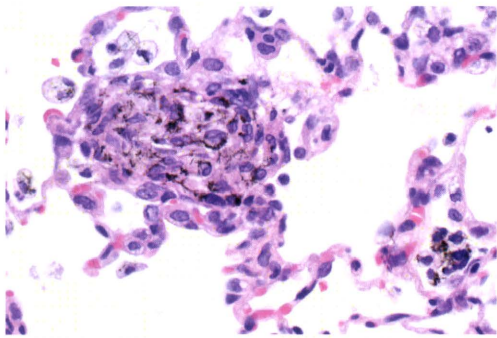
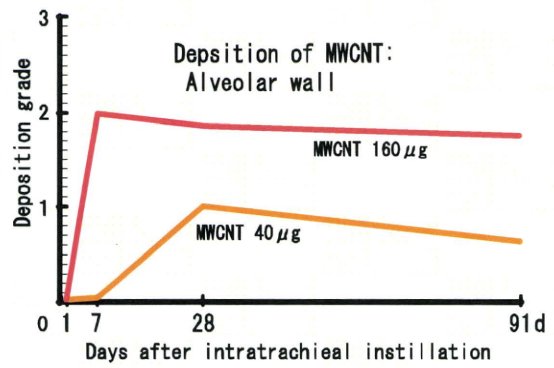


Pulmonary deposition of MWCNT

図3. Deposition of MWCNT in the alveolar wall

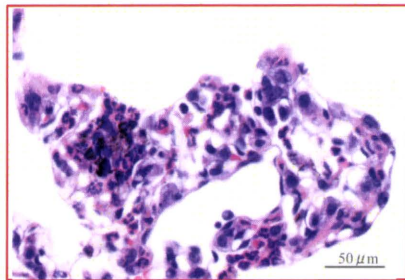
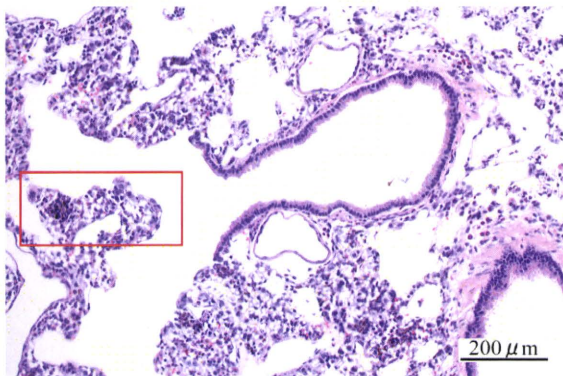


MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{rat}$, 7 days after instillation

