

察することにより、生体内寿命・寿命を評価することとした。

走査電子顕微鏡による形態変化の観察に加え、より精密な評価を行うために、粒子の表面状態の変化等の測定を行えないか、予備的に検討をおこなった。評価項目として検討したのは、①触媒金属粒子の溶出の測定、②電気化学的手法による試験粒子の表面積変化の測定、の2項目である。

① 触媒金属粒子の溶出の測定

MWCNTのチューブ内にはしばしば合成の際に触媒として用いられた金属粒子(多くの場合は鉄ないしコバルト)を持っている。これらの粒子の溶出を測定することにより、MWCNTのチューブ構造の劣化を推定できるのではないかと考えた。

溶出濃度を正しく把握するためには、(a)粒子維混在状態での金属濃度測定方法、(b)溶出した金属の存在状態、(c)溶解試験溶液中での金属濃度の安定性の把握が必要である。(a)と(b)は、密接に関連する問題である。金属の存在状態まで知るためには、イオンのみ検出するイオン選択性電極や、電気化学的手法と全部の金属元素濃度を測定するICP-AES/MSを組み合わせる必要があると考えられる。イオン選択性電極は、現在入手可能な電極の性能情報より検討した結果、本研究に必要な感度を確保するのが難しいと考えた、将来的な課題としては、電気化学検出の条件を確立することも必要であるが、本年度はICP-AES/MSによる金属元素濃度測定に絞って検討した。

本来ICP-AES/MSは不溶物質が混在している試料の分析は不得手であるが、今回のMWCNTに関しては、比較的容易に凝集沈殿するため、溶液部分のみを取り出すのは容易である。もう一つの問題として、疑似生体液は、概ね生理食塩水に近い濃度のNaClを含むため、塩濃度が高すぎる事による問題を生じるという問題がある。分担研究者自身の経験²⁾から、感度は劣るが、測定装置のロバストネス(強靱性)にまさるICP-AESによる測定を試みることにした。実験には、Perkin-Elmer製Optima 7300DV型ICP-AESを用い、生理食塩水およびリン酸緩衝生理食塩水(PBS)に1ppmと0.1ppmの2種類の濃度で各種金属元素を含んだ試験溶液を調製し、調製直後、2日後、8日後、26日後の金属の濃度変化を測定することにより、疑似生体液内で金属濃度が測定できるかどうかと、疑似生体液内の金属濃度の安定性の評価をおこなった。

② 電気化学的手法による表面積測定

走査電子顕微鏡観察レベルでは、形態変化が認められなくても、粒子表面の結晶構造に乱れが起きる可能性がある、透過電子顕微鏡を用いれば観測は可能であるが、十分な量の試料を観察するのは困難で

ある。そこで、一定質量の試料粒子の表面積を測定することにより、形態変化量の試料とする方法を考えた。このような粉体試料の総表面積を測定するには、通常、ガスの吸着量を測定するBET法が用いられる。本研究においてBET法を用いるためには、疑似生体液に浸漬したあとの粒子から、疑似生体液に含まれる成分を完全に除去する必要があるが、溶媒を何度も交換して超音波処理等を行った場合、その過程で、粒子の微細構造が破壊される可能性も高く、BET法により評価するのは困難であると考えられる。

本研究では、MWCNTが導電性であることに着目し、MWCNTを電極に付着させ、電極反応をさせ、その電流量から電極面積を求める方法で、MWCNTの表面積を測定する試みを行った。実験方法としては、MWCNT11mgをイソプロパノール30mLに懸濁させた懸濁液を1 μ Lあるいは、3 μ L(=1 μ Lを3回)、金ディスク状電極に滴下し、2日間風乾させてMWCNT付着電極をさくせいした。この電極をマーカーとして5mMのヘキサシアノ鉄(II)酸カリウム溶液を含む0.5M硫酸ナトリウム水溶液中で、参照電極にAg/AgCl電極、対極に白金線を用いた3電極電解セルを構成し、0V vs Ag/AgClから0.5V vs Ag/AgClの電位で、電位変化速度20-200mV/sの条件でサイクリックボルタンメトリーによる評価を行った。

(3) MWCNTの毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索

MWCNTが生体に及ぼす影響が懸念され、マウスで中皮腫を引き起こすとの報告⁹⁾をはじめ、酸化ストレス惹起や免疫系への影響など徐々に情報が蓄積しつつある。本検討ではMWCNTの培養細胞系での毒性評価法を確立するとともに、MWCNTが生体に与える影響を解析する。

① 培養細胞を用いたMWCNTの毒性評価

培養細胞:MWCNTの毒性評価にはA549細胞(ヒトII型肺胞上皮細胞由来)を用いた。A549細胞はダルベッコ変法イーグル培地に10%ウシ胎児血清(FCS)を添加した培養液で維持した。

MWCNT:MWCNTは、動物実験に用いているものと同じものを用いた。一連の実験にはMWCNTを10% Pluronic F-68溶液(PF68;Sigma社製)に懸濁し、超音波ホモジナイザーSONIFIER 450(BRANSON社製)を用いて出力3(OUTPUT値30)、ON 30秒→OFF 30秒のサイクルで30分間超音波処理したのを用いた。

毒性評価:A549細胞を96ウェルプレートに1ウェルあたり 1×10^4 個/90 μ Lの濃度で播き、24時間培養後に各濃度のMWCNTを10 μ L添加した(最

終濃度：20 µg/ml～100 µg/ml)。添加 48 時間後に AlamarBlue 試薬 (Invitrogen 社製) を加え、細胞生存率を測定した。AlamarBlue 試薬は従来の MTT 法を応用した、ミトコンドリアの還元能を利用する色素である。

② MWCNT が遺伝子発現に与える影響解析

A549 細胞を 12 ウェルプレートに 1×10^5 個 /650 µl の濃度で播き、3 日間培養後に各濃度の MWCNT を 65 µl 添加した(最終濃度：5 µg/ml～100 µg/ml)。添加 20 時間後に細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、リアルタイム PCR 装置 (LightCycler 480, Roche 社製) を用いて対象遺伝子の発現量 (mRNA 量) を測定した。解析対象遺伝子としては、(1)ストレス関連遺伝子：ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、熱ショックタンパク質 70 (HSP70)、メタロチオネイン-2A (MT-2A)；(2)免疫関連遺伝子：インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α)；(3)線維化関連遺伝子：コラーゲン 1A1 (COL1A1)、熱ショックタンパク質 47 (HSP47) を選択した。

③ MWCNT 耐性細胞樹立の試み

A549 細胞を 20 µg/ml の MWCNT 存在下で培養し続け、約 1 ヶ月後に生き残ってコロニーを形成した細胞群を得た。これを 12 ウェルプレートに移し MWCNT 非存在下で培養を続け、最終的に 100 mm プレートで生育させた。この細胞を用い MWCNT に対する毒性 (「(3)-①-毒性評価」に準じた) を親株と比較検討した。

C. 研究結果

(1) 模擬粉じん発生装置を用いた気中 MWCNT の濃度測定

図 2 は、模擬粉じん発生装置による粉じん発生時における、粒子濃度測定結果である。図の一番上のグラフは CNC を用いて測定した 10-1000nm の粒子濃度の変化を示し、他の 5 つのグラフはそれぞれ、0.3-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-5, >5µm (300-500, 500-1000, 1000-2000, 2000-5000, >5000nm) の粒子濃度変化を示す。

今回の実験では、13:50 頃、14:25 頃、14:40 頃、14:55 頃の 3 回発生を試みている。このうち、3 回目の発生ではインピンジャー中の MWCNT が 2 回目の発生まででほとんど消費されたため、CNC 以外の装置では、明瞭な粉じん発生が観測されなかったため、MWCNT を再びインピンジャーに追加して 4 回目の発生を試みている。

