

令和5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: 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 17 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広い分野の新材料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、生体における吸収性や蓄積性、表面活性の増強による生体影響の最大の焦点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は広範且つ長期に渡り使用され続けることが求められ、慢性影響評価はこれまで以上に重要な位置を占めると考えられる。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。初年度に OECD TG451 により実施された MWNT-7 (NT-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 (曝露時間 6 時間/回、4 週毎、計 26 回、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); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$) の結果を解析し、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 TTF-1 陽性の腺癌を L 群に 2 例にみとめた。2 年度目は、II 型肺胞上皮の過形成の背景病変の解析を継続するとともに、過形成初期の病変の局在、及び NT-7 を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明する目的で、リンパ管内皮を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立衛研動物施設への導入および、Taquan 吸入装置による NT-7 の吸入実験を実施した。これらにより NT-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の解析を実施した。

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 17 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、間歇型曝露手法をより効率的なものとするを目的とする。本分担研究では、OECD TG451により実施された MWNT-7(NT-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た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の解析結果をもとに、昨年度は、II型肺胞上皮の過形成初期の病変の局在、及び NT-7 を貪食したマクロファージの肺内局在と、リンパ管の走行との関係を解明するため、リンパ系経路を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立衛研動物施設への導入、および、Taquann 吸入装置による NT-7 の吸入実験を実施した。本年度はこれらにより NT-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の解析を進めた。

B. 研究方法

光学顕微鏡及び、3次元蛍光顕微鏡による肺の病理組織学的な検討を実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する(詳細は研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長 高橋祐次、及び研究分担者、東京医科歯科大学 大学院医歯学総合研究科 教授 :渡部 徹郎の項を参照)。

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(NT-7)をナノテクノロジービジネス推進協議会より入手した。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 μm の金属シープ(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。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1)動物

Prox1-GFP トランスジェニック雄性マウスを使用した。

2)群構成

①実験1(実験コード NANO-BU): 吸入曝露実験の検体は NT-7 を用いた。対照群(Ctrl 群、清浄空気のみ:1 頭)、低濃度曝露群(Low concentration 群:3 頭)、高濃度曝露群(High concentration 群:3 頭)の3群構成とした。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、1日6時間(10:00~16:00)の全身曝露吸入を3回行った。3回の曝露の平均濃度は、Low:2.7mg/m³、および High:4.7mg/m³であった。

②実験2(実験コード NANO-BX): 吸入曝露実験の検体は NT-7 を用いた。対照群(Ctrl 群、清浄空気のみ:10 頭)、低濃度曝露群(Low concentration 群:10 頭)、高濃度曝露群(High concentration 群:10 頭)の3群構成とした。Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を使用し、1日6時間(10:00~16:00)の全身曝露吸入を13回行った。13回の曝露の平均濃度は、Low:2.5mg/m³、および High:4.4mg/m³であった。

3)吸入曝露実験装置

NT-7 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 5899592、特許 7112685、特許 7111296、特開 2019-190914、特開 2019-190915)。

B-3. 解剖

肺組織のサンプリングは最終曝露後に行った。肺は透明化用に採取した。今年度も、昨年度に引き続き、本分担研究において、肺組織における吸入ナノマテリアルの分布を観察するために、定法に従って肺組織の透明化を行い、3次元レベルの観察をLeica THUNDERモデル生物実体顕微鏡を用いて施行した。

さらに、透明化した肺をパラフィン包埋し、光学顕微鏡用の10 μ m厚の連続切片を作成し、抗GFP抗体を用いたDAB発色免疫染色切片を作成し、ヘマトキシリンによる各染色を加え、組織切片上でのリンパ管内皮細胞の永久免疫染色標本作製し、3次元蛍光像との対比の検討を行った。

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。

C. 研究結果

低濃度ならびに高濃度のNT-7を吸入曝露したProx1-GFPトランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡によって観察した。その結果、NT-7の凝集体は、終末細気管支周囲の領域に気管支に沿って規則的な模様を描くように局在することが示された。透明化肺をGFP励起光(455nm)にて蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管と、肺細静脈系列(V)のリンパ管の二つ

の系列が交互に、肺門から末梢に向けて放射状に分布する事が確認された。そして、前者BA系列のリンパ管周囲に局限してNT-7の凝集体が局在し、V系列のリンパ管の周囲には凝集体は局在しない事が判明した。また、末梢の毛細リンパ管の形状が、NT-7の吸入により変化している可能性が示唆された(図1)。

抗GFP抗体を用いたDAB発色免疫染色切において、リンパ管が終末細気管支の壁外側、および、静脈に接して、そして、胸膜近傍まで分布する事を確認した。また、連続切片の画像情報をトレースすることで、3次元構築を再確認できた。ヘマトキシリン単染色においても、リンパ管、およびNT-7と、それらの周囲に位置する細胞の種類と同定が凡そ可能なことが示された。

今後、NT-7の沈着部位の細胞構成を確認する為に、連続パラフィン切片における複数の免疫染色を検討し、解析を進める予定である。その際に、現行の染色プロトコールにおいてはマクロファージの共染が問題となることが判明したことから、染色プロトコールの改良を進める予定である。また、細胞レベルの空間的遺伝子発現解析(Xenium, 10x Genomics)の導入も考慮された。

