

2) 雑誌

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A.

②Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay.

③Cancer Sci.④100 ⑤2261-2267⑥2009

①Takahashi M, Yoshida M, Inoue K, Morikawa T, Nishikawa A.

②A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats.

③Food Chem Toxicol. ④47(10) ⑤2490-8. ⑥2009

①Yoshida M, Sanbuissyo A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A.

②Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection.

③J Toxicol Sci. ④34 Suppl 1 ⑤SP189-97⑥2009.

①Takahashi M, Shibutani M, Nakahigashi J, Sakaguchi N, Inoue K, Morikawa T, Yoshida M, Nishikawa A.

②Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods.

③Arch Toxicol.; ④83(8): ⑤785-93⑥2009 .

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Ohnishi K, Nakashima K, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A.

②Possible contribution of rubiadin, a metabolite of madder color, to renal carcinogenesis in rats.

③Food Chem Toxicol. ④47(4) ⑤752-9⑥2009.

①Yoshida M, Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.

②Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats.

③J Reprod Dev.④55(2) ⑤105-9 ⑥2009 .

①Takahashi M, Inoue K, Yoshida M, Morikawa T, Shibutani M, Nishikawa A.

②Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats.

③Food Chem Toxicol. 2009; ④47(2): ⑤462-71.

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Shibutani M, Takagi H, Hirose M, Nishikawa A.

②Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study.

③Food Chem Toxicol. ④47(1) ⑤184-91⑥2009.

①Sato I, Kawamoto K, Nishikawa Y, Tsuda S, Yoshida M, Yaegashi K, Saito N, Liu W, Jin Y.

②Neurotoxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats and mice after single oral exposure.

③J Toxicol Sci.④34(5) ⑤569-74⑥2009 .

2. 学会発表

Midori Yoshida, Naoki Koyama, , Kaoru Inoue, Miwa Takahashi, Youhei Sakamoto, Yoshikazu Taketa, Yoshiya Shimada, Akiyoshi Nishikawa

Early depletion of ovarian follicles by prepubertal exposure to gamma ray promotes rat uterine cancer development
第68 日本癌学会学術総会(横浜)2009年10月

Midori Yoshida, Atsushi Sanbuissho, Shigeru Hisada, Michihito Takahashi, Yasuo Ohno, Akiyoshi Nishikawa

Collaborative work to evaluate ovarian toxicity by repeated dose and female fertility studies in rats: Morphological characteristics of normal cycling ovary in rats and their viewpoints for ovarian toxicity detection

49th Annual Meeting & ToxExpo (Baltimore, US)2009年3月

吉田緑

生殖発性毒性の評価法：現状と問題点

第10回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会
2009年7月(岩手)

