

B. 研究方法

B-1 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

まず、CNT コーティング糸を用いた織物を製作する現場での加工糸などの飛散状況を測定・評価することとした。作業環境評価の対象場所は自動織機によって CNT コーティング糸の製織作業を行う現場で、作業者が織機近傍で常時作業するわけではないが、ばく露する可能性は十分にある場所である（図1参照）。



図1. CNT コーティング糸の製織現場

作業者は一旦、縦糸と横糸をセットすると機器に不具合がない限りに自動織機の近傍で作業することは少ない

作業環境等の測定点は (A) 織機の近傍 (加工糸に摩擦がかかる場所)、(B) 織機から 1.5m 程度離れた場所、(C) 作業員近傍に研究員が立つ個人曝露測定を想定した測定を実施した (図2参照)。作業中にナノサイズの粒子がどの程度飛散しているかを比較検討するため、対照となる職定ポイントとして (D) 屋外 (工場への空気の入り口)、(E) 異なる建屋の会議室、を定めた。作業環境測定に使用した測定装置は、粒子のリアルタイム個数濃度測定装置として、1.光

散乱式パーティクルカウンター (OPC)、2.凝縮核カウンター (CNC)、3.粒径分布測定装置：走査型移動度粒子計測器 (SMPS)、4.表面積計などである。さらに、個人曝露サンプラーを用いて、測定点 (B) と研究所の職員が作業員近傍 (C) に立って粒子を捕集し、重量測定した。



図2. 現場近傍で個人ばく露の評価

作業員近傍でのナノサイズの粒子の飛散状況を OPC や CNC を用いて評価し、さらには、個人ばく露を想定したナノ粒子の秤量や形態観察のためのサンプルを捕捉解析した。

B-2 電子顕微鏡による形態変化と炭素分析による評価

ついで、作業環境中の試料とコーティング糸自体を電子顕微鏡によって観察した。作業環境試料は織機の上部、織機から 1.5m 程度離れた場所 (粒子濃度等測定場所)、および空気とり入れ口で、シウタスカスケードインパクターを用い、粒径別に気中粒子を捕集した。また、機器表面に付着した炭素の分析のために、1x1.5cm に切り抜いた石英繊維ろ紙で、織機の周囲の 10cm 四方程度の面積を拭き取った。電子顕微鏡観察は、日立製 S-4700 走査型電子顕微鏡

(SEM)で行い、炭素分析はカーボンエアロゾルモニター (Sunset Laboratory 社製) を使用して、加工糸の検出に適した分析条件を設定することにより、CNT の検出と定量を試みた。コーティング糸の形態観察は、加工糸を約 1cm に切りエポキシ樹脂で包埋した。包埋された糸を約 1 μ m 厚で薄切し糸の表面が観察可能であることを光学顕微鏡で確認した後、このブロックを 50nm ~ 80nm 厚で超薄切した。作製した切片を透過型電子顕微鏡 (TEM : FEI Tecnai G² spirit, 120kV) で観察した。

C. 研究結果

C-1 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

定点 (B) では、上記 1~4 の測定装置では作業に対応する明らかな個数濃度の上昇を検出することができなかった (図 3 参照)。粉じん濃度を見ると (B) では 40~60cpm、

(E) では 15cpm であった。工場内では周辺に他の織機があり、同時に稼働していたため、多くは CNT コーティング糸以外に起因する粉じんと思われた。3 を用いて測定した 50nm 以下の粒子と、表面積の値は午後にピークを示したが、建屋内と屋外とで粒径分布が一致した (図 4 参照)。建屋内と屋外で観察されたナノサイズの粒子は、光化学反応により生成した粒子で、作業由来ではないと考えられる。粒子の重量濃度の測定では、総粉じんと PM₄ は B 点では 0.092、0.066 mg/m³、C 点では 0.159、0.093 mg/m³ であった。自動織機近くで作業する場合に粉じんへの曝露が 1.5 倍程度上昇したが、CNT コーティング糸由来であるとは言えなかった。

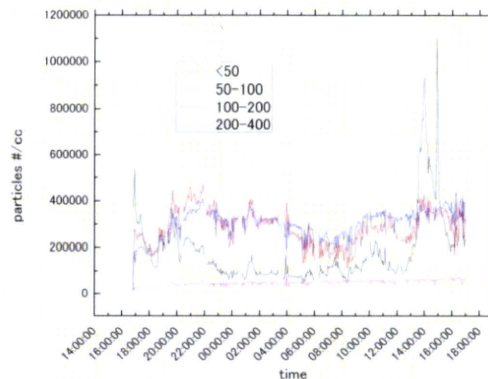


図 3. 作業中の気中ナノ (サブミクロン) サイズの粒子変化

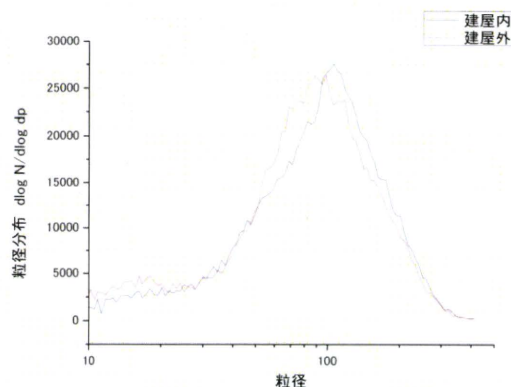


図 4. 作業時間中の建物内外での粒径分布の比較

C-2 電子顕微鏡による形態変化と炭素分析による評価

SEM 観察では、CNT が単独の粒子として観測されることはなかったが、数 μ m の大きさの繊維の断片が多数観察され、一部で表面に CNT と思われる数十 nm の繊維が存在している粒子もあった (図 5 及び図 6 参照)。加工糸を TEM 観察した結果、繊維に塗布された CNT は不規則に絡み合った凝集塊として観察された (図 7-a, b, c を参照)。また、凝集塊が枝分かれし、繊維の表面上で重なっている像も観察された。また凝集塊の表面には、個々の CNT が外側

に向かって飛び出している像等が観察されたが、粒子の SEM 観察結果と矛盾しない結果であった。

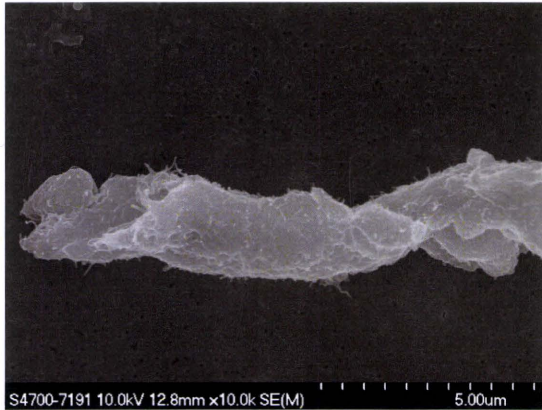


図5. 作業点近傍で捕捉した CNT コーティング糸 (SEM 観察)

作業現場においてシウタスカスケード・インパクトで捕捉した気中粒子の中に、破断した CNT コーティング糸の断片が観察された。

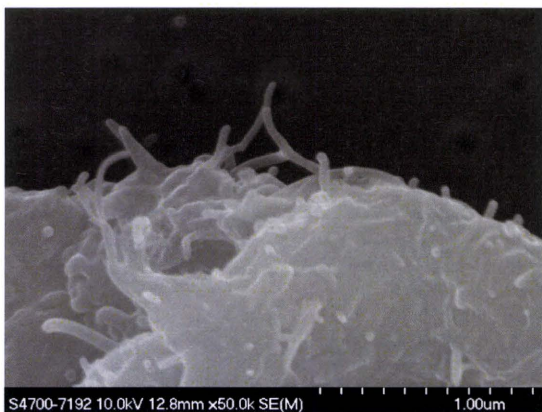


図6. 破断した CNT コーティング糸の拡大 (SEM 観察)

