

図 4. 0.60~0.80 mg/mL MWCNT 懸濁液 (Tween 20 : MWCNT= 1 : 2) を用いたミスト発生実験のチャンパー内濃度

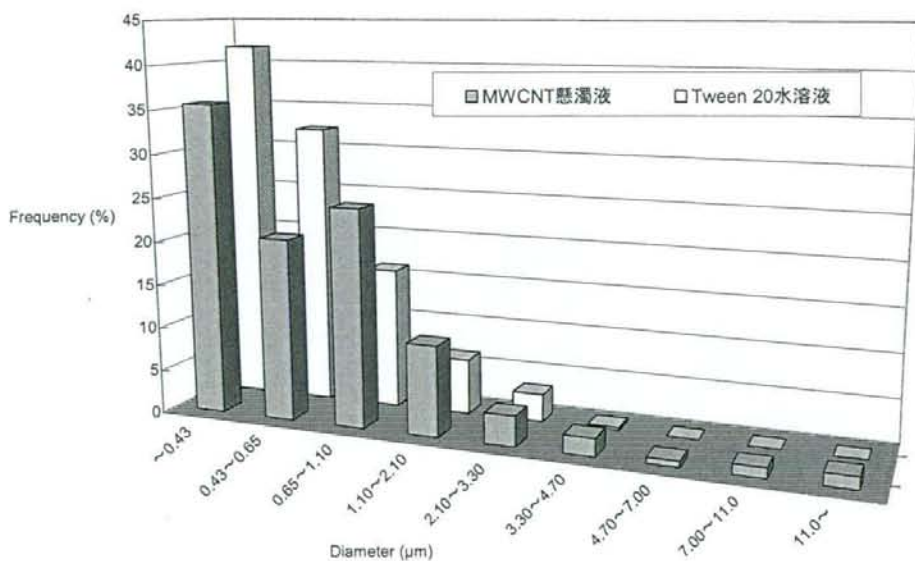


図 5. 0.70 mg/mL MWCNT 懸濁液及び 0.35 mg/mL Tween 20 水溶液を用いたミスト発生実験の粒径分布の比較

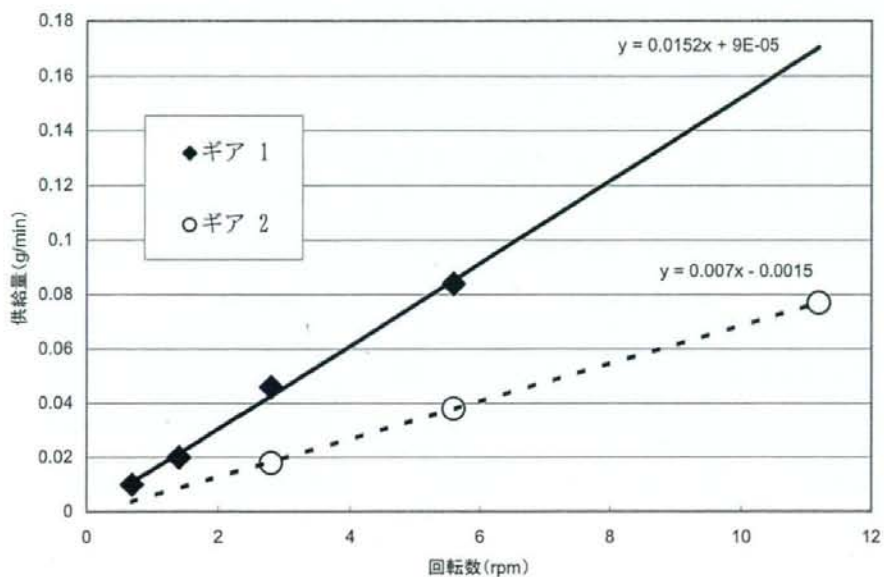


図 6. 粉体用超微量フィーダーのギア回転数と MWCNT の供給量

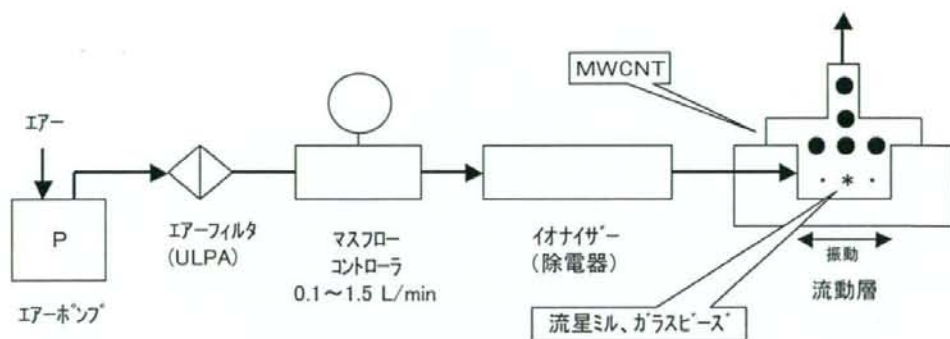


図 7. 流動層式発生器及び発生フロー図

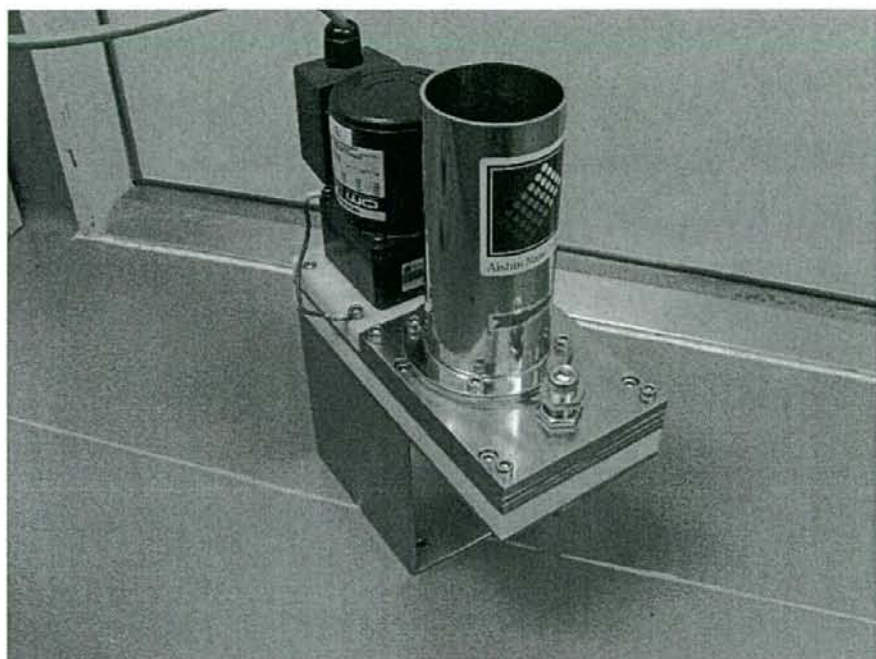


写真1. 粉体用超微量フィーダー外観

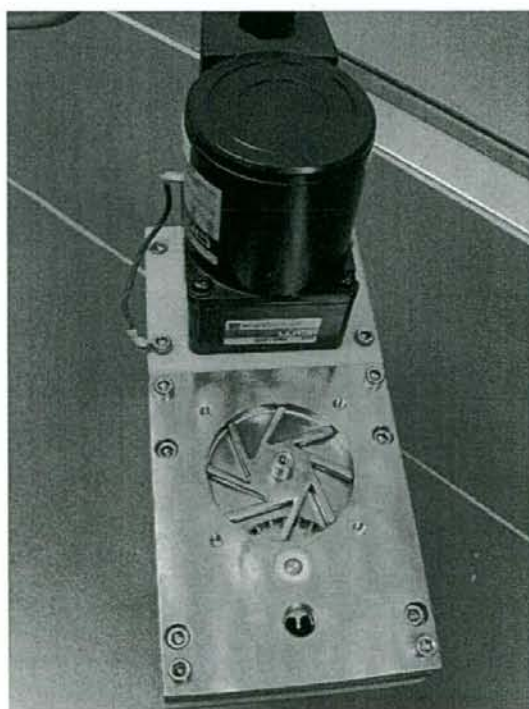


写真2. フィーダー 擦切りフィンと搬送・供給用ギア

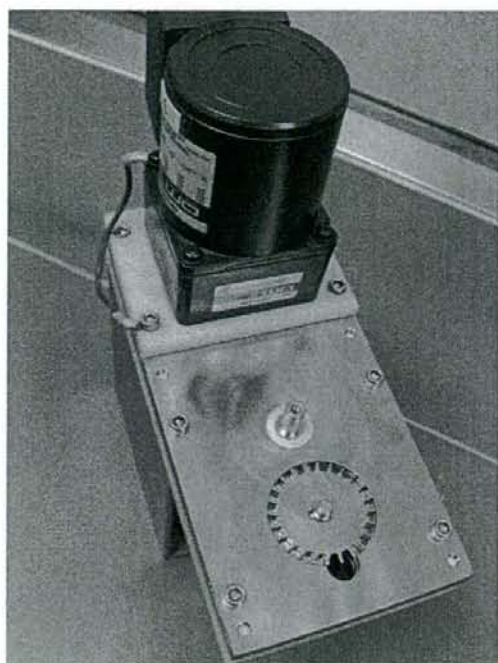


写真3. フィーダー 搬送・供給用ギアと試料出口

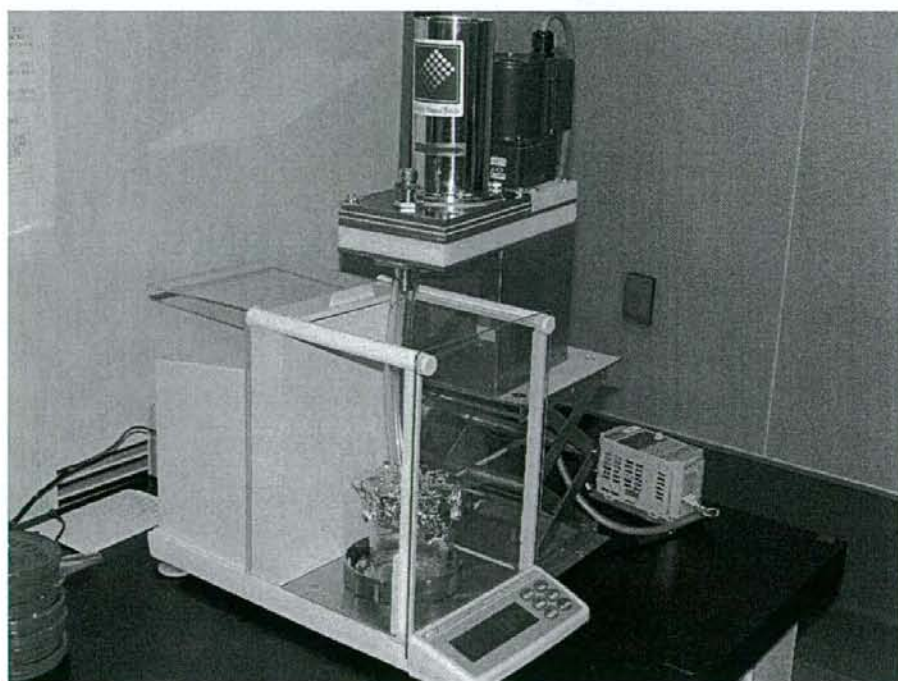


写真4. 供給量検討試験（フィーダーと天秤）

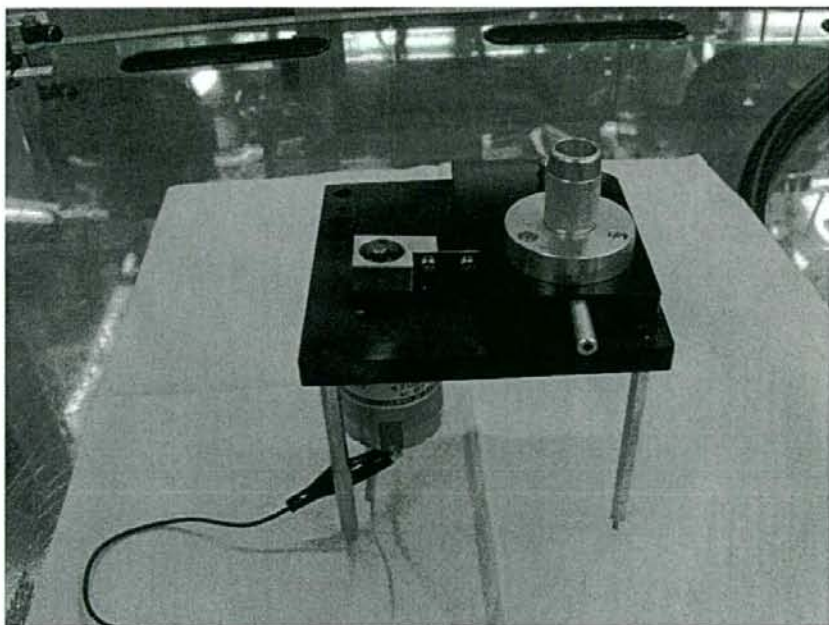


写真 5. 流動層式発生器

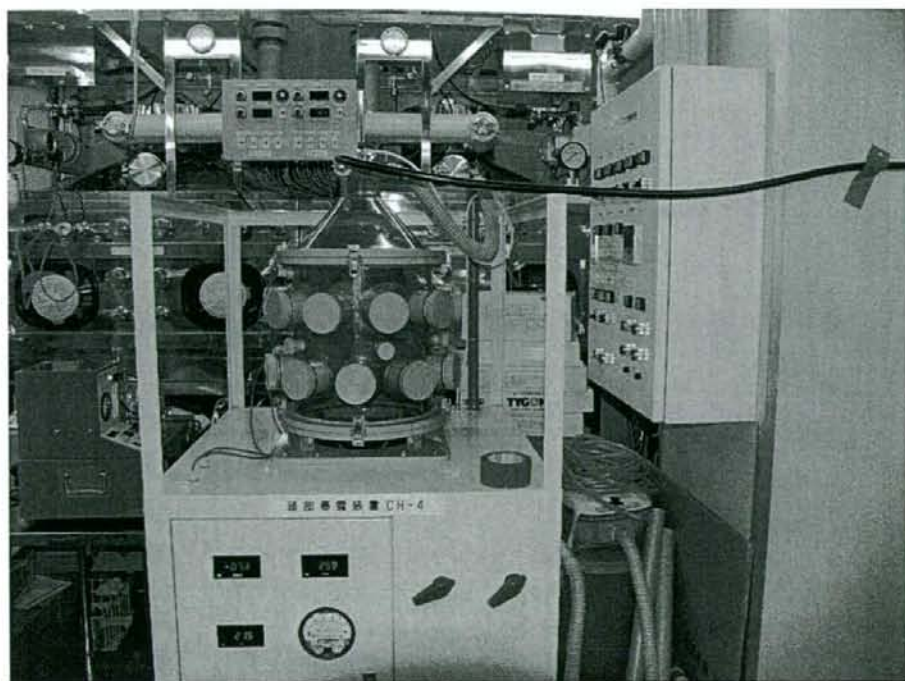


写真 6. 濃度確認に使用したチャンバー

ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究

研究分担者 相磯成敏 中央労働災害防止協会日本バイオアッセイ研究センター
病理検査室 室長

研究協力者

戸谷忠雄 独立行政法人労働安全衛生総合研究所 有害性評価研究グループ主任研究員
久保田久代 独立行政法人労働安全衛生総合研究所 健康障害予防研究グループ主任研究員
酒井俊男 酒井電子顕微鏡応用研究所代表
山崎一法 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部経口等試験室 室長
加納浩和 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部経口等試験室 室長補佐
鈴木正明 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部経口等試験室 室長補佐
奥田裕計 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部生殖試験室 室長
竹内哲也 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部生殖試験室 室長補佐
野口孝義 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部血液生化学査室 室長
近藤ひとみ 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部血液生化学査室 室長補佐