吉田緑

通常の反復投与の動物試験による化学物質の雌性生殖
器系への影響評価

第3回 In vivo 実験医学シンポジウム(東京)2009年12月

吉田緑、武田賢和、島田義也、井上薫、森川朋美、高橋美和、坂本洋平、渡辺元、田谷一善、西川秋佳
未成熟期の放射線照射による小卵胞の経時的変化

第26回日本毒性病理学会講演要旨集(金沢)2010年2月

H. 知的財産所有権の出願・登録状況

特許取得・ 実用新案登録

なし

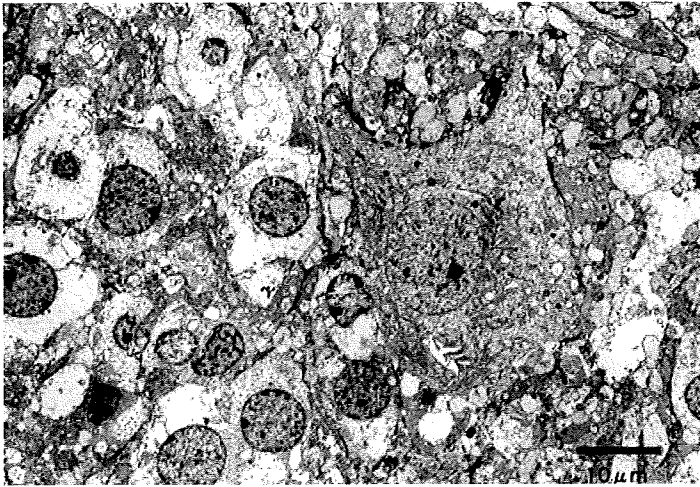


Fig. 1 CNT 投与直後 嗅球ラット 異常を認めない

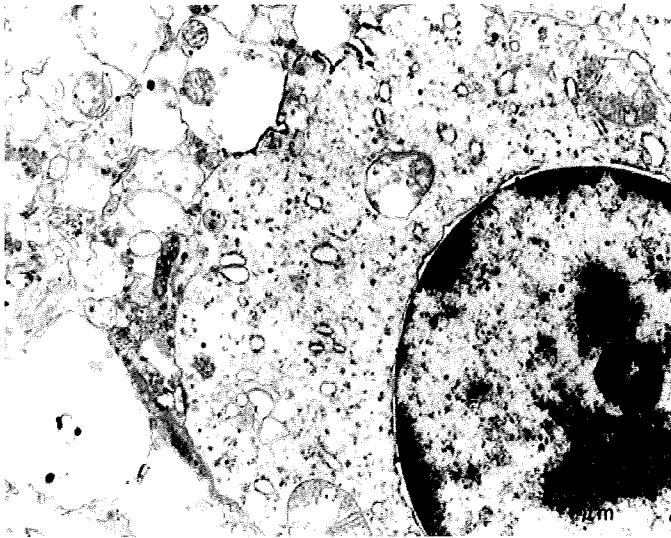


Fig. 2 CNT 投与直後 嗅球ラット 異常を認めない

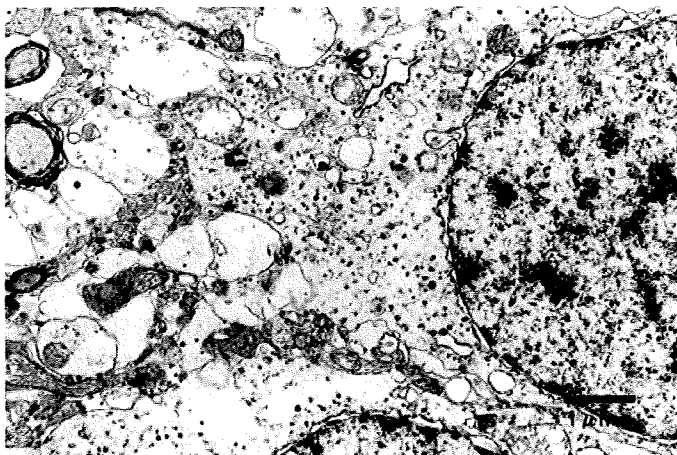


Fig. 3 CNT 投与直後 嗅球ラット 異常を認めない

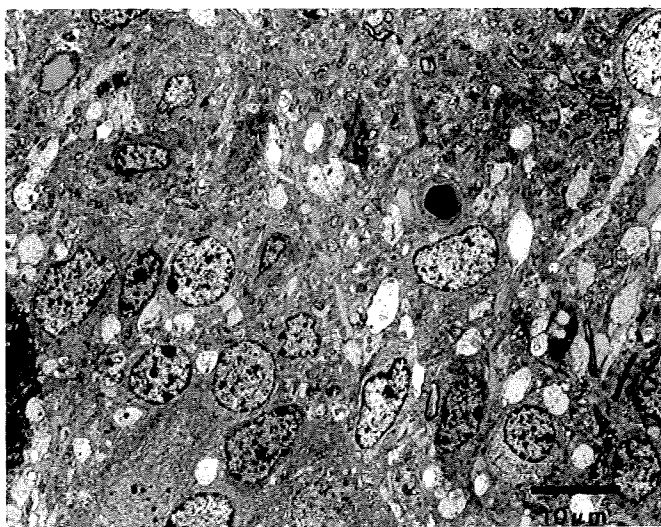


Fig.4 CNT投与後3日 嗅球ラット 異常を認めない

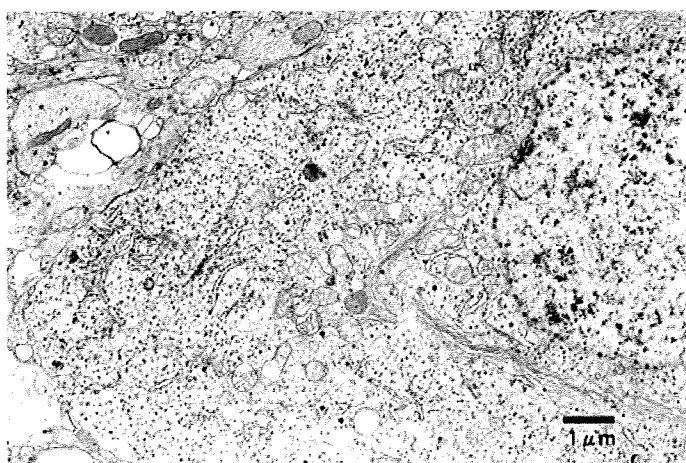


Fig.5 CNT投与後3日 嗅球ラット 異常を認めない

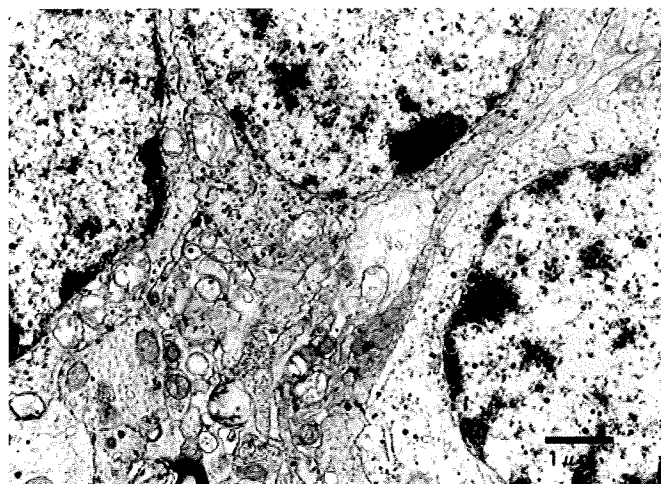


Fig.6 CNT投与後3日 嗅球ラット 異常を認めない

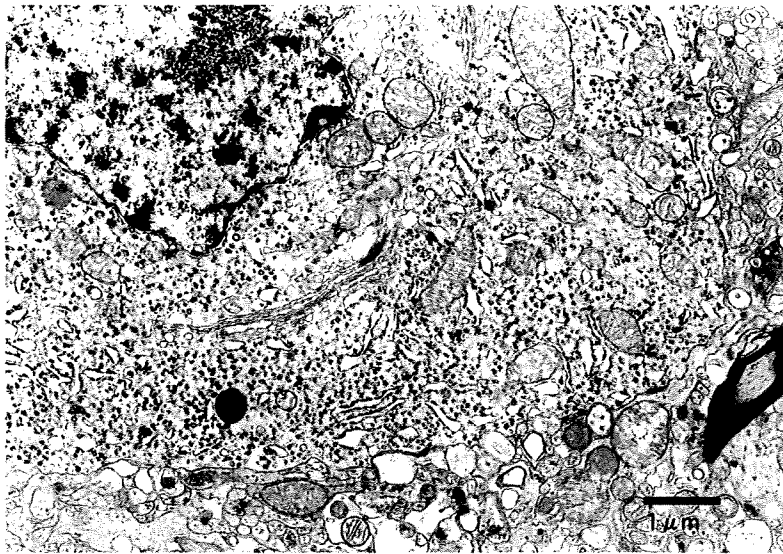


Fig.7 フラーレン 対照群 嗅球 ラット 異常を認めない

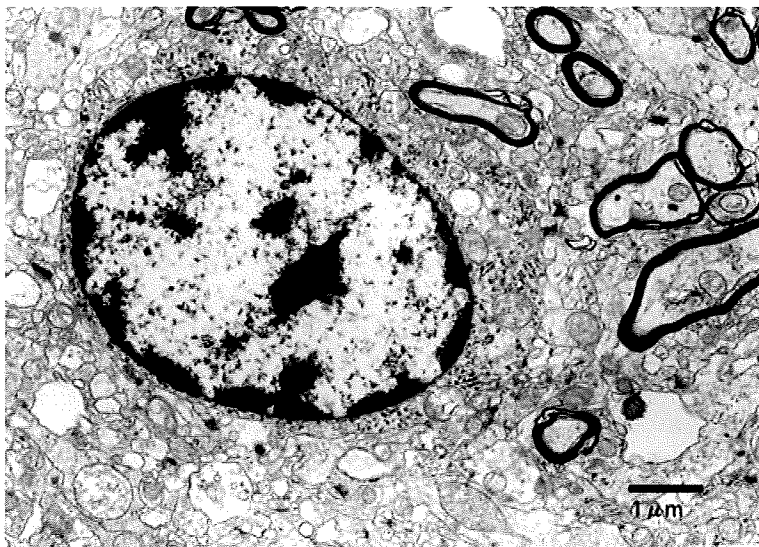


Fig.8 フラーレン 対照群 嗅球 ラット 異常を認めない