図5を強拡大してみると、破断した CNT コーティング糸より CNT が飛び出している様子が確認できる。

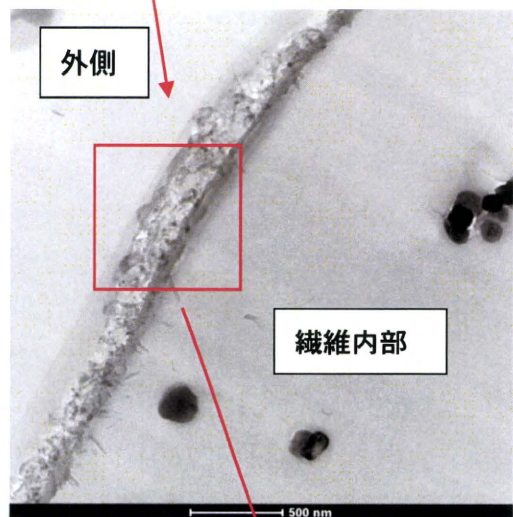
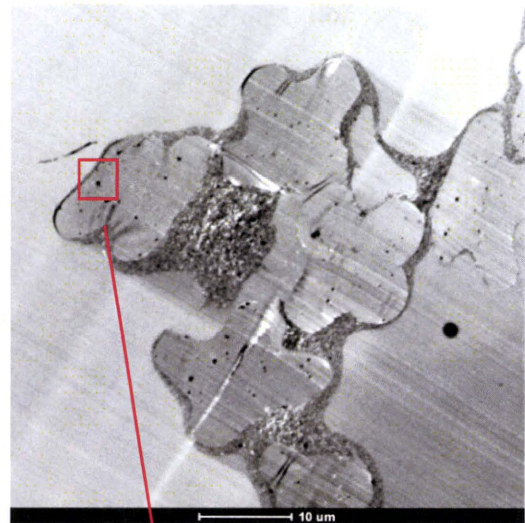


図7-a,-b,-c CNT コーティング糸の TEM 観察像

-a : CNT コーティング糸の縦断面、-b : 繊維の外側には CNT の表面にさらに何かコーティングされているようにも見える、-c : 表面にはループ状に幾重にも絡み合っている CNT が観察される。

空気中に存在している粒子を現場の試料を測定する前にあらかじめ加工糸の原糸ポリエステルと加工に使用した CNT (Bayer 社製 Baytube) について炭素分析を行った。酸素添加の有無でポリエステルと Baytube の分離は行えたが、Baytube は細いために容易に酸化されることと、種々のバインダーを含むため、大気中の炭素成分との分離が難しかった。大気中の炭素と CNT コーティング糸由来の炭素濃度の和から、バックグラウンド空気中の炭素濃度を減じることで、CNT 濃度を概算した。織機上部では $1\mu\text{m}$ 以上の粒子中に CNT が観察され、濃度は 0.002 mg/m^3 であった。作業立ち上げ時には、織機から離れた地点でも $1\mu\text{m}$ 以上の粒子中に 0.001 mg/m^3 が観察された。これらは SEM 観察で見られた加工糸の断片由来のものと考えられる。

さらに、製織作業中に空気中に浮遊していた CNT 粒子ないし CNT を含む繊維断片は時間をかけて沈降し、自動織機やその近辺に堆積している可能性がある。その堆積している粉じん等を $10 \times 10\text{ cm}^2$ 程度の面積を石英繊維ろ紙で拭き取り、炭素分析を行った。炭素分析結果では、明らかな EC3 のピークが見られ、拭き取り試料中に CNT 由来のピークが観察された。これらは織機上部や糸に摩擦がかかる付近の表面から剥離したものであることを示唆している。拭き取り試料の結果をまとめると表 1 のよ

うになる。製織作業により、CNT 粒子の気中放出の可能性は低い一方で、CNT を含む繊維断片が作業環境中に存在するため、この粒子を吸入しないように保護具の着用することが望ましいといえる。

表 1 拭き取り試料の結果

試料拭き取り場所	EC3 (μg)
ロール置き棚上	36.54
ロール置き棚上	2.23
織機の上ロール	0.71
織機上部物差し状のもの付近	10.37
織機裏の吸引口	1.64
織機上ランプ↓↑付近	2.84

D. 考察

著者が所属する研究所では「先端作業における材料ナノ粒子のリスク評価に関する研究」(平成 19~21 年度、研究代表者：鷹屋光俊)において、ナノマテリアル製造現場における作業中の環境測定及び評価などを通じて、労働者がどの程度のナノマテリアルにばく露するのか、検討してきた。本分担研究で検討してきた CNT に関しても現場調査等を数回実施してきた。その結果によると、CNT を含めて多くのナノマテリアルで製品として回収する段階では、サブミクロンサイズまで凝集しており、電子顕微鏡レベルでわずかに一次粒子としてのナノマテリアルを観察できるものの、労働者への個人ばく露評価が可能なほどのナノマテリアルは観察できなかった。すなわち、労働者はナノマテリアルを凝集体としてばく露する可能性は高いが、ナノサイズの粒子のばく露を定量的に把握することは困難であった。今回、本研究で検討した内容は、製品化されたナノマテリアル由来のもので

あったても、機械的な摩擦力等の物理的刺激によって CNT 剥離の可能性に注目し、労働者へのナノサイズでの経気道的なばく露の有無とその程度を検討してきた。結論としては、CNT 粒子が単体で浮遊していることは確認できなかったが、CNT でコーティングされた繊維の断片が作業環境中に存在していたことは確認できた。ナノマテリアルを計測できる機器による作業環境測定結果だけでなく、電子顕微鏡による観察や炭素分析結果などから、定量的にはみていくと、自動織機上部（考え得る限りのホットスポット）で 1 μ m 以上の粒子中に CNT が観察され、濃度は 0.002 mg/m³、自動織機から 2メートル近く離れた地点で 1 μ m 以上の粒子中に 0.001 mg/m³ とかなり低い値が観察された。ただし、これは CNT でコーティングされた繊維の断片であるため、個人ばく露の観点から推測すると、経気道的に取り込むナノレベルの CNT は多くないことが予想される。

E. 結論

CNT に注目し、実際の労働現場でナノサイズの CNT を経気道的にばく露する可能性があるのかどうかを検討した。CNT を被覆した繊維で織物を作成する工程で、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。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

甲田茂樹. ナノマテリアル取り扱いと労働衛生管理. 亘理文夫監修. ナノ材料のリスク評価と安全性対策－生体・環境への影響, 安全性対策・国内外動向－. フロンティア出版. 東京 2010年 p237-241

2) 雑誌

甲田茂樹. 知っておきたいこんな用語（ナノマテリアル, 予防的アプローチ）. 安全衛生のひろば. 第5号, p. 22-23. 2010年

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, 久保田久代, 鷹屋光俊, 甲田茂樹, 有藤平八郎, 福島昭治(2010) 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. 第83回日本産業衛生学会, 産業衛生学雑誌 (suppl.) 52, p601.

