

CNT 暴露嗅球の EDS 解析
 CNT 暴露ラット嗅球。電顕写真(左上)と EDS による同部位の炭素分布(左下)。炭素は視野全体に分布していた。EDS 解析の結果、炭素の検出量は多いが(右上グラフ)、選択部位による分布量の違いも認められなかった(右下グラフ)ことから、部位特異的な分布はないと考えられた。

酸化チタン暴露肺の光顕観察結果まとめ

Time points examined	Day 0				Day 1				Day 3				Day 7				Day 14				Day 28				
	0	0.05	0.25	0.5	0	0.05	0.25	0.5	0	0.05	0.25	0.5	0	0.05	0.25	0.5	0	0.05	0.25	0.5	0	0.05	0.25	0.5	
No. of rats examined	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	5	
Macrophage aggregation		1				1					3				3				1			1	1	5	
Perivascular lymphoid cells			1								2	1			3	1									
Perivascular inflammatory cells						1	1	1			1	1			1										
Inflammatory cells in alveoli, slight						1	1				1	2							2					2	
Inflammatory cells in alveoli, moderate							1	1				2	4			1	2				5				1
Inflammatory cells, severe																	1								
Inflammatory cells in alveolar wall																	1								
Abscess							3	2					2				1			1	3				2
Hemorrhage								1																	
Granulation tissue											1														
Bronchitis												1													
Pigmentation in alveoli, slight		1	4					1				4													
Pigmentation in alveoli, moderate		4		1				3			1	1													
Pigmentation in alveoli, severe				1				1																	
Pigmentation in bronchus																1									
Pigmentation in Macrophage, slight		5	2	5											5	1			4	2	4		1		
Pigmentation in Macrophage, moderate			3				5	2			1	3			3	4			3	1				4	5
Pigmentation in Macrophage, severe								1			4	2			1					2				1	
Pigmentation in Aggregated macrophage																									
Pigmentation in BALT											1	1			1										

酸化チタン経気道暴露ラット肺の超微形態像およびチタンの分布

0.5% Day 1 Lung

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

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

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

EM2: 肺胞内、マクロファージ内に黒色物が認められる。

黒色部とチタンおよび酸素の分布

黒色部とチタンの分布が一致

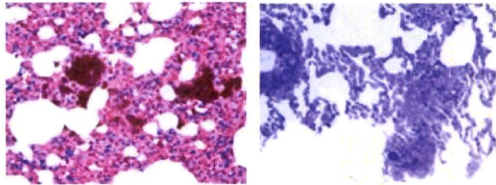
EM1: EDS analysis in fibroblasts of 0.5% at Day 1

EM1: EDS analysis in fibroblasts of 0.5% at Day 1

チタン

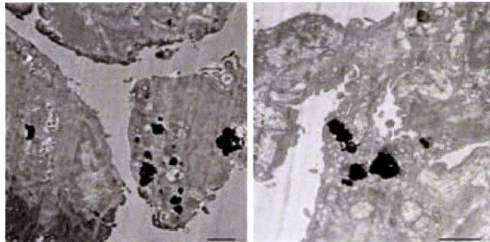
0.5% 投与 1日

0.5% Day 28 Lung



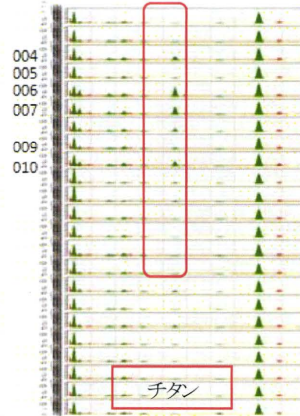
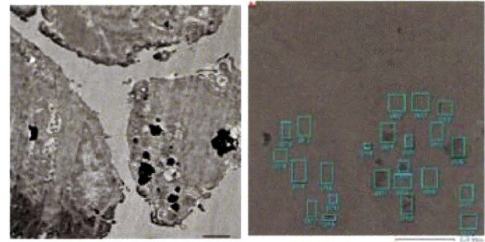
肉芽組織内に黒色物を入れるマクロファージの集簇が認められる(H&E染色標本)

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



EM1: マクロファージのライソソーム内に黒色物が認められる

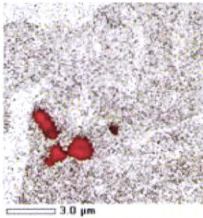
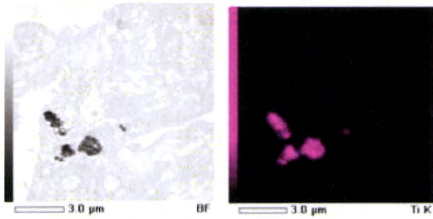
EM2: マクロファージのライソソーム内に黒色物が認められる



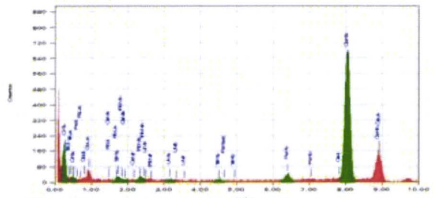
マクロファージ内の黒色部にチタンが検出

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

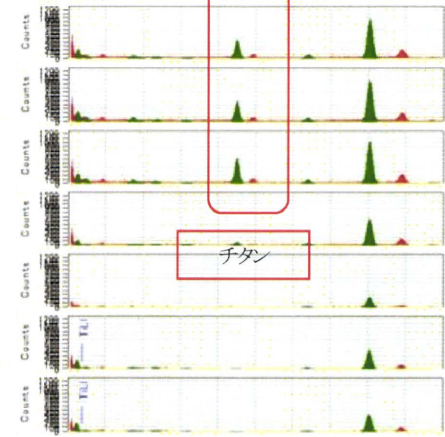
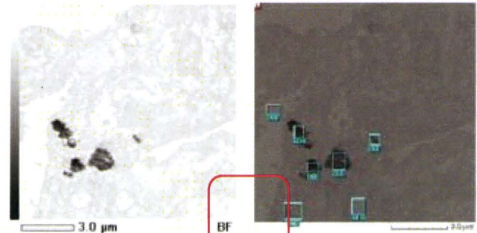
0.5% 投与28日



マクロファージ内の黒色部にチタンが検出



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



マクロファージ内の黒色部にチタンが検出

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

0.5% 投与28日

ナノマテリアルの吸入暴露実験、及び、肺の c-DNA マイクロアレイによる毒性評価に関する研究

分担研究者 小川幸男 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部室長
協力研究者 高木篤也 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター毒性部室長

研究要旨

本分担研究では、ナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、まず始めに雄 C57BL/6 マウスの肺の遺伝子発現データベースを構築した。次いで、長野 嘉介班員との共同で、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を単回経気道暴露後、1ヶ月と3ヶ月後の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析 (Percellome 法) を行った。その結果、炎症、酸化ストレス、線維化等に関与する遺伝子発現が MWCNT 投与により増加することを確認した。また、ナノマテリアルの動物への短期吸入暴露実験を行うため、NIOSH 式マルチウオールカーボンナノチューブダスト発生装置を購入し、焼却可能なディスポーザブル暴露チャンバーを開発するとともに、この吸入暴露装置を環境中への検体の放出を防止する施設に、コンプレッサー・配管工事を行い、散塵防止動物用カートとともに設置した。マルチウオールカーボンナノチューブを用いたダスト発生などの総合運転試験、濃度試験を行った後に、動物への暴露を行う。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルの健康影響について懸念が高まっている。本研究ではナノマテリアルの生体障害作用を分子レベルで明らかにするため、国立医薬品食品衛生研究所毒性部で開発した定量的なマイクロアレイ解析手法 (Percellome 法) を用いて、肺の遺伝子発現に及ぼすナノマテリアルの影響について検討する。

