

201035006B

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

(H20-化学-一般-006)

平成 20-22 年度 総合研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 23 (2011) 年 3 月

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

(H20-化学-一般-006)

平成 20-22 年度 総合研究報告書

研究代表者

福島昭治

平成 23 (2011) 年 3 月

厚生労働科学研究費補助金研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

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	1
福島昭治	

II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアルの全身吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立	
1) 実験動物への暴露量および暴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	15
鷹屋光俊	
2) ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究	27
相磯成敏	
3) ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究	47
甲田茂樹	
4) 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検出系の確立	53
吉田 緑	
5) 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	59
小川幸男	
6) 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	71
長野嘉介	

2.	<i>in vitro</i> 及び <i>in vivo</i> 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価	
1)	ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための <i>in vitro</i> 系 での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究	91
	浅倉真澄	
2)	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 <i>in vivo</i> 系での遺伝毒性試験による評価手法に関する研究	101
	野口 忠	
3.	ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究	107
	山本雅也	
Ⅲ.	研究成果の刊行物・別刷	125

I. 総括研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

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（H20-化学-一般-006）

研究代表者 福島昭治

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 所長

研究要旨

ナノマテリアルの経気道暴露によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することを目的として、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）に焦点をあて、下記の研究を実施した。ナノマテリアルの吸入暴露法及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立のための研究では、MWCNTの吸入暴露法について発生方法の検討を行い、音響式発生器を用いたMWCNT吸入暴露装置を設置した。また、生体内・外のMWCNTの分散状態等を電子顕微鏡観察・金属成分の微量分析・空気中粒子測定などの手法で試みた。MWCNTの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法の研究として、ラットを用いた気管内投与実験を行い、肺毒性の用量相関と脳、腎臓等遠隔臓器への移行を確認し、肺外影響についても検索した。MWCNTの吸入暴露によるラット嗅球への形態学的影響は認められなかった。MWCNTを気管内投与したラット肺のマイクロアレイ解析を実施し、炎症、酸化ストレス等に関与する遺伝子発現増加を明らかにした。発がん二段階説に基づいてMWCNTの気管内投与による肺を標的とした中期発がん試験を実施し、DHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないことがわかった。*in vitro* 及び *in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価では、培養細胞を用いる遺伝毒性試験による評価手法は、ナノマテリアルの発がん性スクリーニング法として有効であった。これに対し、*gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 突然変異原試験ではMWCNTによる突然変異の増加は認められなかった。上記の研究に加えて、ナノマテリアル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。職業暴露に関する十分な情報は得られなかったものの、毒性影響に関しては、試験の結果が蓄積されつつあることがわかった。

研究分担者氏名・所属施設名および所属における職名（50音順）

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・病理検査部・病理検査室・室長

浅倉 眞澄：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・病理検査部・培養細胞試

験室・室長

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

甲田 茂樹：独立行政法人労働安全衛生総合研究所・首席研究員

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

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

野口 忠：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・病理検査部・微生物試験室・室長

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・総合評価研究室・主任研究官（平成20年度）

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（平成21～22年度）

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・室長

A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細であり一般生活環境や産業現場の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く、それによるヒトへの健康影響が深刻に懸念される。本研究の目的は、ナノマテリアルの経気道的暴露によるヒトへの健康影響の評価に役立つ手法を開発することである。この目的のため、形状がアスベストに類似しており吸入暴露による発がん性が懸念されている多層カーボンナノチューブ（MWCNT）に焦点をあてて下記の研究を行った。

1. ナノマテリアルの吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立：1) 実験動物への暴露量および暴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（鷹屋）、2) ナノマテリアルの経気道暴露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究（相磯）、3) ナノマテリアルの経気道暴露による肺外影響の評価手法に関する研究（甲田）、4) 超微形態学的手法を用いたナノマテリアルの経気道暴露による中枢神経系への影響の特徴と検

出系の確立（吉田）、5) 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（小川）、6) 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（長野）。

2. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価：1) 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（浅倉）、2) 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（野口）。

3. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究（平田、山本）。

B. 研究方法

各分担研究者の研究方法を以下に示した。MWCNTはMWNT-7（三井物産株式会社提供）を用いた。

1. ナノマテリアルの吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

MWCNT用吸入暴露装置の開発では、MWCNTの拡散法及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法について、湿式法及び乾式法の2つの発生方式による吸入暴露法を比較検討した（20年度西沢）。また、確立した発生法での暴露システムの設置をめざした（小川）。

生体内のMWCNTの分散状態を把握するために、MWCNTを気管内投与したラットの肺切片を試料とし、脱パラフィンのみ、および酸素プラズマ処理した試料をSEM観察した。また、生体外のMWCNTの分散状態を検討する一環として、