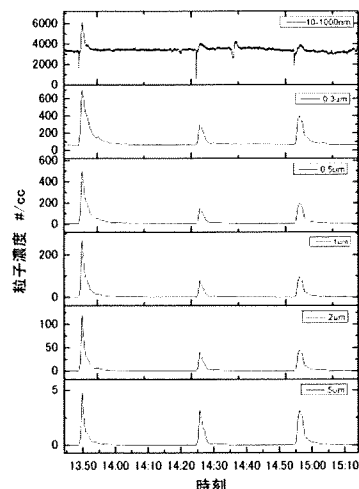


図 2 CNC および OPC の粒子濃度変化

CNC では、元々のバックグラウンド濃度として 3000 個/cc 程度の粒子を観測している。この数値は、実験当日の室内の粒子個数と大差ない。この模擬粉じん発生装置は、バランスを取るための吸気口に HEPA 等の高性能フィルターを使用せず、多孔質のスポンジ状の簡易フィルターを使用しているため、このような結果になっている。粉じん発生直後に一旦濃度が下がるが、これはテクニカルなものであり、実際に濃度が下がっているわけではない。CNC は、装置内に過飽和蒸気 (水・アルコール) を作り、試料中の粒子を種として霧粒を生成させ、その霧粒を計数するという動作原理で計測しているため、温度・気圧の急激な変化に追従することができない。今回もちいた粉じん発生法は、固体試料に二連球を用いて空気を吹き込み発じんさせるというものなので、粉じん発生時に一時的に再発じん装置内の気圧が上がることになる。CNC のマイナス側のピークは、この圧力変動によるものと考えられる。

4 回試みた発生のうち、インピンジャー内に充分 MWCNT 試料が存在した 3 回は、CNC, OPC とも粒子濃度の上昇を観測しており、この発生法、即ち、本 MWCNT 試料を粉体として扱うときの巻き上げなどによる発じんは、サブミクロン径からミクロン径に亘ってまんべんなく発生していることがわかる。CNC のみ、応答した 3 回目の発生は、実際にナノ粒子の濃度が上昇したのではなく、気圧変動によるものである可能性が高い。それは後述する他の装置による粒子濃度測定結果からも推測される。

CNC はナノ粒子の計測を行うが、ナノよりも大きい 1000nm 以下のサブミクロンサイズの粒子にも反応する。そこで、DMA 分級器を備え、ナノ

サイズのみでの測定が可能な SMPS による測定を試みた結果が図 3 である。

図 3 は一番上の図から順に <50, 50-100, 100-200, 200-400nm の粒子数の濃度変化を計測した者である。SMPS は、DMA で測定する粒子径を変化させて CNC で計数するという原理上、測定範囲全領域の粒子数を同時に測定するわけではない、今回の測定では、9nm から 400nm までを 165 秒かけて、測定した後、10 秒で DMA の出力粒径を 400nm から 9nm に戻し、さらに 5 秒の安定化時間を取っている。従って図 3 が示すデータは、3 分毎の計測データになる。

図 3 に示すように、粒径 50nm 未満の粒子は、発生とは全く関係なしに 1000 個/cc 程度の濃度を保っている。これは全てバックグラウンド粒子であり、今回の発じんでは粒径 50nm 未満の粒子の発生はなかったものと考えられる。

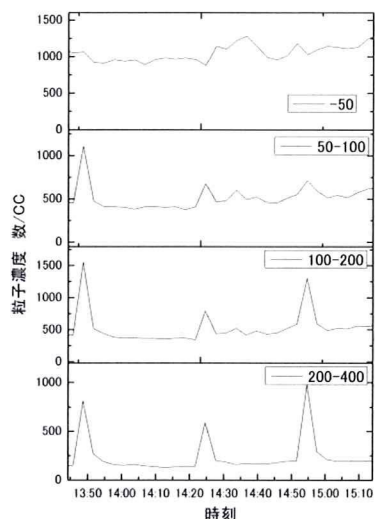


図 3 SMPS によるナノ粒子時間変化

一方、50nm より大きな粒径の粒子数濃度は、発生に同期して濃度上昇を観測された。

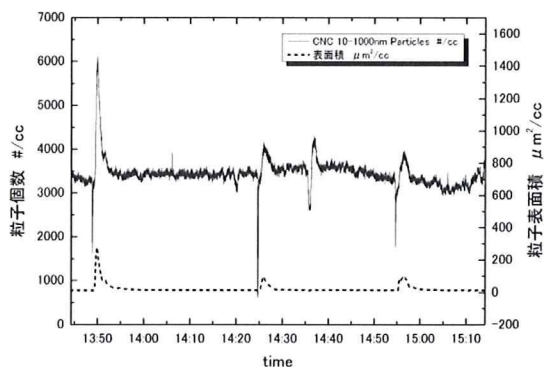


図 4 CNC と表面積計の結果比較

図 4 は CNC と表面積計の結果を同時にプロット

したものである。表面積計についても OPC と同様に、3 回目をのぞく 3 回の発生に同期して粒子表面積の上昇を観測し、ナノサブミクロン粒径の粒子発生をとらえることに成功した。

(2) 生体内寿命の評価法の検討

① 触媒金属粒子の溶出の測定結果

図 5 は、調製直後から、26 日目までの生理食塩水および PBS 中での鉄ならびにコバルトの濃度を ICP-AES により測定した測定結果を示している。いずれも一部 26 日めで濃度が上昇しているが、これは、蒸発による濃縮や粘性の変化などの影響だと考えられる。生理食塩水・PBS のいずれでも濃度変化がないと考えられる Li を内標準として補正を試みたが大差なかった。今回の測定結果で明瞭にいええることは、生理食塩水では鉄、コバルトともに、明瞭な濃度変化は観測されないが、鉄に関しては、PBS で 2 日目の時点で既に濃度の低下が観測された。従って触媒中の鉄をマーカーとする場合、疑似生体液に PBS は使用できないということがわかった。

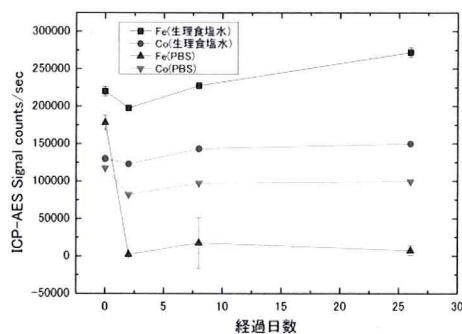


図 5 生理食塩水・PBS 中の金属濃度変化

② 電気化学的手法による表面積測定

図 6 は MWCNT を付着させた金電極のサイクリックボルタモグラムである。

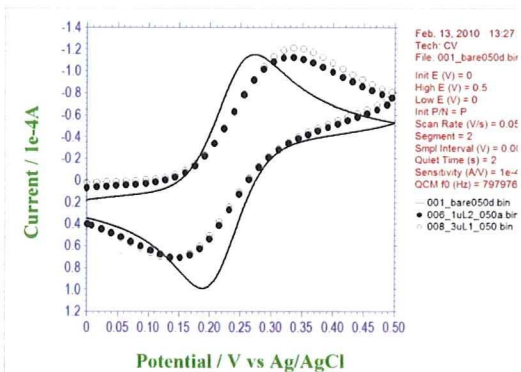


図 6 CNT コート電極によるサイクリックボルタモグラム

図の実線が bare, 即ち無加工の金電極による結果、点線が、MWCNT コート電極の結果である。

MWCNT コートによりサイクリックボルタモグラム (CV) の形状は変化した。コート量による変化量の違いは明瞭でなく、またコートにより、CV の酸化波と還元波のピーク電位の差が bare 電極より大きくなった。この変化は、電極の有効面積 MWCNT で増えたのではなく、MWCNT が電極の汚れ、即ち絶縁体として付着していることを示しており、この方法で評価する場合に、異なる電極へのコート方法を用いることが必要であることを示している。