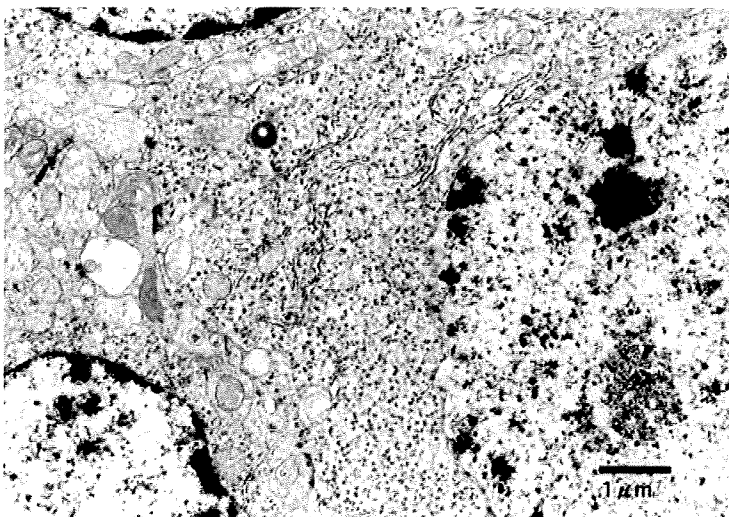


Fig.9 フラーレン 1mg/mL 群 投与後0日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

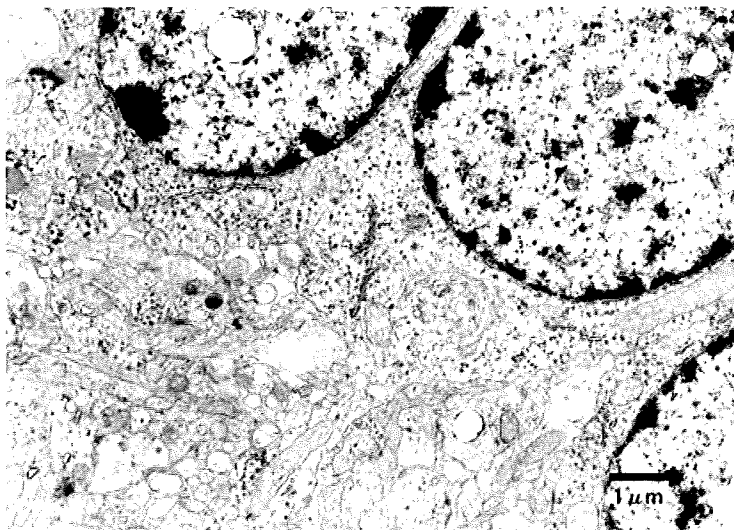


Fig.10 フラーレン 1mg/mL 群 投与後0日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

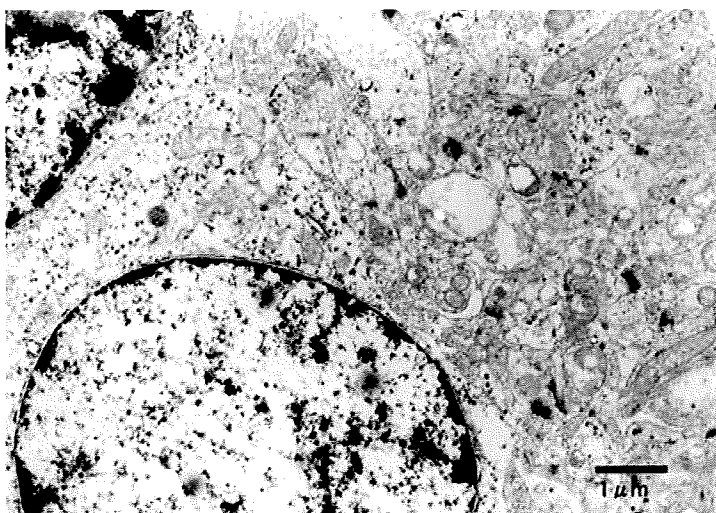


Fig.11 フラーレン 1mg/mL 群 投与後3日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

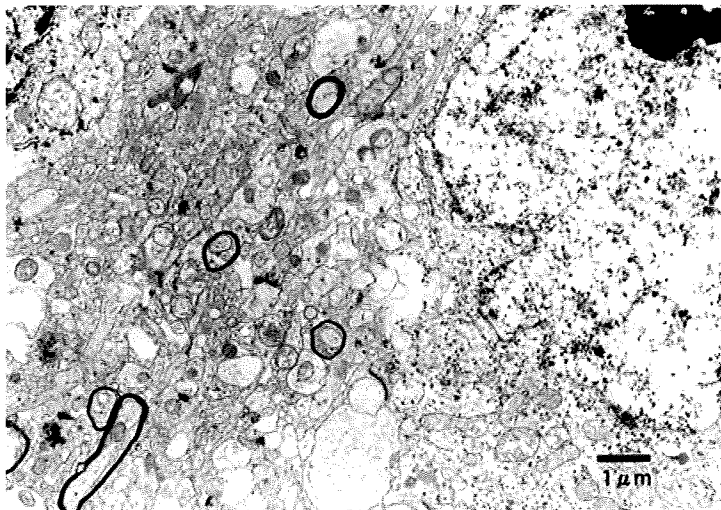


Fig.12 フラーレン 1mg/mL 群 投与後3日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

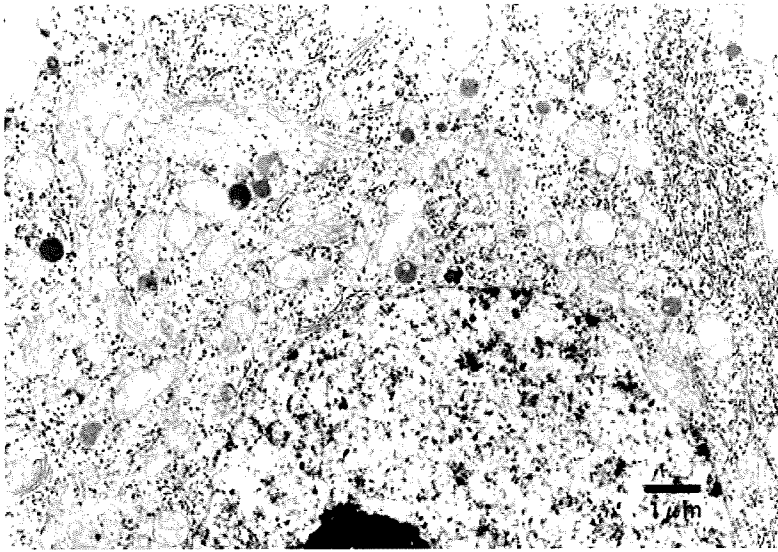


Fig.13 フラーレン 1mg/mL 群 投与後7日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

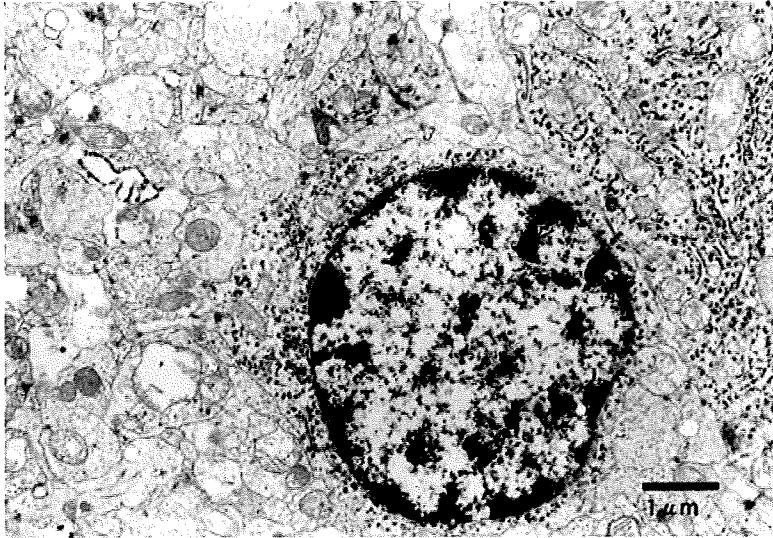


Fig.14 フラーレン 1mg/mL 群 投与後7日(投与直後) 嗅球 ラット 異常を認めない

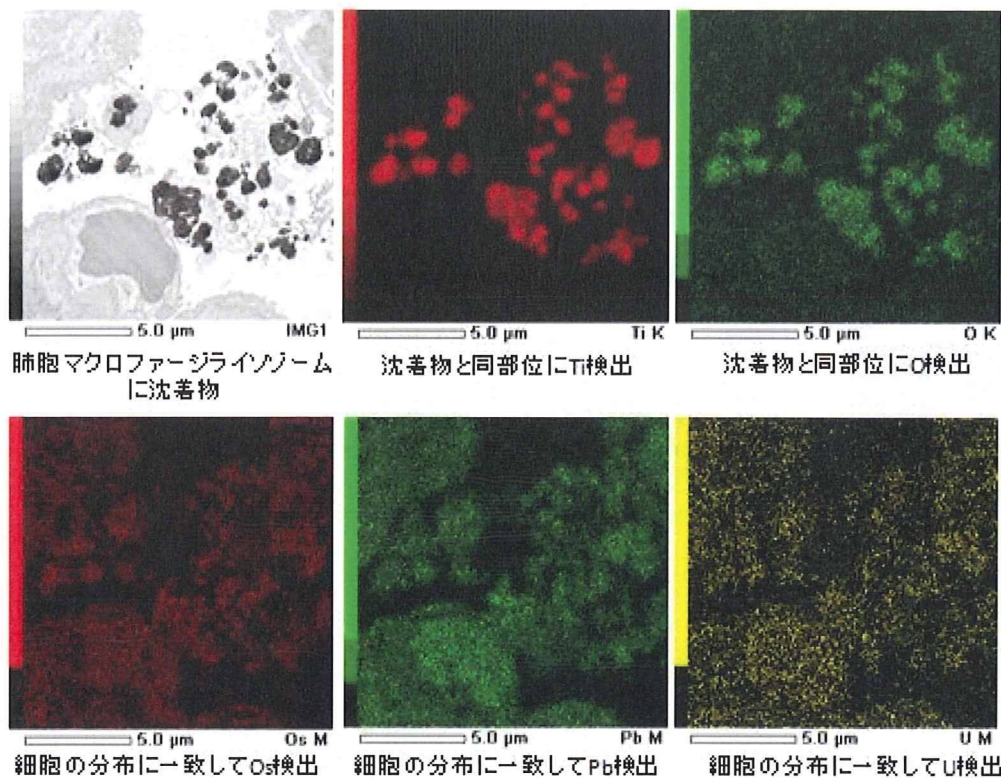
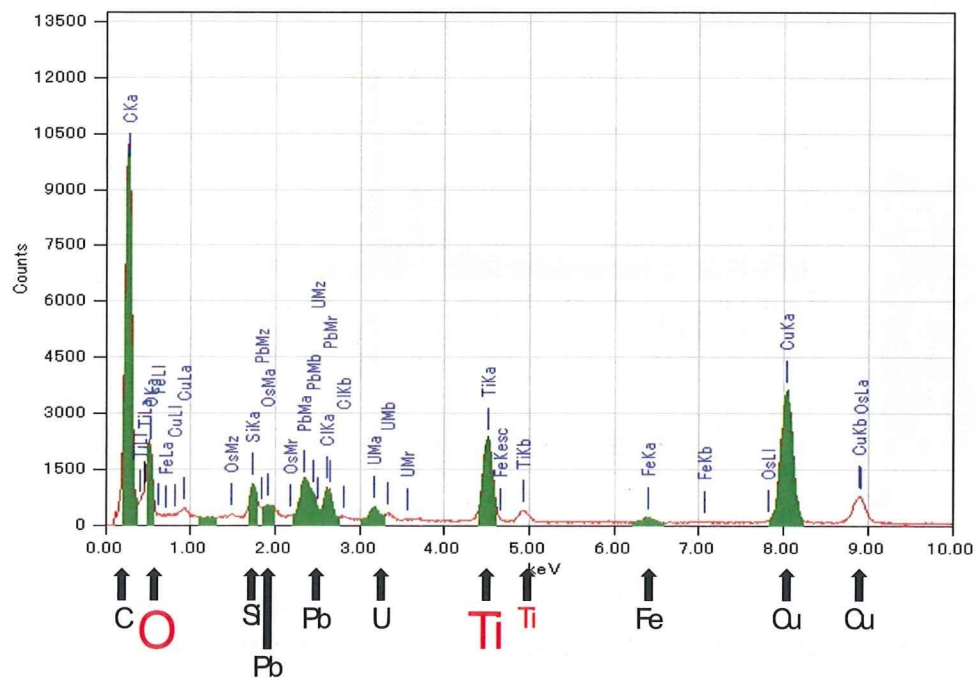


