

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
ナノマテリアルを含む化学物質の短期吸入曝露等による免疫毒性評価手法開発のための研究

令和7年度 分担研究報告書

肺胞マクロファージの免疫学的解析

研究分担者	石丸 直澄	東京科学大学大学院医歯学総合研究科・教授
研究協力者	牛 尾 綾	東京科学大学大学院医歯学総合研究科
	布川 裕規	東京科学大学大学院医歯学総合研究科
	濱垣美和子	東京科学大学口腔病理学分野
	鈴木 麻弘	東京科学大学歯学部
	葛岡 隼人	東京科学大学歯学部
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所
	横 田 理	国立医薬品食品衛生研究所
	辻 昌 貴	国立医薬品食品衛生研究所
	森田 紘一	国立医薬品食品衛生研究所
	菅 康 佑	国立医薬品食品衛生研究所

研究要旨

ナノマテリアル（NM）はその組成や形状によってマクロファージなどの貪食細胞の反応性は大きく異なっている。令和7年度の本分担研究では、Taquann 処理した二酸化ケイ素（NM202）の全身吸入曝露による肺組織における病理組織学的検討と実施するとともに、前年度までに得られた情報に基づいて MARCO 分子の発現を、NM202 吸入曝露マウスの肺組織を用いて検討した。NM202 曝露 8 週後に肺胞構造の変化、肺胞マクロファージの集簇像を有する領域が観察された。また、肺の間質における線維化が部分的に確認された。さらに、MARCO の免疫染色を実施すると、NM202 曝露マウスの肺胞に集簇したマクロファージに強く発現していることが示された。

NM202 の全身吸入曝露では、肺胞構造の変化、肺胞マクロファージの集簇に加え、軽度の線維化を伴う可能性が示された。また、肺胞マクロファージにおける MARCO 分子がナノマテリアル曝露に関与していることが示唆された。

A. 研究目的

R 7 年度の本研究では、前年度に実施した NM202 の全身吸入曝露実験の継続解析として、肺組織の詳細な病理組織解析を実施した。特に、前年度までに in vivo および in vitro でナノマテリアル関連分子とし

て示された MARCO 分子の発現に関して、肺組織を用いて解析を加えた。

B. 研究方法

Taquann 処理を施した NM202 を 0、15、30 mg/m³ の濃度で 1 日 6 時間 5 日間の曝露を全身曝露装置を用いて実施した。本実験では雄 C57BL/6NCrSlc マウスを用い

た（8週齢、各群 N=5）（図 1）。暴露後 4 週および 8 週目で屠殺解析を実施した。

屠殺時に肺組織は 10% 中性緩衝ホルマリンにて注入固定を行った後、標本作成まで同液に浸漬した状態で常温にて保存した。パラフィン包埋、薄切により標本を作成した。キシレン、エタノールにて脱パラフィン後、ヘマトキシリン・エオジンあるいはマッソン・トリクロームにて染色、封入を行った。また、パラフィン標本を用いて、免疫染色を実施した。脱パラフィン、ブロッキング溶液による処理後 1 次抗体として、抗マウス F4/80 抗体（70076, Cell Signaling Technology）、抗マウス MARCO 抗体（ab239369, abcam）を用いた。2 次抗体として HRP 標識抗体（VECTASTAIN Elite ABC Kit, #PK-610, funakoshi）を使用し、DAB（049-22831, FUJIFILM Wako Chemical）にて発色を行った。ヘマトキシリンによる核染色後、封入処理を行った。

（倫理面への配慮）

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国立医薬品食品衛生研究所および東京科学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ている。

C. 研究結果

NM202 の全身吸入暴露による肺組織の病理組織学的評価

NM202 暴露後 4 週では、大きな変化は認められないが、高濃度暴露群の一部の肺組織に肺胞構造の乱れが観察された（図 1）。

肺の胸膜側に肺胞の狭窄する領域が認められ、強拡大での観察では、軽度の肺胞壁の肥厚、肺胞腔内に肺胞マクロファージの集簇像が確認された。暴露後 8 週では、肺胞構造の不明瞭な領域は高濃度暴露群で広がり（図 2）、強拡大でも肺胞壁の肥厚、肺胞腔内での肺胞マクロファージの集簇像が目立つ部分が増加していた（図 2）。