マルチウオールカーボンナノチューブ (MWCNT) の気中への拡散法及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法、動物への暴露法を検討し、検討した方法を用いて動物に暴露を行う。同時に、実験者への MWCNT 暴露のみならず室内及び外部環境への漏出を避ける方法を検討し、適切な方策を講じて暴露実験を遂行する。

B. 研究方法

1. 遺伝子発現解析

1) ナノマテリアル標的臓器の遺伝子発現解析に資するため、正常な肺の24時間内の遺伝子発

現変動のデータベースの構築を行った。動物は C57BL/6 雄マウス (12 週令) を対象に、吸入暴露試験の対照群 (暴露開始時間は午前 10 時、2 時間全身暴露後、通常の飼育環境に戻す) のデータを用いた。なお、暴露開始、投与開始時間 (午前 10 時) をそれぞれ 0hr とした。データ解析には当研究部の独自開発ソフト MF analyzer を用いた。

2) 当研究班の長野 嘉介班員の実施した実験より得られた臓器サンプルを対象に詳細なマイクロアレイデータ解析を実施した。すなわち、gpt delta ラット雄にナノマテリアルとして MWCNT を 40 または 160 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の用量で単回気管内投与後、31 及び 90 日後に解剖を行い、得られた肺のサンプルを用いた。また、粒子状物質による肺毒性の陽性対照として quartz を 160 $\mu\text{g}/\text{animal}$ の用量にて同様に投与した肺を用いた。なお、マイクロアレイ解析用の 1 群の匹数は 3 匹とした。RNA はキアゲン社の RNeasy にて抽出、蛍光標識後、のべ 31,000 遺伝子の

発現解析が可能なアフィメトリクス社の Gene Chip Rat Genome 230 2.0 Array とハイブリダイズを行った。さらに、遺伝子発現の定量的比較を正確に行うために、Percellome 手法(細胞1個当たりの mRNA 絶対値を得る遺伝子発現解析手法)を用いて解析を行った。

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

西沢共司班員が担当した部分を引き継ぎ、ナノマテリアルの気中への拡散法及び吸入チャンバー内へ安定供給する方法を検討するとともに、それによって確立させた発生法を用いて暴露システムを構築設置し、動物に暴露する。

初年度に、MWCNT ダストの気中への拡散法は、西沢班員が湿式法及び乾式法について検討し、報告した。

MWCNT は静電気を帯びやすいといわれ、MWCNT は繊維が綿状に複雑に絡み合い、肺の深部まで到達する微細粉塵を作り出し供給することが難しく、また微細粉塵を作り出し得たとしても供給先のチャンバー内でその粒子の形状と濃度をモニターすることが困難という問題点がある。米国 NIOSH から、効率良く微細粉塵を作り出し供給できる発生器の作成が報告された。この発生器を用いて検討することが妥当と考え、これを購入し、3群への暴露を可能にするため、発生器を追加作成し、動物に暴露するためのディスプレイ暴露チャンバーの開発を行った。

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

MWCNT は石綿と同様の生体影響を引き起こすことが懸念されることから、完全に密閉され、外部への漏出を防ぐ構造を持った環境保全型動物飼育棟内に暴露機器を設置することで、周囲の環境への排出を防止する対策を講じた。また、ダストの発生、動物への暴露、暴露後の動物からのサンプル採取時など実験者への暴露防止対策とともに、排気の処理や実験に使用したパイプ配管やチャンバーなどの器具

器材に付着した検体の、実験終了後の廃棄処理法が重要となる。本暴露装置を設置する場所は、排気処理、排水や入室者への暴露防止に工夫がなされているだけでなく、内部へ持ち込まれた器具器材は実験終了後一定の大きさの処理箱内に密封可能な物以外の搬出が禁じられ、被検物質を環境へ排出させない方策を講じている。処理箱は高温焼却施設に搬送後、焼却されるが、この焼却処理箱に入らない大きな物は、棟外への持ち出しができない。MWCNT ダスト発生器は棟外へ搬出できないが、パイプラインなど処理箱内に入れられる大きさに切断できれば焼却処理が可能である。既存の金属製暴露チャンバーについては細断不能であり、搬出ができないため、使用後はチャンバー内部を無塵状態までにクリーンアップする、あるいは掃除せずに廃棄できる樹脂製のディスプレイ暴露チャンバーを開発する必要があった。今回開発したディスプレイ暴露チャンバーは軟性樹脂薄膜を用い、チャンバーの天板部分は細断可能に製作することで、焼却処理箱内へ収納し焼却することが可能となり、これにより MWCNT の環境への排出を防ぐこととした。

(倫理面への配慮)

吸入暴露などを行った動物の屠殺に当たっては、麻酔薬の使用や頸動脈切開法など苦痛の少ない方法を用いること等、当研究所の実験動物取り扱い倫理規定に準拠した対応を行っている。

C,D.研究結果及び考察

1. 遺伝子発現解析

1)雄 C57BL/6 マウスの肺の 24 時間の遺伝子発現データベースを構築した。このデータベースを基に肺で発現する遺伝子の解析を行った。

1-1)House keeping gene の解析

House keeping gene である beta-actin、G3PDH、Hprt 遺伝子は、いずれも肺で高発現していたが、比較に用いた肝よりも低レベルであった。これら

は各臓器毎の mRNA の産生量の特徴を反映していると考えられた。また、これらの遺伝子の日内変動は認められなかった。臓器での mRNA の発現の絶対量が大きく異なることから、臓器間の遺伝子発現量を比較する際に、これらの house keeping gene を基準とした相対的遺伝子発現量を用いることは適当ではないと判断された。

1-2) Circadian gene の解析

遺伝子の中には日内変動を示すものが存在することが知られている。そこで、既知の circadian gene の変動について調べたところ、Arntl, Clock, DPP, Per1, Per2, Per3 とも肺で日内変動を示すことが確認された。また、これら以外に、肺と肝に共通して、あるいは、特異的に日内変動する遺伝子を同定することが出来、今後の遺伝子発現データの解釈に役立つことが期待された。

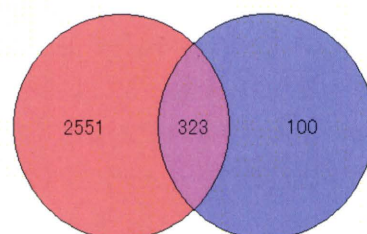
1-3) Oxidative stress response gene の解析

ナノマテリアルの生体毒性における酸化ストレスの関与が指摘されている。そこで、oxidative stress response gene の恒常的な発現レベルについて検討した。その結果、catalase、SOD(superoxide dismutase)-1, 2, 3, thioredoxin-1, 2 とも肺での発現が認められたが、おおむね肝より低かった。SOD3 は細胞外で働くことが知られており、肺で相対的に高い発現が認められ、肺胞等で活性酸素の除去に働いているものと思われる。

2) MWCNT を単回経気道暴露したラット肺のマイクロアレイ解析を実施した。1copy/cell 以上の発現量を示す遺伝子で有意($p < 0.01$)に増加した遺伝子数は 1ヶ月目の MWCNT 40 μ g/animal 投与群(L群)では 820 遺伝子、MWCNT 160 μ g/animal 投与群(H群)では 2874 遺伝子、Quartz 160 μ g/animal 投与群では 423 遺伝子、3ヶ月目の MWCNT の L 群では約 211 遺伝子、MWCNT の H 群では 1546 遺伝子、Quartz 群では 3032 遺伝子であった。一方、有意($p < 0.01$)に減少した遺伝子は、1M の Quartz 投与群で 203 遺伝子であり、その他の群及び 3M ではいずれも 40 遺伝子以下であった。以下、同じ投与