MWCNTのラポレベルでの模擬作業を行って発生する粉じん中にナノサイズのものがあるかどうかを調べるとともに、MWCNTを生理食塩水などの溶媒に浸した際の形状などの変化を調べた（鷹屋）。

13週齢のF344雄ラットに0.1% Tween80添加PBSに懸濁したMWCNT（0、40、160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ ）を単回気管内投与し、投与後1、7、28、91日に各群8匹を解剖した。中性緩衝ホルマリンで浸漬して固定・保存した肺、縦隔部のリンパ節、肝臓、脾臓、腎臓、脳について病理組織学的検索と透過型電子顕微鏡による検索を行った。想定される肺線維化については、陽性対照として α -Quartz 160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 投与群を設けて比較検討した（相磯、甲田）。

MWCNT、フラーレンを単回吸入暴露したラットの嗅球の形態について、超微形態を含め経時的に観察した。また、酸化チタンを経気道暴露したラットの肺の経時変化を光顕および電顕観察し、チタンの細胞内局在をエネルギー分散型X線分光器(EDS)を用いて解析した（吉田）。

MWCNTの*gpt delta*ラット単回経気道暴露実験（下記に記載）で得られた肺サンプルを用いて、Percellome手法による定量的なマイクロアレイ解析を行った（小川）。

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、中期発がん試験に使用する動物、イニシエーション処理の方法、被験物質であるMWCNTの投与方法等を検討し、決定した方法を用いて、MWNT-7を材料とした気管内投与による中期発がん試験を実施した（長野）。

2. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

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。MWCNTの

細胞への処理方法の開発、適正な細胞種を選択、細胞への取り込み等を検討した上で、細胞毒性試験（コロニー法、酵素放出法）、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、細胞形質転換試験）を用いた評価を行った（浅倉）。

*in vivo*での遺伝毒性評価手法の開発を目的として*gpt delta*ラットの有用性を検討した。*gpt delta*ラットにMWCNTを1匹あたり40及び160 μg の用量で気管内に単回投与し、投与後28日目及び90日目に臓器を摘出した。さらに、MWCNTを1匹あたり40及び160 μg の用量で気管内に2週間間隔で4回連続投与し、初回投与後49日目及び90日目に肺を摘出した。それぞれの肺における肺の*gpt*突然変異とSpi-欠失突然変異の頻度を測定した（野口）。

3. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

カーボンナノチューブ、フラーレン及び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（平田、山本）。

また、労働現場における作業環境について、MWCNTを用いた加工現場でMWCNTの飛散状況等を評価し、非凝集体としてのMWCNTの暴露の可能性を検討した（甲田）。

（倫理面への配慮）研究における実験動物の使用は、動物の愛護及び管理に関する法律等及び研究を実施する各機関及び施設で定める規定を遵守した。

C. 研究結果

各分担研究者の結果を以下に示した。

1. ナノマテリアルの吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

吸入暴露法については、MWCNT用吸入暴露装置のMWCNTの発生濃度は、湿式法では0.14 mg/m³、乾式法では0.21 mg/m³であった（20年度西沢）。また、吸入暴露装置は、実験者への暴露及び環境への漏出を避けるため専用の施設内に音響式ダスト発生器とディスポーザブル全身暴露チャンバーを設置した（小川）。

生体内のMWCNTのSEM観察においては、脱パラフィン処理のみの試料で肺組織にMWCNTが刺さっていると思われる像を観察することができた。一方、組織由来の有機物を除去し、組織内のMWCNTの定量を行うために行った酸素プラズマ処理では、一部、組織内にMWCNTが集積していると思われる画像を得ることができたが、定量的にMWCNTを残したまま、組織を完全に除去できる条件を見いだすことはできなかった。また、ラットに投与したMWCNTのミストのSEM観察および投与用に調製した懸濁液の分散状態を動的光散乱法で測定したが、いずれも良好な分散状態だった。模擬作業におけるMWCNTの粒子発生は、圧縮空気吹き飛ばす作業を模した作業では、明瞭にナノサイズの粒子の発生が確認できた。一方、計りとりや容器の移し替え作業では、ナノ粒子の発生が疑われるものの、明瞭ではなかった（鷹屋）。

MWCNTのラットへの気管内投与により以下の結果を得た。①MWCNTは肺胞腔内でマクロファージにより速やかに貪食された、②MWCNT貪食マクロファージは、徐々に肺胞壁、肺関連リンパ節（後縦隔リンパ節、傍胸腺リンパ節）に移行した、③MWCNTによる肺毒性として、Ⅱ型肺胞上皮細胞過形成、微小肉芽腫、線維化が起きた、④単繊維状のMWCNTが脳、肝臓、腎臓等の複数臓器に認められ、MWCNTの肺外

