

られる上に、試料調製に高度な技術を要する。また、試料を酸などで分解・抽出して、誘導結合プラズマ原子発光分析(ICP-AES)/誘導結合プラズマ質量分析(ICP-MS)、原子吸光分析(AA)などを行うことも考えられるが、CNTは、物理的にも化学的にも強靱な材料であることから、定量的に金属を溶解・抽出する手順を確立するためには、多数の実験を重ねる必要がある。そこで、蛍光 X線(XRF)による定性・半定量を試みた。

XRFは、試料に X線を照射すると、元素特有の X線(蛍光 X線)を発生することを利用して、主に固体試料について元素の定性・定量分析を行う分析方法である。原理的には、金属元素に限らずあらゆる元素の分析が可能であるが、原子番号の小さい軽元素では、発生する X線の透過力が弱いため、測定できない CNTの分析においても主成分の炭素の X線が測定できないため、不純物金属同士の比は求められても、不純物の炭素への含有量を知ることはできない、そこで、CNTに XRF計測が可能な金属酸化物、既知量混合する方法で定量を試みた。本研究では Panalytical社製 Minipal2型エネルギー分散型蛍光 X線分析装置を用い、酸化チタンおよび酸化銅を既知量加えて、XRFの代表的な測定法である FP法による触媒成分の半定量を試みた。

(2) 投与試料の分散状態の把握

動物実験で用いたマイクロスプレーで噴霧した MWCNTの分散状態を把握するため MWCNTの分散状況を噴霧前の溶液を動的光散乱(DLS, Malvern製 ZetaSizer Nano)と走査電子顕微鏡(SEM, 日立 S-4700)による測定。噴霧試料の分散状況は SEM観察で評価した。

(3) SEMによるラット肺内の CNT観察

投与後の試料の凝集状態、分布の観察を SEMで行えないか検討した。日本バイオアッセイ研究センターで行った、気管内投与実験後の肺病理切片の一部を、キシレンに浸漬して脱パラフィンを行い、この切片試料をそのまま、あるいは、酸素プラズマによる低温灰化装置により組織の除去を試みたものを試料とし、SEM観察した。

(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

MWCNTの模擬粉じんを発生させる装置として、柴田科学製の堆積粉じん再発じん装置 SKY-2を用いた。インピンジャーに二連球で空気を吹き込む方法と、グローブボックス内で試料の計りとり、乳鉢による磨砕等の模擬作業を置こう装置の2種類の方法を用いた。測定は、SKY-2を用いた実験では、

導電性シリコンチューブと、黄銅-クロムメッキの3方分岐管を用いて MWCNTエアロゾルを光散乱式粒子カウンター(Optical Particle Counter; OPC)、凝縮核カウンター(Condensed Nuclei Counter; CNC)、走査移動度式粒子サイザー(Scanning Mobility Particle Sizer; SMPS)、表面積計の4つの測定器に導いた。グローブボックスを用いた実験では、CNCを用いた。SKY-2を用いた実験装置の構成を図1に示す。

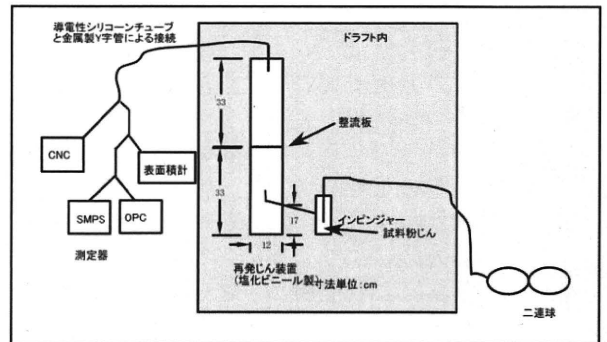


図1 装置の構成

(5) 疑似肺胞液に浸漬することによる MWCNTの生体内寿命の推定

粒子状物質を動物に投与して、有害性を評価する際、特に長期的な影響を評価する際には、粒子の生体内での物理化学的性状の変化(以下本項では生体内寿命と呼ぶ)を評価することは非常に重要になる。生体内寿命を評価する方法として、実際に投与動物の臓器内試験物質が残存しているかどうかを観察する方法や、金属元素などの場合は、各臓器の金属濃度を測定する方法などがある。本研究の場合、対象物質が炭素と、ごく僅かの触媒由来の鉄でできた MWCNTであるため、これらの方法は困難であり、また、電子顕微鏡観察による粒子形状の変化に関しても MWCNT粒子を完全に残したまま、生体由来組織を除去することは困難である。

生体内寿命を評価する別の方法として、生理食塩水や生理食塩水に各種のアミノ酸やタンパク質などを加えた疑似生体液に浸漬して、粒子の時間変化を測定する方法が広く行われている³⁻⁶⁾。この方法を用いて、粒子の形態変化を走査電子顕微鏡(SEM)で観察することにより、生体内寿命・寿命を評価することとした。実験材料として、本研究の動物実験に用いているものと同一ロットの MWCNT

(MT-7)を用いた。これらを 10mg 程度試験管にはかりとり、純水、(対照) および表1に組成をしめした。模擬肺胞液(ギャンブル氏液)³⁾を 10mL 加え、0日、10日、31日、100日間、38℃に設定した乾燥器内においた。0日の試料についてもギャン

ブル氏液の成分の残存の影響を排除するため、一度ギャンブル氏液に浸漬した。

表 1

物質	1L に加える試薬量(g)
MgCl ₃ · 6H ₂ O	0.212
NaCl	6.415
CaCl ₃ · 2H ₂ O	0.255
Na ₂ SO ₄	0.079
NaHPO ₄	0.148
NaHCO ₃	2.703
酒石酸 Na · 2H ₂ O	0.18
クエン酸 1 Na · 2H ₂ O	0.153
酪酸 Na	0.175
ビルビン酸 Na	0.172
グリシン	0.118

ギャンブル氏液は各種の塩類を含むため腐敗の可能性があり、トルエンやホルマリンを殺菌剤として加える場合が多いが、本研究ではこれらの添加剤の影響を排除するため加えなかったが、特にカビの発生などは観察されなかった。

観測機終了後、熱重量・示差熱分析による熱分析、走査電子顕微鏡観察を行った。粒子の変化を見るためには BET 法による比表面積測定が最適だと考えられるが、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 法は用いなかった。この他、動的光散乱法による粒径分布・ζ 電位測定も測定したが、明確な結果は得られなかった。さらに、電気化学的方法や、触媒金属微粒子の溶液への溶けだしを測定して評価することも検討したが、予備実験の結果は思わしくなかったため、上記の方法を用いることとした。粒径分布と ζ 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・ζ 電位測定の両方が可能な専用セルに懸濁液をいれて測定を行った。

