

与した群は、無処置群に比較して体重の低値が認められた。すなわち、DHPN+ MWNT-7(10 μ g)群、DHPN+ MWNT-7(40 μ g)群及びDHPN+ CHRYS(40 μ g)群では、ほぼ全投与期間を通して体重の低値が認められた。また、DHPN処理のみの群とDHPN+ MWNT-7 (2.5 μ g) 群では、起始物質投与開始から、それぞれ18週と12週まで体重の低値が認められた。MWNT-7の各用量群およびクリソタイルA投与群ともDHPN処置だけの群との間に体重推移の差がみられないことから、これらの体重への影響は、起始物質であるDHPNの投与による影響と考えられる。

C-3-3 摂餌量

摂餌量の推移を図3に示した。DHPN処置だけの群、DHPN処置後に2.5 μ g、10 μ gまたは40 μ g/匹の用量でMWNT-7を投与した群、及びDHPN処置後に40 μ g/匹の用量でクリソタイルAを投与した群は、DHPN処置を行っていた期間に摂餌量の低値が認められた。MWNT-7の各用量群およびクリソタイルA投与群ともDHPN処置だけの群との間に摂餌量推移の差がみられないことから、これらの摂餌量への影響は、起始物質であるDHPNの投与による影響と考えられる。

C-3-4 摂水量

DHPNで処置した群では、DHPNの投与期間を通して摂水量の低値が認められた。DHPNの投与期間の平均一日摂水量は、DHPNで処置しない群：21.3 gに対し、DHPN処理群は18.3 g (DHPNで処置しない群の86%)であった。

体重、摂水量及び設定濃度より算出したDHPNの投与量は、70~120 mg/kg体重/日(平均DHPN摂取量は89 mg/kg体重/日)であった。

C-3-5 気管支肺胞洗浄液検査

気管支肺胞洗浄液検査の結果を表2に示した。

MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群は、無処置対照群に比較して、ALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

DHPN処理のみの群は、無処置対照群に比較して、総蛋白とアルブミンの高値が認められた。しかし、増加の程度は無処置対照群に比較して少なかった。

DHPN処置後にMWNT-7を40 μ g/匹投与した群は、DHPN処理のみの群に比較してALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

DHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹投与した群は、DHPN処理のみの群に比較してALP、総蛋白及びアルブミンの高値が認められた。

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ため、LDHの活性が低下していると考えられることから評価から除外したが、ALPと同様に、MWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群とDHPN処置後にMWNT-7を40 μ g/匹投与した群に高値が認められている。

C-3-6 肺の病理検査

剖検の結果を表4に示した。

DHPN処理のみの群、DHPN処置後にMWNT-7を2.5 μ g、10 μ g および40 μ g/匹投与した群、並びにDHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹投与した群は、全ての動物の肺に結節や白色斑が認められた。これに対し、無処置群とMWNT-7を40 μ g/匹投与しただけの群では、いずれの動物も肺に結節や白色斑の発生がなかった。

結節や白色斑の平均発生個数/匹は、DHPN処置だけの群は 32.2 ± 8.4 、DHPN処置後にMWNT-7を2.5 μ gの用量で投与した群は 32.4 ± 6.8 、10 μ gの用量で投与した群は 29.0 ± 7.3 、40 μ gの用量で投与した群は 27.7 ± 6.9 、DHPN処置後にクリソタイルAを40 μ g/匹の用量で投与した群は 31.3 ± 7.5 であり、これらの群の間には差がみられなかった。

D. 考察

アスベストに類似した形状を持つMWCNT

の経気道暴露は、胸膜の中皮腫や肺の腫瘍の発生の原因になることが懸念されている。Polandら(2008)は、MWNT-7をマウスに腹腔内投与しアスベストに類似した反応がみられることを報告した。また、Takagiら(2008)は、雄p53+/-マウスにMWNT-7を腹腔内投与し、中皮腫が発生したことを報告している。さらに、Sakamotoら(2009)は、今回の研究に使用したと同様の雄F344ラットの陰嚢内にMWNT-7を投与し、腹膜の中皮腫が発生したことを報告している。本研究では、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ある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。

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について文献的に検索すると、ラット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DHPNを使用した報告が多い(Moorら,1986,1988、Hasegawaら,1990、加藤ら,1998)。現在までの知見では、DHPNに比べラットの肺腫瘍をより確実に誘発させる化学物質の情報は得られないことから、ラットを使用した中期発がん試験のイニシエーターとしてはDHPNを選択するのが適切と考える。使用する動物の系統については、長期がん原性試験で多用されているF344系雄ラットを使用できるため(Moorら,1986,1988、Hasegawaら,1990)、長期がん原性試験との比較を考慮してF344系ラットが選択できる。また、使用動物の週齢については、Moorら(1986,1988)は6週齢からイニシエーション処理を開始していること、また、6週齢の動物は入手が容易であることから、6週齢が適切と考える。性については雄を使った報告が多く雄を選択できるが、雌の使用についても検

討することが課題と考える。DHPNの投与経路、投与期間、用量およびナノマテリアルの投与期間については、①DHPNを250~1000 mg/kgの用量で2回~4回腹腔内投与し、その後、被験物質を22週間投与する方法(Moorら,1986,1988)、および②DHPN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週間投与する方法(Hasegawaら,1990)がある。いずれの報告も、肺の増殖性病変の発生率が100%に近い場合、肺への発がん性の抑制効果を調べるためには適したプロトコールであるが、促進効果を目的とするためにはDHPNの用量の低減、またはナノマテリアルの投与期間の短縮について検討することが課題になる。従って、ラットを使用した中期発がん試験では、雌雄F344系ラットを使用し、イニシエーション処理としてDHPNを250~1000 mg/kgの用量で2回~4回腹腔内投与、あるいは飲水に1000 ppmの濃度で混入し2週間投与し、その後、ナノマテリアルを22~30週間、経気道投与する方法をプロトコールの基本とするのが適切と考える。また、DHPNの用量の低減やナノマテリアルの投与期間の短縮が今後の課題になる。

マウスを使用した中期発がん試験については、ウレタン、4-NQO、3-MC、DMBA等、ラットに比べ多くの種類のイニシエーターを用いた試験系がある。また、動物の系統もA/J系、ddY系、C3H系、BC3F1系等、多くの系統が使用されている。すなわち、①3-MCをC3H系やBC3F1系マウスに投与した後、被験物質を生体投与する方法(Henryら,1981)、②ウレタンをA/J系マウスに投与した後、被験物質を16週間投与する方法(Lindenschmidtら,1986)、③4-NQOをddY系雄マウスに投与した後、被験物質を25週間投与する方法(Inayama,1986)、④DMBAをA/J系雄マウスに投与した後、被験物

