

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業、H20-化学一般-006）
分担研究報告書

ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための *in vitro* 系で
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

研究分担者 浅倉眞澄 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
病理検査部培養細胞試験室 室長

研究協力者 杉山淑江 日本バイオアッセイ研究センター病理検査部
培養細胞試験室 室長補佐

研究要旨

近年、種々のナノマテリアルが開発され、広い分野で使用されている。しかし、現在、このようなナノマテリアルの安全性試験の手法が確立されているとは言いがたい。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。本研究では、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を用い、①溶媒の検討、②分散方法の検討、③細胞種の検討、④細胞毒性指標の検討を実施した。その結果、以下の手法を確立することが出来た。①溶媒は DMSO/培養液に懸濁する。②超音波ホモジナイザーにより分散 (3 分) する。③試験した 3 種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能である。④毒性指標としては、コロニー法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一般的に大きさが 1~100nm 程度の超微粒子とされるが、ナノテクノロジーの分野の研究開発が進み、既にナノマテリアルを材料とした化粧品、衣料、医薬品などに盛んに使用されるようになってきた。しかし、その安全性や毒性についての研究はまだ始まったばかりである。特に作業環境や一般生活の環境において、ヒトへの健康影響が懸念されている。ナノマテリアルの中でも、カ

ーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。

本試験は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。

MWCNT は水に溶けないことおよび超微粒子であることなどから、通常の安全性の試験ガイドラインに示されているよう

な溶媒および処理方法では、正確な評価が出来ない可能性がある。このため、試験材料として MWCNT を用い、細胞への処理方法の開発、適正な細胞種を選択等を検討したうえで、細胞毒性試験、遺伝毒性試験等を用いた評価を行うこととした。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

三井物産株式会社から提供を受けた多層カーボンナノチューブ (MWNT-7, Lot No. 061220-01K) を使用した。細胞は、チャイニーズハムスター肺由来の細胞株 (CHL/IU, V79) および、BALB/c マウス由来の細胞株 (BALB/c3T3) を使用した。培養液は、MEM+10%牛胎児血清 (V79, BALB/c3T3) または、MEM+10%仔牛血清 (CHL/IU) を使用した。

B-2. 溶媒の検討

MWCNT は水に溶けないため、通常の安全性の試験ガイドラインに示されているような溶媒および処理方法では、正確な評価が出来ない可能性がある。

このため、MWCNT を適正に分散させる溶媒の検討を始めに行った。すなわち、コロニー形成能を指標とした細胞毒性試験を種々の溶媒を用いて実施し、強く細胞毒性を示す溶媒を選択した。溶媒検討には以下の5種類の方法を用いた。①MWCNT を培養液に直接懸濁、②MWCNT にジメチルスルホキシド (DMSO, 最終濃度 0.5%) を添加後、培養液に懸濁、③MWCNT を 0.1mg/ml Tween80 水溶液に懸濁後 (最終濃度の 10 倍)、培養液に添加、④MWCNT を 1% カルボキシメチルセルロース水溶液 (CMC) に

懸濁後 (最終濃度の 10 倍)、培養液に添加、⑤リン酸緩衝生理食塩液 (PBS) に懸濁後 (最終濃度の 10 倍)、培養液に添加して、細胞毒性試験を実施した。MWCNT の懸濁液は、超音波ホモジナイザーで 5 分間分散処理を行い、直後に培養液で調製し、15 分以内に細胞に処理をした。

細胞毒性試験は、35mm ポリエチレンシャーレに 100 個の細胞 (CHL/IU) を播種し、翌日に MWCNT を処理し、7 日間 CO₂ インキュベータで培養した。7 日間培養後に細胞を固定 (酢酸+エタノール) し、0.1% クリスタルバイオレットで染色後、形成したコロニーをカウントして細胞生存率を算出した。細胞生存率は、陰性対照のコロニー数を 100% として算出した。各用量、4 枚のシャーレを用いて実施した。

B-3. 分散方法の検討

溶媒 (B-2) の検討により、DMSO/培養液による MWCNT の分散処理が、細胞毒性を強く発現することが分かった。このため、溶媒を DMSO として、分散方法の検討を行った。分散方法は、①懸濁液を入れたポリプロピレン製のスピッツを超音波槽 [UC-6200 型 (600W)、シャープ] に設置して分散する方法と、②超音波ホモジナイザー [VP-30S 型 (20kHz, 300W)、マイクロチップ: MCN-0420 (テーパー型)、タイテック] で分散する方法の 2 通りで実施した。分散方法と同時に分散時間についても検討を行った。細胞毒性試験は、B-2 と同じ方法とした。

B-4. 細胞種の検討

使用する細胞種の違いにより、MWCNT

への感受性が異なる可能性がある。細胞は、CHL/IU、V79、BALB/c3T3 の 3 種類を用いて、細胞毒性試験を実施した。試験方法は、B-2 および B-3 と同じ方法とし、溶媒に DMSO を用い、超音波ホモジナイザーにより分散処理 (3 分) を行った。

B-5. 細胞毒性指標の検討

上記、B-1 から B-4 では、細胞毒性の指標としてコロニー形成能を見たが、別の指標として酵素放出法を実施し、結果を比較した。

試験は、60mm ポリエチレンシャーレに 10^5 個の細胞を播種し、2 日後に MWCNT を処理した。処理 24 時間後に培養液を遠心 (1200rpm、10 分) し、上清中の酵素量 (乳酸脱水素酵素 : LDH) を測定した。また、残ったシャーレに、0.1% Triton X-100 (生理食塩液中) を添加し、細胞を融解 (4℃、2 時間) 後、細胞中 (1200rpm、10 分遠心の上清) の酵素量を測定した。培養液中の酵素量と細胞中の酵素量の和を酵素全量として、酵素放出率をシャーレ毎に算出した。培養液中の血清に含まれている酵素量は、別に測定して補正した。LDH は、JSCC 法により、自動分析装置 (日立 7080 型) を用いて測定した。細胞は、CHL/IU および V79 を用いた。各用量、4 枚のシャーレを用いて実施した。

C. 研究結果

C-1. 溶媒の検討

溶媒検討結果を表 1 に示した。細胞毒性を強く示す溶媒は、DMSO/培養液 > 培養液 > Tween80 (0.1mg/ml 水溶液) > PBS > CMC (1%水溶液) の順となった。MWCNT を処

理したシャーレを位相差顕微鏡 (400 倍) で観察したところ、上記順番で分散状態がよいことが確認された。

C-2. 分散方法の検討

分散方法の検討の結果を表 2 に示した。分散装置としては、超音波ホモジナイザーを用いて、懸濁液に直接マイクロチップを入れて分散する方が、超音波槽内に懸濁液の入った容器を設置する方法よりも良いことが分かった。また、超音波ホモジナイザーの分散時間による細胞毒性の強さは、3 分 > 1 分 > 10 分 > 0.3 分となった。

C-3. 細胞種の検討

細胞の違いによる細胞毒性試験の結果を表 3 に示した。細胞生存率が 80-20% の範囲では、細胞毒性の強さは、3 種ともほとんど変わらない結果となった。高濃度処理では、V79 が他の 2 種に比べて若干感受性が高い結果となっている。なお、3 種の細胞ともに貪食能を持つことが知られている。

C-4. 細胞毒性指標の検討

CHL/IU および V79 を用いた酵素放出法の結果を表 4 に示した。同一濃度での酵素放出率を比較すると CHL/IU > V79 となるが、陰性対照での放出率は V79 の方が低い結果となった。V79 では、バックグラウンドが低いために、高い濃度でも酵素放出が抑えられている可能性があり、両者の感受性の差は大きくない可能性がある。

