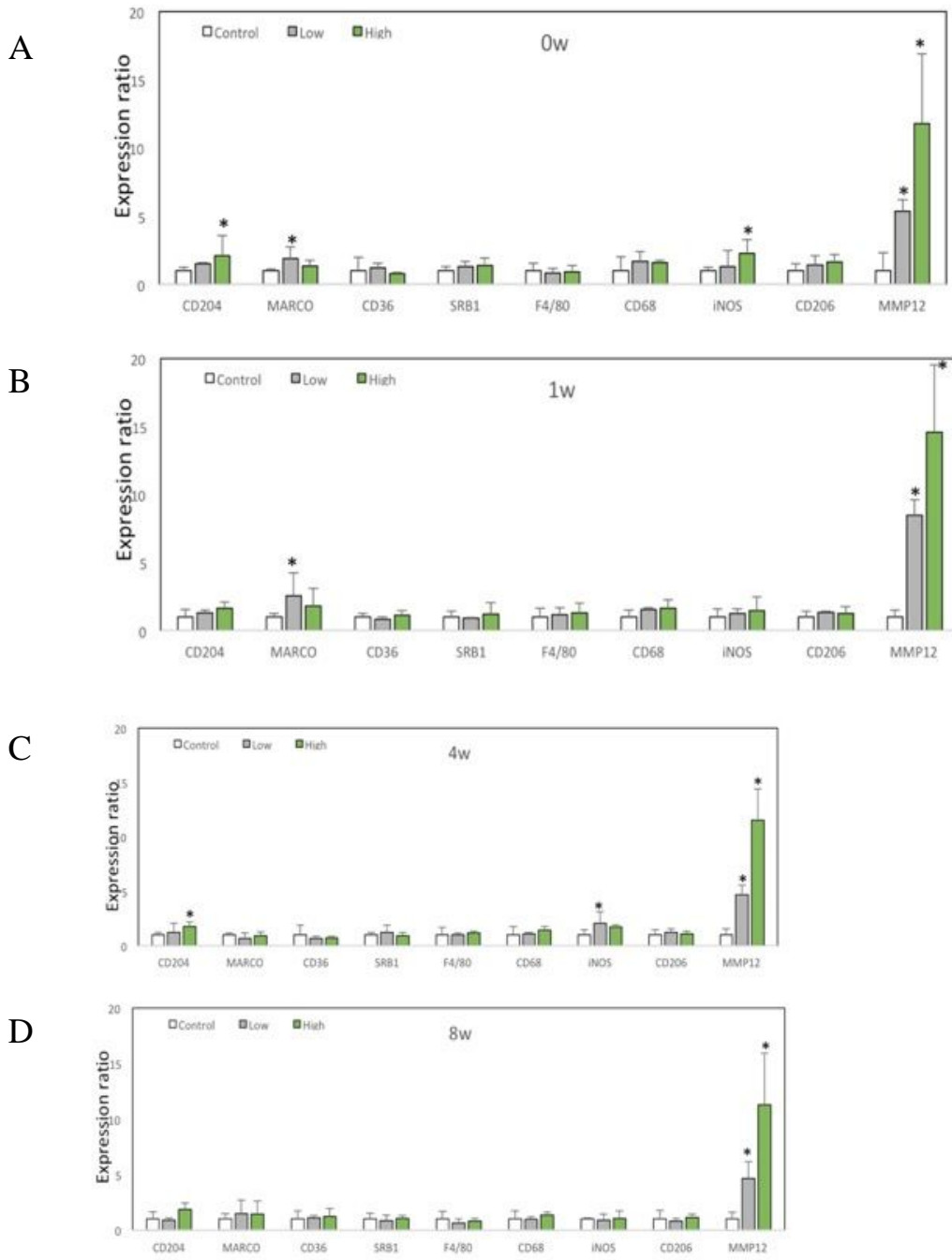
B



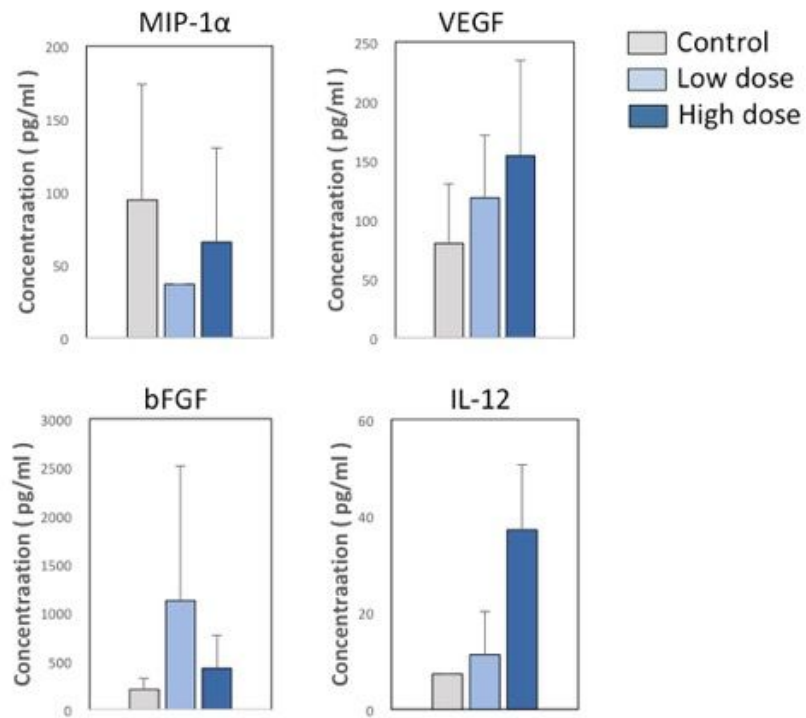


Scavenger receptor on alveolar macrophages

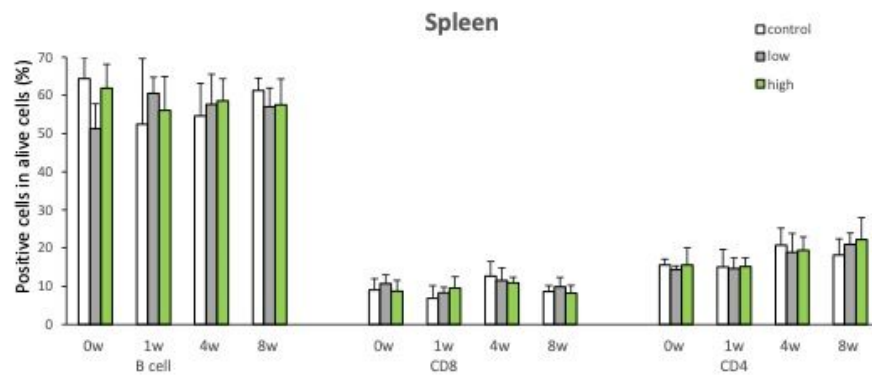




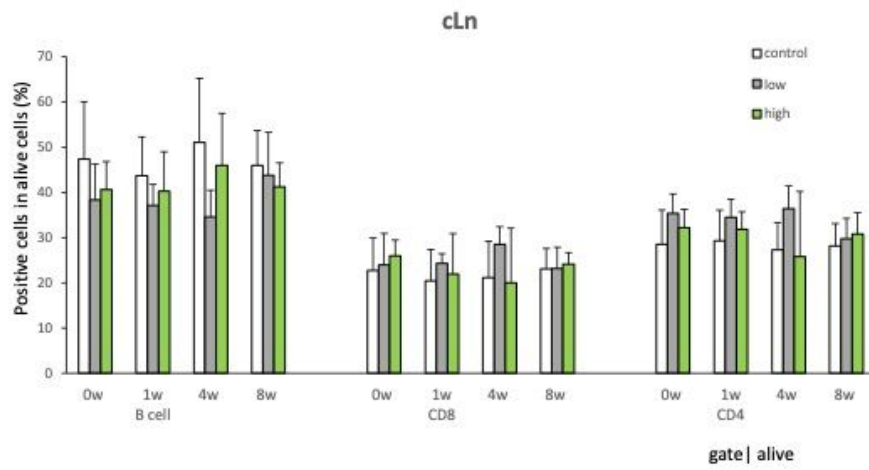
Levels of Cytokine, Chemokine and Growth Factor in BALF (8w)