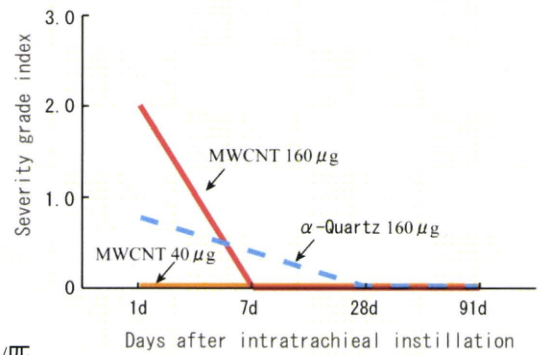


Pulmonary toxic lesions induced by MWCNT

図4. Infiltration of inflammatory cells

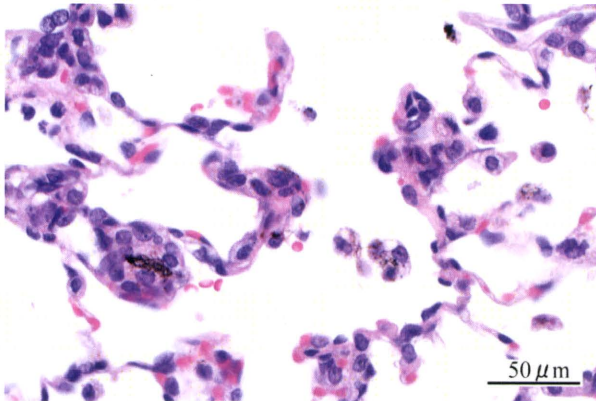


MWCNT 160 $\mu\text{g}/\text{匹}$
投与後 1日

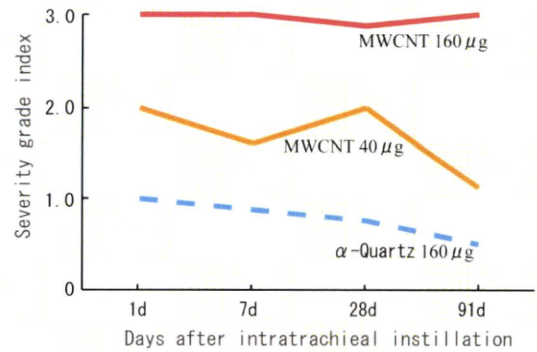


Pulmonary toxic lesions induced by MWCNT

図5. Infiltration of alveolar macrophages

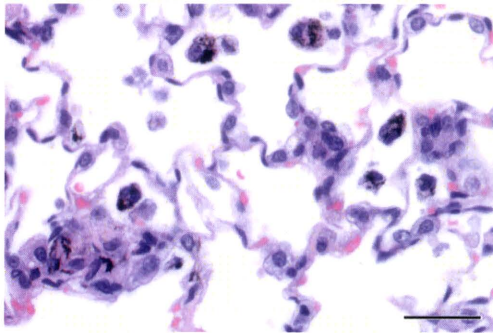


MWCNT 160 μg /匹
投与後 7日

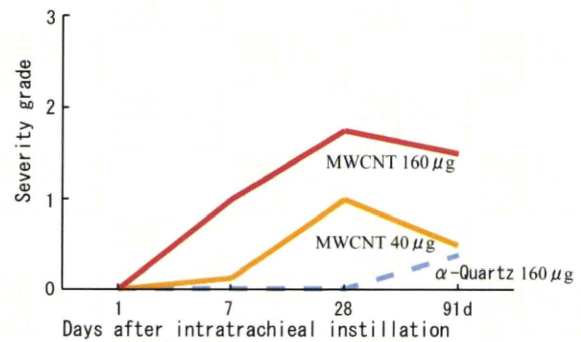


Pulmonary toxic lesions induced by MWCNT

図6. Hyperplasia of type II pneumocytes

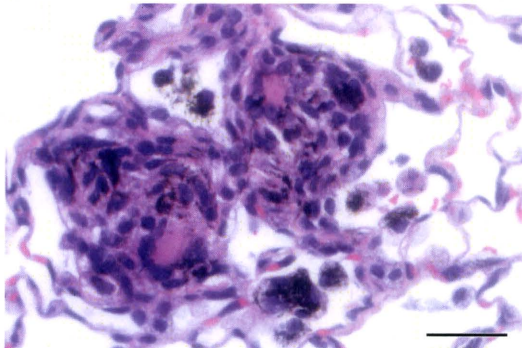


MWCNT 160 μg /rat, 7 days after
instillation,
Bar 50 μm

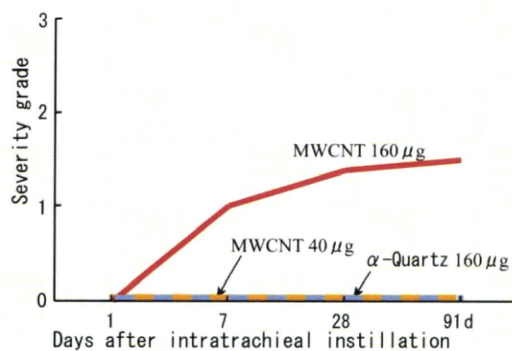


Pulmonary toxic lesions induced by MWCNT

図7. Microgranuloma

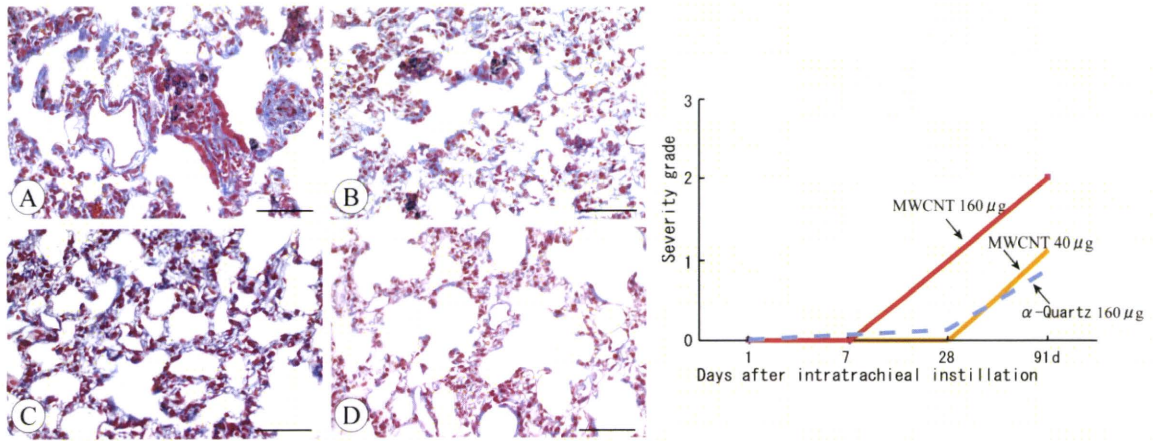


MWCNT 160 μg /rat, 91days after
instillation,
Bar 50 μm



Pulmonary toxic lesions induced by MWCNT

図8. Fibrosis



A: MWCNT 160 µg/rat

B: MWCNT 40 µg/rat

C: α-Quartz 160 µg/rat

D: Control

91 days after intratracheal instillation, Masson's trichrome staining
Bar 100µm

図9. BALFs 生化学検査結果

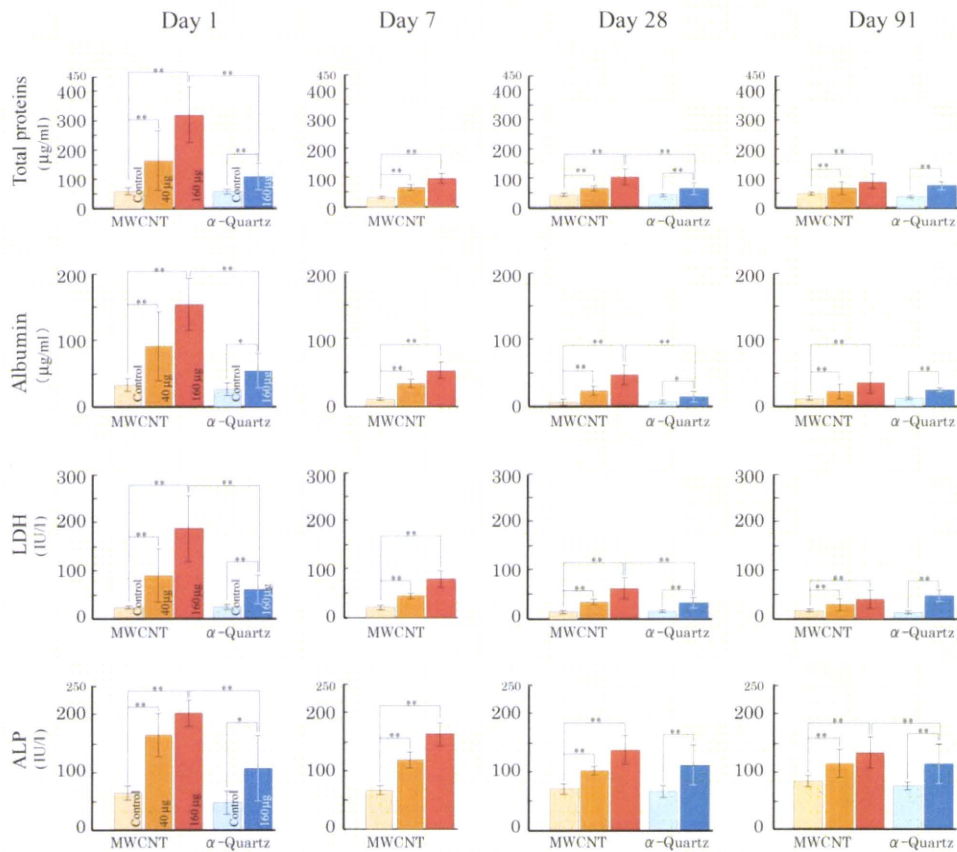


Fig. 5

図10. Translocation of MWCNT to Lung-Associated Lymph Nodes

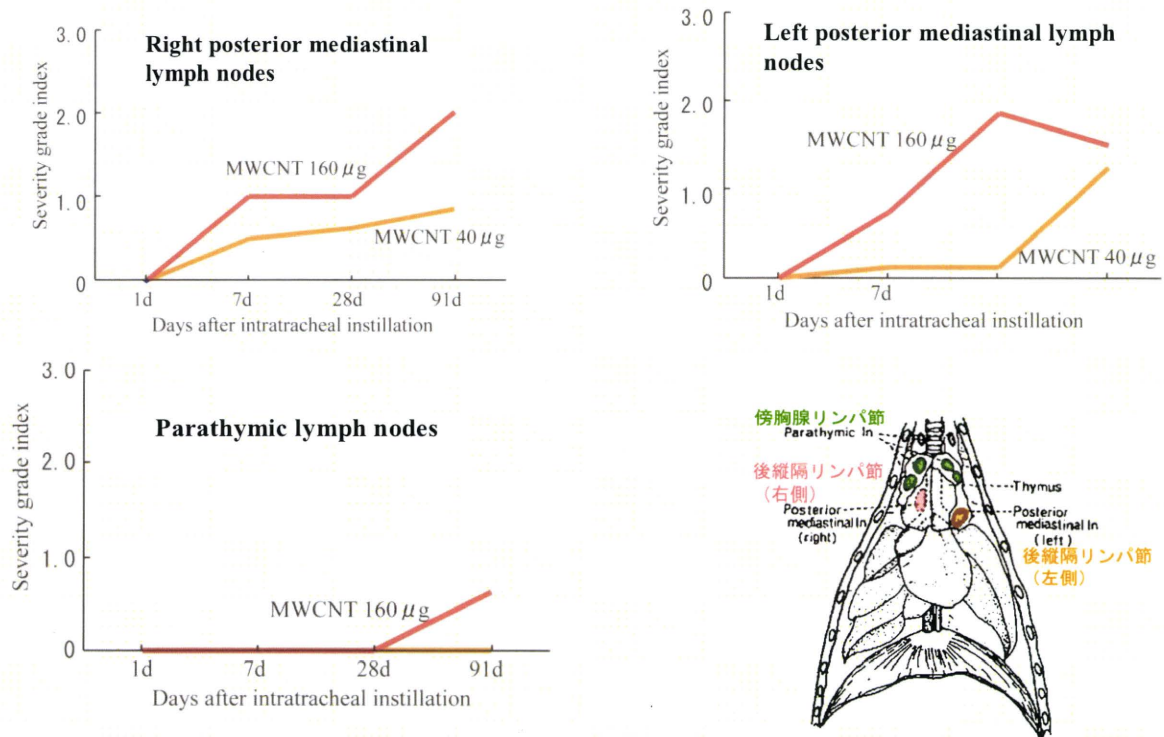
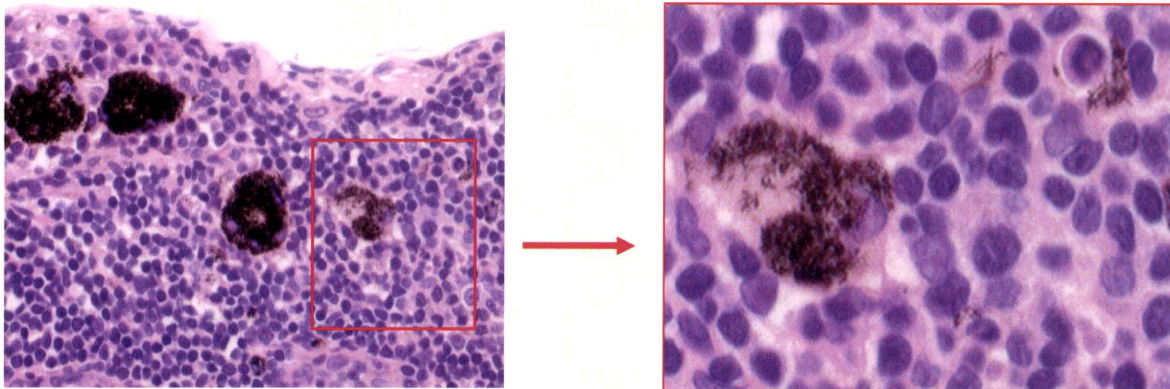
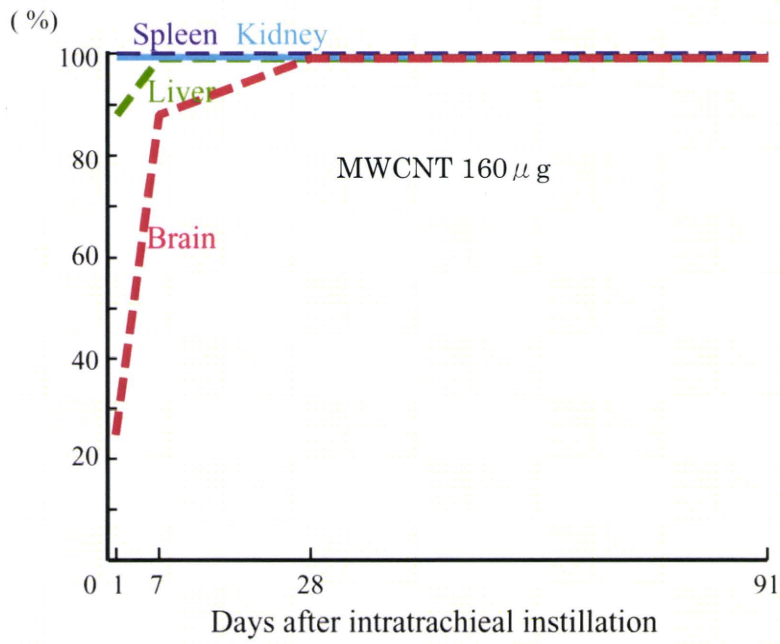


