

令和3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:

ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究
(21KD2004)

分担研究課題名: 間歇吸入曝露による慢性影響評価に関する病理学的研究

研究分担者: 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所客員研究員
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究協力者: 北條 幹 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員

研究協力者: 前野 愛 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部生体影響研究科

研究協力者: 横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者: 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

ナノマテリアル曝露により懸念された健康・環境へのリスク評価の必要性の国際的な高まりを受けて 15 年近くが過ぎ、従前の化学物質のリスク評価・管理の枠組みを拡張する方向で様々な評価法の開発が進められてきた。さらに、ナノマテリアルよりもより広い分野の新材料マテリアルの安全性評価に焦点が移りつつある。毒性学的観点からは、評価対象がアドバンスドマテリアルに拡大することになっても、生体内への吸収性や蓄積性、表面活性の増強による重要な生体影響が慢性影響であることには変わりはない。この社会的ニーズにかなった新材料マテリアルはより広範且つ長期間に渡り使用され続けることが求められることとなり、慢性影響評価はこれまで以上に重要な評価手法として位置づけられるようになると考えられる。本研究では、この間歇型曝露手法の利点を更に活かして、複数の慢性試験を同時期に効率的に曝露できる手法を開発することを目的とする。本分担研究では、先ず、先行研究において OECD TG451 により実施された MWNT-7 の先行試験(Particle Fibre Tox 2016, 13:53)との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした 2 年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析する。曝露時間は 6 時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために 4 週毎の間歇全身曝露吸入を継続し、計 26 回の曝露を実施した。曝露濃度は、低濃度群(L 群); $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群(H 群); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であった。群間に死亡率の差は認められなかった。肉眼的に肺は曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量は増加した。2 年目の肺負荷量は、L 群; $61.1 \pm 2.2 \text{ } \mu\text{g/lung}$ 、H 群; $91.6 \pm 21.5 \text{ } \mu\text{g/lung}$ であった。肉眼的に L 群に 2 例に結節性病変を確認し、組織学的に腺癌であった。免疫染色において TTF-1 陽性、CC10 陰性であり、II 型肺胞上皮由来の腺癌である事が示された。MWNT-7 の終末細気管支領域への集積と、それによる組織反応の様態を解析し、用量作用関係に検討に必要な諸要件を検討した。

A. 研究目的

新素材としての産業用ナノマテリアルについては、新しい物性に伴う未知のヒト健康影響の懸念に対して適正な安全性評価手法の確立が急務となっているが、これまで 15 年近くにわたり OECD や各国が各種研究を精力的に行ってきたにもかかわらず、未だに体系的な評価手法は見いだせない。我々は、これまでの研究において、慢性影響に関する知見を積み上げ、二年間の連続吸入曝露との結果を比較可能な間歇型曝露手法の開発を行ってきた。本研究では、間歇型曝露手法の効率化を更に推し進めて、より効率的な曝露手法を開発することを目的とする。本分担研究では、先ず、先行研究において OECD TG451 により実施された MWNT-7 の先行試験 (Particle Fibre Tox 2016, 13:53) との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした 2 年間の間歇吸入曝露実験の結果を解析する。

B. 研究方法

本分担研究では、主として肺の病理組織学的な検討を担当するが、今年度は、実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する。

B-1. 検体

検体は多層カーボンナノチューブの一つである MWNT-7 (三井、lot No.: 060125-01k) を使用した。高分散性の乾燥検体とするため、tert-ブチルアルコール (特級、関東化学株式会社) に懸濁、53 μ m の金属シブ (特注品、セイシン企業) でろ過、凍結乾燥によって乾燥検体を得る Taquann 法処理を行った。以下、Taquann 処理 MWNT-7 を、T-CNT7#53 と記載する。

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。

2) 群構成

対照群 (C 群、清浄空気のみ)、低濃度群 (L 群、目標濃度 3 mg/m³)、高濃度群 (H 群、目標濃度 6 mg/m³) の 3 群構成とした。各群 50 匹のマウスを使用し、1 日 6 時間 (10:00~16:00) の全身曝露吸入を 4 週毎に行い、2 年間で 26 回の曝露を行った。

3) 吸入曝露実験装置

T-CNT7#53 のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver3.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)。

B-3. 解剖

マウスは吸入麻醉器 (TK-7、バイオマシナリー) を用い 3.5~4% イソフルラン (DS ファーマアニマルヘルス) による深麻酔下で、眼窩より採血を行い、その後、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛に付着している T-CNT7#53 が組織に混入することを防止するため、開胸前に剥皮して除去した状態にしてサンプリングを行った。

肺負荷量測定用の動物は、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に -80°C で凍結保存した。