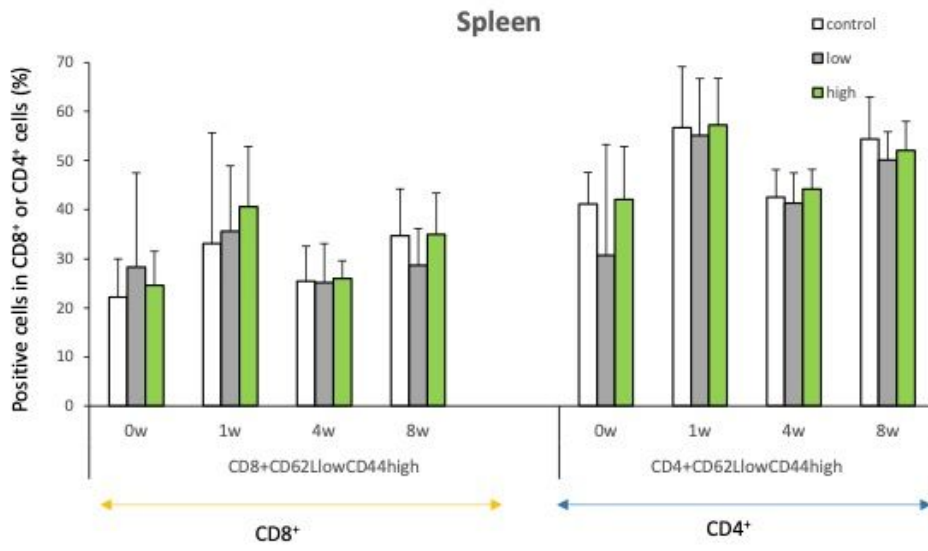
A



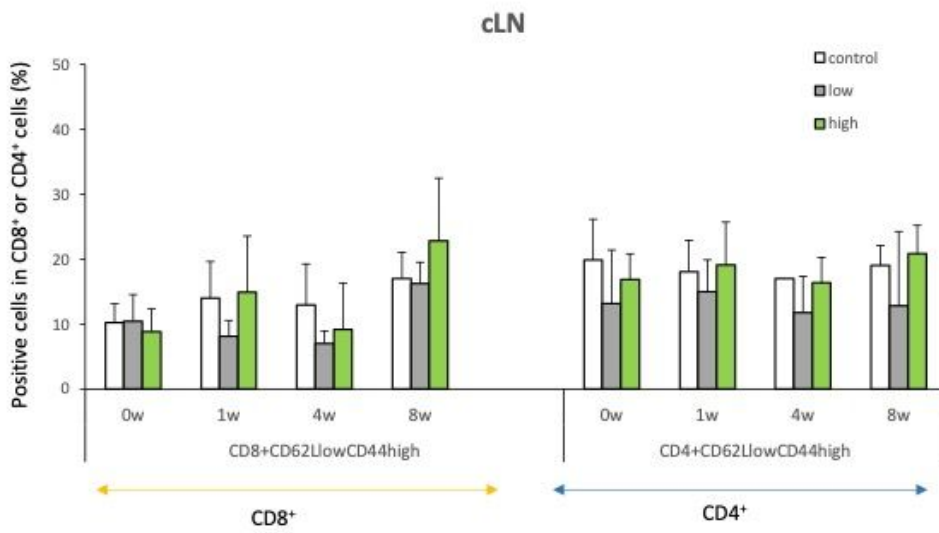
B



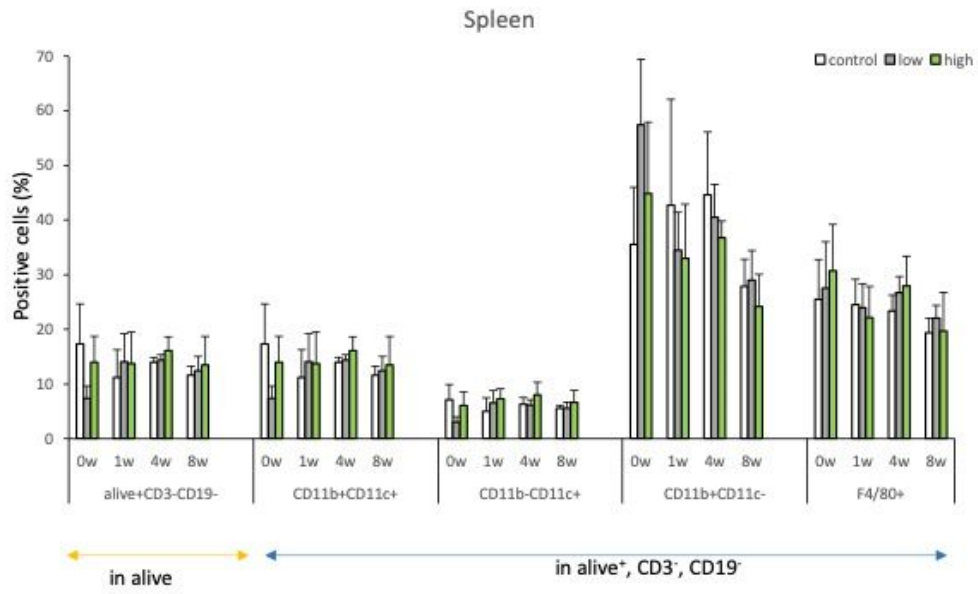
A



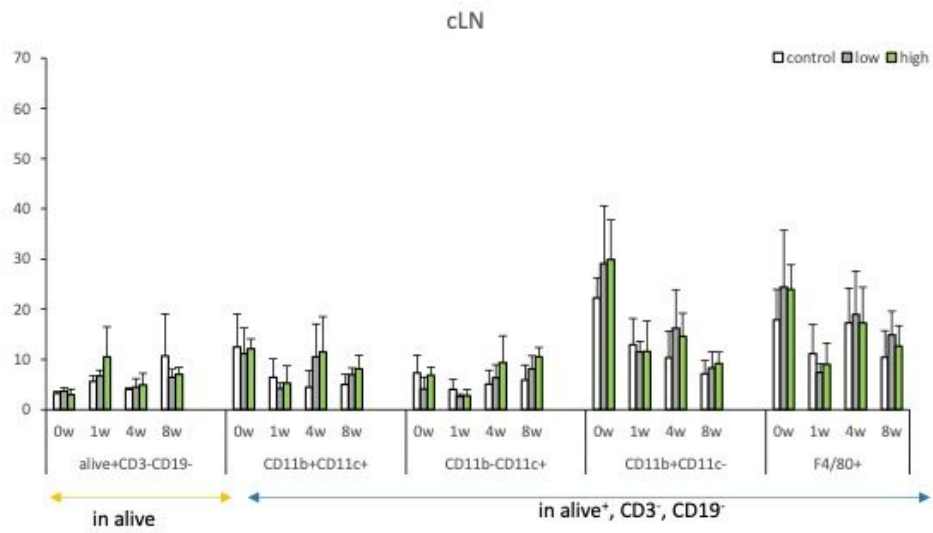
B

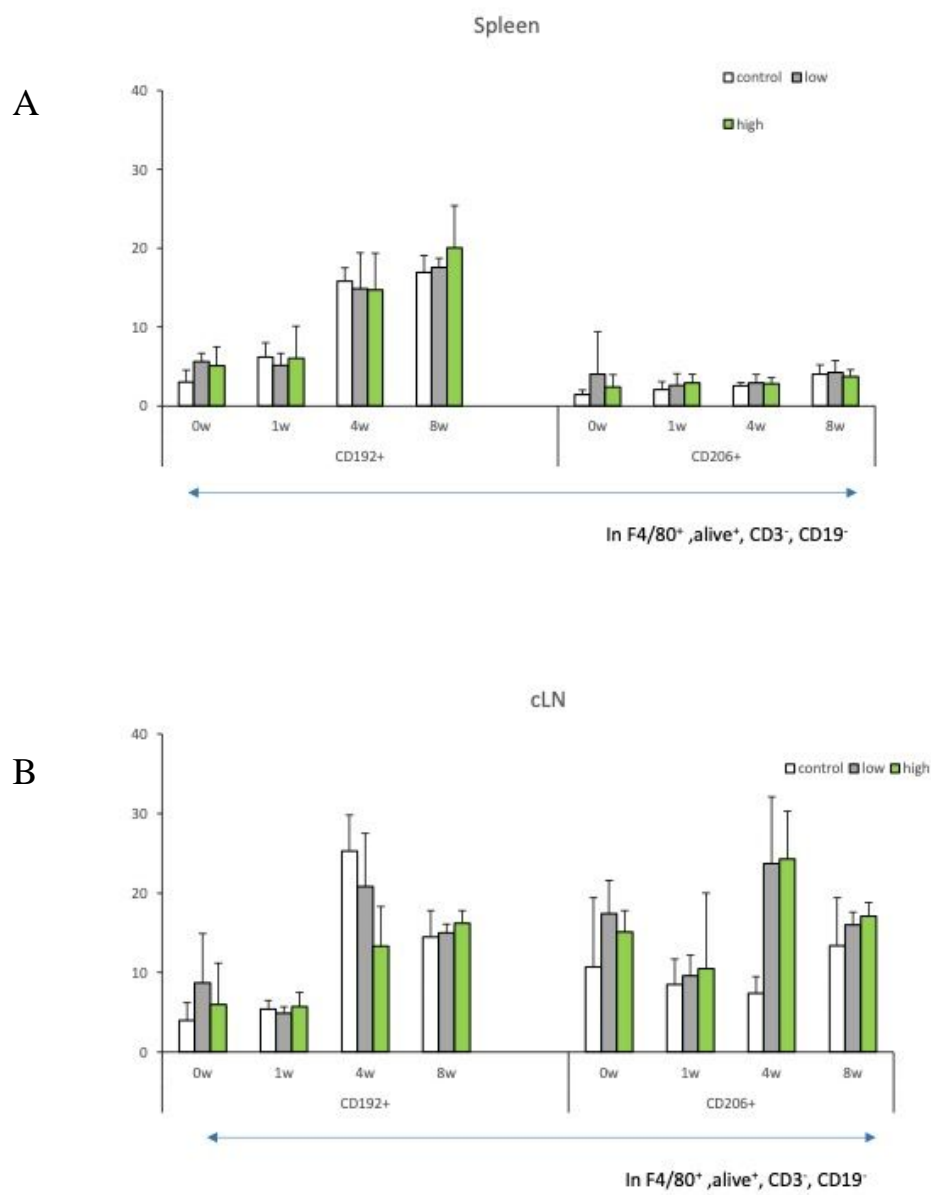


A



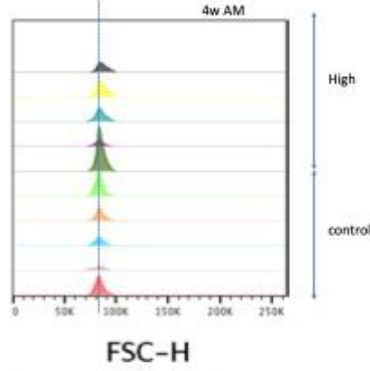
B





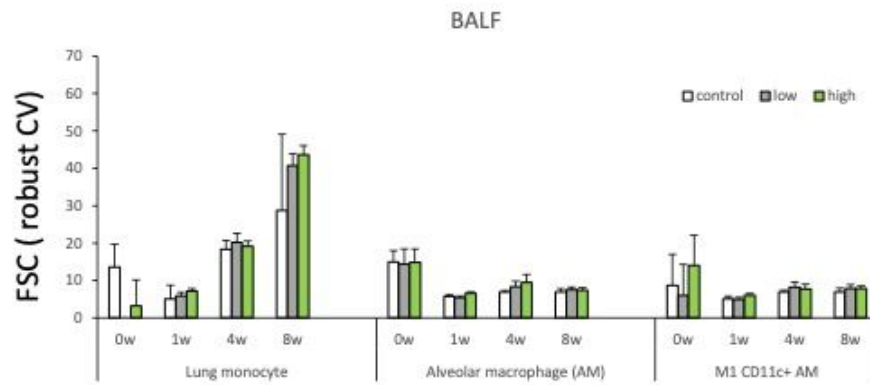
A

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