Fig.15 酸化チタン吸入暴露したラット肺の電顕写真およびEDS分析。電顕像で肺泡マクロファージのライソゾーム内に黒色沈着物と同部位に、チタン(Ti)および酸素(O)元素が認められる。染色に使用したオスミック酸(Os)、鉛(Pb)およびウラン(U)は、細胞が存在する部位に認められる。



検索視野全体の元素分析

Fig.16 写真 15 のEDS。写真 15 で認められた元素の他、シリカ(Si)、銅(Cu、電顕サンプルを載せたメッシュ)も検出された。

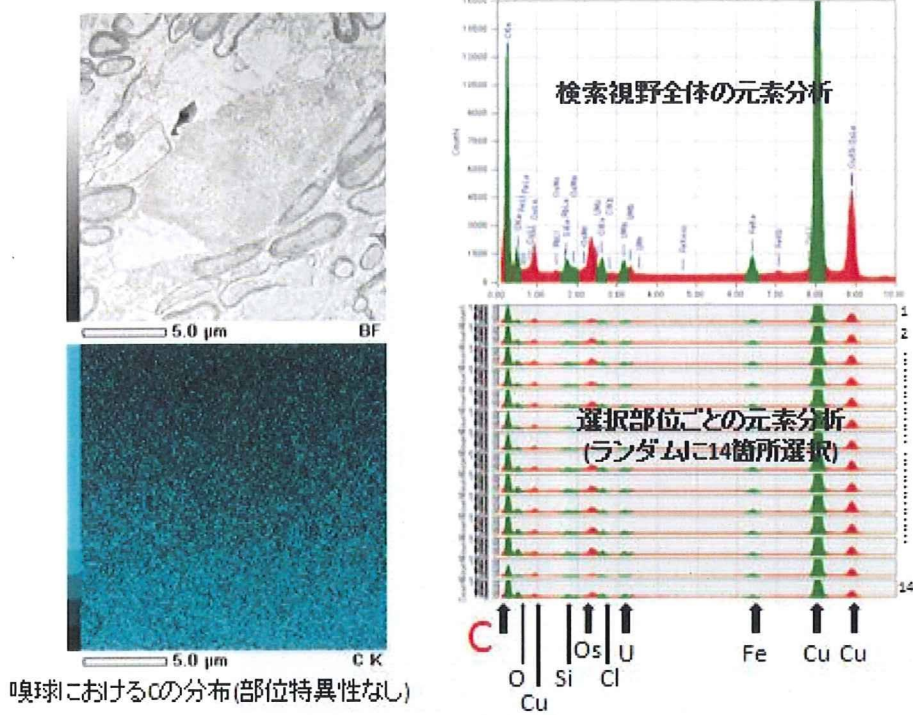


Fig.17 CNT 暴露ラット嗅球。電顕写真(左上)とEDSによる同部位の炭素分布(左下)。炭素は視野全体に分布していた。EDS 解析の結果、炭素の検出量が多いが(右上グラフ)、選択部位による分布量の違いも認められなかった(右下グラフ)ことから、部位特異的な分布はないと考えられた。

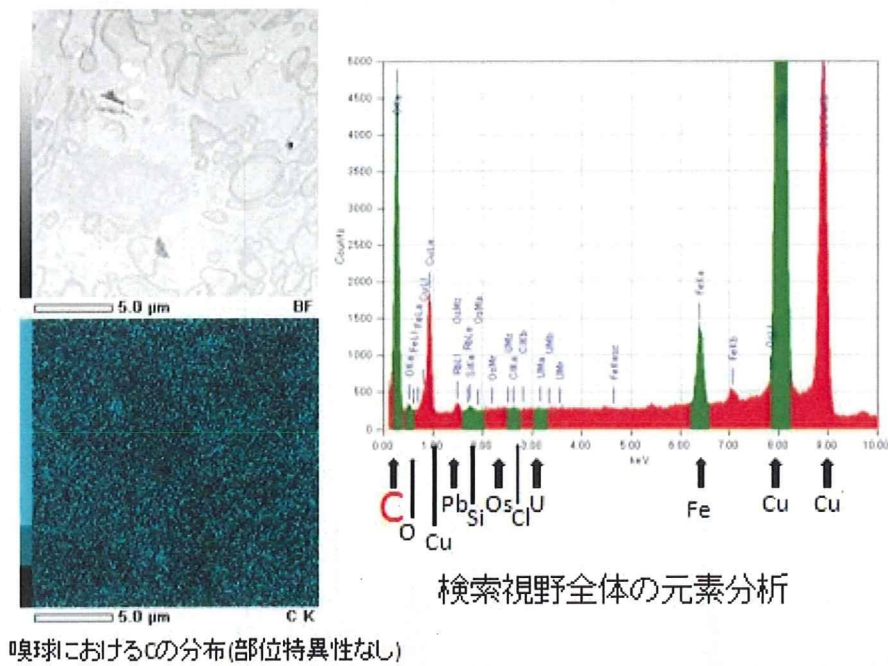


Fig.18 Fig.17 と異なる部位のCNT 暴露ラット嗅球。電顕写真(左上)とEDSによる同部位の炭素分布(左下)。炭素は視野全体に分布していた。EDS 解析の結果、炭素の検出量が多いが(右上グラフ)、選択部位による分布量の違いも認められないことから、Fig.17 と同様、部位特異的な分布はないと考えられた。

ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺の c-DNA マイクロアレイによる毒性評価に関する研究

分担研究者 小川幸男 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 毒性部 室長

協力研究者 高木篤也 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 毒性部 室長

研究要旨

本分担研究では、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、長野嘉介班員との共同で、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を単回経気道暴露後、1ヶ月と3ヶ月後の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析(Percellome 法)を行なった。その結果、炎症、酸化ストレス等に関与する遺伝子発現が増加することを確認した。また、ナノマテリアルの動物への短期吸入暴露実験を可能とすべく、ナノマテリアルダスト発生装置の開発を検討するとともに、この吸入暴露装置を環境中への検体の放出を防止する施設に、暴露チャンバーとともに設置するべく検討を行う。

A.研究目的

近年、ナノマテリアルの健康影響について懸念が高まっている。本研究ではナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、国立医薬品食品衛生研究所毒性部で開発した定量的なマイクロアレイ解析手法(Percellome 法)を用いて、肺を中心とした標的臓器の遺伝子発現に及ぼすナノマテリアルの影響について検討する。

マルチウォールカーボンナノチューブ(MWCNT)の気中への拡散法及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法を検討するとともに、これを用いて動物への暴露法を検討し、最終的には検討した方法を用いて暴露を行う。また、実験者への MWCNT 暴露のみならず室内及び外部環境への漏出を避ける方法を検討し、適切な方策を講じる。

B.研究方法

1. 遺伝子発現解析

前年度はマルチウォールカーボンナノチューブ(MWCNT)を単回経気道暴露(気管内投与)した動物について、経時的に肺を採取し、

定量的マイクロアレイ解析を行った。当研究班の長野嘉介班員の実施した実験より得られた臓器サンプルを使用した。すなわち、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を 40 または 160 μ g/animal の用量で単回気管内投与後、31 及び 90 日後に解剖を行い、肺のサンプリングを行った。また、粒子状物質による肺毒性の陽性対照として quartz を 160 μ g/animal の用量にて同様に投与した肺を用いた。臓器は遺伝子発現解析用に RNA 抽出用の溶液(RNAlater)に入れ凍結保存した。なお、マイクロアレイ解析用の1群の匹数は3匹とした。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、蛍光標識後、のべ 31,000 遺伝子の発現解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array とハイブリダイズを行った。さらに、遺伝子発現の定量的比較を正確に行うために、Percellome 手法(細胞1個当たりの mRNA 絶対値を得る遺伝子発現解析手法)を用いて解析を行った。