D. 考察

溶媒の検討

DMSO/培養液は、疎水性の強いMWCNTに極性溶媒であるDMSOを少量添加することにより、水との親和性が強くなり、分散性が良くなるものと考えられる。培養液に懸濁したものが比較的強い細胞毒性を示したがこれは、培養液中に含まれる10%の血清が、分散性を良くしていると考えられる。ナノマテリアルの分散剤としてTween系が比較的広く使われている。今回の実験では、Tween80濃度が0.1mg/mlと薄いのにに対し、MWCNT濃度としては4000 μ g/mlと高く(最終濃度の10倍を調製して超音波分散後、培養液に添加した)、界面活性効果が十分に期待できない可能性が考えられた。なお、細胞毒性との関係でTween80濃度はこれ以上高くすることは不可能である。PBSおよびCMCについては、MWCNTに対する分散効果があまり期待できないことが分かった。

以上の結果から、以降の試験には、MWCNT分散の溶媒としてDMSO/培養液を用いた。具体的には、MWCNTを秤量しこれにDMSOを最終濃度の0.5%添加し、必要量の培養液を添加後、超音波処理を行った懸濁液を最高処理濃度とし、培養液で段階希釈した後に細胞に処理した。

分散方法

超音波ホモジナイザーで直接懸濁液を分散する方が、超音波槽に設置するのに比べてエネルギー効率が高いと考えられる。しかし、長時間処理しすぎると、逆に凝集してしまうことにより、細胞毒性が低くなる可能性が考えられる。この試験以降のMWCNTの処理は、原則として

DMSOを溶媒とし、超音波ホモジナイザーでの分散処理(3分)をして、細胞に処理した。調製から処理までは15分以内とした。今回の調製液は、20-30mlの容量で分散処理を行った。容量が大きく変わる場合は、有効な処理時間が変化する可能性がある。

細胞種

CHL/IUおよびV79は、チャイニーズハムスターの肺由来の細胞株である。一方、BALB/c3T3は、マウス全胎児細胞由来の細胞株である。細胞の種類によって、細胞の大きさ、増殖速度、食食能等に違いがあると思われるが、細胞毒性毒性結果(コロニー法)に大きな違いは認められなかった。

以上の結果から、変異原性試験の評価には、日本で広く用いられている細胞(CHL/IU)を用いる。また、トランスフォーメーション試験には、これも良く使われているBALB/c3T3細胞を用いることとする。

細胞毒性指標

培養細胞に対する毒性の強さを、コロニー形成法および酵素放出法を用いて検索した。コロニー法は、細胞相互の影響が少なく、単一の細胞の増殖能力に及ぼす被験物質の影響が直接調べられ、増殖死の指標として用いられている。一方、LDHは細胞質に存在する酵素であり、細胞膜の破壊により細胞外に放出されると考えられており、細胞死の指標として用いられる(酵素放出法)。

MWCNTにおいては、細胞毒性の2つの指標に大きな相違は認められなかった。両

指標ともに、MWCNT に対しては有効に使用できると考えられる。

なお、被験物質の分散性および被験物質の細胞への取り込み等を確認するため、電子顕微鏡での確認が今後必要であると考える。

E. 結論

本試験は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。MWCNT を用い、①溶媒の検討、②分散方法の検討、③細胞種の検討、④細胞毒性指標の検討を実施した。その結果、以下の手法を確立することが出来た。①溶媒は DMSO/培養液に懸濁する。②超音波ホモジナイザーによる分散 (3 分) する。③試験した 3 種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能である。④毒性指標としては、コロニー法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。

今後、上記の分散条件を用い、CHL/IU 細胞による変異原性試験 (染色体異常試験、小核試験、遺伝子突然変異試験)、BALB/c3T3 細胞によるトランスフォーメーション試験を実施することにより、MECNT の遺伝毒性等の評価を試みる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

M. Asakura, T. Sasaki, T. Sugiyama, H. Arito, S. Fukushima, T. Matsushima, ;
An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous

compounds in the chromosomal aberration assay. *Mutation Res.* 652 (2008) 122-130

2. 学会発表

浅倉真澄、杉山淑江、長野嘉介、松岡厚子、福島昭治、ナノ材料の *in vitro* 安全性評価手法の開発 -1- 二酸化チタン、第 37 回日本環境変異原学会 (2008 年 11 月)

浅倉真澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性、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: P1052)

G. 知的財産権の出願・登録状況

- ・特許取得・実用新案登録なし。

表1 溶媒検討(細胞毒性試験結果:コロニー形成法)

用量 (μ g/ml)	細胞生存率(%)* \pm SD				
	培養液	DMSO/培養液	Tween80	CMC	PBS
陰性対照	100	100	100	100	100
12.5	92 \pm 11	99 \pm 7.8	100 \pm 6.4	98 \pm 8.9	99 \pm 1.6
25	82 \pm 10	102 \pm 6.2	103 \pm 5.1	99 \pm 3.3	98 \pm 12
50	81 \pm 14	82 \pm 3.1	100 \pm 5.5	101 \pm 6.2	98 \pm 9.5
100	72 \pm 9.4	54 \pm 8.2	98 \pm 7.8	99 \pm 6.1	92 \pm 3.7
200	57 \pm 16	33 \pm 7.1	80 \pm 7.8	91 \pm 3.2	87 \pm 8.7
400	37 \pm 4.9	4 \pm 1.6	45 \pm 4.7	71 \pm 8.8	51 \pm 9.7
陽性対照 (chrysoliteA)	43 \pm 2.8				

* 細胞生存率は、陰性対照のコロニー数を100%として算出した。データは、4枚のシャーレの平均値を示した。

使用細胞:CHL/IU

表2 分散法検討(細胞毒性試験結果:コロニー形成法)

用量 (μ g/ml)	細胞生存率(%)* \pm SD**						
	超音波ホジナ イザ-(0.3分)	超音波ホジナ イザ-(1分)	超音波ホジナ イザ-(3分)	超音波ホジナ イザ-(10分)	超音波槽 (30分)	超音波槽 (60分)	超音波槽 (120分)
陰性対照	100						
12.5	88 \pm 6.4	88 \pm 8.0	87 \pm 4.8	93 \pm 15	93 \pm 7.0	93 \pm 6.9	95 \pm 11
25	82 \pm 4.9	83 \pm 4.0	88 \pm 4.9	91 \pm 11	83 \pm 2.6	86 \pm 7.4	84 \pm 4.3
50	82 \pm 9.7	80 \pm 0.5	78 \pm 5.35	81 \pm 7.7	79 \pm 4.2	81 \pm 14	81 \pm 5.9
100	77 \pm 3.8	72 \pm 8.2	73 \pm 2.6	75 \pm 4.5	74 \pm 6.5	72 \pm 6.2	72 \pm 5.5
200	54 \pm 7.2	41 \pm 2.7	28 \pm 3.3	42 \pm 3.8	57 \pm 9.5	59 \pm 6.3	52 \pm 11
400	17 \pm 3.1	9 \pm 1.5	3 \pm 0.79	11 \pm 0.81	29 \pm 4.7	24 \pm 4.2	13 \pm 1.9
陽性対照 (chrysoliteA)	43 \pm 2.8						