(3) MWCNT の毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索

① 培養細胞を用いた MWCNT の毒性評価

MWCNT は水に不溶であり、適当な溶媒に分散させる必要がある。分散補助剤として Tween 20 または Tween 80 を 0.005~0.02% 添加する手法が散見されるが、A549 に対する Tween 20 の添加許容濃度を検討したところ非常に毒性が高く、0.001% の Tween 20 存在下でも添加 24 時間後には 90% 以上の細胞が死滅した。そのため Tween 系の使用は不可能と判断した。またジメチルスルホキシド (DMSO) に懸濁した例もあるが、MWCNT による酸化ストレス惹起が報告されており^{6,7)}、また DMSO の OH ラジカル消去能はよく知られている。MWCNT が産生する活性酸素種が明確ではないことから本実験系での DMSO の使用は回避することとした。そこで平野らの報告⁹⁾に準じ、10% PF-68 に懸濁させ分散する系を選択した。MWCNT を 1 mg/ml の濃度で 10% PF-68 に懸濁し、【研究方法】に記した条件で分散しその 1/10 量を細胞に添加することとした (PF-68 の最終濃度: 1%)。なお PF-68 は添加 48 時間後でも 1% 濃度まで全く毒性を示さず、本実験における分散補助剤として使用可能である (図 7)。

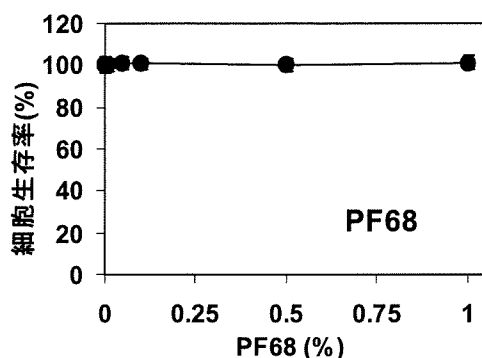


図 7 分散補助剤 PF68 が細胞増殖に与える影響

次に、分散した MWCNT を A549 に各濃度 (20 $\mu\text{g/ml}$ ~100 $\mu\text{g/ml}$) で添加し、毒性評価法を検討し

た。MWCNT は協力者 (三浦) が以前検討したナノ銀⁹⁾とは異なり毒性発現時間が遅く、添加 24 時間後では生存率低下が 10% とほとんど毒性が認められなかった。マウスマクロファージ由来細胞株 (J774.1) では添加 16 時間後までに 40% 程度まで生存率が低下するとの報告⁹⁾がある一方、A549 細胞で添加培地から FCS を除いてばく露することで 48 時間後に明らかな毒性が認められたとの報告がある¹⁰⁾。そこで (I) 長時間ばく露、および (II) FCS 非存在下でのばく露を検討した。その結果、ばく露時間に依存した毒性発現の増強が認められたものの添加 72 時間後でも 20% 程度の生存率低下であった (図 8)。一方 FCS を除くこと自体が細胞毒性を引き起こしたため FCS 非存在下ばく露での検討は不適と判断した。

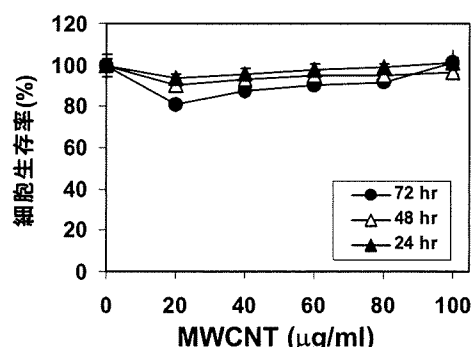


図 8 MWCNT 毒性の時間依存性 (5×10^4 細胞)

そこでさらに、MWCNT 添加時の細胞数について検討を加えた。図 8 の検討では対数増殖期のばく露を行うため 1×10^4 個の細胞を播いて 3 日間培養後に MWCNT を添加した。しかし添加時点で細胞数は増加することになる (A549 細胞の倍加時間より、約 5×10^4 個と考えられる)。添加時の細胞数が多過ぎることが毒性評価を不正確にしている可能性があるため、MWCNT 添加時の細胞数を 1×10^4 個および 5×10^4 個とし、細胞を播いて 24 時間後に MWCNT を添加して、添加 48 時間後の細胞生存率を測定した。その結果、図 9 に示すように添加時の細胞数が少ない群 (1×10^4 個/ウェル) が強い毒性を示した。

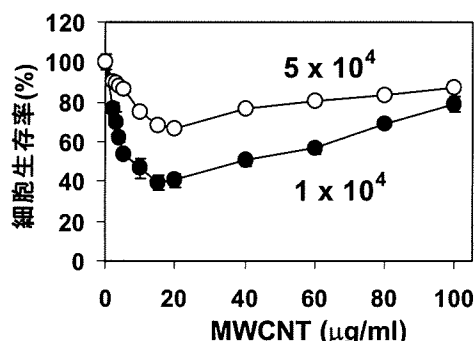


図 9 細胞数が MWCNT 毒性発現に与える影響

② MWCNT が遺伝子発現に与える影響解析

MWCNT による酸化ストレス惹起、免疫系への影響⁷⁾、また線維化への関与などが報告されている¹¹⁾。一方で免疫系には影響しないとの報告がある¹²⁾。MWCNT が及ぼす生体影響をスクリーニングするには cDNA マイクロアレイなどの手法が用いられ総括的検索を可能とするが、今年度は解析対象を絞り込み、ストレス関連、免疫関連および線維化関連遺伝子の発現量変動を指標に、MWCNT ばく露による生体影響の類推を行った。各濃度(5 µg/ml ~100 µg/ml)の MWCNT を添加し 20 時間後の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定したところ、免疫関連遺伝子 (IL-6 および TNF-α) の顕著な増加が認められた (図 10)。また酸化ストレスマーカーである HO-1 発現量の上昇を観察したが (図 10)、線維化関連遺伝子や他のストレスマーカー遺伝子の発現量に対してはほとんど影響を与えなかった。

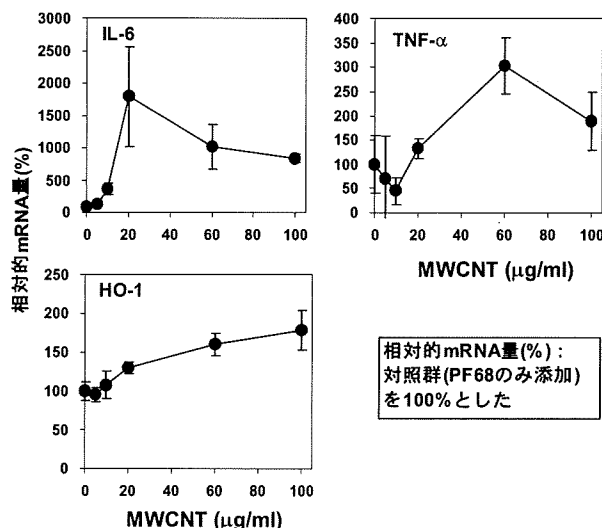


図 10 MWCNT による免疫関連及び酸化ストレス関連遺伝子の発現誘導

③ MWCNT 耐性細胞樹立の試み

化学物質や金属などの毒性に対して細胞が耐性を獲得した場合、その機序を解明し耐性に関わる生体因子を検索・同定することで対象物質が示す生体影響の解明に結びつく。例えばカドミウム耐性細胞では、カドミウム毒性を強力に抑制するメタロチオネンが高発現し細胞に耐性を与えることが明らかにされ¹³⁾、その知見を基にメタロチオネンを細胞あるいはマウスで高発現させるとカドミウムに対して抵抗性を示す。そこで MWCNT 耐性細胞の樹立を試みた。A549 細胞を 20 µg/ml の MWCNT 存在下で培養し続けたところ、生き残り増えてきた細胞を得た。そこで親株との毒性を検討したところ、有意差は認められないもののわずかな生存率の上昇を認めた (図 11)。

