

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究  
分担研究報告書

分担研究名 実験動物へのばく露量およびばく露形態を把握するためのナノマテリアルの性状・拡散状態及び濃度を把握する方法に関する研究

分担研究者 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首席研究員  
協力研究者 三浦 伸彦 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

本分担研究では、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを担当している。本年度は、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）のばく露チャンパー内での挙動を把握するための基礎的検討、生体内寿命を実験的に評価するために、純水および模擬肺胞液に0-100日浸漬後のMWCNTの性状変化の測定を行うとともに、生体内での挙動（生体に与える影響）を分子生物学的手法により把握し、さらに *in vitro* 系による有害性評価へも発展可能にするために、培養細胞を用いた検討を行った。

## A. 研究目的

ナノ物質の生体影響を実験的に評価する場合は、*in vitro*, *in vivo* のいずれであっても、被験物質の性状・濃度を正しく把握するドーズキャラクタリゼーションを行わねば、生体影響を定量的に評価できない。しかし、ナノ材料の、濃度・性状・動態を知るキャラクタリゼーション技術は確立されているとはいえない。本分担研究では、分担研究者が職場環境におけるナノ粒子発生状況に関する測定を重ねて得た知見をもとに、ばく露チャンパー中の空気、気管内投与試料懸濁液、動物体内におけるナノ材料のキャラクタリゼーション法の開発・評価を行うことを目的としている。

また、MWCNTの生体影響を把握するためにはMWCNTの毒性標的を知る必要がある。そのための一つ的手段として、MWCNTばく露後に生体内で生ずる遺伝子発現変化(mRNA量変動)をcDNAマイクロアレイ法により網羅的に解析する方法がある。この場合、MWCNTばく露後の一過性の発現変化を調べるのが一般的であるが、昨年度の本検討においてMWCNT耐性候補細胞を得た。この耐性候補細胞ではMWCNTに対する応答が恒常的にダイナミックに変化し、従って一過性ばく露での検索に比べより感度の良い系と考えられる。そこで本年度は、①MWCNT耐性候補細胞の耐性を高めると共に、より多くの耐性細胞を得ること、②MWCNT耐性細胞-対照細胞(親株)の間で発現量の異なる遺伝子をマイクロアレイ法により網羅的に検索することにより、MWCNTの生体内毒性標的を絞り込むことを目的とした。

## B. 研究方法

本分担研究では、本研究の動物実験で用いられている多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を試料として、チャンパー内での挙動・生体内寿命・分子生物学的手法による検出等を検討した。

3年目の年度の本年度は

- (1) グローブボックス内で、実作業を模した作業を行いその作業で発せするナノ粒子を測定することにより、チャンパー内等での濃度評価が測定器でどの程度可能かを評価するための実験。(鷹屋)
  - (2) MWCNT試料を模擬生体液を浸し、一定期間経過後の物理・化学的性状の変化を測定することにより生体内寿命推定に参考となる基礎データを得るための実験。(鷹屋)
  - (3) MWCNTの毒性発現を修飾する生体因子の検索。(三浦)
- の3つのサブテーマに関して実験的研究をおこなった。

### (1) 模擬作業にともなう粒子発生の測定

#### ① 作業に伴うナノ粒子の測定について

ナノ粒子の有害性を評価する際に、毒性学の観点から、投与量を変えて試験を行い無反応量を求めることは重要であるが、一方で、現実の労働環境での粒子の発生の有無・発生量を参考にして現実的な曝露量での影響を評価することも重要であると考え、作業を模した実験での粒子発生を評価することとした。

#### ② 実験方法

実験に用いた装置の構成を図1に示す。



えられるが、今回はギャンブル氏液の成分の付着による影響を除去することは困難だと考えて、BET法による評価は用いなかった。

粒径分布と電位は、マルバーン社製の Zetasizer nano 90 を用いて測定を行った。観測期間終了後、5 分間超音波洗浄機で超音波を加え、凝集を軽くほどいた後、浸漬した溶液のまま、粒径・電位測定のため可能な専用セルに懸濁液をいれて測定を行った。

粒径・電位測定に必要とされる分を除く試料懸濁液は、ミリポア製のポリカーボネートメンブランフィルター（アイソポア）を用いて、濾過し純水で洗浄した。この際、まず 1 滴のみ濾過して粉体を低密度でフィルター上にのせたものを SEM 用試料とした。SEM 用試料は白金-パラジウム蒸着後、日立製フィールドエミッション型走査電子顕微鏡 (S-4700) で SEM 観察を行った。残りの懸濁液は濾過、洗浄後、0.5mg 程度白金皿に計りとり、リガク製熱分析装置で、大気下で、毎分 10℃ の昇温速度で 1000℃ まで加熱し、熱重量分析 (TG) ならびに示差熱分析 (DTA) を行った。

### (3) MWCNT の毒性発現を修飾する生体因子の検索

#### ① MWCNT 耐性細胞の樹立および耐性度の増強

A549 細胞（ヒト II 型肺上皮細胞由来）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。A549 細胞を 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の MWCNT（動物実験に用いているものと同じものを用いた）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。耐性度を高めるために、生育して増えた細胞を再び 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  の MWCNT 存在下で 1 ヶ月程度培養し続け、増殖した細胞を MWCNT 耐性細胞 (MWCNT-R) とした。以上の操作を繰り返し、MWCNT 耐性細胞の樹立を行った。なお、通常の細胞維持は MWCNT 非存在下で行った。

毒性評価は昨年度と同様に行った。すなわち、対照の A549 細胞 (WT 細胞) あるいは MWCNT-R 細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり  $1 \times 10^4$  個/90  $\mu\text{l}$  の濃度で播き、24 時間培養後に各濃度の MWCNT を 10  $\mu\text{l}$  添加した (最終濃度: 2  $\mu\text{g}/\text{ml}$  ~ 100  $\mu\text{g}/\text{ml}$ )。添加 48 時間後に AlamarBlue 試薬 (Invitrogen 社製) を 10  $\mu\text{l}$  加え、37℃ で 1 時間反応後に細胞生存率を測定した。なお、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。統計解析は分散分析 (ANOVA) および多重比較解析 (Dunnett 法) により行った。

#### ② マイクロアレイ解析

MWCNT 非存在下で培養した WT 細胞および MWCNT-R2 細胞 (毒性評価の結果から耐性度の最も高い細胞) から total RNA を抽出し、超純水に溶解後、RNA 品質の確認を行った。得られた RNA サンプルについて、DNA チップ研究所 (横浜市) にマイクロアレイ受託解析を依頼した。本受託解析は Agilent Technologies 社製のヒトマイクロアレイ (4 x 44K) を用い、1 つのアレイで約 44,000 種の遺伝子について解析できる。マイクロアレイは 1 色法により行い、得られたシグナルを正規化 (アレイ間補正および遺伝子間補正) した後、発現変動遺伝子抽出・Gene Ontology 解析などの結果を得た。これらの結果を詳細に解析し、WT 細胞-MWCNT-R2 細胞間で変動する遺伝子群から MWCNT の毒性標的の絞り込みを試みた。

### C. 研究結果

#### (1) 模擬作業にともなう粒子発生量の測定

図 2, 3, 4 は、模擬作業中の粒子濃度 (10-1000nm の粒子の個数濃度) の変化を示したものである。

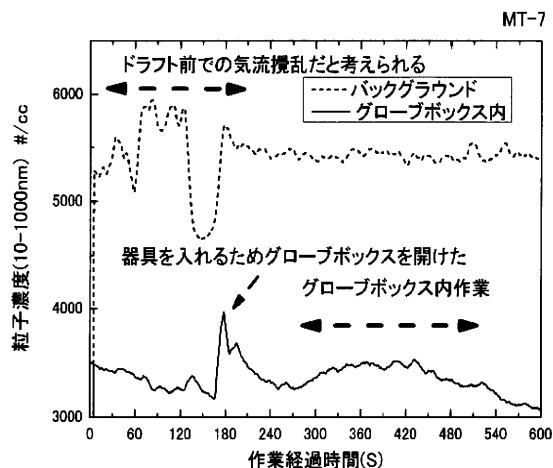


図 2 MWCNT 作業

図 2 は MWCNT、図 3 はナノ酸化銅、図 4 はナノ酸化チタンを用いた作業中のグローブボックス内の粒子濃度変化並びに、バックグラウンド粒子の濃度変化を示している。各図に示すように、作業が行われていないときのグローブボックス内の粒子濃度は HEPA フィルターにより低く維持されている。作業準備などの際、バックグラウンドの粒子濃度も激しく変化しているが、作業時にはおおむね一定で