質を14週間投与する方法（PashkoとSchwartz,1996）、⑤NNKをA/J系雄マウスに投与した後、28週目に解剖する方法（五十嵐ら,2006）等が報告されている。いずれの方法も1回の投与で肺の過形成や腫瘍が高率に発生する方法であり、ナノマテリアルの中期発がん試験に利用できる可能性がある。特に、A/J系マウスに、ウレタンを腹腔内投与する方法やDMBAを経口投与する方法は、それぞれ16週間と14週間で肺に腫瘍を高率に発生させることができるため、試験期間をより短くした中期発がん試験の開発が可能と考えられる。また、試験従事者が発がん物質を取り扱う際の安全性を考慮すると、ウレタンがDMBAより安全性が高い。従って、マウスを使用した中期発がん試験では、A/J系マウスを使用し、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、ナノマテリアルを16週間、経気道投与する方法をプロトコルの基本とするのが適切と考える。また、ラットのDHPN処理と同様に、このプロトコルではイニシエーション処理だけの群における肺の増殖性病変の発生率が100%であるため、用量の低減やナノマテリアルの投与期間の短縮が今後の課題になる。

発がん性の検出方法については、g-glutamyltransferase (GGT) 陽性表現系に着目した検討が報告されているが(吉田ら,2003)、肺の増殖性病変の陽性率が低いため実用化されていない。従って、現時点では、ラット、マウスとも、肉眼的および病理組織学的な検査による肺の過形成や腫瘍の発生匹数、個数および面積の測定が基本となる。

ハムスターを使用した中期発がん試験については、BOPやBPを使用した報告があるが（Nishikawaら,1983、BiitとPour,1983、Beems,1984）、ラットやマウスに比べ情報が少ない。また、ハムスターはラットやマウスに比

べ動物の供給体制が整っていない。ナノマテリアルの中期発がん試験へのハムスターの利用は、今後の課題と考えられる。また、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おり（田村ら,2000、安原ら,2001、大島ら,2008）、特にヒトプロト型c-Ha-ras遺伝子を導入した動物の利用を考慮すべきと考える。

次に、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ルについて検討した結果、下記の試験系を採用した。

使用する動物は、F344系ラットとし、イニシエーション処理開始時の週齢を8週齢とする。イニシエーション処理の方法は、イニシエーターとしてDHPNを用い、飲水に0.1%の濃度で混ぜ2週間投与する。2週間の休薬期間の後、被験物質の投与を開始する。被験物質であるMWCNTの投与方法は、気管内投与とし、最高用量は、40 μg /匹/回を2週間に1回の割合で4回投与、計160 μg /匹、中間用量は、10 μg /匹/回を2週間に1回の割合で4回投与、計40 μg /匹、最低用量は、2.5 μg /匹/回を2週間に1回の割合で4回投与、計10 μg /匹とした。また、陽性対照群としてクロシドライトを投与する群を設けた。従って、試験群の構成は、1) DHPN処理+MWCNT 40 μg /匹/回を4回投与(計160 μg /匹)、1) DHPN処理+MWCNT 40 μg /匹/回を4回投与(計160 μg /匹)、2) DHPN処理+MWCNT 10 μg /匹/回を4回投与(計40 μg /匹)、3) DHPN処理+MWCNT 2.5 μg /匹/回を4回投与(計10 μg /匹)、4) DHPN処理+MWCNT 0 μg /匹、5) DHPN処理+クロシドライト 40 μg /匹/回を4回投与(計160 μg /匹)(陽性対照群)とした。また、陰性対照群として、1) DHPN処理をせずMWCNT 40 μg /匹/回を4回投与(計160 μg /匹)する群、および、DHPN処理、MWCNTともしな

い群を設けた。被験物質の投与終了後、約18週間後に動物を解剖し、肉眼観察と病理検査により、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検索することにより、被験物質の投与によるDHPN誘発肺腫瘍への促進作用の有無を判定する方法が、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性試験に最も適した方法であると考えた。

MWCNTの中からMWNT-7を試験材料として、上記で検討した試験プロトコルを用いて、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。

その結果、DHPNのイニシエーション処理により摂餌量の低下や体重の増加抑制がみられたが、各群とも最終解剖まで投与に起因した動物の死亡はなかった。従って、DHPNのイニシエーション処置およびMWNT-7の投与用量は、動物が十分耐える条件であることが確認できた。一方、最終解剖時の剖検観察で、肺の腫瘍性病変による結節や白色斑の発生がDHPN処置により全ての動物でみられ、DHPNによるイニシエーション処置が十分であり、本研究で用いた中期発がん試験法は肺の腫瘍発生への修飾作用を検出する方法として適切であると考えられた。

肺の腫瘍性病変の発生を量的に比較するため、肺の結節と白色斑の発生個数は計数した。その結果、DHPNでイニシエーション処置した後にMWNT-7を投与した群はDHPN処置だけの群と比較して発生個数に差が認められなかった。今回の研究で用いたMWNT-7の最高用量である40 μ g/匹は、Aisoらの研究(2010)で線維化が発生することが確認されている用量であり、この用量を4回投与した今回の投与条件は、肺に十分に影響を与えることが予想される量である。また、気管支肺胞洗浄液検査の結果でも、MWNT-7を40 μ g/匹の用量で投与しただけの群にもは、ALP、総蛋白及びアルブミンの高値

が認められ、組織傷害や炎症が起きていることが裏付けられている。従って、MWNT-7はDHPN処理による肺の腫瘍発生を修飾する作用がないと結論した。

E. 結論

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、試験プロトコルは、実験動物として雌雄F344系ラットを使用し、イニ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と結論した。

参考文献

- Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U. et al. (2010). *Industrial Health* 48: 783 – 795.
- Beems, R.B. (1984). *Carcinogenesis* 5, 1057-1060.
- Birt, D.F., Pour, P.M. (1983). *JNCI* 70, 1135-1138.
- Hasegawa, R., Furukawa, F., Toyoda, K., et al. (1990). *Jpn. J. Cancer Res.* 81, 871-877.
- Henly, C.J., Billups, L.H., Avery, M.D. (1981). *Cancer Res.* 41, 5027-5032.
- Inayama, Y. (1986). *Jpn. J. Cancer Res.* 77, 345-350.
- Ito, N., Tsuda, H., Tarematsu, M., et al.

(1988). *Carcinogenesis* 9, 387-394.

Ito, N., Tatematsu, M., Hasegawa, R., et al.

(1989). *Toxicol. Pathol.* 17, 630-641.

Ito, N., Shirai, T., Hasegawa, R., et al.

(1992). IARC Scientific Publications No. 116. 352-388.

Ito, N., Tamano, S., Shirai, T. (2003). *Cancer Sci.* 94, 3-8.

Lindenschmidt, R.C., Tryka, A.F., Witschi, H.P. (1986). *Cancer Res.* 46, 1994-2000.

Moor, A.K., Thamavit, W., Tsuda, H., et al. (1986). *Carcinogenesis* 7, 311-316.

Moor, A.K., Weber, E., Thornton, M., et al. (1988). *Carcinogenesis* 9, 1507-1509.

Nishikawa, A., Furukawa, F., Imazawa, T., et al. (1994). *Jpn. J. Cancer Res.* 85, 1000-1004.