粒径・ζ 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。

(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

MWCNT が生体に及ぼす影響が懸念され、マウスで中皮腫を引き起こすとの報告⁷⁾をはじめ、酸化ストレス惹起や免疫系への影響などの情報が蓄積しつつある。本検討では先ず MWCNT の培養細胞系での毒性評価法を確立する。さらに MWCNT が生体に与える影響を解析するために、MWCNT 耐性細胞を樹立し MWCNT 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。実際に行った研究の具体的な方法は以下の通りである。

① 培養細胞を用いた MWCNT の毒性評価

培養細胞: MWCNT の毒性評価には A549 細胞 (ヒト II 型肺胞上皮細胞由来) を用いた。A549 細胞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。

MWCNT: MWCNT は動物実験に用いているものと同じものを用いた。一連の実験には MWCNT を 10% Pluronic F-68 溶液 (PF-68; Sigma-Aldrich 社製) に懸濁し、超音波ホモジナイザー SONIFIER 450 (BRANSON 社製) を用いて出力 3 (OUTPUT 値 30)、ON 30 秒 → OFF 30 秒のサイクルで 30 分間超音波処理したのものを用いた。

毒性評価: A549 細胞を 96 ウェルプレートに 1 ウェルあたり 1×10^4 個/90 μl の濃度で播き、24 時間培養後に各濃度の MWCNT を 10 μl 添加した (最終濃度: 20 μg/ml ~ 100 μg/ml)。添加 48 時間後に AlamarBlue 試薬 (Invitrogen 社製) を加え、細胞生存率を測定した。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。

② MWCNT が遺伝子発現に与える影響解析

A549 細胞を 12 ウェルプレートに 1×10^5 個/650 μl の濃度で播き、3 日間培養後に各濃度の

MWCNT を 65 μl 添加した(最終濃度: 5 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ~100 $\mu\text{g}/\text{ml}$)。添加 20 時間後に細胞から total RNA を抽出し、逆転写反応後、リアルタイム PCR 装置 (LightCycler 480, Roche 社製) を用いて対象遺伝子の発現量 (mRNA 量) を測定した。解析対象遺伝子としては、(1)ストレス関連遺伝子: ヘムオキシゲナーゼ-1 (HO-1)、熱ショックタンパク質 70 (HSP70)、メタロチオネイン-2A (MT-2A); (2)免疫関連遺伝子: インターロイキン-6 (IL-6)、腫瘍壊死因子- α (TNF- α); (3)線維化関連遺伝子: コラーゲン 1A1 (COL1A1)、熱ショックタンパク質 47 (HSP47) を選択した。

③ MWCNT 耐性細胞の樹立

A549 細胞を 20 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の MWCNT 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。得られた耐性細胞について細胞毒性試験を行った。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。

④ 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) を使い、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) 金属不純物の濃度測定

図 2 に試料 CNT の蛍光 X 線スペクトルを示す。蛍光 X 線測定で検出できる金属不純物は、鉄だけだということが解った。この結果を元に研究方法の項で述べた方法で FP 法 Standardless による半定量を試みた。

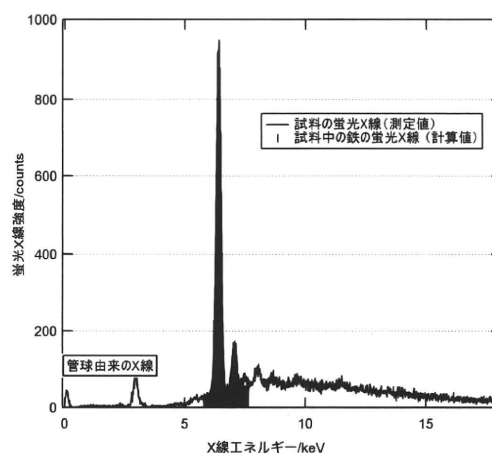


図 2 MWCNT 試料の蛍光 X 線スペクトル

その結果、試料 CNT 中に含まれる鉄は $1.1 \pm 0.7\%$ 程度となった。

(2) 投与試料の分散状態の把握

DLS の測定結果では、懸濁液中の MWCNT は、1 μm 程度に分散していることを確認した。この粒子をマイクロスプレーで噴霧した試料中の MWCNT を SEM 観察したものを図 3 に示す。この結果から、本研究で行った動物実験に用いた投与試料は十分に分散していたと判断した。

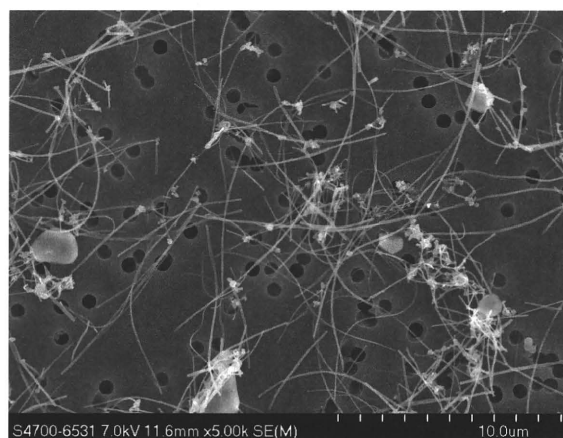


図 3 気管内投与試験に用いた MWCNT 試料の SEM 観察像

(3) SEM によるラット肺内の CNT 観察

図 4 は、投与実験に用いたラット肺試料 (投与

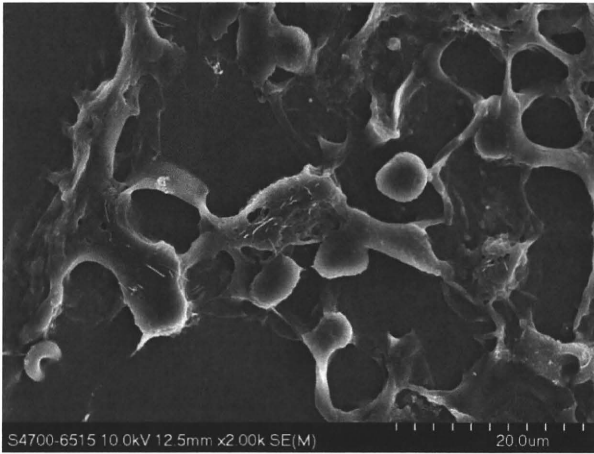


図4 MWCNTを投与したラット肺のSEM観察像

翌日)の病理切片を脱パラフィンのみおこなったもののSEM像である、ほぼ無処理で、SEM観察で組織中の繊維の分布をある程度推定できるものと考えられる。一方、より、繊維の分布を鮮明に観察するために、酸素プラズマによる組織除去を試みたが、組織とともに、CNT繊維も消失し、観測は行えなかった。