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または細胞保存液 (MACS® Tissue Storage Solution, MACS) を 1 mL 注入して BALF を採取した。この作業

を2回行い、約2 mLのBALFを回収した。BALFを回収した肺は、遺伝子発現解析用に副葉を採取してRNALater®に保存した。その後、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)を約1.5 mL注入し、同組成の固定液に浸漬固定した(免疫機能解析用のサンプルは研究分担者の石丸直澄教授が解析を実施)。

病理標本用の動物は、気道内のT-CNT7#53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、左心室から左心耳、肺静脈へ固定液を逆流させて灌流固定した。具体的には、開胸前に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。

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、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

B-4. 肺組織の病理学的解析

固定した肺のパラフィン切片を情報に従って作成し、H&E染色に加え、マッソントリクローム

染色を実施した。TTF-1、CC10、及びKi-67に対する免疫染色をすべての肺パラフィン切片に対して実施した。

B-5. BALF細胞の染色

回収したBALFは、スライドガラス(Matsunami)をセットしたShandon™ EZ single cytofunnel (A78710003, Thermo Fisher Scientific)に150µL分注し、Cytospin 3 (Thermo Fisher Scientific)を用いて、700 rpm、5分間の遠心を行い、細胞塗抹標本作製した。冷風乾燥、メタノール(試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社)で1分間固定した後、pH6.4リン酸緩衝液(武藤化学株式会社)にて洗浄した。3%メイグリュンワルド染色液(富士フィルム和光純薬株式会社)にて45分間染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄した。その後、5%ギムザ染色液(富士フィルム和光純薬株式会社)にて45分間染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄し、乾燥、封入を行った。

B-6. 血液検査及び血液生化学検査

採血直後の血液を対象として、電解質とヘマトクリットを測定した(STAX-5 inspire、株式会社テクノメディカ)。血清を対象として、乾式臨床化学分析装置(富士ドライケムNX500s、富士フィルム株式会社)を用いて血液生化学検査を行った。

C. 研究結果

C-1. 一般状態と体重推移

体重は初回曝露後54週まで、対照群とT-CNT7#53曝露群との間に差はみられなかったが、54週以降、H群で体重低下傾向であった(図1)。2年間の曝露期間において、死亡または切迫屠殺に供した動物は、対照群7/50匹、L群9/50匹、H群13/50匹であった。曝露後

24ヶ月の最終解剖に供した動物数は、対照群 20匹、L群 18匹、H群 16匹であった。死亡率について Kaplan-Meier 解析 (R version 4.0.4)を行い、Log-rank 検定を行ったところ、群間に差は認められなかった(図 2)。

C-2. 肉眼所見・肺重量・肺負荷量

BALF 細胞

最終解剖において、肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した。胸腔壁の背側において、ミルキースポットが脊椎骨の両側に L群 15/18例、H群では 15/16例観察された(図 3)。肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し、灰色から黒色を呈する様子が L群 12/18例、H群では 9/16例観察された(図 4)。L群の 2/18例において、肺に白色腫瘍が観察された(図 5)。胸水が L群 3/18例、H群では 5/16例観察された。肺の腫大に伴うと考えられる心肥大が、L群 4/18例、H群では 6/16例観察され、対照群にも 1/20例観察された(表 1)。

肺重量と肺負荷量は、曝露濃度依存的に増加した(図 6A, B)。肺負荷量は、L群の 6ヶ月、12ヶ月及び 24ヶ月においてそれぞれ 6.4 μ g/動物、22.3 μ g/動物、61.1 μ g/動物、H群の 6ヶ月、12ヶ月及び 24ヶ月においてそれぞれ 15.2 μ g/動物、45.8 μ g/動物、91.6 μ g/動物であった。24ヶ月の時点における肺負荷量はバラツキが大きかった(図 6C)。肺重量と各時点、各群の肺重量と肺負荷量の関係をプロットすると、6ヶ月及び 12ヶ月では各群が明らかに分離するが、24ヶ月では L群と H群が近接していた(図 6D, E, F)。呼吸量は基礎代謝量に応じて増加すること、基礎代謝量は体表面積、或いは体重と関連することから、肺負荷量測定に供した各動物の体重推移と肺負荷量を比較した(図 7A, B, C)。24ヶ月時点では、L群

においては、体重が重い個体ほど肺負荷量が多い傾向にあった。一方、H群では体重が最も軽い個体(#121)の肺負荷量が最も多く、体重と肺負荷量の相関性は明瞭ではなかった。

曝露期間中の体重の積分値として、期間中の平均体重との関係をみると(図 7D)、統計学的有意差はないものの、24ヶ月目においては肺負荷量が多いほど、期間平均体重は減る傾向がみられた。また、肺絶対重量が H群と L群とで差が無い状況にあること(図 7E)から、H群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、これは図 1の体重曲線からも示唆されたことではあるが、H群は、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられた。