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

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吸入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

昨年度実施した酸化チタンのラット単回気管内投与実験について経時的な超微形態学的解析を実施し、X線解析装置(EDS)を用いて肺における酸化チタンの分布を解析した。その結果、投与した酸化チタンは肺胞マクロファージを主として速やかに取り込まれ炎症性変化を引き起こすが、大部分は肺に留まっている可能性が示唆された。電顕観察における結果は光学顕微鏡での観察結果と一致するものであった。

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の酸化チタンを気管内投与したラットの呼吸器系の超微形態学的解析と肺へのチタンの分布についてX線解析装置(EDS)を用いて検索した。

B. 研究方法

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DIMS型経気道用ゾンデを用いて単回気管内投与した。暴露0日(暴露直後)、暴露後1、3、7、14および28日に1群各5匹の動物を解剖し、病理組織学解析を行った(昨年度)。

各解剖時に各群2匹の動物の肺をグルタルアルデヒドで固定後、通常の方法に従いエポン包埋した。投与準超薄切切片を作成し、酢酸ウラニルと鉛の二重染色後、電子顕微鏡にて超微形態を観察された。さらにEDSを用いた細胞内のチタンの分布を分析した。電顕観察は、投与1日、3日および28日の対照群、0.05%群および0.5%群について行った。

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

電顕的に、0.5%群では投与1日目より黒色物が肺胞内およびマクロファージ内の細胞質内に認められ、EDSでは黒色部に一致してチタンおよび酸素が認められた。一部II型肺胞上皮に類似した細胞室内にもチタンが検出された(0.5%投与1日参照)。同群では28日までマクロファージ内に黒色物と一致してチタンが検出された(0.5%投与28日参照)。また黒色物が認められないマクロファージや肺胞内ではチタンは検出できなかった。

黒色物がわずかしか光顕レベルでも検出できない0.05%群では電顕レベルでチタンを検出することはできなかった。マクロファージおよび肉芽組織内にもチタンを検出することはできなかった(0.05%投与3日参照)。対照群に異常は認められなかった。

D. 考察

今回の検索結果より、ラットに気管内投与した酸化チタンは、投与数日は肺胞内にも分布するが、速やかに数日以内にマクロファージに取り込まれることが超微形態学的にも明らかとなった。またマクロファージにとりこまれたチタンが投与後4週間まで、肺マクロファージ内に検出されたことから、酸化チタンはかなり長期にわたり肺胞内に存在する可能性が示唆され、この結果は、昨年度の光学顕微鏡での観察結果と一致するものであった。また、今回の電顕観察の結果、投与1日目にII型肺胞上皮類似の細胞にチタンが検出されたが、その意義は不明であった。

E. 結論

チタンは投与数日まで肺胞内にも存在するが速やかにマクロファージ内に取り込まれ、投与後4週間までマ

クロファーシ内に分布することが明らかとなった。この結果は光学顕微鏡の結果と一致するものであった。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

2) 雑誌

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

② Age-related susceptibility to induction of osteochondral and vascular lesions by semicarbazide hydrochloride in rats.

③Toxicol Pathol.④ 38 ⑤ 598-605 ⑥ 2010

①Yahia D, El-Nasser MA, Abedel-Latif M, Tsukuba C, Yoshida M, Sato I, Tsuda S.

②Effects of perfluorooctanoic acid (PFOA) exposure to pregnant mice on reproduction.

③J Toxicol Sci. ④35 ⑤ 527-33 ⑥2010.

○①Kawanoto K, Sato I, Yoshida M, Tsuda S

②Air purifiers that diffuse reactive oxygen species potentially cause DNA damage in the lung.

③J Toxicol Sci ④35 ⑤ 929-933⑥2010.

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

②Ultrasonic-induced tonic convulsion in rats after subchronic exposure to perfluorooctane sulfate (PFOS).

③J. Toxicol Sci④36 ⑤ 55-62⑥2011 .

①Takahashi M, Inoue K, Koyama N, Yoshida M, Irie K, Morikawa T, Shibutani M, Honma M, Nishikawa A.

② Life stage-related differences in susceptibility to acrylamide-induced neural and testicular toxicity

③Arch Toxicol.④⑤.In press. ⑥2011.

①Taketa Y, Yoshida M, Inoue K, Takahashi M, Sakamoto Y, Watanabe G, Taya K, Yamate J, Nishikawa A.

②The newly formed corpora lutea of normal cycling rats exhibit drastic changes in steroidogenic and luteolytic gene expressions. ③Exp. Toxicol. Pathol, ④⑤In press⑥2011.

2. 学会発表

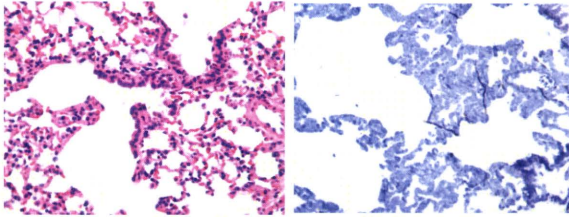
○吉田緑、河部真弓、古川文夫、井上薫、高橋美和、広瀬明彦、西川秋佳: 酸化チタン曝露ラットの肺の経時的変化とチタンの局在. 第37回日本トキシコロジー学会学術年会要旨集 S128、2010年、

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

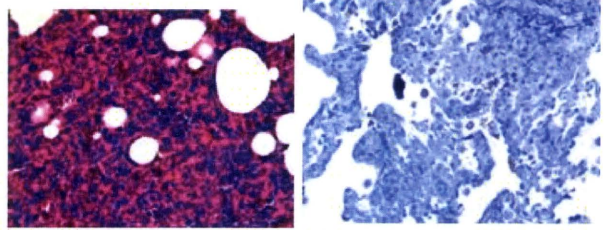
0% Day 1 Lung



異常は認められない(HE標本)

異常は認められない(トルイジンブルー染色標本)

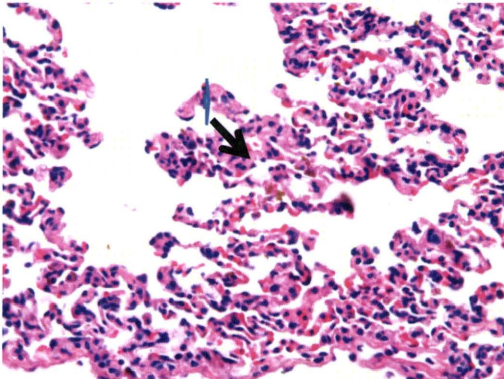
0.5% Day 1 Lung



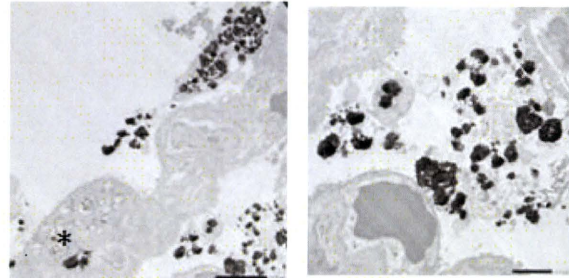
肺胞内には炎症細胞が認められ、黒色物が肺胞およびマクロファージ内に認められる(HE標本)

肺胞内およびマクロファージと思われる上皮内に黒色物が認められる(トルイジンブルー染色標本)

0.05% Day 1 Lung

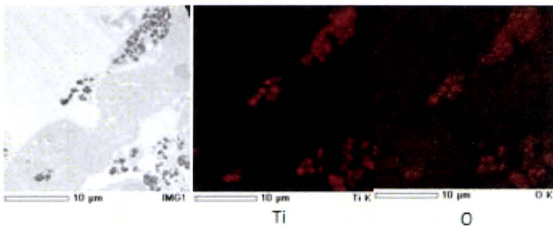


軽度ながら黒色物(?)が肺胞内に認められた(HE標本)

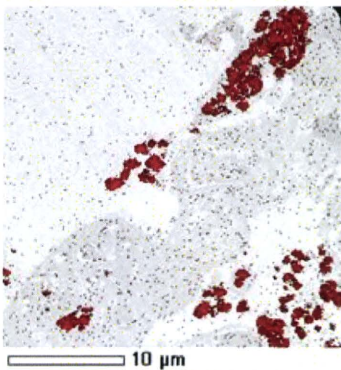


EM1 肺胞内、マクロファージ内に黒色物が認められる。II型肺胞上皮内と思われる細胞内(*)にも黒色物が認められる(酢酸ウラニル・鉛二重染色標本 bar=1 μm 以下同様)