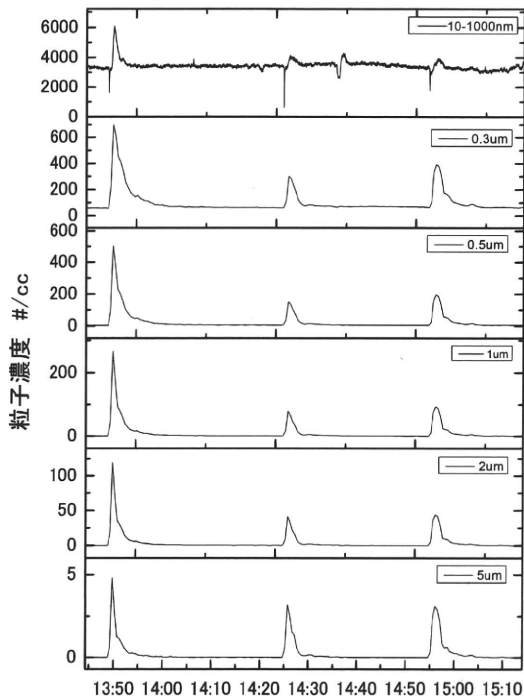


図5 CNCおよびOPCの粒子濃度変

(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

図5は、模擬粉じん発生装置による粉じん発生時における、粒子濃度測定結果である。図の一番上のグラフはCNCを用いて測定した10-1000nmの粒子濃度の変化を示し、他の5つのグラフはそれぞれ、0.3-0.5, 0.5-1, 1-2, 2-5, >5 μ m (300-500,

500-1000, 1000-2000, 2000-5000, >5000nm)の粒子濃度変化を示す。

今回の実験では、3回発生を試みている。

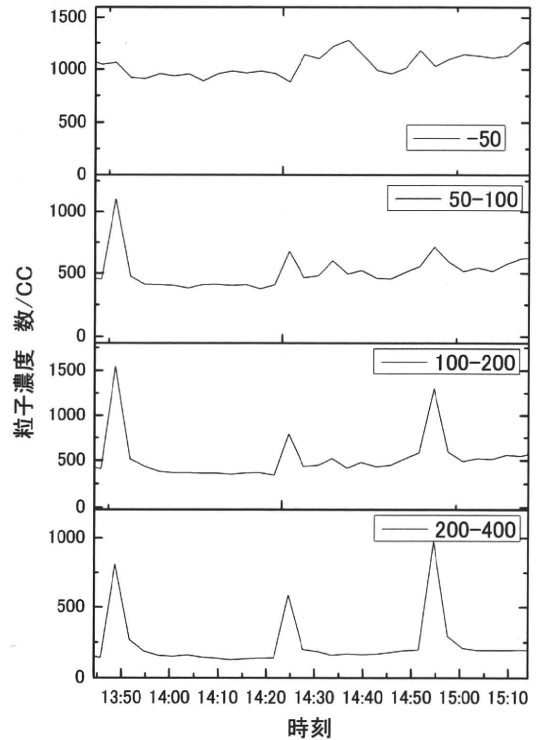


図6 SMPSによるナノ粒子時間変化

CNCでは、元々のバックグラウンド濃度として3000個/cc程度の粒子を観測している。この数値は、実験当日の室内の粒子個数と大差ない。この模擬粉じん発生装置は、バランスを取るための吸気口にHEPA等の高性能フィルターを使用せず、多孔質のスポンジ状の簡易フィルターを使用しているため、このような結果になっている。

CNCはナノ粒子の計測を行うが、ナノよりも大きい1000nm以下のサブミクロンサイズの粒子にも反応する。そこで、DMA分級器を備え、ナノサイズのみ測定可能なSMPSによる測定を試みた。図6は一番上の図から順に<50, 50-100, 100-200, 200-400nmの粒子数の濃度変化を計測した。図に示すように、粒径50nm未満の粒子は、発生とは全く関係なしに1000個/cc程度の濃度を保っている。これは全てバックグラウンド粒子であり、今回の発じんでは粒径50nm未満の粒子の発生はなかったものと考えられる。

一方、50nmより大きな粒径の粒子数濃度は、発生に同期して濃度上昇を観測された。

(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

図7と図8はサ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。

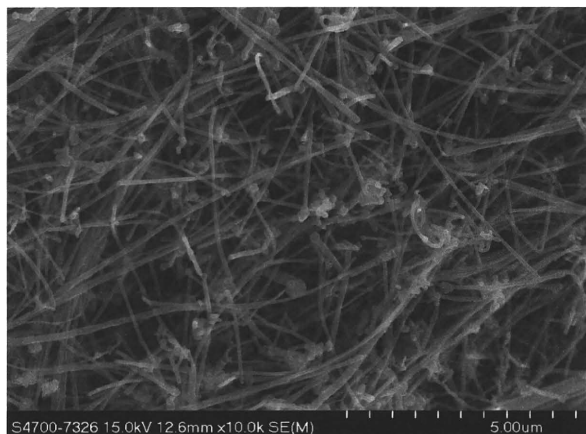


図7 ギャンブル液浸漬 0 日

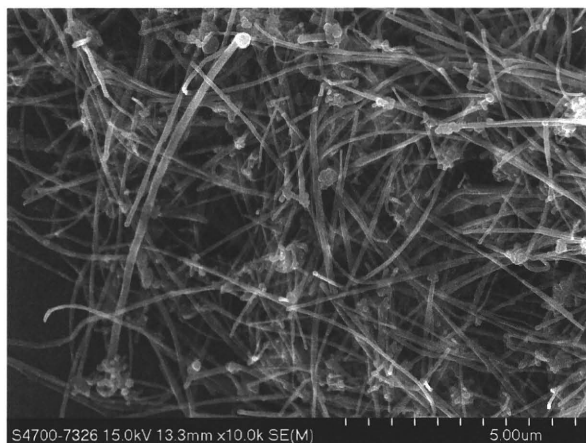


図8 ギャンブル液浸漬 100 日

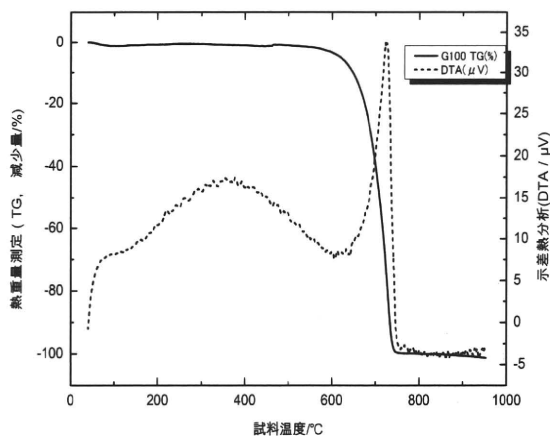


図9 ギャンブル液浸漬 100 日の TG および DTA

図9に熱分析の結果例を示した。MWCNTは炭素材料であるため、空气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。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10にギャンブル氏液に浸漬した試料の熱重量変化を示す。