D. 考察

2年間の間歇曝露実験における前駆病変の解析の結果、終末細気管支近傍におけるNT-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。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NT-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の必要性が残った。

この様な初期病変の局在には NT-7 を貪食したマクロファージの肺内挙動と特定の部位への局在、及び、マクロファージと密接な関係の存在が想定される肺内リンパ管の局在と反応の解析が重要であると考えた。その為に国立医薬品食品衛生研究所に導入した Prox1-GFP トランスジェニックマウスから肺組織をサンプリングし、透明化処置を行い、実体顕微鏡下で GFP 蛍光観察を実施した結果、終末細気管支・気管支細動脈の系列(BA)のリンパ管周囲に限局して大型の NT-7 の凝集体が局在すること、末梢毛細リンパ管の形状が、NT-7 の吸入により変化している可能性が示唆された。他方、大型の NT-7 の凝集体が局在しない肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞には、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージが孤在性に認められた。BA 系列領域における組織反応と V 系列領域近傍の肺胞領域における組織反応には、差異があることが確認された。両領域における、マクロファージとリンパ管、特に内皮の内皮間葉移行 (EndoMT) を含めた細胞の詳細解析を透明化肺をパラフィンブロック化し作成した連続パラフィン切片において詳細に進める予定である。遺伝子発現解析には、細胞レベルの空間的遺伝子発現解析 (Xenium) の導入も考慮される。

E. 結論

リンパ系経路を可視化可能な Prox1-GFP マウスの国立医薬品食品衛生研究所の動物施設への導入および、Taquan 吸入装置による NT-7 の吸入実験により NT-7 の終末細気管支領域(BA 系列)への集積と、肺細静脈系列(V 系列)の近傍の肺胞マクロファージへの集積による組織反応の様態の解析を開始した。今後、リンパ管内皮細胞の内皮間葉移行 (EndoMT) を含めた肺病変の形成過程の詳細解析を、透明化肺をパラフィンブロッ

ク化し連続組織切片とする事により進める。

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

1. 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.
2. Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J.(2013) An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28.

G. 研究発表

1. 論文発表

Motomu Shimizu, Motoki Hojo, Kiyomi Ikushima, Yukio Yamamoto, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Naozumi Ishimaru, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Jin Suzuki, Akiko Inomata, Dai Nakae. Continuous infiltration of small peritoneal macrophages in the mouse peritoneum through CCR2-dependent and -independent routes during fibrosis and mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube, MWNT-7. *J Toxicol Sci.* 2023;48(12):617-639. doi: 10.2131/jts.48.617

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Satoshi Kitajima. 159 Keynote: An Overview of Carbon

Nanotube Carcinogenesis from Mouse Inhalation Data. *Annals of Work Exposures and Health*, Volume 67, Issue Supplement_1, May 2023, Pages i40–i41, <https://doi.org/10.1093/annweh/wxac087.097>.

2. 学会発表

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Naozumi Ishimaru, Miho Kobayashi, Tetsuro Watabe, and Satoshi Kitajima. Basic lung responses to multiwall carbon nanotubes monitored in mouse whole body inhalation studies. Symposium: Nanosafety and Nanotoxicology. ASIATOX-X, (2023.7.18), Taipei, Taiwan, Oral.

Hojo M, Shimizu M, Ikushima K, Maeno A, Sakamoto Y, Yamamoto Y, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Suzuki J, Inomata A, Nakae D: Phenotypic characterization of macrophages during peritoneal mesothelioma development induced by a multiwalled carbon nanotube in wildtype C57BL mice. EUROTOX 2023, Ljubljana, Slovenia (Sep 10-13, 2023).

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:透明化した肺の同一部位の、GFP 蛍光像に NT-7 の2値化強調像を重ねたものを示す。系列(BA)に黒色粒状のNT-7の局在が確認される(黒色)。NT-7の大型の凝集体のうち、2本のGFP陽性線に挟まれたものは、気管支内の凝集体であり、GFP陽性線の外にあるものが、終末細気管支から肺泡洞付近の凝集体である。

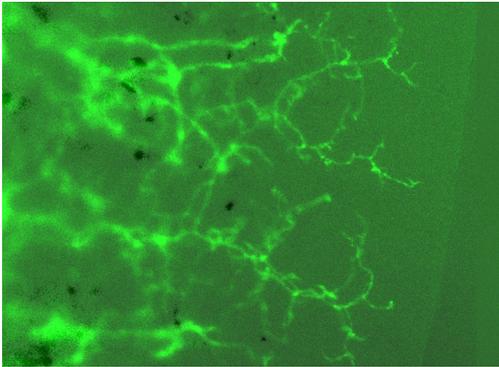


図2:透明化した肺をパラフィン包埋し、DAB 発色抗 GFP 抗体免疫染色により、リンパ管の局在を示した肺細静脈系列(V)の領域の顕微鏡像。黄色*が静脈に伴行するリンパ管を示す。偏光により NT-7 を発光させており、黄色矢印は、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージ(DAB 発色あり)を示す。肺細静脈系列(V)の領域には NT-7 の大型の凝集体は認められないが、NT-7 を貪食した肺胞マクロファージが確認される。赤※印の部分の白色偏光は静脈壁の平滑筋及び線維成分による。