Fig. 2. The location of lymph nodes (In) in the thoracic cavity.

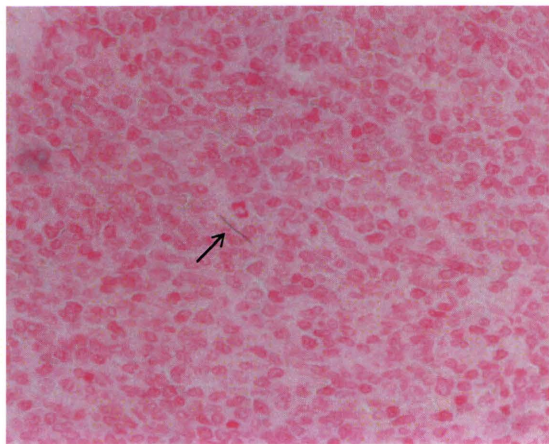


Deposition of MWCNT in the macrophages of the right posterior mediastinal lymph node.

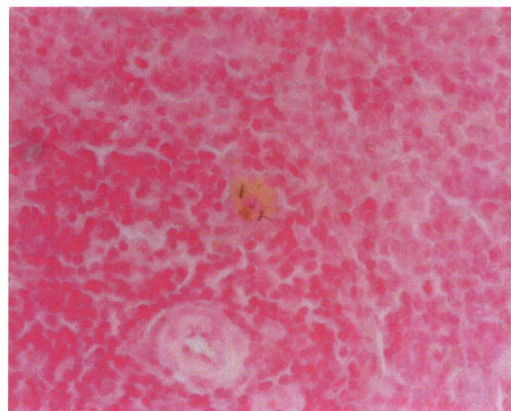
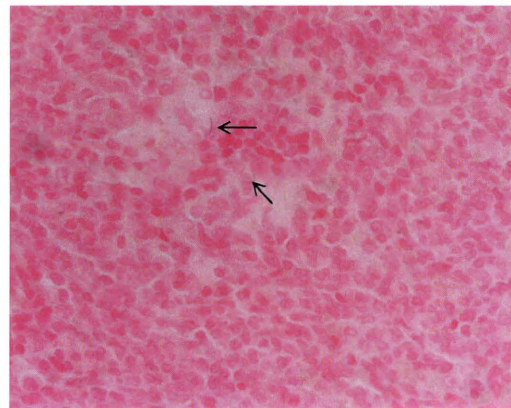
☒11. **Translocation of Intratracheally Instilled MWCNT to Distal organs in Rats**



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



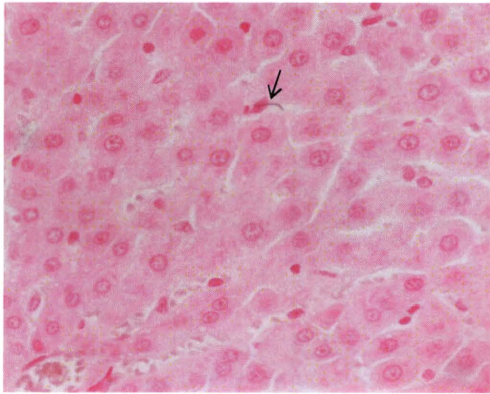
MWCNT 160 µg /rat, 1 days after instillation, Kernechtrot stain



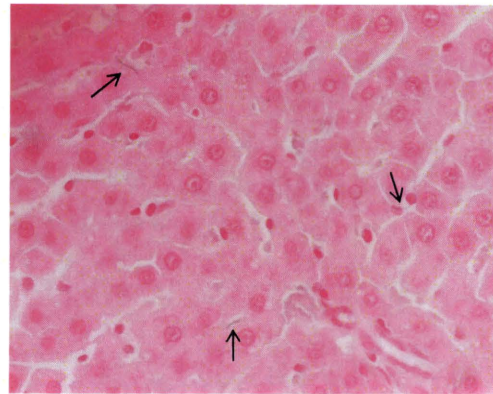
MWCNT 160 µg /rat, 91 days after instillation, Kernechtrot stain

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

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



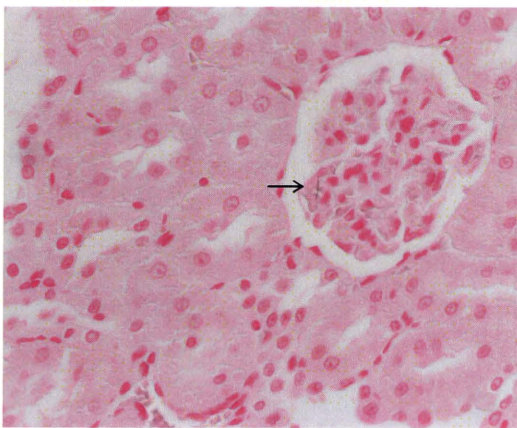
MWCNT 160 μg /rat, 1 days after instillation,
Kernechtrot stain



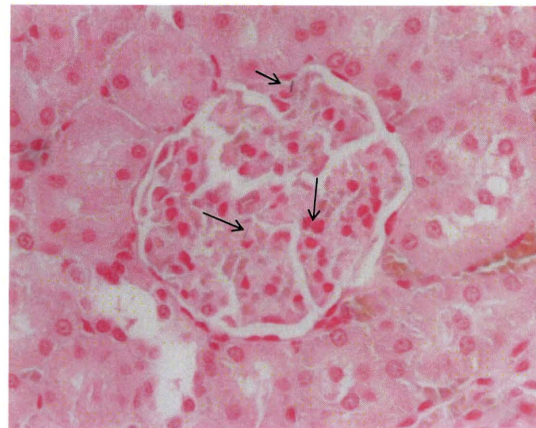
MWCNT 160 μg /rat, 91 days after instillation,
Kernechtrot stain