Sample Name	Subst Name	Count
33171_H2c	ant	1157
33169_H2c	ant	1885
33142_H2c	ant	1436
33151_H2c	ant	770
33163_H2c	ant	3915
33155_H2c	ant	2295
33153_H2c	ant	1264
33145_H2c	ant	940
33149_H2c	ant	450
33143_H2c	ant	1914

B



C

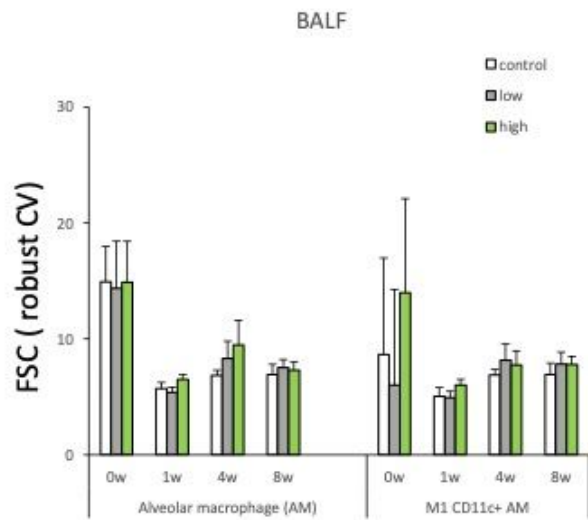


図1A 実験計画

H30

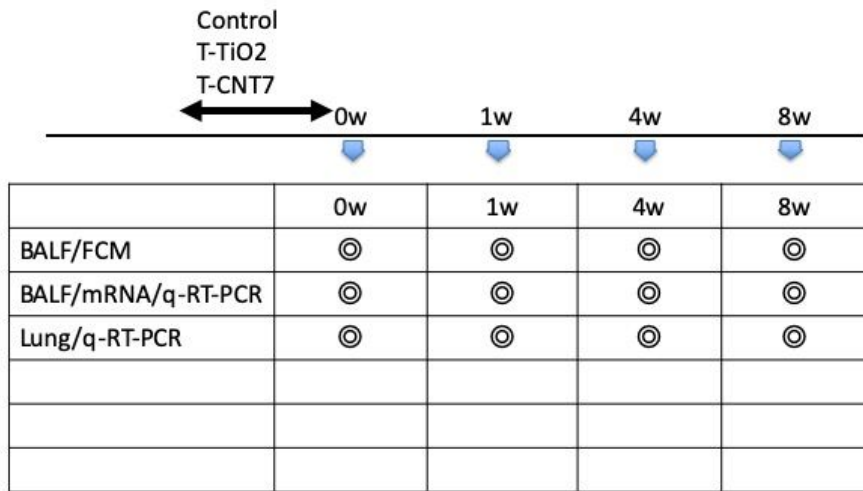
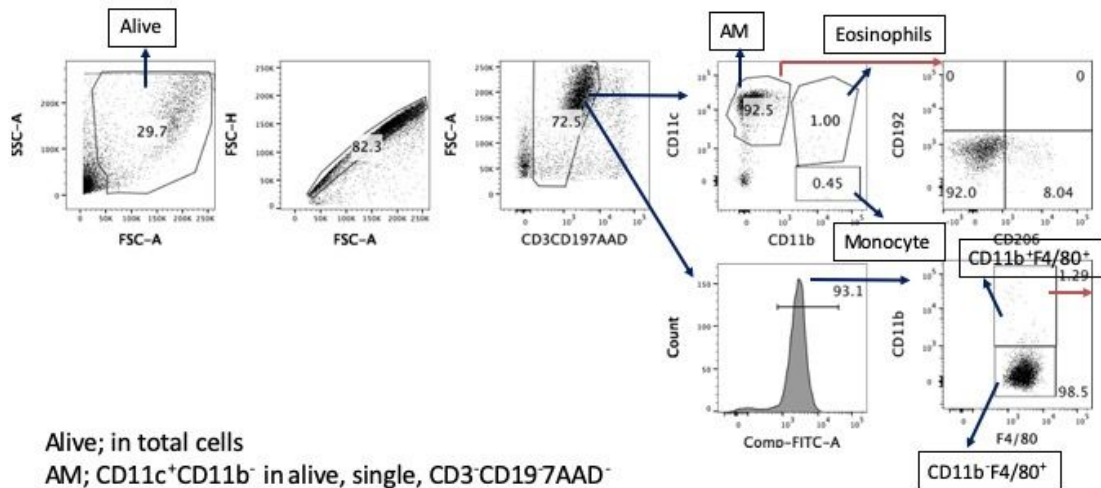


図1B フローサイトメータ解析 (ゲーティングストラテジー)



