

図3 MWCNT 処理細胞 (CHL/IU、×20000)

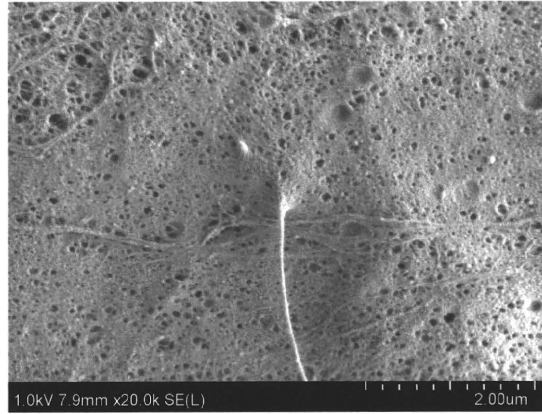


図4 MWCNT 処理細胞 (Balb3T3、×20000)

表3 MWCNTの染色体異常試験(CHL/IU細胞)

処理時間 (h)	用量 ($\mu\text{g/ml}$)	染色体構造異常の出現頻度(%)						総異常細胞数	染色体数的異常の出現頻度(%)		細胞増殖率(%)
		観察細胞数	染色体分体切断	染色体分体交換	染色体切断	染色体交換	その他		観察細胞数	倍数体	
24	0	200	0	0	0	0	0	0	201	0.5	100
	1.3	200	0	0	0	0	0	0	203	1.5	76
	5.0	200	0	0	0	0	0	0	207	3.4*	62
	20	200	0	0	0	0	0	0	234	14.5**	56
	80	200	0	0	0	0	0	0	242	17.4**	50
	Cochran-Armitage test							ns	P<0.01		
	MMC	200	7	23.5	0	0	0	28.5**	200	0	—
48	0	200	0.5	0	0	0	0	0.5	202	1.0	100
	0.078	200	0.5	0	0	0	0	0.5	203	1.5	83
	0.31	200	0.5	0	0	0	0	0.5	204	2.0	74
	1.3	200	0	0	0	0	0	0	217	7.8**	67
	5.0	200	0	0	0	0	0	0	261	23.4**	59
	Cochran-Armitage test							ns	P<0.01		
	MMC	200	6.5	58.5	0	0	0	63**	200	0	—

a) Fisher's exact test : * P<0.05 ** P<0.01

b) Cochran-Armitage test : ns(not significant) or p<0.01

表4 MWCNTの小核試験結果(CHL/IU細胞)

濃度(μ g/ml)	観察細胞数	小核出現頻度(%)	その他の指標(%)			細胞増殖率(%)
			2核細胞	多核細胞 [†]	分裂細胞	
0	2000	8.5	4.5	2.5	14.5	100
0.02	2000	10.5	3.0	2.5	12.5	94
0.078	2000	9.5	6.0	2.5	11.5	88
0.31	2000	12.0	19.0**	5.0	12.0	79
1.3	2000	13.0	27.5**	10.5**	10.0	73
5.0	2000	14.0	63.5**	21.5**	9.5	63
Cochran-Armitage test		P<0.05	P<0.01	P<0.01	-	-
MMC	2000	48.5**	9.5	5.0	9.5	-

Fisher's exact test * P<0.05 ** P<0.01

[†]多核はひとつの細胞に3つ以上の核を有するもの

MMC: マイトマイシンC(0.01 μ g/ml)

表5 MWCNTの2段階細胞形質転換試験(イニシエーション試験、Balb3T3細胞)

Initiating treatment (μ g/ml)	Promoting treatment (μ g/ml)	Growth index (%)	Transformation			
			No. of dishes examined	No. of dishes with foci	Total no. of foci	Foci/dish
DMSO (0.5%)	DMSO (0.5%)	100	18	2	2	0.11
MWCNT 0.25	(0.5%)	88	18	2	2	0.11
0.5	(0.5%)	85	18	1	1	0.06
1	(0.5%)	78	18	3	3	0.17
2	(0.5%)	63	18	4	4	0.22
4	(0.5%)	42	18	3	4	0.22
MCA 0.1	(0.5%)	72	18	15	29	1.61
DMSO (0.5%)	TPA 0.1	100	18	3	4	0.22
MWCNT 0.25	0.1	91	18	5	6	0.33
0.5	0.1	83	18	5	7	0.39
1	0.1	76	18	8	11	0.61
2	0.1	67	18	16	21	1.17
4	0.1	54	18	13	15	0.83
MCA 0.2	0.1	46	18	18	97	5.39

DMSO: Dimethylsulfoxide
MCA: 3-Methylcholanthrene

MWCNT: Multi-wall carbon nanotube
TPA: 12-O-tetradecanoylphorbol -13-acetate

ナノマテリアルの経気道暴露による発がん性スクリーニングのための *in vivo* 系での
遺伝毒性試験による評価手法に関する研究

分担研究者	野口 忠	日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 微生物試験室 室長
協力研究者	片桐 卓	日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部 動物管理室 技術専門役
	上垣外 智之	日本バイオアッセイ研究センター 病理検査部 微生物試験室 室長補佐