* 細胞生存率は、陰性対照のコロニー数を100%として算出した。データは、4枚のシャーレの平均値を示した。

使用細胞:CHL/IU

表3 細胞種検討(細胞毒性試験結果:コロニー形成法)

用量 (μ g/ml)	細胞生存率(%)* \pm SD		
	CHL/IU	V79	BALB/c3T3
陰性対照	100		
3.13	89 \pm 14	88 \pm 7.5	82 \pm 2.7
6.25	70 \pm 9.2	76 \pm 3.3	64 \pm 6.9
12.5	44 \pm 5.6	36 \pm 8.7	33 \pm 2.7
25	35 \pm 3.0	21 \pm 5.5	25 \pm 3.6
50	24 \pm 3.3	11 \pm 4.6	21 \pm 5.3
100	20 \pm 2.5	8 \pm 5.5	12 \pm 4.4
200	11 \pm 2.7	0	10 \pm 1.9
400	5 \pm 2.3	0	6 \pm 1.9

* 細胞生存率は、陰性対照のコロニー数を100%として算出した。
データは、4枚のシャーレの平均値を示した。

表4 細胞毒性指標(細胞毒性試験結果:酵素放出法)

用量 (μ g/ml)	乳酸脱水素酵素(LDH)放出率(%)* \pm SD	
	CHL/IU	V79
陰性対照	3 \pm 0.38	1 \pm 0.51
1	3 \pm 0.28	1 \pm 0.61
3	3 \pm 0.71	2 \pm 0.20
10	9 \pm 0.53	5 \pm 0.26
30	21 \pm 0.26	10 \pm 0.48
100	24 \pm 0.29	12 \pm 0.34
300	27 \pm 0.91	15 \pm 0.86
1000	33 \pm 0.29	23 \pm 0.66
陽性対照 (chrysotileA)	18 \pm 0.56	15 \pm 0.77

* 酵素放出率は、培養液中の酵素量(LDH量)を細胞中の酵素量を含む全酵素量で割った値を百分率(%)で示した。データは、4枚のシャーレの平均値を示した。

ナノマテリアルの吸入による発がん性スクリーニングのための *in vivo* 系での
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

研究分担者 野口 忠 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
試験管理部動物管理室・病理検査部微生物試験室 室長

研究協力者 片桐 卓 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部
動物管理室 技術専門役

上垣外智之 日本バイオアッセイ研究センター試験管理部動物管理室・
病理検査部微生物試験室 室長補佐

研究要旨

ナノマテリアルの *in vivo* 突然変異原試験を開発する目的として、トランスジェニック動物である *gpt delta* ラットにマルチウォールカーボンナノチューブ（MWCNT）を気管内投与し肺での突然変異検出試験を実施した。試験はラット MWCNT を1匹あたり 40 及び 160 μg を気管内に単回投与し、投与後28日目及び90日目に臓器を摘出した。さらに28日目においては、気管支肺胞洗浄（BAL）を行い気管支及び肺胞内の細胞を取り出した。その結果、28日目の肺では、*gpt* 突然変異頻度の増加は認められなかった。現在、Spi-突然変異頻度分析、その他 BAL 及び精巢について突然変異の分析を実施中である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響として現在問題になっているのは、難溶解性の微細な粒子状物質であり、結晶性シリカ、酸化チタン、カーボンブラック、ディーゼル排出粒子等の発がん性が指摘されていることによる。さらに近年開発された工業性資材として有用性の高いカーボンナノチューブはその形状がアスベストと類似していることから安全性が危惧されている。アスベストはヒトに悪性中皮腫を発生させ、組織の74%にCDKN2A遺伝子部位でホモ接合性の欠失が認められる。¹⁾

化学物質の *in vivo* 変異原性試験は、げっ歯類動物の骨髄を用い、染色体の構造又は分離の異常により生成する小核を指標とした小核試験が主に行われている。この試験は、難溶解性の粒子状物質は血液中に取り込まれる可能性が低

く有効ではない。最近開発された大腸菌由来のレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニック動物が開発され、その有用性が示されてきた。導入されたレポーター遺伝子は、個体の全ての細胞に存在することから、あらゆる臓器において遺伝子突然変異を検出することが可能である。特に *gpt delta* ラットは、大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする6-TGセレクションを用いる点突然変異と、ラムダーファージ *red/gam* 遺伝子をレポーターとする欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物で、遺伝子に欠失を誘発するような化学物質の遺伝子変異を検出するのに有効な試験系である。^{2) 3)}

本年度はナノマテリアルとして、マルチウォールカーボンナノチューブ（MWCNT）及びQuartzを気管内に投与し、肺の突然変異誘発性を検索することにより、ナノマテリアルに対

する安全性評価における gpt delta ラットを用いる突然変異試験の有効性を検討した。

B. 研究方法

使用動物

日本エスエルシー株式会社から、5週齢の雄 F344 gpt delta ラットを導入し、13週齢（体重 287 ± 17 g）で投与した。飼育条件は、温湿度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 15\%$ で管理した飼育室で、飼料（30 k Gy γ 線照射滅菌 CRF1 固形飼料、オリエンタル酵母工業株式会社）及び飲水（秦野市水をフィルターろ過した後、紫外線照射滅菌）を自由摂取させた。

被験物質

被験物質は、Nano Caebon Technologies 社の MWCNT（MWNT-7）及び US Silica 社の Quartz（MIN-U-SIL5）を用いた。

MWCNT（MWNT-7）

Propaty	Specification Range
Diamerter	40~90nm
Aspect Ratio	>100
Bulk Density	0.005~0.01g/cm ³
Surface Area	25~30m ² /g
Defect/Graphite Ratio	0.06~0.15
purity	99.5%

Quartz（MIN-U-SIL5）

Propaty	Specification Range
AverageDiamerter	1.6 μm
pH	8.0
Chemical Composition	
SiO ₂	99.25%
Fe ₂ O ₃	0.064%
Al ₂ O ₃	0.143%

被験物質懸濁液の調製方法

Tween80 を 0.1% 添加した PBS（Phosphate buffered saline）に、各設定濃度となる様、被験物質を加え超音波ホモジナイザー（VP-30S 型 TAITEC）を用いて懸濁した。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散した。

被験物質の投与方法

イソフルランの吸入による麻酔下で被験物質懸濁液を液体気管内投与器具（ラット用（1A-1B）（株イナリサーチ））を使用して気管内に投与した。

投与用量

MWCNT の投与用量は 40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の 2 段階（公比 4）、また、Quartz の投与用量は 160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。1 匹当たりの投与容量は 0.3ml とした。なお、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 Tween80 を 0.1% 添加したものを投与（0.3ml/匹）した。

試料採取方法

被験物質を単回気管内投与 29 日及び 90 日に、ベントバルピタルナトリウム麻酔下で後大動脈より放血屠殺した。開胸後、左右の肺を肺門部で気管から別々に切り離して摘出した。摘出後、直ちに -80°C で凍結した。

突然変異分析方法

1) gpt 突然変異検出方法

各種臓器から、ゲノム DNA を抽出し（RecoverEase DNA Isolation Kit : Stradagene 社）、in vitro パッケージング（Transpack Packaging Extract : Stradagene 社）によりトランスジーンを入ファージとして回収した。

回収したファージを大腸菌 YG6020 に感染させ、gpt 領域に変異をもつ大腸菌を

6-Thioguanine ポジティブセレクションにより検出した。

2) Spi-突然変異検出方法

1)と同様に、回収したファージをP2溶原菌である大腸菌 XL1-Blue MRAP2 に感染させ、red/gum 領域に欠失のあるファージをポジティブセレクションにより検出した。