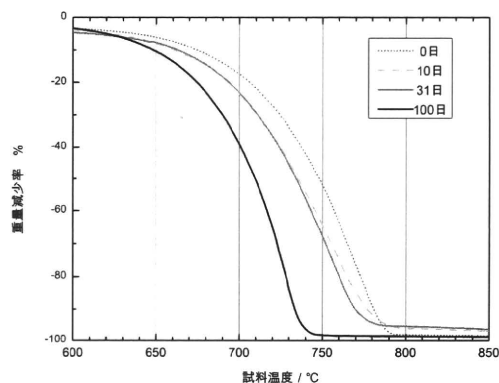


図10 ギャンブル液浸漬試料の熱重量変化

(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

① 培養細胞を用いた MWCNT の毒性評価

MWCNTは水に不溶であり、適当な溶媒に分散させる必要がある。分散補助剤として Tween 20 または Tween 80 を 0.005~0.02% 添加する手法が散見されるが、A549 に対する Tween 20 の添加許容濃度を検討したところ非常に毒性が高く、0.001% の Tween 20 存在下でも添加 24 時間後には 90% 以上の細胞が死滅した。そのため Tween 系の使用は不可能と判断した。またジメチルスルホキシド(DMSO)に懸濁した例もあるが MWCNT による酸化ストレス惹起が報告されており^{8,9)}、また DMSO の OH ラジカル消去能はよく知られている。MWCNT が産生する活性酸素種が明確ではないことから本実験系での DMSO の使用は回避するこ

ととした。そこで平野らの報告¹⁰⁾に準じ、10% PF-68 に懸濁させ分散する系を選択した。MWCNT を 1 mg/ml の濃度で 10% PF-68 に懸濁し、【研究方法】に記した条件で分散しその 1/10 量を細胞に添加することとした (PF-68 の最終濃度: 1%)。なお PF-68 は添加 48 時間後でも 1% 濃度まで全く毒性を示さず、本実験における分散補助剤として使用可能である (図 11)。

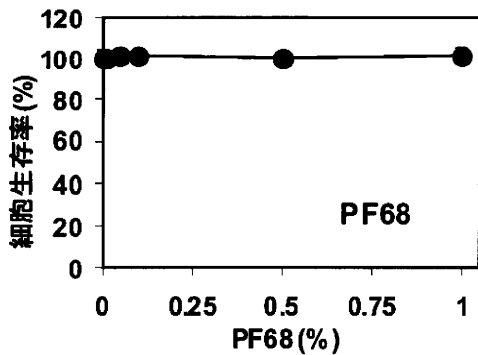


図 11 分散補助剤 PF68 が細胞増殖に与える影響

分散した MWCNT を A549 に各濃度 (20 $\mu\text{g/ml}$ ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) で添加し、毒性評価法を検討した。MWCNT は分担者 (三浦) が以前検討したナノ銀¹¹⁾とは異なり毒性発現時間が遅く、添加 24 時間後では生存率低下が 10% とほとんど毒性が認められなかった。マウスマクロファージ由来細胞株 (J774.1) では添加 16 時間後までに 40% 程度まで生存率が低下するとの報告¹⁰⁾がある一方、A549 細胞で添加培地から FCS を除いてばく露することで 48 時間後に明らかな毒性が認められたとの報告がある¹²⁾。そこで (I) 長時間ばく露、および (II) FCS 非存在下でのばく露を検討した。その結果、ばく露時間に依存した毒性発現の増強が認められたものの添加 72 時間後でも 20% 程度の生存率低下であった (図 12)。一方 FCS を除くこと自体が細胞毒性を引き起こしたため FCS 非存在下ばく露での検討は不適と判断した。

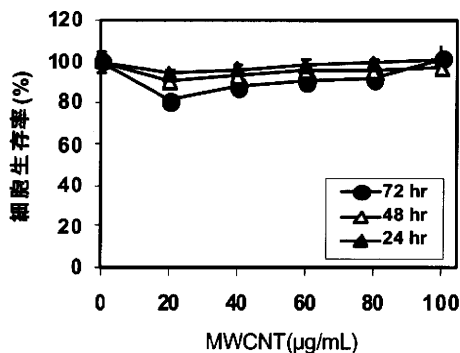


図 12 MWCNT 毒性の時間依存性 (5×10^4 細胞)

そこでさらに、MWCNT 添加時の細胞数について検討を加えた。図 12 の検討では対数増殖期のばく露を行うため 1×10^4 個の細胞を播いて 3 日間培養後に MWCNT を添加した。しかし添加時点で細胞数は増加することになる (A549 細胞の倍加時間より、約 5×10^4 個と考えられる)。添加時の細胞数が多過ぎることが毒性評価を不正確にしている可能性があるため、MWCNT 添加時の細胞数を 1×10^4 個および 5×10^4 個とし、細胞を播いて 24 時間後に MWCNT を添加して、添加 48 時間後の細胞生存率を測定した。その結果、図 13 に示すように添加時の細胞数が少ない群 (1×10^4 個/ウェル) が強い毒性を示した。

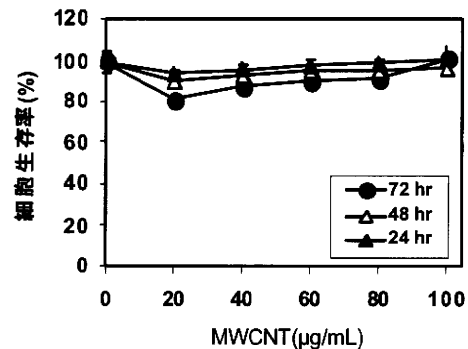


図 13 細胞数が MWCNT 毒性発現

② MWCNT が遺伝子発現に与える影響解析

MWCNT による酸化ストレス惹起、免疫系への影響⁹⁾、また線維化への関与などが報告されている¹³⁾。一方で免疫系には影響しないとの報告がある¹⁴⁾。MWCNT が及ぼす生体影響をスクリーニングするには cDNA マイクロアレイなどの手法が用いられ総括的検索を可能とするが、今年度は解析対象を絞り込み、ストレス関連、免疫関連および線維化関連遺伝子の発現量変動を指標に、MWCNT ばく露による生体影響の類推を行った。