あるため結果には影響が無いと考えている。  
MWCNT では、作業中にわずかに、ナノスケール  
粒子の濃度上昇が観測された。

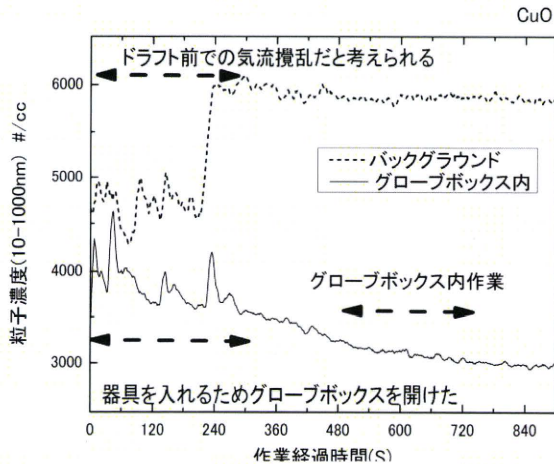


図3 酸化銅作業

酸化銅では、作業に伴う粒子発生が全く観測されな  
なかった一方で、酸化チタンでは、作業に明確に対応し  
たナノ粒子の発生が観測できた。

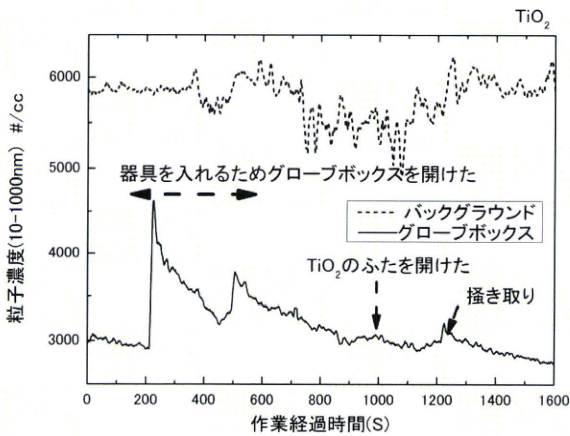


図4 酸化チタン作業

(2) 生体内寿命の実験的評価

動的光散乱法による測定では、粒径分布および  
電位のいずれにおいても、浸漬溶液の種類、浸漬時  
間と関係が無く結果がばらついたため、このデー  
タを用いて何らかの評価を行うことはできなかった。  
図5と図6はギャンプル氏液に浸漬した MWCNT  
の SEM 観察像 (いずれも 1 万倍) である。繊維長  
や太さの分布などに顕著な違いは見られなかった。

図7に熱分析の結果例を示した。MWCNTは炭  
素材料であるため、空気中で加熱した場合燃焼する。  
その燃焼は試料そのものの性状のほかに、熱分析装置  
の測定用白金皿への試料の詰め方などにも影響さ  
れる可能性が高い。したがって、DTAのピーク温  
度では定量的に評価できない可能性があるため、

TGにより、相対減少率が10%に到達した温度で評  
価することとした。

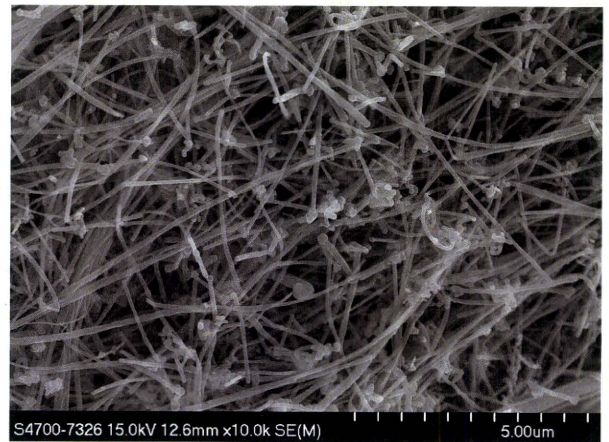


図5 ギャンプル液浸漬0日

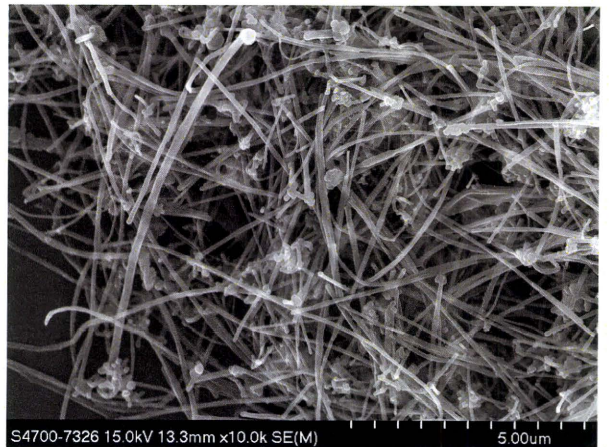


図6 ギャンプル液浸漬100日

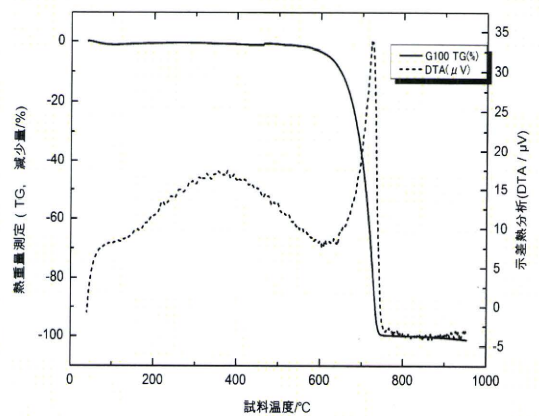


図7 ギャンプル氏液浸漬100日のTGおよびDTA

その結果、

0日	674°C
10日	661°C
31日	663°C
100日	648°C

となり、10日と31日の差こそ明瞭ではないものの、浸漬期間が延びるに従って、低い温度でCNTの分解が進むという結果になった。図8にギャンブル氏液に浸漬した試料の熱重量変化を示す。

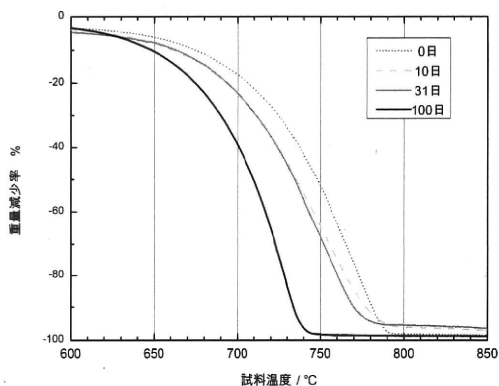


図8 ギャンブル氏液浸漬試料の熱重量変化

尚、対照に用いた純水浸漬試料ではこのような変化は観測されなかった。

### (3) MWCNTの毒性発現を修飾する生体因子の検索

① MWCNT耐性細胞の樹立および耐性度の増強  
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、そのメカニズムを解析し耐性に関わる生体因子を検索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(Cd)の毒性を強力に抑制するメタロチオネイン(MT)はCd耐性細胞で高発現することが知られ<sup>5)</sup>、MTがCdの生体影響を修飾する因子であることが分かる。このように検討対象物質のばく露に応答(=発現量に変動)する生体因子の検索により、検討対象物質に対する防御因子のみならず毒性標的因子が見出

される可能性が高い。

そこでMWCNTのばく露に応答する遺伝子群の網羅的解析を計画した。しかし過去に報告されている網羅的解析は、MWCNTばく露一定時間後の発現変化を調べる一過性変動の観察系である。昨年度の本検討でMWCNT耐性細胞の樹立を試み、耐性候補細胞を得た。MWCNT耐性細胞はMWCNTに対する応答系統が恒常的に変化している細胞と考えられ、よりダイナミックな変動が生じている可能性がある。従ってMWCNT耐性細胞は毒性標的を絞り込むための強力なツールになると考えられる。

本年度は、MWCNT耐性候補細胞を20 µg/mlのMWCNT存在下で再び1ヶ月程度培養し続け耐性度の増強を目指した。並行して新たにWT細胞を20 µg/mlのMWCNT存在下で培養し耐性細胞の樹立を行った。その結果、最終的に20 µg/mlのMWCNT存在下で生存し続ける3種の耐性候補細胞を得た。そこでWT細胞とのMWCNT感受性を比較したところ、WT細胞に対して有意な耐性が認められた(図9)。これらの細胞をMWCNT-R細胞とし、特に耐性度の高いMWCNT-R2細胞について以下のマイクロアレイ解析を行った。

(4) ②MWCNT-R2細胞で変動する遺伝子群のマイクロアレイ法による網羅的解析

マイクロアレイ解析を行う上で、スタートマテリアルとなるRNAの品質は重要である。WT細胞およびMWCNT-R2細胞(どちらもMWCNT非存在下で培養)から抽出したRNAの品質チェック結果を表2に示した。全ての項目において許容値をクリアしており、マイクロアレイ解析に問題なく用いることのできる高品質のRNAであることを確認した。