(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実験動物委員会の承認され、「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

現在までに投与29日後の解剖が終了し、この肺組織のgpt突然変異の検査が終了している。

投与後29日までの体重変化を図1に、解剖時の肺重量を図2に、また肺のgpt突然変異頻度の結果を表1に示した。

1) 体重変化

投与時の平均体重は287gで、投与後1日目に对照群を含む全ての群で体重が5から10g低下し、その後順調な体重の増加が認められ、29日では平均体重が312gで各群間に差は認められなかった。投与による影響は全群均等に認められ、投与技術的に安定していることを示していた。

2) 肺重量変化

投与29日目の肺の重量は、MWNCT の投与群で用量相関的な増加傾向が認められ、160 μg/匹投与群では、肺の重量及び体重比共に对照群と比べ有意な増加を示した。

Quartz 投与群では増加は認められなかった。

3) 肺 gpt 突然変異頻度

投与後29日の肺における gpt 突然変異頻度は、对照群に比べ増加は認められなかった。

D. 考察

難溶解性粒子状物質の被験物質 MWCNT と Quartz をラットに動物あたり 160 μg 気管内投与したところ、29日目の肺の重量は MWCNT で有意な増加を示したが、Quartz では増加は認められなかった。このときの肺の gpt 遺伝子上での突然変異頻度の増加は MWCNT、Quartz 共に認められなかった。管の直径がナノサイズの繊維状 MWCNT と粒径サイズがミクロンサイズの粒子状 Quartz を肺に気管内投与したとき、その肺に対する影響はナノサイズの繊維状物質の方が強く現れることが示唆されたが、投与後29日ではゲノム遺伝子に対しては影響が認められず、さらに長期間の影響を評価する必要が示された。

今後、肺胞洗浄液中の細胞（主にリンパ球及びマクロファージ）及び投与90日について評価し、ナノマテリアルに対する安全性評価における gpt delta ラットを用いる突然変異試験の有効性を検証する。

E. 結論

ナノマテリアルの in vivo 突然変異原試験を開発する目的として、トランスジェニック動物である gpt delta ラットに難溶解性粒子状物質の MWCNT を気管内投与し肺での突然変異検出試験を実施した。その結果、投与後29日ではゲノム遺伝子に対しては影響が認められなかった。投与後90日については、現在検討中である。

参考文献

- 1) Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine

phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. Clin Cancer Res, 9:2108-2113.2003.

- 2) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, Matsui M, Yamada M, Watanabe M, Suzuki M, Horiya N, Ueda O, Shibuya H, Ikeda H, Sofuni T. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. Environ Mol Mutagenesis, 28: 465-470.1993.
- 3) Hayashi H, Kondo H, Masumura K, Shindo Y, Nohmi T. Novel transgenic rat for in vivo genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi- selections. Environ Mol Mutagenesis, 28:465-470.1993.

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

図1 試験結果 体重変化 (投与29日)

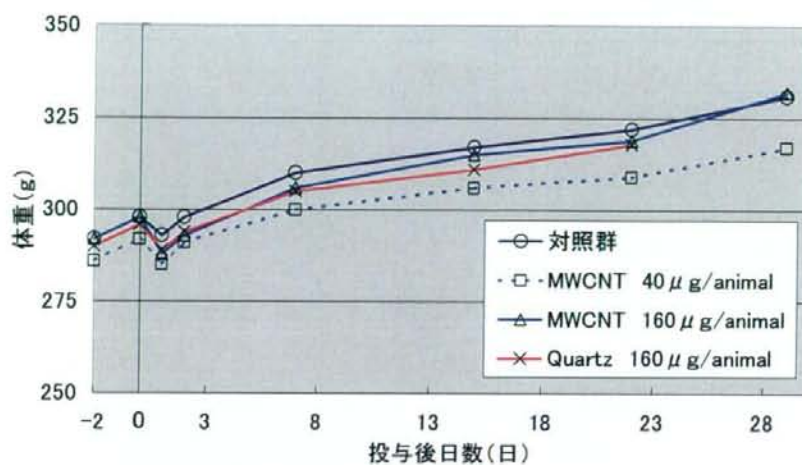


図2 試験結果 肺重量 (投与29日)

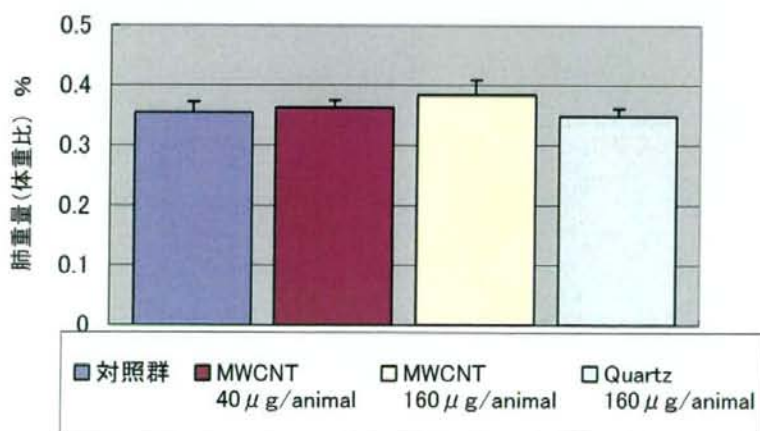
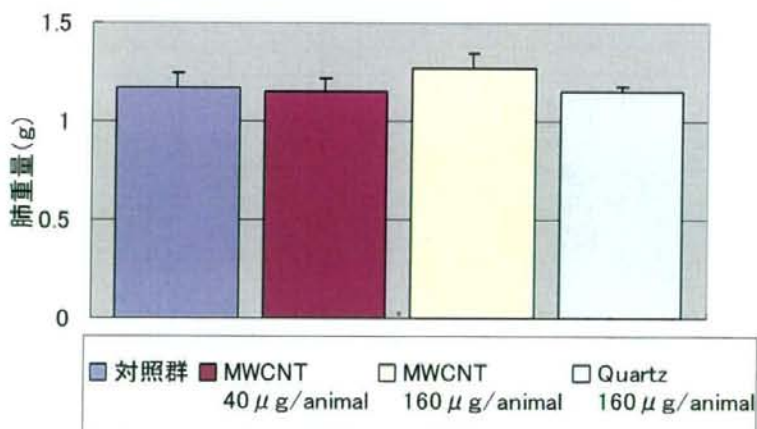


表 1 試験結果 肺の gpt 突然変異頻度 (投与 29 日)

Dose (μ g/head) Animal No.	No. of resued colony	No. of mutant	Mutat frequency ($\times 10^{-6}$)	Average \pm SD
MWCNT 0 μ g/animal				
1001	1047000	15	14.33	
1003	726000	4	5.51	
1005	966000	12	12.42	
1007	618000	3	4.85	
1009	567000	2	3.53	8.13 \pm 4.89
MWCNT 40 μ g/animal				
1101	732000	3	4.10	
1103	477000	4	8.39	
1105	657000	3	4.57	
1107	1353000	2	1.48	
1109	933000	3	3.22	4.35 \pm 2.55
MWCNT 160 μ g/animal				
1201	1122000	3	2.67	
1203	486000	1	2.06	
1205	1413000	1	0.71	
1207	1590000	8	5.03	
1209	714000	1	1.40	2.37 \pm 1.66
Quartz 160 μ g/animal				
1301	1440000	12	8.33	
1303	1998000	3	1.50	
1305	1743000	10	5.74	
1307	1092000	1	0.92	
1309	807000	1	1.24	3.55 \pm 3.32

ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

研究分担者 平田睦子 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
総合評価研究室 主任研究官
研究協力者 広瀬明彦 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
総合評価研究室長

研究要旨

フラーレン及びカーボンナノチューブの職業暴露及び吸入毒性に関する公開情報を収集し、整理した。職業暴露に関する情報は非常に限られていたが、毒性影響に関しては、近年、気管内投与、咽頭吸引、エアロゾルへの鼻部/全身暴露による *in vivo* 試験の結果が蓄積されつつある。しかし、これらの多くは比較的高用量を投与/暴露させた際の短期的な影響を調べたものであるから、職業暴露に関する更なる調査を実施し、その暴露状況を反映した慢性試験の実施が望まれる。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは、その物理化学的性状が同一化学組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、未知な生体影響が懸念される。特に、産業現場では、空气中に拡散しやすいため、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高い。産業用ナノマテリアルのヒトの健康への影響を評価するためには、実験動物にナノマテリアルを吸入暴露させ、その毒性影響を適切に評価する手法を確立することが必要である。そこで、本研究では、産業用ナノマテリアルの吸入暴露システムにおける適切な吸入暴露条件や毒性評価法等を開発するための論点を明らかにするために、産業用ナノマテリアルの職業暴露情報や吸入暴露を介した毒性影響に関する情報を収集し、整理した。本年度は、炭素系ナノマテリアル（フラーレン及びカーボンナノチューブ）に焦点を当て、文献情報等の公開情報の収集・整理を行った。

B. 研究方法

フラーレン及びナノチューブの職業暴露情報、気管内投与、咽頭吸引及び吸入暴露による体内動態及び毒性発現に関する情報を収集し、整理した。文献検

索には Medline を用い、特に 2004 年以降の最新情報に焦点をあてて検索を行った。

（倫理面への配慮）

本研究は、公表情報を収集し、整理したものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 職業暴露情報

単層カーボンナノチューブ (Single-walled Carbon Nanotube: SWCNT) を遠心管に入れ、Vortex shaker で攪拌し、空気中のエアロゾルの粒径別個数濃度を、走査型移動度粒径測定器 (Scanning Mobility Particle Sizer: SMPS) 及び空力学的粒径測定器 (Aerodynamic Particle Sizer: APS) により測定したところ、ナノメーターサイズのエアロゾルの発生が認められた (Baron *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2004)。しかし、実際に SWCNT を取り扱う 4 施設で、凝縮式粒子計数器及び光散乱式粒子計数器 (Optical Particle Counter: OPC) を用いてエアロゾルの計測を行った結果、SWCNT の回収、充填や移し変えの際に、粒子の個数/重量濃度の明確な増加は見られなかった。補修粒子中の鉄もしくはニッケル含量を基に SWCNT

濃度を算出したところ、空气中濃度は最大で 52.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ となり、作業時のグローブへの付着量は片手につき 0.22~6.0 mg となった。走査型電子顕微鏡による捕集粒子の観察を行ったところ、HiPCO (High-Pressure Carbon Monoxide Process)法により生成された SWCNT を取扱う施設では、100 μm ~1mm の粒子は少なく、比較的オープンなナノローブ構造を示していた。しかし、マイクロメートルサイズの粒子の多くはコンパクトな構造を示し、ナノチューブ構造はほとんど観察されなかった。一方、レーザー蒸発法で生成された SWCNT を取扱う施設で捕集されたマイクロメートルサイズの粒子中には、ナノローブ構造が明確に観察された。

多層カーボンナノチューブ (Multi-walled Carbon Nanotube: MWCNT) 研究所の MWCNT 合成施設、計量/噴霧 (spraying)施設及び混合施設において放出される粒子濃度を SMPS 及び APS を用いて調査した結果、MWCNT 混合作業を行う施設の総粒子濃度が、0.21~0.43 mg/m^3 と、最も高かった (Han *et al.*, 2008)。エネルギー分散型 X 線分析装置を装着した走査透過型電子顕微鏡で観察した結果、個々のチューブ構造から凝集塊まで様々な形状の MWCNT が観察された。MWCNT を混和する施設では 172.9~193.6 個/ cm^3 の MWCNT が検出された。この施設で、エアロゾル粒子のリアルタイムモニタリングを行った結果、混合装置からの MWCNT の放出を示唆する結果が得られた。

日本では、炭化水素-酸素混合物の燃焼により生成した煤から、混合フラーレン (C_{60} : 約 60%、 C_{70} 等: 約 25%) を抽出する工場で調査が行われている (Fujitani *et al.*, 2008)。SMPS 及び OPC を用いて、粒子の個数/容積濃度を測定した結果、フラーレンの攪拌過程や貯蔵タンクからフラーレンを回収する作業の際に、1000 nm を超える粒子の容積濃度の増加が見られた。走査型電子顕微鏡による観察を行ったところ、両過程で得られた粒子の形態は類似していたことから、これらの粒子はフラーレンの凝集体/塊であると考えられた。

2. 吸入暴露による毒性影響に関する情報

2.1 フラーレン (Fullerene: C_{60})

C_{60} を超純水に懸濁し、0.2~3.0 mg/kg の用量で、Crl:CD(SD) IGS BR ラットに気管内投与した結果、投与 1 日後に、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の好中球数/率の一過性の増加がみられたものの、肺の病理組織学所見に変化は見られなかった (Sayes *et al.*, 2007)。

最近、加圧型ネブライザー及びミストドライヤーを暴露チャンバーにつなげた全身暴露システムを使用した吸入暴露試験の結果が報告されている (Fujita *et al.*, in press)。この試験では、 C_{60} を 0.1 mg/mL Tween 80 に分散させ、粉碎後、ジルコニウム粒子と共に懸濁させ、遠心分離し、試験に供した。Wistar ラットを 0.12 mg/m^3 の C_{60} (平均粒径: 96 nm) に 4 週間 (6 時間/日、5 日/週) 暴露させた結果、暴露の 3 日後に肺胞上皮細胞に C_{60} 粒子が認められ、さらに、肺胞マクロファージによる飲食作用が 3 日及び 1 ヶ月後に観察された。肺の遺伝子発現解析を行ったところ、炎症反応、酸化ストレスやアポトーシスに関連する遺伝子の変化はほとんど見られず、主要組織適合複合体を介した免疫反応を含む免疫系プロセスに関連した遺伝子のみが upregulate された。

一方、Baker ら (2008) は、乾式法により生成させたエアロゾル (2.22~2.35 $\text{mg } \text{C}_{60}/\text{m}^3$) に F344 ラットを 10 日間 (3 時間/日) 鼻部暴露させ、その影響を調べている。この研究では、粉碎した C_{60} を室素ガス流に分散させて粒子磨耗チャンバーに導入し、その後、550°C に熱した炉の中の石英チューブに導入することにより、中央粒径 55 nm (粒子数ベース) のナノ粒子からなるエアロゾルを生成した。一方、チューブ炉の代わりにステンレススチールチューブを用い、加熱を行わないことによって、中央粒径 0.93 μm (重量ベース) の微小粒子からなるエアロゾルを生成し、ナノ粒子及び微小粒子暴露による影響を比較した。その結果、両暴露群共に、暴露期間中に観察された明確な変化は鼻汁及び眼漏のみであり、肺の病理組織学所見にも変化は見られなかった。暴露期間終了後の肺の C_{60} 含量を HPLC で分析した結果、ナノ粒子暴露群では 78.89 $\mu\text{g}/\text{lung}$ 、微小粒子暴露群では 55.86 $\mu\text{g}/\text{lung}$ であり、ナノ粒子の方が肺に沈着しやすいことが明らかになった。それぞれの半減期は 26

