

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、2009 年 5 月、第 82 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、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、2009 年 5 月、第 82 回日本産業衛生学
会

山崎一法、加納浩和、梅田ゆみ、松本道治、
妹尾英樹、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭
治：2-アミノ-4-クロロフェノールのラット
及びマウスへの経口投与による発がん性と
慢性毒性、2009 年 5 月、第 82 回日本産業
衛生学会

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

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

分担研究者 浅倉眞澄 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 鷹屋光俊 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 上席研究員

杉山淑江 日本バイオアッセイ研究センター

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分散方法の検討、②細胞への取り込みの検討、③遺伝毒性試験を実施した。その結果、以下の知見を得た。①DLS 測定および SEM 観察により昨年度の分散条件が適切であったことが証明された。②MWCNT は細胞内に取り込まれていて、培養細胞による細胞毒性試験、遺伝毒性試験での評価が正当であることを証明した。③遺伝毒性試験の結果、染色体の数的異常および多核細胞の誘発が認められた。この結果より、細胞内に取り込まれた MWCNT による、細胞分裂時に何らかの阻害作用をしていることが示唆された。

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、昨年度に続き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、適正な細胞種の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、昨年度の結果を受けて、チャイニーズハムスター肺由来の細胞株(CHL/IU)を使用した。培養液は、イーグル MEM+10% 仔牛血清を使用した。

B-2. 分散性の検討

MWCNT は水に溶けず、超微粒子であるため、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。

昨年度に細胞毒性を指標として求めた MWCNT の培養液への分散条件について、今年度は動的光散乱(DLS)による粒度分布および走査型電子顕微鏡(SEM)を用いて検討した。

溶媒検討には、昨年度に続き以下の 4

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)、培養液に添加した。MWCNT の懸濁液は、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 3 分間分散処理を行い、培養液で調製し、直後に DLS 測定 (ZetaSizer Nano, Malvern 社)を行った。また、懸濁液をフィルター(ポリカーボネート製アイソポアメンブレンフィルター、0.8 μ m、ミリポア社)上に滴下(200 μ l)して、吸引ろ過後乾燥させ、Pt コートして SEM(日立 : FE-SEM、SU-8000 型)観察を行った。

B-3. 細胞内への取り込みの検討

60mm ポリエチレンシャーレに 1×10^5 個の細胞を播種し 24 時間培養した。DMSO/培養液+超音波ホモジナイザーで分散した MWCNT を細胞に 2 日間処理後、細胞への取り込みを観察した。①光学顕微鏡観察 : 2 日間処理後、メタノールで 5 分間固定後、3%ギムザ液で 15 分間染色し、光学顕微鏡で観察した。②SEM 観察 : 2 日間処理後、1%グルタルアルデヒドで固定し、段階的に 100%エタノールに置換後、t-ブタノールに置き換えて、凍結乾燥した。Pt コート後に SEM により観察した。

B-4. 小核試験

小核試験は、35mm ポリエチレンシャーレに 1.2×10^4 個の細胞を播種し、24 時間培養後に MWCNT を 2 日間処理した。2 日間培養後にシャーレを 10%ホルマリンで固定した。シャーレの立ち上がり部分をカットした後、アクリジンオレンジ/DAPI で染色し、蛍光顕微鏡(300 倍)を用い、小核を持つ細胞、2 核または 3 核以上(多核)を持つ細胞、分裂細胞を観察した。各用量、2 枚のシャーレを用いて試験を実施し、同時に 2 枚のシャーレで細胞増殖率を測定した。

B-5. 染色体異常試験

染色体異常試験は、60mm ポリエチレンシャーレに 1×10^5 個の細胞を播種し 24 時間培養後 MWCNT を 2 日間処理した。2 日間培養後に染色体標本を作製し、ギムザ染色後、顕微鏡(600 倍)を用いて染色体の観察を行った。染色体の構造異常および数的異常(倍数体)の観察を行った。各用量、2 枚のシャーレを用いて試験を実施し、同時に 2 枚のシャーレで細胞増殖率を測定した。

B-6. 遺伝子突然変異試験

遺伝子突然変異試験は、*hgp_rt* 遺伝子座の突然変異を 6-チオグアニン(6-TG)耐性を指標として観察した。90mm ポリエチレンシャーレに 3×10^5 個の細胞を播種し、24 時間培養後 MWCNT を 2 日間処理した。2 日間培養後に再播種を行い、6 日間培養(発現時間)した後、60mm シャーレに 4×10^4 個の細胞を播種(各用量 20 枚)し、6-TG を添加して 9 日間培養した。その後、

エタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色し、生成した変異コロニー数を観察した。

C. 研究結果

C-1. 分散性の検討

各溶媒を用いた MWCNT 懸濁液の DLS 粒度分布測定の結果を図 1 に示した。MWCNT の分散性は、DMSO/培養液 < 培養液 < CMC(1% 水溶液) < Tween80 (0.1mg/ml 水溶液)の順となった。この結果は、昨年度実施した細胞毒性の順と比較的良く一致していた。

SEM 観察の結果を図 2 に示した。SEM 像から、MWCNT の繊維が一本一本バラバラになっていることを確認した。

これらの結果および昨年度の細胞毒性試験の結果から、以降の培養細胞への処理は、DMSO/培養液 + 超音波処理(3 分)で実施した。

C-2. 細胞内への取り込みの検討

光学顕微鏡による細胞像を図 3 に示した。細胞内に MWCNT が取り込まれているのが観察できる。また、2 核および多核(矢印)を持つ細胞が観察できる。また、二つの細胞にまたがった形で存在する MWCNT(矢頭)が観察できる。

SEM による細胞像を図 4 に示した(図左上に拡大図を示す)。MWCNT 繊維が細胞内に入っているのが観察できる。繊維は完全には細胞内に入らず、一部外に出ている。また、短い繊維は、完全に細胞内に取り込まれているものも観察できる。