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

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



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



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

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

図15. 顕微鏡切片から電顕試料の作製

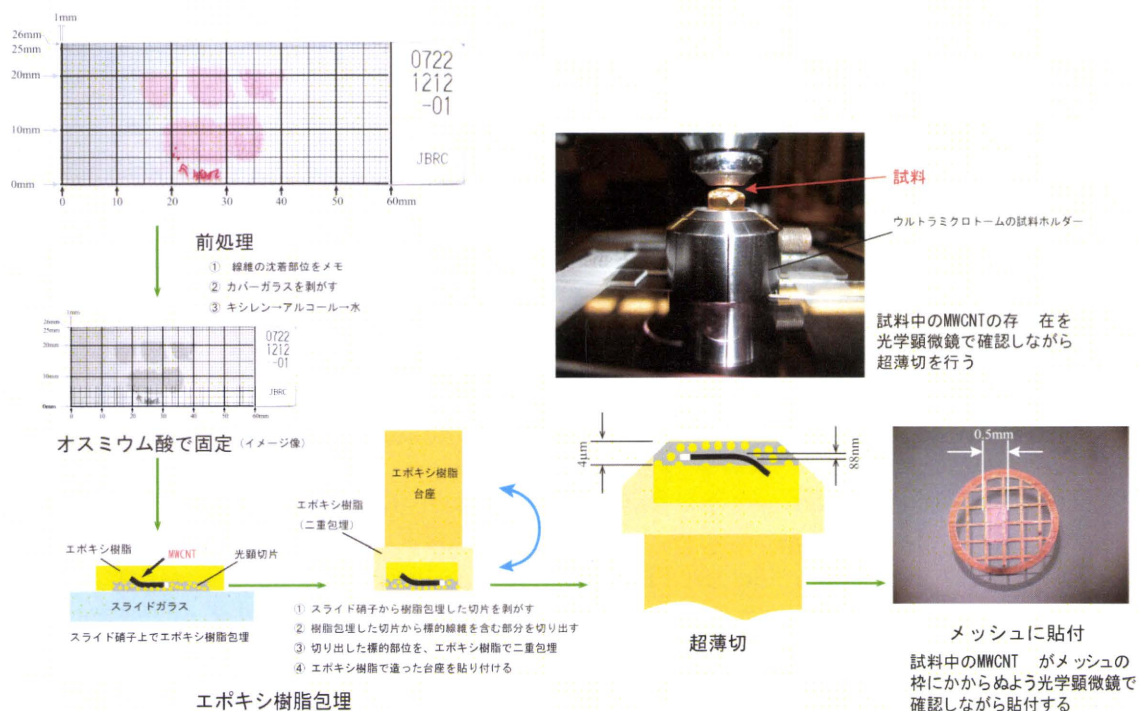
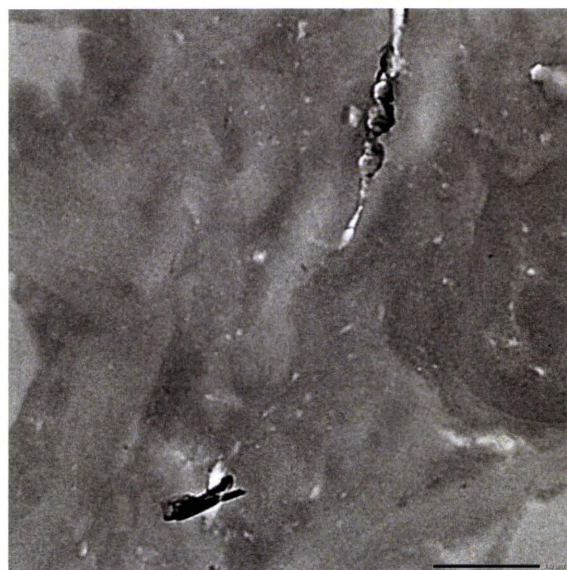
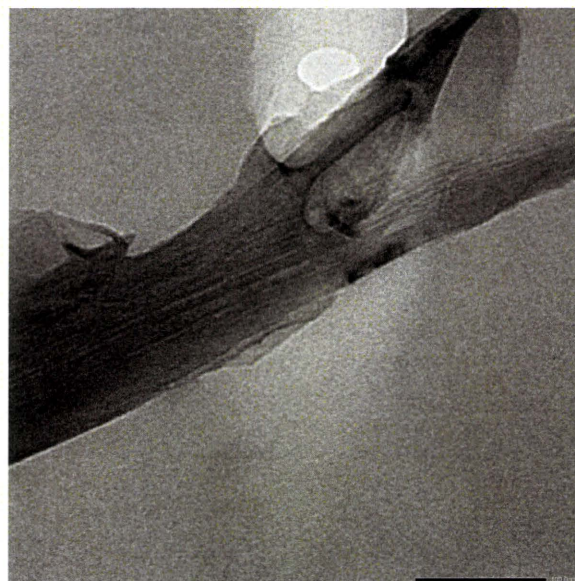


図16. Transmission electron microscopic (TEM) observation for fibers in the renal glomerule

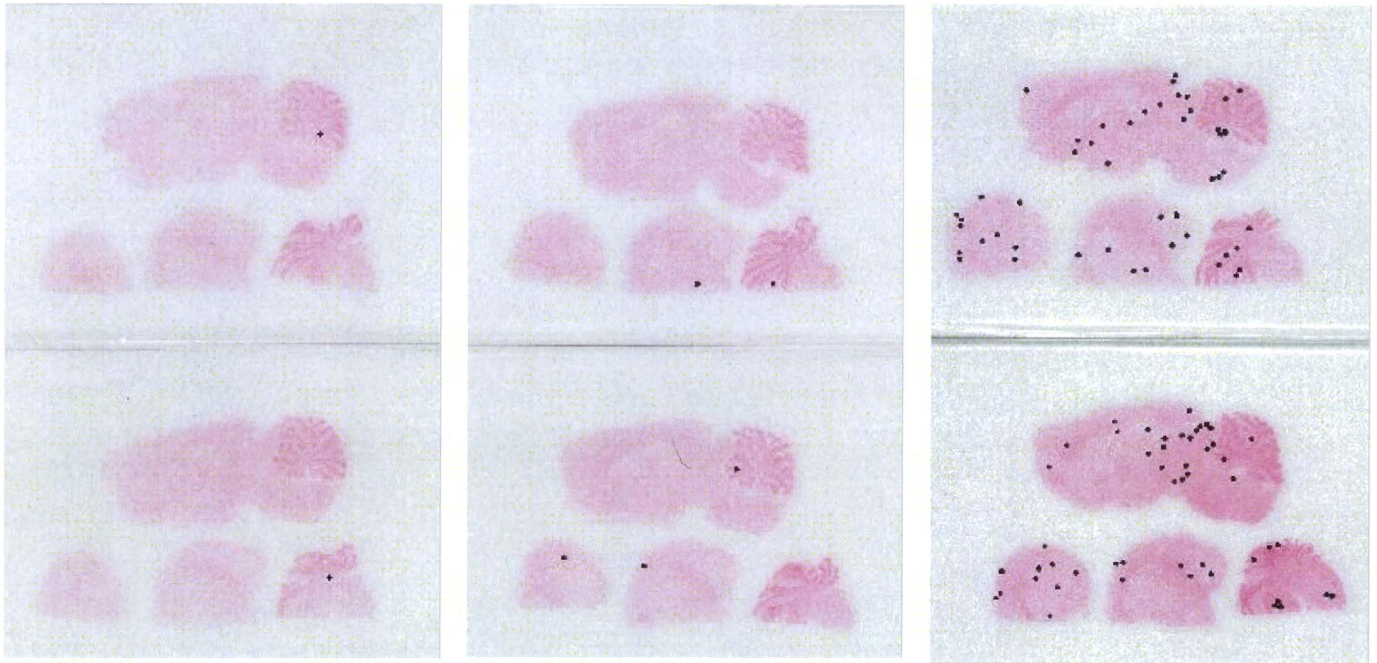


(unstained)