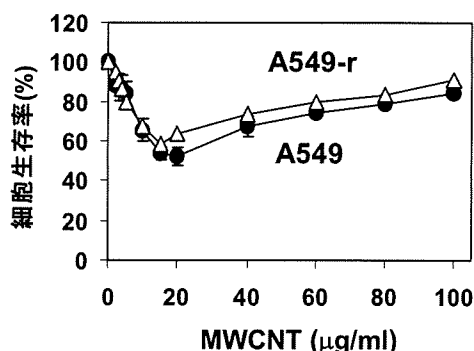


図 11 MWCNT 耐性候補細胞の感受性

D. 考察

(1) 模擬発生装置を用いた気中 MWCNT の濃度測定

模擬発生装置を用いた実験の結果では、粒径 50nm 以下の極めて小さい粒子の発生は観測されなかったが、50-100nm の粒子の発生は観測された。今回用いた MWCNT の太さは電子顕微鏡観察の結果 88nm±0.5nm であるため、凝集していない単繊維が飛散していた可能性が極めて高い。従来、一次粒子がナノスケールであっても凝集性が高いため、労働者がナノにばく露することはないといわば常識のように語られてきた。これは決して根拠がないわけではなく、実際にナノ材料の生産・開発に携わる側にとってみれば、ナノ材料の凝集を解くことは極めて大きな課題であることは間違いない。ただし、それは、材料の生産効率を示す歩留まりあるいは、収率という尺度でみた場合であり、生体影響・環境影響に着目した場合、必ずしも一次粒子の飛散は無視しうる量ではないと予想され、今回の実験結果も一次粒子の飛散の可能性は高いことを示唆している。

ばく露濃度を評価する装置の比較という観点で今回の実験結果をみると、CNC については、温度・圧力の外乱に弱く、表面積計の方が勝れていると考えられる。問題は表面積計が示す空気中粒子の総表面積という数値と、ばく露エアロゾル中のナノ成分の質量ないし個数濃度とをどう結びつけるかであり、これについては、実際のばく露装置から発生した粒子を用いて、SMPS との比較データを取る必要があると考えられる。

(2) 生体内寿命の評価法の検討

生理食塩水並びに PBS を用いた金属濃度測定の結果より、触媒としてコバルトを用いた MWCNT であれば、生理食塩水、PBS のいずれを用いても、触媒由来金属をマーカーとして MWCNT の変化を追うことは可能であると考えられるが、鉄については PBS を用いることは困難であった。これは PBS

に含まれるリン酸の影響よりも pH を中性付近に保っているため、徐々に水酸化物として沈殿した可能性が高いと考えている。実際に生体内寿命を模擬生体液で用いる場合には、生理食塩水・PBS よりもさらに生体の状態に近い、各種アミノ酸や水溶性タンパク質を加える場合も多く、異なった結果が得られる可能性がある。また MWCNT 自体が金属ナノ粒子を放出するだけでなく、水中にイオンとして溶け出した金属を吸着する可能性もあるため、評価は難しい。MWCNT を疑似生体液に浸漬する際に、既知量の金属イオンを加えた試料を用意して同時に濃度変化を見ることは極めて容易に行えるため、生体内寿命の評価そのものを、電子顕微鏡観察で行い、補助的なデータと位置づければ、金属濃度を測定する方法は有用だと考えられる。一方電気化学的方法については、CV の結果より、MWCNT が導電性物質として電極面積の向上をもたらさず、不導体として電極表面を隠蔽していたことが明らかである。従って、電気化学測定による表面積測定を用いて MWCNT の形状変化を評価するためには、電極形成に関して尚検討を要する。

(3) MWCNT の毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索

MWCNT の毒性評価を、至適細胞数を検討した上で行ったところ、添加 48 時間後で顕著な毒性が認められた。無処理群（対照群）の細胞数の増加を考慮するとより長時間での観察は不適と考えられる。また高濃度ばく露で生存率が回復（上昇）したが、この結果は平野らの報告⁸⁾と一致した。回復した理由として、MWCNT の高濃度添加のため分散した MWCNT の再凝集が生じ、細胞毒性が軽減した可能性が考えられる。

本検討で用いた A549 細胞は II 型上皮由来の細胞であり、IL-6 や IL-8 などの発現・分泌が報告されている。MWCNT は免疫関連遺伝子の発現量を顕著に増加させたことから、免疫系への影響を検討する上でも適当な細胞と考えられる。

さらに MWCNT 耐性細胞の樹立を試みたが耐性度が弱い。より長期に MWCNT にばく露し耐性細胞を樹立する必要がある。

E. 結論

(1) 模擬発生装置を用いた気中 MWCNT の濃度測定全てのナノ粒子について、あるいは全ての MWCNT について、普遍的な、結論ではないが、粉体として取り扱う作業においても、ナノ一次粒子の気中への発生の可能性はゼロではないということがわかった。また、各種測定器の利点・欠点が明らかになり、ばく露実験での濃度監視には表面積計が優れていると考えられることがわかった。

(2) 生体内寿命の評価法の検討

生体内寿命評価に関して電子顕微鏡観察の補助的方法として検討した方法のいずれについても尚、実験方法の検討・改良が必要であった。

(3) MWCNT の毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索

MWCNT の毒性発現は長時間経過して生じる。そのため毒性評価には MWCNT 添加時の至適細胞数を予め検討することが必要であることが示された。また MWCNT は免疫系に大きく影響する可能性が示された。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

論文

Mitsutoshi Takaya, Fumio Serita, Kazunori Yamazaki, Shigetoshi Aiso, Hisayo Kubota, Masumi Asakura, Naoki Ikawa, Kasuke Nagano, Heihachiro Arito, and Shoji Fukushima(2010): Characteristics of Multiwall Carbon Nanotubes for an Intratracheal Instillation Study with Rats Industrial Health, in press

学会発表

芹田富美雄, 鷹屋光俊, 久保田久代, 甲田茂樹, 相磯成敏, 山崎一法, 長野嘉介, 有藤平八郎, 福島昭治(2009)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: II 気管注入時の投与物質及び肺内 MWCNT の SEM 観察, 第 82 回日本産業衛生学会

H. 知的財産

なし

I. 参考文献

- 1) Gamble J (1967) Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid, 8th Ed. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- 2) Takaya M, Shinohara Y, Serita F, Ono-Ogawawara M, Otaki N, Toya T, Takaya A, Yoshida Y, Kohyama N(2006) Dissolution of Functional Materials and Rare Earth Oxides into Pseudo Alveolar Fluid, Ind. Health, 44(4), 639-44
- 3) Koshi K, Homma K, Kohyama N, Sakabe H (1975) The solubility and cell toxicity of metallic fume. Ind Health 13, 253-8.
- 4) Koshi K (1979) Solubility and celltoxicity of cadmium. Ind Health 17, 187-97.
- 5) Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J Toxicol Sci 33,

- 105-116.
- 6) Han SG, Andrews R, Gairola CG (2010) Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhal Toxicol* **22**, 340-347.
 - 7) Mitchell LA, Gao J, Wal RV, Gigliotti A, Burchiel SW, McDonald JD (2007) Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci* **100**, 203-214.
 - 8) Hirano S, Kanno S, Furuyama A (2008) Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**, 244-251.
 - 9) Miura N, Shinohara Y (2009) Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* **390**, 733-737.
 - 10) Simon-Deckers A, Gouget B, Mayne-L'hermite M, Herlin-Boime N, Reynaud C, Carriere M (2008) In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* **253**, 137-146.
 - 11) Ryman-Rasmussen JP, Tewksbury EW, Moss OR, Cesta MF, Wong BA, Bonner JC (2009) Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* **40**, 349-358.
 - 12) Elgrabli D, Abella-Gallart S, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G (2008) Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology* **253**, 131-136.
 - 12) Rugstad HE, Norseth T (1978) Cadmium resistance and content of cadmium-binding protein in two enzyme-deficient mutants of mouse fibroblasts (L-cells). *Biochem Pharmacol* **27**, 647-650.