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L群、H群で増加しており、T-CNT7#53を貪食した大型の細胞が観察された(図 8)。

C-3. 血液/生化学検査

最終解剖においては、電解質とヘマトクリットに影響はみられなかった。生化学検査においては、T-CNT7#53曝露群において肝の胆道系酵素である LAP (leucine aminopeptidase)、TCHO、BUN の低下がみられたが、いずれも軽度であった(表 2, 表 3)。

C-4. 肺組織の病理学的解析

MWNT-7 の沈着が 2年時は、1年時の状況よりも進行し(図 3)、線維化を伴う慢性肉芽腫性異物反応が用量相関性をもって惹起された。呼吸細気管支炎、リンパ系病変、胸膜病変を認めた。上皮性増殖性病変の発生を、低用量群及び高用量群に認め、対照群には認めなかった。低用量群において肉眼的に観察可能

な肺腺癌が誘発された。

TTF-1、CC10、Ki-67 免疫染色の結果の概要は以下の通りである。

(1) TTF-1 (II型肺胞上皮細胞のマーカー)

正常部では、肺胞内のII型上皮、及び、終末細気管支のクララ細胞の一部の細胞核に陽性であった。肉眼的に確認された腺癌は、TTF-1 陽性、CC10 陰性であった。終末細気管支近傍に MWNT-7 を貪食したマクロファージの集簇を多く認め、それによる局所的な慢性炎症の領域にほぼ一致して TTF-1 陽性細胞の密度の増加を認めた。

(2) CC10 (クララ細胞のマーカー)

CC10 陽性像は、終末細気管支上皮の細胞質に認めた。クララ細胞の多くは核が TTF-1 陽性であった。

(3) Ki-67 (分裂期細胞のマーカー)

今回の染色では、やや染色性が弱いと判定された(肺内のリンパ装置を陽性対照と見做しての判定)。その条件下で、腺癌、終末細気管支近傍の局所的慢性炎症領域の TTF-1 陽性細胞の密集部位のいずれも、標識率は1%に満たなかった。

D. 考察

本分担研究では Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し T-CNT7#53 の2年間の間歇吸入曝露実験において、マウスに6時間/日、4週毎の吸入曝露を行い、最終解剖を行った。現在、詳細な病理組織学的解析を実施中であるため、最終的な結論には至っていないが、以下の事が推察された。

Kaplan-Meier 解析では、死因を考慮せずに解析を行った。その結果、Log-rank 検定では、曝露による影響は認められていない。今後の病理組織評価によって死因を分類することができれば、検体による影響を明らかにできる

可能性がある。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加していた。このような外観の変化は6ヶ月及び12ヶ月の解剖では見られておらず、また病理組織評価においては明確な線維性肉芽腫の形成は認められていない。24ヶ月では肺の弾性が増しており、検体の肺への沈着に伴い、線維化が亢進していることが推察される。

肺重量と肺負荷量の関係については、L群H群ともに、6ヶ月、12ヶ月並びに24ヶ月において吸入曝露回数と肺負荷量の相関関係が見られた。L群($2.7\text{mg}/\text{m}^3$)とH群($5.2\text{mg}/\text{m}^3$)は公比約2であるが、24ヶ月において、H群の肺負荷量($91.6\mu\text{g}/\text{lung}$)はL群の肺負荷量($61.1\mu\text{g}/\text{lung}$)の2倍には到達しなかった。呼吸量と基礎代謝量は相関することから、体重低下による影響が考えられたが、図7Cに示すように、H群では最も体重が低値を示した個体の肺負荷量が最も多く、体重との関連は説明できなかった。肺からの排泄低下である可能性もあるが、肺負荷量測定では全肺を溶解して検体を回収するため、病理組織学的解析による検討ができないため明らかにすることはできなかった。

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数はL群、H群で増加しており、T-CNT7#53を貪食した大型の細胞が観察されたが、多くの細胞は6ヶ月、12ヶ月の中間解剖時に得られた細胞よりも凝集塊を形成する傾向が強かった。今後、凝集塊を示すマクロファージの詳細な解析を行ない、細胞膜、細胞外マトリクスの変化との関係を明らかにする計画である。

肺に付属するリンパ節は、肉眼で明確に観察できるサイズに腫大し、検体の沈着と考えられる黒色を胸呈していた。肺病変として、L群に2例に発がんを示唆する白色結節が観察さ