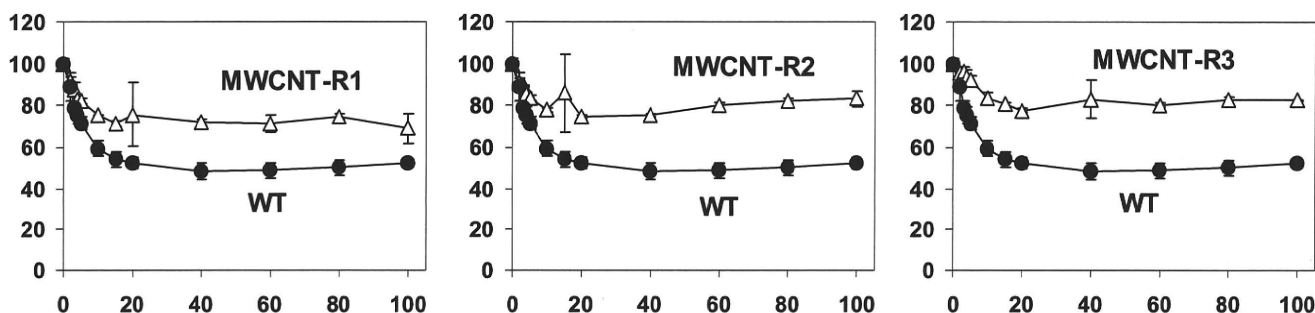


図9 MWCNT耐性細胞のMWCNT感受性(MWCNTばく露48時間後)

<表 2>解析に用いる RNA の品質チェック

	意味・指標			
	タンパク質混在 (260 nm/280 nm)	有機物・塩の混在 (260 nm/230 nm)	RNA の分解 (28s/18s)	RNA の分解度 RNA Integrity Number (RIN)
許容範囲	2.0 程度	2.0 程度	2.0 程度	7~10
WT	2.05	2.06	2.01	9.5
MWCNT-R2	2.06	1.99	2.09	9.7

<表 3>マイクロアレイ解析結果

発現の増減数	増加：181	減少：336
発現量が低下した遺伝子群の生理機能 (GO 分類)	Biological Process	Positive regulation of protein kinase cascade Positive regulation of MAPKKK cascade
	Cellular Component	Extracellular region part
		Extracellular region
		Extracellular space
	Molecular Function	Receptor binding

DNA チップ研究所受託の AgilentAgilent Technologies 社マイクロアレイ結果から、WT 細胞に比べて MWCNT-R2 細胞で 2 倍以上の増減が認められる遺伝子群を対象として解析を行った。その結果、先ず発現量の上昇が認められた遺伝子群が 181、減少した遺伝子群が 336 あった。これら遺伝子産物の生理機能を遺伝子オントロジー (Gene Ontology: GO) 分類に従って分類し、系統立った変動の有無を解析した。これは変動が集中した GO 分類カテゴリーを示しており、注目すべき生理機能系統を探す手がかりとなる。その結果、特にキナーゼ関連遺伝子や細胞外マトリックス関連遺伝子、さらにはレセプター関連遺伝子が有意に低下している可能性が示された (表 3)。しかし同様の解析では有意な上昇は検出されず、従って MWCNT-R2 細胞では上記キナーゼや細胞外マトリックスおよびレセプター結合に関わる遺伝子群が大量に低下している可能性がある。

さらに上記のような系統立った変動に加え、発現量が著しく増減していた遺伝子について調べたところ、発現量上昇遺伝子群の最大変動値は 9.84 倍であり、WT 細胞に比べて 4 倍~9.84 倍の増加を示した遺伝子は 8 種であった。これら遺伝子群には細胞外マトリックス関連酵素やチトクロム P450 ファミリーさらには酸化ストレス関連酵素をコードする遺伝子が含まれていた。一方、発現量減少遺伝子群の最大値は 39.84 倍であり、10 倍~39.84 倍の低下を示した遺伝子群が 13 種認められた。従ってこの結果からも発現量低下が MWCNT-R2 細胞では強く生じていることが分かる。低下遺伝子群の特徴として、細胞膜構造の形成に関わるタンパク質や関連酵素をコードする遺伝子が多く、また数種

のリボゾームタンパク質関連遺伝子が認められた。

#### D. 考察

##### (1) 模擬作業にともなう粒子発生の測定

試料の計りとり、乳鉢による磨砕といった機械力ではなく、人手による作業であっても、ナノレベルの粒子はわずかながら発生していることは確認できた、ただその絶対量は多くなく、バックグラウンド粒子を HEPA フィルターで除去することでようやく確認できるレベルであった。

試料の量にともなう粒子の発生量は材料によって異なり、ナノ酸化銅では全く発生が認められなかった。ナノ酸化銅は相互の粘着が強く、乳鉢内面に一つの塊として付着した。一方、ナノ酸化チタンは高比重が非常に小さい粉体として存在しており、容易に発じんが観測された。肉眼で見えるレベルの発じんは、ミクロンレベルの大きな粒子径の粒子が発じんしているのだが、ナノレベルの粒子の発生の容易さと決して無関係ではないことが示唆された。

##### (2) 生体内寿命の実験的評価

ギャンプル氏液を用いて、MWCNT の生体内寿命を実験的に推定する試みを行った動的光散乱法による粒径分布の結果は、結果の項で述べたとおり、浸漬溶液の種類・時間とは関係がなかった。当初の実験では、浸漬にともない MWCNT 繊維の断片が多数発生する可能性を考えたが、実際にはそのような大きな粒子サイズの変化は無かったと言うことであり、これは SEM 観察の結果とも矛盾していない。

熱分析の結果、より低温でMWCNTの燃焼が開始するという結果が得られた。このことから、MWCNTの微細構造に変化が起きている可能性が高い。今回用いたギャンブル氏液は、クエン酸や酒石酸を含むため、金属類を溶解する能力が高い。MWCNTには微量ながら触媒由来の金属微粒子が含まれている。今回用いたMT-7では鉄であるが、この他コバルトを含むものもある。これらの金属がギャンブル氏液に溶解することにより、元々触媒金属粒子が存在している部分に空隙が発生し、これが低温での燃焼を促進した可能性があると考えられる。低温で燃焼がすすむ一方で、SEMレベルでは繊維構造は維持されており、MWCNTの生体影響のうち、繊維形状に由来する部分は長期の生体内滞留においても変化がないと考えられる一方で、化学的活性が高くなる可能性があり、今回用いた評価手法の他に、酸素ラジカルの生成能などの評価を行うことが望ましいと考える。

### (3) MWCNTの毒性発現を修飾する生体因子の検索

本年度樹立したMWCNT耐性細胞は、MWCNTが示す毒性を何らかの形で回避する能力を有する細胞であり、その耐性メカニズムを明らかにすることで、MWCNTの生体内毒性標的を絞り込むことが可能となる。また同時に毒性回避は、すなわち防御系の変化とも捉えられることから、メカニズム解析によりMWCNTばく露によって引き起こされる毒性を回避する方法に結びつく可能性がある。従って樹立したMWCNT耐性細胞は今後のMWCNT研究において強力なツールとなり得る。

マイクロアレイ解析の結果からMWCNT耐性細胞ではキナーゼや細胞外マトリックスおよびレセプター結合に関わる遺伝子群の発現低下が認められた。MWCNTのばく露によりp38/ERK MAPKの活性低下を介した細胞の増殖阻害が生じること<sup>6)</sup>、また平野らにより細胞膜構造が破壊されることが報告されている<sup>7)</sup>。これらはMWCNTが引き起こす生体影響であるが、MWCNT-R2で認められた上記変化と相似である。従ってキナーゼや細胞外マトリックスおよびレセプター結合の低下は、MWCNT耐性メカニズムというよりもMWCNTが示す生体影響を反映した結果と考えられる。一方で、平野らはMWCNTばく露により細胞膜の破壊が生じ、この時MWCNT自体に結合する生体因子(コラーゲン構造を有するレセプター: MARCO)を見出し、MWCNTは細胞膜上のMARCOへの結合を介して細胞膜破壊に関わると報告している[3]。従ってMWCNT-R2で観察された細胞外マトリックスおよびレセプター結合に関わる遺伝子群の発現低下は、MWCNT耐性メカニズムの一つとも考

えられ、MWCNTによる細胞膜破壊の素材(生体因子)を低下させることにより細胞毒性惹起を低下させている可能性もある。

その他、これら系統だった変動を示す遺伝子群以外にも発現量増減の著しい遺伝子群が毒性標的である可能性があり、候補遺伝子についてWT細胞で発現を消失(RNAi法)あるいは強制発現して感受性の変化を調べることで確認できると思われる。

## E. 結論

### (1) 模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定

所謂ダストネスは、従来の発じんだけではなく、ナノレベルの粒子の発生にも関係する可能性が高い。

### (2) 生体内寿命の評価法の検討

生体内寿命評価に関して、熱分析が非常に有望である。ただし、熱分析の結果と生体内寿命をヒモ付けするためには、なお多くのデータの蓄積が必要である。

### (3) MWCNTの毒性発現を修飾する生体因子の検索

MWCNTの生体影響解析研究の強力なツールとなるMWCNT耐性細胞を樹立した。MWCNT耐性細胞ではWT細胞に比べてキナーゼや細胞外マトリックスおよびレセプター結合関連遺伝子の低下が認められた。

## F. 健康危惧情報

なし

## G. 研究発表

なし

## 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) Rugstad, H. E. and 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