Alive; in total cells

AM; CD11c⁺CD11b⁻ in alive, single, CD3⁻CD19⁻7AAD⁻

Eosinophils; CD11c⁺CD11b⁺ in alive, single, CD3⁻CD19⁻7AAD⁻

Monocyte; CD11c⁻CD11b⁺ in alive, single, CD3⁻CD19⁻7AAD⁻

F4/80⁻; F4/80⁺ in alive, single, CD3⁻CD19⁻7AAD⁻

図2A BALF中の各細胞分画

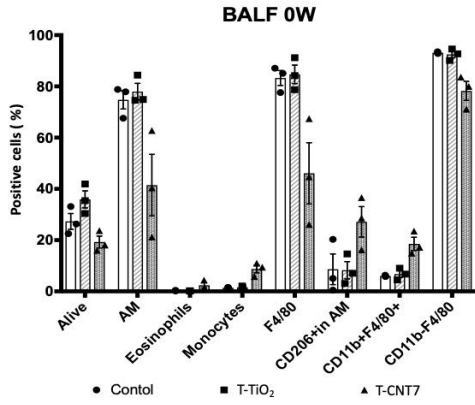


図2B BALF中の各細胞分画

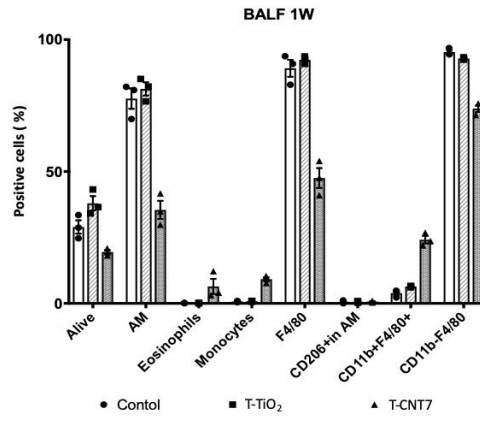


図2C BALF中の各細胞分画

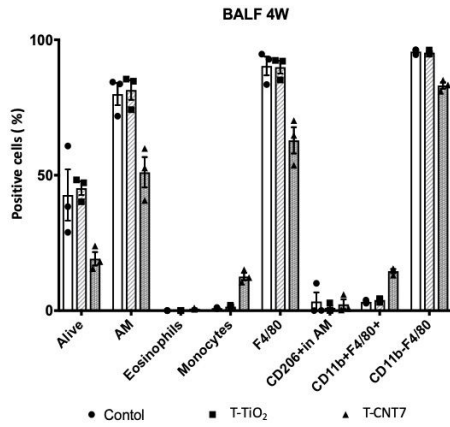


図2D BALF中の各細胞分画

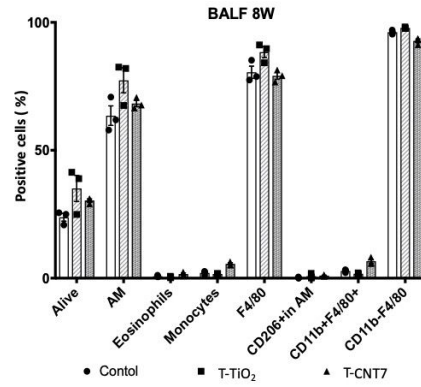


図3A 肺胞マクロファージの経時的変化

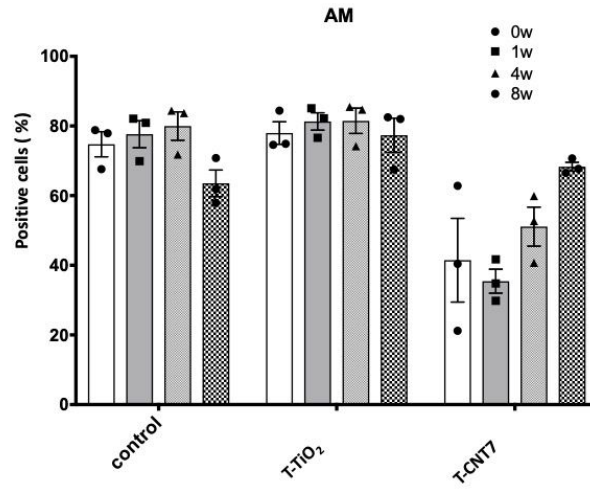


図3B 好酸球の経時的変化

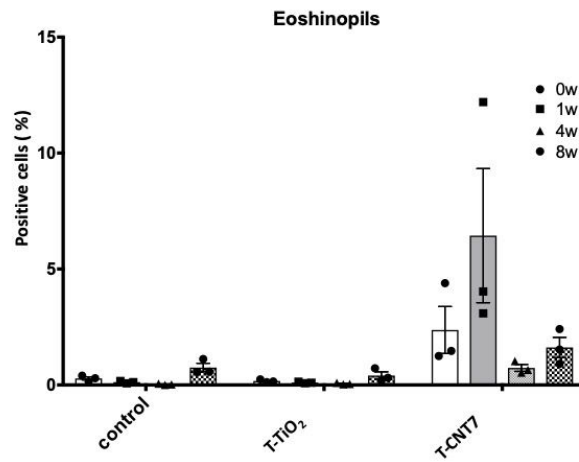


図3C 単球の経時的変化

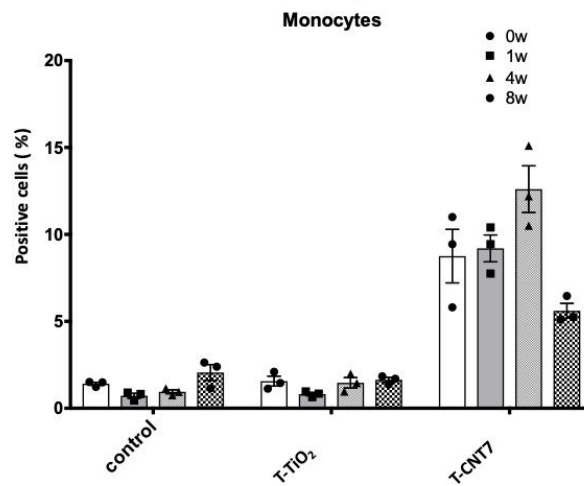


図4A CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージの経時的変化

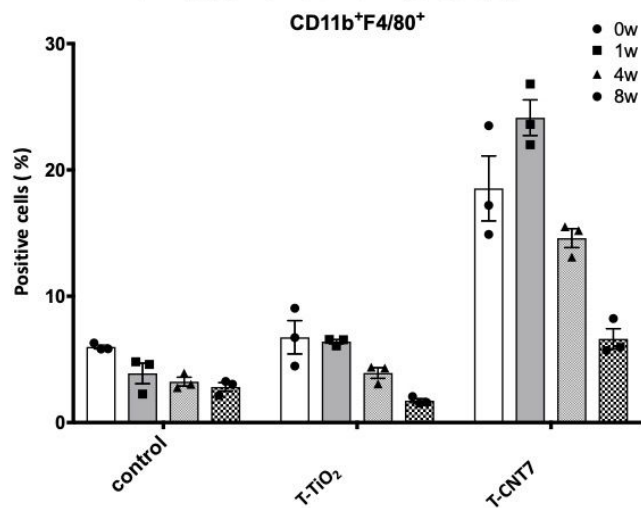


図4B M2型肺胞マクロファージの経時的変化

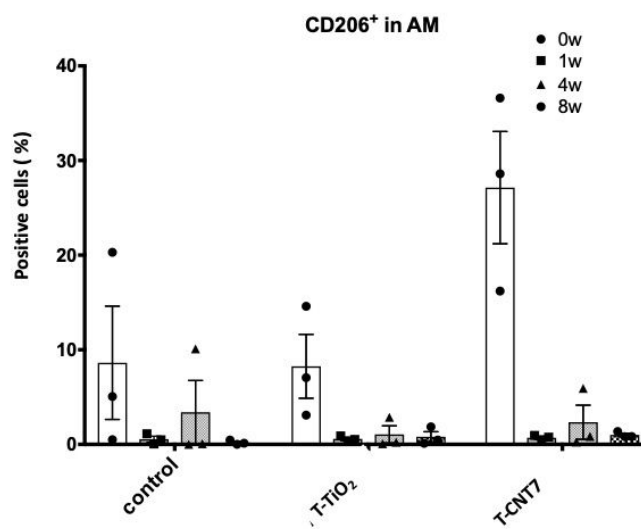


図5A