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

前年度に当研究班の西沢共司班員が担当し

た部分を引き継ぎ、発生器製作の検討を行うこととなった。すなわち、ナノマテリアルの気中への拡散法及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法を検討するとともに、それによって確立させた発生法を用いて暴露システムを設置し、動物に暴露することである。

MWCNT ダストの気中への拡散法は、西沢班員が湿式法及び乾式法について検討した。湿式法は、Tween20 溶液中に MWCNT を懸濁させ、超音波により攪拌した浮遊液をネブライザーでミストを発生させ、加熱乾燥させてダストにする方法である。乾式法は、粉体用超微量フィーダーを用いて MWCNT を供給し、水平振動型発塵装置によりダストを発生させる方法である。

MWCNT は静電気を帯びやすいといわれ、また MWCNT はその繊維が綿状に複雑に絡み合い、肺の深部まで到達する微細粉塵を作り出し供給することが難しく、また微細粉塵を作り出し得たとしても供給先のチャンバー内でその粒子の形状と濃度をモニターすることが困難という問題点がある。

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

MWCNT は石綿と同様の生体影響を引き起こすことが懸念されることから、完全に密閉され、外部への漏出を防ぐ構造を持った実験棟内に暴露機器を設置することで、実験者のみならず、周囲の環境への排出を防止する対策とした。また、ダストの発生、動物への暴露、暴露後の動物からのサンプル採取時など実験者への暴露防止策とともに、排気の処理や実験に使用したパイプ配管やチャンバーなどの器具器材に付着した検体の、実験後の清掃処理法が重要となる。本暴露装置は、完全密閉型実験棟内に設置する予定であるが、この棟は排気処理や入室者への暴露防止に工夫がなされているだけでなく、内部へ持ち込まれた器具器材は実験終了後一定の大きさの処理

箱内に密封、高温焼却施設に搬送焼却される。この焼却処理箱に入らない大きな物は、棟外への持ち出しが禁じられている。従って、MWCNT ダスト発生器及び暴露チャンバーなどは棟外へ搬出できない。パイプラインなど処理箱内に入れられる大きさに切断できれば焼却処理が可能であるが、暴露チャンバーについては搬出ができないため、次の実験に備えてチャンバー内部を無塵状態まで掃除する必要がある。そのためチャンバー内に樹脂などを用いてコーティングしておき、暴露に使用した後、この薄膜を剥離するなどによる清掃方を講じることで、チャンバー内の検体を除去することを検討する。

(倫理面への配慮)

吸入暴露及びマイクロアレイのデータ解析に使用した動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸動脈切開法など苦痛の少ない方法を用いること等、当該研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

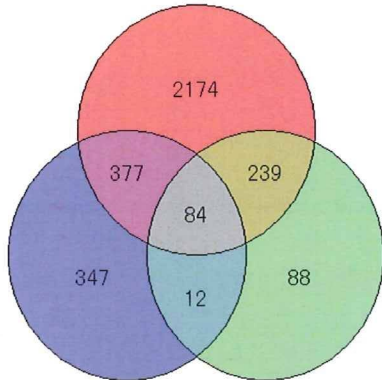
C,D.研究結果及び考察

1. 伝子発現解析

MWCNT を単回経気道暴露したラット肺のマイクロアレイ解析を実施した。有意($p < 0.01$)に増加した遺伝子数は1ヶ月目の MWCNT 40 μ g/animal 投与群(L群)では約800 遺伝子、MWCNT 160 μ g/animal 投与群(H群)では2900 遺伝子、Quartz 160 μ g/animal 投与群では400 遺伝子、3ヶ月目の MWCNT のL群では約200 遺伝子、MWCNT のH群では1500 遺伝子、Quartz 群では3000 遺伝子であった。一方、有意($p < 0.01$)に減少した遺伝子は、1M の Quartz 投与群で約200 遺伝子であり、その他の群及び3M ではないずれも40 遺伝子以下であった。単独あるいは重複して増加した遺伝子数のベン図を図1に示す。投与1ヶ月後ではMWCNT のH群で発現増加が多く、投与3ヶ月後では Quartz 群で増加遺伝子が多かった。ジーンオンロジー解析で増加遺伝

子の機能を調べたところ、transport に関連する遺伝子が各投与群とも多かった(data not shown)。

A)



B)

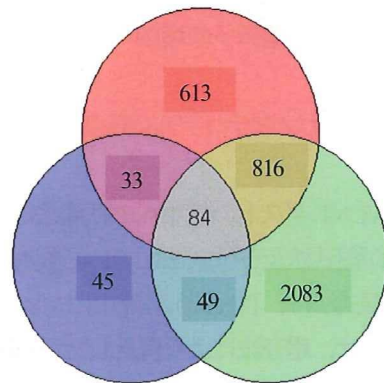


図1. ナノマテリアル投与ラット肺で有意に増加した遺伝子数のベン図

A) 1ヶ月後、B) 3ヶ月後

青: MWCNT (L 群)

赤: MWCNT (H 群)

緑: Quartz

次に、遺伝子発現プロファイルとして2種、すなわち1) MWCNT (L及びH群)とQuartzで共に増加する遺伝子、2) MWCNT (L及びH群)でのみ増加し、Quartz では増加しない遺伝子に分けて、パスウェイ解析ソフトIngenuity Pathway Analysisによるパスウェイ解析を行ったところ、1ヶ月目でMWCNT (L及びH群)とQuartzで共に増加する遺伝子では炎症に関連する補体系と急性応答期シグナリングが抽出され、MWCNT (L及びH群)

でのみ増加し、Quartz では増加しない遺伝子ではFc γ 受容体媒介マクロファージ及びモノサイトのファゴサイトーシスの系が抽出された。3ヶ月目のMWCNT (L及びH群)とQuartzで共に増加する遺伝子では炎症に関連するB細胞分化、抗原提示パスウェイの系が抽出され、MWCNT (L及びH群)でのみ増加し、Quartz では増加しない遺伝子では細胞周期の系が抽出された。次に、個別の遺伝子に着目するとオステオポンチン遺伝子が1ヶ月目のMWCNT群で顕著に増加していた(図2)。オステオポンチンはマクロファージやT細胞から分泌される蛋白で、また、肉芽で多く発現していることが知られている。組織所見でMWCNTのH群で肺の肉芽が1及び3ヶ月目で認められていることから、オステオポンチン増加と肉芽との関連性が示唆された。この他、炎症関連遺伝子としてケモカイン・サイトカインであるCcl2、補体のC1qa、B細胞や単球に発現するFcgr2b遺伝子の増加が認められた。

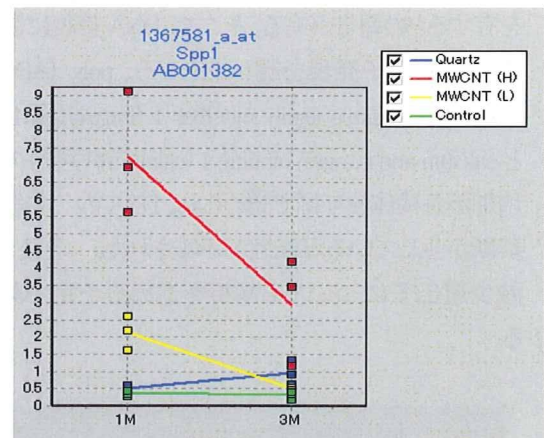


図2. オステオポンチン遺伝子の発現増加

* 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell) 以下同様

また、酸化ストレス反応遺伝子としてSOD2の増加が認められ(図3)、MWCNT及びQuartzの投与により、肺において酸化ストレスが増加していることが示唆された。その他の酸化ストレス反応遺伝子として、メタロチオネイン1aが各検体投与群で、メタロチオネイン3がMWCNTのH

群で増加した。

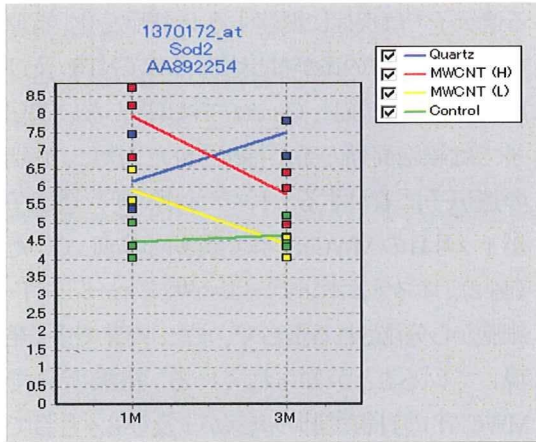


図3. SOD2 遺伝子の増加

その他の遺伝子として、組織の抗線維化に働く酵素のカテプシン K が各検体投与群で認められた。炎症、酸化ストレスとの関連は明らかではないが、MWCNT には遺伝子突然変異誘発作用を有するとの報告が有る。そこで、DNA 修復に関連する遺伝子発現を調べたところ、poly (ADP ribose) polymerase family member 1 (Parp1)(図4)と calcium and integrin binding 1 (calmyrin)(図5)の増加が各検体投与群で認められ、DNA の二本鎖切断が生じている可能性が示唆された。今後、減少遺伝子についても解析を進める予定である。