梅田ゆみ 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部病理検査室 室長補佐
妹尾英樹 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部病理検査室 室長補佐
斎藤美佐江 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部病理検査室 室長補佐

研究要旨

ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法を確立することを目的として、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を対象として研究を行った。本年度は、MWCNの呼吸器への生体影響の特徴をラットに気管内投与試験で確認して、標的臓器の絞込みを行うとともに、電子顕微鏡による超微細形態検索で肉眼的な観察や病理組織学的検索で影響が認められる部位を確実に採材することが可能な検索方法の確立を目標とした。ラットの気管内投与試験ではMWCNを気管内に単回噴霧し、投与後1日、7日、28日、91日目に解剖し、気管支・肺胞洗浄液の細胞学的検査、生化学的検査、光学顕微鏡レベルでの肺を含む胸部臓器の病理組織学的検査を行った。MWCNTを単回気管内投与したラット肺の変化は次のような経過を辿ることが明らかとなった。投与後1日目に、肺組織の傷害と急性炎症みられ、投与後7日以降では急性炎症は終息した。MWCNTを貪食したマクロファージの肺胞壁への集簇がみられ、マクロファージによるMWCNTの肺内からのクリアランスが示唆された。肺の線維化は投与後28日以降にみられた。陽性対照としたQuartzとの比較では肺への生体影響はMWCNTの方がQuartzよりも強く現れることが判明し

た。来年度以降、ナノサイズのマテリアルの体内動態について電子顕微鏡を用いた検索を展開する準備として、胸腔内の各臓器間の連携を保った状態で検索が可能な大型のエポキシ樹脂包埋標本の作製を目標として「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術を酒井電子顕微鏡応用研究所と共同開発し、十分評価に耐えるレベルであることが確認できた。

A. 研究目的

本分担研究は、ナノマテリアルの吸入暴露による健康影響の評価手法の確立、とりわけナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究をテーマとしている。平成20年度の課題は、1) 光学顕微鏡レベルでの標的臓器の絞込、2) 電子顕微鏡レベルでの検査手法の検討、3) ナノマテリアルの肺への蓄積と肺外への移行を調べる手法の検討である。本分担研究の実施にあたって、気管内に散布するMWCNT懸濁液中のMWCNTの性状と拡散状態を把握については(独)労働安全衛生総合研究所鷹屋光俊博士の許で研究を進め、本年度の研究報告書が提出されている。

B. 研究方法

B-I MWCNTのラット気管内への投与

MWCNをラットの気管内に単回噴霧し、投与後1日、7日、28日、91日目に解剖し、本年度の課題研究を行う為の生体材料を採取した。MWCNの投与と計画解剖までの実験デザインは次の通りである。