研究要旨

カーボンナノチューブは、その形状がヒトに悪性中皮腫を発生させるアスベストと類似していることから安全性が危惧されている。また、アスベストにより発生したヒト悪性中皮腫にホモ接合性の欠失が認められる。現在開発されている *in vivo* 遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中で gpt delta 動物は欠失変異を評価できる点からも最も有効な試験系である。ナノマテリアルの *in vivo* 突然変異誘発性の評価方法を検討する目的で、gpt delta ラットに多層カーボンナノチューブ（MWCNT）を気管内投与し、肺における突然変異検出試験を実施した。試験はラットにMWCNTを1匹あたり 40 及び 160 μg の用量で気管内に単回または2週間間隔で4回投与した。さらに、Quartzを160 μg の用量で単回、アスベスト（Chrysotile）を1000 μg の用量で2週間間隔の4回投与した。単回投与の場合、初回投与後29日目及び90日、また4回投与の場合、初回投与後49日目及び90日後の肺重量は増加を示したが、gpt 突然変異及び Spi-欠失変異誘発性は認められなかった。難溶性のナノマテリアルの主要な標的臓器は肺であり、*in vivo* で肺における遺伝毒性を調べることはその毒性を評価する上で重要である。gpt delta 動物を用いる *in vivo* 突然変異試験の肺における評価方法の検討及び新に有効な試験系の開発が必要である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響として現在問題になっているのは、難溶解性の微細な粒子状物質であり、結晶性シリカ、酸化チタン、カーボンブラック、ディーゼル排出粒子等の発がん性が指摘されていることによる。さらに近年開発された工業性資材として有用性の高い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

いることから安全性が危惧されている。アスベストはヒトに悪性中皮腫を発生させ、組織のCDKN2A遺伝子部位にホモ接合性の欠失が認められている。¹⁾

化学物質の *in vivo* 変異原性の評価には、主にげっ歯類動物の骨髄を用い、染色体の構造又は分離の異常により生成する小核を指標とした小核試験が行われている。この試験は、難溶解

性の粒子状物質は投与臓器から血液中に取り込まれ骨髄に到達する可能性が低く有効ではなと思われる。

発がん物質のリスク評価を行うには、発がん試験に用いた動物種における標的臓器での突然変異誘発性を調べるのが重要である。

最近開発された大腸菌由来のレポーター遺伝子を組み込んだトランスジェニック動物が開発され、突然変異検出系としての有用性が示されてきた。導入されたレポーター遺伝子は、個体の全ての細胞に存在することから、全ての臓器において遺伝子突然変異を検出することが可能である。特に *gpt delta* ラットは、大腸菌 *gpt* 遺伝子をレポーターとする 6-TGセクションを用いる点突然変異と、ラムダーファージ *red/gam* 遺伝子をレポーターとする欠失変異の検出が可能なトランスジェニック動物で、遺伝子に欠失を誘発するような化学物質の遺伝子変異を検出するのに有効な試験系である。^{2) 3)}

ナノマテリアルの *in vivo* 突然変異誘発性の評価方法を検討する目的で、*gpt delta* ラットに多層カーボンナノチューブ (MWCNT)、結晶性シリカ微粒子 (Quartz) 及びアスベスト (Chrysotile) を気管内に投与し、肺における突然変異検出試験を実施し、ナノマテリアルに対する安全性評価における *gpt delta* ラットを用いる突然変異試験の有効性を検討した。

B. 研究方法

使用動物

日本エスエルシー株式会社から、5週齢の雄 *gpt delta* (F344) ラットを導入し、13週齢 (体重 276 ± 12 g) で投与した。飼育条件は、温湿度を $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、 $55 \pm 15\%$ で管理した飼育室で、飼料 (30 kGy γ 線照射滅菌CRF1固形飼料、オリエンタル酵母工業株式会社) 及び飲水 (秦野市水をフィルターろ過した後、紫外線照射滅菌) を自

由摂取させた。

被験物質

被験物質は、Nano Carbon Technologies 社の MWCNT (MWNT-7)、US Silica社の Quartz (MIN-U-SIL5) 及び Chrysotile (UICC Chrysotile A) を用いた。

被験物質懸濁液の調製方法

Tween80 を 0.1% 添加した PBS (Phosphate buffered saline) に、各設定濃度となる様、被験物質を加え超音波ホモジナイザー (VP-30S 型 TAITEC) を用いて懸濁した。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散した。

被験物質の投与方法

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またはゾンデを使用して、被験物質懸濁液を気管内に投与した。

投与用量

MWCNT は $40 \mu\text{g}/\text{匹}$ または $160 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、Quartz は $160 \mu\text{g}/\text{匹}$ または Chrysotile は $1000 \mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で、単回または 2 週間隔で 4 回投与した。対照群は被験物質の懸濁媒体として使用した PBS に Tween80 を 0.1% 添加したものを 1 匹当たり 0.3ml の投与容量で投与した。