- 6) Ding, L., Stilwell, J., Zhang, T., Elboudwarej, O., Jiang, H., Selegue, J. P., Cooke, P. A., Gray, J. W. and Chen, F. F. (2005) Molecular characterization of the cytotoxic mechanism of multiwall carbon nanotubes and nano-onions on human skin fibroblast. *Nano Lett* **5**, 2448-2464.
- 7) Hirano, S., Kanno, S. and Furuyama, A. (2008) Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* **232**, 244-251



## ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究

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 室長

### 研究要旨

ナノマテリアルの吸入暴露による呼吸器への生体影響の評価手法の確立を目的として、多層カーボンナノチューブ（MWCNT、三井物産(株)提供）での、気管内投与法の有用性を検証した。気管内投与後のMWCNTの遠隔臓器への移行について、肺関連リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、脳を対象とした光学顕微鏡レベルでの検索をおこなった。その結果、気管内投与後、MWCNTが投与用量、時間依存性に肺関連リンパ節に移行することが示された。また、MWCNTの遠隔臓器への移行が気管内投与後1日から脾臓、肝臓、腎臓、脳に認められた。以上、MWCNTの気管内投与法で量-反応関係が明確なデータを得ることが可能であることが実証され、気管内投与法は吸入暴露試験の代替法として利用可能なことが示された。

#### A. 研究目的

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の確立を目的として、多層カーボンナノチューブ（MWCNT、三井物産(株)提供）を用い、気管内投与法の有用性を検証した。ヒトにおけるMWCNTの暴露は吸入による経気道経路が主な曝露経路であることから、動物実験からヒトに外挿には吸入曝露実験の実施が最も望ましいが、ラット60匹収容規模の曝露チャンバーを備えたMWCNTの吸入曝露装置を開発は、技術的に困難であり、性能面でバリデーションされた吸入曝露装置を得るには、少なからぬ開発期間が必要とされる。本研究では、これまでに吸入曝露試験の代替法として気管内投与法によるラットを用いた試験を行い、呼吸器への生体影響の病理組織学的検索を行った。MWCNTの呼吸器への慢性的な影響を考える上で、気管内投与後のMWCNTの体内動態に関する基礎データが重要な要素となる。平成22年度は、気管内投与後のMWCNTの体内動態に関する基礎データを得るために、遠隔臓器への移行について調べる目的で、肺関連リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、脳を対象とした病理組織学的検索を行った。

#### B. 研究方法

##### B-1 ラットを用いた単回気管内投与試験

研究材料はH21年度に実施したMWCNTをラットに単回強制気管内投与した動物のホルマリン固定臓器を用いた。昨年度までの報告と内容が重複するが、試験デザイン、MWCNTの気管内投与、病理標本の作製を次のように行った。

##### 1) 試験デザインとMWCNTの気管内投与

13週齢の雄性F344/DuCrIjラット、1群あたり64匹を用い、MWCNT（三井物産(株)提供）を0（対照群）、40、160  $\mu\text{g}/0.3\text{ ml}/\text{匹}$ の用量で単回気管内投与した。MWCNTの単回気管内投与、後1日、7日、28日、91日目に解剖した（図1）。気管内投与のMWCNT投与用量は、現在利用できるSynthetic graphite粒子の許容曝露限界値 $5\text{ mg}/\text{m}^3$ （US.OSHA PEL for carbon graphite）を参考として、MWCNT  $5\text{ mg}/\text{m}^3$ のエアロゾルを8時間吸入曝露した場合のラットの肺内負荷量（沈着量） $40\text{ }\mu\text{g}$ を低用量群の投与量とし、高用量群には明確な肺毒性影響の発現が期待

出来る 160  $\mu\text{g}$  を投与した。また、肺線維化を起こす陽性対照として  $\alpha$ -Quartz(MIN-U-SIL 5)、160  $\mu\text{g}$  を単回気管内投与した。1 匹当たりの投与量は 0.3 ml/匹とした。投与液は用時調製とし、Tween 80 を 0.1% 添加した PBS に、各設定濃度となる様、MWCNT を加え超音波を用いて懸濁、投与直前に超音波で再拡散させた。気管内投与はイソフルランの吸入による麻酔下で液体気管内投与器具を使用し、気管内に噴霧投与した。対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用した PBS に Tween 80 0.1% 添加溶液を同様に投与した。なお、MWCNT 160  $\mu\text{g}$  群の各解剖期で、別途 2 匹を透過型電子顕微鏡による肺関連リンパ節の超微細形態的検索に供試した。

## 2) 病理組織学的検査

### i) 剖検及び採材

MWCNT を投与した動物の半数 (32 匹) を病理検査に供試した。胸部の諸臓器 (肺、気管、縦隔の組織、リンパ節等) の固定・保存には 10% リン酸緩衝ホルマリンの灌流固定を実施した。灌流固定では、肝門脈から固定液を注入、頸静脈から排出することにより胸部から頭部にかけての諸臓器を固定した。諸臓器を肉眼的に詳細な観察を行った後、胸部臓器を摘出して病理組織学的検査に供試した。肝臓と腎臓については、門脈から固定液を注入する灌流固定方法では、肝臓にアーティファクトを生じることが不可避であることから、肝臓と腎臓の病理組織検査には、気管支・肺泡洗浄液を採取した動物の肝臓と腎臓を用いた。

### ii) 病理組織標本の作製

常法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本作製して病理組織学的検査を行った。はじめに、全臓器について、MWCNT による病理組織学的変化の有無を確認して標的臓器の絞り込みを行った。その結果、肺と肺関連リンパ節に変化が認められたことから、本試験では肺と肺関連リンパ節について、詳細な病理組織学的検索を実施した。肺の病理組織標本は、1 匹の動物から、左肺の主気管支に沿った位置で切り出した組織片と右肺の上葉、中葉、下葉及び副葉を体軸と平行な位置で一括して切り出した組織片各 1 片の合計 2 片について、常法によりヘマトキシリン・エオジン染色を施して病理組織標本作製した。予想される肺の線維化病変については、ヘマトキシリン・エオジン染色に加えて Masson trichrome 染色標本作製して病理組織学診断を行った。

## B- II 気管内投与後の遠隔臓器への移行

MWCNT を単回気管内投与 (平成 20 年度報告) したラットについて気管内投与後の MWCNT の肺外への移行を光学顕微鏡レベルで研究した。単回気管内投与実験における MWCNT の投与量は 0、40、160  $\mu\text{g}$ /匹、解剖時期は単回気管内投与後 1、7、28、91

日、検索動物数は 8 匹 (各用量/各解剖期) とした。MWCNT の肺外への移行について、①と②を検討した。

### ① 肺関連リンパ節への MWCNT の移行:

縦隔部の肺関連リンパ節について H&E 染色標本作製して MWCNT の沈着量の推移を半定量的に調べるとともに、病理組織学的に当該リンパ節に対する毒性影響を検索した。

### ② 全身諸臓器への移行:

脾臓、肝臓、腎臓、脳についてパラフィン包埋、ケルンエヒトロード染色標本を光学顕微鏡で病理組織学的に検索した。スクリーニング調査によって、光学顕微鏡を用いた検索で遠隔臓器内に認識される MWCNT の数は極めて少なく、かつ細く繊細な単繊維で存在することが多いことが予想された。ヘマトキシリン・エオジン染色標本で MWCNT 繊維を検出するのは困難と判断した。

本研究では、光学顕微鏡下の観察で幅 1  $\mu\text{m}$  に満たない細く繊細な黒色繊維として認められる MWCNT を容易に認識することが可能な方法として、細胞の核を赤く染めたケルンエヒトロード染色法標本を用いて検索を行った。また、光学顕微鏡レベルの検索で MWCNT と判断した細く繊細な黒色繊維そのものを、病理組織標本のカバーガラスを剥がして、周囲の組織とともに取り出し、エポキシ樹脂に包埋、透過型電子顕微鏡 (JEM-1400) による超微細形態学的な同定を試みた。

### (倫理面への配慮)

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

## C. 研究結果

気管内投与に散布された MWCNT は縦隔部の肺関連リンパ節 (後縦隔リンパ節 (左側、右側) と傍胸腺リンパ節) に沈着が認められ、沈着の程度は投与量と時間に依存して増加した。また、実験に用いた投与量では MWCNT の移行先のリンパ節に炎症反応は認められなかった。

肺関連リンパ節への MWCNT の移行: 肺関連リンパ節への MWCNT の移行を図 2 に示した。病理組織学的には、リンパ節内に少量の MWCNT を貪食したマクロファージを散在性に認め、多量の MWCNT を貪食したマクロファージの集簇もみられた。炎症反応や肉芽腫性病変はみられなかった。後縦隔リンパ節 (右側、左側) では、投与後 7 日から 40  $\mu\text{g}$  群と 160  $\mu\text{g}$  群ともに MWCNT の沈着が認められた。傍胸腺

リンパ節では、投与後91日にはじめてMWCNTの沈着を160 $\mu$ g群で認めた。後縦隔リンパ節(右側、左側)では、投与後の時間的経過とともにMWCNTの沈着の程度が増加した。