各濃度 (5 $\mu\text{g/ml}$ ~ 100 $\mu\text{g/ml}$) の MWCNT を添加し 20 時間後の mRNA 発現量をリアルタイム PCR 法で測定したところ、免疫関連遺伝子 (IL-6 および TNF- α) の顕著な増加が認められた (図 14)。また酸化ストレスマーカーである HO-1 発現量の上昇を観察したが (図 14)、線維化関連遺伝子や他のストレスマーカー遺伝子の発現量に対してはほとんど影響を与えなかった。

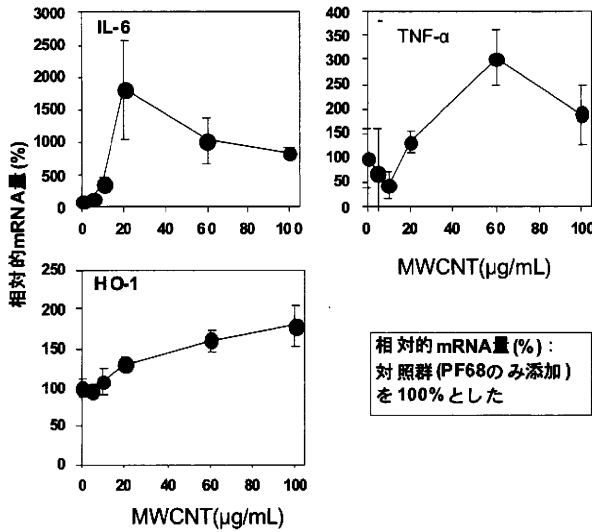


図 14 MWCNT による免疫関連及び酸化ストレス関連遺伝子の発現誘導

③ MWCNT 耐性細胞の樹立

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。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(毒性標的の同定)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¹⁵⁾、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(=発現量が変動)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。本検討で MWCNT 耐性細胞が樹立できれば、その細胞は 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。

MWCNT 耐性候補細胞を 20 μg/ml の MWCNT 存在下で 1 ヶ月程度培養し続け耐性細胞の樹立を行った。その結果、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 15)。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 MWCNT-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。

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

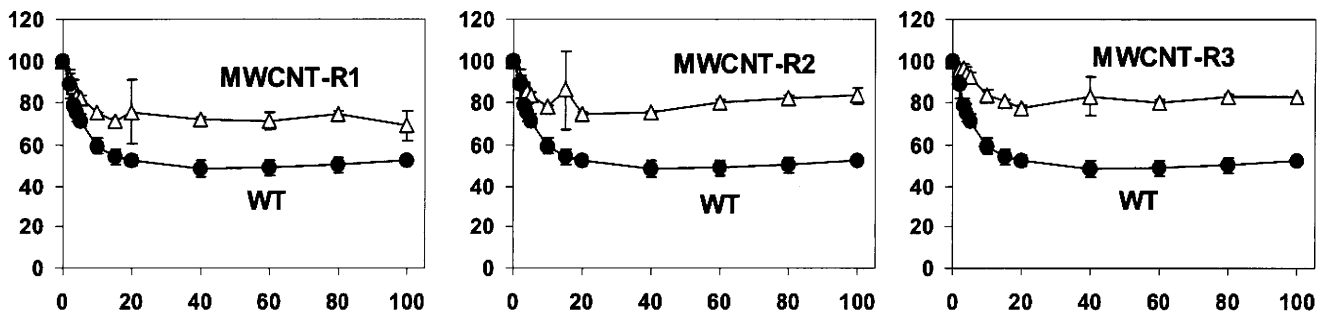


図 15 MWCNT 耐性細胞の MWCNT 感受性

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

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

蛍光 X 線測定により、触媒の主成分だと考えられる鉄の検出を行うことができた。また、酸化物を加えた混合試料に対して FP 法を行うことにより、オーダー分析も行った。本研究ではドライ条件での混合しか行わなかったが、アルコールなどの分散媒を用いた混合や、バルク FP 法ではなく、フィルター上に混合試料を塗布して薄膜 FP 法を行うなどの方法でより精度よく触媒金属残留量を測定する方法も可能であると考えられる。

分散状態の把握に関しては、DLS と SEM 観察の 2 つの方法を用いたが、DLS は簡便に実験ができる反面、得られる情報は限定的であり、SEM 観察が必須であるといえる。今回の気管内投与実験では、試料懸濁液ではなく、ラットに投与したスプレーミスト中の MW-CNT の分散が重要であると考えられる。これについては、ミスト粒子を捕集し、SEM 観察を行う方法により、現実にラット体内に入ったものに近い状態の試料の観察を行うことができたと考えられる。

模擬発生装置を用いた実験の結果では、粒径 50nm 以下の極めて小さい粒子の発生は観測されなかったが、50-100nm の粒子の発生は観測された。今回用いた MWCNT の太さは電子顕微鏡観察の結果 88nm±0.5nm であるため、凝集していない単繊維が飛散していた可能性が極めて高い。従来、一次粒子がナノスケールであっても凝集性が高いため、労働者がナノにばく露することはないといわば常識のように語られてきた。これは決して根拠がないわけではなく、実際にナノ材料の生産・開発に携わ

る側にとってみれば、ナノ材料の凝集を解くことは極めて大きな課題であることは間違いない。ただし、それは、材料の生産効率を示す歩留まりあるいは、収率という尺度でみた場合であり、生体影響・環境影響に着目した場合、必ずしも一次粒子の飛散は無視しうる量ではないと予想され、今回の実験結果も一次粒子の飛散の可能性は高いことを示唆している。

ばく露濃度を評価する装置の比較という観点で今回の実験結果をみると、CNCについては、温度・圧力の外乱に弱く、表面積計の方が勝れていると考えられる。問題は表面積計が示す空气中粒子の総表面積という数値と、ばく露エアロゾル中のナノ成分の質量ないし個数濃度とをどう結びつけるかであり、これについては、実際のばく露装置から発生した粒子を用いて、SMPSとの比較データを取る必要があると考えられる。