C-3. 小核試験

小核試験の結果を表 1 に示した。全ての処理群において小核出現頻度は、対照群に対して有意な上昇を示さなかった。しかし、傾向検定では、用量に依存した小核出現頻度の上昇傾向を示した。一方、2 核を持つ細胞および多核(3 核以上)を持つ細胞の出現頻度は、対照群に対して有意な上昇を示し、かつ、用量に依存して増加していた。

C-4. 染色体異常試験

染色体異常試験の結果を表 2 に示した。24 時間処理、48 時間処理ともに数的異常(倍数体)を持つ細胞の出現率が有意な上昇を示し、かつ、用量に依存して増加した。一方、構造異常を持つ細胞の出現率は上昇せず、用量に依存した増加傾向も示さなかった。

C-5. 遺伝子突然変異試験

hgp_rt 遺伝子突然変異試験の結果を表 3 に示した。陰性対照に対して、処理群の変異率は 2 倍以上を示すことはなく、明瞭な増加が観察されなかった。一方、細胞毒性の指標である細胞生存率は 21%まで低下していて、十分毒性の出現する用量まで試験が実施された。また、陽性対照として処理したメタンスルホン酸エチルは、対照群に対して、約 100 倍の突然変異率を示していた。

D. 考察

分散性の検討

昨年度、培養細胞を用いる細胞毒性の結果から、MWCNT の分散条件として、DMSO/培養液+超音波処理(3 分)を設定

した。今年度の DLS による粒度分布測定および SEM 観察による分散状況から上記条件で分散が十分に行われていることが裏付けられた。また、DLS による粒度分布測定の結果から、MWCNT の分散状況と細胞毒性が相関していることを確認した。この結果から、以降の実験では、上記の分散条件を適用した。

細胞内への取り込みの検討

MWCNT の *in vitro* 系での細胞毒性および遺伝毒性の評価に当たり、細胞への MWCNT の取り込みの確認は不可欠な問題である。明視野顕微鏡および SEM を用いた観察により、MWCNT は細胞内に取り込まれていることが確認された。また、上記分散条件により、一本一本ばらばらになった MWCNT が、細胞内に取り込まれていることが確認できた。培養細胞を用いる細胞毒性および遺伝毒性は、細胞内に取り込まれた MWCNT により引き起された結果と考えられる。

遺伝毒性試験

今回実施した遺伝毒性の結果を整理すると、以下の陰性反応が観察された：①小核は誘発しない。②染色体構造異常は誘発しない。③遺伝子突然変異は誘発しない。この結果から、MWCNT は、細胞 DNA に直接作用する物質ではないことが推測される。

また、以下の陽性反応が観察された：①染色体の数的異常(倍数体)を誘発した。②2 核を含む多核細胞を誘発した。この結果から、MWCNT は、細胞分裂時に何らかの作用をする物質であることが推測さ

れる。倍数体の誘発からは、スピンドル作用の阻害およびその他の分裂阻害が推測される。また、多核細胞の誘発から、核の分裂は進行しているが、細胞質の分裂を阻害するような働きを MWCNT が行っていることが推測される。

なお、小核試験において、小核を持つ細胞の出現率に上昇傾向が認められたのは、分裂の異常により誘発される異数化によるものと考えられる。今後、異数性の誘発についても観察を行うことが必要と考えられる。

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。具体的には、MWCNT を用い、①分散方法の検討、②細胞への取り込みの検討、③遺伝毒性試験(小核試験、染色体異常試験、遺伝子突然変異試験)を実施した。

その結果、以下の知見を得た。①DLS 測定および SEM 観察により昨年度の分散条件が適切であったことが証明された。②MWCNT は細胞内に取り込まれていて、培養細胞による細胞毒性試験、遺伝毒性試験での評価が正当であることを証明した。③遺伝毒性試験の結果、染色体の数的異常および多核細胞の誘発が認められた。この結果より、細胞内に取り込まれた MWCNT による、細胞分裂時に何らかの阻害作用をしていることが示唆された。

今後、上記知見を基に、BALB/c3T3 細胞によるトランスフォーメーション試験および、繊維サイズを変えた MWCNT に

よる細胞毒性および遺伝毒性試験を実施することにより、MWCNT の遺伝毒性およびがん原性の評価を試みる予定である。

F. 研究発表

1. 論文発表

Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Arito, H., Fukushima, S. and Matsushima, T.: An improved system for exposure of cultured mammalian cells to gaseous compounds in the chromosomal aberration assay, *Mutation Res.*, 2008, 652:122-130.

Nakagawa, K., Hidaka, T., Kitano, M., Asakura, M., Kamigaito, T., Noguchi, T. and Hosoe, K.: Genotoxicity studies on licorice flavonoid oil (LFO), *Food and Chemical Toxicology*, 2008, 46: 2525-2532.

Tanaka, N., Sasaki, K., Hayashi, K., Sakai, A., Asada, S., Muramatsu, D., Kuroda, S., Mizuhashi, F., Nagai, M., Suzuki, H., Imamura, T., Asakura, M., Satoh, H., Sakamoto, A., Nakao, R., Hirose, H., Ishii, N. and Umeda, M.: An Interlaboratory collaborative study on a cell transformation assay using Bhas 42 cells, *AATEX*, 2009, 14: 831-848.

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

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

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.