13週齢の雄性F344/DuCrIcrIj ラット、1群あたり63匹を用い、MWCNT(三井物産株提供)を0(対照群)、40、160 µg/0.3 ml/匹の用量で単回気管内投与した。MWCNTの投与用量は、文献情報から肺の線維化病変をエンドポイントとし、カーボングラファイト(synthetic)の曝露限界値である気中濃度5 mg/m³(US.OSHA PEL for carbon graphite)を参考に設定した。1匹当たりの投与量は0.3 ml/匹とした。投与液は用時調製とし、Tween 80を0.1%添加したPBSに、各設定濃度となる様、MWCNTを加え超音波を用いて懸濁、投与直前に超音波で再拡

散させた。気管内投与はイソフルランの吸入による麻酔下で液体気管内投与器具を使用し、気管内に噴霧投与した。対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用したPBSにTween 80 0.1%添加溶液を同様に投与した。陽性対照としてQuartzを単回気管内投与したラットおよび、その対照群として溶媒のみを気管内投与したラットを用いた。電子顕微鏡を用いた超微細形態的検索手法の確立のために各解剖期に併せてMWCNT 160 µg投与動物2匹を供試した。

B-II 光学顕微鏡レベルでの標的臓器の絞込

1) 病理学的検査を中心とした検索:

IでMWCNTを投与した動物の半数を供試した。剖検では胸部の諸臓器(肺、気管、縦隔の組織、リンパ節等)の詳細な病理学的検索を行うため、組織の固定・保存には還流固定を実施した。すなわち、肝門脈から固定液(10%リン酸緩衝ホルマリン)を注入、頸静脈から放血することにより胸部から頭部にかけての諸臓器を固定した。剖検時に臓器を肉眼的に観察した後、胸部臓器を摘出して病理組織学的検査を行った。病理組織学的検査ではヘマトキシリン・エオジン染色標本による一般的な病理組織診断の他に、Masson trichrome染色標本を作製して肺線維化病変の程度を評価した。

2) 気管支・肺胞洗浄液の細胞学的検査、生化学的検査:

MWCNT投与動物の残り半数は、MWCNT投与後各解剖時期にネンプター麻酔下で腹大動脈からの放血により安楽死させ、気管支・肺胞洗浄液を左肺から採取し、細胞学的検査、生化学的検査を実施し、また、右肺の重量を計測し

た。気管支・肺胞洗浄液の採取、細胞学的検査及び生化学的検査は次の手順で行った。剖検直前に右気管支を結紮して気管から生理食塩水5.1 mlを注入し、回収。この操作を3回繰り返して、左肺から洗浄液のほぼ全量を回収した。回収した洗浄液の液量を計量した後、細胞数についてはADVIA 120 (シーメンスヘルスケアーダイアグノスティック株) を用い、細胞分画についてはCytospin 4 (サーモフィシシャーサイエンティフィック株) を用いて遠心収集、メイグムザ染色をした塗抹標本について500細胞を光学顕微鏡下で分類した。生化学的検査については、乳酸脱水素酵素 (LDH)、アルカリフォスファターゼ (ALP)、総蛋白、アルブミン量を自動分析装置 (日立 (株)日立製作所) を用いて計測した。