ギャンブル氏液を用いて、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。

MWCNTの毒性評価を、至適細胞数を検討した上で行ったところ、添加48時間後で顕著な毒性発現が認められた。無処理群（対照群）の細胞数の増加を考慮すると、より長時間での観察は不適と考えられる。また高濃度ばく露で生存率が回復（上昇）したが、この結果は平野らの報告¹⁰⁾と一致した。回復した理由として、MWCNTの高濃度添加のた

め分散したMWCNTの再凝集が生じ、細胞毒性が軽減した可能性が考えられる。

本検討で用いたA549細胞はII型上皮由来の細胞であり、IL-6やIL-8などの発現・分泌が報告されている。MWCNTは免疫関連遺伝子の発現量を顕著に増加させたことから、免疫系への影響を検討する上でも適当な細胞と考えられる。

本検討で樹立した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が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¹⁶⁾、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¹⁰⁾。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[4]。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

動物実験に用いたMW-CNTについて各種分析法を用いたキャラクタリゼーションを試みた。蛍光X線分析、DLS、脱パラフィン切片のSEM観察と

いった比較的簡便な前処理しか要しない分析方法でも、MW-CNTの性状をある程度知ることが可能であり、長期間にわたり、大量の試料を扱う吸入曝露実験を行う際のドーズの管理には、このような手法を用いるのが適切であると考えられる。

模擬発生装置を用いた気中MWCNTの濃度測定では、全てのナノ粒子について、あるいは全てのMWCNTについて、普遍的な結論ではないが、粉体として取り扱う作業においても、ナノ一次粒子の気中への発生の可能性はゼロではないということがわかった。

生体内寿命の評価法の検討に関して、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。

MWCNTの毒性発現は長時間経過して生じる。そのため毒性評価にはMWCNT添加時の至適細胞数を予め検討することが必要であることが示された。またMWCNTは免疫系に大きく影響する可能性が示された。さらに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。マイクロアレイ法の解析結果から、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。

参考文献

- (1) CNT 製造法：
<http://www.hodogaya.co.jp/nct/process.html>,
http://www.nikkiso.co.jp/d_kenkyu/rd_88.html
- (2) カーボンナノファイバー製造法：
http://www.jemco-mmco.co.jp/products/products_e04.html
<http://www.sdk.co.jp/html/products/finecarbon/vgcf.html>
- (3) Gamble J (1967) Chemical anatomy, physiology and pathology of extracellular fluid, 8th Ed. Harvard University Press, Cambridge, MA.
- (4) 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
- (5) Koshi K, Homma K, Kohyama N, Sakabe H (1975) The solubility and cell toxicity of metallic fume. *Ind Health* 13, 253-8.
- (6) Koshi K (1979) Solubility and celltoxicity of cadmium. *Ind Health* 17, 187-97.
- (7) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Ohashi, N., Kitajima, S. and Kanno, J. (2008) Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 33, 105-116
- (8) Han, S. G., Andrews, R. and Gairola, C. G. (2010) Acute pulmonary response of mice to multi-wall carbon nanotubes. *Inhal Toxicol* 22, 340-347
- (9) Mitchell, L. A., Gao, J., Wal, R. V., Gigliotti, A., Burchiel, S. W. and McDonald, J. D. (2007) Pulmonary and systemic immune response to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Toxicol Sci* 100, 203-214
- (10) Hirano, S., Kanno, S. and Furuyama, A. (2008) Multi-walled carbon nanotubes injure the plasma membrane of macrophages. *Toxicol Appl Pharmacol* 232, 244-251
- (11) Miura, N. and Shinohara, Y. (2009) Cytotoxic effect and apoptosis induction by silver nanoparticles in HeLa cells. *Biochem Biophys Res Commun* 390, 733-737
- (12) Simon-Deckers, A., Gouget, B., Mayne-L'hermite, M., Herlin-Boime, N., Reynaud, C. and Carriere, M. (2008) In vitro investigation of oxide nanoparticle and carbon nanotube toxicity and intracellular accumulation in A549 human pneumocytes. *Toxicology* 253, 137-146
- (13) Ryman-Rasmussen, J. P., Tewksbury, E. W., Moss, O. R., Cesta, M. F., Wong, B. A. and Bonner, J. C. (2009) Inhaled multiwalled carbon nanotubes potentiate airway fibrosis in murine allergic asthma. *Am J Respir Cell Mol Biol* 40, 349-358
- (14) Elgrabli, D., Abella-Gallart, S., Robidel, F., Rogerieux, F., Boczkowski, J. and Lacroix, G. (2008) Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology* 253, 131-136
- (15) 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
- (16) 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.

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

論文

Mitsutoshi Takaya, Fumio Serita, Kazunori Yamazaki, Shigetoshi Aiso, Hisayo Kubota, Masumi Asakura, Naoki Ikawa, Kasuke Nagano, Heihachiro Arito, and Shoji Fukushima(2010): Characteristics of Multiwall Carbon Nanotubes for an Intratracheal Instillation Study with Rats Industrial Health, 48(4),452-459

学会発表

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(2009)多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の単回強制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, 第 82 回日本産業衛生学会

H. 知的財産

なし

分担研究報告書

ナノマテリアルの吸入曝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曝露による呼吸器への生体影響の評価手法として、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。ラットに気管内投与法でMWCNTの単回投与を行い、リスク評価に必要な量-反応関係を得られるか検討した。併せて、経気道曝露後のMWCNTの体内動態を調べるため、MWCNTの遠隔臓器への移行を光学顕微鏡レベルで検索した。その結果、II型肺胞上皮細胞過形成、微小肉芽腫、線維化、マクロファージに貪食されたMWCNTの肺関連リンパ節への移行に量-反応関係が認められた。MWCNTの遠隔臓器への移行は、気管内投与後1日から脾臓、心臓、肝臓、腎臓、脳に認められた。以上、MWCNTの気管内投与法で量-反応関係が明確な生体影響の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曝露試験の代替法として有用なことが示された。

A. 研究目的

ナノマテリアルの吸入曝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）用い、気管内投与法の有用性を検証した。ヒトでのMWCNTの曝露経路は主として吸入曝露経路であり、動物実験データからヒトへの外挿には吸入曝露実験が最も望ましい。しかし、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。このため、本研究では吸入曝露試験に先行して、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試みた。また、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。

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-I MWCNTのラットを用いた気管内投与試験による呼吸器への生体影響の研究

1) 試験デザインとMWCNTの気管内投与

13週齢の雄性F344/DuCrj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 µg/0.3 ml/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

5mg/ m³(US.OSHA PEL for carbon graphite)を参考として、MWCNT 5mg/ m³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 μg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 μgを投与した。また、肺線維化を起こす陽性対照としてα-Quartz(MIN-U-SIL 5)、160 μg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 μg群の各解剖期で、別途、透過型電子顕微鏡による超微細形態的検索に2匹を供試した。