2. 学会発表

浅倉真澄、杉山淑江、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治、アスベストによる細胞形質転換と倍数性誘発、第38回日本環境変異原学会(2009年11月、静岡)

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5月、福岡)

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、沖縄)

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。

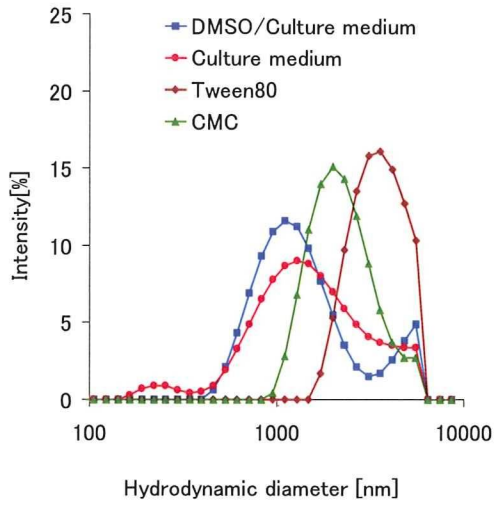


図1 DLS測定によるMWCNT粒子分布

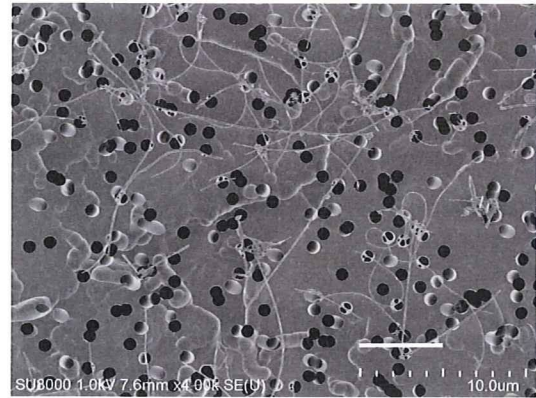


図2 MWCNT懸濁液

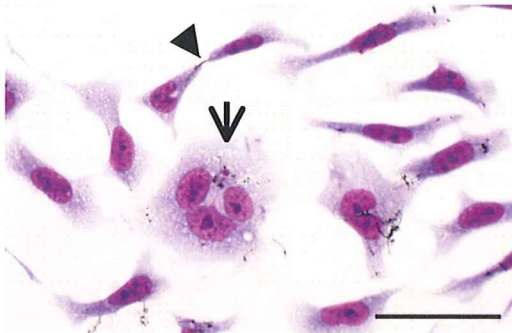


図3 MWCNT処理細胞 Bar:50μm

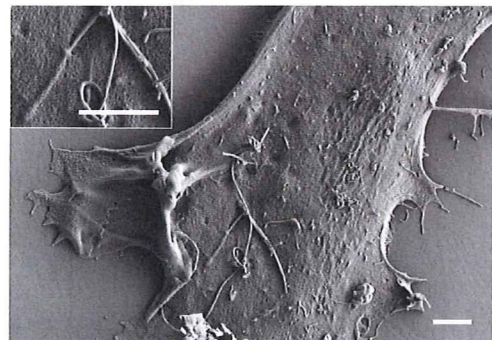


図4 MWCNT処理細胞 Bar:2μm

Table 1. MWCNTの小核試験結果

濃度(μg/ml)	観察細胞数	小核出現頻度(%)	その他の指標(%)			細胞増殖率(%)	
			2核細胞	多核細胞*	分裂細胞		
0	2000	8.5	4.5	2.5	14.5	100	
0.02	2000	10.5	3.0	2.5	12.5	94	
0.078	2000	9.5	6.0	2.5	11.5	88	
0.31	2000	12.0	19.0**	5.0	12.0	79	
1.3	2000	13.0	27.5**	10.5**	10.0	73	
5.0	2000	14.0	63.5**	21.5**	9.5	63	
Cochran-Armitage test		P<0.05	P<0.01	P<0.01	-	-	
陽性対照		2000	48.5**	9.5	5.0	9.5	-

Fisher's exact test * P<0.05 ** P<0.01

* 多核はひとつの細胞に3つ以上の核を有するもの

陽性対照: マイトマイシンC (0.01 μg/ml)

Table 2. MWCNTの染色体異常試験

処理時間 (h)	用量 (μ g/ml)	染色体構造異常の出現頻度(%)						染色体数的異常 の出現頻度(%)		細胞増殖 率(%)	
		観察 細胞数	染色分 体切断	染色分 体交換	染色体 切断	染色体 交換	その他	総異常細 胞数	観察 細胞数		倍数体
24	0	200	0	0	0	0	0	0	201	0.5	100
	1.3	200	0	0	0	0	0	0	203	1.5	76
	5.0	200	0	0	0	0	0	0	207	3.4*	62
	20	200	0	0	0	0	0	0	234	14.5**	56
	80	200	0	0	0	0	0	0	242	17.4**	50
	Cochran-Armitage test							ns	P<0.01		
	MMC	200	7	23.5	0	0	0	28.5**	200	0	—
48	0	200	0.5	0	0	0	0	0.5	202	1.0	100
	0.078	200	0.5	0	0	0	0	0.5	203	1.5	83
	0.31	200	0.5	0	0	0	0	0.5	204	2.0	74
	1.3	200	0	0	0	0	0	0	217	7.8**	67
	5.0	200	0	0	0	0	0	0	261	23.4**	59
	Cochran-Armitage test							ns	P<0.01		
	MMC	200	6.5	58.5	0	0	0	63**	200	0	—

a) Fisher's exact test : * P<0.05 ** P<0.01

b) Cochran-Armitage test : ns(not significant) or p<0.01

Table 3. MWCNTの遺伝子突然変異試験

濃度(μ g/ml)	細胞生存率(%)	突然変異率(/ 10^6)
0	100	4.68
6.3	86	3.56
12.5	63	6.83
25	48	4.77
50	33	6.14
100	21	3.82
EMS	33	462*

陽性対照:メタンサルホン酸エチル(200 μ g/ml)

*:陽性反応(陰性対照の2倍以上)