Noronha, R.F.X., Goodwall, C.M. (1983). *Carcinogenesis* 4, 613-616.

Pashko, L.L., Schwartz, A.G. (1996). *Carcinogenesis* 17, 209-212.

Poland, CA., Duffin, R., Kinloch, I. et al. (2008). *Nature Nanotechnology* 3, 423 – 428.

Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N. et al. (2009). *J Toxicol Sci* 34, 65 – 76.

Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T. et al. (2008). *J Toxicol Sci* 33, 105 – 116.

大嶋浩, 深町勝己, アレキサンダー デビット(2008). 第24回日本毒性病理学会.

加藤浩司, 今井田克己, 山口剛他(1998). 第14回日本毒性病理学会.

五十嵐麻希, 吉田緑, 高橋正一他(2006). 第22回日本毒性病理学会.

五十嵐麻希, 吉田緑, 渡邊学他(2007). 第23回日本毒性病理学会.

高橋明子, 三森国敏, 安原加壽雄他(2002). 第18回日本毒性病理学会.

田村啓, 三森国敏, 安原加壽雄他(2000). 第16回日本毒性病理学会.

安原加壽雄, 三森国敏, 糀谷高敏他(2001). 第17回日本毒性病理学会.

吉田緑, 片嶋紗弓, 前川昭彦他(2003). 第19回日本毒性病理学会.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

○ Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, Y., Asakura, M., Kasai, T., Takaya, M., Toya, T., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 783 – 795.

○ Aiso, S., Kubota, H., Umeda, Y., Kasai, T., Takaya, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Sasaki, T., Koda, S. and Fukushima, S.: Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 49: in press

○ Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.

Kasai, T., Saito, M., Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., Ohbayashi, H., Nishizawa, T., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week inhalation toxicity of 1,4-dioxane in rats. *Inhalation Toxicology*. 20: 961-971 (2008).

Kasai, T., Kano, H., Umeda, Y., Sasaki, T., Ikawa, N., Nishizawa, T., Nagano, K.

- K., Arito, H., Nagashima, H. and Fukushima, S.: Two-year inhalation study of carcinogenicity and chronic toxicity of 1,4-dioxane in rats, *Inhalation Toxicology*, 21: 889-897 (2009).
- Kano, H., Umeda, Y., Saito, M., Senoh, H., Ohbayashi, H., Aiso, S., Yamazaki, K., Nagano, K., Fukushima, S. Thirteen-week oral toxicity of 1,4-dioxane in rats and mice. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33: 141-153 (2008).
- Kano, H., Umeda, Y., Kasai, T., Sasaki, T., Matsumoto, M., Yamazaki, K., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S: Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. *Food and Chemical Toxicology*, 47: 2776-2784 (2009).
- Nagano, K., Gotoh, K., Kasai, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Ohnishi, M., Ikawa, N., Eitaki, Y., Yamada, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Two- and 13-week inhalation toxicities of indium-tin oxide and indium oxide in rats, *Journal of Occupational Health*, 2011, 53: 51-63.
- Nagano, K., Nishizawa, T., Eitaki, Y., Ohnishi, M., Noguchi, T., Arito, H. and Fukushima, S.: Pulmonary toxicity in mice by 2- and 13-week inhalation exposures to indium-tin oxide and indium oxide aerosols, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.
- Nagano, K., Nishizawa, T., Umeda, Y., Kasai, T., Noguchi, T., Gotoh, K., Ikawa, N., Eitaki, Y., Kawasumi, Y., Yamauchi, T., Arito, H. and Fukushima, S.: Inhalation carcinogenicity and chronic toxicity of indium-tin oxide in rats and mice, *Journal of Occupational Health*, 2011: in press.
- Ohbayashi, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Nagano, K., Fukushima, S., Ohta, H. Enhanced proliferative response of hepatocytes to combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 33: 327-33 (2008).
- Ohbayashi, H., Saito, Senoh, H., Umeda, Y., Aiso, S., M., Yamazaki, K., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Occurrence of two different types of glutathion s-transferase placental form positive hepatocytes after a single administration of 2,3,7,8-tetrabromo dibenzo-p-dioxin in rats. *Industrial Health*. 46: 281-288 (2008).
- Ohbayashi, H., Umeda, Y., Senoh, H., Kasai, T., Kano, H., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Enhanced hepatocarcinogenicity by combined inhalation and oral exposures to N,N-dimethylformamide in male rats. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34: 53-63 (2009).
- Renne, R., Brix, A., Harkema, J., Herbert, R., Kittel, B., Lewis, D., March, T., Nagano, K., Pino, M., Rittinghausen, S., Rosenbruch, M., Tellier, P., Wohrmann, T.: Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. *Toxicologic Pathology* 37: 5S-73S (2009).
- Takaya, M., Serita, F., Yamazaki, K., Aiso, S., Kubota, H., Asakura, M., Ikawa, N., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats, *Industrial Health*, 2010, 48: 452-459.
- Take, M., Ohnishi, M., Nagano, K., Yamamoto, S., Fukushima, S. Design and performance of a system for blood collection of rats under whole-body inhalation exposure. *The Journal of Toxicologic Sciences*. 34: 221-226 (2009).
- Take, M., Yamamoto, S., Ohnishi, M., Matsumoto, M., Nagano, K., Hirota, T., Fukushima, S: Chloroform distribution and accumulation by combined inhalation plus oral exposure routes in rats. *J of*

Environmental Science and Health Part A, 45: 1616-1624 (2010).

Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nishizawa, T, Nagano, K., Arito, H. and Fukushima S.: Inhalation Carcinogenicity and Toxicity of 1,2-Dichloropropane in Rats. Inhalation Toxicology: 2010,22:1116-1126

Yamazaki, K., Suzuki, M., Kano, H., Umeda, Y., Matsumoto, M., Asakura, M., Nagano, K., Arito, H., Fukushima, S. Oral carcinogenicity and toxicity of 2-amino-4-chlorophenol in rats. Journal of Occupational Health, 51: 249-260 (2009).

長野嘉介：呼吸器系の毒性、化合物を医薬品にするために必要な安全性試験⑫、日薬理誌、133：87-90 (2009).

2. 学会発表

○相磯成敏、梅田ゆみ、山崎一法、長野嘉介、戸谷忠雄、鷹屋光俊、甲田茂樹、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：I. 病理学的検索、第82回日本産業衛生学会 (2009年).

○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、第83回日本産業衛生学 (2010年)

○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、第25発癌病理研究会 (2010年)

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、第26回日本毒性病理学会(2010年).

○浅倉眞澄、杉山淑江、長野嘉介、松岡厚子、福島昭治、ナノ材料のin vitro安全性評価手法の開発 -1- 二酸化チタン 第37回日本環境変異原学会(2008年)

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性、第82回日本産業衛生学会 (2009年).

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、第83回日本産業衛生学会(2010年).

○浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、第39回日本環境変異原学会 (2010年).