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

ナノマテリアルの経気道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

分担研究者 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 病理検査室長

研究要旨

昨年度、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を単回気管内投与したラットの肺について、光学顕微鏡レベルで病理形態学的検索を行った結果、肺胞腔と肺胞壁にMWCNTと推定される沈着物を認めた。本年度、この沈着物について超微形態学的観察を実施したところ、MWCNTに特徴的な層状構造を認めた。この結果から光学顕微鏡レベルの検索で肺胞腔と肺胞壁に認められた沈着物はMWCNTであると結論した。

A. 研究目的

本分担研究では、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を研究材料として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テーマに研究を行っている。昨年度、MWCNTをラットに気管内投与し91日まで経過観察を行う試験を実施し、光学顕微鏡による病理組織学的検索で標的臓器が肺であることを絞り込み、肺にみられた病変の特徴とその経過推移を明らかにした。また、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である「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製法」を酒井電子顕微鏡応用研究所・酒井俊男博士と協同開発し、十分評価に耐えるレベルであることを確認した。

本年度は、昨年度実施したラットの気管内投与試験でMWCNTの気管内投与後91日目の肺にみられた微小肉芽腫(Fig 1)を研究材料として透過型電子顕微鏡による研究に着手し、昨年度の光学顕微鏡を用いた検索において、MWCNTと判断した肺内沈着物がMWCNTであることの超微細形態検索による確認を行った。

B. 研究方法

研究材料とした肺の微小肉芽腫病変は昨年度に開発した「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製法」に従った手順で試料作製を行うことで、光学顕微鏡による検索で当該病変部であることを確認された材料につい

て透過型電子顕微鏡による超微細形態的手法による検索をおこなった。透過型電子顕微鏡で観察する準超薄切片と超薄切片の作製は酒井電子顕微鏡応用研究所・酒井俊男博士のもとでおこなった。以下に「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製法」を用いた本研究における電子顕微鏡観察のための試料作製の概要を記した。

(1) 解剖、灌流固定、臓器の摘出

H20年度に実施したラットを用いたMWCNTの単回気管内投与実験で透過型電子顕微鏡検索用に灌流固定を行った高用量群の動物2匹の肺について、電子顕微鏡検索を行った。肺は、0.074Mのリン酸緩衝液にパラホルムアルデヒド2%、グルタルアルデヒドを0.5-1%添加した固定液をペントバルビタール(i.p.)麻酔下で肝門脈から注入、頸静脈から放血して灌流固定を行った後、肺(左右)気管・気管支及び胸腺等縦隔部の組織とともに一塊として胸腔内から摘出した。

(2) 組織片の切り出し(Fig 2-①)

胸腔内臓器を全長に渡り0.5~0.8mm間隔で切り分け、得られた胸腔内臓器の全割横断組織片の中から肉眼的に顕著な変化が認められたものについて電子顕微鏡検索試料作製することとした。

(3) エポキシ樹脂包埋試料の作製(Fig 2-②)

選択した胸腔内臓器の横断組織片はリン酸緩衝液で洗浄後、オスミウム酸による後固定、アルコール脱水、プロピレンオキシドによる置換を経て、エポキシ樹脂で包埋、残りの胸腔内臓器の横断組織片は固定液に浸漬して保存した。

(3) エポキシ樹脂包埋試料から病変部の切り出し

(Fig 2-② 破線囲み)

作製したエポキシ樹脂包埋組織の中で肉眼的に最も顕著な変化を認めた部位を含む約 5mm×9mm の大きさをで切り出した (準超薄切が可能な大きさは最大で 5.5mm×13mm)。

(4) 光学顕微鏡下で観察、電顕観察部位の絞込み (Fig 2-③)

切り出した肺のエポキシ樹脂包埋組織から厚さ約 1 μ m の準超薄切片を作製し、スライドガラスに載物、トルイジン青染色を施して光学顕微鏡下で観察、MWCNT と推定される物質の沈着が強く認められた肺胞壁の微小肉芽腫に電子顕微鏡観察の絞込みを行った。

(5) エポキシ樹脂に再包埋 (Fig 2-④)

(4) で絞り込んだ電顕観察部位を切り出し、エポキシ樹脂に再包埋した。

(6) 超薄切片の作製 (Fig 2-⑤)

厚さ 100nm の超薄切片を作製して電顕用グリッドに載物、電子染色は酢酸ウラン液と鉛染色液による二重染色を施した。

(7) 透過型電子顕微鏡による観察 (Fig 3, 4)

透過型電子顕微鏡 (JOL 1400) を用いて観察した。観察に際しては日本電子 (株) 東京昭島市) の協力を得た。

C. 研究結果

H20 年度の光学顕微鏡による肺の検索において MWCNT と判断した沈着物がマクロファージの細胞質内にみられ (Fig 4)、MWCNT に特徴的なグラファイトの層状構造が認められ、光学顕微鏡的观察で肺に認められた沈着物は MWCNT であると結論した。

D. 考察

昨年度の本分担研究では、光学顕微鏡レベルの形態観察によって黒色繊維状物質と認識される肺内沈着物を MWCNT と判断して研究報告を行った。気管内投与試験で用いた気管内投与を行った MWCNT 懸濁液の物理化学的特性は鷹屋等の研究によると、不純物として鉄 4400ppm (wt/wt)、クロム 48ppm、ニッケル 17ppm が認められたことが報告されている。不純物中のクロムとニッケルについては、超音波ホモジナイ

ザーで懸濁液中の MWCNT を均一に分散させた際、MWCNT が超音波ホモジナイザーに衝突して、超音波ホモジナイザーのステンレス素材を研削したものが混入した可能性が高いと考えられ、鉄についても超音波ホモジナイザーのステンレス素材を研削物が検出された可能性が高いと考えられた。したがって、肺組織中に含まれる MWCNT の同定に際しては、MWCNT に指標となる金属元素が含まれていないことから、走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡の元素分析機能を用いた検索を行うことはできないと考えた。従って生態組織中に存在する繊維状物質が MWCNT であることを確認するためには透過型電子顕微鏡を用いた超微細形態観察によって MWCNT を構成するグラファイトの多層構造を確認することが必要であると考えた。本年度の研究結果により、昨年度、気管内投与したラットの肺に認められた黒色沈着物に MWCNT を構成するグラファイトの多層構造を認めたことから、当該沈着物は MWCNT であると考えられ、MWCNT は光学顕微鏡を用いた検索においても、ある程度の長さを有する繊維は認識することが可能であることが確認された。

また、昨年度から本年度にかけて酒井電子顕微鏡応用研究所・酒井俊男博士と共同で開発した「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製法」はナノマテリアルの生体影響を超微細形態学的手法で検索を行う際に、検索部位の試料作製を的確に行うことができる有効手段であると考えられた。光学顕微鏡による病理組織学的検索は、MWCNT の生体影響の概略を調べるには、有効な検索手段であると考えられる。

E. 結論

光学顕微鏡を用いた病理組織学的検索で MWCNT と推定していた沈着物質は、透過型電子顕微鏡像により MWCNT であることが確認された。光学顕微鏡による病理組織学的検索は、MWCNT の生体影響の概略を調べるには、有効な検索手段であると考えられる。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, In press

Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of Multiwall Carbon Nanotubes for an Intratracheal Instillation Study with Rats, *Industrial Health*, In press

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 5 月、福岡)

相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、大林久雄、長野嘉介、福島昭治、多層カーボンナノチューブを単回気管内投与したラットにみられた肺病変、第 24 回発癌病理研究会 (2009 年 8 月、石川)

相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、高信健司、長野嘉介、福島昭治、複層カーボンナノチューブの単回気管内投与によるラットの肺毒性、第 26 回 日本毒性病理学会 (2010 年 2 月、金沢)