移行が示された、⑤これらの病理学的変化は投与用量-、時間-依存性に増加し、40 µg/rat (153 µg/kg bw)から認められた（相磯、甲田）。

嗅球等の観察では、①MWCNT、フラーレンを単回暴露したラット嗅球および脳に光顕レベルでの異常は認められず、嗅球の電顕観察においても、神経細胞および神経線維の超微構造に異常は認められなかった。②酸化チタンの単回吸入後、肺ではマクロファージ浸潤を伴う炎症が観察され、投与後4週にかけて肉芽腫の形成等の炎症が慢性化した。チタンは主にマクロファージに貪食され、貪食したマクロファージの凝集像が4週後では明らかだった。脳やその他の組織に光顕レベルで異常は認められなかった。EDS解析では、投与直後のチタンは主に肺胞内やマクロファージのライソゾーム内に分布していた（吉田）。

MWCNT経気道暴露ラット肺のマイクロアレイ解析の結果、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遺伝子等の顕著な増加がMWCNT投与群で認められた。また、酸化的ストレス反応遺伝子としてSOD2及びメタロチオネイン-1aの増加が各検体投与で認められ、メタロチオネイン-3がMWCNTの高用量群で増加した。その他の遺伝子として、組織の線維化/抗線維化に働く酵素のマトリックスメタロプロテアーゼ(MMP)-12、MMP-14、カテプシンKが各検体投与群で増加した（小川）。

MWCNTの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験について、使用する動物は8週齢のF344ラット雄、イニシエーション処理の方法は0.1%のN-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を2週間飲水投与、MWCNTの投与方法はDHPN投与後2週間の休薬期間の後2.5、10及び40 µg/匹の用量で2週おきに計4回気管内投与、その後、無処置観察とする試験系を採用した。この試験プロトコールに従って、MWNT-7を材

料とした中期発がん性試験を実施した結果、DHPN処置だけの群、DHPN処置後にMWNT-7を2.5mg、10mgまたは40mg/匹の用量で投与した群、DHPN処置後にクリソタイルを40mg/匹の用量で投与した群では全ての動物の肺に結節や白色斑が認められたが、結節や白色斑の平均発生個数/匹は各群の間に差がなかった（長野）。

2. *in vitro* 及び*in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

MWCNTをDMSO/培養液に懸濁し、超音波ホモジナイザー処理により均一な分散状態が得られた。このMWCNT懸濁液を細胞に処理した後の光学顕微鏡およびSEMによる観察結果から、MWCNTが細胞内に入っていることを確認した。毒性指標としては、コロニー形成法、酵素放出法のどちらにも感受性を示した。使用した細胞系（CHL/IU、V79、Balb3T3）は、3種ともに毒性指標に対し同様な反応を示し、MWCNT評価に使用できる細胞であることを確認した。遺伝毒性試験の結果、小核試験において、小核は誘発しなかったが多核を持つ細胞の出現率の上昇が観察された。染色体異常試験では、構造異常は誘発されなかったが倍数性細胞の出現率の上昇が観察された。遺伝子突然変異試験では、*hprt* 遺伝子の変異率の上昇は観察されなかった。また、細胞形質転換試験では、イニシエーション処理により形質転換細胞の出現率が上昇した（浅倉）。

MWCNTを*gpt delta* ラットに単回気管内投与した結果、投与後28日および90日の肺重量は増加傾向を示した。肺のトランスジーン*gpt* 突然変異および Spi-欠失変異に変化は認められなかった。なお、肺の組織病理学的変化として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（野口）。

3. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

カーボンナノチューブ及びフラーレンの職業暴露に関する情報は非常に少なく、十分な情報は得られなかった。酸化チタンについ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。一方、毒性影響に関しては、気道内投与や咽頭吸引試験に加え、エアロゾルへの鼻部/全身暴露の結果が公表されてきている。カーボンナノチューブに関する試験では、投与/暴露後、比較的初期から、肺に肉芽腫性変化や線維性変化がみられた。フラーレンに関しては、投与/暴露後、一過性の炎症反応が見られたものの、肺の病理組織変化の報告はなかった。酸化チタンに関しては、多くの試験で、肺の炎症、好中球の浸潤、貪食マクロファージの蓄積がみられた。最近の研究では、従来に比べて長期（90日間）のカーボンナノチューブの吸入暴露試験結果や、投与部位（肺）以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告されてきている（平田、山本）。

実際の労働現場での作業環境測定・評価を実施した事業所は、MWCNTをポリマー繊維にコーティングしてMWCNT含有繊維を開発し、この素材を用いた布を生産している事業所である。この労働現場ではMWCNT含有繊維を自動織機で加工しており、MWCNT含有繊維にはかなりの負荷がかかり、MWCNTが飛散する可能性の高い職場である。ここで測定した限りにおいてはMWCNT含有繊維の断片等は観察できたが、非凝集体としてのMWCNTを観察することはできなかった（甲田）。