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

○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、第27回日本毒性病理学会 (2011年).

○芹田富美雄、鷹屋光俊、久保田久代、甲田茂樹、相磯成敏、山崎一法、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の単回気管内投与によるラットの肺及び肺外への影響：II. 気管

注入時の投与物質及び肺内MWCNTのSEM観察, 第82回日本産業衛生学会 (2009年).

妹尾英樹, 梅田ゆみ, 片桐 卓, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治. N,N-Dimethyl formamideの吸入曝露と飲水投与における肝臓病変の比較, 第25回日本毒性病理学会 (2009年).

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, 第27回日本毒性病理学会 (2011年).

高信健司, 竹内哲也, 奥田裕計, 長野嘉介, 福島昭治. アクリル酸エステル吸入曝露によるラットの生殖機能や児の発育に及ぼす影響 第 81 回日本産業衛生学会 (2008年) .

高信健司, 妹尾英樹, 梅田ゆみ, 相磯成敏, 長野嘉介, 福島昭治: F344 ラットにみられた悪性エナメル上皮腫の1例, 第26回日本毒性病理学会 (2010年)

○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, 第 27 回日本毒性病理学会(2011年).

山崎一法, 加納浩和, 梅田ゆみ, 松本道治, 妹尾英樹, 長野嘉介, 有藤平八郎, 福島昭治: 2-アミノ-4-クロロフェノールのラット及びマウスへの経口投与による発がん性と慢性毒性, 第82回日本産業衛生学会 (2009年).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

表1 試験群の構成

群番号	群名称	DHPN 処置	MWCNT と CHRYS の投与量 $\mu\text{g}/\text{匹}/\text{回}$ $\times 4$ 回	使用動物数
0	無処置対照群	-	0	12 匹
1	MWNT-7 (40 μg) 群	-	40	12 匹
2	DHPN 処理のみの群	+	0	24 匹
3	DHPN+ MWNT-7 (2.5 μg) 群	+	2.5	24 匹
4	DHPN+ MWNT-7 (10 μg) 群	+	10	24 匹
5	DHPN+ MWNT-7 (40 μg) 群	+	40	24 匹
6	DHPN+ CHRYS 40 μg 群	+	40	24 匹

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis*(2-hydroxypropyl)nitrosamine

CHRYS : UICC クリソタイル A

表2 気管支肺胞洗浄液検査

	検査 動物数	ALP	総蛋白	アルブミン
無処置対照群	12	215.8 ± 24.5	74.3 ± 9.4	33.6 ± 4.1
MWNT-7 (40 μg) 群	12	284.1 a ± 13.0	127.0 a ± 9.8	55.4 a ± 3.6
DHPN 処理のみの群	12	244.1 ± 43.3	89.9 a ± 11.0	38.3 a ± 3.7
DHPN+ MWNT-7 (2.5 μg) 群	12	269.9 ± 27.9	89.1 ± 8.5	38.9 ± 3.4
DHPN+ MWNT-7 (10 μg) 群	12	266.9 ± 39.8	94.7 ± 11.9	40.7 ± 4.5
DHPN+ MWNT-7 (40 μg) 群	12	318.3 b ± 31.2	125.2 b ± 14.4	53.5 b ± 5.3
DHPN+ CHRYS 40 μg 群	12	271.3 ± 32.0	103.6 b ± 11.9	48.9 b ± 4.7

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis*(2-hydroxypropyl)nitrosamine

CHRYS : UICC クリソタイル A

a : 無処置群に対し $p \leq 0.01$ で有意な差 (t 検定)

b : DHPN 処理のみの群に比較し $p \leq 0.01$ で有意な差 (t 検定)

表3 肺の剖検結果

	検査 動物数	結節や白色斑 の発生匹数 (%)	結節や白色斑の発生個 数 (1匹あたり)
無処置対照群	12	0 (0%)	0
MWNT-7 (40 μ g) 群	12	0 (0%)	0
DHPN 処理のみの群	24	24 (100%)	32.2 \pm 8.4
DHPN+ MWNT-7 (2.5 μ g) 群	23	23 (100%)	32.4 \pm 6.8
DHPN+ MWNT-7 (10 μ g) 群	24	24 (100%)	29.0 \pm 7.3
DHPN+ MWNT-7 (40 μ g) 群	24	24 (100%)	27.7 \pm 6.9
DHPN+ CHRYS 40 μ g 群	23	23 (100%)	31.3 \pm 7.5

MWNT-7 : 多層カーボンナノチューブ

DHPN : *N-Bis*(2-hydroxypropyl)nitrosamine

CHRYS : UICC クリソタイル A

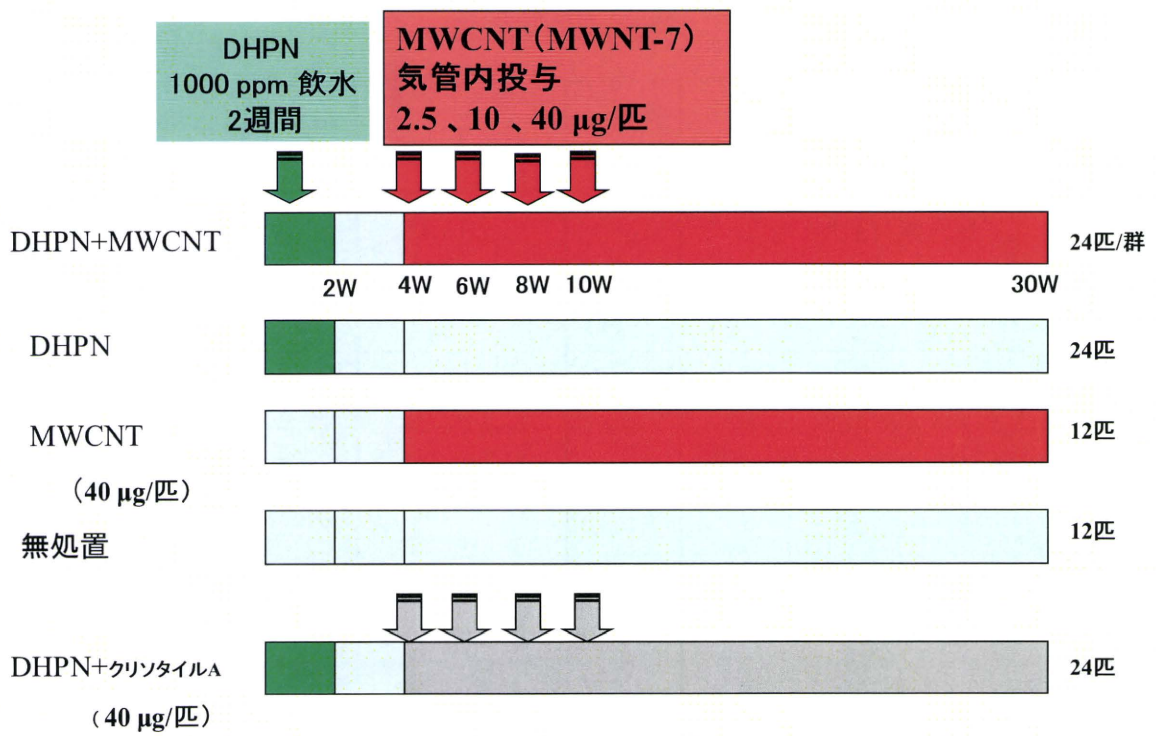


図1 MWCNTの気管内投与によるDHPNイニシエーション処理を用いた肺を標的とした中期発がん試験のプロトコール

MWCNT : 多層カーボンナノチューブ
DHPN : *N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine*