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。

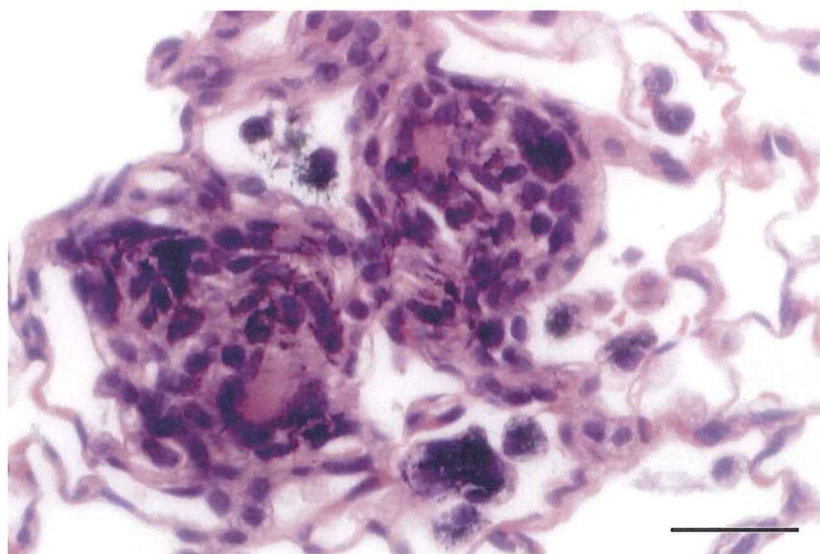


Fig.1 MWCNT 気管内投与後 91 日の肺、ラット、肺胞壁に形成された微小肉芽腫 (光学顕微鏡写真)

肺胞腔内のマクロファージが多量の黒色繊維状物質を貪食、肺胞壁に形成された微小肉芽腫の中にも黒色繊維状物質を認める。昨年度の報告では、これらの黒色繊維状物質を MWCNT であると推定した。本年度は透過型電子顕微鏡を用いた超微細形態観察による同定を試みた。

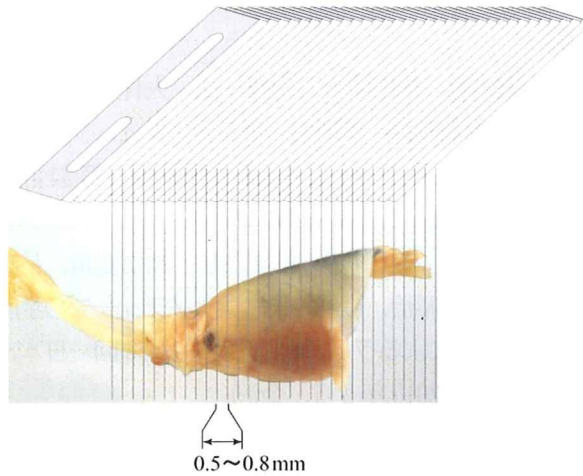


Fig.2 「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」

① 胸腔内臓器（寒天包埋）の全切断、連続切り出し

2%パラホルムアルデヒド（グルタルアルデヒドを 0.5-1%添加）固定液で灌流固定した胸郭内臓器を全長に渡り 0.5~0.8mm 間隔で切り分ける。

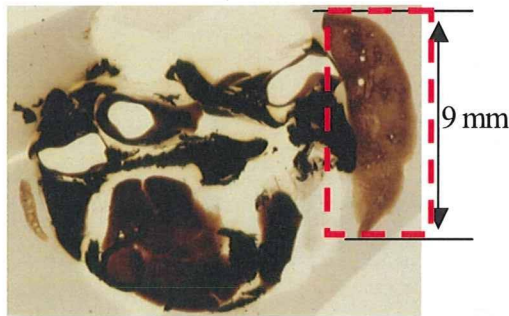


Fig.2 「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」

② エポキシ樹脂包埋

胸腔内臓器の全割組織片を各組織間の連携を保った状態でエポキシ樹脂に包埋する。

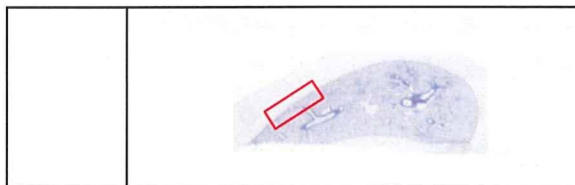


Fig.2 「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」

③ 準超薄切片の作製（トルイジン青染色） → 光学顕微鏡で病変部を確認

電子顕微鏡観察用の試料は従来では 1mm² 程度の準超薄切片しか作製できないが、今回、開発した方法では準超薄切片は最大で 5.5mm×13mm の大きさのものを薄切可能であり、光学顕微鏡観察で使用するマウスの肝臓程度の大きさの切片から光学顕微鏡による病変部の観察が可能となる。この為、電子顕微鏡検索での検索部位の絞込みを正確に行うことができる。 Fig.2-②の破線囲い部分を切り出して準超薄切片を作製した。



Fig.2 「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」

④ 観察部位の切り出し

電子顕微鏡で観察する領域をスライドガラス上の準超薄切片から切り出してから剥がす。
Fig.2-③の実線囲い部分を切り出してエポキシ樹脂に再包埋→ 超薄切片を作製した。

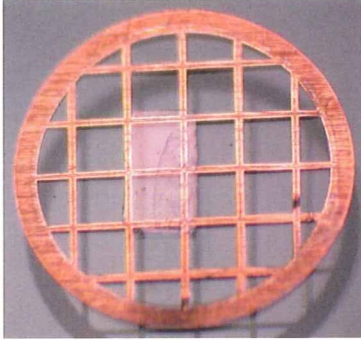


Fig.2 「複合臓器包埋による電子顕微鏡試料作製」

⑤ グリッドに貼付

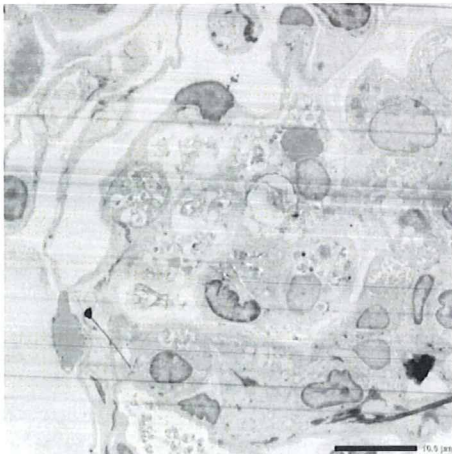


Fig.3 透過型電子顕微鏡で観察（低倍率）

MWCNT 気管内投与後 91 日の肺、ラット、肺胞壁に形成された微小肉芽腫

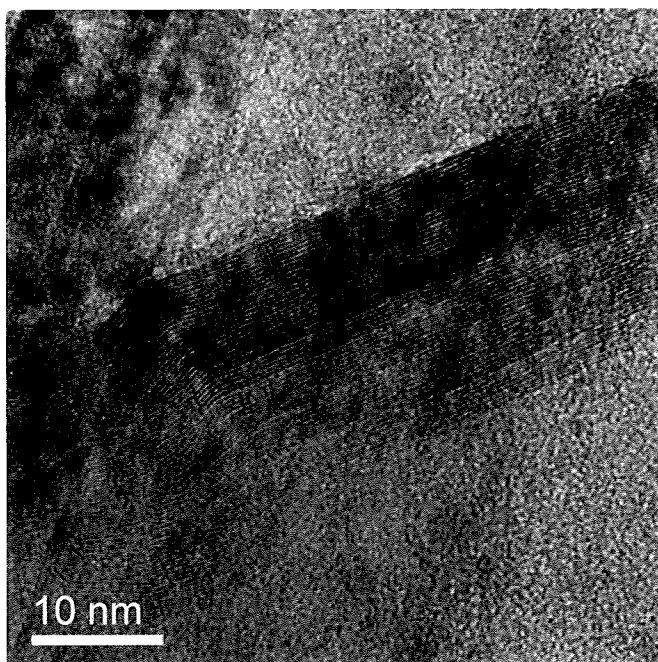


Fig.4 透過型電子顕微鏡で観察（高倍率）
MWCNT に特徴的なグラファイト層の多層構造が認められた。

ナノマテリアルの経気道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有害性評価研究グループ 部長
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