全身諸臓器へのMWCNTの移行: 160 $\mu$ g群での肝臓、腎臓、脾臓への移行は、投与後1日からほぼ100%の動物にみられた(図3)。MWCNTは移行先の組織中に単繊維で存在し、組織反応が認められなかった(図4,5,6)。腎臓の糸球体の毛細血管に沈着していた事例では、透過型電子顕微鏡を用いた超微細形態学的検索(図7)によって、沈着した繊維状物質がMWCNTであることを確認した(図8)。160 $\mu$ g群での脳へのMWCNTの移行は、投与後1日に25%の動物で認められ、28日以降には全ての動物に脳内に移行が認められた。脳での沈着部位は、脳内全域(嗅脳、大脳皮質、間脳、中脳、橋、延髄)であった(図9)。病理組織学的には、多くの事例で単繊維の沈着として毛細血管と関係した部位に認められたが、中には、毛細血管との関係を想定し難い脳実質中に認められた事例もあった。沈着した繊維の周囲組織には炎症等の反応は認められなかった(図10)。脳に沈着していた事例では、走査型電子顕微鏡を用いた検索によって、沈着した繊維状物質がMWCNTであることを確認した(図11)。

#### D. 考察

経気道的に肺に入ったMWCNTの体内動態に関する基礎データを得る目的で、気管内投与後のMWCNTの遠隔臓器への移行についての研究を行った。検索した各臓器(肺関連リンパ節、脾臓、肝臓、腎臓、脳)でMWCNTの移行が確認されたが、移行先の臓器内でのMWCNT沈着の様相は肺関連リンパ節と肝臓、心臓、腎臓、脳で異なるとの結果を得た。肺関連リンパ節へのMWCNTの移行は、MWCNTが食マクロファージが徐々に肺胞壁からリンパ行性に移行したものと考えられた(図12,13)。一方、肝臓、腎臓、脳へのMWCNTの移行は、MWCNTの沈着部位と毛細血管との関係から、血行性に移行した公算が大きいと考えられた。リンパ流路は鎖骨下静脈で血流と合流することから、MWCNTが血流に入る経路として次のような仮説が考えられた。ナノ粒子の脳への移行経路について、Oberdörster et al.は、鼻腔粘膜から脳に至る嗅神経を介した経路を提唱しているが〔1〕、本研究の結果からは、血流を介した移行経路が示差された。MWCNTが血流に入る経路を以下のように考えた。肺内の多くのMWCNTがマクロファージに貪食され、リンパ行性に肺関連リンパ節へと移行し、多くは肺関連リンパ節でトラップされる。肺関連リンパ節でのトラップを免れた単繊維状のMWCNTが鎖骨下静脈から血流中に入り、全身の臓器に移行した公算が大きいと考えられた。肺胞領域で直接毛細血管に入る可能性を含めMWCNTの移行経路について、さらに研究を

進める必要がある。以上、MWCNTの気管内投与法によって、量-反応関係が明確なMWCNTの体内動態に関するデータを得ることが可能であることが示された。しかし、気管内投与法でヒトでの曝露状態を正しく反映させたリスク評価を行うには、まだまだ解明しなければならない事も多い。気管内投与法で行った試験と吸入曝露試験との比較検証を行い、両者で違いが認められる場合には、その間の補正を検討する必要がある。

#### E. 結論

MWCNTの気管内投与法によって、ラットの肺に生じる生体影響に関する量・反応関係が明確なデータを得ることが可能であることがわかった。MWCNTの気管内投与法を吸入曝露試験の代替法として利用するためには、吸入曝露試験との比較検証を行い、両者で違いが認められる場合には、その間の補正を検討する必要がある。

#### 参考文献

〔1〕 G. Oberdörster et al., Translocation of inhaled ultrafine particles to the brain., *Inhalation Toxicology* 16: 437-445, 2004.

#### F. 健康危惧情報

なし。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

###### 1) 書籍

①相磯成敏 ②多層カーボンナノチューブの有害性情報 ③ナノファイバー学会「ナノ材料の安全性」編集委員会編 ④ナノ材料の安全性—世界最前線— ⑤シーエムシー出版 ⑥東京 ⑦2010 ⑧pp.69-94

###### 2) 雑誌

Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-Tin Oxide and Indium Oxide in Rats, *Journal of Occupational Health*: in press.

Ueda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T., Nagano, k., Arito, H. and Fukushima S.: Inhalation Carcinogenicity and Toxicity of 1,2-Dichloropropane in Rats. *Inhalation Toxicology*: 2010,22:1116-1126

○Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation

of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 49: 215-220.

○Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., 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, 48: 783 – 795.

○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, 48: 452 – 459.

## 2. 学会発表

○相磯成敏、笠井辰也、西沢共司、加納浩和、山崎一法、梅田ゆみ、妹尾英樹、

長野嘉介、福島昭治：発がん標的臓器としての鼻腔の重要性、2011年、文部科学省科学研究費補助金がん研究分野の特性等を踏まえた支援活動「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、P-44

○高信健司、相磯成敏、梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、長野嘉介、福島昭治：気管内投与による多層カーボンナノチューブの脳内移行：2011年、第27回日本毒性病理学会、P-103

妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：1-プロモ-3-クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変：2011年、第27回日本毒性病理学会、P-014

○相磯成敏、斎藤美佐江、妹尾英樹、高信健司、梅田ゆみ、戸谷忠雄、長野嘉介、福島昭治：気管内投与した多層カーボンナノチューブの体内動態：2010年、第25発癌病理研究会、演題20

○片桐卓、高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：多層カーボンナノチューブで処理した培養細胞(CHL/IU細胞、BALB/c3T3細胞)の走査電子顕微鏡による観察：2010年、第27回日本毒性病理学会、P-101

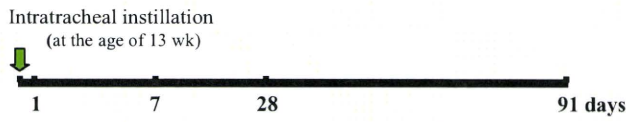
○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、久保田久代、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：ラットに単回強制気管内投与した多層カーボンナノチューブの気管支周囲リンパ組織と縦隔部リ

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、P-3-016

## H. 知的財産所有権の出願・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。

## 1. Preparation and intratracheal instillation



MWCNT

Dose : 160,40,0 $\mu$ g/rat

Solvent : PBS+0.1% Tween80

$\alpha$ -Quartz(MIN-U-SIL 5,US, Sillica)

Dose : 160,0 $\mu$ g/rat

Solvent : PBS+0.1% Tween80

Dose selection

Tentative application of OSHA's PEL for carbon graphite (5.0 mg/m<sup>3</sup>)