肺泡マクロファージにおけるCD36の経時的変化

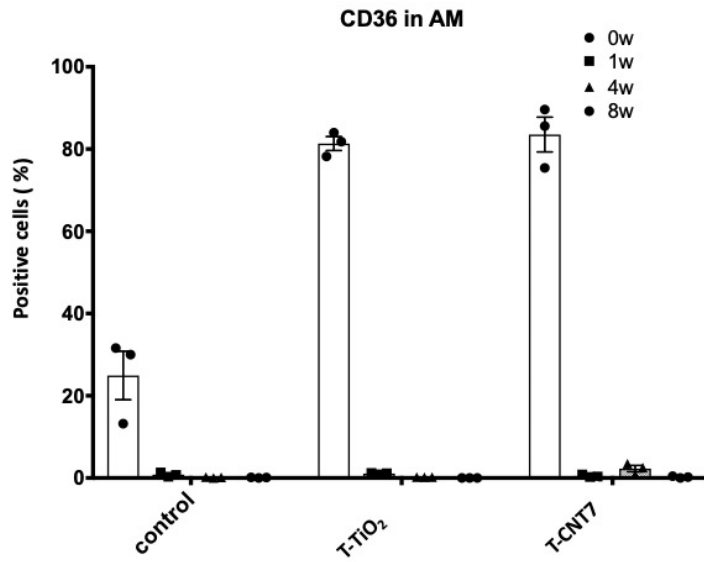


図5B CD11b⁺F4/80⁺肺泡マクロファージにおけるCD36の経時的変化

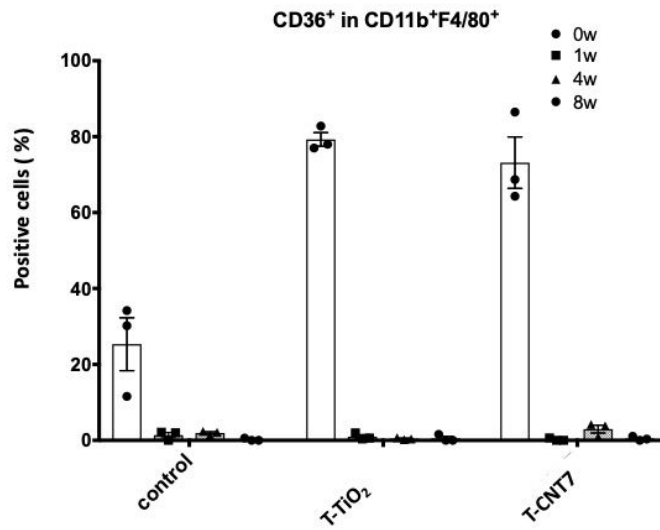


図6A 肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化

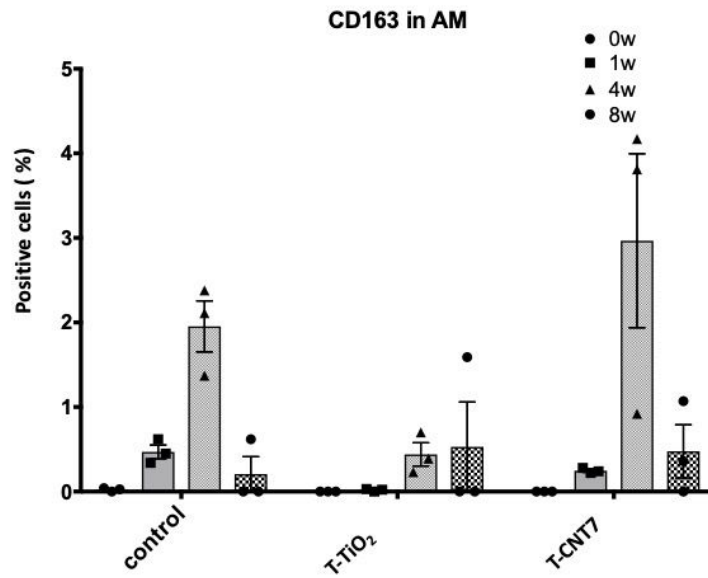
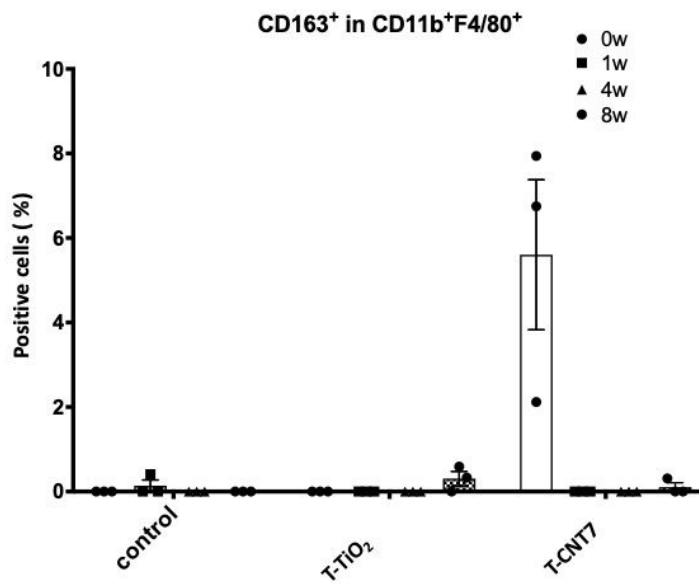


図6B CD11b⁺F4/80⁺肺胞マクロファージにおけるCD163の経時的変化



BALF細胞におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

H30

図7A

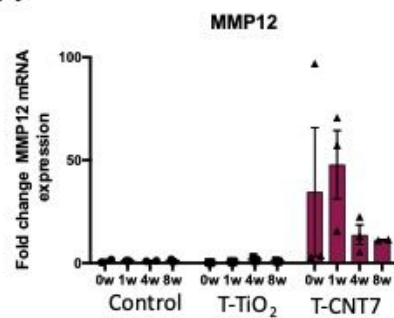
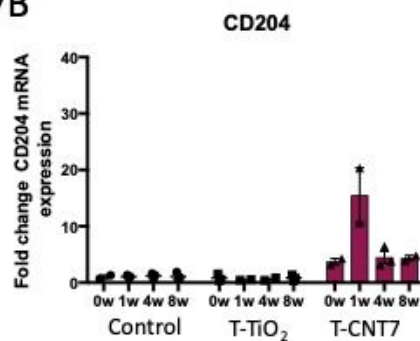
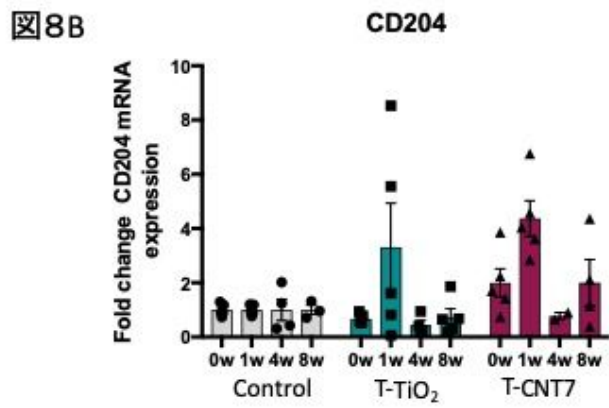
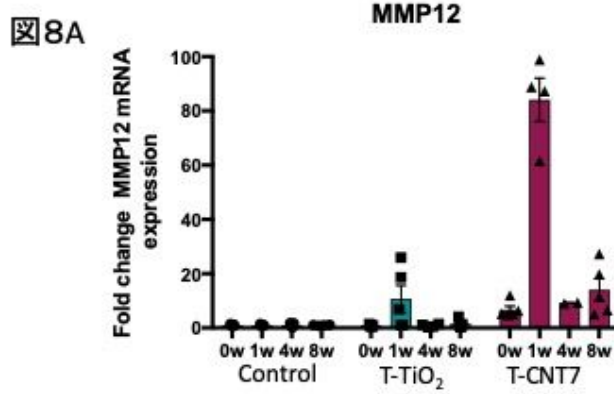


図7B



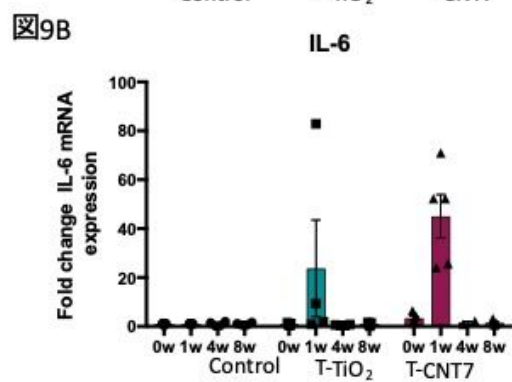
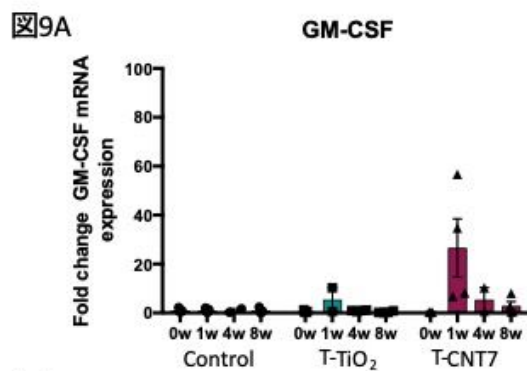
肺組織におけるMMP12およびCD204 mRNA発現

H30



肺組織におけるGM-CSFおよびIL-6 mRNA発現

H30



肺組織におけるIL-33およびColIV mRNA発現

H30

図10A

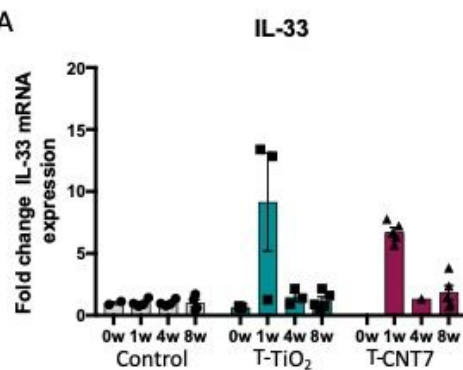
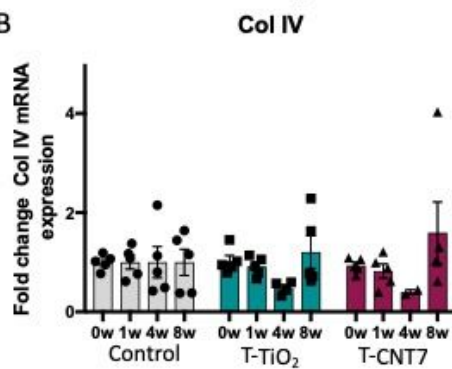