れたが、H群では観察されていない。

肉学所見では中皮腫と考えられる所見は観察されていないが、胸腔の腔壁側にはミルキースポットが観察されており、これが観察された脊椎の両側は、p53+/-マウスを用いたMWCNT吸入による先行研究において、肉眼では明らかな変化が観察されないが、中皮腫発がんを示唆する顕微鏡的病変が誘発されること確認している部位であるため、今後、さらに病理組織評価を進める。

肺組織の病理組織学的解析により肺腫瘍の誘発を確認したが、肉眼的に確認可能な肺腫瘍の発生についての用量相関性ははっきりしないことから、微小病変、前駆病変の発生の確認を免疫染色により確認した。その結果、終末細気管支近傍におけるMWNT-7を貪食したマクロファージの集簇を多く認め、それによる局所的な慢性炎症の領域にはほぼ一致してTTF-1陽性細胞の密度の増加を認めた。この密集像は病理組織診断学的には過形成性の範疇に留まるが、その原因と考えられるMWNT-7が恒久的にその部位に存在すると想定されることから、腫瘍性増生に発展する基盤となる病変であると考えerる必要性が残る。繊維状の難分解性の異物は、異物除去機構による肺からの排除の速度が遅く、十分に長い期間残留する可能性が高いと考えられるためである。過形成性と診断されたII型上皮の遺伝子解析、遺伝子発現解析の必要性を含め、更なる検討を進める。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いてのT-CNT7#53の2年間の間歇吸入曝露実験を実施した24ヵ月の最終期解剖で得られた結果を解析した結果、群間に死亡率の差は認

められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肺負荷量と肺重量、及び、体重の関係からはH群の吸入量は、肺毒性を超えて一般毒性が強く誘導される量に達しており、発癌性に関しては用量相関性が保証されない曝露濃度であったと考察するのが妥当であると考えられたが、肺組織について免疫染色を用いた詳細な解析を行った結果、用量相関性について、前駆病変に当たる組織変化などの検討を進める必要性が明らかとなり、今後、いくつかの遺伝子情報を含めた解析の必要性を検討する。

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、菅康佑氏、相田麻子氏、相原妃佐子に深く感謝する。

F. 参考文献

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct 13;13(1):53.

G. 研究発表

1. 論文発表

Okubo Y, Ohtake F, Igarashi K, Yasuhiko Y, Hirabayashi Y, Saga Y, Kanno J. Cleaved Delta like 1 intracellular domain regulates neural development via Notch signal-dependent and -independent pathways. Development. 2021 Oct 1;148(19):dev193664. doi: 10.1242/dev.193664. Epub 2021 Oct 4. Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A,

Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D. Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins. *Cancer Sci.* 2021 Jun;112(6):2185-2198. doi: 10.1111/cas.14873. Epub 2021 May 2.

2. 学会発表

Jun Kanno : Histone Modification, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to a Chemical. ASIATOX-IX、(2021.10.22)、Virtual、Oral

ナノ毒性学—粉体毒性学からの複合毒性領域としての展開—Nanomaterials! Let's broaden our minds, Asbestos. 筑波大学大学院、(2021.10.13)、茨城、講義

J. Kanno, K.-I. Aisaki, R. Ono, S. Kitajima : Analysis of Murine Liver mRNA Expression, DNA Methylation, And Histone After Repeated Exposure To Chemicals. EUROTOX 2021 virtual congress、(2021.9.29)、Oral

菅野純、北嶋聡、相崎健一、齊藤洋克、種村健太郎: 肺の遺伝子発現応答と毒性機序予測解析. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

石丸直澄、新垣理恵子、常松貴明、高橋祐次、菅野純: ナノマテリアルの吸入暴露による肺免疫応答と線維化の分子機構. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.9)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、高木篤也、相崎健一、北嶋聡: 異物発癌に関わるトランスクリプトミクス特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

相崎健一、小野竜一、菅野純、北嶋聡: トランスクリプトミクスから見た発癌物質の特性. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純: 「子供の毒性学: 脳の発達を中心に」—イントロダクション—. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

齊藤洋克、北嶋聡、菅野純、種村健太郎: 低用量化学物質の発生-発達期ばく露による成熟後の神経行動毒性の検出と評価—発生-発達期マウスへのネオニコチノイド系農薬ばく露影響解析を中心に—. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.8)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

菅野純、相崎健一、小野竜一、北嶋聡: 毒性 Omics と AI による慢性毒性予測. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

夏目やよい、相崎健一、北嶋聡、Samik GHOSH、北野宏明、水口賢司、菅野純: PPAR α リガンドの比較毒性オミクス. 第 48 回日本毒性学会学術年会、(2021.7.7)、神戸国際会議場、シンポジウム、口演