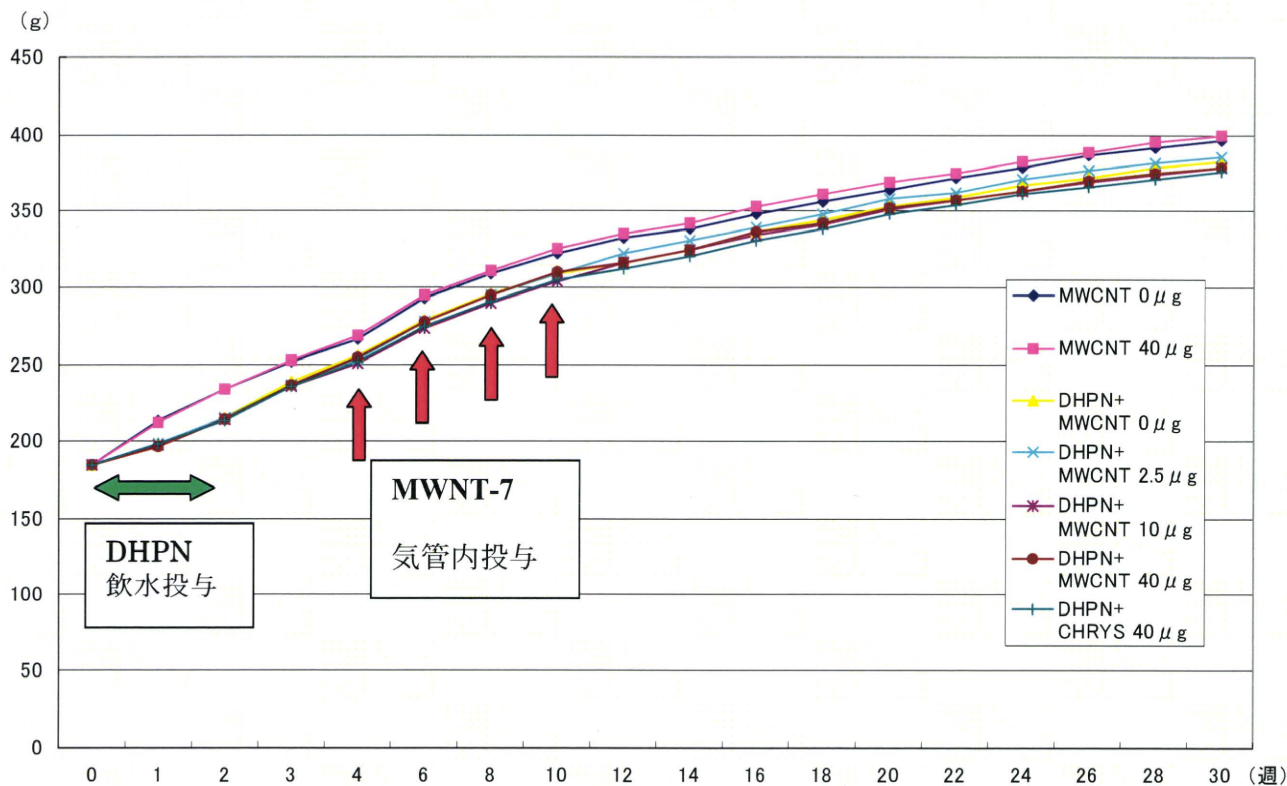


図2 体重の推移

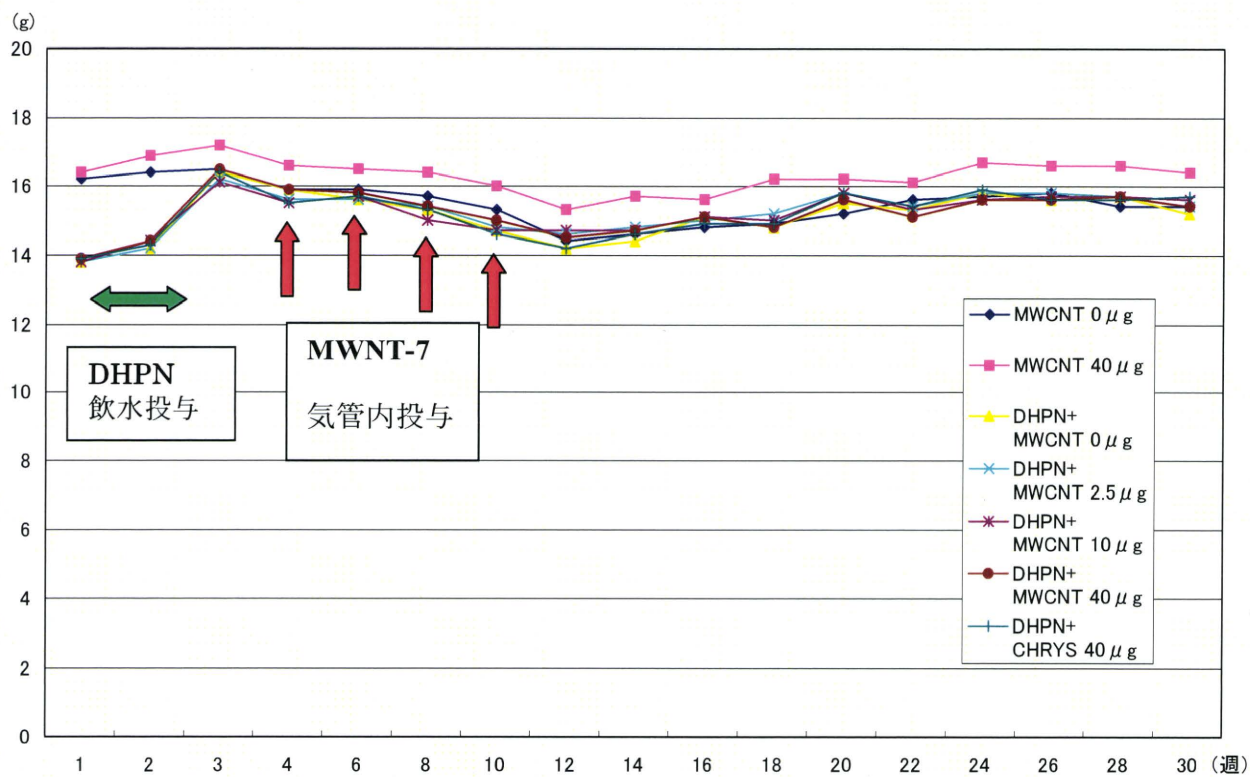


図3 摂餌量の推移

厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業、H20-化学-一般-006)