0.5% 投与1日

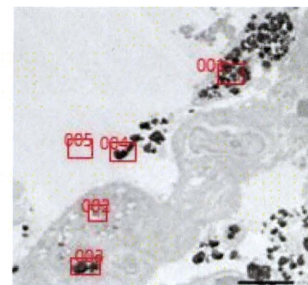


黒色部とチタンおよび酸素の分布

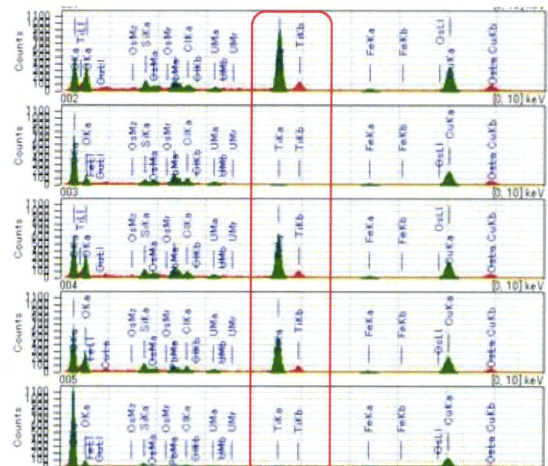


黒色部とチタンの分布が一致

EM 1: EDS analysis in fibroblasts of 0.5% at Day 1



黒色部にチタンが検出。II型肺胞上皮と思われる細胞内の黒色物003にもチタンが検出された。

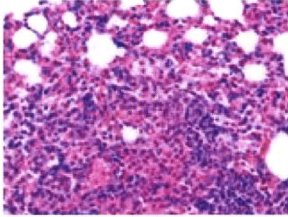


EM 1: EDS analysis in fibroblasts of 0.5% at Day 1

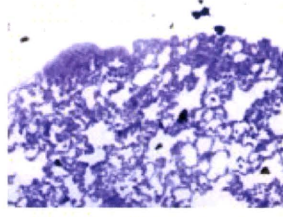
チタン

0.5% 投与1日

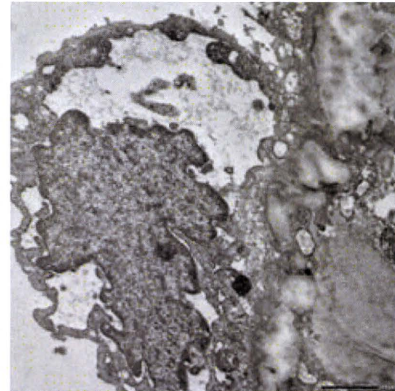
0.05% Day 3 Lung



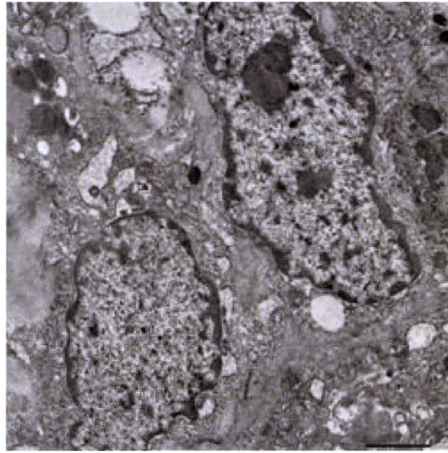
肉芽組織内のマクロファージには色素は殆ど認められない(H&E染色標本)



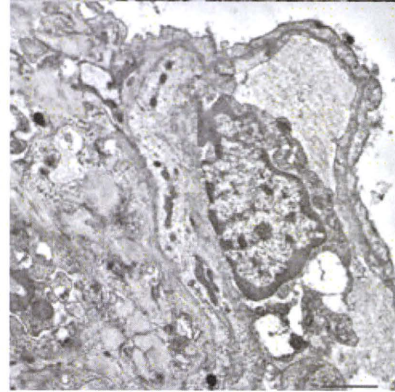
肉芽組織内のマクロファージには色素は殆ど認められない(semi thin section, トルイジンブルー染色標本)



EM2: Mesothelium 異常は認められない

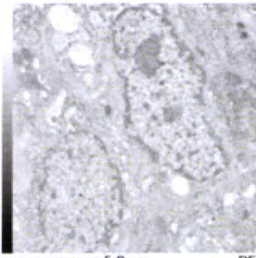


EM1: Fibroblasts in granulation tissue 異常は認められない

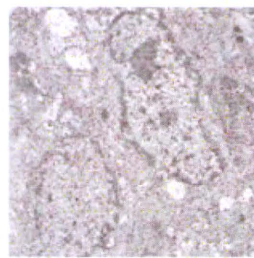


EM3: Mesothelium 異常は認められない

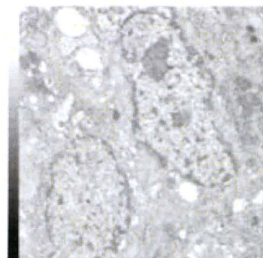
0.05% 投与3日



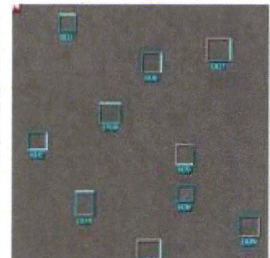
5.0 μm BF



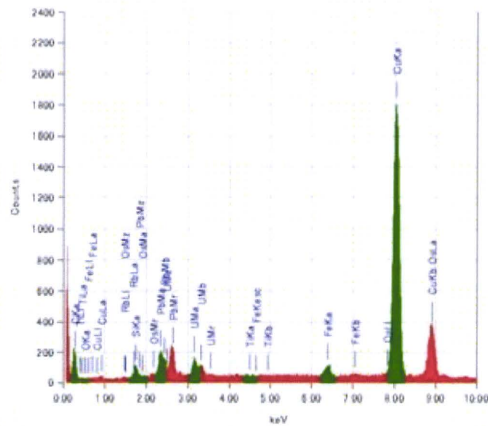
5.0 μm



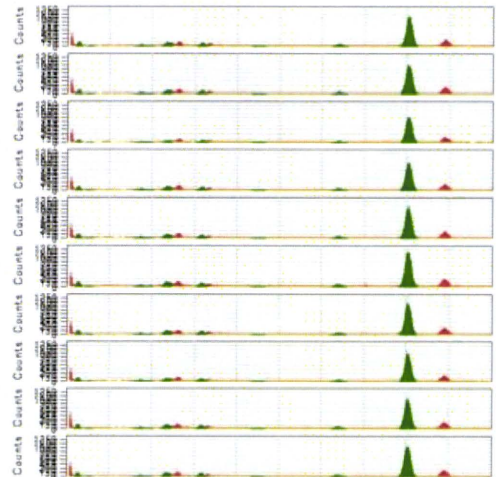
5.0 μm BF



40 μm

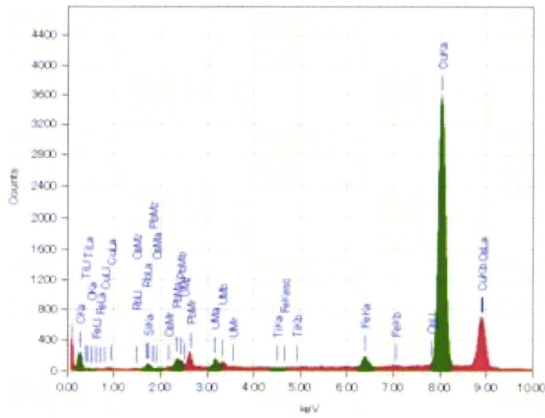
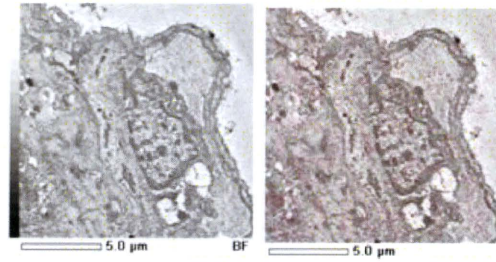
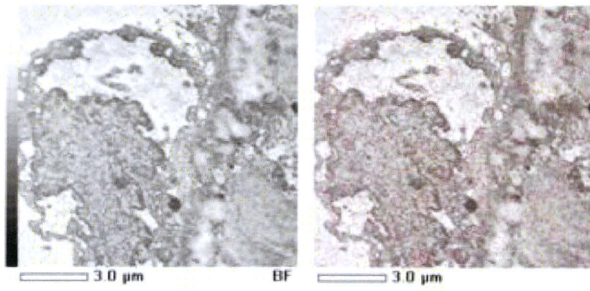