J. KANNO, K. AISAKI, R. ONO, AND S. KITAJIMA: Comprehensive Histone, DNA Methylation and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposed to Chemicals. CTDC11, (2021.6.15), Virtual, Oral

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

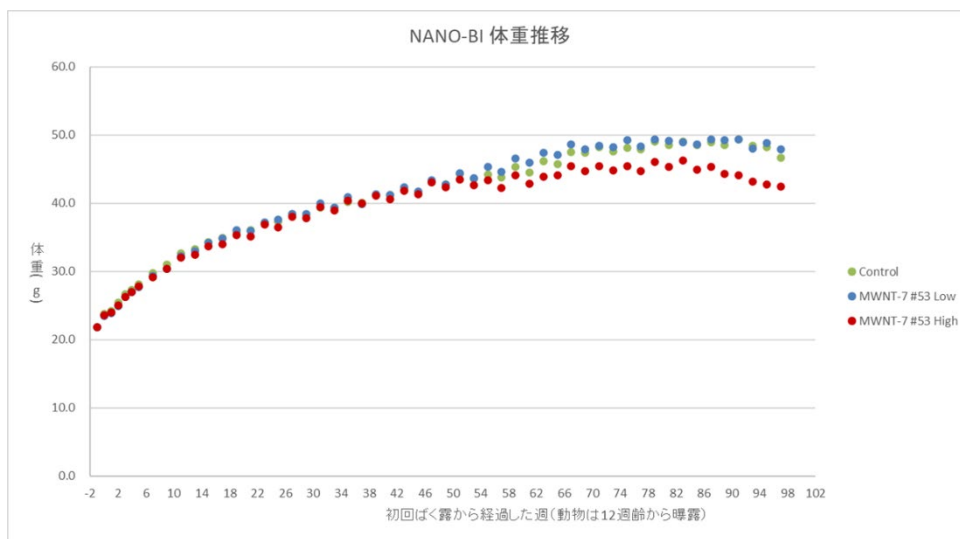


図 1: 体重推移は初回曝露後 54 週まで、対照群と T-CNT7#53 曝露群との間に差はみられなかったが、54 週以降、H 群で体重低下傾向であった。

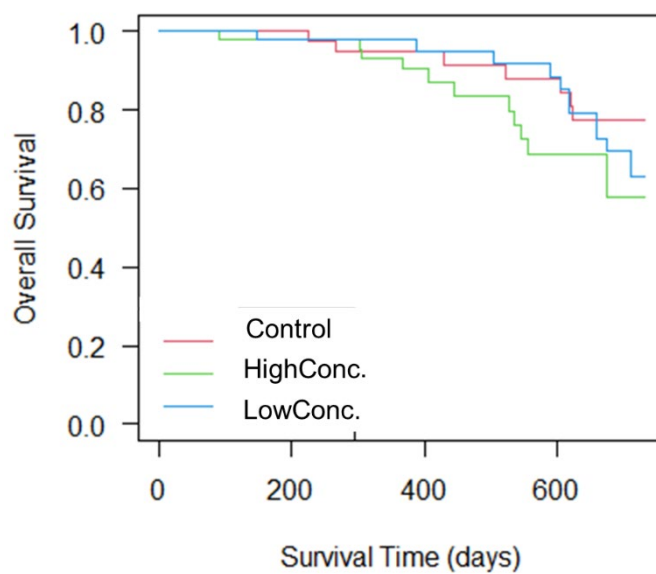


図 2:【Kaplan-Meier 解析】; 死因は考慮せずに Kaplan-Meier 解析を行った。Log-rank 検定では群間に差は認められなかった。

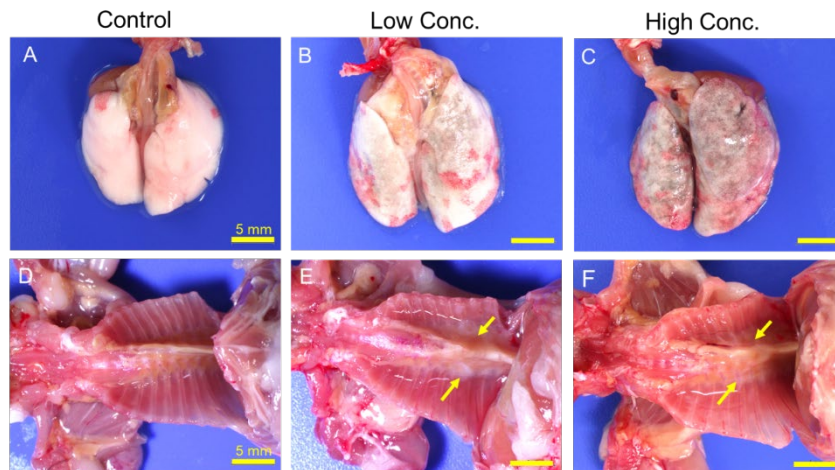


図 3:【肉眼所見】肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した(A~C)。胸腔壁の背側において、ミルキースポット(E,F:矢印)が脊椎骨の両側にL群 15/18例、H群では 15/16例観察された(スケールバー:5mm)。