分担研究報告

研究課題名：ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性スクリーニングのための *in vitro* 系での
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

分担研究者：

浅倉眞澄 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 培養細胞試験室 室長

研究協力者：

鷹屋光俊 独立行政法人 労働安全衛生総合研究所 環境計測管理研究グループ 上席研究員

杉山淑江 日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 培養細胞試験室 室長補佐

研究要旨

近年、種々のナノマテリアルが開発され、広い分野で使用されている。しかし、現在、このようなナノマテリアルの安全性試験の手法が確立されているとは言いがたい。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。本研究では、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での細胞毒性、遺伝毒性及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。試験材料として多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を用い、処理方法および細胞毒性試験の検討を行った結果、個々の手法を確立するとともに、以下の知見を得た。①DMSO/培養液に懸濁し、超音波ホモジナイザーで均一に分散する。②毒性指標としては、コロニー形成法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。③試験した3種の細胞ともに感受性があり、*in vitro* 試験系としての使用が可能である。④MWCNTは細胞内に取り込まれることから、培養細胞を用いる試験系での評価が妥当であること。また上記手法を基礎として実施したMWCNTの遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験により両試験の手法を確立するとともに、以下の知見を得た。①遺伝毒性試験の結果、MWCNTは遺伝子突然変異、染色体構造異常及び小核を誘発しないことから、DNAへの直接的な作用はないと考えられる。②遺伝毒性試験の結果、倍数体及び多核の誘発が観察されることから、細胞の分裂過程に何らかの異常が起こっている可能性が考えられる。③細胞形質転換の結果、MWCNTはイニシエーション段階で処理することにより細胞形質転換を誘発することから、多核の誘発あるいは染色体の数的異常がゲノムの不安定性を通して形質転換のイニシエーション作用に寄与している可能性が考えられる。以上より、培養細胞を用いる細胞毒性、遺伝毒性及び細胞形質転換試験は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 試験系として、十分に評価に耐えるものであると考える。

A. 研究目的

ナノマテリアルは一般的に大きさが1~100nm程度の超微粒子とされるが、ナノテクノロジーの分野の研究開発が進み、既にナノマテリアルを材料とした化粧品、衣料、医薬品などに盛んに使用されるようになってきた。しかし、その安全性や毒性についての研究はまだ始まったばかりである。特に作業環境や一般生活の環境において、ヒトへの健康影響が懸念されている。ナノマテリアルの中でも、カーボンナノチューブはその形状が繊維状物質であるという物理的特性から、アスベストと同様の毒性を示す可能性も推測される。

本試験は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での細胞毒性試験、遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。

B. 研究方法

B-1. 実験材料

三井物産株式会社から提供を受けた多層カーボンナノチューブ(MWNT-7、Lot No. 061220)を使用した。細胞は、チャイニーズハムスター肺由来の細胞株(CHL/IU、V79)および、BALB/c マウス由来の細胞株(Balb3T3)を使用した。培養液は、イーグル MEM+10%牛胎児血清(FBS : V79、Balb3T3)または、イーグル MEM+10%仔牛血清(CHL/IU)を使用した。2段階細胞形質転換試験の培養液には、D-MEM/F-12+2%FBS+1%ITES (insulin, transferrin, ethanolamine, sodium selenite)を併用した。

B-2. 被験物質調製法及び細胞毒性試験

ナノマテリアルの中で MWCNT は水に溶けないことおよび超微粒子であることなどから、通常の安全性の試験ガイドラインに示されているような溶媒および処理方法では、正確な評価が出来ない可能性がある。このため、試験材料として MWCNT を用い、細胞への処理方法の開発、適正な細胞種を選択等を検討したうえで、細胞毒性試験、遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価を行うこととした。

溶媒は以下の5種類を検討した。① MWCNT を培養液に直接懸濁、② MWCNT にジメチルスルホキシド(DMSO、最終濃度 0.5%)を添加後、培養液に懸濁、③ MWCNT を 0.1mg/ml Tween80 水溶液に懸濁(最終濃度の10倍)後、培養液に添加、④ MWCNT を 1% カルボキシメチルセルロース水溶液(CMC)に懸濁後(最終濃度の10倍)、培養液に添加、⑤リン酸緩衝生理食塩液(PBS)に懸濁(最終濃度の10倍)後、培養液に添加して、MWCNT 懸濁液を調製した。それぞれの MWCNT 懸濁液は、超音波ホモジナイザー[VP-30S 型(20kHz,300W)、タイテック]で5分間分散処理を行い、直後に培養液で調製し、15分以内に細胞に処理した。

細胞毒性試験(コロニー形成法)は、60mm ポリエチレンシャーレに100個の細胞(CHL/IU)を播種し、翌日に MWCNT 懸濁液を処理し、7日間培養後に固定染色し、形成したコロニーをカウントして細胞生存率を算出した。一部の試験では、V79細胞及び Balb3T3細胞を使用した。

また、作製した MWCNT 懸濁液の分散

状態を動的光散乱(DLS : ZetaSizer Nano, Malvern 社)による粒度分布および走査型電子顕微鏡(SEM : 日立、FE-SEM、SU-8000 型)を用いて測定、観察した。

B-3. 細胞毒性指標(酵素放出法)の検討

細胞毒性の指標としてコロニー形成法の他に酵素放出法を実施した。試験は、60mm シャーレに細胞を播種し、2 日後に MWCNT を処理し、24 時間後に培養液中及び細胞中の酵素量(乳酸脱水素酵素 LDH)を測定し、酵素放出率をシャーレ毎に算出した。試験は、感受性の違いを見るために、3 種類の細胞を用いた。

B-4. 遺伝毒性試験

B-4-1. 染色体異常試験

60mm シャーレに 1×10^5 個の細胞 (CHL/IU) を播種し 24 時間培養後 MWCNT を処理した。24 時間または 48 時間後に染色体標本を作製し、ギムザ染色後、顕微鏡(600 倍)を用いて染色体の観察を行った。各用量 200 個以上の細胞を観察し、染色体の構造異常および数的異常(倍数体)の観察を行った。

B-4-2. 小核試験

35mm シャーレに 1.2×10^4 個の細胞 (CHL/IU) を播種し、24 時間培養後に MWCNT を 2 日間処理した後にシャーレを 10%ホルマリンで固定した。アクリジンオレンジ/DAPI で染色し、蛍光顕微鏡(300 倍)観察を行った。各用量 2000 細胞を観察し、小核を持つ細胞、2 核または 3 核以上(多核)を持つ細胞、分裂細胞をカウントした。