EM 1: EDS analysis in fibroblasts of 0.05% at Day 3

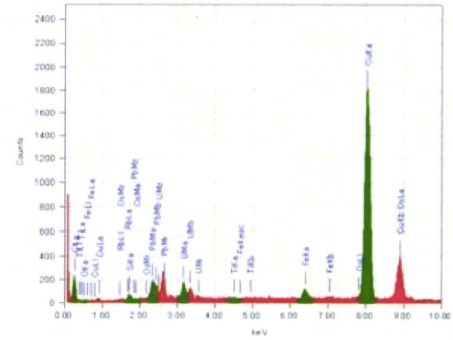


EM1: EDS analysis in the fibroblasts of 0.05% at Day 3

0.05% 投与3日



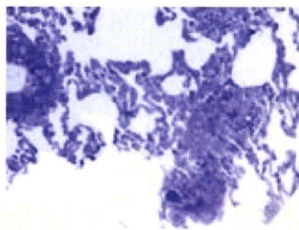
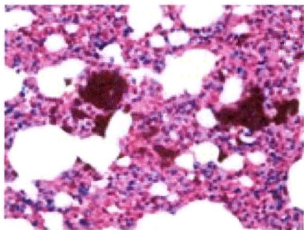
EM2:EDS analysis in the mesothelium of 0.05% at Day 3



EM3: EDS analysis in the mesothelium of 0.05% at Day 3

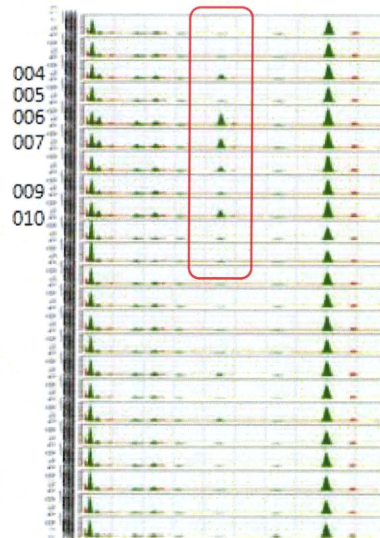
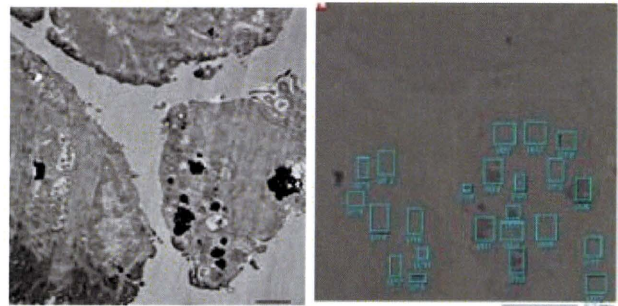
0.05% 投与 3 日

0.5% Day 28 Lung



肉芽組織内に黒色物を入れるマクロファージの集簇が認められる(H&E染色標本)

肉芽組織内に黒色物を入れるマクロファージの集簇が認められる(semi thin section, トルイジンブルー染色標本)

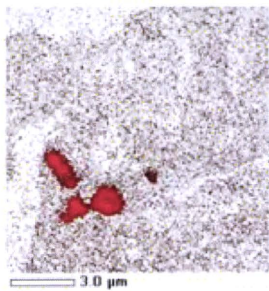
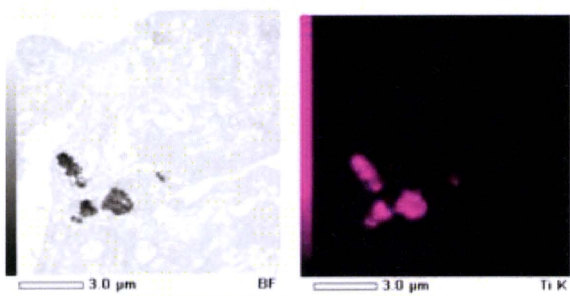


EM1: EDS analysis in the macrophage of 0.5% at Day 28

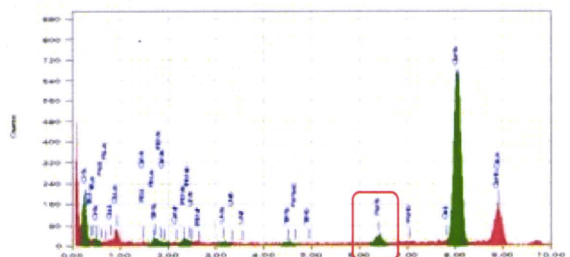
マクロファージ内の黒色部にチタンが検出

チタン

0.5% 投与 28 日

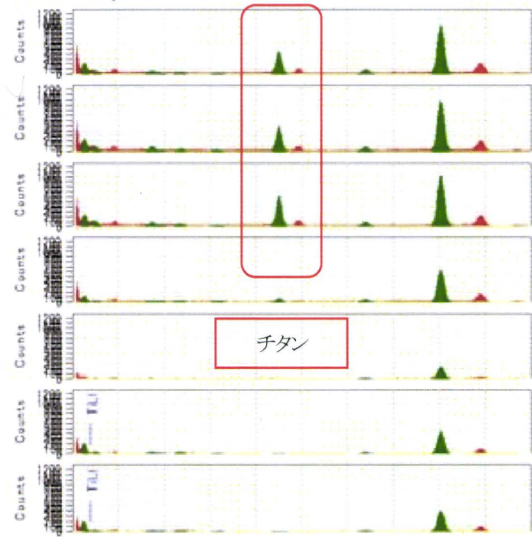
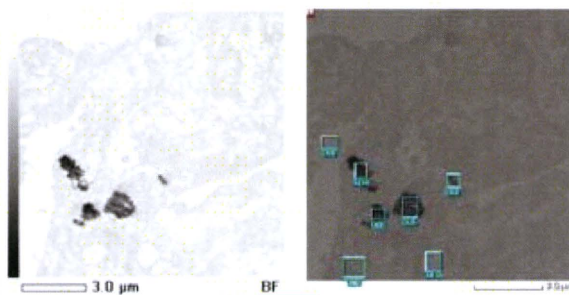


マクロファージ内の
の黒色部にチタン
が検出



EM2: EDS analysis in the macrophage of 0.5% at Day 28

チタン



マクロファージ内の黒色部にチタンが検出

EM2: EDS analysis in the macrophage of 0.5% at Day 28

0.5% 投与 28 日

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）を前年度に引き続いて行なった。その結果、炎症、酸化ストレス、線維化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行うため、NIOSH式マルチウオールカーボンナノチューブダスト発生装置を購入し、焼却可能なディスポーザブル暴露チャンバーを開発するとともに、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、コンプレッサー・配管工事を行い、散塵防止動物用カートとともに設置した。マルチウオールカーボンナノチューブを用いた発生器の能力試験、総合運転試験、濃度測定試験などを行った後に、動物への暴露を行う。

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。

マルチウオ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、動物への暴露法を検討し、検討した方法を用いて動物に暴露を行う。同時に、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、適切な方策を講じて暴露実験を遂行する。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現解析

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対象に詳細なマイク

ロアレイデータ解析を実施した。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、得られた肺のサンプルを用いた。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。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

西沢共司班員が担当した部分を引き継ぎ、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構築設置し、動物に暴露する。

初年度に、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、報告した。

二年度より、ナノマテリアルの吸入暴露法を開始した。MWCNT は静電気を帯びやすいといわれ、MWCNT は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。米国 NIOSH から、効率良く微細粉塵を作り出し供給できる発生器の作成が報告された。この発生器を検討し使用することが妥当であろうと考え、これを発注し購入した。

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環境保全型動物飼育棟内に暴露機器を設置することで、周囲の環境への排出を防止する対策を講じた。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対策とともに、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、実験終了後の廃棄処理法が重要となる。本暴露装置を設置する動物室は、排気処理、排水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収納可能な物以外の搬出が禁じられ、被検物質を環境へ排出させない方策を講じている。処理箱は密閉され高温焼却施設に搬送後、焼却されるが、この処理箱に入らない大きな物は、棟外への持ち出しができない。MWCNT ダスト発生器は棟外へ搬出できないが、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。既存の金属製暴露チャンバ