量である MWCNT の H 群と Quartz 群を対象に解析を行った。変動遺伝子数のベン図を図 1 に示す。投与 1ヶ月後では MWCNT の H 群で発現増加が多く、投与 3ヶ月後では Quartz 群で増加遺伝子が多かった。ジーンオンロジー解析で増加遺伝子の機能を調べたところ、transport に関連する遺伝子が 1ヶ月目及び 3ヶ月目の MWCNT 及び Quartz 各投与群とも多かった。また、1ヶ月目の MWCNT 及び Quartz 群で免疫反応、炎症反応に関連する遺伝子が共通して増加した。

A)



B)

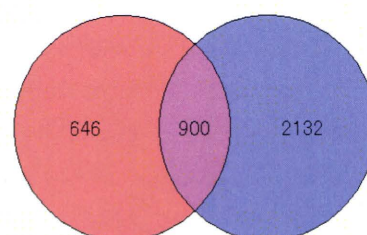


図 1. ナノマテリアル投与ラット肺で有意に増加した遺伝子数のベン図

A) 1ヶ月後、B) 3ヶ月後

赤 : MWCNT (H 群)

青 : Quartz

次に、遺伝子発現プロファイルとして 3 種、すなわち 1) MWCNT (H 群) と Quartz で共に増加する遺伝子、2) MWCNT (H 群) でのみ増加する遺伝子、

3) Quartz 群のみ増加する遺伝子に分けて、パスウェイ解析ソフト Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行ったところ、1ヶ月目で MWCNT (H群)と Quartz で共に増加する遺伝子では、Antigen presentation pathway、B cell development、Allograft rejection signaling、Communication between innate and adaptive immune cells、Altered T cell and B cell signaling in rheumatoid arthritis 等の炎症・免疫反応に関連するシグナリングが抽出された。MWCNT (H群)でのみ増加した遺伝子では Fc γ receptor-mediated phagocytosis in macrophages and monocytes (受容体媒介マクロファージ及びモノサイトのファゴサイトーシスの系)が抽出された。その他、CD28 signaling in T helper cells や oxidative phosphorylation の系が抽出された。Quartz でのみ増加した遺伝子では cell death、protein synthesis の系が抽出された。3ヶ月目の MWCNT (L及びH群)と Quartz で共に増加する遺伝子で Nur77 signaling in T lymphocytes、Antigen presentation pathway など炎症に関連するパスウェイの系が抽出された。また、Oxidative phosphorylation、Mitochondrial dysfunction などのミトコンドリアに対する影響を示唆する系が抽出された。MWCNT (H群)でのみ増加する遺伝子としては、Infection disease、Infection mechanism が、Quartz 群でのみ増加する遺伝子では protein synthesis、Infection mechanism の系がそれぞれ抽出された。次に、個別の遺伝子に着目するとオステオポンチン遺伝子が1ヶ月目の MWCNT 群で用量に相関して顕著に増加していた(図2)。オステオポンチンはマクロファージや T-細胞から分泌される蛋白で、また、肉芽で多く発現していることが知られている。組織所見で MWCNT の H 群で肺の肉芽が1及び3ヶ月目で認められていることから、オステオポンチン増加と肉芽との関連性が示唆された。

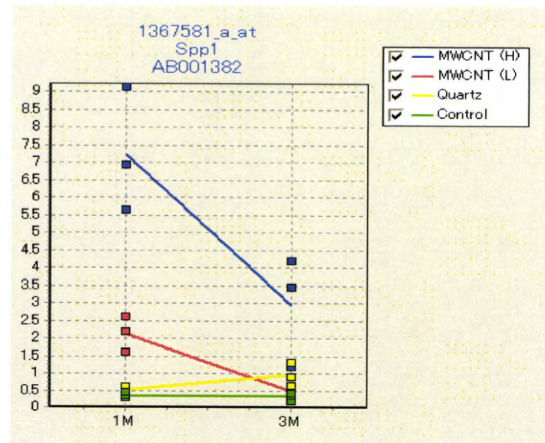


図2. オステオポンチン遺伝子の発現増加

* 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell) 以下同様

この他、炎症関連遺伝子としてケモカイン・サイトカインである Ccl2、Ccl9、Ccl3 (図3参照)、補体の C1qa、B細胞や単球に発現する Fcgr2b 遺伝子の増加が認められた。

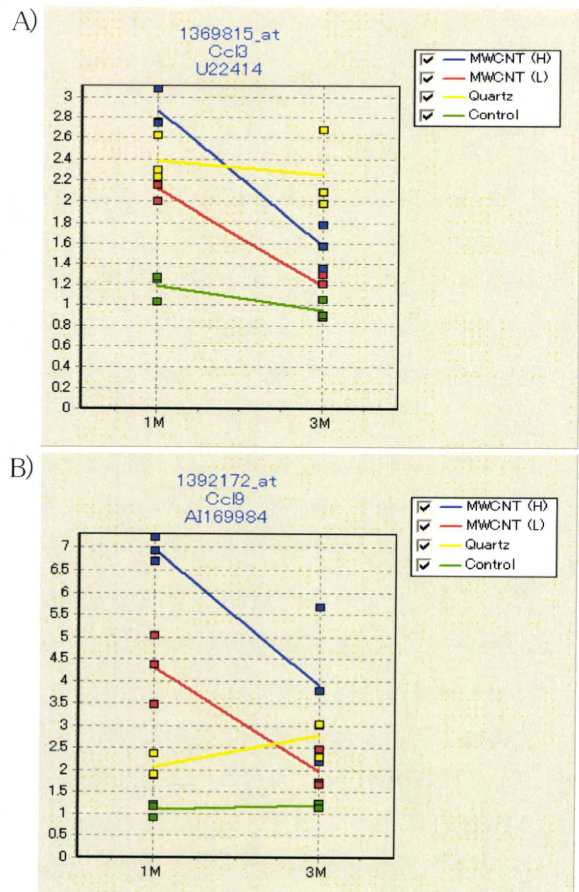


図3. ケモカインである Ccl3 及び Ccl9 遺伝子の発現増加

A) Ccl3、B) Ccl9

また、酸化ストレス反応遺伝子としてSOD2の増加が1ヶ月後のMWCNT及びQuartz群で認められ(図4)、MWCNT及びQuartzの投与により、肺において酸化ストレスが増加していることが示唆された。

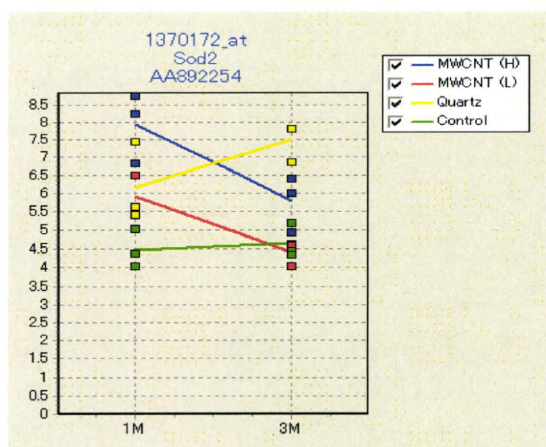


図4. 酸化ストレス反応性SOD2遺伝子の増加

その他の酸化ストレス反応遺伝子として、メタロチオネイン 1a(図5)が各検体投与群で、メタロチオネイン 3がMWCNTのH群で増加した。

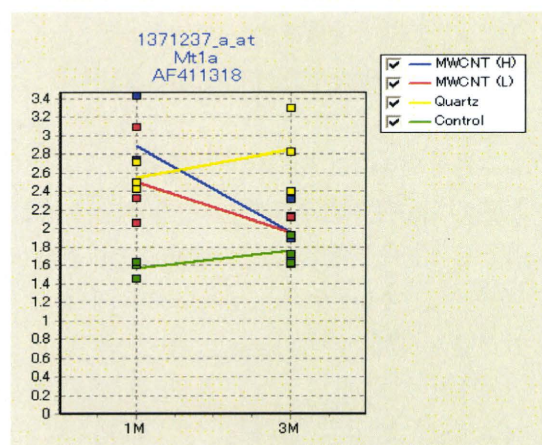
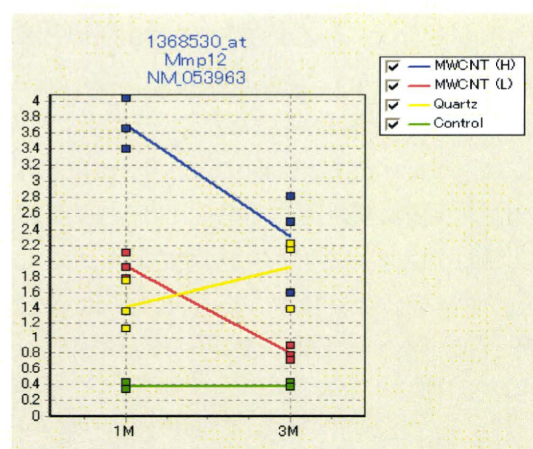