図10B



肺組織におけるTIMP-1およびVEGF mRNA発現

H30

図11A

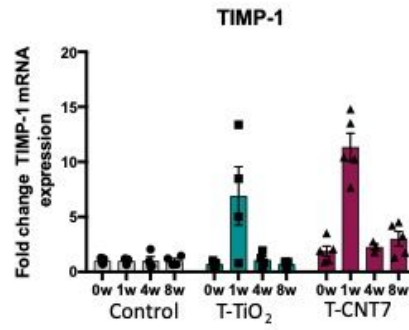


図11B

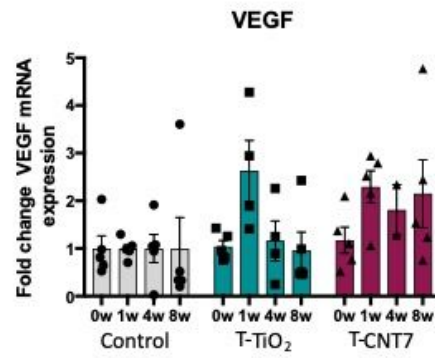


図 1A 実験計画 (H30年度継続実験)

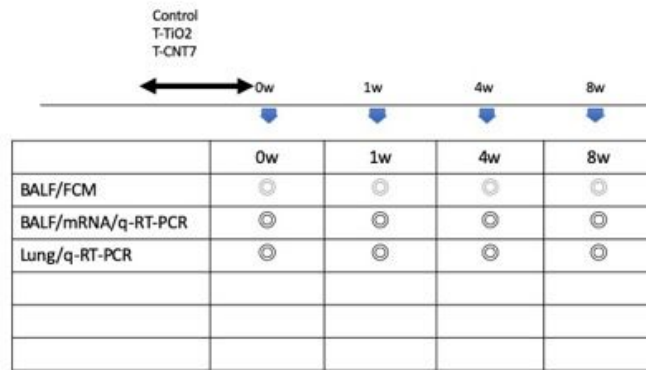
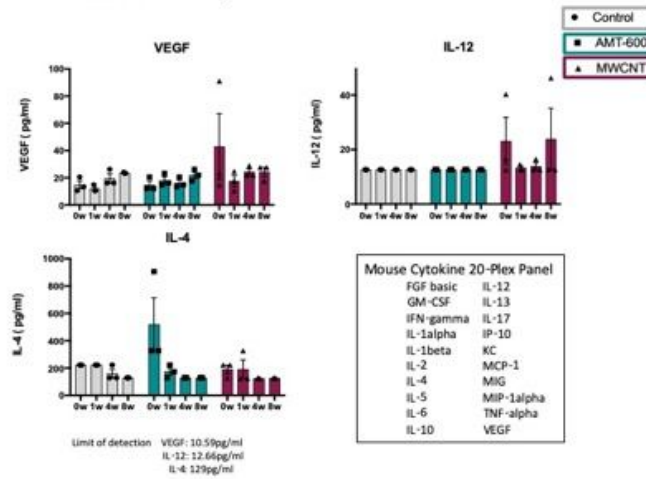


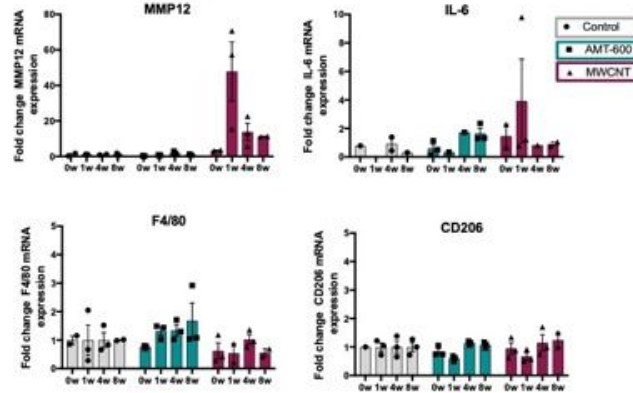
図 1B

Levels of VEGF, IL-12 and IL-4 in BALF

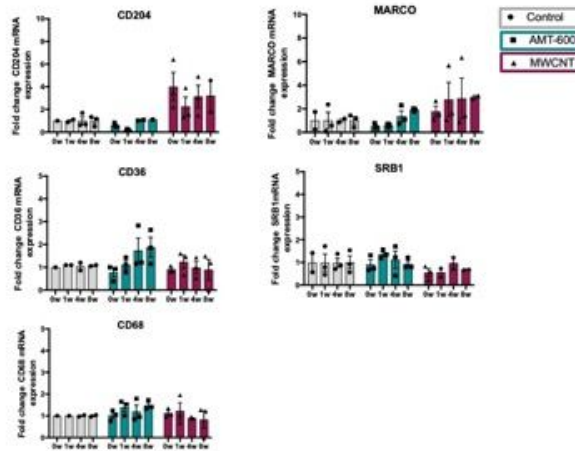


平均±標準偏差にて示す (n=3)。

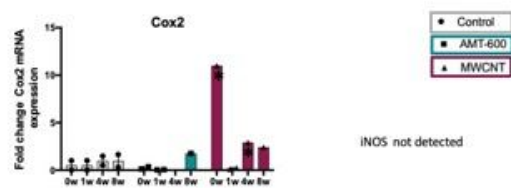
2A Gene expression of MMP12, IL-6 and macrophage marker (F4/80, CD206) in BLAF cells



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)。* $p < 0.05$

図3A

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

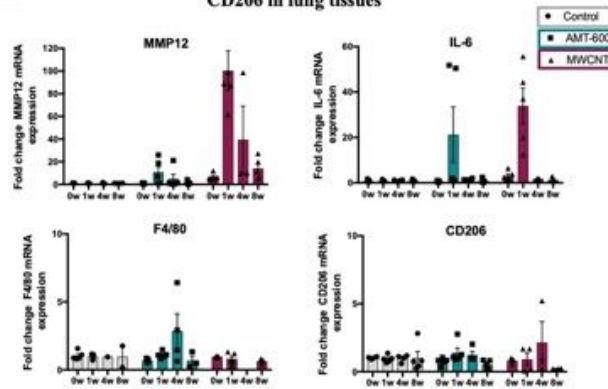


図3B

Gene expression of Scavenger receptors in lung tissues

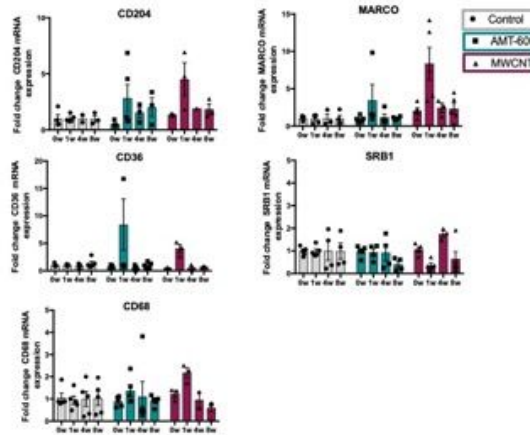
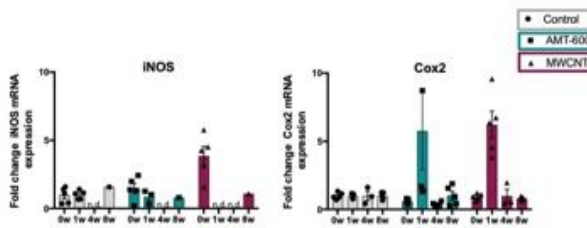


図3C

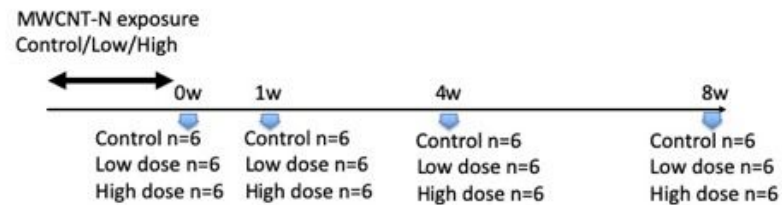
Gene expression of iNOS and Cox2 in lung tissues