ーについては細断不能であり、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にクリーンアップする、あるいはこれに代わる樹脂製のディスポーザブル暴露チャンバーを開発する必要があった。今回開発したディスポーザブル暴露チャンバーは軟性樹脂薄膜を用い、チャンバーの天板部分は細断可能に製作することで、焼却処理箱内へ収納し焼却することが可能となり、これにより MWCNT の環境への排出を防ぐこととした。

(倫理面への配慮)

吸入暴露などを行った動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸動脈切去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。

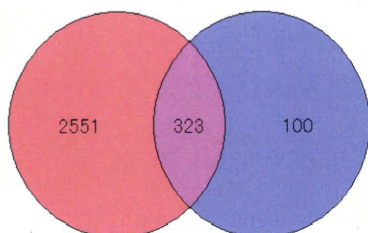
C. D. 研究結果及び考察

1. 遺伝子発現解析

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。1copy/cell 以上の発現量を示す遺伝子で有意 ($p < 0.01$) に増加した遺伝子数は1ヶ月目の MWCNT 40 $\mu\text{g}/\text{animal}$ 投与群 (L 群) では 820 遺伝子、MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{animal}$ 投与群 (H 群) では 2874 遺伝子、Quartz 160 $\mu\text{g}/\text{animal}$ 投与群では 423 遺伝子、3ヶ月目の MWCNT の L 群では約 211 遺伝子、MWCNT の H 群では 1546 遺伝子、Quartz 群では 3032 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 203 遺伝子であり、その他の群及び 3M ではいずれも 40 遺伝子以下であった。以下、同じ投与量である MWCNT の H 群と Quartz 群を対象に解析を行った。変動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。ジーンオント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 1ヶ月目及び 3ヶ月目の MWCNT 及び Quartz 各投与群とも多かった。また、1ヶ月目の MWCNT

及び Quartz 群で免疫反応、炎症反応に関連する遺伝子が共通して増加した。

A)



B)

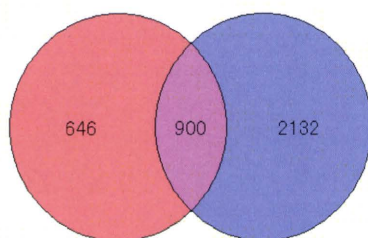


図 1. ナノマテリアル投与ラット肺で有意に増加した遺伝子数のベン図

A) 1ヶ月後、B) 3ヶ月後

赤：MWCNT (H 群)

青：Quartz

次に、遺伝子発現プロファイルとして3種、すなわち 1) MWCNT (H 群) と Quartz で共に増加する遺伝子、2) MWCNT (H 群) でのみ増加する遺伝子、3) Quartz 群のみ増加する遺伝子に分けて、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 (H 群) と Quartz で共に増加する遺伝子では、Antigen presentation pathway、B cell development、Allograft rejection signaling、Communication between innate and adaptive immune cells、Altered T cell and B cell signaling in rheumatoid arthritis 等の炎症・免疫反応に関連するシグナリングが抽出された。MWCNT (H 群) でのみ増

加した遺伝子では Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages and monocytes (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。その他、CD28 signaling in T helper cells や oxidative phosphorylation の系が抽出された。Quartz でのみ増加した遺伝子では cell death、protein synthesis 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 Nur77 signaling in T lymphocytes、Antigen presentation pathway など炎症に関連するパスウェイの系が抽出された。また、Oxidative phosphorylation、Mitochondrial dysfunction などのミトコンドリアに対する影響を示唆する系が抽出された。MWCNT (H 群) でのみ増加する遺伝子としては、Infection disease、Infection mechanism が、Quartz 群でのみ増加する遺伝子では protein synthesis、Infection mechanism の系がそれぞれ抽出された。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 群で用量に相関して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。

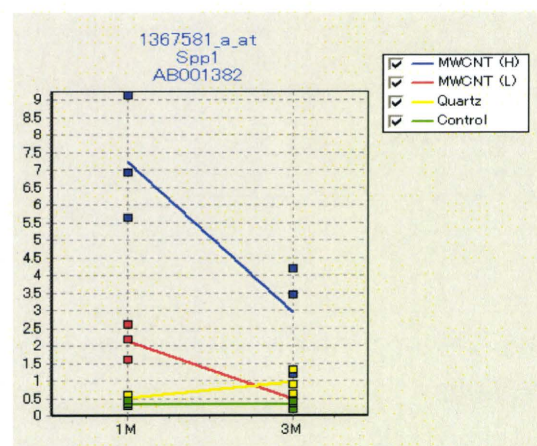
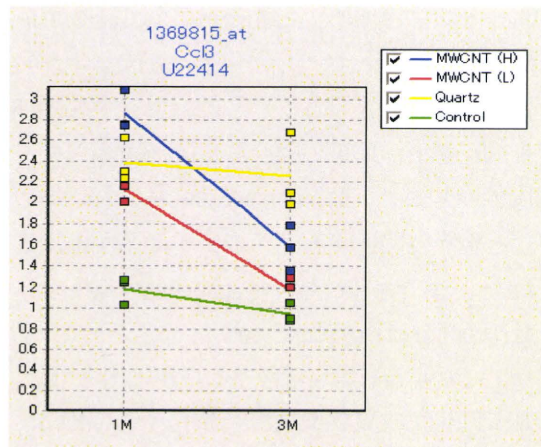


図 2. オステオポンチン遺伝子の発現増加

* 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell) 以下同様

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、Ccl9、Ccl13 (図 3 参照)、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。

A)



また、酸化ストレス反応遺伝子として SOD2 の増加が 1 ヶ月後の MWCNT 及び Quartz 群で認められ (図 4)、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。

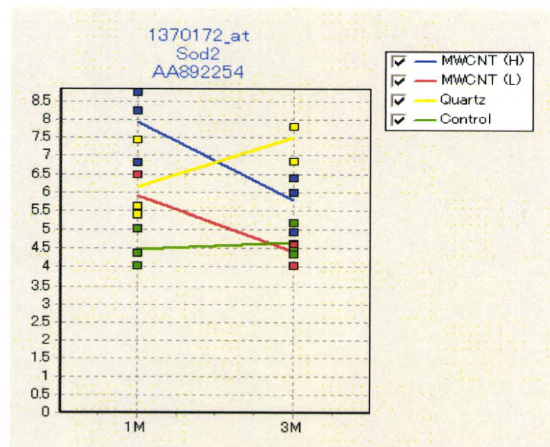


図 4. 酸化ストレス反応性 SOD2 遺伝子の増加

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 (図 5) 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。

B)

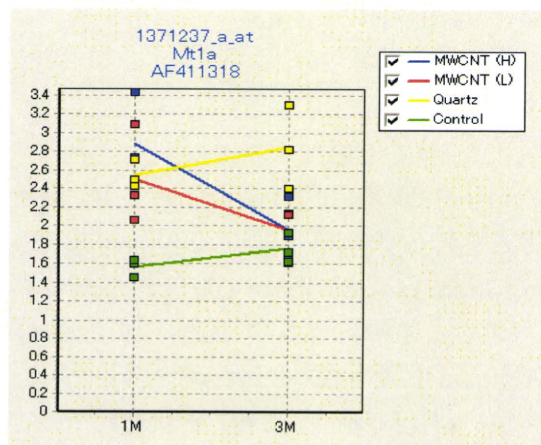
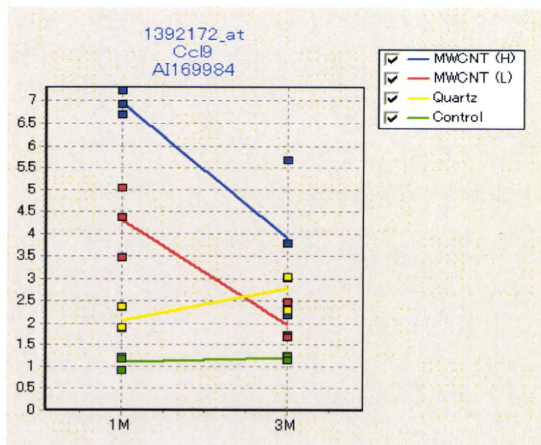