図5. 酸化ストレス反応性メタロチオネイン 1a 遺伝子の増加

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

A)



B)

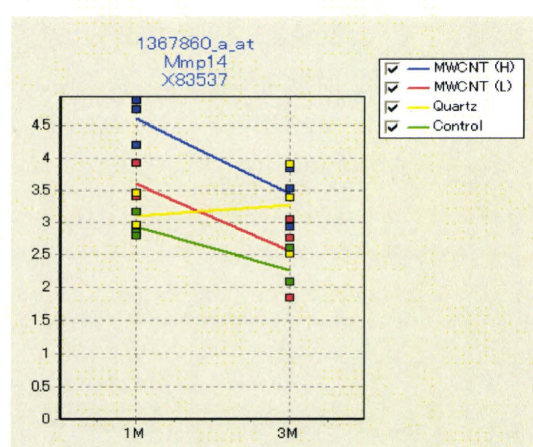


図6. 線維化・抗線維化酵素 MMP-12、MP-14 遺伝子の増加

A) MMP-12、B) MMP-14

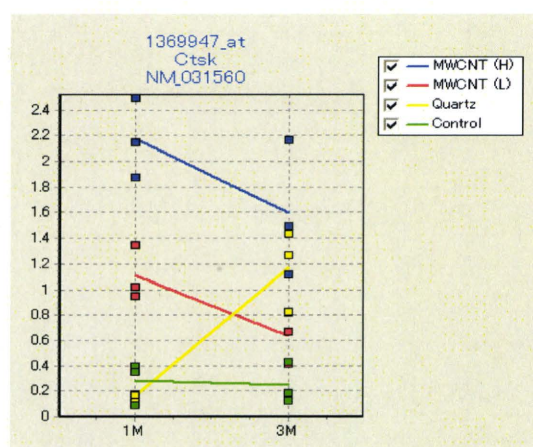


図7. 抗線維化酵素カテプシン K 遺伝子の増加

炎症、酸化ストレスとの関連は明らかではないが、MWCNT には遺伝子突然変異誘発作用を有するとの報告が有る。そこで、DNA 修復に関連する遺伝子発現を調べたところ、poly (ADP ribose)polymerase family member 1 (Parp1)(図8)の増加が各検体投与群で認められ、DNA の二本鎖切断が生じている可能性が示唆された。しかし、その他の Gadd45a、Rad17、Rad23b、Rad50、Xrcc 等を含む DNA 修復関連遺伝子の発現に変化は認められず、DNA 障害が生じていることを示す明確な遺伝子発現レベルでの変化を同定することは出来なかった。本実験では、1 及び 3 ヶ月後に限定して遺伝子発現変化を調べており、より早期での遺伝子発現変化を確認する必要があると思われた。なお、減少遺伝子については有意に変動する遺伝子が増加遺伝子と比較して、少数例存在したが、毒性学的変化と関連づけられるものは無かった。

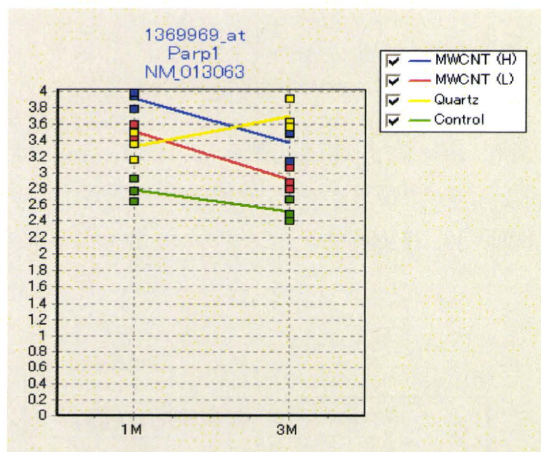


図8. Parp1 遺伝子の増加

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

MWCNT ダストの気中への拡散法は、初年度西沢班員が湿式法及び乾式法について検討してきた。湿式法は、Tween20 溶液中に MWCNT を懸濁させ、超音波により攪拌した浮遊液をネブライザでミストを発生させ、加熱乾燥させてダストにする方法である。この方法はネブライザ

により発生させたミストが配管内の下部へ逆流し、充分な量のミストが発生できず、またミストを加熱乾燥させたダスト中には Tween20 の粒子が多く混在した。乾式法は、粉体用超微量フィーダーにより MWCNT を供給し、水平振動型発塵装置によりダストを発生させる方法である。前年、McKinney ら¹⁾(米国 NIOSH) および Fujitani ら²⁾(国立環境研究所)が MWCNT ダスト発生法を報告している。国立環境研究所で開発された Fujitani ら²⁾の方法は、垂直に振動する容器の中に MWCNT と鉄球を入れ鉄球の落下時の衝撃を用いてダストを発塵させる方法である(図6)。米国 NIOSH の McKinney ら¹⁾の方法は、ゴム膜上に載せた MWCNT の下にスピーカーを置き、その音振動を用いて跳ね上げ、ダストを発塵させる方法である(図7)。両者が報告した方法は、濃度的にも一定の成果が得られており、これを取り入れることは、動物に暴露するという目的にかなう方法であると考えた。

鉄球の落下衝撃を用いる方法は、鉄球の衝突によりダストを発塵させるのであるが、MWCNT と鉄球が衝突することにより、両者への破壊作用が起こることが考えられ、動物へ暴露される MWCNT の形状及び成分が、実際に製造現場や使用者が暴露される MWCNT とは異なる可能性が考えられた。MWCNT 以外の粒子の混在を疑われることなく形態的にも二次的変形が加わらず、 $12\text{mg}/\text{m}^3$ までの濃度が達成されている点で、スピーカー振動で跳ね上げる方式が優れていると考えこれを採用することとし、購入した(写真1)。

McKinney ら¹⁾による発生方法、すなわちゴム膜上に載せた MWCNT の下にスピーカーの音振動を用いて跳ね上げ、ダストを発塵させる方式での発生器をさらに 2 台製作し、環境配慮型実験棟内に設置、発生器用のエアークンプレッサー、ディスポーザブル暴露チャンバー 3 台(写真2)等の設置及び配管工事を行い、吸入暴露システムが構築された。発生器の能力検証、濃度試験等、動物への暴露実験を行うため

の検討を行っている。

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

MWCNTの実験者への暴露防止方法は、全身に防塵衣、露出した顔部分にはゴーグル及び高性能マスクを着用する。発生器及び暴露チャンバー内を常に陰圧とし室内への漏出を防ぎ、暴露後の動物の移動には、ケージを積載するカートの上外側に陰圧による空気の流れを作ることで動物とケージに付着した検体が室内へ飛散するのを防止する運搬台車を使用する。臓器サンプルを採取する際には陰圧のドラフトチャンバー内で作業し、動物の被毛にアルコールを噴霧することで検体の周囲への飛散と実験者への暴露を防止する。暴露チャンバーから出た排気に対しては、隣接するサイクロン集塵器、活性炭及びウルトラヘパフィルター等を通して実験棟の排気処理装置へ排出し、そこで再び活性炭及びヘパフィルターを通過させる。実験者の暴露室からの退室時には、防塵衣、ゴーグル及び高性能マスクは焼却箱内へ投棄、エアシャワー室でさらに除塵退室する。焼却箱は完全密閉した後に搬出され、専門の業者の手によって高温焼却される。MWCNTの暴露試験終了時には、飛散しないよう内部を油脂でコーティング後デイスポーザブル暴露チャンバーをたたみ、天板は裁断して全てを焼却できるよう、樹脂製暴露チャンバーを製作設置した。