ナノマテリアルの経気道暴露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

分担研究者	野口 忠	日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 微生物試験室 室長
協力研究者	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 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。試験はラットにMWCNTを1匹あたり 40 及び 160 μg の用量で単回投与し、投与後29日目及び90日目に臓器を摘出した。MWCNTを投与した肺ではMWCNTを取り込んだ肺胞マクロファージの浸潤および肉芽の形成、またII型肺胞上皮細胞の増生が軽度ではあるが継続的に認められたが、肺の *gpt* および *Spi-* 突然変異の増加は認められなかった。さらに *gpt delta* 動物でナノマテリアルの *in vivo* 突然変異原試験を評価するには、試験プロトコルの最適化等更なる調査が必要である。

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、*in vivo* 変異原性試験として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 gpt delta (F344) 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 μ m
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 μ g/匹、160 μ g/匹 の 2 段階 (公比 4)、また、Quartz の投与用量は 160 μ g/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、ペントバルビター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、右肺下葉の一部を病理検査用に摘出した。その後、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 の耐性変異コロニーを選択して点突然変異頻度を測定した。

2) Spi-変異検出方法

1)と同様に、回収したファージを大腸菌 XL-1Blue MRA 及び XL-1BlueMRA(P2)に感染させ、Spi-セレクションにより欠失変異頻度を測定した。

(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

1)体重変化

投与時の平均体重は 287 ± 17 g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 312 ± 16 g、90日では 360 ± 18 gで各群間に差は認められなかった。投与直後の体重低下、および、その後の回復は全群均等に認められ、投与技術的には安定していたことを示している。

2) 肺重量変化

投与29日目の肺の重量は、MWNCT の投与群で用量に相関した増加傾向が認められ、 $160 \mu\text{g}$ /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。投与90日目の肺の重量は、各群で差は認められなかった。

3) 肺組織病理学検査

右肺下葉より作製した標本をヘマトキシリン・エオジン染色し病理組織学検査を行った。 $40 \mu\text{g}$ 、 $160 \mu\text{g}$ のMWCNTを投与したラットにおいて、投与後29日および90日で、ほぼ全例で

MWCNTの沈着を伴う肺胞マクロファージの浸潤とII型肺胞上皮の増生が認められた。また $160 \mu\text{g}$ のMWCNTを投与したラットにおいては、投与後29日および90日で、全例でMWCNTの沈着を伴う軽度の肉芽腫病変が認められた。

4) 肺突然変異

投与後29日および90日の肺における gpt 突然変異とSpi-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

MWCNTをgpt delta ラットに単回気管内投与により、投与後29日および90日の肺重量は増加傾向を示した。また、肺の組織病理学的変化は、MWCNTの沈着を伴う肺胞マクロファージの浸潤とII型肺胞上皮の増生、およびMWCNTの沈着を伴う軽度の肉芽腫が認められた。しかし、肺のトランスジーンgpt遺伝子上の突然変異およびred/gam遺伝子上の欠失突然変異に変化は認められなかった。

Jacobsenら(2008)は、シングルウォールカーボンナノチューブ(SWNCT)およびフラーレン(C_{60})をMuta Mouseの株化肺上皮細胞(FE1-MML)に暴露し、共にDNA損傷の増加を認めているが、cII遺伝子上での突然変異の増加は認めていない。Xuら(2009)は、 C_{60} をgpt delta マウスの初代胚線維芽細胞に暴露し活性酸素種(ONOO-)の増加およびSpi-欠失変異の増加を示した。また、Totukaら(2009)はgpt delta マウスに C_{60} を気管内投与し、肺のDNA損傷およびgpt突然変異の増加を示している。

本研究では、MWCNTをgpt delta ラットに気管内投与により、炎症性影響によるII型肺胞上皮(肺幹細胞)の増生が認められたことから突然変異の増加が想定されたが、突然変異の増

加は認められなかった。

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。現プロトコールではその遺伝毒性を評価することはできなかった。

難溶性粒子状物質の標的臓器は肺であるので、in vivo で肺における遺伝毒性を検出する試験系を開発することはその毒性を評価する上で必須である。

現在開発されている遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中でgpt delta動物は、欠失変異が評価できる点からも評価レスポンスが高く最も適している動物である。さらにgpt delta動物でナノマテリアルの in vivo 突然変異原試験を評価するには、試験プロトコールの最適化等更なる調査が必要である。

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

野口 忠、上垣外 智之、成見 香瑞範、高島 理恵、濱田 修一、真田 尚和、増村 健一、蓮子 雅之、能美 健彦. gpt delta トランスジェニックラットを用いた遺伝毒性試験の共同研究 3) 亜酸化ニッケルの気管内投与による遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第38回大会 (2009年11月清水市)

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)