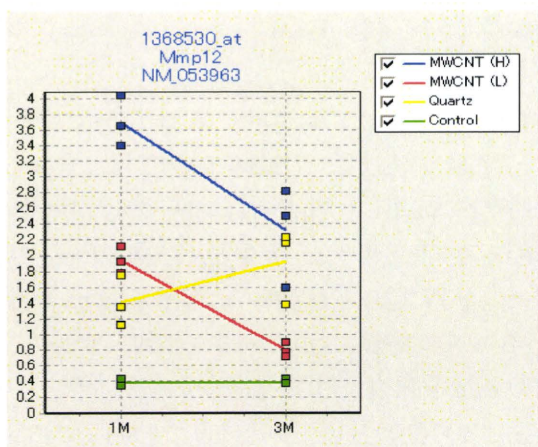
図 5. 酸化ストレス反応性メタロチオネイン 1a 遺伝子の増加

図 3. ケモカインである Ccl13 及び Ccl9 遺伝子の発現増加

A) Ccl13、B) Ccl9

また、組織の線維化、抗線維化に働く酵素の MMP-12、MMP-14 (図 6)、抗線維化に働くカテプシン K が各検体投与群で増加した (図 7)。

A)



B)

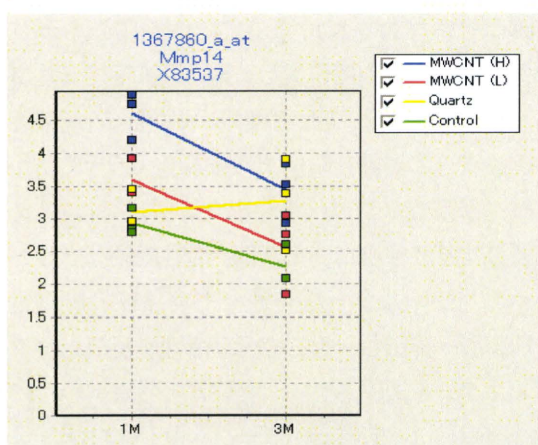


図 6. 線維化・抗線維化酵素 MMP-12、MP-14 遺伝子の増加

A) MMP-12、B) MMP-14

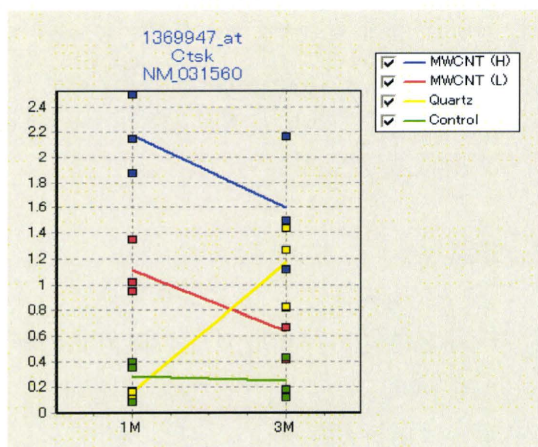


図 7. 抗線維化酵素カテプシン K 遺伝子の増加

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 8) 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。しかし、その他の Gadd45a、Rad17、Rad23b、Rad50、Xrec 等を含む DNA 修復関連遺伝子の発現に変化は認められず、DNA 障害が生じていることを示す明らかな遺伝子発現レベルでの変化を同定することは出来なかった。本実験では、1 及び 3 ヶ月後に限定して遺伝子発現変化を調べており、より早期での遺伝子発現変化を確認する必要があると思われた。なお、減少遺伝子については有意に変動する遺伝子が増加遺伝子と比較して、少数例存在したが、毒性学的変化と関連づけられるものは無かった。

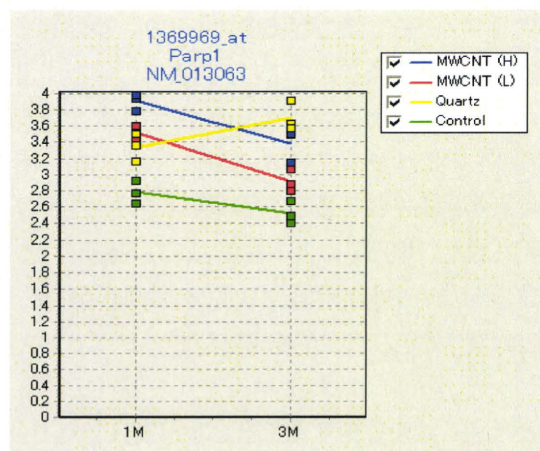


図 8. Parp1 遺伝子の増加

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、初年度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、またミストを加熱乾燥させたダスト中には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により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。前年、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かなう方法であると考えた。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、MWCNTと鉄球が衝突することにより、両者への破壊作用が起こることが考えられ、動物へ暴露されるMWCNTの形状及び成分が、実際に製造現場や使用者が暴露されるMWCNTとは異なる可能性が考えられた。MWCNT以外の粒子の混在を疑われることがなく形態的にも二次的変形が加わらず、12mg/m³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考えこれを採用することとし、購入した(写真1)。

McKinneyら¹⁾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式での発生器をさらに2台製作し、環境配慮型実験棟内に設置、発生器用のエアーコンプレッサー、ディスポーザブル暴露チャンバー(写真2)等の設置及び配管工事を行い、吸入暴露システム

が構築された。動物への暴露実験を行うための検討を行っている。

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、ケージを積載するカートの上面外側に陰圧による空気の流れを作ることにより動物とケージに付着した検体が室内へ飛散するのを防止する運搬台車を使用する。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、活性炭及びウルトラヘパ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ヘパ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、防塵衣、ゴーグル及び高性能マスクは焼却箱内へ投棄、エアーシャワー室でさらに除塵退室する。焼却箱は完全密閉した後に搬出され、専門の業者の手によって高温焼却される。MWCNTの暴露試験終了時には、飛散しないよう内部を油脂でコーティング後ディスポーザブル暴露チャンバーをたたみ、天板は裁断して全てを焼却できるよう、樹脂製暴露チャンバーを製作設置した。

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

音響振動を用いMWCNTのダストを発生させる機器を3台設置することができた。また、ディスプレイ暴露チャンバーを3台、コンプレッサー等の設置配管を行い、吸入暴露システムが構築された。MWCNT発生器の能力試験、総合運転試験、濃度測定試験などを行っており、今後動物への暴露を行う。

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、実験者及び環境への安全が確保できる対策を講じた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

○Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. : Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J Toxicol Sci. 2008 Feb; 33 (1) : 105-16.

Ishimaru N, Takagi A, Kohashi M, Yamada A, Arakaki R, Kanno J, Hayashi Y. : Neonatal exposure to low-dose 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin causes autoimmunity due to the disruption of T cell tolerance. J Immunol. (2009) 15;182 (10) :6576-86.

Kawasaki Y, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kanno J, Kodama Y, Matsushima Y, Ogawa Y, Saitoh M, Sekita K, Uchida O,

Umemura T, Yoon BI, Inoue T., Benzene-induced hematopoietic neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice., Toxicol Sci. 2009 Aug;110 (2) :293-306.