Magnified

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



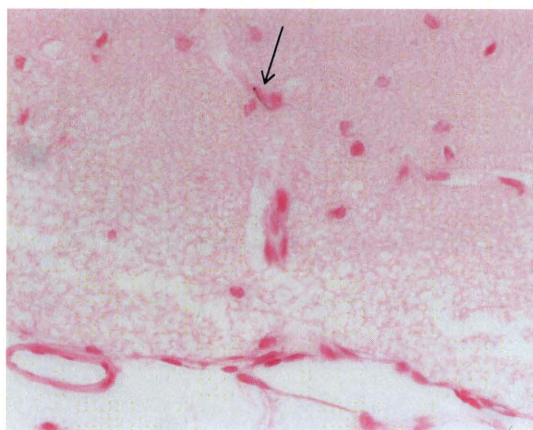
1 day after instillation

7 days after instillation

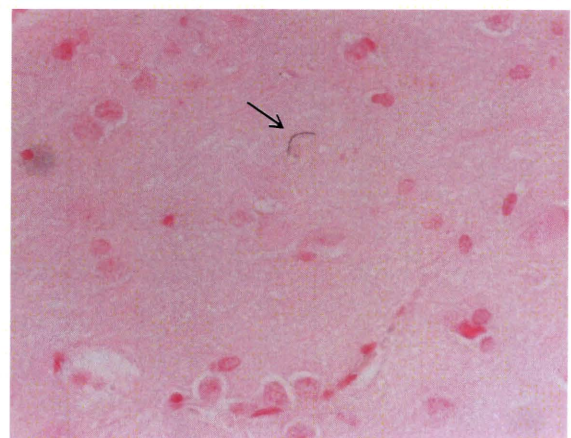
91 days after instillation

MWCNT 160 μ g/rat

☒18. Translocation of MWCNT to the Brain



MWCNT 160 μ g/rat, 7 days after instillation
(Kernechtrot stain)



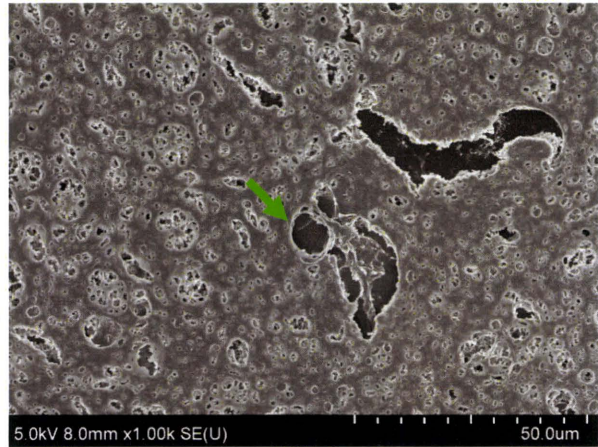
MWCNT 160 μ g/rat, 7 days after instillation
(Kernechtrot stain)

- 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.

图19. Translocation of MWCNT to the Brain



H&E, 40 ×

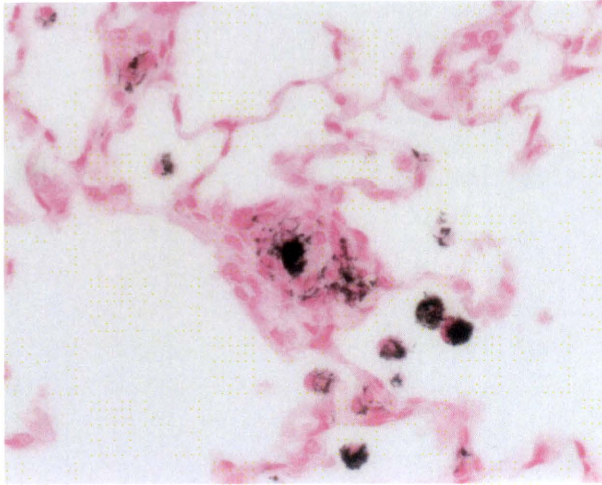


SEM image, 1000 ×



SEM image, 20000 ×

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

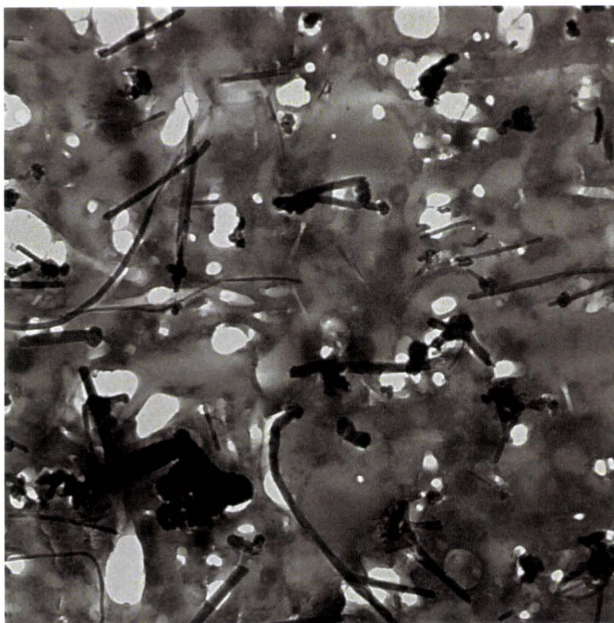


Microgranuloma in alveolar wall

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)

☒21. 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.

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

研究分担者 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

研究協力者 戸谷 忠雄 独立行政法人労働安全衛生総合研究所有害性評価研究グループ前主任研究員
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

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。平成 20～21 年度は、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を多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺外への移行とその影響について動物実験によって検討した。初年度は、MWCNT をラットに 40 および 160 μ g/匹の用量で単回気管内投与し、経時的に投与後 91 日まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査、病理学的検査を行い、呼吸器以外の臓器や血液への影響を調べた結果、MWCNT 投与による影響は見られなかった。次年度には、1、7、28 および 91 日後に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした病理組織学的検索を行った。その結果、40 および 160 μ g/匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓への MWCNT の移行は認められなかった。また、これらの臓器には病理組織学的変化がみられなかった。22 年度は労働現場での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、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。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

ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品の経気道的ばく露によるヒトの健康影響を評価する上で、吸入したナノマテリアルが心臓や脳など他の臓器に移行するかどうかという点が課題になっている (NIOSH, 2007)。経気道的に体内に侵入したナノマテリアルが呼吸器から他の臓器に移行すれば、移行した先の臓器にナノマテリアルが影響を与える可能性がある。また、肺などの呼吸器の障害に伴って、二次的に他の臓器に影響を与える可能性も否定できない。本研究は、経気道的に暴露されたナノマテリアルの肺以外の臓器への影響、すなわち肺外影響の評価手法を明らかにすることを目的とする。本研究では、実験動物を用いたナノマテリアルの気管内投与による

肺外影響を検討する研究と労働現場におけるナノサイズのナノマテリアルばく露が労働現場で起こりうるかという観点からの研究を実施した。前者は平成 20～21 年度に、後者は平成 22 年度にかけて実施した。

A-1 動物実験による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

ナノマテリアルのうち多層カーボンナノチューブ (MWCNT) をラットに気管内投与し、血液学および血液生化学的な影響、肝臓・腎臓・脾臓を中心とした病理組織学的検索に実施し、ナノマテリアルの経気道ばく露による肺外影響を検討した。

A-2 労働現場におけるナノマテリアルばく露に関する研究

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。

B. 研究方法

B-1 動物実験による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

① 実験の概要

ラットに MWCNT を 40 および 160 μ g/匹単回気管内投与し、投与 1、7、28 及び 91 日後に動物を解剖し、肝臓、腎臓、脾臓について光学顕微鏡による観察を行った。

② 被験物質

MWCNT (ロット番号 061220) は三井物産株より提供を受けた。気管内投与時の MWCNT の性状は、鷹屋ら (Takaya et al, 2010) の研究によれば、直径が平均 88nm (中央値 87nm) であり、長さが平均 5.0 μ m (中央値 4.0 μ m)、5 μ m 以上の繊維が 38.9% を占めることが確認されている。また、不純物として、鉄が 0.44% (W/W)、クロムが 0.0048%、ニッケルが 0.0017% 含まれていた。

③ 使用動物と飼育環境

11 週齢の雄性 F344/DuCr1Cr1j ラットを日本チャールス・リバー、厚木飼育センターより導入し、2 週間の検疫・馴化の後、実験に使用した。動物は、温度 23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度 55 \pm 15%、明暗サイクル 12 時間点灯/12 時間消灯の飼育室内で、ステンレス製金網個別ケージにて飼育した。飼料はオリエンタル酵母工業株の CRF-1 固形飼料、飲水は市水をフィルターろ過した後、紫外線滅菌し、自動給水装置により自由摂取させた。