研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺外への移行とその影響について調べることを目的として、MWCNTをラットに40および160 μ g/匹の用量で単回気管内投与し、1、7、28および91日後に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした病理組織学的検索を行った。その結果、40および160 μ g/匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓へのMWCNTの移行は認められなかった。また、これらの臓器には病理組織学的変化がみられなかった。今回の研究ではこれら肺外臓器へのMWCNTの移行を示す明らかな証拠は得られなかったが、電子顕微鏡等による詳細な検索が必要であると考えられる。

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、経気道的に暴露され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。平成20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、血液学および血液生化学的な影響を中心に肺外影響の検索を行った。その結果、血液学的検査で投与7日後に好酸球と赤血球数の増加がみられ、血液生化学的検査では投与1日後にコレステロール、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28日後に肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。この結果から、MWCNは経気道暴露により肺外影響を起こすことが示唆され、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ことの必要性が示された。本年度は、経気道的に投与したMWCNTの肺外への移行とその影響について、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした病理組織学的検索により調べた。

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1、7、28及び91日後に動物を解剖し、肝臓、腎臓、脾臓について光学顕微鏡による観察を行った。

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。気管内投与時のMWCNTの

性状は、鷹屋ら (Takaya et al, 2010) の研究によれば、直径が平均88nm (中央値87nm) であり、長さが平均5.0 μ m (中央値4.0 μ m)、5 μ m以上の繊維が38.9%を占めることが確認されている。また、不純物として、鉄が0.44% (W/W)、クロムが0.0048%、ニッケルが0.0017%含まれていた。

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 $^{\circ}$ 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は40および160 μ g/匹投与群、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を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 $^{\circledR}$) 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。

投与1、7、28及び91日後に各群8匹の動物をチオペンタール麻酔下で、後大動脈から採血後に、解剖した。動物は腹腔、胸腔及び頭蓋腔を含め剖検した後、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、

10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。これらの臓器をパラフィン包埋し、薄切後、HE染色し、光学顕微鏡で観察した。

C. 研究結果

C-1 MWCNTの移行

肝臓、腎臓、脾臓の病理組織標本を光学顕微鏡を用いて観察し、MWCNT繊維の有無を調べた。その結果、投与1、7、28及び91日後とも、いずれの動物にも肝臓、腎臓、脾臓組織中にMWCNT繊維は認められなかった。

C-2 病理組織学的変化

肝臓、腎臓、脾臓を光学顕微鏡により病理組織学的に検索し、下記の結果を得た。

1) 投与1日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が40 μ g/匹投与群 (軽度7例、中等度1例)、160 μ g/匹投与群 (軽度6例、中等度2例) にみられたが、対照群 (軽度7例、中等度1例) との間に発生率、程度とも差を認めなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

2) 投与7日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が40 μ g/匹投与群 (軽度5例、中等度3例)、160 μ g/匹投与群 (軽度4例、中等度4例) にみられたが、対照群 (軽度4例、中等度4例) との間に発生率、程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が160 μ g/匹投与群の1例にみられたが、対照群にも2例の発生があり、MWCNTの投与による影響ではなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも

病理組織学的な変化を認めなかった。

3) 投与28日後

肝臓：40 µg/匹投与群、160 µg/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が40 µg/匹投与群（軽度1例、中等度7例）、160 µg/匹投与群（軽度1例、中等度7例）にみられたが、が対照群（中等度8例）との間に発生率、程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が40 µg/匹投与群と160 µg/匹投与群に各1例みられたが、投与7日後の対照群にも2例の発生があり、MWCNTの投与による影響ではなかった。

脾臓：40 µg/匹投与群、160 µg/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

4) 投与91日後

肝臓：40 µg/匹投与群、160 µg/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が40 µg/匹投与群（中等度8例）、160 µg/匹投与群（軽度1例、中等度7例）にみられたが、が対照群（中等度8例）との間に発生率、程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が40 µg/匹投与群の1例と160 µg/匹投与群の2例にみられたが、投与7日後の対照群にも2例の発生があり、MWCNTの投与による影響ではなかった。

脾臓：40 µg/匹投与群、160 µg/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

D. 考察

労働現場でのMWCN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（NIOSH, 2007）。動物実験による研究でも、MWCNTをマウスやラットに吸入暴露すると、肺に影響が現れることが報告されている（Li JGら, 2007、Ma-Hockら, 2009）。一方、Mitchellら（2007）は、マウ

スにMWCNTを吸入暴露した実験で全身性の免疫抑制が起こることを報告しており、MWCNTの経気道暴露による肺以外への影響を明らかにすることが重要な課題になると考えられる。

平成20年度の研究では、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、血液生化学的検査等を行なった結果、血液学的検査により40および160µg/匹投与群の投与7日後に好酸球と赤血球数の増加、血液生化学的検査では160µg/匹投与群の投与1日後に総蛋白、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の高値、A/G比とクロールの低値が認められた。また、投与28日後に160µg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。これらの結果から、MWCN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。

本年度は、MWCNTの肺から他臓器への移行およびその影響を明らかにすることを目的として、MWCNT（40および160µg/匹）を単回気管内投与したラットを経時的に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った。その結果、40および160µg/匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓の組織中にMWCNT繊維は認められなかった。また、病理組織学的検索でも、MWCNT投与群に対照群と発生率や程度に差がみられる所見はなく、40および160µg/匹の用量の経気道暴露では肝臓、腎臓、脾臓に光学顕微鏡レベルでの病理組織学的変化は認められないことがわかった。40あるいは160µg/匹の用量のMWCNTを単回気管内投与すると、MWCNT繊維が肺に長期間にわたって沈着し、線維化などの病理組織学的変化が引き起こされることが報告されている（Aisoら, 2010）。本研究の結果は、肺に病理組織学的な変化がみられ

る用量のMWCNTが沈着した場合でも、肝臓や腎臓、脾臓には形態学的な変化が発生しないことを示している。また、Mitchellら（2009）は、MWCNTの吸入ばく露により全身性の免疫抑制反応が起きるメカニズムについて、肺に取り込まれたMWCNTが脾臓に移行し作用するのではなく、肺胞マクロファージから放出されたサイトカインが血流を介して脾臓のT-細胞の産生を抑制すると報告している。本研究でも脾臓にはMWCNTの移行や病理組織学的変化は認められず、Mitchellら（2009）の報告と一致する結果であった。しかし、今回の研究は光学顕微鏡レベルでの観察であり、これらの臓器へのMWCNTの移行の有無を明らかにするためには、電子顕微鏡等による詳細な検索が必要であると考えられる。

E. 結論

MWCNTをラットに40および160 μ g/匹の用量で単回気管内投与し、1、7、28および91日後に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った。その結果、40および160 μ g/匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓へのMWCNTの明らかな移行は認められなかった。また、これらの臓器には病理組織学的変化がみられなかった。今回の研究ではこれら肺外臓器へのMWCNTの移行を示す明らかな証拠は得られなかったが、電子顕微鏡等による詳細な検索が必要であると考えられる。

参考文献

- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., et al. (2010). *Industrial Health*, in press
- Li, J.G., Li, W-X., Xu, J-Y., et al (2007). *Environmental Toxicology* 22, 415-412.
- Ma-Hock, L., Treumann, S., Strauss, V., et al. (2009). *Toxicological Science*, in press

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

Mitchell, L.A., Lauer, FT., Burchiel, SW et al. (2009). *Nature Nanotechnology*. 4, 451-456

National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (2007). DHHS (NIOSH) Publication No. 2007-123.

Takaya, M., Serita, F., Yamazaki K, et al. (2010). *Industrial Health*, in press

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

甲田茂樹（2009） ナノマテリアル取り扱いと労働衛生の課題、労働の科学、第64巻第4号 205-207.

Yoshida, J, Mochizuki, C., Masu, Y., Koda, S. and Kumagai, S. (2008). Use of a closed system device to reduce occupational contamination and exposure to antineoplastic drugs in hospital work environment. *Ann, Occup Hyg.* 53, 153-160.