B-□ 電子顕微鏡による超微細形態検索

ナノサイズのマテリアルの体内動態を把握するには電子顕微鏡による検索が不可欠であるが、従来行われている摘出臓器から1mm角のサンプルを数箇所から採取する検索では、剖検時に行われる試料のサンプリングは目視にたより、病理組織学的検査結果が得られる前に行われている。このため電子顕微鏡検索の目標を正確に理解した採材ができず、光学顕微鏡を用いる病理組織学的検索との連携も十分に図れない。ここでは標的となる個々の臓器についての検索はもとより、胸腔内の各臓器間の連携を保った状態で検索が可能な大型のエポキシ樹脂包埋標本の作製を目標として酒井電子顕微鏡応用研究所と共同で「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術の開発を行った。

(倫理面への配慮)

本研究は動物愛護の観点から日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

C-I MWCNTのラット気管内への投与

MWCNをラットの気管内に単回噴霧し、投与後1日、7日、28日、91日に計画解剖を行い、本年度の課題研究を行う為の生体材料を採取した。

C-II. 光学顕微鏡レベルでの標的臓器の絞込

1) 光学顕微鏡による病理組織検索

現在、病理組織標本の作製を終え、光学顕微鏡を用いた病理組織学的な詳細検索を行っているところで、まだ標的臓器の十分な絞込みを終えていないが、これまでの検索で肺に下記の変化がみられている。

投与後1日：肺にみられる変化は好中球とマクロファージの出現を特徴とした急性炎症であり、肺胞マクロファージによるMWCNTを貪食もみられた。これらの変化は主として気道終末部から肺胞管領域に投与濃度に対応してみられた。

投与後7日：投与後1日にみられた好中球はほとんど認められず、肺胞壁内のMWCNTを貪食した肺胞マクロファージが変化の主体となる。気道終末部や肺胞管領域の肺胞壁にはマクロファージの小集簇がみられることが多い。これらの変化は投与濃度に対応してみられた。明瞭な線維化はみられない。

投与後28日：肺の弱い線維化が認められ、線維化の程度は比較対照としたQuartz投与群の肺よりも強く現れた。気道終末部や肺胞管領域の肺胞壁にMWCNTを貪食したマクロファージの集簇がみられる。これらの変化は投与濃度に対応してみられた。

投与後91日：肺の線維化は、投与後28日と同様であった。気道終末部や肺胞管領域の肺胞壁にMWCNTを貪食したマクロファージの集簇がみられた。これらの変化は投与濃度に対応してみられた。

C-II-(2) 気管支・肺胞洗浄液

細胞学的検査：投与後1日に好中球数が一過性に急増した。肺胞マクロファージ数は投与後1日で対照群と比較して減少したが、投与後7日と28日に対照群よりも増加していた。リンパ球数の増加は投与後1日と7日にみられ、投与後7日の値が特に高かった。好酸球数は投与後1日の値が最も高く、7日、28日、91日と時間経過とともに漸減を示した。これらはいずれも投与濃度に対応した変化であった。

生化学的検査：投与後1日に総蛋白とアルブミンの一過性増加みられた。総蛋白の組成はアルブミンとグロブリンの量がほぼ等しいことが示された。LDHとALPは投与後1日の値が最も高く、7日、28日、91日と時間経過とともに漸減を示した。これら血液生化学的検査の値はいずれも投与用量に相関した変化であった。陽性対照としたQuartz投与群の値はMWCNTと比較して総蛋白とLDHの値が約1/3、ALPの値が約1/2であった。

肺重量：右肺重量は各解剖期とも投与用量に相関した増加がみられた。投与群の右肺重量増加は対照群と比較して統計学的に有意ではあるが、増加幅は小さいものであった。陽性対照としたQuartz投与群には投与による肺重量の増加は認められなかった。

C-III. 電子顕微鏡による超微細形態検索

1) 超微細形態検索の為に「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術の開発：0.5% glutaraldehyde添加2% paraformaldehyde固定液で頭部から胸部を還流固定した胸腔内臓器(気管、縦隔の組織、肺、胸腺、リンパ節、食道)を一塊として摘出、頭側から腹側方向に胸腔内臓器全長に渡り約0.5 mm厚で連続的に切り出す方法を開発した。B-I MWCNTのラット気管内への投与で用意した各解剖期高用量群2匹ずつの

動物について胸腔内臓器の大型のエポキシ樹脂包埋試料を作製した。このエポキシ樹脂包埋試料で光学顕微鏡用の厚切り切片と透過型電子顕微鏡用の超薄切片を作製して、光学顕微鏡と電子顕微鏡の像を観察した。その結果、本研究で開発した技術が今後の研究で十分評価に耐えるレベルであることが確認できた。

D. 考察

MWCNTの単回気管内投与後にラットにみられた生体反応として、投与後1日目に、肺に好中球の遊走を中心とした急性炎症、と肺組織の傷害が起こることが、病理組織学的検査及び気管・肺胞洗浄液の細胞学的検査及び生化学的検査により示された。特に気管支・肺胞洗浄液の生化学的検査で総蛋白とアルブミンの増加がみられたことから肺毛細血管からの血漿蛋白の漏出が起きていることが示された。また、LDHとALPの増加からII型肺胞上皮細胞をはじめとする肺組織の傷害が示された。こうした変化はいずれも投与濃度に対応したものであり、MWCNTの気管内投与で起きたものと考えられた。MWCNTを貪食した肺胞マクロファージが認められ、肺胞マクロファージのMWCNTのクリアランスへの関与が示唆された。投与後7日になると、病理組織学的検査で肺組織内に好中球ほとんどみられず、MWCNTを取り込んだマクロファージの集簇が目立った。気管支・肺胞洗浄液の細胞学的検査でもマクロファージの増加が投与後7日目と28日目で示されることから、投与後7日目と28日目でMWCNTの肺からのクリアランスにマクロファージが関与していると考えられた。

投与後28日以降、MWCNT投与群に病理組織学的検査で肺に線維化が認められ陽性対照としたQuartz投与群よりも幾分強い変化であった。

MWCNT投与群とQuartz投与群で肺にみら

れた生体反応を比較すると、肺重量、気管・肺胞洗浄液(生化学的検査)、病理組織学的検査(肺の線維化)でMWCNT投与群の方がQuartz投与群よりも強い反応が認められた。

単層カーボンナノチューブやMWCNTを実験動物に気管内投与すると病理組織学的には肺に肉芽形成が起こり、気管支・肺胞洗浄液の検査で炎症細胞、総蛋白、LDH及びALPの増加がみられることが報告されている [1,2, 3]。本研究の結果はこれらの報告と一致するものであった。また、MWCNTが肺に進行性の線維化を起こすという報告 [4] がされている。MWCNTが肺に進行性線維症を起こすか否かについては、我々の研究でも肺に軽度の線維化が投与後28日以降に認められているが、さらに詳細な検索を行ってから判断する必要がある。肺に投与されたナノマテリアルの肺からクリアランスについては酸化チタンで若干の報告 [5,6]があるが、カーボンナノチューブのクリアランスについての知見はこれまでのところ報告されていない。透過型電子顕微鏡を用いたナノマテリアルの体内動態の検索には、本研究で実用化の域に達した「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術が有用であると考えられる。