MWCNT aerosol at 5.0 mg/m<sup>3</sup> for 6h, 5days

## 2. Translocation of MWCNT to Lung-Associated Lymph Nodes

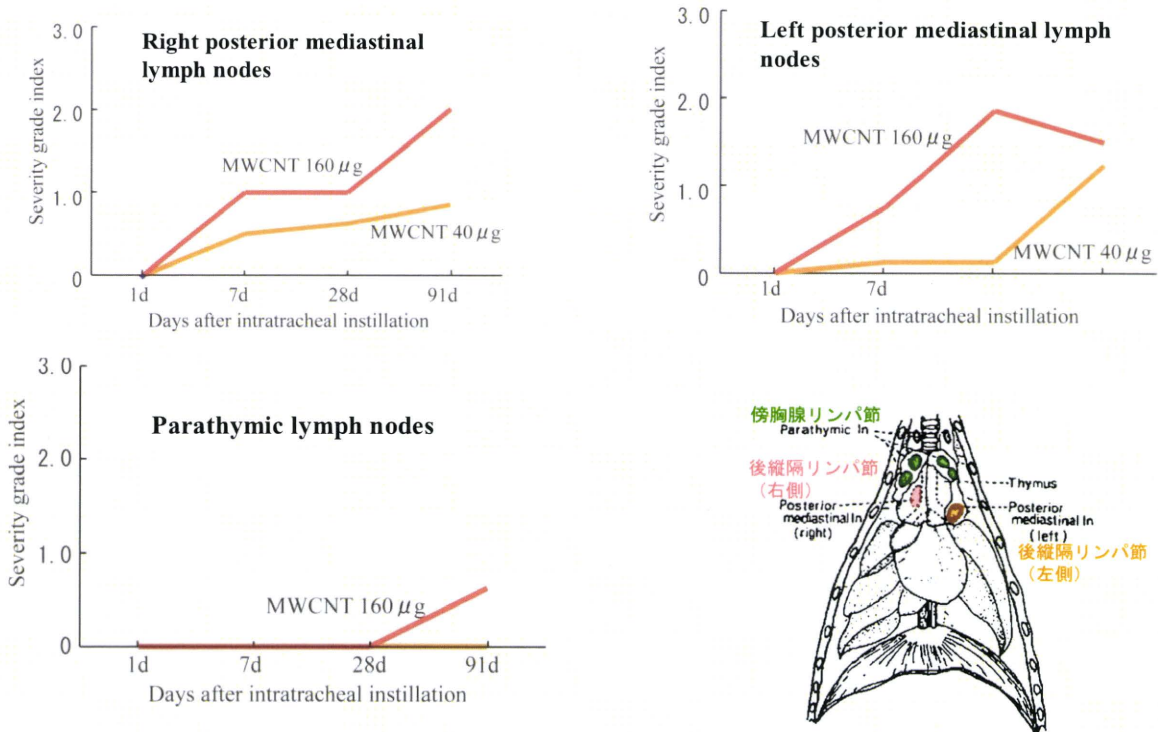
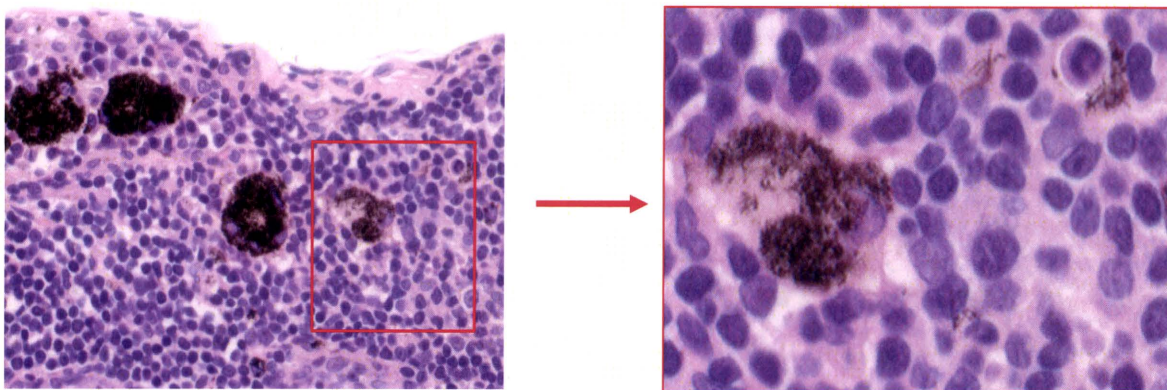
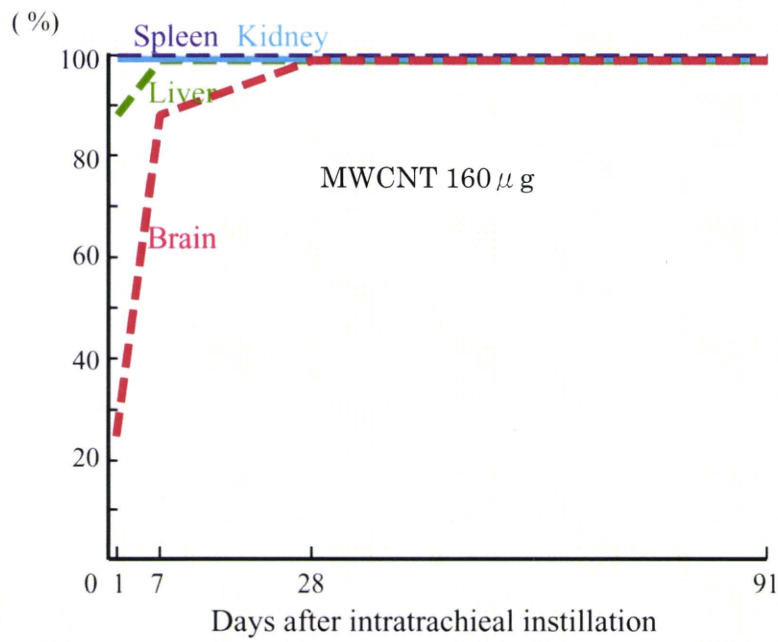


Fig. 2. The location of lymph nodes (In) in the thoracic cavity.

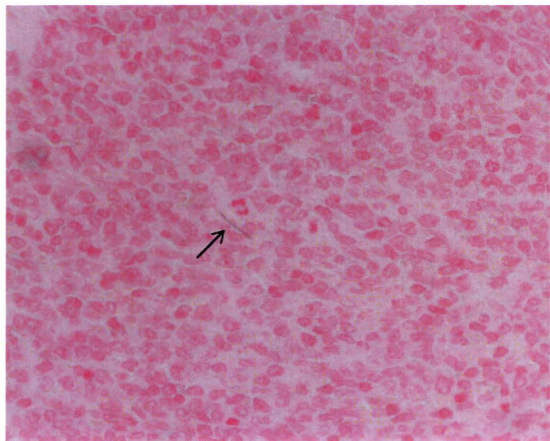


Deposition of MWCNT in the macrophages of the right posterior mediastinal lymph node.

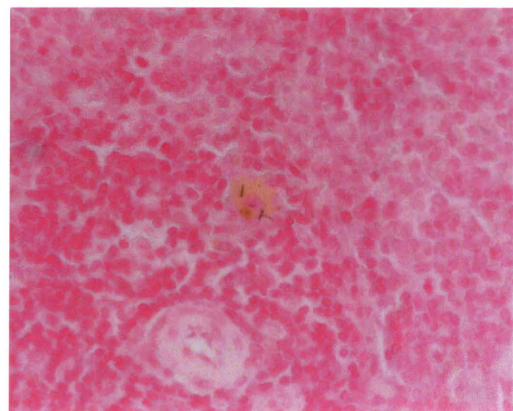
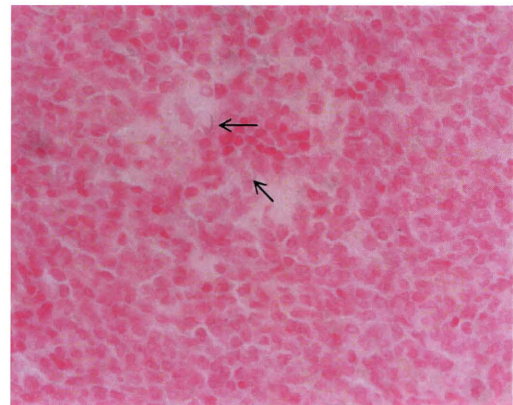
☒3. **Translocation of Intratracheally Instilled MWCNT to Distal organs in Rats**



☒4. **Translocation of MWCNT to the spleen**



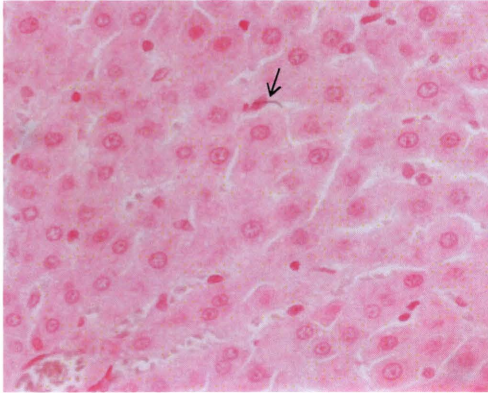
MWCNT 160 µg /rat, 1 days after instillation, Kernechtrot stain



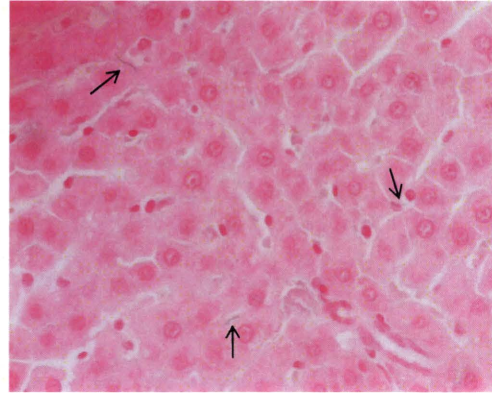
MWCNT 160 µg /rat, 91 days after instillation, Kernechtrot stain

- Single fiber
- Many fibers in large macrophages
- Lack of inflammatory reaction

☒5. **Translocation of MWCNT to the Liver**



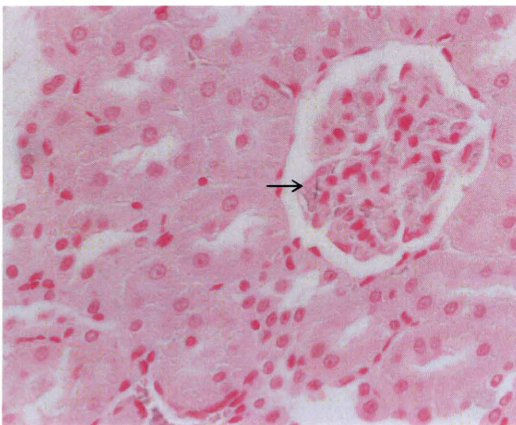
MWCNT 160  $\mu\text{g}$  /rat, 1 days after instillation, Kernechtrot stain