D. 考察

各分担研究者の研究成果は下記のように考察

された。

1. ナノマテリアルの吸入暴露法、及び気管内投与法を用いた経気道暴露による健康影響の評価手法の確立

吸入暴露法については、MWCNTの発生法について検討した結果、MWCNTの吸入による暴露は技術的に難易度が非常に高いことが分かった（20年度西沢）。小川らが導入した音響式によるMWCNTの発生装置は、他の方式に比べMWCNTが形態的にも変形せず、目標濃度が達成されている点で優れていた。

生体内に入ったMWCNTの定量を行うためには、MWCNTを残して生体組織を除去した試料を調製し、電子顕微鏡観察を行うことが必須であるが、酸素プラズマ処理ではこの目的を十分に実行できるとは言いがたい。その理由として、生体内組織に含まれている塩類がMWCNTの分解を促進しているためではないかと推定した（鷹屋）。

ラットの気管内投与で、MWCNTで誘発される肺毒性に関して量・反応関係が明確な毒性データを得ることが可能であることがわかった。また、肺での生体影響のみならず、遠隔臓器へのMWCNTの移行も適切な検索方法を選択することで確認が可能であることが示された。気管内投与法が吸入試験の代替法となり得るか否かについては、吸入による全身暴露実験を行って比較検討する必要がある。（相磯、甲田）

MWCNT、フラーレンを単回吸入暴露した結果、光顕および超微形態学的に嗅球や中枢神経系に異常が認められなかったことから、これらの組織に器質的な影響を与えないと考えられた。ラットに気管内暴露した酸化チタンは投与後4週で凝集して観察されたことから、酸化チタンが肺胞マクロファージのライソゾーム内に長く留まる可能性が示唆された（吉田）。

MWCNT単回経気道暴露ラット肺で炎症、酸化ストレス、線維化等に関与する遺伝子発現の

顕著な増加が認められ、炎症、線維化に関しては組織学的所見の変化を反映したものと考えられた。一方、DNA傷害/修復に関与する遺伝子の明らかな変化は本実験条件下では認められなかった（小川）。

MWCNTの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験は、ラットを用い、0.1%のDHPNの2週間飲水投与によるイニシエーション処理後、2週間の休業期間において、MWCNTを2週おきに計4回気管内投与する方法は、適切な実験条件であると推察される。この試験法はナノマテリアルの肺発がん性を検出するための中期発がん試験に利用できる可能性があると考えられる。また、MWNT-7の気管内投与はDHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないと考察した（長野）。

2. *in vitro* 及び *in vivo* 試験系によるスクリーニング法の有効性の評価

遺伝毒性試験の結果、小核、染色体構造異常および遺伝子突然変異を誘発しないことから、MWCNTはDNAに直接反応する物質ではないこと、また、多核および倍数体を誘発することから、細胞分裂時に何らかの阻害作用をすることが考えられる。MWCNTは細胞に取り込まれることにより、上記反応および細胞毒性を示すと考えられ、細胞毒性試験および遺伝毒性試験での評価が妥当であることが証明された（浅倉）。

MWCNTを *gpt delta* ラットに気管内投与した結果、炎症性影響によるII型肺胞上皮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、その増加は認められなかった。肺には異物に対するクリアランス機構や酸化的ストレスに対する防御機構が発達しているため、トランスジェニック動物を用いて突然変異を検出する方法は難溶性物質の遺伝毒性を評価する試験系としては有効な方法ではない可能性があり、今後、さ

らに検討する必要がある（野口）。

3. ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

最近の研究結果は、ナノマテリアルの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしていることを示しており、労働環境空气中的粒子の形状やその存在比率などについてより詳細な調査が必要である。また、投与部位以外への影響、免疫系などへの影響の報告もあり、発がん性、発生期や神経への影響などを含めナノマテリアルの毒性の総合的な発現メカニズムを今後解明していくことが重要である（平田、山本）。

労働現場での作業環境測定・評価は、経気道暴露によって肺外影響の生じる前提であるナノマテリアルが一次粒子の状態で作業環境中に多数存在していることの検証であるが、その証拠を得ていない。今後は条件を変えて、一次粒子の状態で作業環境中に存在しているかどうかを検討する必要がある（甲田）。