E. 結論

MWCNT単回気管内投与ラットの肺に次に挙げる生体影響がみられた。1)投与後1日に肺の急性炎症、2)マクロファージによるMWCNTの貪食、3)投与後28日以降に肺に軽度の線維化、4)肺への影響の強さはMWCNTの方が陽性対照としたQuartzよりも強い。また、本年度開発した「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」技術は実用の域に達した。

参考文献

- (1) Lam et al. Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanobutes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation. *Toxicol Sci.* 77:126-34, 2004.
- (2) Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al. Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats. *Toxicol Sci.* 77(1):117-25, 2004.
- (3) Muller et al. Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. *Toxicol Appl pharmacol* 207:221-31, 2005.
- (4) Shevedova et al. Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice. *Am J Physiol Lung cell Mol Physiol*,205:L698-L708, 2005.
- (5) S Takahashi and G Patrick. Patterns of lymphatic drainage to individual thoracic and cervical lympho nodes in the rat. *Laboratory Animals*,21:31-34, 1987.
- (6) Warheit DB et al. Inhalation of high concentrations of low toxicity dust in rats: Results in impaired pulmonary clearance mechanisms and persistent inflammation. *toxicol Appl Pharmacol* ,145:10-22, 1997.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhalation Toxicology*. 20, 961-971 (2008).

Ohbayashi, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Fukushima, S., Ohta, H. Enhanced proliferative response of hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to *N,N*-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 327-338 (2008).

Ohbayashi, H., Saito, Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., M., Yamazaki, K., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Occurrence of two different types of glutathion s-transferase placental form positive hepatocytes after a single administration of 2,3,7,8-tetrabromo dibenzo-p-dioxin in rats. *Industrial Health*. 46, 281-288 (2008).

Kano, H., Umeda, Y., Saito, M., Senoh, H., Ohbayashi, H., Aiso, S., Yamazaki, K., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33, 141-153 (2008).

2. 学会発表

相磯成敏, 梅田ゆみ, 山崎一法, 長野嘉介, 戸谷忠雄, 鷹屋光俊, 甲田茂樹, 有藤平八郎, 福島昭治, 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の単回強制気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響: I 病理学的検索 第82回日本産業衛生学会(2009年05月、採択通知受領、演題番号: P1053)

妹尾英樹, 梅田ゆみ, 片桐 卓, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治. *N,N*-Dimethylformamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較. 第25回日本毒性病理学会(2009年1月、浜松).

大林久雄, 相磯成敏, 妹尾英樹, 梅田ゆみ, 長野嘉介, 福島昭治. *N,N*-Dimethylformamideの肝発がんに対する複数経路(吸入・経口)の相乗作用. 第23回発癌病理研究会(2008年8月、鳥羽).

H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

ナノマテリアルの吸入暴露による肺外影響の評価手法に関する研究

研究分担者 甲田 茂樹 独立行政法人労働安全衛生総合研究所研究企画調整部 首席研究員
研究協力者 戸谷 忠雄 独立行政法人労働安全衛生総合研究所有害性評価研究グループ主任研究員
久保田久代 独立行政法人労働安全衛生総合研究所健康障害予防研究グループ主任研究員
芹田富美雄 独立行政法人労働安全衛生総合研究所環境計測管理研究グループ首席研究員

研究要旨

ラットに多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を40および160 μ g/匹単回気管内投与し、経時的に投与後91日目まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行ない、呼吸器以外の臓器や血液への影響について検索した。その結果、MWCNTの投与による動物の死亡や臨床症状の異常は認められなかったが、血液学的検査により投与後7日目に40および160 μ g/匹投与により好酸球と赤血球数の増加が認められた。血液生化学的検査では、投与後1日目に160 μ g/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示した。また、投与後28日目に160 μ g/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果から、MWCNTは気管内投与により肺外影響がみられることが実証された。

A. 研究目的

ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品の経気道的暴露によるヒトの健康影響を評価する上で、吸入したナノマテリアルが心臓や脳など他の臓器に移行するかどうかという点が課題になっている(NIOSH,2007)。経気道的に体内に侵入したナノマテリアルが呼吸器から他の臓器に移行すれば、移行した先の臓器にナノマテリアルが影響を与える可能性がある。また、肺などの呼吸器の障害に伴って、二次的に他の臓器に影響を与える可能性も否定できない。本研究は、気管内投与したナノマテリアルの肺以外の臓器への影響、すなわち肺外影響の評価手法を明らかにすることを目的とする。本年度は、ナノマテリアルのうち多層カーボンナノチューブ(MWCNT)をラットに気管内投与し、呼吸器以外の臓器や血液学および血液生化学的な影響

(肺外影響)を検索した。

B. 研究方法

B-1 実験の概要

ラットにMWCNTを40および160 μ g/匹単回気管内投与し、投与後1、7、28及び91日目に動物を解剖し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行ない、肺外影響を検索した。また、陽性対照としてQuartzを単回気管内投与したラットおよび対照群として溶媒のみを気管内投与したラットを用いた。

B-2 被験物質

MWCNT(ロット番号061220)は三井物産株より提供を受けた(直径40~90 nm、アスペクト比100以上)。Quartz(MIN-U-SIL 5, U.S. Silica Company)(平均粒径1.6 μ m)を使用した。

B-3 使用動物と飼育環境

11週齢の雄性F344/DuCrIjラットを日本チャールス・リバー、厚木飼育センターより導入し、2週間の検疫・馴化の後、実験に使用した。

動物は、温度 $23\pm 2^{\circ}\text{C}$ 、湿度 $55\pm 15\%$ 、明暗サイクル12時間点灯/12時間消灯の飼育室内で、ステンレス製金網個別ケージにて飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業(株)のCRF-1固形飼料、飲水は市水をフィルターろ過した後、紫外線滅菌し、自動給水装置により自由摂取させた。

B-4 実験群の構成と投与方法

MWCNTについては、40および160 μg /匹投与群、Quartzについては160 μg /匹投与群を陽性対照群として設けた。また、対照群として、媒体に用いたリン酸緩衝生理食塩水(PBS)にTween 80を0.1%添加した液を同様に投与した群を設けた。

MWCNTおよびQuartzは、Tween80を0.1%添加したPBS液に懸濁させ、各設定濃度に調製し、超音波を用いて分散させた。この懸濁液をイソフルラン吸入による麻酔下で液体気管内投与器具(MicroSprayer[®])を使用して気管内に1回、噴霧投与した。なお、1匹当たりの投与容量は0.3ml/匹とした。