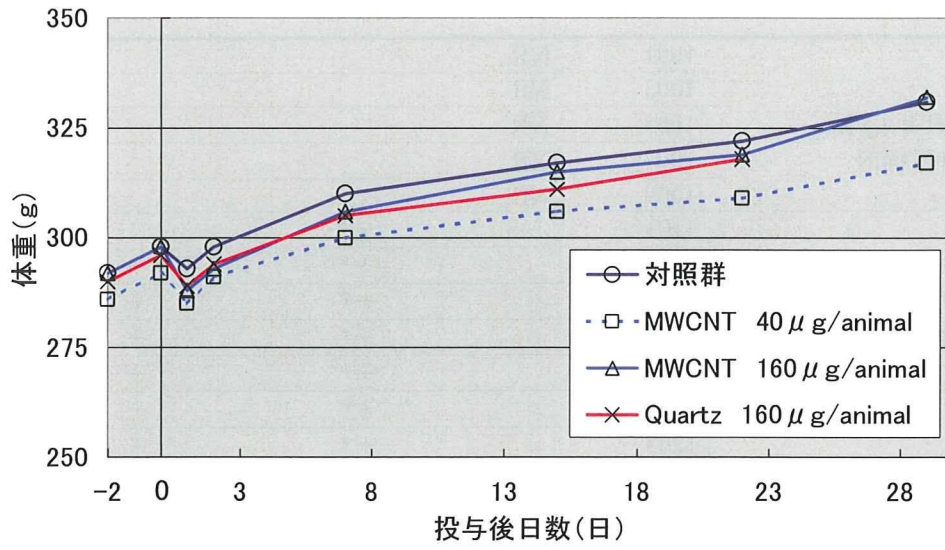


図2 試験結果 肺重量

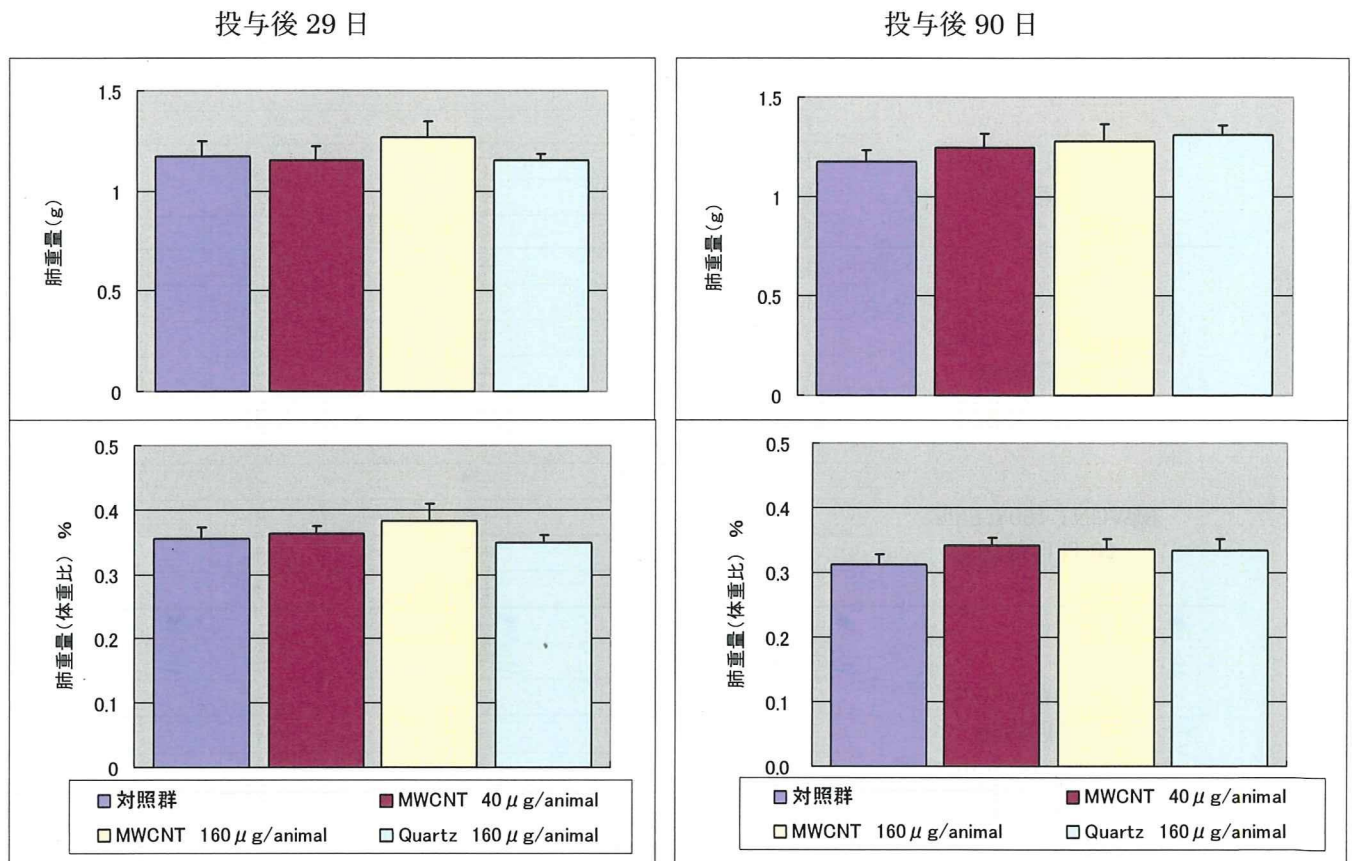


表1 MWCNT 気管内投与肺の組織病理結果

群	動物番号	肺胞マクロファージ の浸潤	II型肺胞上皮 細胞増生	肉芽形成
MWCNT 0 μ g/匹 29日目解剖	1001	NR		
	1003	NR		
	1005	NR		
	1007	NR		
	1009	NR		
MWCNT 40 μ g/匹 29日目解剖	1101	+		+
	1103	+	+	
	1105	+	+	
	1107	+	+	
	1109	+	+	
MWCNT 160 μ g/匹 29日目解剖	1201	+	+	+
	1203	+	+	+
	1205	+	+	+
	1207	+	+	+
	1209	+	+	+
Quartz 160 μ g/匹 29日目解剖	1301	+		
	1303	+		
	1305	+		
	1307	+		
	1309	+		
MWCNT 0 μ g/匹 90日目解剖	1002	NR		
	1004	NR		
	1006	NR		
	1008	NR		
	1010	NR		
MWCNT 40 μ g/匹 90日目解剖	1102	+	+	
	1104		+	
	1106	+	+	
	1108	+	+	
	1110	+	+	
MWCNT 160 μ g/匹 90日目解剖	1202	+	+	+
	1204	+	+	+
	1206	+	+	+
	1208	+	+	+
	1210	+	+	+
Quartz 160 μ g/匹 90日目解剖	1302	+		
	1304	+	+	
	1306	+	+	
	1308	+	+	
	1310	+	+	