NM202 の全身吸入暴露による肺組織の線維化の評価

NM202 暴露によって肺組織の HE 染色において肺胞壁の肥厚は確認される部分があるものの、間質における線維化は確認できなかったため、マッソン・トリクローム染色にて膠原線維増生の有無を検討した。暴露後 4 週の標本では膠原線維の増生は観察されなかったが、暴露後 8 週での高濃度暴露群にて脈管周囲の間質の一部に膠原線維の増生像が確認された（図 3）。低濃度暴露群での膠原線維の増生は目立たなかった。

NM202 の全身吸入暴露による肺組織の肺胞マクロファージの変化

NM202 の吸入暴露によって、肺胞マクロファージの変化を F4/80 の発現を用いた免疫染色法による評価を行うと、F4/80 陽性肺胞マクロファージ数は高濃度暴露群で対象群に比較して増加していたが、対象群と暴露群では有意な差は認められなかった（図 4、5）。また、MARCO 分子の発現に関して免疫染色法にて検討すると、MARCO 陽性肺胞マクロファージが暴露群で対象群に比較して有意に増加していた（図 4、5）。

D. 考察

本年度は昨年度からの継続研究として、NM202 の全身吸入暴露による肺組織の病理学的解析に焦点を当てた解析を進めた。

前年度までに MARCO 分子の重要性が *in vitro* および *in vivo* の実験から示されていたことから、本年度の解析結果を踏まえ、シリカナノマテリアルの暴露による肺胞マクロファージの活性化における MARCO 分子が重要なマーカーになることが確認された。前年度における *in vivo* 実験の BALF 細胞の Marco mRNA 発現、*in vitro* における RAW264.7 細胞を用いた実験の結果とも矛盾しない結果であることから、MARCO 分子がナノマテリアルの暴露によって発現が大きく変動することが明らかになった。

MARCO 分子はスカベンジャー受容体であり、Pattern recognition receptor の一つと考えられている。多陰性分子や低密度リポタンパク質 (LDL) と呼ばれるコレステロールの修飾型タンパクに結合することが知られている。また、シリカなどのナノマテリアルに対する反応性も報告されていることから、本研究の結果もこれまでの報告と矛盾するものではない。一方で、MARCO 分子を介したシグナル伝達の詳細な分子機構やナノマテリアルの認識機構やその分子制御機構に関しては不明な点が多い。今後、シリカを含めたナノマテリアルによる MARCO 分子を介したマクロファージの反応性が従来報告されてきた微生物との反応性の詳細な相違に関して明らかにすることによって、ナノマテリアルに対する詳細な免疫反応ならびに免疫毒性が解明される可能性がある。

E. 結論

ナノシリカの暴露による肺胞マクロファージの活性化には MARCO 分子が重要な役割を果たしていることが明らかになり、MARCO 分子がナノマテリアルの重要なバイオマーカーの一つになる可能性が示された。

F. 研究発表

F.1. 論文発表

1. Nishida M, Otsuka K, Nagao R, Matsuzawa S, Ushio A, Tsunematsu T, Aota K, Ishimaru N. Tissue-Specific Expansion of Age-Associated B Cells via IFN- γ and IL-21 Within Salivary Glands in Sjögren Disease. *J Immunol Res.* 2026;422:1251, 2026 doi.org/10.1155/jimr/4221251
2. Matsuzawa S, Ushio A, Otsuka K, Nagao R, Tsunematsu T, Moriyama M, Ishimaru N. Neonatal Thymic Dynamics Influence Autoimmune Pathology by Shaping the Suppressive Potential of Regulatory T Cells. *Am J Pathol.* 196:920-933, 2026 doi: [10.1016/j.ajpath.2025.12.007](https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2025.12.007)
3. Nagao R, Otsuka K, Matsuzawa S, Ushio A, Tsunematsu T, Ishimaru N. Differential chemokine profiles between lacrimal and salivary glands in a murine model of primary Sjögren disease. *Cytokine*, 196:157023, 2025
4. Otsuka K, Ushio A, Nagao R, Matsuzawa S, Arakaki R, Fukuta K, Mouri Y, Tsunematsu T, Ishimaru N. Regulatory Role of FGL-1 in Inter-Organ Communication by Controlling T Cell Homeostasis during the Onset of Sjögren Disease. *Arthritis Rheumatol.* 77(11):1573-1584, 2025.
5. Ushio A, Ishimaru N. Molecular Pathogenesis via Sex Hormone in Sjögren's Syndrome. *J Stomatol Soc Jpn.* 92(1):1-6, 2025.