④ 実験群の構成と投与方法

MWCNT は 40 および 160 μ g/匹投与群、また、対照群として媒体に用いたリン酸緩衝生理食塩水 (PBS) に Tween 80 を 0.1% 添加した液を同様に投与した群を設けた。

MWCNT を Tween80 を 0.1% 添加した PBS 液に懸濁させ、各設定濃度に調製し、超音波を用いて分散させた。この懸濁液をイソフルラン吸入による麻酔下で液体気管内投与器具 (MicroSprayer[®]) を使用して気管内に 1 回、噴霧投与した。なお、1 匹当たりの投与容量は 0.3ml/匹とした。

⑤ 検査項目

動物は飼育期間中、毎日観察を行った。体重は、週 1 回測定するとともに、解剖時にも測定した。

投与 1、7、28 及び 91 日後に各群 8 匹の動物をチオペンタール麻酔下で、後大動脈から採血後に、解剖した。動物は腹腔、胸腔及び頭蓋腔を含め剖検した後、肝臓、腎臓、脾臓を摘出し、10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。これらの臓器をパラフィン包埋し、薄切後、HE 染色し、光学顕微鏡で観察した。

B-2 労働現場におけるナノマテリアルばく露に関する研究

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

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) 作業者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者近傍 (C) に立って粒子を捕集し、重量測定した。

② 電子顕微鏡による形態変化と炭素分析による評価

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トを用い、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 \sim 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 動物実験による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

① 臨床症状

MWCNT 投与動物および Quartz 投与動物とも死亡した動物はいなかった。また、試験期間を通して臨床症状に異常の見られた動物はなかった。

② 血液学的検査・血液生化学検査

投与後 7 日目に 40 及び 160 μ g/匹投与群により好酸球と赤血球数の増加が認められた。その他、投与後 28 日、91 日と経過していく間では、MWCNT 投与動物では対照群との間で差を認めなくなっていった。血液生化学検査では、投与後 1 日目に 160 μ g/匹投与群の総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウム及び無機リンが高値、A/G 比とクロールが低値を示したが、投与後日数が経つにつれてこの傾向は見られなくなった。

③ 臓器重量

投与後 28 日目には 160 μ g/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低下が認められた。

④ MWCNT の移行

肝臓、腎臓、脾臓の病理組織標本を光学顕微鏡を用いて観察し、MWCNT 繊維の有無を調べた。その結果、投与 1、7、28 及び 91 日後とも、いずれの動物にも肝臓、腎臓、脾臓組織中に MWCNT 繊維は認められなかった。

⑤ 病理組織学的変化

肝臓、腎臓、脾臓を光学顕微鏡により病理組織学的に検索し、下記の結果を得た。

1) 投与 1 日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が 40 μ g/匹投与群（軽度 7 例、中等度 1 例）、160 μ g/匹投与群（軽度 6 例、中等度 2 例）にみられたが、が対照群（軽度 7 例、中等度 1 例）との間に発生率、程度とも差を認めなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

2) 投与 7 日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が 40 μ g/匹投与群（軽度 5 例、中等度 3 例）、160 μ g/匹投与群（軽度 4 例、中等度 4 例）にみられたが、が対照群（軽度 4 例、中等度 4 例）との間に発生率、

程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が 160 μ g/匹投与群の 1 例にみられたが、対照群にも 2 例の発生があり、MWCNT の投与による影響ではなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

3) 投与 28 日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が 40 μ g/匹投与群（軽度 1 例、中等度 7 例）、160 μ g/匹投与群（軽度 1 例、中等度 7 例）にみられたが、が対照群（中等度 8 例）との間に発生率、程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が 40 μ g/匹投与群と 160 μ g/匹投与群に各 1 例みられたが、投与 7 日後の対照群にも 2 例の発生があり、MWCNT の投与による影響ではなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

4) 投与 91 日後

肝臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

腎臓：尿細管上皮への好酸性小体の出現が 40 μ g/匹投与群（中等度 8 例）、160 μ g/匹投与群（軽度 1 例、中等度 7 例）にみられたが、が対照群（中等度 8 例）との間に発生率、程度とも差を認めなかった。また、近位尿細管の再生像が 40 μ g/匹投与群の 1 例と 160 μ g/匹投与群の 2 例にみられたが、投与 7 日後の対照群にも 2 例の発生があり、MWCNT の投与による影響ではなかった。

脾臓：40 μ g/匹投与群、160 μ g/匹投与群とも病理組織学的な変化を認めなかった。

C-2 労働現場におけるナノマテリアルばく露に関する研究

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。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。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。

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 μm 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。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。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。

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により、CNT 濃度を概算した。織機上部では 1μm 以上の粒子中に CNT が観察され、濃度は 0.002 mg/m³ であった。作業立ち上げ時には、織機から離れた地点でも 1μm 以上の粒子中に 0.001 mg/m³ 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、自動織機やその周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 x 10 cm² 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 0.7~36.6 μg であった。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

D. 考察

労働現場での MWCN の労働者への主な暴露形態は吸入暴露であり、取り扱い労働者の肺への影響が危惧されている (NIOSH, 2007)。動物実験による研究でも、MWCNT をマウスやラットに吸入暴露すると、肺に影響が現れることが報告されている (Li JG ら, 2007, Ma-Hock ら, 2009)。一方、Mitchell ら (2007) は、マウスに MWCNT を吸入暴露した実験で全身性の免疫抑制が起こることを報告しており、MWCNT の経気道暴露による肺以外への影響を明らかにすることが重要な課題になると考えられる。

平成 20 年度の研究では、ラットに MWCNT (40 および 160 μg/匹) を単回気管内投与し、経時的に投与後 91 日目まで動物を観察し、血液学的検査、血液生化学的検査等を行なった結果、血液学的検査により 40 および 160 μg/匹投与群の投与 7 日後に好酸球と赤血球数の増加、血液生化学的検査では 160 μg/匹投与群の投与 1 日後に総蛋白、総コレステロール、リン脂質、ALP、尿素窒素、カリウム、カルシウムおよび無機リンの高値、A/G 比とクロールの低値が認められた。また、投与 28 日後に 160 μg/匹投与群の肝臓の実重量と体重比の低値がみられた。これらの結果から、MWCN は経気道暴露により肺外影響を起こすことが示唆された。

本年度は、MWCNT の肺から他臓器への移行およびその影響を明らかにすることを目的として、MWCNT (40 および 160 μg/匹) を単回気管内投与したラットを経時的に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った。その結果、40 および 160 μg/匹の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓の組織中に MWCNT 繊維は認められなかった。また、病理組織学的検索でも、MWCNT 投与群に対照群と発生率や程度に差がみられる所見はなく、40 および 160 μg/匹の用量の経気道暴露では肝臓、腎臓、脾臓に光学顕微鏡レベルでの病理組織学的変化は認められないことがわかった。40 および 160 μg/匹の用量の MWCNT を単回気管内投与すると、MWCNT 繊維が肺に長期間にわたって沈着し、線維化などの病理組織学的変化が引き起こされることが報告されている (Aiso ら, 2010)。本研究の結果は、肺に病理組織学的な変化がみられる用量の MWCNT が沈着した場合でも、肝臓や腎臓、脾臓には形態学的な変化が発生しないことを示している。また、Mitchell ら (2009) は、MWCNT の吸入ばく露により全身性の免疫抑制反応が起きるメカニズムについて、肺に取り込まれた

MWCNT が脾臓に移行し作用するのではなく、肺胞マクロファージから放出されたサイトカインが血流を介して脾臓の T-細胞の産生を抑制すると報告している。本研究でも脾臓には MWCNT の移行や病理組織学的変化は認められず、Mitchell ら (2009) の報告と一致する結果であった。

著者ら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としても、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 $1\mu\text{m}$ 以上の粒子中に CNT が観察され、濃度は 0.002 mg/m^3 、自動織機から 2メートル近く離れた地点で $1\mu\text{m}$ 以上の粒子中に 0.001 mg/m^3 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

ナノマテリアルの経気道ばく露による肺外影響を動物実験にて検討したするために、MWCNT をラットに 40 および $160\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で単回気管

内投与し、1、7、28 および 91 日後に解剖し、肝臓、腎臓、脾臓を中心とした光学顕微鏡レベルの観察を行った。その結果、40 および $160\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量とも、肝臓、腎臓、脾臓への MWCNT の移行は認められなかった。また、これらの臓器には病理組織学的変化がみられなかった。

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。

参考文献

- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., et al. (2010). *Industrial Health*, in press
Li, JG., Li, W-X., Xu, J-Y., et al (2007). *Environmental Toxicology* 22, 415-412.
Ma-Hock, L., Treumann, S., Strauss, V., et al. (2009). *Toxicological Science*, in press
Mitchell, L.A., Gao, J., Vander Wal, R., et al. (2007). *Toxicol. Sci.* 100, 203-214
Mitchell, L.A., Lauer, FT., Burchiel, SW et al. (2009). *Nature Nanotechnology*. 4, 451-456
National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH). (2007). DHHS (NIOSH) Publication No. 2007-123.
Takaya, M., Serita, F., Yamazaki K, et al. (2010). *Industrial Health*, in press

F. 健康危機情報

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 (2009) ナノマテリアル取り扱いと労働衛生の課題、労働の科学、第 64 巻第 4 号 205-207.