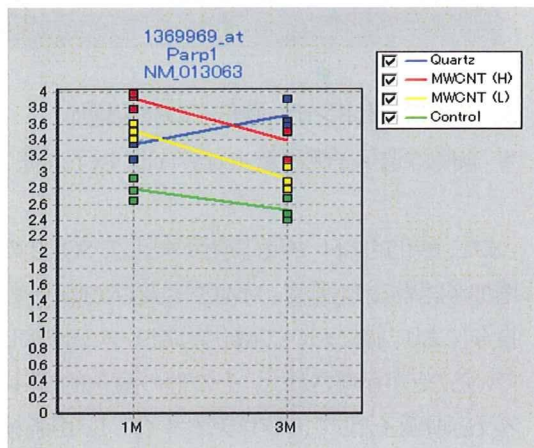


図4. Parp1 遺伝子の増加

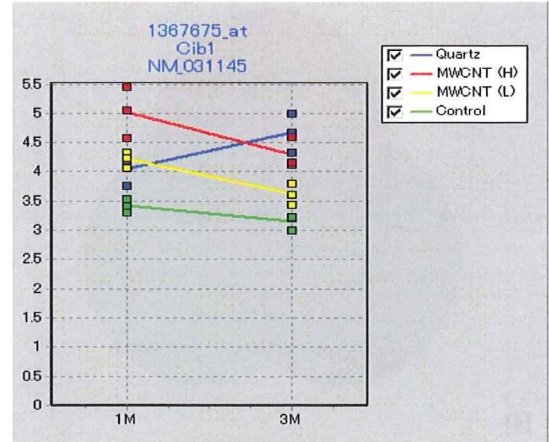


図5. Calmyrin 遺伝子の増加

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

MWCNT ダストの気中への拡散法は、西沢班員が湿式法及び乾式法について検討してきた。湿式法は、Tween20 溶液中にMWCNTを懸濁させ、超音波により攪拌した浮遊液をネブライザでミストを発生させ、加熱乾燥させてダストにする方法である。この方法はネブライザにより発生させたミストが配管内の下部へ逆流し、十分な量のミストが発生できず、また加熱乾燥させたダストには Tween20 の粒子が多く混在した。乾式法は、粉体用超微量フィーダーを用いてMWCNTを供給し、水平振動型発塵装置によりダストを発生させる方法である。最近、McKinney ら¹⁾(米国 NIOSH) および Fujitani ら²⁾(国立環境研究所)が MWCNT ダスト発生法を報告している。国立環境研究所で開発された Fujitani ら²⁾の方法は、垂直に振動する容器の中に MWCNT と鉄球を入れ鉄球の落下時の衝撃を用いてダストを発塵させる方法である(図6)。米国 NIOSH の McKinney ら¹⁾の方法は、ゴム膜上に載せた MWCNT の下にスピーカーを置き、その音振動を用いて跳ね上げ、ダストを発塵させる方法で

ある(図7)。両者が報告した方法は、濃度的にも一定の成果が得られており、これを取り入れることは、動物に暴露するという目的に到達する近道であると考えた。

鉄球の落下衝撃を用いる方法は、鉄球の衝突によりダストを発塵させるのであるが、一方でMWCNTに対しても鉄球の衝突による破壊作用が起こると思われ、動物へ暴露される形状が、実際に製造現場などで暴露される製造時のMWCNTとは異なった形状になる可能性が考えられる。また、鉄球との摩擦で鉄粉が発生しMWCNTと同時に暴露される可能性も排除できないと思われる。MWCNT以外の粒子の混在を疑われることなく形態的にも二次的変形が加わらず、 $12\text{mg}/\text{m}^3$ までの濃度が達成されている点で、スピーカー振動で跳ね上げる方式が優れていると思われた。

現在、McKinneyら¹⁾の方法による発生方法、すなわちゴム膜上に載せたMWCNTの下にスピーカーの音振動を用いて跳ね上げ、ダストを発塵させる方法での発生器の製作を行っており、完成後にその性能についてさらに検討を加える予定である。

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

MWCNTの実験者への暴露防止方法は、全身に防塵衣、露出した顔部分にはゴーグル及び高性能マスクを着用する。発生器及び暴露チャンバー内を常に陰圧とし室内への漏出を防ぎ、暴露後の動物の移動には、ケージを積載する下面に陰圧をかけることにより室内への飛散防止対策を施したカートを製作し使用する。臓器サンプルを採取する際には陰圧のドラフトチャンバー内で作業し、動物の被毛にアルコール溶液を噴霧することで検体の周囲への飛散と実験者への暴露を防止する。環境への汚染防止は、暴露チャンバーから出た排気に対しては、隣接するサイクロン集塵器、活性炭及びHEPAフィルター等を通して実験棟の排気処理装置へ排出し、そこで再び

活性炭及びHEPAフィルターを通過させる。実験者の暴露室からの退室時には、エアージャワー室で除塵、防塵衣、ゴーグル及び高性能マスクは焼却箱へ投棄し、焼却箱は完全密閉された後に専門の業者の手によって搬出され高温焼却される。暴露チャンバーは、内部に樹脂などでコーティングを施し、本検体の暴露試験終了時には、このコーティング剤を剥がし焼却することなどの方策を講じることで除塵を行えると考え、その素材や塗布方法を検討している。暴露チャンバー内の樹脂コーティングを施すには、動物の出し入れ口やのぞき窓など内部の凹凸構造をできるだけ平坦にする工程を必要とするため、チャンバーの改修作業の検討も進めている。

E. 結論

1. 伝子発現解析

ラット肺の遺伝子発現に及ぼすMWCNTの影響を分子レベルで明らかにするため、定量的マイクロアレイ解析実験を行い、炎症、酸化ストレスに関与する遺伝子の増加を認めた。また、DNA修復に関連する遺伝子の増加が認められたことから、DNA損傷も生じている可能性が示唆された。

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

スピーカー音振動を用いる発生器の性能が優れていると考えその製作を行っており、これを設置しその性能を検討するとともに、動物への暴露に向けた検討を行う。

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

実験者への暴露及び環境への漏出防止や、暴露装置とその周辺機器、暴露動物の取り扱い及び暴露装置の排気処理について、あらゆる方策を検討し、安全に計画を遂行できるように勤める。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

なし

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) Walter McKinney, et al., Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system, Inhalation Toxicology, 2009, 19, iFirst.
- 2) Yuji Fujitani, et al., Generation of Airborne Multi-walled Carbon Nanotubes for Inhalation Studies. Aerosol Science and Technology, 2009, 43: 881-890