F.2 学会発表

1. 牛尾綾、布川裕規、大塚邦紘、常松貴明、高橋祐次、石丸直澄 二酸化ケイ素暴露が肺胞マクロファージを介して免疫毒性へ与える影響 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 18 仙台)
2. 山本安希子、石丸直澄、浅野正岳、MASH モデルマウスの肝ミトコンドリアに対する病理及び生化学的解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 17 仙台)
3. 永尾瑠佳、山本安希子、牛尾綾、大塚邦紘、松澤鎮史、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける Trat1 を介した T 細胞活性化抑制機構の解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 17 仙台)
4. 大塚邦紘、近藤博之、常松貴明、石丸直澄、安友康二 T 細胞と線維芽細胞の相互作用によるシェーグレン症候群の増悪機構 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 17 仙台)
5. 布川裕規、清水六花、黒嶋雄志、石丸直澄 下顎骨に発生した硬化性歯原性癌 4 例の臨床病理学的検討 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 17 仙台)
6. 松澤鎮史、牛尾綾、永尾瑠佳、大塚邦紘、常松貴明、石丸直澄 新生仔胸腺におけるオートファジーを介した自己免疫疾患に関わる T 細胞分化 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 18 仙台)
7. 俵宏彰、常松貴明、永尾瑠佳、松澤鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 頭頸部扁平上皮癌の分化を決定づける転写因子ネットワークの解明 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 18 仙台)
8. 常松貴明、俵宏彰、永尾瑠佳、松澤鎮史、大塚邦紘、牛尾綾、石丸直澄 HPV 陽性癌における新規脱ユビキチン化酵素複合体の機能解析 第 114 回日本病理学会総会 (2025. 4. 19 仙台)
9. 四釜洋介、吉田佳世、大塚邦紘、石丸直澄 加齢および自己免疫疾患に起因する唾液腺の線維化・リンパ球集積に対する上皮間葉転換 (EMT) の関与 第 67 回歯科基礎医学会学術大会 (2025.9.7 北九州)
10. 石井麻美、牛尾綾、布川裕規、木下祐理、石丸直澄、自己免疫疾患モデルマウスにおける視床下部 IL-6 発現を介した神経免疫関連と抑うつ行動 第 42 回分子病理学研究会 八景島シンポジウム (2025.7.11 横浜)
11. 茂木祐人、布川裕規、牛尾綾、石丸直澄 マウス頭頸部扁平上皮癌細胞による腫瘍関連マクロファージの分化誘導と腫瘍機能への影響 第 42 回分子病理学研究会 八景島シンポジウム (2025.7.11 横浜)
12. 牛尾綾、木下裕理、石井麻未、布川裕規、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスの骨髄環境における B 細胞分化機構の解明 第 67 回歯科基礎医学会学術大会 (2025.9.6 北九州)
13. 石丸直澄 臓器間ネットワークを介したシェーグレン病の発症機序の解明 第 33 回シェーグレン症候群学会学術集会 (2025.9.20 東京都大田区)
14. 石井麻未、牛尾綾、布川裕規、木下祐理、石丸直澄 シェーグレン症候群モデルマウスにおける視床下部 IL-6 と抑うつ様行動の関連性 第 33 回シェ