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

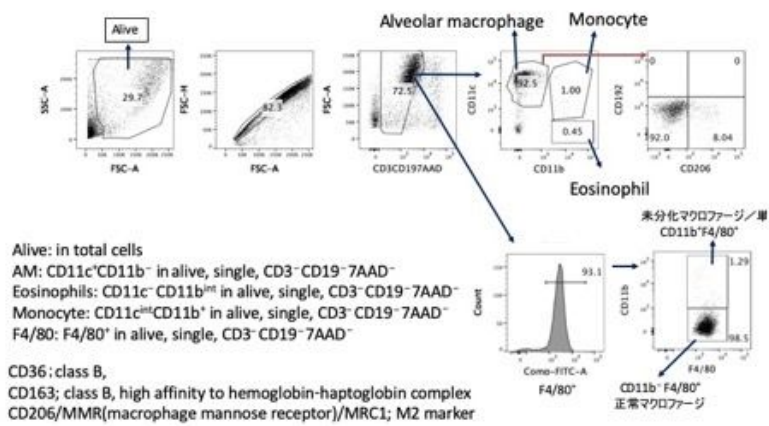


図 6. MWCNT-N暴露後0～8週目でのBALF細胞分画

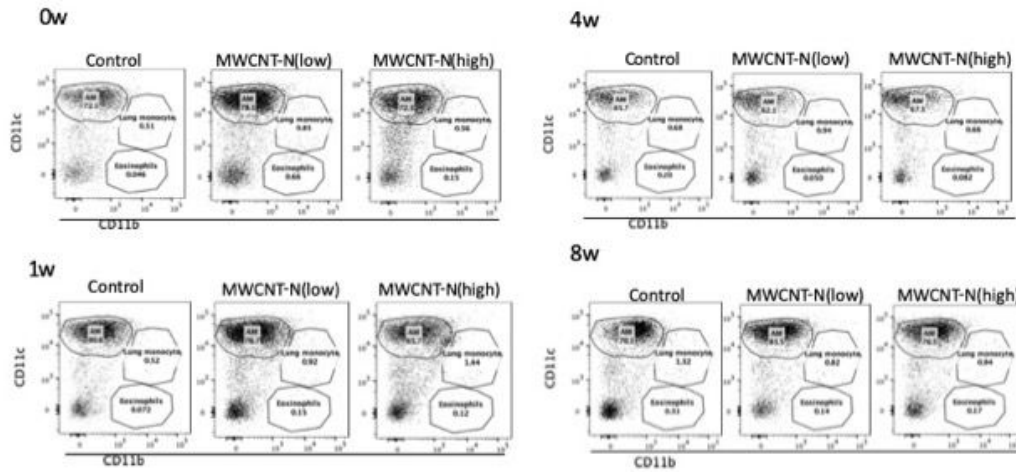
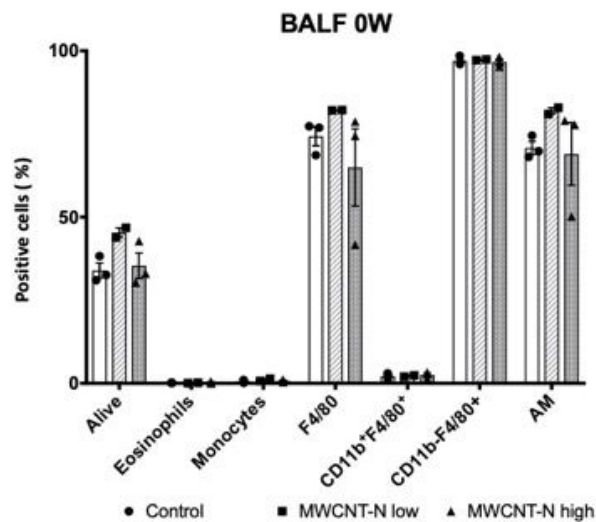


図2に示すようなGating方法にてCD11c/CD11bの展開により、肺胞マクロファージ、単球、好酸球分画の割合を定量化した。図は代表的なデータを示す。

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

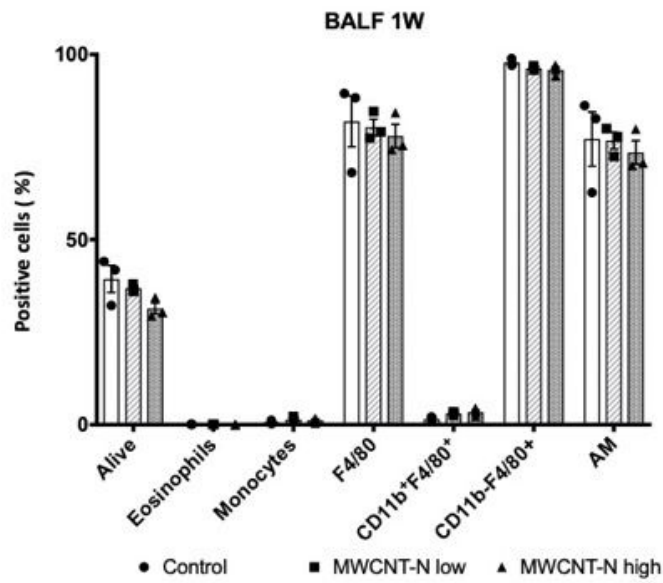
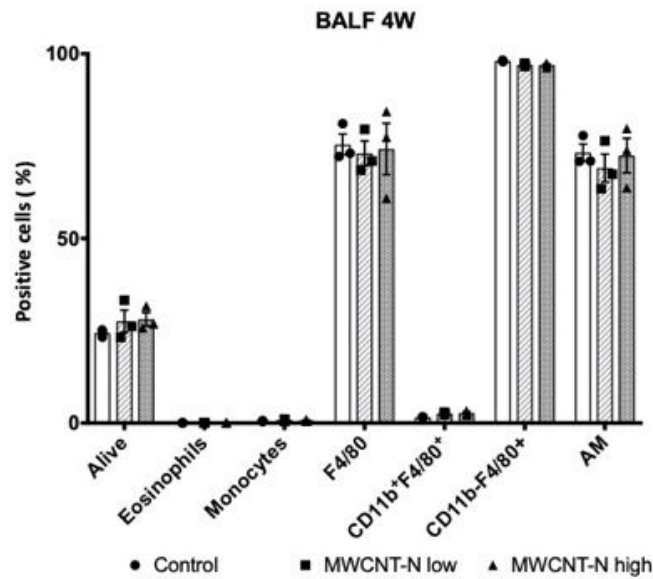


図 9 . MWCNT-N暴露後 4 週目でのBALF細胞分画



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

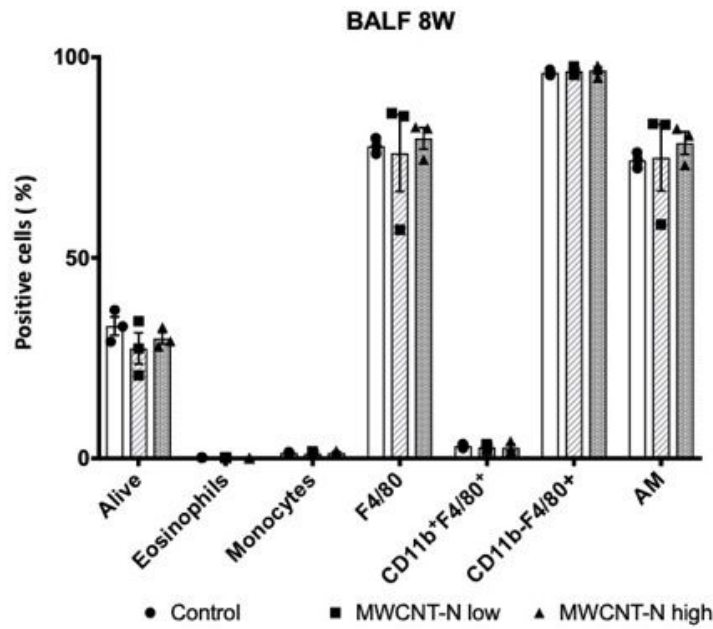
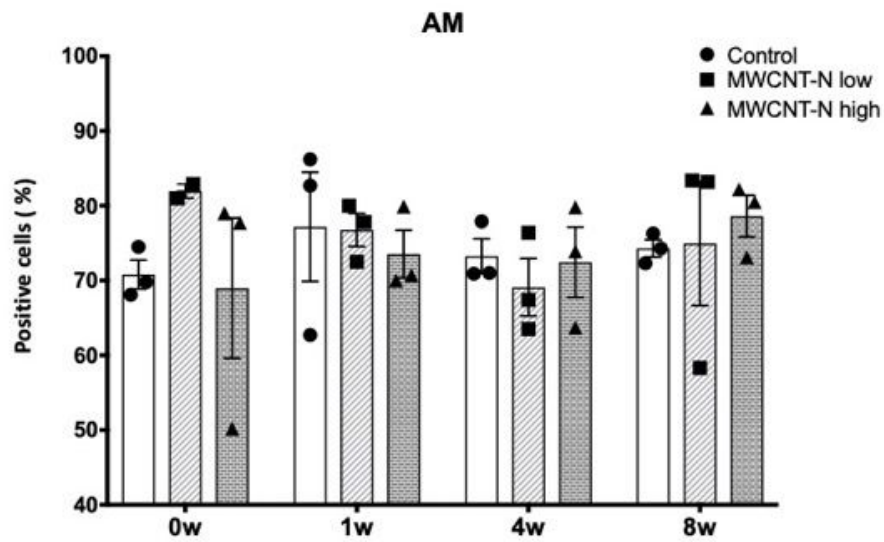
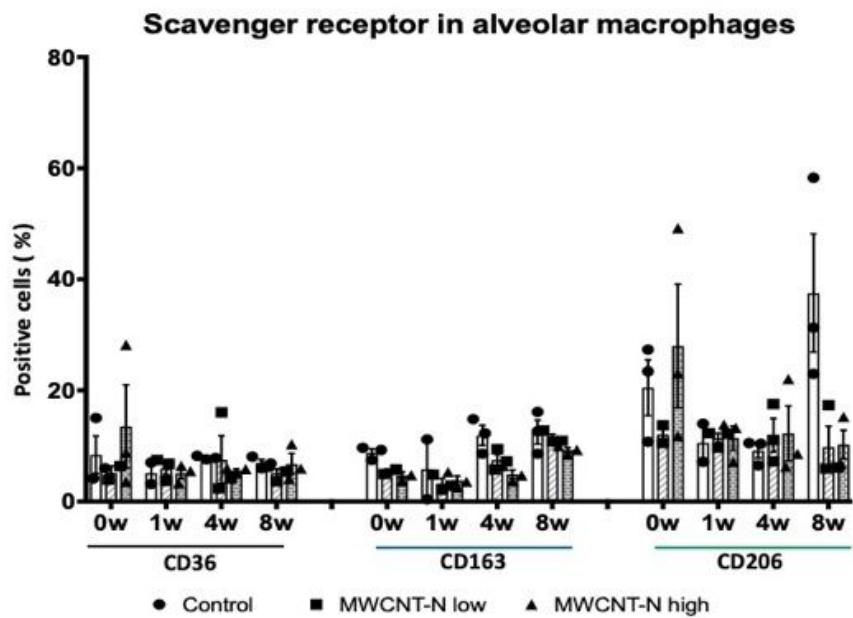