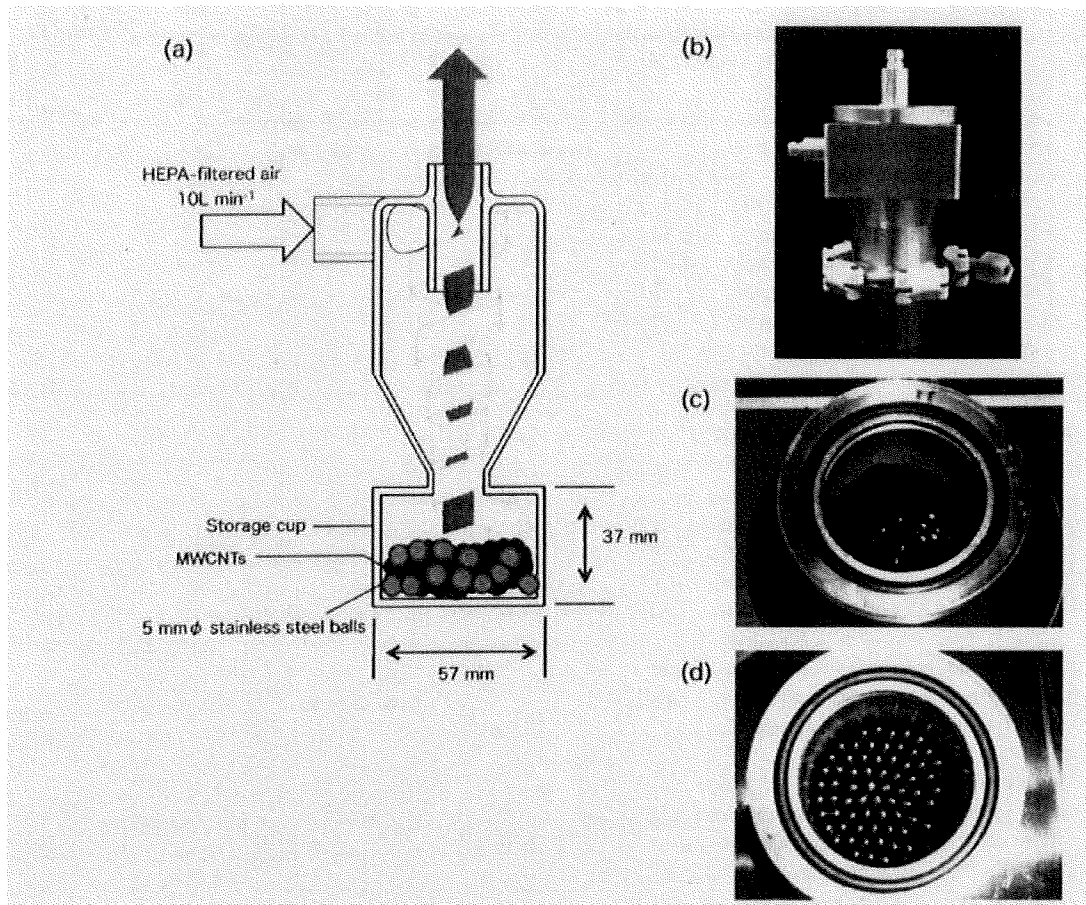


図6. Fujitani ら²⁾の開発した鉄球の上下振動を用いた発生器 (文献より転載)

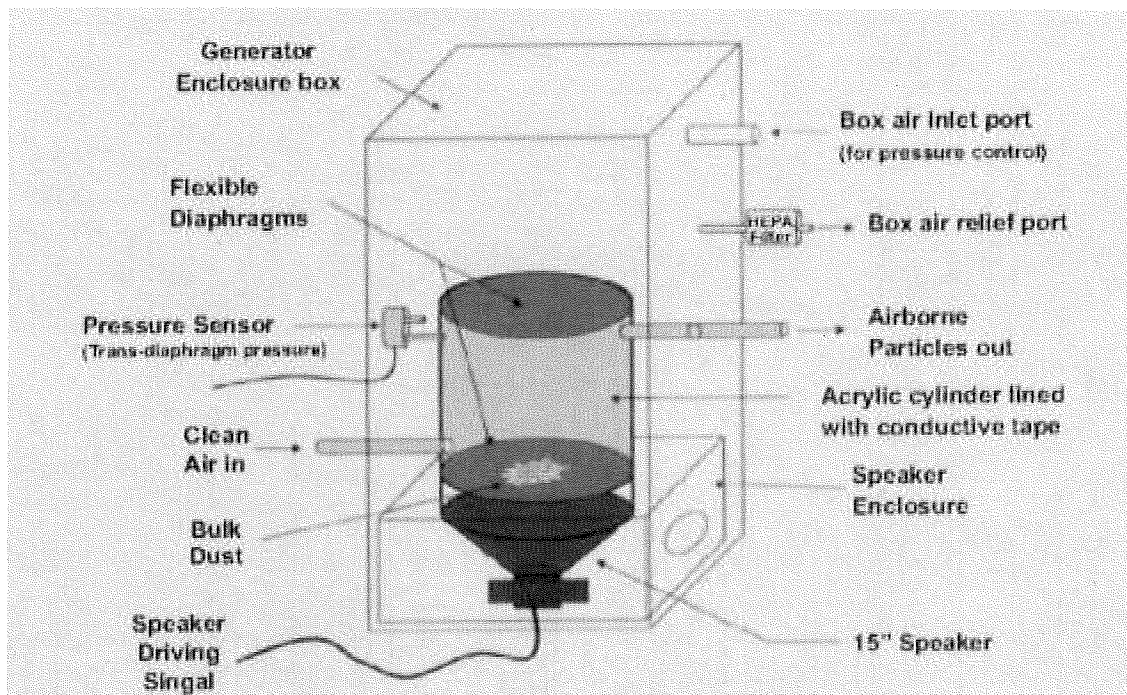


図7. McKinney ら¹⁾の開発したスピーカーによる音振動を用いた発生器 (文献より転載)

ナノマテリアルの経気道暴露による中期発がん試験法の開発に関する研究

研究分担者 長野嘉介 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 副所長

研究協力者 山崎一法 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長

鈴木正明 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長補佐

加納浩和 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長補佐

研究要旨

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験法について、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を用いて検討している。試験プロトコールは、実験動物として雌雄F344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを0.1%の濃度で飲水に混入して2週間投与し、2週間の休業期間の後、MWCNTを0、2.5、10および40 μ g/匹の用量で1回/2週、4回気管内投与する方法を選択した。

A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細な粒子であり空中に飛散しやすいため、ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品のヒトへの暴露経路として経気道的暴露が重要な位置をしめている。経気道的に暴露されたナノマテリアルは、気道、特に肺に沈着するため、肺に対する影響が問題になる。特に、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ため、長期暴露による肺や胸膜への発がん性が懸念されている。従来の動物実験で化学物質の発がん性の有無を調べるためには、動物の寿命に相当する長期間にわたり化学物質を動物に投与することが必要であった。ナノマテリアルは多くの種類があり、されに用途や製法により形状や不純物が異なる製品が多数存在している。ナノマテリアルの生体影響は、その形状や不純物などの物理化学的性質が関与していると考えられており、個々のナノマテリアルで発がん性が異なることが予測

される。従来行われてきた長期発がん性試験では、多数の動物、莫大な費用、期間がかかるため、個々のナノマテリアルについて長期試験を実施することは不可能である。このため、より短期間で多くの物質の発がん性を推定できるスクリーニング手法を開発することが必要である。化学物質の発がん性を推測するスクリーニング手法としては、微生物や培養細胞を用いた短期スクリーニング手法がある。しかし、標的臓器を考慮してナノマテリアルの発がん性を検出するためには、ほ乳動物を用い、腫瘍の発生をエンドポイントとしたスクリーニング手法、すなわち、ナノマテリアルの経気道投による肺や中皮を標的とした中期発がん性試験法を開発する必要がある。

21年度は、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験

に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて、文献等の情報を基に検討した。肺を標的とした中期発がん試験は、ラットを使用した試験系としてはイニシエーターとして N-bis (2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) や diethylnitrosamine (DEN) を使用した中期発がん試験の報告がある (Noronha と Goodall,1983、Beems,1984、Moorら,1986,1988、Hasegawaら,1990、加藤ら,1998)。マウスを使用した中期発がん試験については、イニシエーターとして 3-methylcholanthrene (3-MC)、ウレタン、4-nitroquinoline 1-oxide (4-NQO)、7,12-dimethylbenz[α]anthracene (DMBA) 等を使用した報告がある (Henryら,1981、Lindenschmidtら,1986、Inayama、1986、PashkoとSchwartz,1996、五十嵐ら,2006)。ハムスターを使用した中期発がん試験は、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine (BOP) 等をイニシエーターとして用いた試験の報告がある (Nishikawaら,1983))。また、遺伝子改変動物にイニシエーション処理を行い、より短期間に発がん性を調べる試みが報告されている (田村ら,2000、安原ら,2001、高橋ら,2002、五十嵐ら,2007、大島ら,2008)。これらの文献から、ラットを使用した中期発がん試験では、雌雄 F344系ラットを使用し、イニシエーション処理として DHPN を腹腔内、あるいは飲水に混入して投与し、その後、ナノマテリアルを経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。また、マウスを使用した中期発がん試験では、A/J系マウスを使用し、イニシエーション処理としてウレタンを腹腔内投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と結論された。

B. 研究方法

本年度は、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を材料として、肺を標的とした経気道投与による中期発がん試験法について検討した。試験法は、MWCNTは非遺伝毒性物質と考えられているため、既知の発がん物質 (イニシエーター) を投与し、その発がんへの修飾作用を検出する方法を基本とし、1) 中期発がん試験に使用する動物、2) イニシエーション処理の方法、3) 被験物質である MWCNT の投与方法、4) 発がん性の検出方法、5) 陽性対照群について、検討した。