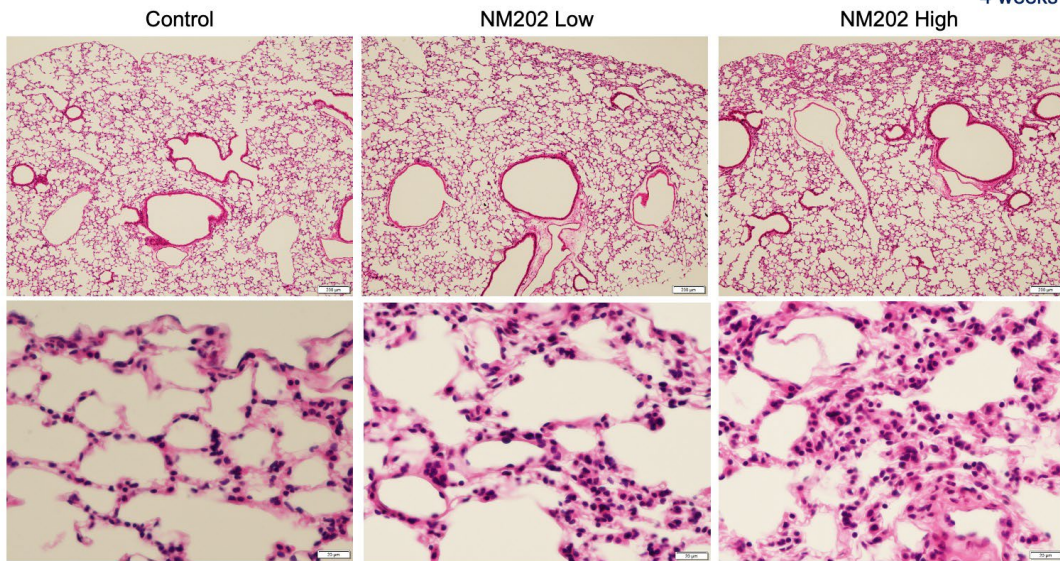
- ーグレン症候群学会学術集会
(2025.9.20 東京都大田区)
15. 茂木祐人、布川裕規、牛尾綾、原田浩之、石丸直澄 マウス頭頸部扁平上皮癌細胞による腫瘍関連マクロファージの分化誘導と腫瘍機能への影響 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22 札幌)
 16. 永尾瑠佳、牛尾綾、常松貴明、石丸直澄 シェーグレン症候群マウスモデルにおける自己反応性 T 細胞調節機構の解明 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22 札幌)
 17. 中村勇亮、布川裕規、牛尾綾、石丸直澄 破骨細胞由来因子のマウス頭頸部扁平上皮癌細胞への影響 第 61 回日本口腔組織培養学会学術大会 (2025.11.22 札幌)
 18. Matsuzawa S, Ushio A, Nagao R, Otsuka K, Tsunematsu T, Ishimaru N. The regulatory role of neonatal thymic microenvironment in the onset of autoimmunity. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.10 姫路)
 19. Ishii A, Ushio A, Fukawa Y, Kinoshita Y, Ishimaru N. Immunological effect on neuropsychiatric symptoms in Sjögren's syndrome models. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12 姫路)
 20. Kinoshita Y, Ushio A, Fukawa Y, Ishii A, Matsumoto Y, Ono T, Ishimaru N. B cell dynamics in the bone marrow of Sjögren's syndrome model mice. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12 姫路)
 21. Nagao R, Yamamoto A, Ushio A, Otsuka K, Matsuzawa S, Tsunematsu T, Ishimaru N. Analysis of suppressive mechanism for

T cell activation via Tratl1 in Sjögren's syndrome model mice. 第 54 回日本免疫学会学術集会 (2025.12.12 姫路)

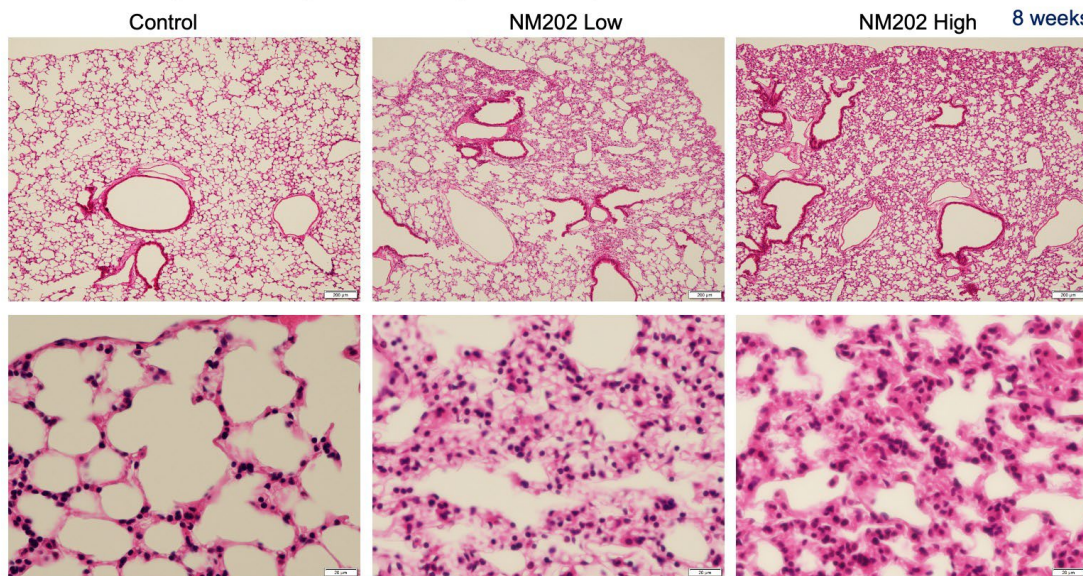
G. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む。)