図 1 1. MWCNT-N暴露後の肺胞マクロファージの経時的変化



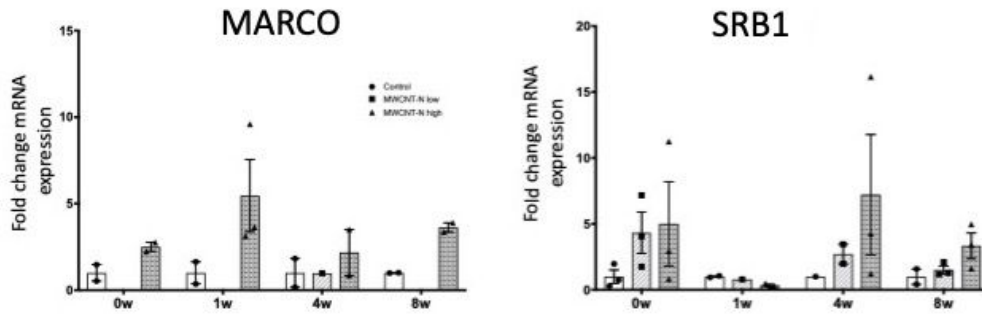
肺胞マクロファージ分画の割合を平均±標準偏差で示す (n=3)。

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



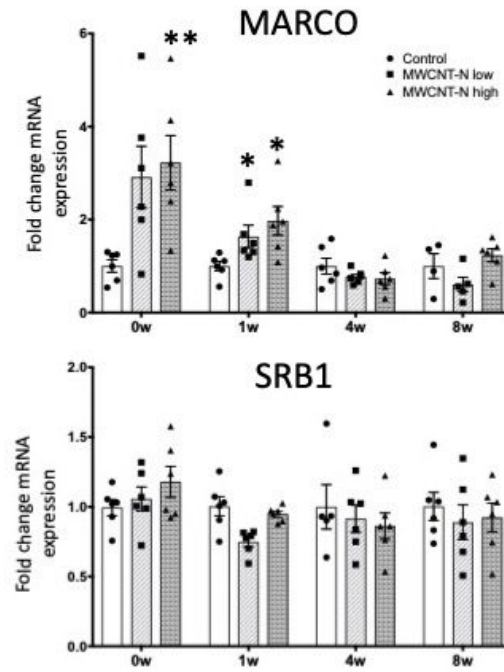
暴露後、0～8週目での肺胞マクロファージにおけるスカベンジャー受容体（CD36, CD163, CD206）の発現をフローサイトメータにて解析し、それぞれの発現を平均±標準偏差で示す（n=3）。

図 1 3. BALF細胞におけるスカベンジャー受容体



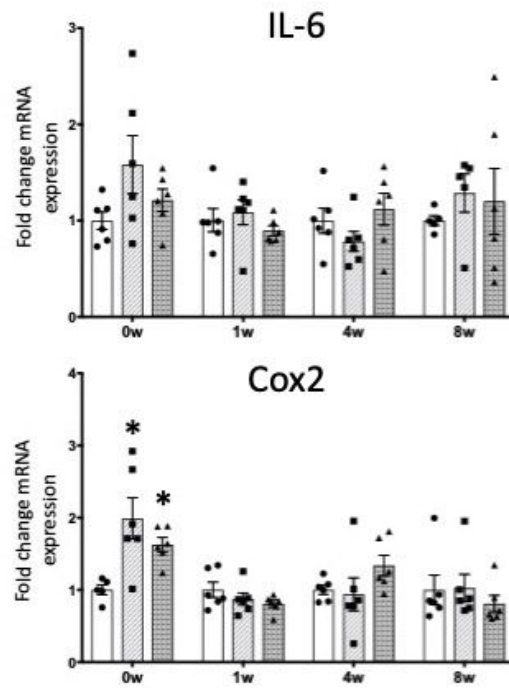
BALF細胞におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3)。

図 1 4. 肺組織におけるスカベンジャー受容体



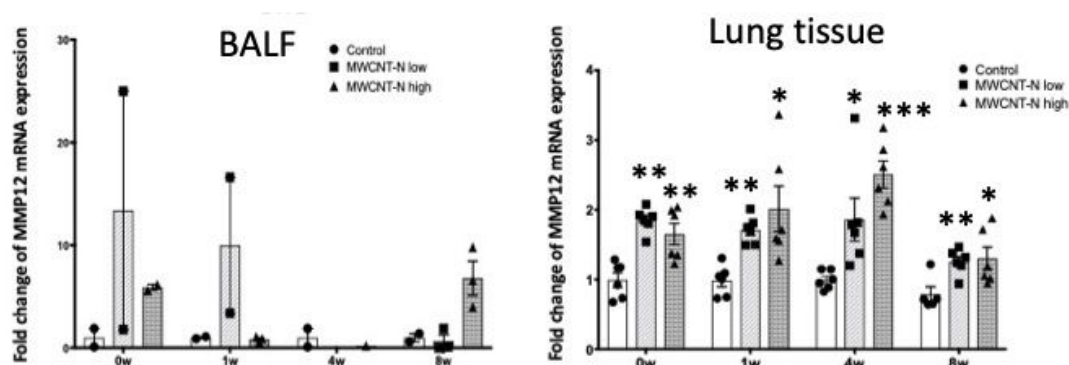
肺組織におけるスカベンジャー受容体mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3) 。*p<0.05, **p<0.005, vs control.

図 1 5 . 肺組織における酸化ストレス関連遺伝子



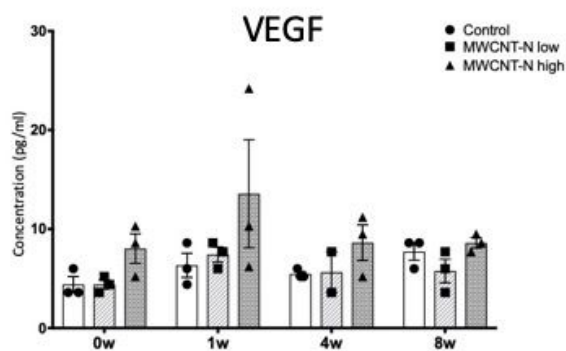
肺組織における酸化ストレス関連遺伝子mRNA発現に関して、定量RT-PCRにて検討した。平均±標準偏差にて示す (n=3) 。*p<0.05, vs control.

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

雑誌

発表者指名	論文タイトル名	発表雑誌	巻号	ページ	出版年
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N.	Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes.	PLoS One	13(10):	e0205702	2018