E. 結論

各分担研究者の研究成果から下記のように結論された。

1. MWCNT の吸入暴露法については、技術的に難易度が非常に高いことが分かったが、今後の工夫の方向性が示される成果を得た。また、音響式発生器を用いたMWCNT吸入暴露装置を設置している。
2. 生体内外ともMWCNTのキャラクタリゼーションにおいてもっとも有効なのは電子顕微鏡観察であるが、電子顕微鏡観察を補完する手法のさらなる研究が重要である。
3. ラットの気管内投与法はMWCNTの生体影響の検索手段として有効であるが、吸入暴露実験の代替法となり得るかについては、吸入による全身暴露実験との比較検討が必要である。

4. MWCNT単回吸入暴露によるラット嗅球への形態学的影響は認められなかった。単回気管内暴露した酸化チタンは肺のマクロファージ内に長期留まると考えられた。

5. MWCNT単回経気道暴露ラット肺で炎症、酸化的ストレス、線維化に関与する遺伝子の発現が顕著に増加した。

6. DHPNのイニシエーション処理による中期発がん試験は、ナノマテリアルの経気道暴露による肺発がん性を検出するための試験に利用できる。また、MWNT-7の気管内投与はDHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないことがわかった（長野）。

7. 培養細胞を用いる遺伝毒性試験による評価手法は、ナノマテリアルの発がん性スクリーニング法として有効である。

8. *gpt delta* ラットを用いた *in vivo* 突然変異原試験では突然変異の増加は認められなかった。

9. ナノマテリアルの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしており、労働環境での空气中的粒子の詳細な調査及び毒性メカニズム解明を意図した試験・研究が必要である。

以上の研究成果は、ナノマテリアルによるヒトの健康への影響の評価手法の確立と機序の解明に資することができる。

F. 健康危機情報

該当しない

G. 研究発表

1. 論文発表

Abe, M., Suzuki, N., Yoshida, M., Usuda, K., Furukawa, S., Juneja, L.R., Okubo and T., Nakae D.: Possible carcinogenic risks of copper gluconate and their prevention by co-administered green tea catechins evaluated by a rat medium-term multi-organ carcinogenicity bioassay

- protocol. *Food Chem. Toxicol.* 2008, 46: 1760-1770.
- 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.
- 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, 48: 215-220
- Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.
- Ema, M., Fujii, S., Hirata-Koizumi, M., and Matsumoto, M.: Two-generation reproductive toxicity study of the flame retardant hexabromocyclododecane in rats. *Reprod. Toxicol.* 2008 25; 335-351.
- Ema, M., Fukunishi, K., Hirose, A., Hirata-Koizumi, M., Matsumoto, M., and Kamata, E.: Repeated-dose and reproductive toxicity of the ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2008 31; 399-412.
- Harada, T., Kimura, E., Hirata-Koizumi, M., Hirose, A., Kamata, E. and Ema, M.: Reproductive and developmental toxicity screening study of 4-aminophenol in rats. *Drug. Chem. Toxicol.* 2008 31; 473-486.
- Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E. and Ema, M.: Gender-related difference in the toxicity of ultraviolet absorber 2-(3',5'-di-tert-butyl-2'-hydroxyphenyl)-5-chlorobenzotriazole in rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2008 31; 383-398.
- Hirata-Koizumi, M., Matsuyama, T., Imai, T., Hirose, A., Kamata, E. and Ema, M.: Lack of gender-related difference in the toxicity of 2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole in preweaning rats. *Drug Chem. Toxicol.* 2008 31; 275-287.
- Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Fujimoto, H., Shibutani, M., Hirose, M. and Nishikawa, A.: Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay. *Cancer Science.* 2009, 100: 2261-2267.
- Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Fujimoto, H., Ohnishi, K., Nakashima, K., Shibutani, M., Hirose, M. and Nishikawa, A.: Possible contribution of rubiadin, a metabolite of madder color, to renal carcinogenesis in rats. *Food and Chemical Toxicology.* 2009, 47: 52-59.
- Inoue, K., Yoshida, M., Takahashi, M., Shibutani, M., Takagi, H., Hirose, M. and Nishikawa, A.: Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study. *Food and Chemical Toxicology.* 2009, 47: 184-191.
- Kanno, J., Kitashima, S., Aizaki, K., Igarashi, K., Nakatsu, N., Takagi, A., Ogawa, Y. and Kodama, Y.: A new trial of toxicotranscriptmics by Percellome Project. *Cell Technology, Japan*, 2007 26:71-77
- Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M. and Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H. and 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.
- Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K., Arito, H., Nagashima, H. and Fukushima, S.: Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in rats, *Inhalation Toxicology*, 2009, 21: 889-897.
- Kawamoto, K., Sato, I., Yoshida, M. and