B-5 検査項目

動物は飼育期間中、毎日観察を行った。体重は、週1回測定するとともに、解剖時にも測定した。

MWCNT投与動物は、投与後1、7、28及び91日目、Quartz投与動物は、投与後1、28及び91日目に各群8匹の動物をチオペンタール麻酔下で、後大動脈から採血し、解剖した。血液は、総合血液学検査装置(ADVIA 120:シーメンスヘルスケア・ダイアグノスティクス社)を用いて、赤血球数、ヘモグロビン濃度、ヘマトクリット値、平均赤血球容積、平均赤血球ヘモグロビン量、平均赤血球ヘモグロビン濃度、血小板数、網赤血球比、白血球数、白血球分類を測定

した。血漿は、自動分析装置(日立 7080:株日立製作所)を用いて、総蛋白、アルブミン、A/G比、総ビリルビン、グルコース、総コレステロール、トリグリセライド、リン脂質、AST、ALT、LDH、ALP、 γ -GTP、CK(Creatine Kinase)、尿素窒素、クレアチニン、ナトリウム、カリウム、クロール、カルシウム、無機リンを測定した。動物は腹腔、胸腔及び頭蓋腔を含め剖検した後、皮膚、骨髄(大腿骨)、リンパ節(腋窩、腹壁等)、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸(十二指腸を含む)、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、前立腺、乳腺、脳、脊髄、末梢神経(坐骨神経)、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨(大腿骨)を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。また、胸腺、副腎、精巣、心臓、腎臓、脾臓、肝臓、脳については、湿重量を測定した。固定した臓器・組織はパラフィン包埋し、薄切後、HE染色し、病理組織学的に検索した。

(倫理面への配慮)本研究は日本バイオアッセイ研究センターの「動物実験に関する指針」に基づき実施した実験により得られた材料を使用した。

C. 研究結果

C-1 臨床症状

MWCNT投与動物およびQuartz投与動物とも死亡した動物はなかった。また、試験期間を通して、臨床症状に異常のみられた動物はなかった。

C-2 血液学的検査結果

1) 投与後1日目

MWCNT投与動物は、各検査項目とも対照群との差を認めなかった。Quartz投与動物は、好中球($1.47\pm 0.29\times 10^9/\text{ml}$)が対照群($1.09\pm 0.25\times 10^9/\text{ml}$)と比較して高値であった。また、平

均赤血球ヘモグロビン濃度 (35.3 g/dl) が対照群 (35.7 g/dl) と比較して低値であった。

2) 投与後7日目

MWCNT投与動物は、40および160 μ g/匹投与群の好酸球 (0.07 \pm 0.01、0.08 \pm 0.02 \times 10³/ml) が対照群 (0.05 \pm 0.02 \times 10³/ml) と比較して高値、160 μ g/匹投与群の好中球 (1.12 \pm 0.16 \times 10³/ml) が対照群 (0.95 \pm 0.11 \times 10³/ml) と比較して高値であった。また、40および160 μ g/匹投与群の赤血球数 (8.69 \pm 0.21、8.65 \pm 0.15 \times 10⁶/ml) が対照群 (8.39 \pm 0.26 \times 10⁶/ml) と比較して高値、160 μ g/匹投与群の平均赤血球容積 (47.6 \pm 0.3 fl) が対照群 (48.1 \pm 0.4 fl) と比較して低値を示した。

3) 投与後28日目

MWCNT投与動物およびQuartz投与動物とも、各検査項目に対照群との差を認めなかった。

4) 投与後91日目

MWCNT投与動物は、各検査項目とも対照群との差を認めなかった。Quartz投与動物は、赤血球数 (9.23 \pm 0.22 \times 10⁶/ml) とヘマトクリット値 (43.2 \pm 0.8%) が対照群 (8.97 \pm 0.21 \times 10⁶/ml、42.2 \pm 0.8%) と比較して高値であった。

C-3 血液生化学的検査結果

1) 投与後1日目

MWCNT投与動物は、160 μ g/匹投与群の総蛋白 (6.2 \pm 0.2 g/dl) が対照群 (6.0 \pm 0.2 g/dl) と比較して高値、A/G比 (1.1 \pm 0.0) が対照群 (1.2 \pm 0.1) と比較して低値であった。また、総コレステロール (56 \pm 4 mg/dl)、リン脂質 (105 \pm 6 mg/dl)、ALP (598 \pm 40 IU/l) および尿素窒素 (20.5 \pm 1.7mg/dl) は対照群 (50 \pm 4 mg/dl、97 \pm 8mg/dl、558 \pm 21 IU/l、18.6 \pm 1.6mg/dl) と比較して高値であった。また、カリウム (3.7 \pm 0.2 Eq/l)、カルシウム (10.7 \pm 0.2 Eq/l) および無機リン (7.7 \pm 0.5 mg/dl) は対照群 (3.5 \pm 0.1 Eq/l、10.4 \pm 0.2 Eq/l、7.1 \pm 0.7mg/dl) と比較して高値、

クロール (105 \pm 1 Eq/l) は対照群 (107 \pm 1 Eq/l) と比較して低値であった。Quartz投与動物では、カルシウム (10.2 \pm 0.1 Eq/l) が対照群 (10.0 \pm 0.2 Eq/l、7.1 \pm 0.7mg/dl) と比較して高値であった。

2) 投与後7日目

MWCNT投与動物は、160 μ g/匹投与群のCK (180 \pm 45 IU/l) が対照群 (261 \pm 89 IU/l) と比較して高値であった。

3) 投与後28日目

MWCNT投与動物は、160 μ g/匹投与群の無機リン (6.5 \pm 0.4mg/dl) が対照群 (5.8 \pm 0.4mg/dl) と比較して高値であった。Quartz投与動物は、各検査項目とも対照群との差を認めなかった。

4) 投与後91日目

MWCNT投与動物およびQuartz投与動物とも、各検査項目に対照群との差を認めなかった。

C-4 臓器重量

1) 投与後1日目

MWCNT投与動物およびQuartz投与動物とも、各臓器の実重量と体重比に対照群との差を認めなかった。

2) 投与後7日目

MWCNT投与動物は、各臓器とも実重量と体重比に対照群との差を認めなかった。

3) 投与後28日目

MWCNT投与動物は、40および160 μ g/匹投与群の肝臓の実重量 (6.666 \pm 0.330 mg、6.554 \pm 0.275 mg) が対照群 (7.049 \pm 0.209 mg) と比較して低値であった。また、160 μ g/匹投与群の肝臓の体重比 (2.377 \pm 0.080%) も対照群 (2.477 \pm 0.080%) と比較して低値であった。160 μ g/匹投与群の脳の体重比 (0.679 \pm 0.017%) も対照群 (0.656 \pm 0.011%) と比較して低値であったが、実重量には対照群との差が認められなかった。Quartz投与動物は、各臓器とも実重量と体重比に対照群との差を認めなかった。

4) 投与後91日目

MWCNT投与動物は、各臓器とも実重量と体重比に対照群との差を認めなかった。Quartz投与動物は、副腎の体重比(0.017±0.003%)が対照群(0.015±0.001%)と比較して高値であった。