NR : 異常を認めない

+ : 軽度、 ++ : 中程度、 +++ : 強度

* : MWCNT の沈着を伴う

表 2 MWCNT 気管内投与肺の gpt 突然変異試験結果

群	動物番号	Total Population	Confirmed Mutants	Mutant Frequency (X 10 ⁻⁶)	平均	SD
MWCNT 0 μ g/匹 29 日目解剖	1001	1,422,000	15	10.55	7.04	3.43
	1003	894,000	5	5.59		
	1005	1,197,000	13	10.86		
	1007	837,000	4	4.78		
	1009	873,000	3	3.44		
MWCNT 40 μ g/匹 29 日目解剖	1101	732,000	3	4.10	4.35	2.55
	1103	477,000	4	8.39		
	1105	657,000	3	4.57		
	1107	1,353,000	2	1.48		
	1109	933,000	3	3.22		
MWCNT 160 μ g/匹 29 日目解剖	1201	1,122,000	3	2.67	2.37	1.66
	1203	486,000	1	2.06		
	1205	1,413,000	1	0.71		
	1207	1,590,000	8	5.03		
	1209	714,000	1	1.40		
Quartz 160 μ g/匹 29 日目解剖	1301	1,440,000	12	8.33	3.55	3.32
	1303	1,998,000	3	1.50		
	1305	1,743,000	10	5.74		
	1307	1,092,000	1	0.92		
	1309	807,000	1	1.24		
MWCNT 0 μ g/匹 90 日目解剖	1002	663,000	3	4.52	3.55	0.95
	1004	870,000	2	2.30		
	1006	1,845,000	7	3.79		
	1008	1,164,000	5	4.30		
	1010	1,407,000	4	2.84		
MWCNT 40 μ g/匹 90 日目解剖	1102	768,000	1	1.30	3.59	1.79
	1104	324,000	1	3.09		
	1106	954,000	3	3.14		
	1108	324,000	2	6.17		
	1110	471,000	2	4.25		
MWCNT 160 μ g/匹 90 日目解剖	1202	615,000	3	4.88	2.56	2.42
	1204	504,000	0	0.00		
	1206	426,000	2	4.69		
	1208	312,000	1	3.21		
	1210	363,000	0	0.00		
Quartz 160 μ g/匹 90 日目解剖	1302	396,000	1	2.53	3.35	0.87
	1304	477,000	2	4.19		
	1306	414,000	1	2.42		
	1308	294,000	1	3.40		
	1310	711,000	3	4.22		

表 3 MWCNT 気管内投与肺の Spi-突然変異試験結果

群	動物番号	Total Population	Confirmed Mutants	Mutant Frequency (X 10 ⁻⁶)	平均	SD
MWCNT 0 μ g/匹 29 日目解剖	1001	651,000	1	1.54	1.95	0.50
	1003	426,000	1	2.35		
	1005	627,000	1	1.59		
	1007	381,000	1	2.62		
	1009	615,000	1	1.63		
MWCNT 40 μ g/匹 29 日目解剖	1101	333,000	1	3.00	2.44	1.46
	1103	444,000	1	2.25		
	1105	309,000	1	3.24		
	1107	270,000	1	3.70		
	1109	399,000	0	0.00		
MWCNT 160 μ g/匹 29 日目解剖	1201	579,000	2	3.45	1.84	1.26
	1203	423,000	1	2.36		
	1205	600,000	0	0.00		
	1207	633,000	1	1.58		
	1209	552,000	1	1.81		
Quartz 160 μ g/匹 29 日目解剖	1301	489,000	1	2.04	1.12	1.04
	1303	498,000	1	2.01		
	1305	663,000	0	0.00		
	1307	651,000	1	1.54		
	1309	528,000	0	0.00		
MWCNT 0 μ g/匹 90 日目解剖	1002	438,000	2	4.57	3.16	1.02
	1004*	879,000	17	19.34		
	1006	435,000	1	2.30		
	1008	393,000	1	2.54		
	1010	309,000	1	3.24		
MWCNT 40 μ g/匹 90 日目解剖	1102	333,000	1	3.00	2.08	1.35
	1104	402,000	1	2.49		
	1106	435,000	0	0.00		
	1108	297,000	1	3.37		
	1110	648,000	1	1.54		
MWCNT 160 μ g/匹 90 日目解剖	1202	588,000	1	1.70	1.54	0.98
	1204	369,000	0	0.00		
	1206	423,000	1	2.36		
	1208	423,000	1	2.36		
	1210	777,000	1	1.29		
Quartz 160 μ g/匹 90 日目解剖	1302	816,000	1	1.23	2.75	2.09
	1304	273,000	1	3.66		
	1306	387,000	2	5.17		
	1308	270,000	1	3.70		
	1310	318,000	0	0.00		

* : 棄却データとして評価には使用しなかった。

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

ナノ材料の吸入暴露情報に関する調査研究

研究分担者 山本雅也 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 主任研究官

研究協力者 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 主任研究官

研究要旨

酸化チタン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。職業暴露に関しては、過去に大規模な疫学調査が実施されているが、粒径や詳しい性状に関する情報は得られなかった。毒性影響に関しては、気管内投与、エアロゾルへの全身暴露による *in vivo* の試験結果が蓄積されてきている。しかし、酸化チタンの毒性は、粒径、組成、表面の性状、結晶構造、実際の分散状態など様々な要因の影響を受けるため、毒性の評価や実験を行う場合は、これらを十分に考慮する必要がある。

A. 研究目的

産業用ナノ材料は、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、気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。産業用ナノ材料のヒトの健康への影響を評価するためには、実験動物にナノ材料を吸入暴露させ、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、リスク評価法としての吸入暴露システムの開発のための適切な吸入暴露条件や毒性評価法等を提言することを目的として、産業用ナノ材料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、金属系ナノ材料の酸化チタンに焦点を当て、文献情報等の公開情報の収集・整理を行った。