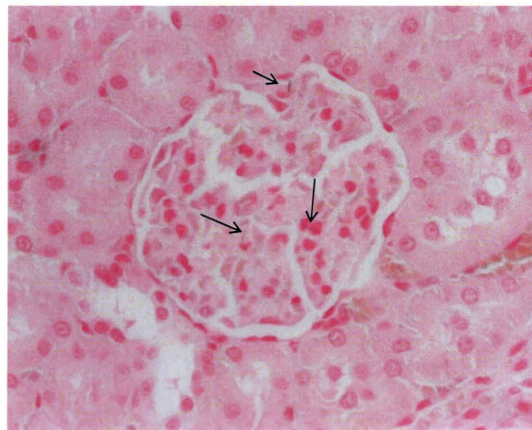
MWCNT 160  $\mu\text{g}$  /rat, 91 days after instillation, Kernechtrot stain

- Fibers were noticed from Day 1 after instillation
- Single fiber
- Fibers were detected in sinusoidal capillary
- Lack of inflammatory reaction

☒6. **Translocation of MWCNT to the Kidney**



MWCNT 160  $\mu\text{g}$  /rat, 1 days after instillation, Kernechtrot stain



MWCNT 160  $\mu\text{g}$  /rat, 91 days after instillation, Kernechtrot stain

- Single fiber
- Relation with glomerular capillary was suggested
- Lack of inflammatory reaction

図7. 光顕切片から電顕試料の作製

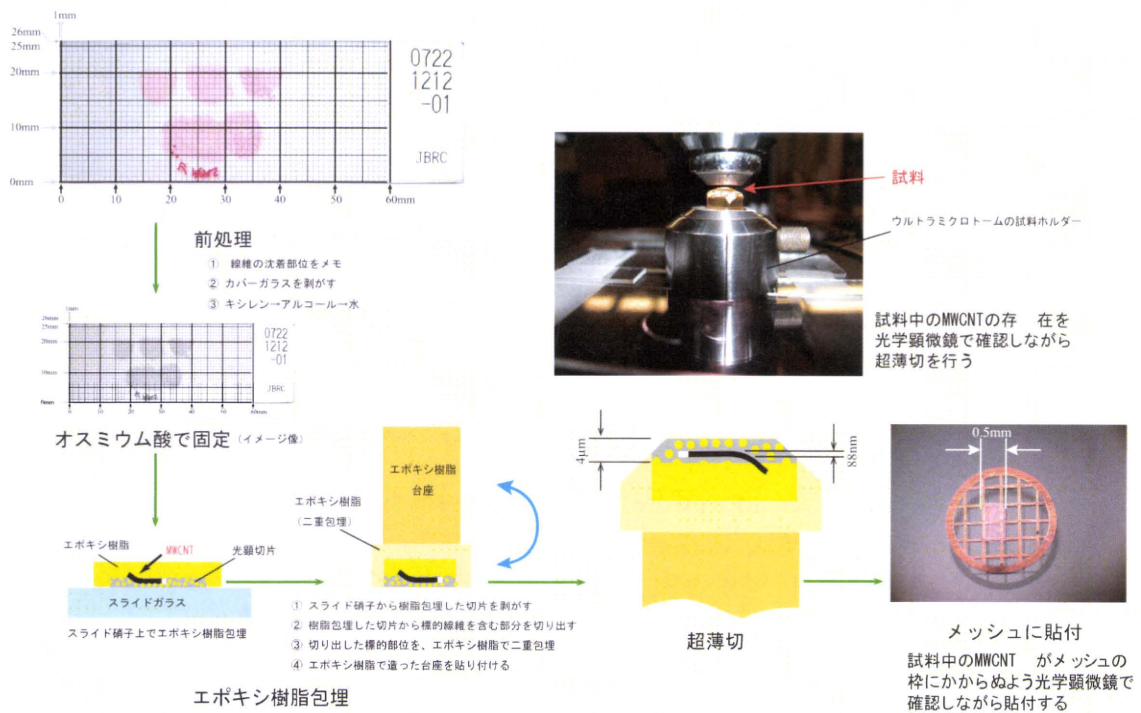
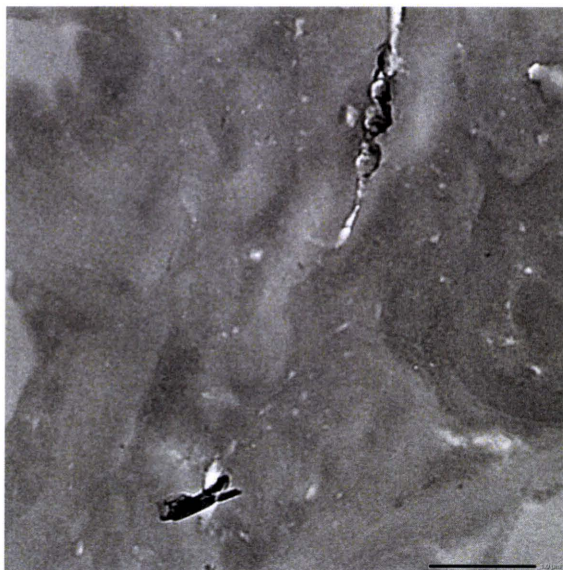


図8. Transmission electron microscopic (TEM) observation for fibers in the renal glomerule



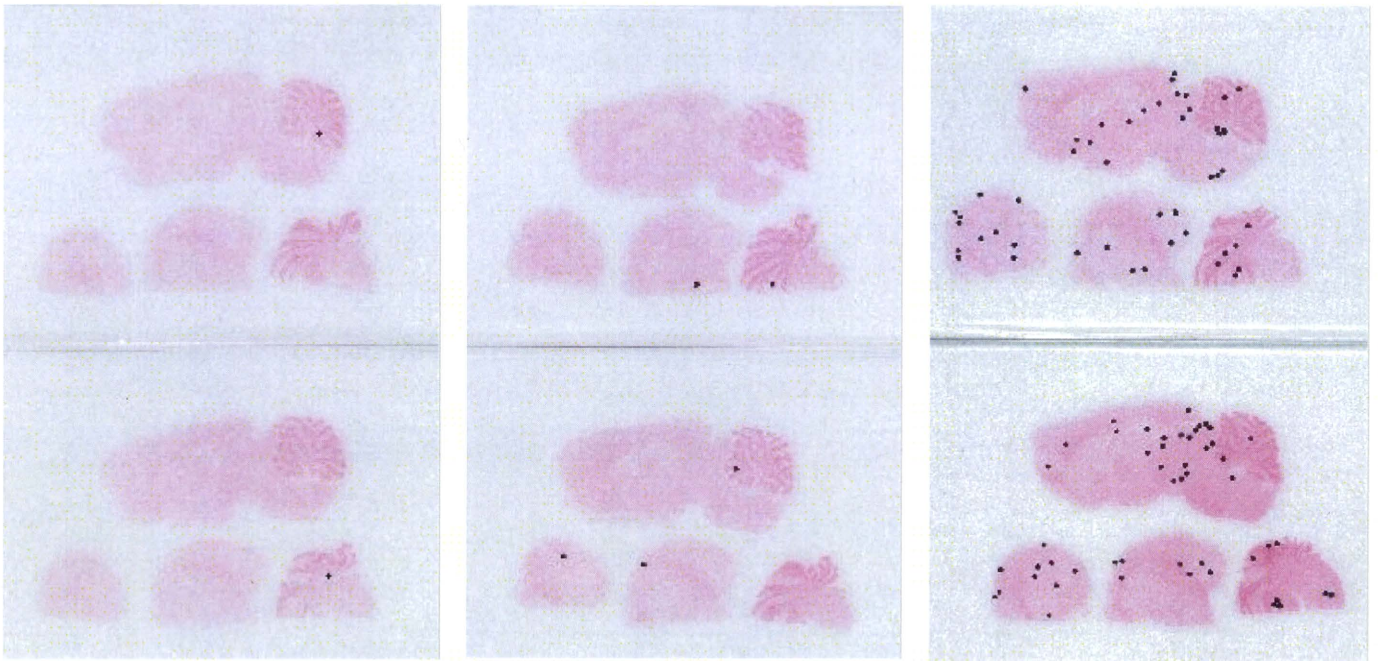
(unstained)



Magnified



☒9. Deposition site of intratracheally instilled MWCNT to in rats brain



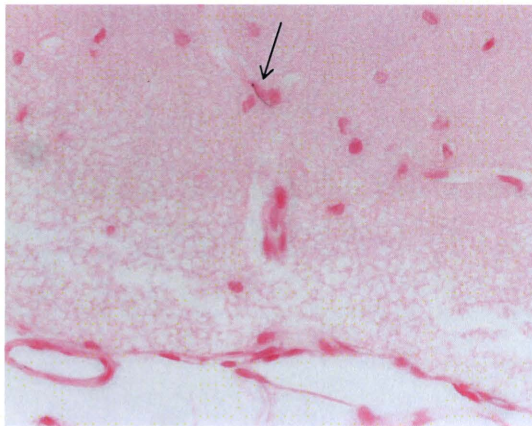
1 day after instillation

7 days after instillation

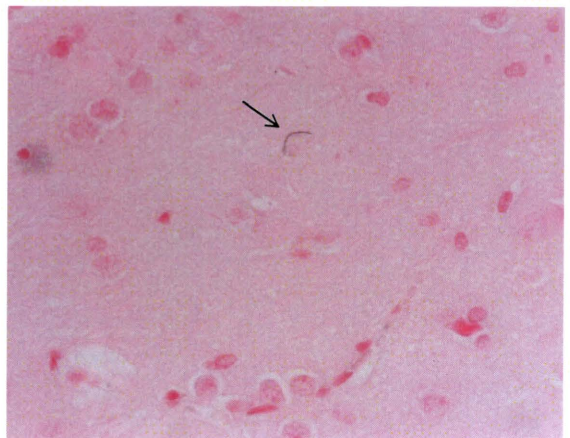
91 days after instillation

MWCNT 160  $\mu$ g/rat

☒10. Translocation of MWCNT to the Brain



MWCNT 160  $\mu$ g/rat, 7 days after instillation  
(Kernechtrot stain)