以上のように、ラットにMWCNT(40および160μg/匹)を単回気管内投与した結果、MWCNTの投与による動物の死亡や臨床症状の異常は認められなかった。しかし、血液学的検査では、投与後7日目にのみ40および160μg/匹投与により好酸球と赤血球数の増加が認められた。また、血液生化学的検査では、投与後1日目に160μg/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示したが、その後は、投与後7日目にCKの高値、投与後28日目に無機リンの高値がみられただけであった。臓器重量は、投与後28日目に160μg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。なお、Quartz(160μg/匹)を投与した動物は、血液学的検査で投与後1日目に好中球の高値と平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値、投与後91日目に赤血球数とヘマトクリット値の高値、血液生化学的検査で投与1日後にカルシウムの高値、臓器重量の測定で投与91日後に副腎の体重比の高値がみられた。

D. 考察

経気道的に暴露されたナノマテリアルは、呼吸器に沈着するとともに他の臓器にも移行することが報告されている。例えば、Oberdörsterら(2002)は、C¹³でラベルしたcount median diameter(CMD)20~29 nmの炭素粒子をラットに吸入暴露する実験を行い、吸入した炭素粒子が肝臓に沈着することを報告している。また、彼らはCMD 36 nmの炭素粒子をラットに吸入暴露した実験で、吸入した炭素粒子が中枢

神経系、特に嗅球に移行することを見出し、ナノサイズ粒子の吸入による標的臓器が中枢神経系である可能性を指摘している(Oberdörsterら,2004)。本研究では、気管内投与したナノマテリアルの肺以外の臓器への影響、すなわち肺外影響を評価する手法明らかにすることを目的として、MWCNTを研究対象として実験的な研究を試みた。

労働現場でのカーボンナノチューブ(CNT)の労働者への主な暴露形態は吸入暴露であり、取り扱い労働者の肺への影響が危惧されている(Donaldsonら,2006、NIOSH,2007)。動物実験による研究でも、単層カーボンナノチューブやMWCNTを実験動物に気管内投与すると、肺に有害影響が現れることが報告されている(Lamら,2004、Warheitら,2004、Mullerら,2005、Shvedovaら,2005、Mangumら,2006、Mercerら,2008)。一方、Mitchellら(2007)は、マウスにMWCNTを吸入暴露した実験で、MWCNTの影響が肺だけでなく免疫系にも認められたことを報告している。

本研究では、ラットにMWCNT(40および160μg/匹)を単回気管内投与し、経時的に投与後91日目まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行ない、呼吸器以外の臓器や血液学および血液生化学的な影響について検索した。MWCNTの投与用量はカーボングラファイトの労働環境での暴露限界値である気中濃度5 mg/m³(US.OSHA PEL for carbon graphite)への吸入曝露による体内負荷を考慮して設定した。すなわち、5 mg/m³の濃度に体重250gのラットが1日6時間吸入暴露された場合、ラットの体重1kgあたりの呼吸量を561 ml/分(Mauderlyら,1979)、沈着率を100%として計算すると、1日あたりの沈着量は250μg/匹になる。また、粒子状物質の吸入暴露(鼻部暴露)による呼吸器への沈着率が気管内投与に

対し11% (Leongら,1998) であると仮定して沈着率を補正すると、5 mg/m³の濃度に体重250gのラットが1日6時間吸入暴露された場合の沈着量は、気管内投与での投与量28μg/匹に相当する。従って、1日6時間、5 mg/m³の濃度に40μg/匹は1~2日、160μg/匹は6日暴露した場合に相当する用量である。その結果、血液学的検査では、投与後7日目にのみ40および160μg/匹投与により好酸球と赤血球数の増加が認められた。また、血液生化学的検査では、投与後1日目に160μg/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示した。さらに、投与後28日目に160μg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果は、MWCNTの経気道の暴露による肺以外への影響が起きる可能性があることを示している。特に、好酸球の増加は、アレルギー等の免疫系への影響を示唆する変化であり (Humbles et al., 2004; Lee et al., 2004)、注目すべき知見と考えられる。また、MWCNTと同様に160μg/匹の用量のQuartzを気管内投与した動物では、投与1日後に好中球の高値と平均赤血球ヘモグロビン濃度の低値および血漿カルシウムの高値、投与91日後に赤血球数とヘマトクリット値の高値および副腎の体重比の増加がみられ、MWCNTとQuartzの気管内投与による影響は異なることが示された。

ナノマテリアルについては、体内の侵入経路が気道以外にも存在する可能性があるとの指摘もあることから、経気道以外の体内侵入による肺外影響についても留意する必要がある、今後は、これらを考慮してMWCNTの肺から他臓器への移行とその経路および移行先の組織との生体反応などの課題を研究する必要がある。

E. 結論

ラットにMWCNT (40および160μg/匹)を単回気管内投与し、経時的に投与後91日目まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行なった結果、血液学的検査により投与後7日目に40および160μg/匹投与により好酸球と赤血球数の増加、血液生化学的検査では投与後1日目に160μg/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンが高値、A/G比とクロールが低値を示した。また、投与後28日目に160μg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果から、MWCNTは経気道暴露により肺外影響を起こすことが示唆された。

参考文献

- Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., et al. (2006). *Toxicol. Sci.* 92, 5-22.
- Humbles, A.A., Lloyd, C.M., McMilan, S.J., et al. (2004). *Science* 305, 1776-1779.
- Lam, C.W., James, J.T., McCluskey, R., et al. (2004). *Toxicol. Sci.* 77, 126-134.
- Lee, J.J., Dimica, D., Macias, M.P., et al. (2004) *Science* 305, 1773- 1776.
- Leong, B.K.J., Coombs, J.K., Sabaitis, C.P., et al. (1998). *J. Appl. Toxicol.* 18, 149-160.
- Mangum, J.B., Turpin, E.A., Antao-Menezes, A., et al. (2006). *Particle Fibre Toxicol.* 3, 15.
- Mauderly, J.L., Tesarek, J.E., Sifford, L.J., et al. (1979). *Lab. Anim. Sci.* 29, 323-329.
- Mercer, R.R., Scabilloni, J., Wang, L., et al. (2008). *Am. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 294, L87-L97.
- Mitchell, L.A., Gao, J., Vander Wal, R., et al.

- (2007). Toxicol. Sci. 100, 203-214.
- Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., et al.
(2007). Toxicol. Appl. Pharmacol. 207,
221-231.
- National Institute for Occupational Safety
and Health (NIOSH). (2007). DHHS
(NIOSH) Publication No. 2007-123.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., et
al. (2002). J. Toxicol. Environ. Health
65, 1531-1543.
- Oberdörster, G., Sharp, Z., Atudorei, V., et
al. (2004). Inhalation Toxicol. 16,
437-445.
- Shvedova, A.A., Kisin, E.R., Mercer, R., et
al. (2005). Am. Physiol. Lung Cell Mol.
Physiol. 289, L698-L708.
- US.OSHA Permissible Exposure Limit
(PEL) for carbon graphite
- Warheit, D.B., Laurence, B.R., Reed, K.L.,
et al. (2004). Toxicol. Sci. 77, 117-125.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの吸入暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立

研究分担者 吉田 緑

国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター病理部第二室 室長

研究要旨

カーボンナノチューブのミストおよびリポソームを用いたフラーレンを雄ラットに単回吸入暴露し、神経系器官を中心に経時的な病理形態学的検索を実施した。その結果、嗅球を始めとする神経系組織には光学顕微鏡レベルでは異常は認められなかった。投与物質の嗅球への移行については今後電顕微鏡での観察を予定しているが、本投与量において、これらの物質の単回吸入暴露は、光学顕微鏡レベルでの器質的な毒性を及ぼさないと結論した。