B. 研究方法

ナノ材料としての酸化チタンの職業暴露情報、気管内投与及び吸入暴露による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。また、酸化チタンについては、古くから多数の実験が行われているため、総説(Johnston, Hutchison et al. 2009)なども参考とし、粒径がナノスケールの酸化チタンを用いた重要な実験を追加した。(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

米国において1976年から2000年に4つの酸化チタン生産工場の914の酸化チタン (TiO₂) ダストが分析され、空気中濃度は梱包・微粉工程従事者で最大で6.2 mg/m³であった(Fryzek, Chadda et al. 2003)。欧州では、主に1990年代にフランス、イタリア、ノルウェー、イギリスなど7箇所のTiO₂生産工場のダスト中のTiO₂濃度が測定され、乾燥・梱包・混合などの各工程ごとの平均は、最大で5 mg/m³であった

(Boffetta, Soutar et al. 2004)。しかし、いずれも粒径など詳しい性状に関する情報は得られなかった。

2. 吸入暴露による毒性影響に関する情報

2.1 吸入暴露

雌 NMRI マウスと雌 Wistar ラットを用い、P25 ultrafine TiO₂ (21 nm) を平均 10 mg/m³ で 2 年間 [7.2 mg/m³ で 4 ヶ月、14.8 mg/m³ で 4 ヶ月、9.4 mg/m³ で 5.5 ヶ月 (マウス)、16 ヶ月 (ラット)] 吸入暴露した後、9.5 ヶ月 (マウス)、6 ヶ月 (ラット) クリーンな空気で飼育した。実験終了時、マウスでは肺ガン発生率に暴露の影響は特に認められなかった。ラットでは、暴露により死亡率が上昇し、肺泡クリアランスが低下した。また、30 ヶ月後の肺ガンは曝露群で 32/100、対照群で 1/217 であった(Heinrich, Fuhst et al. 1995)。

Ferin らは、Fisher 344 ラットに ultrafine TiO₂ (21 nm[anatase 型]) または fine TiO₂ (250 nm[anatase 型]) のエアロゾルを 23 mg/m³ の用量で 12 週間全身暴露し、64 週後の肺への影響を検討した。ultrafine TiO₂ は、肺胞間隙に分布し、気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の好中球数が増加した。クリアランスは、ultrafine TiO₂ で、半減期 501 日、fine の TiO₂ で、半減期 174 日であった(Ferin, Oberdorster et al. 1992)。

Bermudez らは(Bermudez, Mangum et al. 2004)、F344 ラット、雌 B3C3F1/CrIBR マウス、Lak: LVG (SYR) BR ハムスターに ultrafine TiO₂ (21 nm) のエアロゾル [粒径 1.37 μm] を 0.5, 2.0, 10 mg/m³ の用量で 13 週間 (6 時間/日、5 日/週) 全身吸入暴露し、その後最大 52 週飼育し、肺への影響の種差を検討した。肺の炎症は、ラットで強く起こり、マウスがそれに次いだが、ハムスターでは起こらなかった。TiO₂ の肺でのクリアランスは、最高用量の 10 mg/m³ でラット及びマウスで著しく低かったが、ハムスターでは影響を受けなかった。別の実験で、fine TiO₂ (1.4 μm) のエアロゾル [粒径 1.37 μm] を 10, 50, 250 mg/m³ の用量で全身吸入暴露した実験でも、同様に感受性はラット > マウス > ハムスターの順であった(Bermudez, Mangum et al. 2002)。

Grassian らは、粒径が 10 nm 以下の TiO₂ について検討した。C57Bl/6 マウスに 3.5 nm[anatase 型]の TiO₂ を 8.88 mg/m³ のエアロゾルで単回 4 時間全身曝露または 10 日間 反復(4 時間/日)全身吸入曝露し、BAL 中の炎症マーカーや肺の組織学的検査を行った。単回曝露の高用量と反復曝露で BAL 中のマクロファージ数が増加したが、肺の病理組織学所見や LDH には変化は見られなかった。反復曝露のマクロファージ数は、曝露 2 週間まで増加したが、曝露 3 週では差はなかった(Grassian, O'Shaughnessy P et al. 2007)。また、別の実験では、C57Bl/6 マウスに 5 nm[anatase 型]及び 21 nm [anatase/rutile 混合型]の TiO₂ (0.7, 70 mg/m³) のエアロゾルを 4 時間全身曝露した結果、4 時間後の BAL 中の細胞数が 5 nm の高用量、21 nm のすべての用量で、肺泡マクロファージ数が 5 nm と 21 nm の高用量で増加したが、LDH や肺の病理組織学検査では、変化は見られなかった。曝露に用いたエアロゾルの粒径は、119-153 nm の範囲で、径の大きい 21 nm の TiO₂ は 5 nm に比べ、スペースをもって弱く凝集していた (Grassian, Adamcakova-Dodd et al. 2007)。

2.2 気管内投与

雄 Wistar ラットに ultrafine TiO₂ (29 nm) もしくは fine TiO₂ (250 nm) を 125 及び 500 μg/animal の用量で無菌食塩水に懸濁後、気管内投与した結果、24 時間後に、いずれの TiO₂ 投与でも肺泡マクロファージの貪食能が阻害された。また、ultrafine TiO₂ 投与で気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の好中球の遊走、LDH、GGT、走化因子 C5a へのマクロファージの遊走能が、増加した(Renwick, Brown et al. 2004)。