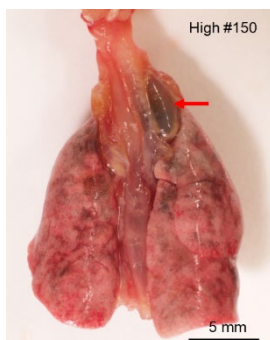


図 4:【傍気管リンパ節の腫大】肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し(矢印)、灰色から黒色を呈する様子がL群 12/18例、H群では 9/16例観察された。

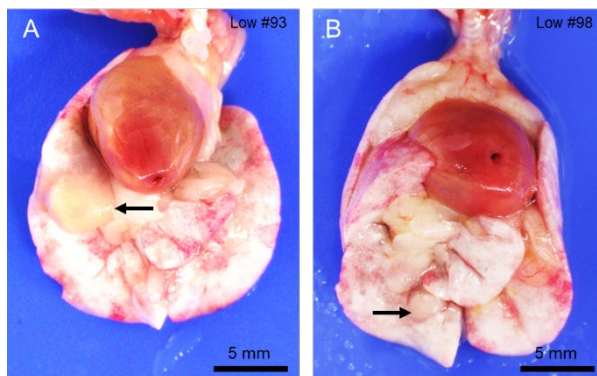


図 5:【肺に結節性病変がみられた例】L群の2例において、肺に白色腫瘍が観察された。

表 1:肉眼所見結果のまとめ

Autopsy Findings					
Period	24M	Control	Low Concentration	High Concentration	
Number of animals examined			20	18	16
Not remarkable			1	0	0
Organ	Findings				
Lung	Swelling		2	16	13
	Grash white		0	18	0
	Grayish		0	0	16
	Edema		2	0	0
	Left median lobe, Raised Node		0	1	0
	Left caudal Lobe, Raised Node		0	1	0
	Lymph node, swelling		0	12	9
	Lymph node, black		0	12	9
Thymus	Swelling		1	1	0
Thoracic cavity	Milky spot		0	15	15
	Pleural effusion		0	3	5
Axillary lymph node	Swelling		0	0	1
Heart	Hypertropy		1	4	6
Liver	Rough-surfaced		0	0	1
	Lateral left lobe, white macule		0	0	1
	Lateral left lobe, raised node		2	1	1
	Caudate lobe, raised node		1	0	0
	Swelling		1	0	0
	Small		0	0	1
	Adhesion		0	3	0
	Adhesion with diaphragm		0	0	1
Kidney	Left, white macule		0	0	2
	Swelling, bilateral		1	0	0
	Right, cystic kidney		1	0	0
	Discoloring		1	0	0
Spleen	Swelling		6	2	3
abdominal cavity	Mesenteric lymph nodes, swelling		4	2	0
	Hemorrhagic ascites		1	1	0
Seminal vesicle	Swelling, brown		18	16	15