- Tsuda, S.: Air purifiers that diffuse reactive oxygen species potentially cause DNA damage in the lung. *The Journal of Toxicological Sciences*, 2010, 35: 929-933
- Kawasaki, Y., Hirabayashi, Y., Kaneko, T., Kanno, J., Kodama, Y., Matsushima, Y., Ogawa, Y., Saitoh, M., Uchida, O., Umemura, T., Yoon, B. and Inoue, T.: Benzen-Induced Hematopoietic Neoplasms Including Myeloid Leukemia in Trp53-Deficient C57BL/6 and C3H/He Mice. *Toxicol. Science*, 2009 110(2): 293-306.
- 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*, 2011: in press.
- Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, Kano, H., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats, *J Toxicol. Sci.*, 2009, 34: 53-63.
- Ohnishi, M., Take, M., Yamamoto, S., Fukushima, S. and Yajima H.: Identification of an N-acetylcysteine conjugate in the urine after oral administration of 2,4-dichloro-1-nitrobenzene to rat. *The Journal of Toxicological Science* 2009, 34: 233-237.
- Ono-Ogasawara, M., Serita, F. and Takaya, M.: Distinguishing nanomaterial particles from background airborne particulate matter for quantitative exposure assessment. *J Nanoparticle Res*, 2009 11: 1651-1659.
- Sato, I., Kawamoto, K., Nishikawa, Y., Tsuda, S., Yoshida, M., Yaegashi, K., Saito, N., Liu, W. and Jin, Y.: Neurotoxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats and mice after single oral exposure. *The Journal of Toxicological Sciences*. 2009, 34: 569-574
- Takahashi, M., Yoshida, M., Inoue, K., Morikawa, T. and Nishikawa, A.: A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009. 47: 2490-2498.
- Takahashi, M., Shibutani, M., Nakahigashi, J., Sakaguchi, N., Inoue K, Morikawa, T., Yoshida, M. and Nishikawa, A.: Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. *Archives of Toxicology*, 2009, 83: 785-793.
- Takahashi, M., Inoue, K., Yoshida, M., Morikawa, T., Shibutani, M. and Nishikawa, A.: Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. *Food and Chemical Toxicology*. 2009, 47: 462-471.
- 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.
- Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S. and Fukushima, S.: Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. *The Journal of Toxicological Science*, 2009, 34: 221-226.
- Umeda, 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*: in press.
- Yahia, D., Tsukaba, C., Yoshida, M., Sata, I., Tsuda, S.: Neonatal death of mice treated with perfluorooctane sulfonate. *J. Toxicol. Sci.* 2008, 33: 219-226.
- Yamazaki, K., Suzuki, M., Kano, H., Umeda, Y., Matsumoto, M., Asakura, M., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Oral carcinogenicity and toxicity of 2-amino-4-chlorophenol in rats. *Journal of Occupational Health*, 2009, 51: 249-260.
- Yoshida, J., Tei, G., Mochizuki, C., Masu, Y., Koda, S., Kumagai S.: Use of a closed system device to reduce occupational

contamination and exposure to antineoplastic drugs in the hospital work environment. *Ann Occup Hyg.* 2009; 53: 153-160.

Yoshida, J., Koda, S., Nishida, S., Yoshida, T., Miyajima, K. and Kumagai, S.: Association between occupational exposure levels of antineoplastic drugs and work environment in five hospitals in Japan *The Journal of Oncology Pharmacy Practice.* 2010; in printing

Yoshida, M., Sanbuissyo, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y. and Nishikawa, A.: Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection. *The Journal of Toxicological Sciences.* 2009. 34 Suppl 1: SP189-97.

Yoshida, M., Watanabe, G., Suzuki, T., Inoue, K., Takahashi, M., Maekawa, A., Taya, K. and Nishikawa, A.: Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats. *The Journal of Reproduction and Development.* 2009, 55: 105-109.

○甲田茂樹: ナノマテリアル取り扱いと労働衛生の課題. *労働の科学.* 2009 64(4), pp13-15.

○甲田茂樹 リスクアセスメント手法を用いた労働衛生対策～化学物質管理を中心に～. *安全衛生コンサルタント.* 2010, 30(95), 2 2-27.

甲田茂樹, 熊谷信二, 佐々木 毅, 吉田 仁. 病院の病理検査室におけるホルムアルデヒドばく露のリスクアセスメントについて. *労働安全衛生研究.* 2010, 3(1), 5-10.

甲田茂樹. 一次予防としての職場のメンタルストレス対策の勧め. *労働経済春秋.* 2010. (印刷中)

○酒井俊男, 相磯成敏, F 阪大 H21-114, 超高压電子線トモグラフィーを用いた気管内投与された多層カーボンナノチューブの肺内動態に関する研究: 阪大複合機能ナノフアウンダリ研究報告書, 2009, 2, 98-99

○鷹屋光俊, 芹田富美雄, 小野真理子, 篠原也寸志, 齊藤宏之, 甲田茂樹: 多層カーボンナノチューブ製造工場における気中粒子

の測定及び炭素分析 1-袋詰め作業-, *産業衛生学雑誌.* 2010, 52, 182-188.

