

令和2年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

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

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

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

### 研究要旨

ナノマテリアル曝露による感染性免疫系への影響の効率的な評価を検討するため、前年度実施した MWNT-7 の複数回の吸入曝露による respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルでの影響評価に続いて、吸入曝露後の RSV 感染回復期における評価を実施した。前回同様にウイルス感染前 7、5 および 3 日に MWNT-7 を Taqaan 法により吸入曝露し、その後 RSV をマウスに経鼻感染させて評価した。感染 21 日後においては、全マウスで肺洗浄液中の肺炎マーカー CCL5 (RANTES) は検出されず、TGF- $\beta$  は高用量曝露-感染群で上昇した。肺の病理組織像において、RSV 感染のみでは肺炎はほぼ終息していたのに対して、MWNT-7 曝露マウスではカーボン貪食マクロファージの集束や肺胞壁・膠原繊維の肥厚など明確な肺炎増悪化が認められ、特に高用量曝露で顕著であった。曝露群の気道上皮では、杯細胞等の粘性多糖の過分泌 (PAS 染色陽性) などが認められ、RSV 感染で亢進していることも見出した。この様に MWNT-7 吸入曝露により RSV 肺炎は回復期でも継続亢進しており、最盛期 (感染 5 日後) で見出した肺炎マーカーの上昇をよく反映した結果が得られた。また、喘息ほど顕著ではないが杯細胞等の増生など気道リモデリング様病変の亢進が見出されたことから、気道上皮の機能に関わる因子の探索研究も今後実施される必要があると考える。

## A. 研究目的

ナノマテリアル曝露による最も懸念されている体内蓄積に伴う慢性影響については、研究がなされておらず、また定量的なリスク評価のために必要な慢性吸入曝露は多層カーボンナノチューブ(MWNT-7)による報告のみである。そのため、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法の開発は急務である。

前年度は、国立衛研毒性部・高橋祐次先生の研究グループでのMWNT-7のTaqaan法による吸入曝露システムを利用して、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いた複数回(感染前7,5および3日)の吸入曝露によるRSウイルス感染への評価を実施した。そして、感染5日後での肺炎マーカーCCL5 (RANTES)の上昇や肺病理組織学的な検討から肺炎増悪化を見出した。

今年度は、MWNT-7の感染影響の持続性を検討するため、RSV感染回復期である感染21日後での影響評価を実施した。

## B. 方法

### MWNT-7 吸入曝露実験

国立衛研において Taqaan 全身曝露吸入装置 (ver.3.0) を用い、53 $\mu$ m メッシュ濾過した MWNT-7 を質量濃度 3 および 6 mg/m<sup>3</sup> になるように調整して、BALB/c 雌、4 週齢のマウスに 6 時間吸入させた。この実験を 1 日おきに 3 回実施した。最終曝露の 1 日後に曝露マウスは、前年度と同様に SLC (実験動物ブリ

ーダー) に委託して九州保健福祉大学動物実験施設へ移送した。

### RSV マウス感染実験

吸入曝露処置を行ったマウスに RSV A2 株  $5 \times 10^5$  PFU を麻酔下 (ketamine 40  $\mu$ g/g, xylazine 6  $\mu$ g/g、筋注) で経鼻感染させた。RSV 感染 21 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

### 肺重量の計測

MWNT-7 の肺負荷量を測定するために、免疫・病理実験とは別にマウスを確保した。体外に残存しているカーボンのコンタミネーションを避けるため、マウス表皮を除去した上で肺を摘出して、ろ紙にて余分な水分を除去後に電子天秤で計量した。-80°C での凍結保管後、国立衛研毒性部へ冷凍輸送した。

### BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

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

### 肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託し、評価は HE およびマッソントリ

クロム染色下で実施した。さらに、薄層標本を常法に従いPAS染色して観察した。

(倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

(1) BALF中のケモカイン・サイトカインレベルの評価結果

RSV感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカインCCL5のBALF中のレベルは、何れのマウスでも検出限界以下であり、感染急性期で誘導される指標であることが判明した。一方、Pro-fibrogenic factorであるTGF- $\beta$ は、0(対照) および3 mg/m<sup>3</sup> (低用量) 曝露では感染の有無に関係なく前回の実験(感染5日後)と同程度のレベルで検出されたが、6 mg/m<sup>3</sup> (高用量) 曝露では感染マウスで1.5~2倍程度上昇していた。

(2) 肺の病理組織学評価結果

HE染色およびマッソントリクロム染色プレパラートの検鏡により、マウス肺全葉を検討した。RSV感染のみ(0 mg/m<sup>3</sup> 曝露)では、部分的にリンパ球の浸潤は認められたが、ほぼ間質性の肺炎は終息していた。MWNT-7の低用量曝露では、感染の有無に関わらずカーボン貪食マクロファージの集束と肉芽腫様の細胞