Yoshida, J, Mochizuki, C., Masu, Y., Koda, S. and Kumagai, S. (2008). Use of a closed system

device to reduce occupational contamination and exposure to antineoplastic drugs in hospital work environment. *Ann, Occup Hyg.* 53, 153-160.

Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S. (2010). Cytotoxicity and mutagenicity of multiwall carbon nanotubes with culture Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers. *Journal of Occupational Health*, in press

Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H., and Fukushima, S. (2010). Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Industrial Health*, 48, p783-795.

鷹屋光俊, 芹田富美雄, 小野真理子, 篠原也寸志, 齋藤宏之, 甲田茂樹(2010) 多層カーボンナノチューブ製造工場における気中粒子及び炭素分析 1 - 袋詰め作業 -. *産業衛生学雑誌* 52, p182-188.

久保田久代, 鷹屋光俊, 芹田富美雄, 甲田茂樹 (2010) プラスティック材料に含まれるナノ添加剤の透過電子顕微鏡観察 - 粉体塗料を試料とした試料調製 -. *労働安全衛生研究* 3, p125-128.

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

甲田茂樹, 鷹屋光俊, 他: ナノマテリアル取扱いと職場での労働衛生管理について - 企業へのアンケート調査結果から -, 第48回労働衛生工学会, 2008年11月

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, 第48回労働衛生工学会, 2008年11月

鷹屋光俊, 甲田茂樹, 他: フラーレン取り扱い職場の空气中粒子濃度と空气中粒子形状の電子顕微鏡観察, 第48回労働衛生工学会, 2008年11月

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, 第82回日本産業衛生学会, 2009年5月

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, 第82回日本産業衛生学会, 2009年5月

相磯成敏, 戸谷忠雄, 甲田茂樹, 他: 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, 第82回日本産業衛生学会, 2009年5月

芹田富美雄, 甲田茂樹, 他: 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, 2009年5月

久保田久代, 芹田富美雄, 甲田茂樹, 鷹屋光俊 (2010) 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形態観察. 第83回日本産業衛生学会, *産業衛生学雑誌 (suppl.)* 52, p384.

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の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

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

カーボンナノチューブ(CNT)のミストおよびフラーレンを単回吸入暴露した嗅球の超微形態およびその他の臓器を光顕レベルで観察した結果、嗅球の超微形態およびその他の臓器に異常は認められなかった。X線解析装置(EDS)を用いてCNT暴露嗅球の炭素の高分布部位を検索したが、確認することはできなかった。また、酸化チタンをラットに単回気道内暴露し、肺の超微形態およびその他の臓器の光顕的観察した結果、酸化チタンは投与4週まで主に肺胞マクロファージ内に検出され、光顕レベルで認められた細胞質内黒色物と一致した。脳を含むその他の臓器に異常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炎症を引き起こすが、チタンは肺胞マクロファージに長期留まると考えられた。

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暴露による生体影響として予測される経路のうち、カーボンナノチューブ(CNT)のミストおよびフラーレン吸入暴露による嗅球、酸化チタンの経気道暴露による肺、およびそれらを介した全身への影響を形態学的観察し、さらにX線解析装置(EDS)による暴露物質の検出とを目的として実施した。

B. 研究方法

1. カーボンナノチューブ(CNT)のミストおよびフラーレン単回吸入暴露したラットの神経系器官の超微形態学的検索

雄SDラットにCNTおよびフラーレンを単回吸入暴露し、投与後0、3、7、14および28日後に剖検した。嗅球、脳、肺、肺門リンパ節、肝臓、脾臓、腎臓を10%中性緩衝ホルマリン液で固定後、常法に従いヘマトキシリンエオジン染色を施して鏡検した。また、片側の嗅球はグルタルアルデヒドで固定後、常法に従いエボン包埋し、酢酸ウラニル・鉛染色後、電子顕微鏡検索(JEM1400, JEOL, Japan)を行った。嗅球は暴露後短時間で被験物質に暴露

されると予想されたため、CNT暴露の嗅球は、投与後0日(投与直後)、投与後7日について、フラーレン暴露の嗅球は、投与後0日(暴露直後)、投与後3日および7日について検索した。CNT暴露直後のラット嗅球について、炭素の存在をEDSにて分析した

2. 酸化チタン経気道暴露したラットの呼吸器系への病理形態学的解析

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%の濃度で単回吸入後暴露した。暴露0(暴露直後)、暴露後1、3、7、14および28日に動物を解剖し、肺、脳、肝、腎、脾を10%中性緩衝ホルマリンに固定し、通常の方法に従い病理標本を作製して、経時的な病理形態学的変化を光学顕微鏡レベルで観察した。また投与1日、3日および28日の対照群、0.05%群および0.5%群の肺の超微形態観察およびEDSによるチタン分布の解析を実施した。

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

1. CNTおよびフラーレン単回吸入暴露した嗅球およびその他の臓器の病理学的観察およびEDSによる嗅球内の炭素高分布部位の検索

CNT、フラーレンを単回暴露した嗅球を含むいずれの

臓器においても顕微鏡レベルで異常は認められなかった。顕微鏡観察においてもCNT、フラーレンともに神経細胞、神経線維、グリア細胞ともに異常は認められなかった。CNT暴露したラットの嗅球についてEDSを用いて元素分析を行ったが、炭素元素は観察視野全体に分布しており、高分布部位を認めることはできなかった。

2. 酸化チタン単回経気道暴露したラットの肺およびその他の臓器の病理学的観察およびEDSによる肺のチタン分布部位の検索

全ての投与群で肺の炎症および投与直後より黒褐色物が用量依存性に肺胞腔内、肺胞壁あるいは気管支腔内に認められ、これらは投与数日以内に肺胞マクロファージに貪食されていた。肺の炎症は時間の経過とともに慢性化し、一部肉芽組織も認められたが、投与28日では軽減した。28日では肺胞内に黒色物貪食マクロファージの集簇巣が認められた。顕微鏡観察により、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分析の結果、黒色部に一致してチタンが検出され、28日までマクロファージ内黒色物に一致してチタンが検出された。顕微鏡レベルで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。その他の臓器には光学レベルで異常は認められなかった。

D. 考察

CNT、フラーレンを単回吸入暴露した嗅球は光学レベルおよび顕微鏡観察においても異常は認められなかったことから、今回の単回吸入暴露はともにラットの嗅球や中枢神経系、全身の臓器へも器質的な影響を与えない可能性が高いと考えられた。

酸化チタン単回経気道暴露された肺において明らかなチタンの沈着がEDS分析により投与翌日より投与後4週間まで観察されたことは、顕微鏡レベルでの解析結果と一致し、投与したチタンが肺内に長くとどまる可能性を示すものと考えられた。また酸化チタン経気道暴露は肺の炎症以外には全身の臓器へも器質的な影響を与えないと考えられた。

EDSは酸化チタンの検出結果から、細胞内の元素を解析できる非常に有用な方法であるが、エポキシ樹脂は炭素が主成分であることからCNTの検出はさらに検討が必要であると考えられた。

E. 結論

カーボンナノチューブおよびフラーレンを雄ラットに単回吸入暴露による嗅球を始めとする中枢神経系への影響は認められなかった。ラットに気管内暴

露した酸化チタンは投与後4週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ゾソーム内に長く留まる可能性が示唆された。EDS解析は、細胞内元素の分布を解析する有用な方法であると考えられた。

F. 健康危惧情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1) 書籍

①吉田緑 ②フタル酸エステル類 ③食品安全ハンドブック編集委員会編④食品安全ハンドブック ⑤丸善 ⑥東京 ⑦2010 ⑧pp.145-147.