E. 結論

1. 伝子発現解析

ラット肺の遺伝子発現に及ぼすMWCNTの影響を分子レベルで明らかにするため、定量的マイクロアレイ解析実験を行い、炎症、酸化ストレスに関与する遺伝子の増加を認めた。また、DNA修復に関連する遺伝子の増加が認められたことから、DNA損傷も生じている可能性が示唆された。

2. ナノマテリアルの吸入暴露法の検討

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

3. ナノマテリアルの環境への排出防止対策

実験者への暴露及び環境への漏出防止や、暴露装置とその周辺機器、暴露動物の取り扱い及び暴露装置の排気処理について、あらゆる方策を検討し、実験者及び環境への安全が確保できる対策を講じた。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

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

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

Kawasaki Y, Hirabayashi Y, Kaneko T, Kanno J, Kodama Y, Matsushima Y, Ogawa Y, Saitoh M, Sekita K, Uchida O, Umemura T, Yoon BI, Inoue T., Benzene-induced hematopoietic

neoplasms including myeloid leukemia in Trp53-deficient C57BL/6 and C3H/He mice., *Toxicol Sci.* 2009

2. 学会発表

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

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

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

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

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

菅野 純、相崎健一、北嶋 聡、五十嵐勝秀、種村健太郎、小川幸男、関田清司、肝障害性薬剤による初期遺伝子発現応答のPercellome解析、

2009年3月28日、薬学会第129年会

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

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

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

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

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

○広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本義光、小縣昭夫、中江 大、樋野興夫、菅

野 純：ナノマテリアルの慢性影響、2010 年、
日本薬学会第 130 年会

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

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

参考文献

- 1) Walter McKinney, et al., Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system, *Inhalation Toxicology*, 2009, 1-9, iFirst.
- 2) Yuji Fujitani, et al., Generation of Airborne Multi-walled Carbon Nanotubes for Inhalation Studies. *Aerosol Science and Technology*, 2009. 43: 881-890

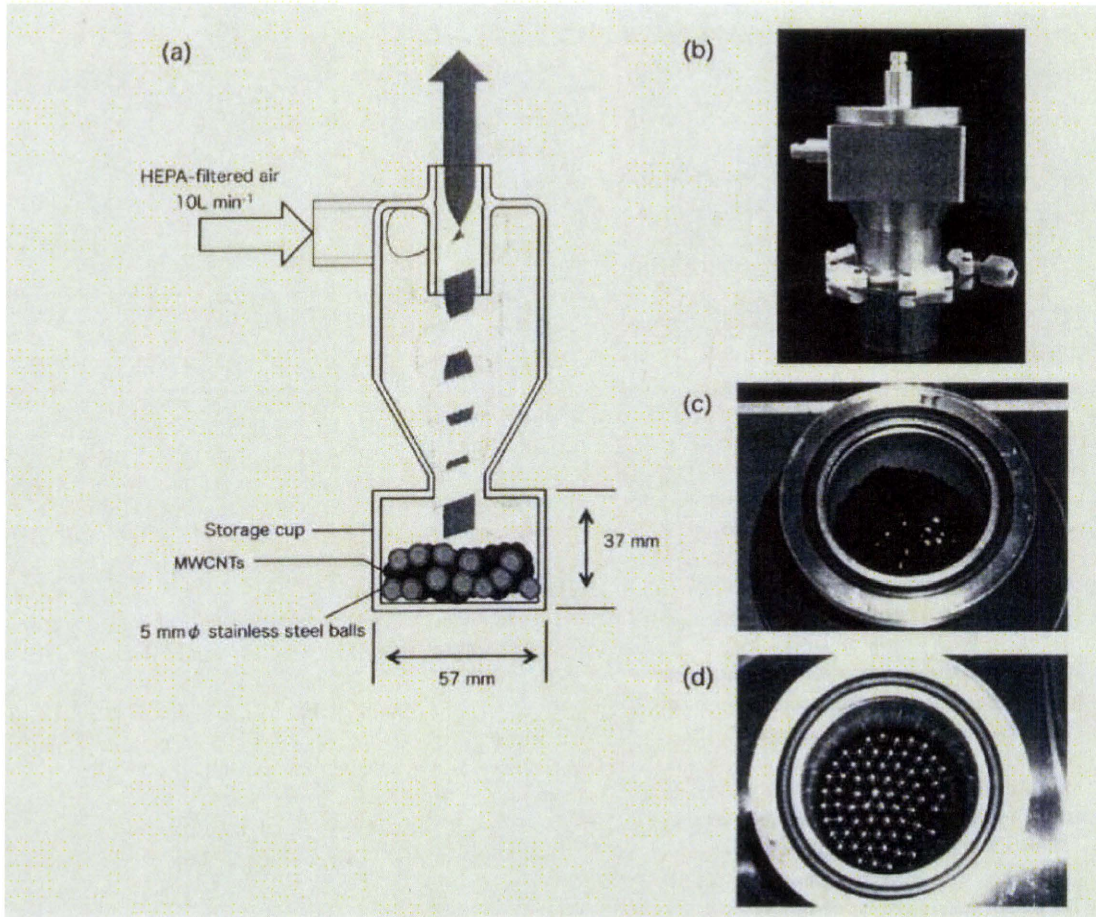


図6. Fujitaniら²⁾の開発した鉄球の上下振動を用いた発生器 (文献より転載)

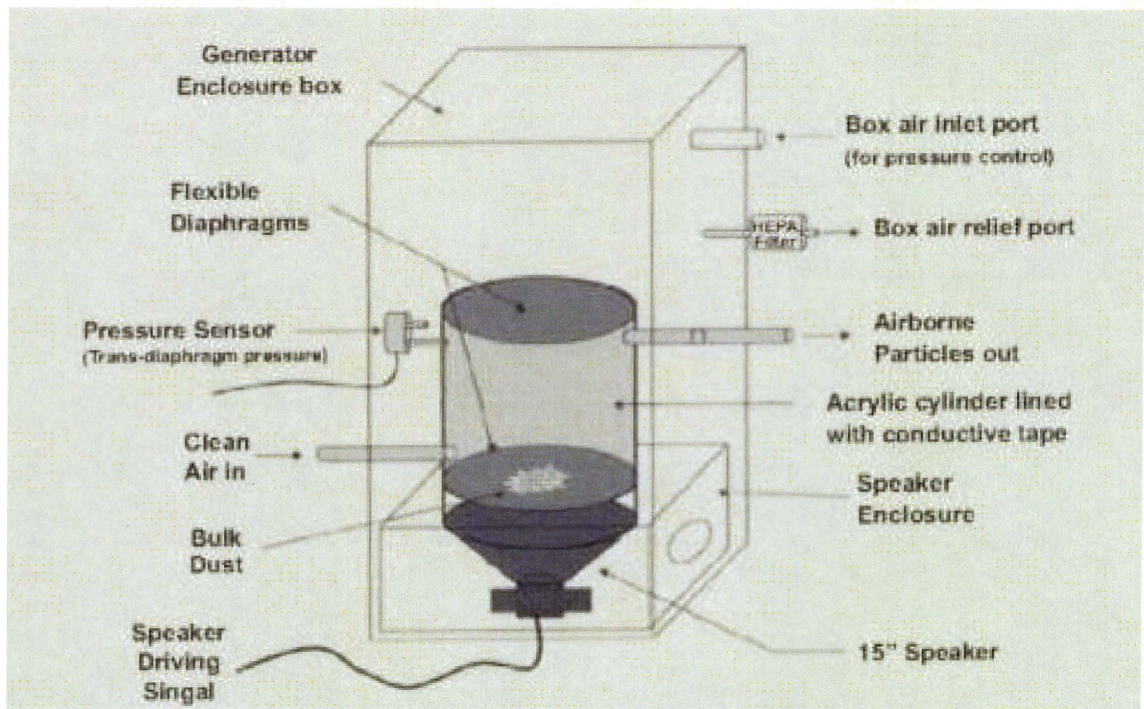


図7. McKinneyら¹⁾の開発したスピーカーによる音振動を用いた発生器 (文献より転載)