日及び29日と算出された。

その他に、水溶性のC₆₀誘導体についての研究結果が報告されている。上述のSayesら(2007)の研究では、C₆₀と同様の方法で水酸化フラーレン(C₆₀(OH)₂₄:C₆₀骨格の表面に24個のOH基)をラットに気管内投与した結果、C₆₀投与群と同様にBAL中の好中球数/率の一過的な増加が引き起こされた。さらに、水酸化C₆₀(C₆₀(OH)_{20±2})を生理食塩水に溶解させ、0.02~200 µg/animalの用量でBALB/cJマウスに気管内投与した試験では、24時間後に、BAL中の好中球数及びマクロファージ炎症性タンパク(Macrophage Inflammatory Protein; MIP)-2が増加したことが報告されている(Roursgaard *et al.*, 2008)。

2.2 カーボンナノチューブ

カーボンナノチューブの吸入暴露による毒性影響に関する最初の*in vivo*研究は、Huczkoら(2001)によって報告されている。カーボンナノチューブを含有する煤(25 mg/animal)をTween添加生理食塩水に分散させ、モルモットに単回気管内投与し、カーボンナノチューブを含まない煤を投与した群と比較した結果、肺機能及びBAL検査結果に変化は見られなかった。この試験では、対象としたカーボンナノチューブ含有煤の詳細が報告されておらず、最も重要な毒性エンドポイントである肺の病理組織学検査が実施されていない。

単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

Crl:CD(SD)IGS BR ラットに1もしくは5 mg/kgのSWCNT [1.0% Tween 80含有リン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)に懸濁後、ポリトロン分散]を気管内投与した結果、24時間以内に高用量群のおよそ15%が死亡した(Warheit *et al.*, 2004)。その後の検査で、この死亡は投与物質による上気道部の機械的な閉塞により引き起こされたことが明らかになった。高用量群では、投与24時間後にBAL中の好中球率、LDH及びタンパク含量の増加が認められたが、1週間後以降の検査ではこれらの変化は見られなかった。肺の病理組織学検査では、投与の1週間後から、SWCNTの周囲に多発性肉芽腫が観察され、この病変は、びまん性で、不均一な分布パターンを示した。しかし、この変化に用量依存性は認

められず、さらに、3ヵ月後の検査では進行性の変化は見られなかった。

Warheitら(2004)の試験で使用されたSWCNTはレーザー蒸発法で生成されたものであり、30~40%の無定形炭素を含んでいた。一方、Lamら(2004)は、HiPCO法で生成したSWCNT(RCNT、鉄含量:26.9%)、RCNTに酸処理を施し金属性不純物を除去したもの(PCNT、鉄含量:2.14%)、さらには、アーク放電法で生成したSWCNT(CNT、ニッケル含量:25.99%、鉄含量:0.53%)を用いて、マウスの肺への影響を比較している。上記3種のSWCNTをマウスの加熱不活化血清に分散させ、0.1及び0.5 mg/animalの用量で、B6C3F1マウスに気管内投与した結果、いずれのSWCNT製品によっても用量依存的な類上皮性肉芽腫が引き起こされた。さらに、一部の動物には間質性炎症も観察され、これらの病変は時間依存的に増強した。これらの結果は、SWCNT投与による肺への影響が、不純物である金属ではなく、SWCNTそのものによって引き起こされたことを示している。一方、CNT投与群のみで死亡が認められたが、この影響について著者らはCNTの不純物であるニッケルやイットリウムによる影響の可能性があると考察している。

上記の2試験では、比較的多量の粒子を急速に気管内に投与する方法で実施された。これらの試験では、気道閉塞やSWCNTの不均一な肺内分布が認められており、吸入暴露によるヒト健康への影響を評価する上で、不適切である可能性が考えられる。そこで、咽頭吸引(pharyngeal aspiration)という方法で試験が行われている(Shvedova *et al.*, 2005)。咽頭吸引では、立ち向きに近い姿勢で固定した動物の舌を広げ、喉の奥に粒子の懸濁液を滴下し、肺の中に吸引させる。この技術による投与では、粒子が肺泡領域の細気管支周囲にまで広く分布することが報告されている。

Shvedovaら(2005)は、SWCNT(10~40 µg/animal)をPBSに懸濁させ、C57BL/6マウスに咽頭吸引させた。BAL検査を行ったところ、投与1日後にはTNF-α及びIL-1βの顕著な増加を伴う好中球の蓄積が観察され、その後、TGF-β1やリンパ球及びマクロファ-

ジの増加が認められた。さらに、タンパク含量、LDH 及び GGT の用量依存的な増加がみられ、4-hydroxy-2-nonenal の蓄積や GSH の枯渇も認められた。肺の病理組織学検査では、投与7日後より、2種の異なる反応が観察された。つまり、SWCNT 凝集体の周囲には肉芽腫性炎症病巣が観察され、SWCNT の凝集体から離れた部位では、主に肺胞壁の肥厚を伴うびまん性間質性線維症が認められた。SWCNT 投与による肺機能への影響を調べたところ、持続的な呼吸時間の増加や肺からの細菌排除能の低下が認められた。

CDF(F344)/CrIBR ラットに 2 mg/kg の SWCNT (粉碎後、0.1%Pluronic F-68 含有 PBS に懸濁)を咽頭吸引させ、投与1及び21日後に BAL 検査及び病理組織学検査を行った結果、明確な炎症反応は認められなかった (Mangum *et al.*, 2006)。しかし、投与21日後には、肺に炭素様物質を含むマクロファージの塊が観察され、肺胞領域ではその周囲に小さな間質性線維性病巣が散在していた。線維性病変形成部位には、細胞増殖活性の増加が認められた。肺の様々な前線維化成長因子及びプロコラーゲンの遺伝子発現を調べた結果、投与1日後に血小板由来成長因子の増加が見られたが、この変化は投与21日後には認められなかった。

上述の Shvedova ら (2005)の研究では、SWCNT の凝集体から離れた部位で間質性線維症が認められた。粉碎した SWCNT を用いた Mangum ら (2006) による研究においても同様の変化が認められたことから、肺の線維性病変の発現には分散したサブミクロンサイズの SWCNT が関与している可能性が考えられる。そこで、Mercer ら (2008)は、SWCNT を蒸留水に懸濁させ、10分間超音波処理を行った後、アセトンで希釈し、さらに、24時間超音波浴にかけることにより分散させた SWCNT (dispersed SWCNT: DSWCNT)と、分散させていない SWCNT を用いて、肺組織への影響を比較している。DSWCNT 及び SWCNT を PBS に懸濁させ、10 µg/animal の用量で C57BL/6 マウスに咽頭吸引させた結果、SWCNT 投与群の肺組織片には直径 2~20 µm の大きな凝集体が観察され、これらの大きな凝集体への肺の反応とし