1. 特許取得
該当なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし

R7 图1 Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202 4 weeks



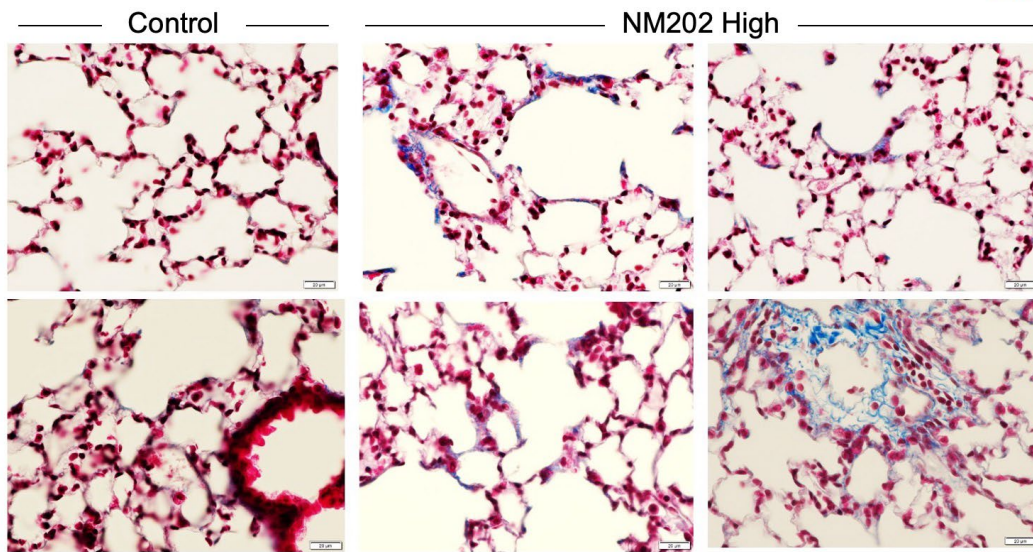
R7 图2 Pathological change of the lung tissues by inhalation exposure to NM202 8 weeks



R7 图3

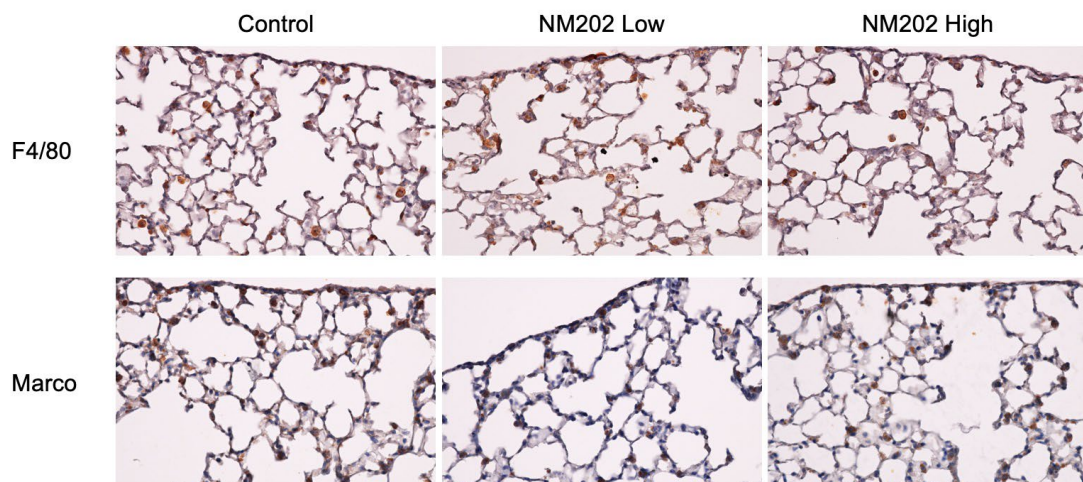
Detection of collagen fibers by Masson-Trichrome staining

8 weeks



R7 图4

F4/80-positive and Marco-positive cells were detected in lung sections



R7 5

Marco positive cells were significantly increased in the lung from mice exposed NM202