2) 雑誌

①Yahia, D., Tsukaba, C., Yoshida, M., Sata, I., Tsuda, S.
② Neonatal death of mice treated with perfluorooctane sulfonate.③ J. Toxicol. Sci.④33⑤ 219-226. ⑥2008

①Abe, M., Suzuki, N., Yoshida, M., Usuda, K., Furukawa, S., Juneja, L.R., Okubo, T., Nakae D.

②Possible 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. ③Food Chem. Toxicol.④46 ⑤1760-1770 ⑥2008

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A.

②Carcinogenic potential of alizarin and rubiadin, components of madder color, in a rat medium-term multi-organ bioassay.

③Cancer Sci.④100 ⑤2261-2267⑥2009

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

②A ninety-day toxicity study of semicarbazide hydrochloride in Wistar Hannover GALAS rats.③Food Chem Toxicol. ④47 ⑤2490-8. ⑥2009

①Yoshida M, Sanbuisyso A, Hisada S, Takahashi M, Ohno Y, Nishikawa A.

②Morphological characterization of the ovary under normal cycling in rats and its viewpoints of ovarian toxicity detection.

③J Toxicol Sci. ④34 Suppl 1 ⑤SP189-97⑥2009.

①Takahashi M, Shibutani M, Nakahigashi J, Sakaguchi N, Inoue K, Morikawa T, Yoshida M, Nishikawa A.

②Limited lactational transfer of acrylamide to rat offspring on maternal oral administration during the gestation and lactation periods. ③Arch Toxicol.; ④83(8): ⑤785-93⑥2009 .

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Fujimoto H, Ohnishi K, Nakashima K, Shibutani M, Hirose M, Nishikawa A.

②Possible contribution of rubiadin, a metabolite of madder color, to renal carcinogenesis in rats. ③Food Chem Toxicol. ④47 ⑤752-9⑥2009.

①Yoshida M, Watanabe G, Suzuki T, Inoue K, Takahashi M, Maekawa A, Taya K, Nishikawa A.

②Long-term treatment with bromocriptine inhibits endometrial adenocarcinoma development in rats. ③J Reprod Dev. ④55 ⑤105-9 ⑥2009 .

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

②Lack of chronic toxicity or carcinogenicity of dietary N-acetylglucosamine in F344 rats. ③Food Chem Toxicol. 2009 ④47 ⑤462-71.

①Inoue K, Yoshida M, Takahashi M, Shibutani M, Takagi H, Hirose M, Nishikawa A.

②Induction of kidney and liver cancers by the natural food additive madder color in a two-year rat carcinogenicity study.

③Food Chem Toxicol. ④47 ⑤184-91⑥2009.

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

②Neurotoxicity of perfluorooctane sulfonate (PFOS) in rats and mice after single oral exposure. ③J Toxicol Sci.④34(5) ⑤569-74⑥2009 .

① Takahashi 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

①Yoshida M, Maekawa A., Nishikawa, A.: Neonatal exposure to DES induces dose-dependent delayed effects at doses showing estrogenic activity in female Donryu rats. Program 47th Annual Meeting and ToxExpo. P.186, 2008.

②Yoshida M, Tsuzuki, N., Watanabe, E., Ozawa, S., Suzuki, K., Nishikawa, A.: Dog and mouse studies: Merits in risk assessment of pesticides in Japan. J. Toxicol. Sci. Sppl 33, P.203, 2008.

③吉田緑、井上薫、高橋美和、西川秋佳。正常性周期におけるラット卵巣の形態学的特徴。第25回日本毒性病理学会講演要旨集。P.24、2009。

④Midori Yoshida, Naoki Koyama, , Kaoru Inoue, Miwa Takahashi, Youhei Sakamoto, Yoshikazu Taketa, Yoshiya Shimada, Akiyoshi Nishikawa. Early depletion of ovarian follicles by prepubertal exposure to gamma ray promotes rat uterine cancer development. 第68日本癌学会学術総会(横浜)2009年10月

⑤ Midori Yoshida, Atsushi Sanbuissho, Shigeru Hisada, Michihito Takahashi, Yasuo Ohno, Akiyoshi Nishikawa
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

49th Annual Meeting & ToxExpo (Baltimore, US) 2009年3月

⑥ 吉田緑 生殖発性毒性の評価法: 現状と問題点 第10回日本トキシコロジー学会生涯教育講習会 2009年7月(岩手)

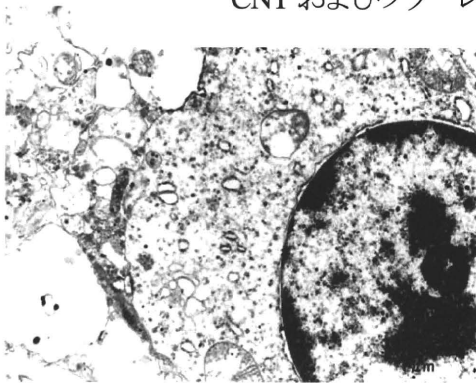
⑦ 吉田緑 通常の反復投与の動物試験による化学物質の雌性生殖系への影響評価 第3回 In vivo 実験医学シンポジウム(東京) 2009年12月

⑧ 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 第26回日本毒性病理学会講演要旨集(金沢) 2010年2月

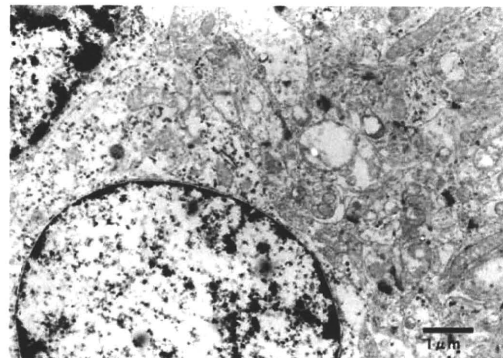
⑨ 吉田緑, 河部真弓, 古川文夫, 井上薫, 高橋美和, 広瀬明彦, 西川秋佳: 酸化チタン曝露ラットの肺の経時的変化とチタンの局在 第37回日本トキシコロジー学会学術年会 S128, 2010年

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

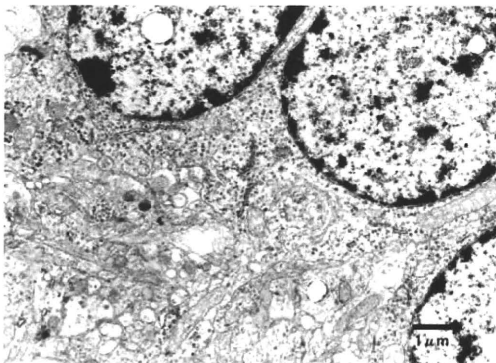
CNT およびフラーレン吸入暴露ラット嗅球の超微形態



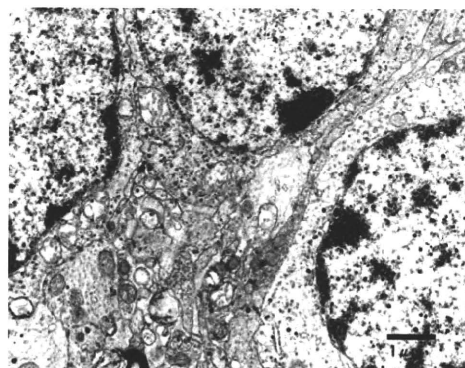
CNT 投与直後 嗅球 異常を認めない



CNT 投与後3日 嗅球 異常を認めない



フラーレン 投与後0日 嗅球 異常を認めない



フラーレン 投与後3日 嗅球 異常を認めない