て、類上皮マクロファージによる浸潤、取り込みや結合組織を豊富に含む肉芽腫性炎症が観察された。一方、DSWCNT 投与群では、凝集体の沈着はほとんどみられず、肉芽腫様変化も見られなかった。SWCNT 及び DSWCNT 共に肺胞壁にコラーゲンの蓄積を引き起こしたが、この変化は DSWCNT 投与群でより顕著であった。また、SWCNT 投与群では SWCNT 凝集体の周辺にコラーゲンの蓄積が見られたのに対し、DSWCNT 投与群ではこの変化は肺全体の肺胞壁内に広範に観察された。

金コロイドもしくは蛍光性量子ドットで標識した SWCNT 及び DSWCNT を同様の方法で C57BL/6 マウスに咽頭吸引させ、肺内分布を調べた結果、SWCNT 投与群では、特に近位肺胞領域に大きな凝集体が見られ、さらに、より小さなナノチューブ構造が間質内に観察された (Mercer *et al.*, 2008)。DSWCNT 投与群ではより微細な、そしてびまん性の分布パターンが観察され、多くが肺胞間質スペースに取りこまれていることが明かになった。

最近、Shvedova ら (2008)は、SWCNT の吸入暴露試験を実施し、咽頭吸引による影響との比較を行っている。吸入暴露試験では、パウダーフィーダーとナイフミルを含むエアロゾル分散システムを用いて発生させたエアロゾル [5.52 mg SWCNT/m³; 粒径: 約 4.2 µm (重量ベース), 約 240 nm (粒子数ベース)]に C57BL/6 マウスを4日間 (5時間/日)全身暴露させた。一方で、咽頭吸引試験では、0.7%PBS に懸濁させた SWCNT (5~20 µg/animal)を C57BL/6 マウスに与えたところ、吸入暴露群でより顕著な影響 [炎症反応、細気管支上皮細胞肥大、肉芽腫性炎症病巣、線維症など]が認められた。なお、肺の K-Ras 遺伝子への影響を調べたところ、特に吸入暴露群において変異の増加が認められた。

上述の試験は、いずれも肺への影響に焦点が当てられた。一方で、疫学調査により、大気中の粒子状汚染物質への暴露と心筋梗塞との間には強い相関関係があることが知られている。そこで、Li ら (2007b)は、最近、SWCNT 暴露による心血管系への影響についての研究結果を報告している。Hol-luc レポータートランスジェニックマウス (FVB/N-TgN

(*Ho1-luc*) Xen マウス)に SWCNT (10–40 $\mu\text{g}/\text{mouse}$)を単回咽頭吸引させたところ、7日後に、大動脈、心臓及び肺のヘムオキシゲナーゼ-1 活性の一過的な増加が見られた。さらに、ApoE⁺トランスジェニックマウス (B6.129P2-ApoE^{tm1Unc} マウス)を用いた研究では、SWCNT (20 $\mu\text{g}/\text{mouse}$ を1週間おきに4回咽頭吸引)が高脂肪食誘発性のアテローム斑の形成を促進させることが明らかとなった。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

Sprague Dawley ラットに MWCNT 及びボールミルで粉碎した MWCNT (ground MWCNT)を、1%の Tween80 を含む生理食塩水に懸濁させ、0.5–50 mg/animal の用量で気管内投与した結果、MWCNT 投与群では気管内に凝集体が引っかかっていたのに対し、ground CNT は肺組織に広く分布しているのが確認された (Muller *et al.*, 2005)。MWCNT 中に含まれるコバルトを指標に、肺内残留量を調べたところ、ground MWCNT と比較して MWCNT の排出速度が著しく遅いことが明らかとなった。MWCNT 及び ground MWCNT 共に肺の炎症性及び線維性反応を引き起こしたが、MWCNT 投与群ではコラーゲン豊富な肉芽腫が部分的もしくは完全に気管支を塞いだのに対し、ground MWCNT は肺実質組織に良く分散しており、間質組織に肉芽腫を引き起こした。

Mitchell ら (2007)は、dry chemical screw feeder に結合させた jet mill で MWCNT を機械的に攪拌/再懸濁して発生させたエアロゾルを、2 μm cut point cyclone に通すことで、げっ歯類の呼吸域サイズの粒子を生成し、吸入暴露試験を実施している。C57BL/6 マウスを 0.3–5 mg/m^3 の濃度の MWCNT [中央粒径: 0.7–1.8 μm (重量ベース), 平均粒径: 350–400 nm (粒子数ベース)]に7もしくは14日間 (6時間/日)全身暴露させた結果、肺の炎症や組織損傷は認められなかった。脾臓から調整した細胞を用いて、全身性免疫機能への影響を調べた結果、T細胞依存性抗原反応の抑制、分裂促進剤存在下でのT細胞増殖能の低下及びNK細胞によるYac-1標的細胞溶解の抑制が認められた。

Li ら (2007a)は、MWCNT の吸入暴露試験及び気管内投与試験を行い、その結果を比較している。

吸入暴露試験では、powder generator で発生させた MWCNT のドライダストを2種の depositor に通すことで、呼吸域粉塵を生成し、吸入チャンバーに導入した。チャンバー内の平均 MWCNT 濃度は 32.61 mg/m^3 であり、8、16 及び 24 日目の肺内沈着量はそれぞれ 0.07、0.14 及び 0.21 mg/animal と算出された。Kunming マウスを 24 日間 (90 分暴露を4回/日、4–5 日/週、計 15 日間暴露) 全身暴露させた結果、気管支内壁には MWCNT 凝集体の付着が認められたが、その周囲に炎症性細胞は観察されなかった。肺胞内ではより小さな凝集体がみられ、その周囲では肺胞壁の増殖や肥厚化などが認められたが、これらの病変は軽度であり、一般的な肺胞の網状構造は保たれていた。一方、0.05 mg/animal の MWCNT (1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁)を気管内投与した Kunming マウスでは、24 日後には、気管支内壁の炎症が観察され、肺胞では網状構造の顕著な崩壊がみられた。

Mitchell ら (2007)や Li ら (2007a)の結果は、気管内投与によって引き起こされた肺の病理組織学的変化が、吸入できない、比較的大きな MWCNT の凝集体によって引き起こされた可能性を示唆している。そこで、Elgrabli ら (2008)は、ウシ血清アルブミンを用いて分散させた MWCNT (1, 10, 100 $\mu\text{g}/\text{animal}$, 凝集体の 80%が 10 μm 未満)を Sprague Dawley ラットに気管内投与し、肺にどのような影響があるのか調べた。その結果、肺胞マクロファージのアポトーシスが観察されたものの、肺の機能や病理組織学所見に変化は見られなかった。

Nemmar ら (2007)は、Swiss マウスに 200 もしくは 400 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の MWCNT (粉碎したものを) 0.1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁し、気管内投与したところ、抹消の血栓形成性が用量依存的に高まったことを報告した。その後の研究から、MWCNT の作用には血小板と組織因子を含むマイクロパーティクルからなる P-セレクチン依存性のメカニズムが関与していると考えられた。

Carrero Sanchez ら (2006)は、竹状構造を示すことが知られている nitrogen doped MWCNT (CNx MWCNT: 一部の炭素原子を窒素に置き換えた

MWCNT)を対象とした試験を実施し、炭素原子のみからなるMWCNTとの比較を行っている。CNx MWCNT及びMWCNT (1~5 mg/kg)をPBSに懸濁させ、近交系CD-1マウスに気管内投与した結果、MWCNT投与群では呼吸困難を伴う用量依存的な死亡が認められたが、CNx MWCNT投与群ではこのような変化は観察されなかった。両投与群共に、肺に肉芽腫性炎症反応が認められたものの、その変化はMWCNT投与群でより顕著であった。