2. 学会発表

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純：シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome解析、2008年、第35回日本トキシコロジー学会学術年会

○高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、菅野 純：p53+/-マウス腹空内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について、2008年、第35回日本トキシコロジー学会学術年会

○TAKAGI, A, KITAJIMA, S, NAKATSU, N, IGARASHI, K, AISAKI, K, EMA, M AND KANNO, J: Quantitative microarray analysis by "Percellome" method on murine embryonic stem cells and embryoid bodies, 47th Annual Meeting of Society of Toxicology, 2008. 3. USA

菅野 純、広瀬明彦、高木篤也：ナノマテリアルの毒性試験、毒性評価、2008年3月28日、日本薬学会第128年会

○Polouliakh N, Matsuoka Y, Ghosh S, Nock R, Nielsen F, Kitajima S, Takagi A, Aisaki K. I, Kanno J, Kitano H, Signaling network in Mouse Embryonic Stem Cells The 9th International Conference on Systems Biology, Aug. 22-28, 2008, Sweden, poster

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司、肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応答のPercellome解析、2009年3月28日、薬学会第129年会

○菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、北嶋聡：多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、2009年5月3日、第98回日本病理学会総会

○広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、菅野 純：ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、2009年7月8日、第36回日本トキシコロジー学会学術年会

○Kanno, J, Takagi, A, Nishimura, T, Hirose, A: Long-term animal testing of nanoparticles for detection of chronic toxicity, 4th International Conference on Nanotechnology - Occupational and Environmental Health (NanOE2009), 2009. 8. 28, Helsinki, Finland

○Kanno, J, Takagi, A, Hirose, A, Nishimura, T, Fukumori, N, Ogata, A, Ohashi, N, and Kitajima, S: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube, The 5th International Congress of Asian Society of Toxicology (ASIATOX V), 2009. 9. 12, Taipei,

○Kanno, J, Takagi, A, Nishimura, T, Hirose, A: Mesothelioma induction by micrometer-sized multi-wall carbon nanotube intraperitoneally injected to p53 heterozygous mice. the 49th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2010. 3. 9, Salt Lake City, USA

○広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江 大、樋野興夫、菅野 純：ナノマテリアルの慢性影響、2010年、日本薬学会第130年会

高木篤也、北嶋聡、五十嵐勝秀、相崎健一、江馬眞、菅野純、Percellome手法を用いたTCDD投与マウスの胎児口蓋の遺伝子発現解析、第37回日本トキシコロジー学会学術年会 (2010. 6. 17) (沖縄)、口演

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, 1-9, iFirst.
- 2) Yuji Fujitani, et al., Generation of Airborne Multi-walled Carbon Nanotubes for Inhalation Studies. Aerosol Science and Technology, 2009. 43: 881-890

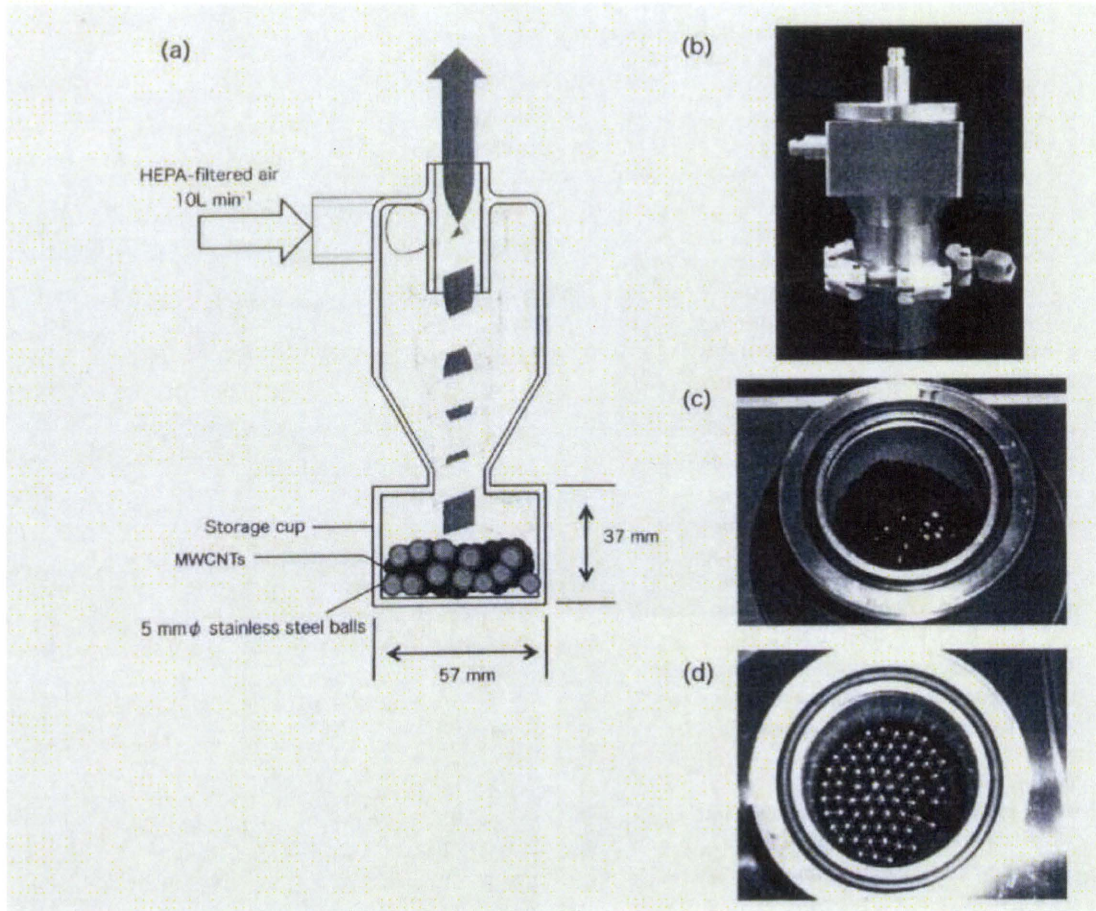


図6. Fujitaniら²⁾の開発した鉄球の上下振動を用いた発生器 (文献より転載)

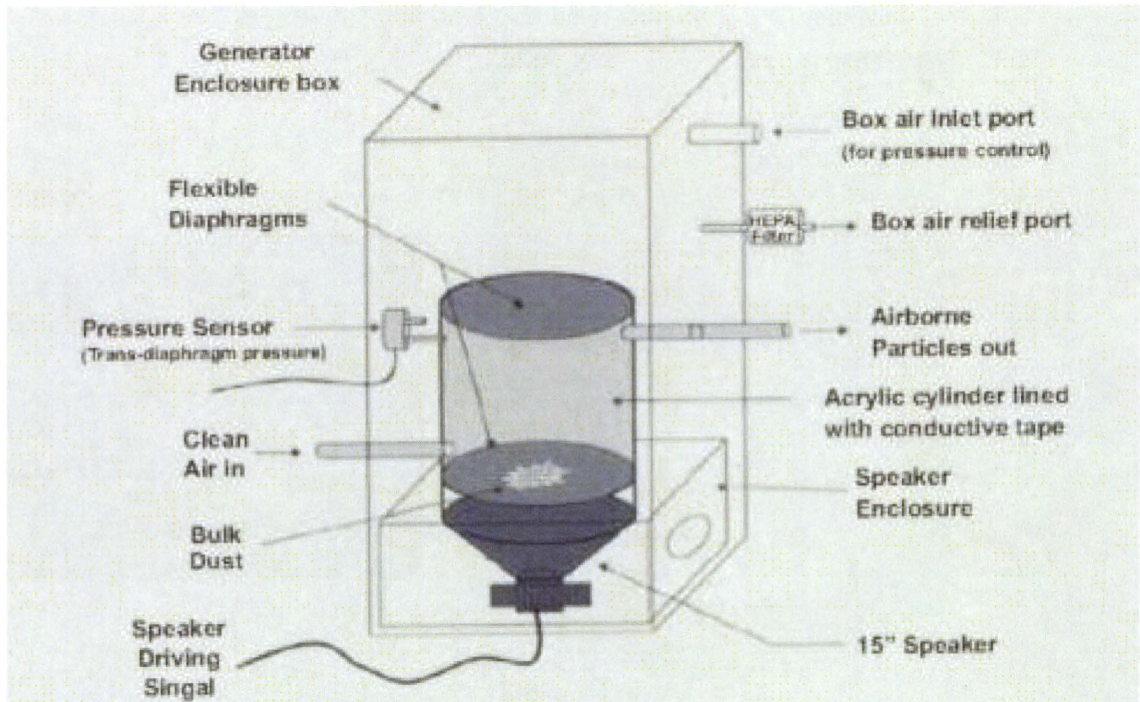


図7. McKinneyら¹⁾の開発したスピーカーによる音振動を用いた発生器 (文献より転載)