が観察され、感染回復期においてもMWNT-7は肺組織に残存していることが判明した。高用量曝露では、カーボン貪食マクロファージマクロファージの集束が多いだけでなく、感染群において細胞壁の肥厚や動脈周囲へのリンパ球浸潤が残っており、また膠原繊維も多くみられるなど間質性肺炎の進行像が散見された。また、II型肺胞上皮細胞の部分的な増生も認められたので、PAS染色による評価を引き続き実施した。

PAS染色により感染の有無に関わらず、対照群では陽性細胞は確認されなかった。高用量曝露-RSV感染群では、細気管支での陽性細胞の数や細胞層が厚く見られ、部分的ではあるが気管支で粘性多糖を過分泌した杯細胞が認められた。また、PAS陽性細胞の存在部位とカーボン貪食マクロファージの集束は必ずしも関連があるようには見られなかった。

## D. 考察

前回、国立衛研・毒性部との共同実験で、Taquann 全身曝露吸入装置でのMWNT-7 複数回の吸入曝露-RSV 感染実験を実施し、感染5日後の最盛期において病態としての肺炎の増悪化は明確ではなかったが、CCL5 や TGF- $\beta$  が影響評価の指標となる可能性があることが示された。そこで今年度は、MWNT-7 吸入曝露の RSV 感染からの回復期への影響を評価するため、前回試験と同条件によ

る感染 21 日後での検討を実施した。

これまでの研究実績から、マウスモデルにおいて RSV は感染 4・5 日後に増殖のピークを迎え、10 日ごろにはウイルスが消失して 2-3 週間後には肺炎が終息することが分かっていた。本試験でも RSV 感染対照群では肺炎はほぼ終息していることが病理組織像から確認された。BALF 中の肺炎マーカー CCL5 は全マウスにおいて検出限界以下であったが、TGF- $\beta$  は最盛期と変わらないレベルで検出され、高用量曝露-感染群では対照より高値を示し、MWNT-7 吸入曝露の影響が回復期でも進行しつつある可能性が示された。そして、最盛期より II 型肺胞上皮細胞が増生しているような組織像が見られたことより、PAS 染色による解析を感染 5 日後の薄層標本とともに実施した。

感染回復期においては、集束マクロファージ以外の免疫担当細胞はあまり残存していないと予測していた。しかし、カーボン貪食マクロファージの周囲にリンパ球浸潤も多く残っており、本来免疫の回復に伴ってスカベンジンされるはずのリンパ球が、その機能の低下したマクロファージ近傍に残ったと考えられる。一方、PAS 陽性で示される粘性多糖分泌細胞は感染 5 日後よりむしろ感染 21 日後に多く見出された。これは MWNT-7 の影響がウイルス感染の動態とは異なって進行していることを強く示唆するものであった。また膠原繊維の

出現も TGF- $\beta$  の増加と共に MWNT-7 の影響が進行していることを反映していた。

今回、高用量曝露-感染の一部マウスでは粘性多糖の過分泌が見られており、致死性の影響であった可能性も残されている。さらに部分的に杯細胞の増生があり、好酸球の浸潤がないため喘息とは機序は異なるが、気道リモデリングが生じている可能性も示された。今後、上皮細胞の損傷や修復に関わる因子の探索やマクロファージの機能との関連についてさらなる検討が必要と考えられる。

## E. 結論

1. Taquann 全身曝露吸入装置を用いた MWNT-7 の複数回曝露による RSV 感染マウスへの感染回復期 (21 日後) での影響評価において、RSV 感染対照群では肺炎は終息していたのに対して、MWNT-7 曝露群では明確な肺炎像を確認した。
2. MWNT-7 曝露群では、カーボン貪食マクロファージの集束は感染の有無に関わらず認められたが、感染群では近傍のリンパ球の浸潤も顕著であった。
3. MWNT-7 曝露群では、粘性多糖を産生する PAS 陽性細胞が感染 5 日後より多く見られ、特に感染群ではその傾向が強かった。
4. MWNT-7 の吸入曝露による回復期の肺胞壁の肥厚等の間質性肺炎の残存は、これまで最盛期 (感染 5 日後) で見

出したCCL5などのマーカー上昇をよく反映するものであった。

10.1016/j.dib.2019.105011

2. 学会発表  
なし。

#### **F.健康危険情報**

なし

#### **G. 研究発表**

1.論文発表

Tange, Y., Yoshitake, S., Watanabe, W. Data on producing an infusion fluid that contains nitric oxide. D. In Brief. (2020) 20, 105011-105014. DOI:

#### **H. 知的財産所有権の出願・登録状況**

(予定も含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他