渡辺裕晃, 甲田茂樹, 佐々木 毅, 鶴田由紀子, 伊藤昭好, 原 邦夫, 堤 明純, 丸山 正治. 自治体職場への OSHMS 導入-導入途上の状況と今後の展望. *労働安全衛生研究.* 2010, 3(1), 11-16.

渡辺裕晃, 甲田茂樹, 佐々木 毅, 伊藤昭好, 原 邦夫, 堤 明純. 自治体職場における職場環境改善を通じた参加型ストレス対策の試み. *産業ストレス研究.* 2010. (印刷中)

2. 学会発表

Hasegawa, R., Hirata-Koizumi, M. and Hirose, A.: Proposal of new uncertainty factor application to derive tolerable daily intake. The 45th Congress of the European Societies of Toxicology (October 2008, Rhodes, Greece).

Hirata-Koizumi, M., Noda, A., Hirose, A., Kamata, E. and Ema, M.: Screening study for reproductive and developmental toxicity of tetrahydrofurfuryl alcohol in rats. The 45th Congress of the European Societies of Toxicology (October 2008, Rhodes, Greece).

Hirose, A., Ishiwa, S., Ciloy, J. M., Takahashi, M., Hirata-Koizumi, M. and Kamata, E.: Ono, A., Ema, M., Hayashi, M. Development of in silico hepatotoxicity predicting system on sub-acute repeated dose toxicity test for industrial chemicals. The 45th Congress of the European Societies of Toxicology (October 2008, Rhodes, Greece).

Hirose, A., Schlueter, T., Matsumoto, M., Hirata-Koizumi, M., Kamata, E., Kremoser, C. and Ema, M.: Modulation of Nuclear Receptor Cofactor Recruitment by Tributyltin and Dibutyltin in Gal4 Assays. *Dioxin2008* (August 2008, Birmingham, UK).

Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirata-Koizumi, M. and Hirose, A. Biological effects of fullerene (C60) exposed using liposome in HepG2 cells. The 45th Congress of the European

Societies of Toxicology (October 2008, Rhodes, Greece).

Yoshida, M., Maekawa A. and Nishikawa, A.: Neonatal exposure to DES induces dose-dependent delayed effects at doses showing estrogenic activity in female Donryu rats. 2008, 47th Annual Meeting and ToxExpo. 2008.

Yoshida, M., Tsuzuki, N., Watanabe, E., Ozawa, S., Suzuki, K. and Nishikawa, A.: Dog and mouse studies: Merits in risk assessment of pesticides in Japan. 2008年 第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会.

Yoshida, M., Koyama, N., Inoue, K., Takahashi, M., Sakamoto, Y., Taketa, Y., Shimada, Y. and Nishikawa, A.: Early depletion of ovarian follicles by prepubertal exposure to gamma ray promotes rat uterine cancer development. 2009年、第 68 日本癌学会学術総会

Yoshida, M., Sanbuissho, A., Hisada, S., Takahashi, M., Ohno, Y. and Nishikawa, A.: 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. 2009, 49th Annual Meeting & ToxExpo

○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、第 82 回日本産業衛生学会

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

○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、第 26 回日本毒性病理学会

○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

○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

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

○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、2008年、第 37 回日本環境変異原学会

○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、2009年、第 82 回日本産業衛生学会

○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、2009年、第 38 回日本環境変異原学会

○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

○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の遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、2010年、第 39 回日本環境変異原学会

梅田ゆみ、妹尾英樹、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：F344 ラットの大腿部に認められた滑膜肉腫の 1 例、2009年、第 25 回日本毒性病理学会

緒方英博、平田睦子、今井俊夫、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 眞、2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl) benzotriazole (HDBB) の 52 週間反復投与毒性試験、第 35