A. 研究目的

ナノサイズ粒子(NSP)は産業用マテリアルとして新用途への展開が期待されている一方、未知の生体影響も予測されており、その物理化学的特性を考慮した有害性評価の開発が急務である。とくに NSP は経口だけでなく、鼻腔および皮膚暴露による侵入が懸念されているため、健康影響研究においては、曝露経路による毒性の特徴を把握することが重要である。そこで本研究は、NSP 曝露による生体影響として予測される経路のうち、鼻腔から嗅神経を介した中枢への影響を形態学的に検出することを目的として実施する。

初年度にあたる本年は、以下の内容を目的として実験を行った:

- カーボンナノチューブのミストを単回吸入暴露したラットの神経系器官における経時的な病理形態学的変化
- リポソームを用いたフラーレンの単回吸入ラットの神経系器官の経時的な病理組織

学的変化

- 上記 2 試験における嗅球の超微形態学的な検索

B. 研究方法

1. カーボンナノチューブ(CNT)のミストを単回吸入暴露したラットの神経系器官における経時的な病理形態学的変化

本実験の計画を Figure 1 に示した。本実験は、CNT のミストを単回吸入暴露したラットにおける体内動態解析用サンプルを得るための実験の一部として実施したものである。実験方法として、6 週齢の雄 SD ラットに Tween20 に懸濁した CNT を単回吸入暴露させた。動物数を 1 群 20 匹として、曝露後 0、3、7、14 および 28 日後に各 5 匹を安楽死させ検索した。対照群には同数のラットを用いて溶

媒のみを投与し、投与群と同時期に検索を行った。剖検後、体内動態解析用サンプルを採取後の嗅球、脳、肺、肺門リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、通常の方法に従い、切り出し(所定の部位)・包埋・薄切・ヘマトキシリンエオジン染色を行い鏡検した。

2. リポゾームを用いたフラーレンの単回吸入ラットの神経系器官の経時的な病理組織学的変化

本実験では、フラーレンをラットに単回吸入曝露した。実験方法として、6週齢の雄SDラットにフラーレンを単回吸入曝露させた。動物数を1群20匹として、曝露後0、3、7、14および28日後に各5匹を安楽死させ検索した。対照群には同数のラットを用いて溶媒であるリポゾームのみを投与し、投与群と同時期に検索を行った。剖検後、嗅球、脳、肺、肺門リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓を10%中性緩衝ホルマリン液で固定した。固定後、通常の方法に従い、切り出し(所定の部位)・包埋・薄切・ヘマトキシリンエオジン染色を行い鏡検した。

上記の2試験において使用した動物については、実験動物の適切な扱いに関する国内外の法規・規則・ガイドライン等に準拠しており、動物実験についても試験実施施設における動物実験委員会による事前審査とモニタリングを受けることにより、適切な倫理面への配慮を行った。

3. 上記2試験における嗅球の超微形態学的な検索

上記2試験の各検査時期に得られた以下の臓器について電子顕微鏡検索の

ためのサンプリングおよび標本作製を行った。

対象臓器 嗅球、肺、肝臓および脾臓

これらの臓器は3から5mmのブロックで採取後さらに細かく細切し、3%グルタルアルデヒドで一晩4℃にて固定した。固定後、リン酸緩衝液で洗浄した。その後、1%オスミック酸で2時間後固定し、アルコール脱水、ブチルグリシジルエーテルで置換後、エポキシ樹脂に包埋した。

C. 結果

1. カーボンナノチューブ(CNT)のミストを単回吸入曝露したラットの神経系器官における経時的な病理形態学的変化

全ての検査時期において、対照群および投与群ともに嗅球に異常は認められなかった。また、検索したその他の臓器においても、投与に関連した変化はいずれの検査時期にも認められなかった。溶媒対照群の1例が途中で死亡した以外、死亡する動物は観察されなかった。

2. リポゾームを用いたフラーレンの単回吸入ラットの神経系器官の経時的な病理組織学的変化

全ての検査時期において、対照群および投与群ともに嗅球に異常は認められなかった。また、検索したその他の臓器においても、投与に関連した変化はいずれの検査時期にも認められなかった。

3. 上記2試験における嗅球の超微形態学的な検索

平成 21 年 2 月現在、当該施設において電子顕微鏡の付属設備の設置を進めており、その設置後、観察予定である。

D. 考察

本年度は、カーボンナノチューブのミストおよびリポゾームを用いたフラールを雄ラットに単回吸入曝露し、神経系器官を中心に経時的な病理形態学的検索を実施した。その結果、嗅球を始めとする神経系組織には光学顕微鏡レベルでは異常は認められなかった。本試験に用いた用量では、呼吸器にも異常は認められなかった。呼吸器系へも影響が観察されなかった一因として、単回投与であること、および投与量が低かったことが考えられた。

鼻腔の嗅細胞を介した神経系への移行は、多くはないものの文献的に古くから報告されている。Bodian と Howe はチンパンジーを用いてポリオウィルス(30 nm)が鼻腔内投与により嗅神経を介して移行することを 1941 年に報告し、de Lorenzo は 1970 年に銀コーティングされた金(50 nm)が、鼻腔内投与により嗅神経へ移行することリスザルを用いて報告している。近年では、酸化マグネシウム粒子(粒子径 30 nm)をラットに 1 日 6 時間、週 5 日、12 日間吸入曝露した実験が実施され、嗅球、脳各部位および肺のマグネシウム濃度が測定されている(Elder et al., 2006)。この実験では、投与 12 日まで肺および神経系などいずれの部位においてもマグネシウムが検出され、とくに嗅球で高い値が認められた。しかし病理組織学的検査は実施されていない。一方で嗅神経軸索の径(100 から 200nm)を考慮すると、NSP すべてが軸索を介して移行するとは考えることは難しく、実験動物とヒトの間には構造学的な種差が大きく、

実験動物からヒトへの外挿性は難しいとの見解も報告されている(Oberdorster et al., 2008)。しかし、ヒトにおいても嗅神経が鼻腔に存在し、嗅神経を介して神経系へ NSP が移行する可能性が否定できないことから、嗅球への移行を動物実験レベルで確認することは極めて重要であると考えられる。

本年度の実験では光学顕微鏡レベルの検討のみであるため、投与物質の神経系への移行の有無は不明である。しかし、これらの 2 つの実験の病理組織学的検索において投与群に病理形態学的な異常が観察されないことを考慮すると、少なくとも細胞に変性・壊死など明らかな器質的な障害を及ぼすとは考えにくい。

次年度は、本年度実施の 2 試験に用いた嗅球の超微形態学的な検索を行って神経系への移行を確認するとともに超微形態学的な変化についても検討するなど、さらに神経系への影響について検討を進める予定である。

E. 結論

カーボンナノチューブのミストおよびリポゾームを用いたフラールを雄ラットに単回吸入曝露し、神経系器官を中心に経時的な病理形態学的検索を実施した。その結果、嗅球を始めとする神経系組織には光学顕微鏡レベルでは異常は認められなかった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 雑誌

- ① Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M.,