2) 動物の一般状態観察、体重測定、気管支・肺胞洗浄液の採取と分析、肺重量測定

動物の一般状態は毎日観察、体重は毎週一回測定した。試験デザインに従って、気管内投与後、計画された各解剖日に、MWCNT投与動物の半数(32匹)をネンプタールの腹腔内投与による麻酔下、腹大動脈からの放血により動物を安楽死させた。気管支・肺胞洗浄液を左肺から採取して細胞学的検査、生化学的検査に供試した。また、右肺の重量を計測した。気管支・肺胞洗浄液の採取、細胞学的検査及び生化学的検査は次の手順で行った。剖検直前に右気管支を結紮して気管から生理食塩水5.1 mlを注入し、回収。この操作を3回繰り返して、左肺から洗浄液のほぼ全量を回収した。回収した洗浄液の液量を計量した後、細胞数についてはADVIA 120(シーメンスヘルスケアーダイアグノスティック株)を用い、細胞分画

についてはCytospin 4(サーモフィッシャーサイエンティフィック株)を用いて遠心収集、メイギムザ染色をした塗沫標本について500細胞を光学顕微鏡下で分類した。生化学的検査については、乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、総蛋白、アルブミン量をAutomatic analyzer 7080(株日立製作所)を用いて計測した。

3) 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・肺胞洗浄液の採取した動物の肝臓と腎臓を用いた。

ii) 病理組織学的検索

常法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製して病理組織学的検査を行った。

まず、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 MWCNTの遠隔臓器への移行の研究

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 μ 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、肺関連リンパ節へのMWCNTの移行と、それ以外の全身諸臓器への移行を検討した。

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。

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、ケルンエヒトロート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。このため、本研究では、光学顕微鏡下の観察で幅1 μ 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ト染色法標本を用いて検索を行った。また、光学顕微鏡下の

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

C-I 肺への影響：気管内投与に用いたMWCNT懸濁液のキャラクタリゼーションの結果は、分担研究を担当した鷹屋等の報告によると、MWCNTは直径 88 ± 5 nm、長さ 5.0 ± 4.5 μ m、5.0 μ m以上の繊維の比率は重量にして全体の38.9%であった。不純物としては、鉄4400ppm(wt/wt)、クロム48ppm、ニッケル17ppmが認められたと報告されている。

体重の推移及び肺重量：MWCNTの気管内投与による体重への影響は投与後91日まで一貫して認められなかったが、肺重量にはMWCNTの投与により軽度な増加が認められた。右肺重量は対照群と比較して増加幅は小さいが、統計学的に有意で投与用量に対応した変化であった。陽性対照としたQuartz投与群には投与による肺重量の増加は認められなかった。

病理組織学的検索：気管内投与後、肺胞腔内に分散したMWCNTは、気管・気管支～肺胞腔内でマクロファージによる盛んに貪食されることが病理組織学的に示された一方、マクロファージに貪食されていないMWCNTは低用量群で投与後7日、高用量群では投与後28日には肺胞腔には認められなくなった(図2)。マクロファージに貪食されたMWCNTの沈着は、低用量群では時間経過とともに肺胞内から減少したのに対し、高

用量群では91日間の観察期間を通じて高レベルの沈着が持続した(図2)。さらに、肺胞壁内にマクロファージによって貪食されたMWCNTの沈着が認められた。その肺胞壁内沈着の推移をみると、低用量群では投与後7日から認められ、その後沈着の程度が増加するものの、28日をピークとして減少することが示された。これに対して、高用量群では投与後7日から認められた肺胞壁内への沈着はわずかな減少傾向を示すものの、91日に至るまで高いレベルでの持続が示された(図3)。病理組織学的検査で、MWCNT投与群の肺には好中球を主体とした炎症性細胞浸潤(図4)、MWCNTを貪食した肺胞マクロファージの浸潤(図5)、II型肺胞上皮細胞の過形成(図6)、微小肉芽腫の形成(図7)、および肺の線維化(図8)が認められた。炎症性細胞浸潤はMWCNT低用量群では対照群との差はなかった。高用量群では投与後1日に炎症性細胞浸潤を認めたが、投与後7日では対照群と差が認められない程度まで回復した。肺胞マクロファージの浸潤は低用量群では時間経過とともに肺胞内から徐々に減少する傾向がみられたのに対して高用量群では91日間の観察期間を通じて高いレベルで持続した(図5)。傷害を受けた肺胞上皮細胞の再生と考えられるII型肺胞上皮細胞の過形成が投与後7日から認められたが、このII型肺胞上皮細胞の過形成は投与後28日をピークとして減少することが示された(図6)。肺の組織内に線維化を伴った微小肉芽腫の形成がMWCNT貪食マクロファージの集簇巣を中心に認められた。この微小肉芽腫はMWCNT高用量群だけに7日から認められ、その後、時間経過とともに病変の進行が示された(図7)。肺の線維化病変についてみると、MWCNT低用量群では投与後28日から、高用量群では投与後7日から極めて軽度なび慢性の線維化が認められた(図8)。この線維化病変の程度はMWCNTの用量と観察期間に相関して増加する

ことが示された。また、肺の線維化病変の強さはMWCNT低用量(40 μ g)群と α -Quartz 160 μ g群で同程度であった。

気管支-肺胞洗浄液、生化学検査：気管支-肺胞洗浄液の生化学検査の結果を図9に示した。

気管内投与後1日に、総蛋白とアルブミンの値に一過性の増加みられ、気管内投与直後の急性炎症による毛細血管透過性の亢進が示された。総蛋白の半量がアルブミンであることから、総蛋白の残り半量がグロブリンであることが示差された。肺胞上皮細胞の傷害の指標とされるLDHとALPは投与後1日の値が最も高く、7、28、91日と時間経過とともに漸減したことから、肺胞上皮細胞の傷害も気管内投与直後に起こり、その後は軽減することが示された。これら血液生化学的検査の値はいずれも投与用量に相関した変化であった。陽性対照としたQuartz投与群の投与後1日の値は、MWCNTと比較して総蛋白とLDHの値が約1/3、ALPの値が約1/2であった。

C-II MWCNTの遠隔臓器への移行

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移行：肺関連リンパ節へのMWCNTの移行を図10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 μ g群と160 μ 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 μ 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。

全身諸臓器への移行：160 μ 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11）。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12,13,14）。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15）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16）。160 μ 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（図11）。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17）。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（図18）。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18）。走査型電子顕微鏡を用いた検索によって、脳に沈着した繊維状物質がMWCNTであることを確認した（図19）。

