

論 文 内 容 要 旨

題 目

Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype  
after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes

(多層カーボンナノチューブの吸入曝露による線維化誘導型肺胞マクロファージへの長期変化)

著 者 大塚 邦紘 (口腔分子病態学分野)

内容要旨

**【目的】** ナノマテリアルは化学物質であり、その有用性から幅広い分野で使用されている。一方で、人体への毒性が指摘され、特にカーボンナノチューブ (carbon nanotube; CNT) の吸入による呼吸器への悪影響が報告されている。肺において、肺胞マクロファージは、炎症反応や外来性異物の貪食に重要な役割を担っており、CNT 曝露によって、その表現型や機能に大きく影響を与えている可能性が示唆されている (*Inhal Toxicol.* 2009, *Toxicol Appl Pharmacol.* 2012, *J Toxicol Environ Health A.* 2016, *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2008)。しかし、従来の CNT 吸入曝露法である咽頭吸入や気管内投与方法では、ヒトが吸引する分散状態と異なり、CNT の凝集体や凝固体による病変が誘発される (*Arch Toxicol.* 2016, *Toxicology.* 2010)。ヒトの CNT 吸入による肺病態では、高度に分散された CNT の単離繊維が肺胞に侵入することで誘発されると考えられている (*Toxicol In Vitro.* 2015, *Chem Res Toxicol.* 2012)。高橋らは新規の方法として、「Taquann 法」と「Taquann 直噴全身曝露吸入装置」を考案した。Taquann 法は、CNT を高分散性の単離繊維の状態にでき、これを Taquann 直噴全身曝露吸入装置を用いて、エアロゾルの状態でマウスの肺胞まで到達させる (*J Toxicol Sci.* 2013)。Taquann 法にて処理した CNT (T-CNT) の吸入曝露実験は、ヒトへの外挿性の高いデータを得ることができ、より現状に即した毒性評価を可能としている。本研究では、T-CNT 曝露後の長期観察により、肺胞マクロファージの表現型や機能をはじめとした肺の免疫機能システムへの影響を解析し、ナノマテリアルの生体への毒性との関連を明らかにすることを目的とした。

**【材料及び方法】** T-CNTをTaquann 直噴全身曝露吸入装置 (version 2.0, Sibata Scientific technology LTD., 埼玉, Japan) にて、マウス (8週齢メスC57BL/6) に全身的に吸入曝露させた。その際、マウスを対照群 (0 mg/m<sup>3</sup>)、低濃度群 (1.42 mg/m<sup>3</sup>)、高濃度群 (3.12 mg/m<sup>3</sup>) に群分けした。解析は曝露から12ヶ月後に行い、フローサイトメトリー・走査型電子顕微鏡・共焦点顕微鏡・リアルタイム定量PCR (RT-PCR)・ヘマトキシリン・エオジン (H&E) 染色・Azan染色・免疫組織化学を用いて、病理組織学的及び免疫学的に評価を行った。

**【結果】** 病理組織学的に、CNT曝露群では、肺胞上皮の肥厚や肺胞マクロファージの集簇、間質の線維化が認められた。気管支洗浄液を採取し、フローサイトメトリー解析を行うと、T-CNT曝露群では対照群に比べ肺胞マクロファージが有意に増加し、その表現型はM1とM2を併せ持つような性格であった。また、肺のRT-PCRを行うと、対照群に比べて

T-CNT曝露群では、線維化に関する遺伝子群であるCollagen type IV (Col IV), matrix metalloproteinase-12 (MMP-12), tissue inhibitors of metalloproteinase- 2 (TIMP-2), TIMP-3の mRNAレベルが上昇していた。免疫組織化学的にも、T-CNT曝露群から採取した肺の気管支や血管周囲にCol IVの発現がみられた。加えて、T-CNT曝露群の肺では、MMP-12<sup>+</sup>マクロファージの集簇が観察され、T-CNT濃度依存的に増加していた。

**【考察】** T-CNTの吸入曝露は、肺において肺胞マクロファージなどの慢性炎症を促進することで免疫機構に変化をもたらし、間質における線維化を誘導することが示された。