- 回日本トキシコロジー学会学術年会 (2008年6月, 東京).
- 小野真理子、鷹屋光俊、甲田茂樹、他：作業環境中のフラーレンのHPLCによる定量、2008年、第48回労働衛生工学会
 - 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
 - 久保田久代、芹田富美雄、甲田茂樹、鷹屋光俊、粉体塗料に含まれるナノ粒子の走査型及び透過型電子顕微鏡による携帯観察、2010年、第83回日本産業衛生学会
 - 甲田茂樹、他：アンケート調査から伺えるナノマテリアル取扱い職場における労働衛生管理の課題について、2009年、第82回日本産業衛生学会
- 妹尾英樹、梅田ゆみ、片桐卓、相磯成敏、長野嘉介、福島昭治：N,N-Dimethylformamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較、2009年、第25回日本毒性病理学会
- 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-ブromo-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
- 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、第82回日本産業衛生学会
- 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
- 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
- 鷹屋光俊、甲田茂樹、他：フラーレン取扱い職場の空气中粒子濃度と空气中粒子径上の電子顕微鏡観察、2008年、第48回労働衛生工学会
 - 鷹屋光俊、甲田茂樹、他：ナノ材料取扱職場の環境測定－職場における粒子測定装置の評価と電子顕微鏡観察－、2009年、第82回日本産業衛生学会
- 平田睦子、離乳前ラットにおける紫外線吸収剤2-(2'-hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazolの毒性影響、第48回日本先天異常学会学術集会(2008年6月, 東京).
- 平田睦子、松野喜代美、川端光彦、矢島加奈子、松山隆史、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬真 2-(2'-Hydroxy-3',5'-di-tert-butylphenyl)benzotriazole (HDBB)の毒性－血中濃度及び肝薬物代謝酵素活性に対する影響、第35回日本トキシコロジー学会学術年会(2008年6月, 東京).
- 平田睦子、野田 篤、広瀬明彦、鎌田栄一、江馬 真、Tetrahydrofurfuryl alcoholの簡易生殖毒性試験、第48回日本先天異常学会学術集会(2008年6月, 東京).
- 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、第82回日本産業衛生学会
- 吉田緑、井上薫、高橋美和、西川秋佳ケ正常性周期におけるラット卵巣の形態学的特徴、2009年、第25回日本毒性病理学会
- 吉田緑：生殖発生毒性の評価法：現状と問題点 2009年、第10回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会
- 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、2009年、第3回In vivo実験医学シンポジウム
- 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 2010年 第26回日本毒性病理学会
- 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. 2010年、第37回日本トキシコロジー
学会学術年会

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

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 実験動物への曝露量および曝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上席研究員
協力研究者 芹田富美雄 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
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
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。初年度に、多層カーボンナノチューブ (MW-CNT) に含まれる不純物金属元素の定性・定量を試みるとともに、動的光散乱法 (DLS) および走査電子顕微鏡観察 (SEM) により、ラットに気管内投与した MW-CNT の肺内における分散状態の確認を行った。2 年目、3 年目には、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、生体内寿命を実験方法によって推定する基礎的検討、ならびに生体内での挙動 (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

動物実験においては、曝露・気管内投与のいずれの手法を用いる場合でも、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うことは、生体影響を定量的に評価するために必要不可欠である。しかし、ナノ材料に関しては、動物の体内はもとより、環境中や比較的制御された環境である曝露チャンパー内のナノ粒子についてさえ、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、曝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。

B. 研究方法

本分担研究の目標は、全てのナノ材料に適用可能な普遍的なキャラクタリゼーションの開発であるが、現実的には難しい点も多いため、主に、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 (MW-CNT) を試料として、濃度・分散状態・材料中に含まれる不純物の測定方法を検討し、一部他の物質に応用可能な技術に関して検討を行うこととした。3 年間で行ったのは、

- (1) MW-CNT 製造時に用いられる触媒由来の金属不純物の定性・半定量 (鷹屋)
- (2) 気管内投与実験に用いられた MW-CNT 懸濁液および投与試料エアロゾル中の MW-CNT 分散状態の把握 (芹田)

- (3) SEM によるラット肺内 MW-CNT 観察 (芹田、久保田)
- (4) 模擬作業によるナノ粒子の発生の把握および、同模擬粒子を用いた測定装置の評価 (鷹屋)
- (5) 疑似肺胞液に浸漬することによる MW-CNT の生体内寿命の推定 (鷹屋)
- (6) MWCNT の毒性評価法検討および毒性発現に関わる生体因子の検索。 (三浦) を行った。これらについて順に報告する。

(1) 金属不純物の濃度測定

① 金属不純物濃度測定の必要性

CNT の製造法は各種あるが、製造・販売量が多い会社の製品は、概ね気相化学蒸気成長 (CVD) によるチューブ構造の構築とそれに引き続き行われる焼成による黒鉛化による製造が行われている¹⁾⁻²⁾。

製品によっては、触媒粒子の除去が完全に行われていない場合もあり、CNT は、その繊維状構造と、触媒由来の金属ナノ粒子の両方について生体に対して影響をもたらす可能性があると考えられ、CNT の生体影響を動物実験で評価する場合は、触媒由来の残留金属の種類・濃度・形状などを把握することが不可欠である。

② 金属の定性および半定量

CNT 内の金属不純物の形状および成分を把握するには、透過型電子顕微鏡 (TEM) を用いて、チューブ内に存在するナノ粒子を確認し、二次 X 線により元素分析する手法が使用できる。しかし、TEM は、装置が高価であり、元素分析装置も備えた分析-TEM となるとさらに使用できる施設が限