D. 考察

フラーレン及びカーボンナノチューブの職業暴露に関する報告は3報のみであった。いずれも、労働環境気中へのフラーレンもしくはカーボンナノチューブ粒子の放出を示すものであったが、その濃度に関しては、SWCNTを取り扱う施設において、捕集された粒子中の金属含量を基に算出した値が報告されているのみであった (Baron *et al.*, 2003; Maynard *et al.*, 2004)。この調査研究では、サンプル数が少なく、また、測定された金属含量がフィールドブランク値に近似していたことから、その信頼性には疑問が残るものの、算出された値 (最高濃度: 52.7 µg SWCNT/m³)は、労働環境大気中のSWCNT濃度が低いことを明確に示している。

吸入暴露を介した毒性影響に関しては、近年、*in vivo*試験の結果が蓄積されつつある。これらの研究の多くは、ラットもしくはマウスにC₆₀やカーボンナノチューブを単回気管内投与もしくは咽頭吸引させたものであるが、最近、エアロゾルへの鼻部/全身暴露試験の結果も公表されてきている。C₆₀に関しては、投与/暴露後、一過性の炎症反応が見られたものの、肺の病理組織への影響は認められていない。一方、カーボンナノチューブに関する試験では、投与/暴露後、比較的初期から、肺に肉芽腫性変化や線維性変化がみられており、これらの肺組織への影響は10 µg SWCNT/animalという低用量の投与によっても認められた。Mercerら (2008)は、この用量で投与した際の肺負荷量 (肺胞面積辺り)は、上述の暴露調査の研究で得られた52.7 µg/m³という濃度で職業的に暴露された場合、およそ200日間で達成されう

ると考察している。一方、最近の研究結果は、カーボンナノチューブの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしていることを示しており、労働環境気中の粒子の形状やその存在比率などについてより詳細な調査が必要である。

最近、Takagiら (2008)は、p53ヘテロ欠損 (p-53(+/-))マウスにMWCNTを単回腹腔内投与した結果、中皮腫が引き起こされ、その発症頻度はアスベスト (クロシドライト)と同程度であったことを報告している。このような変化はC₆₀投与群では観察されなかった。さらに、遺伝子組み換えを行っていない野生型F344ラットにMWCNTを単回陰嚢腔内投与した試験においても、腹腔内に中皮腫が観察されたことが報告されている (Sakamoto *et al.*, 2009)。興味深いことに、投与後52週の時点では、同時に投与したクロシドライト群では中皮腫の発生は認められていない。これらの結果は、MWCNTの吸入暴露後に、MWCNTが長期間に渡って体内に残存した場合、中皮腫が引き起こされる可能性を示唆している。現時点では、カーボンナノチューブの吸入暴露による、中皮腫誘発作用を含めた、慢性的な影響を評価した試験の報告はなく、早期の実施が望まれる。

E. 結論

フラーレン及びナノチューブの職業暴露及び吸入暴露を介した毒性影響に関する公開情報を収集し、整理した。その結果、職業暴露に関する報告は非常に少なく、十分な情報は得られなかった。一方、毒性影響に関しては、気管内投与や咽頭吸引試験に加え、最近、エアロゾルへの鼻部/全身暴露試験の結果が公表されてきている。しかし、これらの多くは、比較的高用量を投与/暴露させた際の短期的な影響を調べたものであることから、職業暴露について更なる調査を実施し、その暴露状況を反映した慢性試験の実施が望まれる。

参考文献

- Baker, G. L., Gupta, A., Clark, M. L., *et al.* (2008). *Toxicol. Sci.* **101**, 122-131.
- Baron, A. P., Maynard, A. D. and Foley, M. (2003).

NIOSH. Report. NIOSH. DART-02-191., April. 2003.

Carrero Sanchez, J. C., Elias, A. L., Mancilla, R., et al. (2006). *Nano. Lett.* **6**, 1609-1616.

Elgrabli, D., Abella-Gallart, S., Robidel, F., et al. (2008). *Toxicology* **253**, 131-136.

Fujita, K., Morimoto, Y., Ogami, A., et al. *Toxicology* in press (Epub ahead of print: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167457?dopt=Citation>).

Fujitani, Y., Kobayashi, T., Arashidani, K., et al. (2008). *J. Occup. Environ. Hyg.* **5**, 380-389.

Han, J. H., Lee, E. J., Lee, J. H., et al. (2008). *Inhal. Toxicol.* **20**, 741-749.

Huczko, A., Lange, H., Clko, E., et al. (2001). *Fuller. Sci. Technol.* **9**, 251-254.

Lam, C. W., James, J. T., McCluskey, R., et al. (2004). *Toxicol. Sci.* **77**, 126-134.

Li, J. G., Li, W. X., Xu, J. Y., et al. (2007a). *Environ. Toxicol.* **22**, 415-421.

Li, Z., Hulderman, T., Salmen, R., et al. (2007b). *Environ. Health. Perspect.* **115**, 377-382.

Mangum, J. B., Turpin, E. A., Antao Menezes, A., et al. (2006). *Part. Fibre. Toxicol.* **3**, 15.

Maynard, A. D., Baron, P. A., Foley, M., et al. (2004). *J. Toxicol. Environ. Health. A.* **67**, 87-107.

Mercer, R. R., Scabilloni, J., Wang, L., et al. (2008). *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **294**, L87-97.

Mitchell, L. A., Gao, J., Wal, R. V., et al. (2007). *Toxicol. Sci.* **100**, 203-214.

Muller, J., Huaux, F., Moreau, N., et al. (2005). *Toxicol. Appl. Pharmacol.* **207**, 221-231.

Nemmar, A., Hoet, P. H., Vandervoort, P., et al. (2007). *J. Thromb. Haemost.* **5**, 1217-1226.

Roursgaard, M., Poulsen, S. S., Kepley, C. L., et al. (2008). *Basic Clin Pharmacol Toxicol* **103**, 386-388.

Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., et al. (2009). *J. Toxicol. Sci.* **34**, 65-76.

Sayes, C. M., Marchione, A. A., Reed, K. L., et al. (2007). *Nano. Lett.* **7**, 2399-2406.

Shvedova, A. A., Kisin, E., Murray, A. R., et al. (2008).

Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol **295**, L552-565.

Shvedova, A. A., Kisin, E. R., Mercer, R., et al. (2005). *Am. J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* **289**, L698-708.

Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., et al. (2008). *J. Toxicol. Sci.* **33**, 105-116.

Warheit, D. B., Laurence, B. R., Reed, K. L., et al. (2004). *Toxicol. Sci.* **77**, 117-125.

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍 なし

2) 雑誌

Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M. Gender-related difference in the toxicity of ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.* **31**, 383-398 (2008).

Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M. Lack of gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem. Toxicol.* **31**, 275-287 (2008).

Ema, M., Fujii, S., Hirata-Koizumi, M., Matsumoto, M. Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod. Toxicol.* **25**, 335-351 (2008).

Ema, M., Fukunishi, K., Hirose, A., Hirata-Koizumi, M., Matsumoto, M., Kamata, E. Repeated-dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.* **31**, 399-412 (2008).

Harada, T., Kimura, E., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M. Reproductive and developmental toxicity screening study of 4-aminophenol in rats. *Drug. Chem. Toxicol.* **31**, 473-486 (2008).

2. 学会発表

Hirata-Koizumi, M., Noda, A., Hirose, A., Kamata, E., Ema, M. Screening study for reproductive and