B-4-3. *hgpert* 遺伝子突然変異試験

90mm シャーレに 3×10^5 個の細胞 (CHL/IU) を播種し、24 時間培養後 MWCNT を処理した。2 日間培養後に再播種を行い、6 日間培養(発現時間)した後 60mm シャーレに 4×10^4 個の細胞を播種(各用量 20 枚)し、6-チオグアニンを添加して 9 日間培養した。その後、エタノールで固定し、クリスタルバイオレットで染色し、生成した変異コロニー数を観察した。

B-5. 2 段階細胞形質転換試験

細胞(Balb3T3)を播種し、24 時間培養後に MWCNT または既知のイニシエーターを処理した。3 日間培養した後、通常の培養液に戻し 3 日間培養した。その後、MWCNT または既知のプロモーターで 10 日間処理した後、通常の培養液に戻し 7 日間培養した。エタノール固定・ギムザ染色後に、実体顕微鏡下でフォーカスの観察を行った。また、同じシャーレを用い、2 核細胞の観察を行った。光学顕微鏡(300 倍)を用い、増殖阻止のかかった細胞を 2000 個観察し、2 核を持つ細胞の数をカウントした。

C. 研究結果

C-1. 被験物質調製法及び細胞毒性試験

各溶媒による細胞毒性の強さは、DMSO/ 培養液 > 培養液 > Tween80 (0.1mg/ml 水溶液) > PBS > CMC(1%水溶液)の順となった(表 1)。MWCNT 懸濁液の DLS 粒度分布測定の結果を図 1 に示した。MWCNT の分散性は、DMSO/培養液 < 培養液 < CMC(1%水溶液) < Tween80

(0.1mg/ml 水溶液)の順となり、細胞毒性の順と比較的良く一致していた。CHL/IU 細胞の他に V-79、Balb3T3 細胞でも細胞毒性試験を実施した結果、CHL/IU 細胞と同様な結果を示した。これより、3種の細胞とも細胞毒性試験に使用可能であることが分かった。また、MWCNT 懸濁液の SEM 観察の結果から、MWCNT の繊維が単離していることを確認した(図 2)。

C-2. 細胞毒性指標(酵素放出法)の検討

酵素放出率は、MWCNT の濃度に依存して上昇した(表 2)。また、3種類の細胞とも、酵素放出に関して同じような傾向を示した。酵素放出法(LDH 法)では、MWCNT に対してコロニー形成法と同様に濃度に依存した毒性感度を示した。

C-3. 細胞内への取り込みの検討

MWCNT を処理した CHL/IU 細胞、Balb3T3 細胞の SEM 写真を示した(図 3、4)。両細胞ともに、MWCNT 繊維が細胞内に入っているのが観察できる。繊維は完全には細胞内に入らず、一部が細胞の外に出ている。MWCNT 処理後の毒性反応等は、細胞による取り込みが原因と考えられる。

C-4. 遺伝毒性

C-4-1. 染色体異常試験

24 時間処理、48 時間処理ともに数的異常(倍数体)を持つ細胞の出現率が有意な上昇を示し、かつ、用量に依存して増加した(表 3)。一方、構造異常を持つ細胞の出現率は、明らかな上昇を示さなかった。

C-4-2. 小核試験

小核出現頻度は、対照群に対して有意な上昇を示さなかったが、傾向検定では用量に依存した上昇傾向を示した。2核を持つ細胞および多核(3核以上)を持つ細胞の出現頻度は、対照群に対して有意な上昇を示し、かつ、用量に依存して増加していた(表 4)。

C-4-3. *hgp*rt 遺伝子突然変異試験

陰性対照に対して、処理群の変異率は 2 倍以上を示すことはなく、明瞭な増加が観察されなかった。一方、細胞毒性の指標である細胞生存率は 21%まで低下していて、十分毒性の出現する用量まで試験が実施された。

C-5. 2 段階細胞形質転換試験

イニシエーション時期に MWCNT を処理した結果、形質転換した細胞のフォーカス数が、用量に依存して上昇した(表 5)。一方、プロモーション時期に MWCNT を処理した結果、形質転換した細胞のフォーカス数の上昇は認められなかった。また、イニシエーション時期に MWCNT を処理したシャーレでは、2核を持つ細胞の出現率が用量に依存して上昇した。

D. 考察

被験物質調製法及び細胞毒性試験

MWCNT を DMSO/培養液に懸濁して処理したものが、最も強い細胞毒性を示した。DMSO/培養液は、疎水性の強い MWCNT に極性溶媒である DMSO を少量添加することにより、水との親和性が強くなり、分散性が良くなるものと考え

られる。DLS による粒度分布測定および SEM 観察による分散状況から上記条件の調製法で MWCNT の分散が十分に行われていることが裏付けられた。また、DLS による粒度分布測定の結果から、MWCNT の分散状態と細胞毒性が関連していることを確認した。この結果から、以降の実験では、上記の調製方法を適用した。

細胞毒性指標

培養細胞に対する毒性の強さを、コロニー形成法および酵素放出法を用いて検索した。MWCNT は濃度に依存して両指標に反応しており、また、その反応性は 2 つの指標の間で大きな相違は認められなかった。従って両指標とも、MWCNT の細胞毒性に有効であると考えられる。また、コロニー形成法、酵素放出法ともに 3 種類の細胞を用いて細胞間の比較を行った結果、全ての細胞が感受性を示し、試験に使用できることが分かった。

細胞内への取り込みの検討

MWCNT の *in vitro* 系での細胞毒性、遺伝毒性及び細胞形質転換の評価にあたり、細胞への MWCNT の取り込みの確認は不可欠な問題である。SEM を用いた観察により、MWCNT が CHL/IU 及び Balb3T3 細胞に取り込まれることが確認できた。細胞毒性試験、遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験における種々の反応は、細胞内に取り込まれた MWCNT により引き起された結果と考えられる。

遺伝毒性試験

遺伝毒性の結果をまとめると、以下の陰性反応が観察された。①小核は誘発しない。②染色体構造異常は誘発しない。③遺伝子突然変異は誘発しない。この結果から、MWCNT は、細胞 DNA に直接作用する物質ではないことが推測される。

また、以下の陽性反応が観察された。①染色体の数的異常(倍数体)を誘発する。②2核を含む多核細胞を誘発する。この結果から、MWCNT は、細胞分裂時に何らかの作用をする物質であることが推測される。

2段階細胞形質転換試験

2段階細胞形質転換試験の結果から、MWCNT は、イニシエーターとして働き、プロモーターとしては働かないことがわかった。イニシエーション時期つまり細胞が増殖を繰り返している時期に作用して何らかの障害が起こることが示唆される。遺伝毒性試験の結果からは、細胞分裂時に何らかの作用をすることが推測された。また、2段階細胞形質転換試験のシャーレで実施した細胞観察でも 2核細胞の誘発が観察されている。Balb3T3 細胞でも、同様の作用が起きて、これが細胞形質転換の引き金になっている可能性が示唆される。染色体の数の異常とがん化の関係は現在、明瞭なメカニズムが解明されているわけではない。しかし、染色体の数の異常(倍数体)が原因となり、異数性の誘発やゲノムの不安定性を引き起こしがん化につながるメカニズムの可能性が考えられる。