C. 研究結果

C-1 中期発がん試験に使用する動物

中期発がん性試験に使用されている動物腫は、ラット、マウスおよびハムスターである。これらの動物腫の中で、MWCNT 中期発がん性試験 T の経気道投与による量反応関係が把握されている F344系ラットを選択した (Aisoら,2010)。また、動物の週齢は、気管内投与が容易になる週齢が約 12週齢であるため、イニシエーション処理の期間 2週間と休薬期間 2週間を差し引いて、8週齢かイニシエーション処理を開始することとした。

C-2 イニシエーション処理の方法

肺を標的臓器とした中期発がん性試験のイニシエーターは、ラットを用いた試験系では DHPN (Beems,1984、Moorら,1986、1988、Hasegawaら,1990、加藤ら,1998) や DEN (Noronha と Goodall,1983) を使用した中期発がん試験の報告がある。DENによるイニシエーションは、肺腫瘍の発生率は 24% であるのに対し、腎臓 (20%) と肝臓 (24%) にも同程度に腫瘍の誘発がある (Noronha と Goodall,1983)。これに対し、DHPNによるイニシエーションでは、肺の腺腫とがんの発生率はそれぞれ 100% と 45% であるのに対し、肺以外の臓器への腫瘍の

誘発は甲状腺（25%）、腎臓（10%）であり（Hasegawaら,1990）、肺への特異性がDENに比較して高い。このため、イニシエーターとしてDHPNを選択した。

DHPNのイニシエーション処理の方法としては、1）腹腔内投与（2週間おきに1000 mg/kg の用量で1回と250 mg/kg の用量で3回、または、1週間おきに1000 mg/kg の用量で2回）（Moorら,1986, 1988）、2）飲水投与（0.1%の濃度で2週間投与）（Hasegawaら,1990）、3）4-methylthiobenzamideを1回腹腔内投与とDHPNの飲水投与の併用（Beems,1984、加藤ら,1998）が報告されている。これらの方法の中で、0.1%の濃度で2週間飲水投与する方法が他の臓器の腫瘍誘発が少なく肺への特異性が高いため、DHPNのイニシエーション処理の方法として採用した。また、イニシエーション処理後、被験物質の投与開始まで2週間の休薬期間をおく。

C-3 MWCNTの投与方法

被験物質であるMWCNTの投与方法については、Aisoら（2010）の報告を参考とした。Aisoら（2010）は、MWCNTを160と40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で1回気管内投与し、投与91日後まで観察した。その結果、160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ も用量では肺に微小肉芽や線維化の発生が認められ。また、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量でも肺に軽度な線維化の発生があることを報告している。従って、被験物質であるMWCNTの中期発がん性試験における最高用量は、肺に明らかな変化が起きる用量である160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を選択した。ただし、中期発がん性試験では被験物質の作用が持続的になるように、2週間に1回、4回に分割して投与する方法とした。160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 以下の用量については、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ でも軽度な線維化が起きることが推定できるため、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ より低い用量での試験が必要と考えられる。従って、MWCNTの肺を標的とした中期発がん性試験の用量は、40 $\mu\text{g}/\text{匹}/$

回、2週間に1回の割合で4回投与、計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。中間用量は、10 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ 、2週間に1回の割合で4回投与、計40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。最低用量は、2.5 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ 、2週間に1回の割合で4回投与、計10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。

C-4 発がん性の検出方法

発がん性の検出方法としては、Moorら（1986）やHasegawaら（1990）は、肺腫瘍の発生について発生動物数と腫瘍および前腫瘍性変化の発生個数を、解剖時の肉眼的観察と病理組織学的検査によって検索する方法を用いている。本研究でもこれらの検出方法を基本として選択した。

C-5 陽性対照群

肺を標的とした中期発がん性試験の陽性対照物質は、現在のところ標準的なプロモーターが確立されていない。そこで、今回の研究では、MWCNTと形状が類似し、かつ、発がん性を有するクロシドライトを陽性対照物質として選択した。投与方法はMWCNTと同様に、40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ の用量を、2週間に1回の割合で4回気管内投与、計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。

D. 考察

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験法について、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を用いて検討した。その結果、下記の試験系を採用した。

使用する動物は、F344系ラットとし、イニシエーション処理開始時の週齢を8週齢とする。イニシエーション処理の方法は、イニシエーターとしてDHPNを用い、飲水に0.1%の濃度で混ぜ2週間投与する。2週間の休薬期間の後、被験物質の投与を開始する。被験物質であるMWCNTの投与方法は、気管内投与とし、最高用量は、

40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を2週間に1回の割合で4回投与、計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、中間用量は、10 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を2週間に1回の割合で4回投与、計40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、最低用量は、2.5 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を2週間に1回の割合で4回投与、計10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。また、陽性対照群としてクロシドライトを投与する群を設けた。従って、試験群の構成は、1) DHPN処理+MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$)、1) DHPN処理+MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$)、2) DHPN処理+MWCNT 10 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計40 $\mu\text{g}/\text{匹}$)、3) DHPN処理+MWCNT 2.5 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計10 $\mu\text{g}/\text{匹}$)、4) DHPN処理+MWCNT 0 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 、5) DHPN処理+クロシドライト 40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$) (陽性対照群)とした。また、陰性対照群として、1) DHPN処理をせずMWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ を4回投与(計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$)する群、および、DHPN処理、MWCNTともしない群を設けた。被験物質の投与終了後、約18週間後に動物を解剖し、肉眼観察と病理検査により、肺腫瘍の発生について発生動物数と腫瘍および前腫瘍性変化の発生個数を検索することにより、被験物質の投与によるDHPN誘発肺腫瘍への促進作用の有無を判定する方法が、ナノマテリアルの経気道投与による肺を標的とした中期発がん性試験に最も適した方法であると考えた。

E. 結論

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて検討した。その結果、試験プロトコールは、実験動物としてF344系ラットを使用し、イ

ニシエーション処理としてDHPNを0.1%の濃度で飲水に混入して2週間投与し、2週間の休薬期間の後、MWCNTを0、2.5、10および40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で1回/2週、4回気管内投与する方法を選択した。

参考文献

- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U. et al. (2010). *Industrial Health*, In press.
- Beems, R.B. (1984). *Carcinogenesis* 5, 1057-1060.
- Birt, D.F., Pour, P.M. (1983). *JNCI* 70, 1135-1138.
- Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., et al. (1990). *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 871-877.
- Henly, C.J., Billups, L.H., Avery, M.D. (1981). *Cancer Res.* 41, 5027-5032.
- Inayama, Y. (1986). *Jpn. J. Cancer Res.* 77, 345-350.
- Moor, A.K., Thamavit, W., Tsuda, H., et al. (1986). *Carcinogenesis* 7, 311-316.
- Moor, A.K., Weber, E., Thornton, M., et al. (1988). *Carcinogenesis* 9, 1507-1509.
- Noronha, R.F.X., Goodwall, C.M. (1983). *Carcinogenesis* 4, 613-616.
- Pashko, L.L., Schwartz, A.G. (1996). *Carcinogenesis* 17, 209-212.
- 大嶋浩, 深町勝己, アレキサンダー デビット(2008). 第24回日本毒性病理学会.
- 加藤浩司, 今井田克己, 山口剛他(1998). 第14回日本毒性病理学会.
- 五十嵐麻希, 吉田緑, 高橋正一他(2006). 第22回日本毒性病理学会.
- 五十嵐麻希, 吉田緑, 渡邊学他(2007). 第23回日本毒性病理学会.
- 高橋明子, 三森国敏, 安原加壽雄他(2002). 第18回日本毒性病理学会.

田村啓, 三森国敏, 安原加壽雄他(2000). 第16回日本毒性病理学会.

安原加壽雄, 三森国敏, 糀谷高敏他(2001). 第17回日本毒性病理学会.

F. 健康危機情報
なし

G. 研究発表

○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*, 2010, In press

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

Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S: Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. *Food and Chemical Toxicology*, 2009, 47: 2776-2784.

○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, 2010, In press

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kano, H., Umeda, Y., Matsumoto, M., Asakura, M., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S: Oral carcinogenicity and toxicity of 2-amino-4-chlorophenol in rats. *Journal of Occupational Health*, 2009, 51: 249-260.

2. 学会発表

○浅倉眞澄、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の培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会

○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リンパ節への移行と病理組織変化、2010年、第83回日本産業衛生学会

○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、2010年2月、第26回日本毒性病理学会

高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344ラットにみられた悪性エナメル上皮腫の1例、2010年2月、第26回日本毒性病理学会

○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：多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の単回気管内投与によ