Asakura, M, Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S. (2010). Cytotoxicity and mutagenicity of multiwall carbon nanotubes with culture Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H., and Fukushima,

S. (2010). Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Industrial Health*, in press

2. 学会発表

甲田茂樹、鷹屋光俊、他：ナノマテリアル取扱いと職場での労働衛生管理について一企業へのアンケート調査結果から一、第48回労働衛生工学会、2008年11月

小野真理子、鷹屋光俊、甲田茂樹、他：作業環境中のフラーレンのHPLCによる定量、第48回労働衛生工学会、2008年11月

鷹屋光俊、甲田茂樹、他：フラーレン取り扱い職場の空气中粒子濃度と空气中粒子形状の電子顕微鏡観察、第48回労働衛生工学会、2008年11月

甲田茂樹、他：アンケート調査から伺えるナノマテリアル取扱い職場における労働衛生管理の課題について、第82回日本産業衛生学会、2009年5月

鷹屋光俊、甲田茂樹、他：ナノ材料取扱職場の環境測定、職場における粒子測定装置の評価と電子顕微鏡観察、第82回日本産業衛生学会、2009年5月

相磯成敏、戸谷忠雄、甲田茂樹、他：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5月

芹田富美雄、甲田茂樹、他：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：II. 気管注入時の投与物質及び肺内MWCNTのSEM観察、第82回日本産業衛生学会、2009年5月

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

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

分担研究者 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

昨年度光学顕微鏡レベルで病理形態学的検索を行ったカーボンナノチューブ(CNT)のミストあるいはリポゾームを用いたフラレーンを単回暴露した嗅球について、超微形態学的観察を実施した結果、神経細胞および神経線維に器質的变化は認められなかった。また、酸化チタンをラットに単回吸入し経時的に観察した結果、酸化チタンは投与4週まで肺内に認められ、時間の経過とともに主に肺胞マクロファージ内に存在した。脳あるいはその他の臓器の異常は光学顕微鏡レベルでは認められなかった。また、X線解析装置(EDS)を用いてCNT暴露嗅球の炭素の部位を検索したが、特定の部位の蓄積を確認することはできなかった。

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、暴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暴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。

研究2年目にあたる本年は、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(CNT)のミストあるいはリポゾームを用いたフラレーンを単回吸入暴露したラットの神経系器官における嗅球の超微形態学的な検索
- 酸化チタン経気道暴露したラットの呼吸器系への病理形態学的解析
- NSPの細胞内局在を観察するためのエネルギー分散形X線分光器(EDS)解析技術の確立とCNT暴露嗅球におけるCの分布の検索

B. 研究方法

1. カーボンナノチューブ(CNT)のミストあるいはリポゾームを用いたフラレーン単回吸入暴露したラットの神経系器官の超微形態学的検索

H20年度に実施したラットを用いたCNTのミス

トを単回吸入暴露実験およびラットを用いたリポゾームを用いたフラレーンの単回吸入暴露試験で得られた動物のうち、高用量群の一部の嗅球について、電子顕微鏡検索を行った。嗅球は、肉眼的観察後、片側を電子顕微鏡用に採取した。これを2分割後さらに3から5mmのブロックに細切して、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を経て、エポキシ樹脂に包埋した。

嗅球は暴露後短時間で被験物質に暴露されると予想されたため、CNT暴露の嗅球は、投与後0日(投与直後)、投与後7日について、フラレーン暴露の嗅球は、投与後0日(暴露直後)、投与後3日および7日について検索した。

2. 酸化チタン経気道暴露したラットの呼吸器系への病理形態学的解析

酸化チタンを6週齢の雄SDラットに0、0.05、0.25および0.5%の濃度で単回吸入後暴露した。暴露0(暴露直後)、暴露後1、3、7、14および28日に動物を解剖し、肺、脳、肝、腎、脾を10%中性緩衝ホルマリンに固定し、通常の方法に従い病理標本を作製して、経時的な病理形態学的変化を光学顕微鏡レベルで観察した。

3. NSPの細胞内局在を観察するためのEDS解析技術

の確立とCNT暴露嗅球におけるCの分布の検索
電子顕微鏡を用いて細胞内の元素分析を行うため、EDS装置の開発を行った日本電子(東京昭島)にて技術研修を行った。その後、1の実験に用いたCNT暴露直後のラット嗅球について、Cの存在をEDSにて分析した。陽性対照として、酸化チタン暴露ラット肺を使用した。

試験に使用した動物の使用は、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。

C. 研究結果

1. カーボンナノチューブ(CNT)のミストあるいはリポゾームを用いたフラレーン単回吸入暴露したラットの神経系器官の超微形態学的検索 (Figs.1-14)

CNT、フラレーンを単回暴露した嗅球の電子顕微鏡観察を実施した。CNT投与群では、神経細胞、神経線維ともに異常は認められず、CNTと考えられる粒子状物も認められなかった。投与後0日から7日まで観察したフラレーン投与群においても、神経細胞および神経線維ともに対照群と同様の組織像であり、フラレーンと考えられる粒子状物も認められなかった。

2. 酸化チタン経気道暴露したラットの呼吸器系への病理形態学的解析

その結果、全ての投与群で投与直後より肺に形態学的変化が認められた。まず全ての投与群で、黒褐色色素が肺胞腔内、肺胞壁あるいは気管支腔内に認められ、投与初期では細胞外にも存在していたが、投与初期より肺胞マクロファージへ貪食される像が観察された。黒褐色色素は用量依存性の増加を示し、28日では色素を貪食したマクロファージが肺内で集簇する傾向が認められた。炎症も全ての投与群で投与1日から急性期の変化が認められ、時間の経過とともに肉芽腫性炎症やリンパ球系細胞集簇等の慢性炎症像が認められた。炎症も用量依存性に増悪化し、28日まで観察された。

3. NSPの細胞内局在を観察するためのEDS記述の確立とCNT暴露嗅球におけるCの分布の検索 (Figs.15-18)

EDS解析技術を日本電子(東京昭島)にて研修した。陽性対照として用いた酸化チタン暴露ラット肺では、肺胞

マクロファージのライソゾーム内の黒褐色沈着物に一致して、チタンおよび酸素元素が観察された。しかし、CNT暴露したラットの嗅球(研究結果1の電顕観察と同個体)を用いて元素分析を行ったが、炭素元素は観察視野全体に分布しており、部位特異的な分布を認めることはできなかった。

D. 考察

CNT、フラレーンを単回暴露した嗅球において、電子顕微鏡観察において異常は認められなかったことから、昨年度の研究結果と併せ、CNTあるいはフラレーンの吸入暴露は、ともにラットの嗅球や中枢神経系に器質的な影響を与えないと考えられた。酸化チタンのEDS解析では、チタンおよび酸素元素とともに明らかに解析できたことから、EDSは細胞内の元素を解析できる非常に有用な方法であると考えられた。しかし、CNTを投与した嗅球では、EDS解析にて炭素の蓄積を認めることができなかったことから、CNT暴露による粒子が嗅球内に存在しない可能性も考えられた。しかし、今回のサンプルは、炭素が豊富なエポキシ樹脂で包埋したことから、分布を明らかにするためには、さらなる検討が必要かもしれない。

ラットに吸入暴露を行った酸化チタンの吸入暴露により肺に明らかなチタンの沈着が投与後4週間まで観察されたことは、投与した物質が肺内に長くとどまる可能性を示すものと考えられた。

平成22年度は、脳、肺の電子顕微鏡検索およびEDS解析を行い、酸化チタンの分布を解析する。

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レーンを雄ラットに単回吸入暴露による嗅球を始めとする中枢神経系への影響は認められなかった。EDS解析は、細胞内元素の分布を解析する有用な方法であるが、今回のEDS解析ではCNTの嗅球における分布は明らかにならなかった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

- ①吉田緑 ②フタル酸エステル類 ③食品安全ハンドブック編集委員会編④食品安全ハンドブック ⑤丸善 ⑥東京 ⑦2010 ⑧pp.145-147.