TiO₂ の結晶構造の違いが、肺への毒性に影響を与えるかについては、Warheit らにより検討されている。Warheit らは、球状 TiO₂ (〜10 nm [anatase 型])、円柱状 TiO₂ (200 nm x 35 nm [anatase 型]) もしくは fine TiO₂ (〜300 nm [rutile 型]) を PBS に懸濁し、1 及び 5 mg/animal の用量で雄 Fisher 344 ラットに気管内投与し、1 日、1 週間、1 ヶ月または 3 ヶ月後の BAL 中の炎症マーカーや肺の組織学的検査を行った。球状ナノスケール TiO₂、円柱状ナノスケール

TiO₂ とともに 24 時間後に一時的な炎症と細胞障害を引き起こしたが、fine TiO₂ と差異は認められなかった。著者らは粒子径や粒子の表面積でなく、粒子表面の性質や結晶構造が毒性に重要と考察している。(Warheit, Webb et al. 2006)。また、ultrafine-1 (〜136 nm [粒子表面アルミナコート、rutile 型])、ultrafine-2 (〜149.4 nm [粒子表面シリカ・アルミナコート、rutile 型])、ultrafine (P25) (〜129 nm [80%: anatase 型、20%: rutile 型])、fine (R-100) (〜382 nm [rutile 型]) の TiO₂ を用いて同様の実験を行ったところ、ultrafine (P25) TiO₂ でのみ、BAL 中の炎症マーカーの上昇及び好中球の浸潤を伴う肺の炎症が認められた。ultrafine の TiO₂ でも粒子の表面の組成や結晶構造により肺への毒性は異なることが示された (Warheit, Webb et al. 2007)。

上記の Warheit の実験では、PBS の懸濁中の TiO₂ の凝集塊が 2 μm 以上であるのに対し、Sager らは気管内投与の際、粒子を分散させるため無処置の BAL 中に懸濁する方法を用いた。電子顕微鏡で懸濁液中の TiO₂ の凝集塊を測定したところ、ultrafine TiO₂ で 200-300 nm、fine TiO₂ で 1 μm であった。ultrafine TiO₂ (21 nm [80%: anatase 型、20%: rutile 型]) もしくは fine TiO₂ (250 nm [rutile 型]) を BAL 中に懸濁し、それぞれ 0.02, 0.52, 1.04 mg/animal (0.0313, 0.0625, 0.125 粒子表面積 cm²/肺胞表面表面積 cm²) の用量で雄 Fisher 344 ラットに気管内投与し、1、7 及び 42 日後の炎症マーカー、肺障害、マクロファージ活性を検討した。炎症や毒性の指標 (PMN, LDH, TNF-α, MIP-2 など) を投与質量で比較すると ultrafine TiO₂ は、fine TiO₂ より約 40 倍の値だが、投与粒子の表面積で比較すると約 2 倍程度であった。この結果から、TiO₂ の肺への障害を検討する際、粒子の表面積が投与用量の指標になりうるとしている (Sager, Kommineni et al. 2008)。

Chen (Chen, Su et al. 2006) らは、雄 ICR マウスに 1 及び 5 mg/kg の ultrafine TiO₂ [Degussa] (21 nm) 又は micro TiO₂ [Fisher] (180-250 nm) を生理食塩水に懸濁後、0.1 及び 0.5 mg/animal の用量で気管内投与し、3 日、1 及び 2 週後の肺の組織の組織学検査及びマイクロアレイ解析を行った。ultrafine TiO₂ 投与

は、肺気腫、マクロファージ集積、肺胞間中隔の拡張・破壊、タイプ II 型肺胞増殖、上皮のアポトーシスを引き起こした。placenta growth factor (PlGF) やケモカイン (CXCL1, CXCL5, and CCL3) などの発現が上昇した。micro TiO₂ [Fisher] (180-250 nm) 投与では、肺気腫など肺の組織学変化など同様の影響は見られなかった。

Inoue (Inoue, Takano et al. 2008) らは、既知の肺の炎症性物質への TiO₂ の影響を検討した。雄 ICR マウスに 15, 50 または 100 nm の TiO₂ (8 mg/kg) と LPS (2.5 mg/kg) をそれぞれ単独及び両者を気管内投与したところ、24 時間後に TiO₂ は、LPS による肺の炎症作用を悪化させ、血液凝固系に関わるフィブリノーゲンなどを上昇させ、径が小さいものほどその作用は強かった。

2.3 鼻部暴露

Grassian らは、C57Bl/6 マウスに 5 nm [anatase 型] の TiO₂ (5, 20, 30 μg/50 μl) 及び 21 nm [anatase/rutile 混合型] の TiO₂ (25, 100, 150 μg/50 μl) を無菌 0.9% 食塩水に懸濁し、鼻部曝露した。24 時間後に、BAL 中の細胞数、LDH、IL-1β、IL-6 が 21 nm 投与のみ増加した。好中球は、5 nm の中高用量、21 nm のすべての用量で、増加した (Grassian, Adamcakova-Dodd et al. 2007)。

Wang (Wang, Chen et al. 2008) らは、ICR 雌マウスに rutile (80 nm) 及び anatase (155 nm) の TiO₂ (500 μg/animal) を 30 日間鼻部内投与し、脳への影響を調べた。TiO₂ は、特に、海馬に高濃度でみられ、顕著なニューロンの形態的变化、CA4 領域の GFAP 陽性アストロサイトの増加が認められた。脳全体で、グルタミン酸、酸化窒素の過分泌、脂肪過酸化、タンパク酸化、カタラーゼ活性の増加など酸化ストレスが顕著であった。

D. 考察

酸化チタンなどナノマテリアルの主要な反応として多くの実験で、肺の炎症、好中球の浸潤、食マクロファージの蓄積がみられる。しかし、Geiser らは、WKY ラットに 0.1 mg/m³ で ultrafine 酸化チタン (20 nm) をエアロゾルで 1 時間全身暴露し、1 及び