写真 1. McKinneyら¹⁾の開発したスピーカーによる音振動を用いた発生器

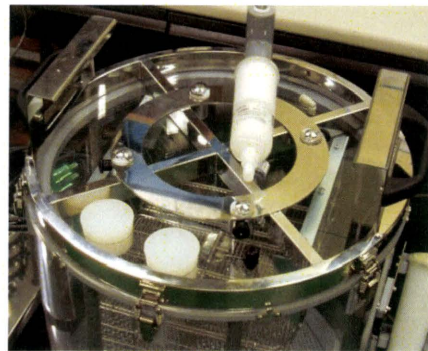


写真 2. 開発製造した、ディスプレイブル暴露チャンバー(左写真は外筒、右は蓋)

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

研究分担者 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

研究協力者 山崎一法 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長

鈴木正明 日本バイオアッセイ研究センター 経口試験室室長補佐

加納浩和 日本バイオアッセイ研究センター 生殖発生試験室室長

研究要旨

ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験法について、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用いて検討した。その結果、試験プロトコールは、実験動物として雌雄F344系ラットを使用し、インシエーション処理としてDHPNを0.1%の濃度で飲水に混入して2週間投与し、2週間の休業期間の後、MWCNTを0、2.5、10および40 μ g/匹の用量で1回/2週、4回気管内投与する方法を選択した。MWNT-7を試験材料として、この試験プロトコールによる中期発がん試験を実施した結果、MWNT-7の経気道投与はDHPN処理によるラットの肺の腫瘍発生を修飾する作用がないことがわかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルは極めて微細な粒子であり空気中に飛散しやすいため、ナノマテリアルおよびナノマテリアル製品のヒトへの暴露経路として経気道的暴露が重要な位置をしめている。経気道的に暴露されたナノマテリアルは、気道、特に肺に沈着するため、肺に対する影響が問題になる。特に、カーボンナノチューブはその形状がアスベストと類似しているため、長期暴露による肺や胸膜への発がん性が懸念されている。従来の動物実験で化学物質の発がん性の有無を調べるためには、動物の寿命に相当する長期間にわたり化学物質を動物に投与することが必要であった。ナノマテリアルは多くの種類があり、さらに、用途や製法により形状や不純物が異なる製品が多数存在している。ナノマテリアルの生体影響は、その形状や不純物などの物理化学的性質が関与していると考えられており、個々

のナノマテリアルで発がん性が異なることが予測される。従来行われてきた長期発がん性試験では、多数の動物、莫大な費用、期間がかかるため、個々のナノマテリアルについて長期試験を実施することは不可能である。このため、より短期間で多くの物質の発がん性を推定できるスクリーニング手法を開発することが必要である。化学物質の発がん性を推測するスクリーニング手法としては、微生物や培養細胞を用いた短期スクリーニング手法がある。しかし、標的臓器を考慮してナノマテリアルの発がん性を検出するためには、ほ乳動物を用い、腫瘍の発生をエンドポイントとしたスクリーニング手法、すなわち、ナノマテリアルの経気道投与による肺や中皮を標的とした中期発がん試験法を開発する必要がある。

20年度は、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験を開発することを目的として、

多くのナノマテリアルで共通して標的臓器となる可能性が高い肺を標的とした中期発がん試験に利用可能なイニシエーション処理と試験プロトコールについて、文献等の情報を基に検討した。

平成21年度は、ナノマテリアルの経気道投与による中期発がん試験の試験プロトコールについて検討した。

22年度は、代表的なナノマテリアルである多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を材料として、平成21年度に検討した試験プロトコールを用いて、経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験を実施した。

B. 研究方法

B-1 肺を標的とした中期発がん試験のイニシエーション処理と試験プロトコールの文献的検索

ナノマテリアルは基本的に非遺伝毒性物質と考えられているため、今回の検討では既知の発がん物質（イニシエーター）を投与し、その発がんへの修飾作用を検出する方法を基本とした。また、中期発がん試験に实际的に使用しうる動物種は、ラット、マウスおよびハムスターであるため、これらの動物種別に下記の項目について文献等の情報を収集し、ナノマテリアルの吸入暴露による中期発がん試験のイニシエーション処理と試験プロトコールの検討を行った。

- 1) 使用する動物の系統、性および週齢
 - 2) イニシエーション処理の方法、すなわちイニシエーターの種類、投与経路、投与期間、用量、イニシエーション処理後の休業期間
 - 3) ナノマテリアルの投与期間
 - 4) 発がん性の検出方法
- なお、近年多用されつつある遺伝子改変動物の使用についても検討した。

B-2 ナノマテリアルの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験の試験プロトコールの検討

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を材料として、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検討した。試験法は、MWCNTは非遺伝毒性物質と考えられているため、既知の発がん物質（イニシエーター）を投与し、その発がんへの修飾作用を検出する方法を基本とし、1) 中期発がん試験に使用する動物、2) イニシエーション処理の方法、3) 被験物質であるMWCNTの投与方法、4) 発がん性の検出方法、5) 陽性対照群について、検討した。

B-3 MWCNTの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験

B-3-1 試験材料

MWCNTは、三井物産(株) から提供されたMWNT-7（ロット番号061220）を材料として使用した。

イニシエーション処理に用いたDHPN（CAS No. 53609-64-6）は、岐阜薬科大学RI研究施設で合成した試薬を使用した。DHPNは使用までの間、 -70°C 以下に冷凍して保管した。

また、陽性対照物質としてクリソタイル A（UICC）を使用した。

B-3-2 動物

動物は、日本チャールス・リバー(株)（厚木飼育センター：神奈川県厚木市下古沢795）のF344/DuCrIjラット（SPF）の雄を使用した。168匹を6週齢で導入し、検疫、馴化を各1週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物から、体重値の中央値に近い144匹（群構成時体重範囲：170～197g）を選別し、試験に用いた。

B-3-3 試験プロトコール

試験プロトコールを図1、試験群の構成を表

1に示した。

起始物質であるDHPNを1.00g/1000 mL (0.1%濃度)となるように脱イオン水に溶解し、褐色給水瓶にて2週間自由摂取させた。2週間の休業期間後、MWNT-7を2.5 μ g、10 μ gまたは40 μ g/匹の用量で2週間おきに4回気管内投与し、20週間の観察期間をおいた後に解剖した。また、比較のために、無処置群、MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群、DHPN処置だけの群、およびDHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹の用量で2週間おきに4回気管内投与した群を設けた。MWNT-7の投与量は、Aisoら(2010)の研究に基づいて決定した。クリソタイルAの投与量は、MWNT-7の最高用量に合わせた。

B-3-4 MWCNT懸濁液の調製方法

Tween80を0.1%添加したPBSに、各設定濃度となるようにMWNT-7を加え超音波ホモジナイザー(VP-30S、タイテック株)を用いて20分間ソニケーションし、懸濁した。調製は1回に投与2回分(4日分)を調製し、MWCNT懸濁液の調製は試験期間中2回行った。調製したMWCNT懸濁液は投与毎に小分けし、高圧蒸気滅菌したものを使用時まで冷蔵保管した。投与直前に超音波で再拡散して投与に使用した。