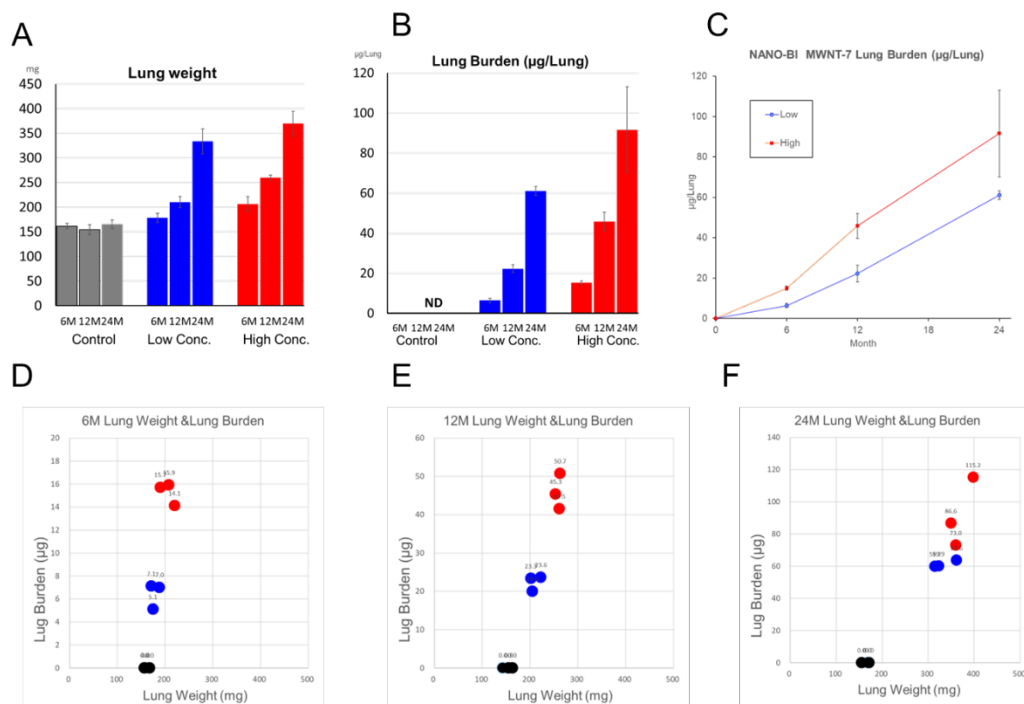


図 6:【肺重量と肺負荷量】肺重量と肺負荷量は曝露濃度依存的に増加した。A:肺重量及び B:肺負荷量の群間比較(各群、各時点 n=3)。C:肺負荷量の経時的変化。D~E:各個体の肺重量(x 軸)と肺負荷量(y 軸)をプロットした図。2 年目の肺負荷量はバラツキが大きい。