E. 結論

本試験は、発がん性スクリーニング法のための *in vitro* 系での遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験による評価手法の開発を目的として、試験系の検討を行った。MWCNT を用いた処理方法および細胞毒性試験の結果、それぞれの手法を確立するとともに、以下の知見を得た。①溶媒として DMSO/培養液に懸濁し、超音波ホモジナイザーにより均一に分散する。②DLS 測定および SEM 観察により MWCNT 懸濁液の調製方法が適切であったことが証明された。③毒性指標としては、コロニー形成法、酵素放出法のどちらを用いることも可能である。④試験した 3 種の細胞ともに感受性があり、変異原性の評価に広く用いられている細胞の使用が可能である。⑤MWCNT は細胞内に取り込まれることから、培養細胞による細胞毒性試験、遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験での評価が妥当であることを証明した。

また上記手法を基礎として実施した遺伝毒性試験及び細胞形質転換試験により両試験の手法を確立するとともに、以下の知見を得ることが出来た。①遺伝毒性試験の結果、MWCNT は遺伝子突然変異、染色体構造異常および小核を誘発しないことから、DNA への直接的な作用はないと考えられる。②遺伝毒性試験の結果、MWCNT は倍数体、2 核および多核の誘発が観察されることから、細胞の分裂過程に何らかの異常が起こっている可能性が考えられる。③細胞形質転換の結果、MWCNT はイニシエーション段階で処理することにより細胞形質転換を誘発する

ことから、多核の誘発あるいは染色体の数的異常がゲノムの不安定性を通して形質転換のイニシエーション作用に寄与している可能性が考えられる。

以上より、CHL/IU 細胞による細胞毒性（コロニー形成法、酵素放出法）、遺伝毒性（染色体異常試験、小核試験、遺伝子突然変異試験）及び Balb3T3 細胞による細胞形質転換試験は、がん原性スクリーニング法のための *in vitro* 系として、十分に評価に耐える試験系であると考えられる。ただし、試験を実施する際には、被験物質の適切な調製法の選択及び細胞への取込みの確認が必要である。

F. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Asakura, M., Sasaki, T., Sugiyama, T., Takaya, M., Koda, S., Nagano, K., Arito, H. and Fukushima, S.: Genotoxicity and cytotoxicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells in comparison with chrysotile A fibers, *Journal of Occupational Health*, 2010, 52: 155-166.
- 2) 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.
- 3) Aiso, S., Yamazaki, K., Umeda, U., Asakura, M., 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.

2. 学会発表

- 1) 浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる細胞毒性および変異原性－クリソタイルとの比較－、2009年、第82回日本産業衛生学会
- 2) 浅倉眞澄、杉山淑江、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：アスベストによる細胞形質転換と倍数性誘発、2009年、第38回日本環境変異原学会
- 3) 浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの培養細胞を用いる小核試験及び細胞形質転換試験、2010年、第83回日本産業衛生学会
- 4) 浅倉眞澄、長野嘉介、有藤平八郎、福島昭治：多層カーボンナノチューブの遺伝毒性試験および細胞形質転換試験、2010年、第39回日本環境変異原学会

G. 知的財産権の出願・登録状況

- ・特許取得・実用新案登録なし。

表1 溶媒検討(細胞毒性試験結果:コロニー形成法、CHL/IU細胞)

用量 ($\mu\text{g/ml}$)	細胞生存率(%) \pm SD				
	培養液	DMSO/培養液	Tween80	CMC	PBS
陰性対照	100	100	100	100	100
12.5	92 \pm 11	99 \pm 7.8	100 \pm 6.4	98 \pm 8.9	99 \pm 1.6
25	82 \pm 10	102 \pm 6.2	103 \pm 5.1	99 \pm 3.3	98 \pm 12
50	81 \pm 14	82 \pm 3.1	100 \pm 5.5	101 \pm 6.2	98 \pm 9.5
100	72 \pm 9.4	54 \pm 8.2	98 \pm 7.8	99 \pm 6.1	92 \pm 3.7
200	57 \pm 16	33 \pm 7.1	80 \pm 7.8	91 \pm 3.2	87 \pm 8.7
400	37 \pm 4.9	4 \pm 1.6	45 \pm 4.7	71 \pm 8.8	51 \pm 9.7
(ChrysotileA)	43 \pm 2.8				

表2 細胞毒性指標(細胞毒性試験結果:酵素放出法、CHL/IU細胞)

用量 ($\mu\text{g/ml}$)	乳酸脱水素酵素(LDH)放出率(%) \pm SD		
	CHL/IU	V79	Balb3T3
陰性対照	3 \pm 0.38	1 \pm 0.51	2 \pm 0.93
1	3 \pm 0.28	1 \pm 0.61	2 \pm 0.28
3	3 \pm 0.71	2 \pm 0.20	3 \pm 0.69
10	9 \pm 0.53	5 \pm 0.26	4 \pm 0.33
30	21 \pm 0.26	10 \pm 0.48	8 \pm 0.63
100	24 \pm 0.29	12 \pm 0.34	9 \pm 0.75
300	27 \pm 0.91	15 \pm 0.86	12 \pm 0.92
1000	33 \pm 0.29	23 \pm 0.66	8 \pm 0.90
(ChrysotileA)	18 \pm 0.56	15 \pm 0.77	10 \pm 0.76

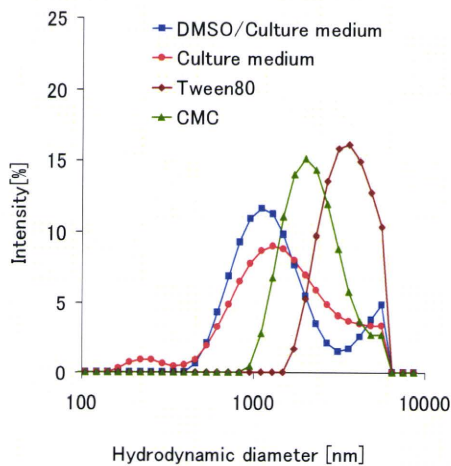


図1 DLS測定によるMWCNT粒子分布

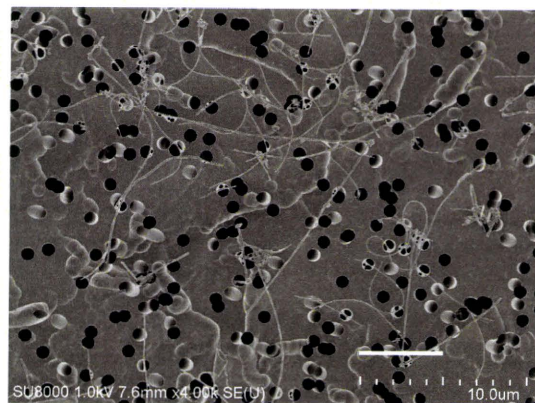


図2 MWCNT懸濁液のSEM像(×4000)