B-3-5 動物の飼育条件

動物は、全飼育期間を通して以下の環境で飼育した。

温度： 23 \pm 2 $^{\circ}$ C

湿度： 55 \pm 15%

明暗サイクル：

12時間点灯(8:00~20:00)/12時間消灯(20:00~8:00)

換気回数： 15~17回/時

ケージへの動物の収容方法：単飼

ケージの材質・形状・寸法等：

ステンレス製2連網ケージ(170(W) \times 294(D)

\times 176(H) mm/匹)

飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)(千葉工場：千葉県千葉市美浜区新港8-2)のCRF-1(30K Gy- γ 線照射滅菌飼料)固型を使用した。ただし、定期解剖前日の夕方からは飼料を摂取させなかった。

飲水は、検疫期間については市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。馴化期間については、脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。起始物質投与期間については、0群と1群には脱イオン水のみを、2群~6群については脱イオン水を用いて所定の濃度に調製したDHPN混合飲水を給水瓶により自由摂取させた。起始物質投与終了後の回復期間の1週目は全ての動物に脱イオン水を給水瓶により自由摂取させた。その後は、フィルターろ過した後、紫外線照射した市水を自動給水装置により自由摂取させた。

B-3-6 観察・検査項目及び方法

①動物の生死及び一般状態の観察

生死及び瀕死の確認を毎日1回行った。一般状態の詳細な観察は週1回行った。

②体重測定

測定時に生存した全動物について、起始物質の処置期間と回復期間は週1回、それ以降は2週に1回体重測定を行った。

③摂餌量測定

測定時に生存した全動物について、起始物質の処置期間と回復期間は週1回、それ以降は2週に1回給餌量、残餌量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂餌量を算出した。

④摂水量測定

起始物質投与期間中及び回復期間の1週目は測定時に生存した全動物について週1回、給水量、残水量を測定し、その値から1匹1日当たりの摂水量を算出した。また、体重、摂水量及び設定濃

度よりDHPNの投与量を算出した。

⑤気管支肺胞洗浄液検査

定期解剖時に生存していた採材可能な各群12匹について、剖検直前にソムノペンチル（共立製薬株式会社）麻酔下で放血させ、左気管支を結紮後、気管から生理食塩水5.5mlを右肺に注入（2回右肺を洗浄）した後、注入液を回収した。回収した洗浄液の液量を計量した後、下記の項目について検査を行った。なお、回収した洗浄液は凍結して保存し、解凍後に測定を実施した。

検査項目：LDH、ALP、総蛋白、アルブミン

⑥病理学的検査

全動物について、安楽死させた後、肉眼的に観察を行った。なお、安楽死は麻酔下において腹部大動脈からの放血によって行い、麻酔は気管支肺胞洗浄検査を行った動物はソムノペンチル、それ以外の動物はエーテルで行った。

また、定期解剖時まで生存していた動物について、肺、肝臓および腎臓の湿重量（臓器実重量）を測定した。また、臓器の湿重量の搬出時体重に対する百分率（臓器重量体重比）を算出した。

全動物について、気管（縦隔リンパ節、胸腺を含む）、肺（右肺に固定液を注入した）、胸郭（横隔膜を含む）、肉眼的に変化のみられた器官及び組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定した。肺については、固定後に結節及び白色斑の個数を計数した。

（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-1 肺を標的とした中期発がん試験のイニシエーション処理と試験プロトコルの文献的検索

C-1-1 ラットを使用した中期発がん試験イニシエーターとして N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) や diethylnitrosamine (DEN) を使用した中期発がん試験の報告がある。

Moorら(1986)は、6週齢のF344系雄ラットにイニシエーション処理としてDHPNを2週間おきに4回(1000 mg/kgの用量で1回、250 mg/kgの用量で3回)腹腔内投与し、その後、被験物質であるdehydroepiandrosteroneを22週間混餌投与し、肺の過形成を指標として肺発がんへの修飾作用を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群での肺の過形成は95%である。なお、肺以外の臓器については、肝臓と甲状腺への腫瘍の発生がみられている。また、彼らは、6週齢のF344系雄ラットにイニシエーション処理として1000 mg/kgの用量のDHPNを1週間おきに2回、腹腔内投与した試験も行っている(Moorら,1988)。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群は、肺の過形成と腺腫の発生率が80%である。また、肺以外の臓器については肝臓への腫瘍の発生がみられている。Hasegawaら(1990)は、F344系雄ラットにイニシエーション処理としてDHPNを飲水に1000 ppmの濃度で混入し2週間投与し、その後、被験物質を餌に混ぜ30週間投与し、肺の過形成、腺腫およびがんの発生匹数、個数および面積を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群の肺の腺腫とがんの発生率はそれぞれ100%と45%である。また、肺以外の臓器については、甲状腺(25%)と腎臓(10%)への腫瘍の発生がみられている。また、イニシエーション処理として、修復過程で高いDNA合成を引き起こす物質である4-methylthiobenzamideを1回腹腔内投与し、その後、DHPNを飲水に1000 ppmの濃度で混入し13日間投与する方法も報告されてい

る（加藤ら、1998）。

NoronhaとGoodall（1983）は、85日齢のNZR/Gd系雌ラットにイニシエーション処理として、20 mg/kgの用量のDENを1回腹腔内投与し、その後、被験物質を生涯にわたって皮下投与し、肺の腫瘍の発生を調べている。この試験系におけるイニシエーション処理のみの群の肺腫瘍の発生率は24%であり、肺以外の臓器については、腎臓（20%）と肝臓（24%）への腫瘍の発生がみられている。

C-1-2 マウスを使用した中期発がん試験

マウスを使用した中期発がん試験については、イニシエーターとして3-methylcholanthrene（3-MC）、ウレタン、4-nitroquinoline 1-oxide（4-NQO）、7,12-dimethylbenz[a]anthracene（DMBA）等を使用した報告がある。

Henryら（1981）は、8～12週齢のC3H系とBC3F1系（C57BL×C3H）雌マウスにイニシエーション処理として3-MCを0.25 mg/kgの用量で1回、気管内投与し、被験物質を生涯にわたって投与し、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、3-MCの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生率は88～95%である。

Lindenschmidtら（1986）は、肺腫瘍好発系であるA/J系マウスの6～8週齢の雄にイニシエーション処理としてウレタンを1000 mg/kgの用量で1回、腹腔内投与し、その後、酸素濃度70%の空気を16週間吸入させ、肺腫瘍の発生数を拡大鏡で数え、ウレタンの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群の肺腫瘍の発生率は100%である。

Inayama（1986）は、6週齢のddY系雄マウスにイニシエーション処理として4-NQOを10 mg/kgの用量で1回、皮下投与し、4週間の休業

期間の後、被験物質を餌に混ぜ25週間与え、肺腫瘍の発生数を拡大鏡で数え、4-NQOの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生率は27%である。

PashkoとSchwartz（1996）は、8週齢のA/J系雄マウスにイニシエーション処理としてDMBAを0.5 mg/kgの用量で1回、経口投与し、その後、副腎を摘出し、14週間後に肺腫瘍の発生数を拡大鏡で数え、DMBAの肺発がん性への修飾作用を調べている。イニシエーション処理のみの群での肺腫瘍の発生数は2個/匹である。

五十嵐ら（2006）は、6週齢のA/J系雄マウスにイニシエーション処理として6 mg/匹の用量の4-(methylnitrosamine)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を浸透圧ポンプを用いて1週間かけて皮下投与すると、28週に最も顕著に肺の増殖性病変が発生したことを報告している。