D. 考察

MWCNTの単回気管内投与後にラットにみられた生体反応として、投与後1日目に、肺に好中球の遊走を中心とした急性炎症、と肺組織の傷害が起こることが、病理組織学的検査及び気管・肺胞洗浄液の細胞学的検査及び生化学的検査により示された。特に気管支・肺胞洗浄液の生化学的検査で総蛋白とアルブミンの増加がみられたことから肺毛細血管からの血漿蛋白の漏出が関与していると考えられた。

投与後28日以降、MWCNT投与群に病理組織学的検査で肺に線維化が認められ陽性対照とし

たQuartz投与群よりも幾分強い変化であった。

MWCNT投与群とQuartz投与群で肺にみられた生体反応を比較すると、肺重量、気管・肺胞洗浄液（生化学的検査）、病理組織学的検査（肺の線維化）でMWCNT投与群の方がQuartz投与群よりも強い反応が認められた。

MWCNTの気管内投与試験によって、気管から肺内に入ったMWCNTは肺胞腔内でマクロファージにより捕食され、その後マクロファージが肺胞壁内に浸潤して肺組織内にMWCNTが沈着、その一部は肺外のリンパ節に移行することが示された。今回の実験条件では、ラットへの気管内投与量が40 μ g以下であれば、肺胞壁内に侵入したMWCNTは除々に肺外に排泄されて肺内沈着量は減少していくことが示された。ラットの気管内投与による肺毒性として、投与初期に於ける急性炎症、マクロファージによるMWCNT貪食と肉芽形成、II型肺胞上皮細胞の過形成が認められた。これらの病理組織学的所見は一般的な異物反応と同じ非特異反応と解釈している。文献的にも、単層カーボンナノチューブやMWCNTを実験動物に気管内投与すると病理組織学的には肺に肉芽形成が起こり、気管支・肺胞洗浄液の検査で炎症細胞、総蛋白、LDH及びALPの増加がみられることが報告されている [1,2, 3]。本研究の結果はこれらの報告と一致するものであった。軽度の肺線維化が認められ、この線維化病変はアスベスト等で問題となる肺線維症の発生を考慮すると繊維状、粒子状物質による特有な変化と推察される。MWCNTが肺に進行性の線維化を起こすという報告 [4] がされており、MWCNTが肺に進行性線維症を起こすか否かについては、さらに詳細な検索を行ってから判断する必要がある。

試験に用いた投与量では、MWCNT、 α -Quartzとも比較的穏やかな結果が示されたが、MWCNTの方が α -Quartzよりも強く現れた。

これは投与量を重量単位として比較したためであり、本試験での投与量を粒子数（または粒子の表面積）で考えた場合は、MWCNTの方が α -Quartzよりもはるかに投与した粒子数が多い（または粒子の表面積が大きい）。その場合はMWCNTよりも α -Quartzの方が線維化は強いと考えられる。また、40 μ g/匹 MWCNTの気管内投与は肺への過負荷(Lung Overload)を引ずボーダーライン付近にあると考えられる。

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、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貪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20,21）。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。肺内の多くのMWCNTがマクロファージに貪食されてリンパ行性に肺関連リンパ節へと移行し、そこでトラップされるが、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MWCNTが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、気管内投与法によってMWCNTの生体影響に関して量-反応関係が明確な多くのデータを入手することが可能であり、それらのデータをリスク評価に活用する

ことも可能と考えられる。以上、MWCNTの気管内投与法によって、生体影響に関する量-反応関係が明確な、多くの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り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) Lam et al.
Pulmonary toxicity of single-wall carbon nanobutes in mice 7 and 90 days after intratracheal instillation.
Toxicol Sci. **77**:126-34, 2004.
- (2) Warheit DB, Laurence BR, Reed KL, et al.
Comparative pulmonary toxicity assessment of single-wall carbon nanotubes in rats.
Toxicol Sci. **77**(1):117-25, 2004.
- (3) Muller et al.
Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes.
Toxicol Appl pharmacol **207**:221-31, 2005.
- (4) Shevedova et al.
Unusual inflammatory and fibrogenic pulmonary responses to single-walled carbon nanotubes in mice.

Am J Physiol Lung cell Mol
Physiol, 205:L698-L708, 2005.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

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.

○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ァウンダリ研究報告書、第2巻 (2009年) p 98-99

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

○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

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

○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

○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

○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、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

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一例、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、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)の単回強制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

○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)の単回強制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

○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

H. 知的所有権の所得状況

1 特許所得

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 μ g/rat

Solvent : PBS+0.1% Tween80

α -Quartz(MIN-U-SIL 5,US, Sillica)

Dose : 160,0 μ g/rat

Solvent : PBS+0.1% Tween80

Dose selection

Tentative application of OSHA's PEL for carbon graphite (5.0 mg/m³)

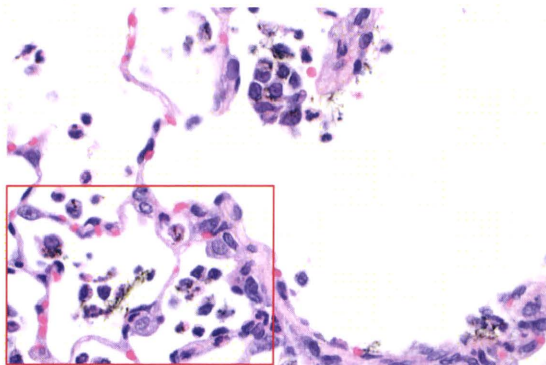
MWCNT aerosol at 5.0 mg/m³ for 6h, 5days

Intratracheal instillation
(at the age of 13 wk)

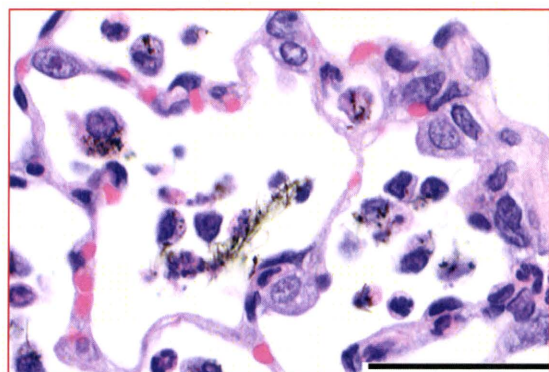


Pulmonary deposition of MWCNT

☒2. Deposition of MWCNT in the alveolar space



↓
MWCNT 160 μ g /rat,
1 day after instillation



Bar 50 μ m