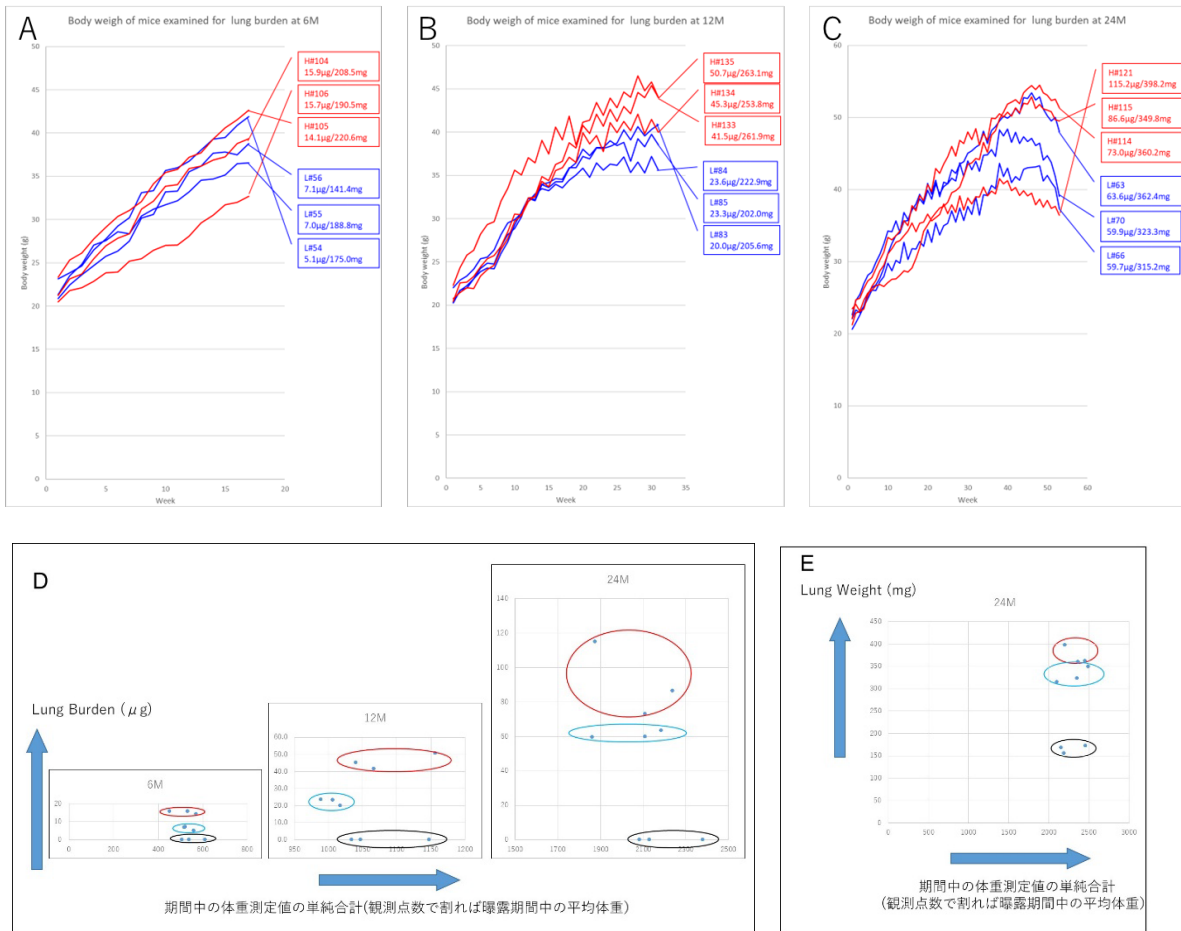


図 7:【体重推移と肺負荷量】肺負荷量測定に供した各動物の体重推移に肺負荷量(吹き出し)をプロットした。肺負荷量の吹き出しは、値が大きい順に上から配置した。A:6ヶ月、B:12ヶ月、C:24ヶ月。12ヶ月のL群においては、体重が重い個体ほど肺負荷量が多いが、H群では、最も体重が低値である個体(#121)の肺負荷量が多い。D:曝露期間中の平均体重で比較すると、肺負荷が増すと平均体重が減少する傾向がみられる。E:24ヶ月時点では、肺の絶対重量がH群とL群で差が無くなっている。

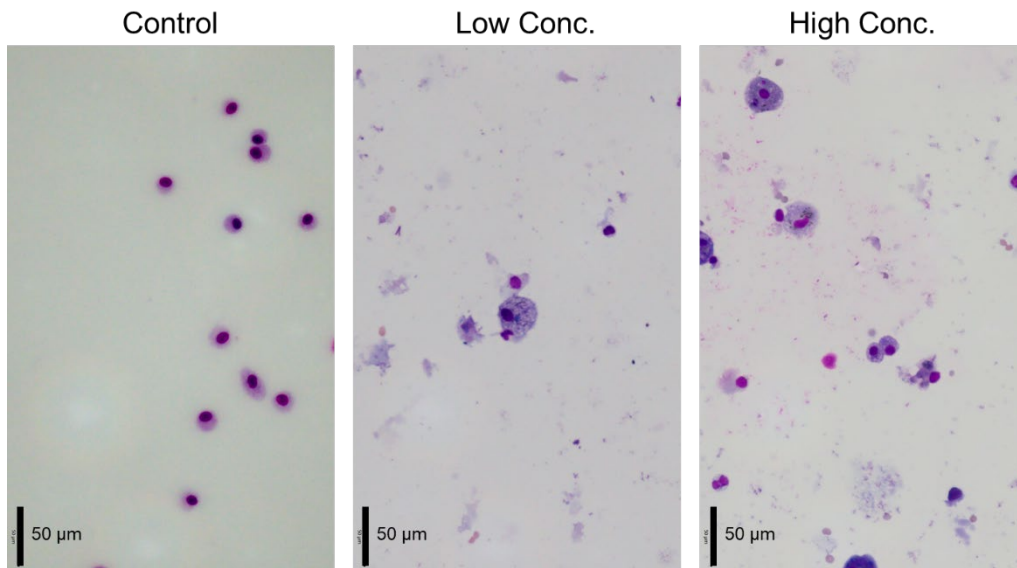


図 8:【BALF 細胞の観察結果】BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。

表 2: 血液検査結果のまとめ(電解質・ヘマトクリット)

Period	24M	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	Hct(%) %
Control	Mean	152	5.2	111.6	29.8
	SD	4.1	0.5	3.9	9.1
	N	20	20	20	20
LowConc.	Mean	152.1	5.1	111.2	31
	SD	2	0.4	2	3.1
	N	18	18	18	18
HighConc.	Mean	152.3	5.3	111	32.7
	SD	1.7	0.5	1.5	10.1
	N	16	16	16	16

表 3: 血液生化学検査結果まとめ

Period	24M	ALP U/l	CHE U/l	ALT U/l	AST U/l	LAP U/l	LDH U/l	TBIL mg/dl	TCHO mg/dl	TG mg/dl	CKMB U/l	BUN mg/dl	CRE mg/dl	AMYL U/l	ALB g/dl	TP g/dl	GLU mg/dl
Control	Mean	268	33	59	97	50	389	0.4	95	91	97	24	0.39	4671	2.1	5.0	189
	SD	129	8	86	109	9	176	0.2	27	40	24	5	0.15	1032	0.3	0.7	55
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
LowConc.	Mean	242	28 *	42	66	46	314	0.3 *	93	75	82 *	20.7 *	0.29	5077	2.0	4.8	223
	SD	67	5	32	24	10	103	0.1	32	45	14	3.4	0.17	858	0.3	0.5	58
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
HighConc.	Mean	242	31	53	84	43 **	391	0.4	77 *	66	101	21 *	0.26	4142	2.2	5.0	193
	SD	47	5	82	55	6	235	0.1	24	38	21	3.1	0.23	1177	0.3	0.6	45
	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16