C-1-3 ハムスターを使用した中期発がん試験

ハムスターを使用した中期発がん試験は少ないが、N-nitrosobis(2-oxopropyl)amine（BOP）等をイニシエーターとして用いた試験の報告がある。

Nishikawaら（1983）は、5週齢の雄のシリアンゴールデンハムスターにイニシエーション処理としてBOPを10 mg/kgの用量で1週間隔で3回皮下投与し、その後、タバコ煙を27週間吸入させ、肺の過形成と腺腫の発生を病理組織学的に検査し、BOPの肺発がん性への修飾作用を調べている。この試験系のイニシエーション処理のみの群の過形成の発生率は17%、腺腫の発生率は80%である。肺以外の臓器については、膵臓腫瘍の発生が57%の動物にみられる。また、BiitとPour（1983）は、8週齢の雌雄のシリアンゴールデンハムスターにイニシエーション処理としてBOPを10 mg/kgの用量で1回、皮下投

与し、高脂肪食と低脂肪食を生涯にわたって与え、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、BOPの肺発がん性への修飾作用を調べている。

その他のイニシエーション処理として、Beems (1984) は、雌雄のシリアンゴールドンハムスターにビタミンAを飼料に混ぜ生涯にわたって与え、その間に、イニシエーション処理としてBenzo[a]pyrene(BP)と酸化鉄を2週間隔で5回気管内投与し、肺腫瘍の発生を病理組織学的に検査し、BPの肺発がん性へのビタミンAの修飾作用を調べている。

C-1-4 遺伝子改変動物を使用した中期発がん試験

遺伝子改変動物にイニシエーション処理を行い、より短期間に発がん性を調べる試みが行われている。特に、ヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入したマウスを用いた中期発がん試験の報告が多い。例えば、田村ら (2000) は、CB6F1マウスにc-Ha-ras遺伝子を導入したトランスジェニックマウス(CB6F1-Tg rasH2マウス)に、イニシエーション処理としてウレタンを250 mg/kg の用量で1回、腹腔内投与し、その後、被験物質を26週間投与し、肺の病理検査を行っている。また、安原ら (2001) や高橋ら (2001) は、CB6F1-Tg rasH2マウスに、イニシエーション処理としてNNKを3 mg/kg の用量で2回腹腔内投与し、その後、被験物質を26週間投与し、肺の過形成、腺腫および腺癌の観察を行っている。

また、DNA酸化損傷の修復酵素である8-oxoguanineDNAglycosylase 1 (OGG1) 遺伝子欠損マウスに、イニシエーション処理としてNNKを浸透圧ポンプを用いて1週間皮下投与し、その後、被験物質を27~33週間投与し、肺の増殖性病変を調べた報告もある(五十嵐ら、2007)。

遺伝子改変ラットについては、Hras250ラットに気管よりCreloxPリコンビナーゼ発現アデ

ノウイルスベクターを投与し、変異型Ha-rasV12遺伝子を発現させたラットを使用して、早期肺がんモデルを確立する試みが行われている。この系ではウイルス投与2週間後に組織学的に肺胞上皮および呼吸細気管支上皮の過形成や腺癌がみられたことが報告されている(大島ら、2008)。

C-2 ナノマテリアルの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験の試験プロトコールの検討

C-2-1 中期発がん試験に使用する動物

中期発がん性試験に使用されている動物種は、ラット、マウスおよびハムスターである。これらの動物種の中で、MWCN中期発がん性試験Tの経気道投与による量反応関係が把握されているF344系ラットを選択した(Aisoら、2010)。また、動物の週齢は、気管内投与が容易になる週齢が約12週齢であるため、イニシエーション処理の期間2週間と休薬期間2週間を差し引いて、8週齢かイニシエーション処理を開始することとした。

C-2-2 イニシエーション処理の方法

肺を標的臓器とした中期発がん性試験のイニシエーターは、ラットを用いた試験系ではDHPN(Beems,1984、Moorら、1986、1988、Hasegawaら、1990、加藤ら、1998)やDEN(NoronhaとGoodall,1983)を使用した中期発がん試験の報告がある。DENによるイニシエーションは、肺腫瘍の発生率は24%であるのに対し、腎臓(20%)と肝臓(24%)にも同程度に腫瘍の誘発がある(NoronhaとGoodall,1983)。これに対し、DHPNによるイニシエーションでは、肺の腺腫とがんの発生率はそれぞれ100%と45%であるのに対し、肺以外の臓器への腫瘍の誘発は甲状腺(25%)、腎臓(10%)であり(Hasegawaら、1990)、肺への特異性がDENに

比較して高い。このため、イニシエーターとしてDHPNを選択した。

DHPNのイニシエーション処理の方法としては、1) 腹腔内投与(2週間おきに1000 mg/kgの用量で1回と250 mg/kgの用量で3回、または、1週間おきに1000 mg/kgの用量で2回)(Moorら,1986,1988)、2) 飲水投与(0.1%の濃度で2週間投与)(Hasegawaら,1990)、3) 4-methylthiobenzamideを1回腹腔内投与とDHPNの飲水投与の併用(Beems,1984、加藤ら,1998)が報告されている。これらの方法の中で、0.1%の濃度で2週間飲水投与する方法が他の臓器の腫瘍誘発が少なく肺への特異性が高いため、DHPNのイニシエーション処理の方法として採用した。また、イニシエーション処理後、被験物質の投与開始まで2週間の休業期間をおく。

C-2-3 MWCNTの投与方法

被験物質であるMWCNTの投与方法については、Aisoら(2010)の報告を参考とした。Aisoら(2010)は、MWCNTを160と40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で1回気管内投与し、投与91日後まで観察した。その結果、160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ も用量では肺に微小肉芽や線維化の発生が認められ。また、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量でも肺に軽度な線維化の発生があることを報告している。従って、被験物質であるMWCNTの中期発がん性試験における最高用量は、肺に明らかな変化が起きる用量である160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ を選択した。ただし、中期発がん性試験では被験物質の作用が持続的になるように、2週間に1回、4回に分割して投与する方法とした。160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ 以下の用量については、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ でも軽度な線維化が起きることが推定できるため、40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ より低い用量での試験が必要と考えられる。従って、MWCNTの肺を標的とした中期発がん性試験の用量は、40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ 、2週間に1回の割合で4回投与、計

160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。中間用量は、10 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ 、2週間に1回の割合で4回投与、計40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。最低用量は、2.5 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ 、2週間に1回の割合で4回投与、計10 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。

C-2-4 発がん性の検出方法

発がん性の検出方法としては、Moorら(1986)やHasegawaら(1990)は、肺腫瘍の発生について発生動物数と腫瘍および前腫瘍性変化の発生個数を、解剖時の肉眼的観察と病理組織学的検査によって検索する方法を用いている。本研究でもこれらの検出方法を基本として選択した。

C-2-5 陽性対照群

肺を標的とした中期発がん性試験の陽性対照物質は、現在のところ標準的なプロモーターが確立されていない。そこで、今回の研究では、MWCNTと形状が類似し、かつ、発がん性を有するクロシドライトを陽性対照物質として選択した。投与方法はMWCNTと同様に、40 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ の用量を、2週間に1回の割合で4回気管内投与、計160 $\mu\text{g}/\text{匹}$ とした。

C-3 MWCNTの経気道投与による肺を標的とした中期発がん試験

C-3-1 生死状況

投与による影響の死亡はなかった。なお、定期解剖の1日目にDHPN+ MWNT-7(2.5 μg)群の1匹が死亡し、剖検で肺の退縮不全が認められたが、投与用量に対応した死亡ではないことから、偶発的な死亡と判断した。また、DHPN+ CHRYS(40 μg)群の1匹が採血時に事故死亡した。

C-3-2 体重

体重の推移を図2に示した。DHPN処置だけの群、DHPN処置後に2.5 μg 、10 μg または40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量でMWNT-7を投与した群、及びDHPN処置後に40 $\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量でクリソタイルAを投