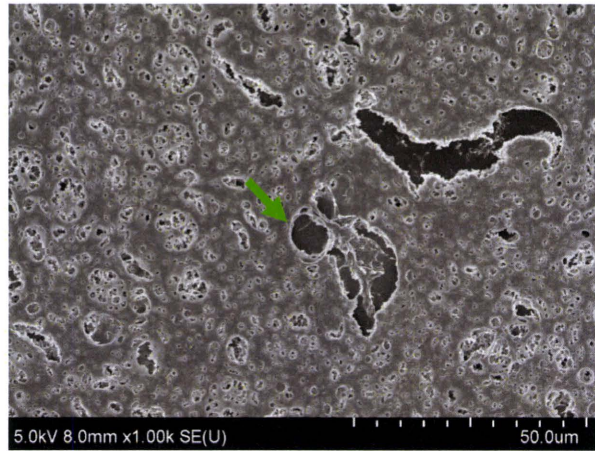
MWCNT 160  $\mu$ g/rat, 7 days after instillation  
(Kernechtrot stain )

- Fibers were noticed from 1 day after instillation.
- Fibers were well dispersed single.
- Fibers were detected in both of capillary and parenchyma of brain.
- Lack of tissue reaction.

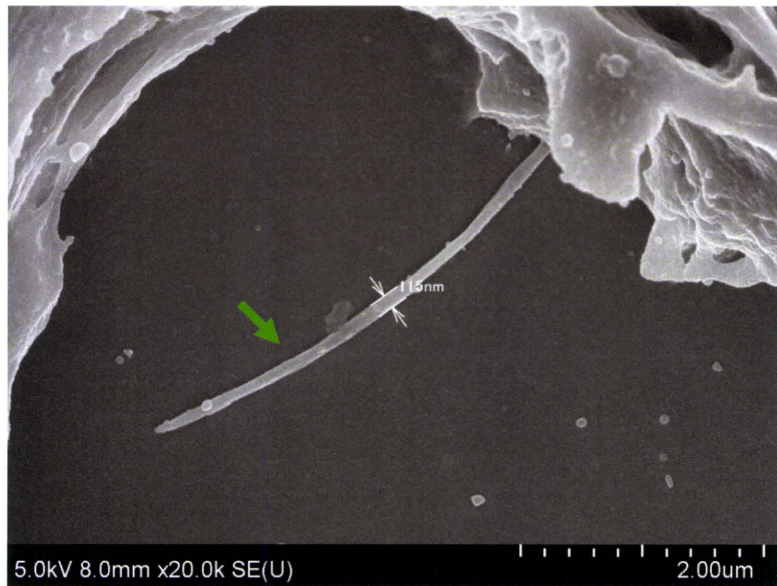
☒11. Translocation of MWCNT to the Brain



H&E, 40 ×

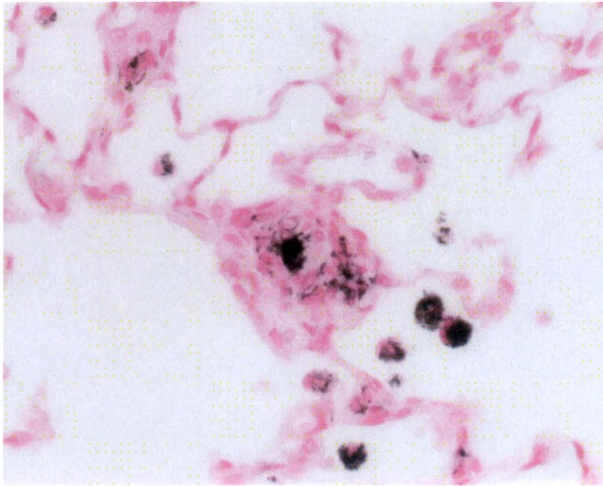


SEM image, 1000 ×



SEM image, 20000 ×

☒12. Pulmonary deposition of MWCNT- in the alveolar wall-

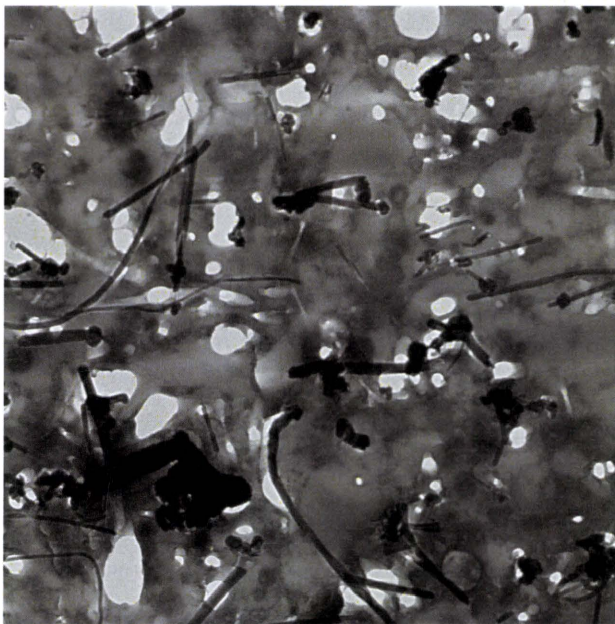


Microgranuloma in alveolar wall

Deposition of black fibers were noticed at the center area of the microgranuloma.

MWCNT 160  $\mu\text{g}/\text{rat}$ , 91 days after instillation  
(Kernechtrot stain)

☒13. Transmission electron microscopic (TEM) observation for fibers in the posterior mediastinal lymph node



Various thickness and Shape.

thin-, thic-, complex shape-fibers

MWCNT fibers engulfed by macrophages.

厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業  
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究  
分担研究報告書

分担研究名 ナノマテリアルの経気道ばく露による肺外影響の評価手法に関する研究

分担研究者 甲田 茂樹 独立行政法人労働安全衛生総合研究所  
研究企画調整部 首席研究員  
協力研究者 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

本分担研究では、ナノマテリアルの経気道ばく露による肺外影響の評価手法に関する研究を担当している。ナノマテリアルの肺外影響を検討する場合、凝集せずにナノサイズで肺外組織まで到達することが重要となる。そこで、本年度は労働現場におけるナノサイズの経気道ばく露の程度を検討するため、CNTを被覆した導電繊維を自動織機によって織物に製造していく工程に注目し、CNTを被覆した導電繊維が自動織機による機械的なこすれ等によって飛散する可能性について検討し、実際の作業現場でナノサイズのCNTにばく露するか否かを検討した。労働現場における作業環境の測定評価による粒子濃度の時間変化の評価や電子顕微鏡による形態変化と炭素分析による評価等を実施した結果、作業点近傍でCNTを被覆した導電繊維の破断物質等は観察できたが、ナノサイズのCNTを観測することはできなかった。実際の労働現場で、労働者がナノサイズの粒子を大量にあるいは一定量、経気道的に取り込むこと可能性は少ないと考える。

#### A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ (Multi-walled Carbon Nanotube: MWCNT、以下CNT) は、グラフェンシートが円筒状に形成され、同心円状に層をなす、主成分が炭素からなる、代表的なナノマテリアルである。軽量で堅牢であり、樹脂等に混合することで導電性を付与できることから、新素材として期待されている。その一方で、生体影響を懸念する動物実験データも発表されており、労働現場でCNTを取扱う場合、予防的にリスク管理を行う事が求められている。

本研究では、ポリエステル繊維にCNTを被覆した導電繊維 (CNTコーティングポ

リエステル加工糸:以下CNTコーティング糸)を用いて、織物を製作する現場において加工糸などの飛散状況を測定・評価し、あわせて電子顕微鏡を用いた観察や炭素分析によって検討した。

なお、このCNTコーティング糸はCNT分散水溶液技術を用いて開発された、CNTによって被覆された導電繊維であり、6団体の産官学コンソーシアム (北海道大学、クラレリビング(株)、茶久染色(株)、松文産業(株)、愛知県尾張繊維技術センターと三井物産(株))の共同開発による地域イノベーション創出研究開発事業の成果であり、本研究は6者のご理解とご協力のもとで実施した。