試料採取方法

被験物質を単回投与の場合、初回投与 29 日または 90 日に、4 回投与の場合 49 日または 90 日目にペントバルビタールナトリウム麻酔下で後大動脈より放血屠殺し、開胸後、肺を摘出した。その後、直ちに -80°C で凍結した。

肺組織病理学検査

右肺下葉より作製した標本をヘマトキシリ

ン・エオジン染色し鏡検した。

突然変異分析方法

1) gpt 突然変異検出方法

各種臓器から、ゲノム DNA を抽出し (RecoverEase DNA Isolation Kit : Stradagene 社)、in vitro パッケージング (Transpack Packaging Extract : Stradagene 社) によりトランスジーンを入ファージとして回収した。

回収したファージを大腸菌 YG6020 に感染させ、gpt 領域に変異をもつ大腸菌を 6-Thioguanine の耐性変異コロニーを選択して点突然変異頻度を測定した。

2) Spi- 変異検出方法

1)と同様に、回収したファージを大腸菌 XL-1Blue MRA 及び XL-1BlueMRA (P2) に感染させ、Spi-セレクションにより欠失変異頻度を測定した。

(倫理面への配慮)

本研究は、日本バイオアッセイ研究センターの実験動物委員会に承認され、「動物実験に関する指針」に基づき実施した。

C. 研究結果

1) 体重変化

MWCNT、Quartz 及び Chrysotile 投与による体重増加抑制は認められなかった。

2) 肺重量変化

MWCNTの単回及び4回投与による肺重量は、用量相関関係を持って増加傾向が認められ、初回投与後 90日まで対照群と比べ有意な増加を示した。Quartz 及び Chrysotile 投与は、同様に初回投与後90日まで対照群と比べ有意な増加を示した。

3) 肺組織病理学検査

右肺下葉より作製した標本をヘマトキシリン・エオジン染色し、MWCNT 40 μ g、160 μ gを単回投与し、投与後29日及び90日のラットについて病理組織学検査を行った、ほぼ全例でMWCNTの沈着を伴う肺胞マクロファージの浸潤とII型肺胞上皮の増生が認められた。また160 μ gのMWCNTを投与したラットにおいては、投与後29日及び90日で、全例でMWCNTの沈着を伴う軽度の肉芽腫病変が認められた。

4) 肺突然変異頻度

MWCNTを1匹あたり 40 及び 160 μ g の用量で気管内に単回または2週間間隔で4回投与した。さらに、Quartz を160 μ gの用量で単回、アスベスト Chrysotile を1000 μ gの用量で2週間間隔の4回投与した。単回投与の場合、初回投与後29日目及び90日、また4回投与の場合、初回投与後49日目及び90日後の肺における gpt 突然変異及び Spi-欠失変異誘発性は認められなかった。

D. 考察

MWCNTを40及び160 μ g、またQuartzを160 μ gの用量で単回気管内に投与により、さらにMWCNTを40及び160 μ g、またアスベスト Chrysotile を1000 μ g の用量でgpt deltaラットに2週間隔の4回気管内投与した。初回投与後28日から90日の肺重量は有意な増加を示したが、gpt突然変異及びSpi-欠失変異誘の発性に変化は認められなかった。MWCNTを40及び160 μ gの用量で gpt delta ラットに単回気管内に投与し、投与後29日及び90日の肺で炎症性影響によるII型肺胞上皮細胞 (肺幹細胞) の増生が認められたことから突然変異の増加が想定されたが、突然変異の増加は認められていない。

さらに、我々が実施した動物の肺に腫瘍誘発性のある難溶性粒子状物質の亜硫化ニッケルを

gptラットに気管内投与した試験においても、肺の遺伝子突然変異の増加は認められていない。

Xuら(2009)は、C₆₀を gpt delta マウスの初代胚線維芽細胞に暴露し活性酸素種(ONOO⁻)の増加及び Spi-欠失変異の増加を示した。また、Totsukaら(2009)は、gpt delta マウスに C₆₀を気管内投与し、肺のDNA損傷及び gpt 突然変異の増加を示している。さらに Topinkaら(2004, 2006)は、アスベスト(amosite)及び人造鉱物線維(Rock wool, Glass wool)をBigBlue™ラットに気管内投与し、肺の*lacI*突然変異の増加を示している。

カーボンナノチューブ(CNT)の*in vitro*遺伝毒性に関しては、哺乳類培養細胞を用いる染色体異常試験において構造異常及び数的異常を誘発するとの報告はあるが、*in vitro*突然変異試験においてCNTが突然変異を誘発するとの報告はない。同様に、*in vivo*遺伝毒性試験に関しては、Shvedovaら(2008)のSWCNTをマウスに吸入暴露した肺のk-ras遺伝子に突然変異を誘発するとの報告のみである。

CNTの人への暴露経路は主に経気道によるものと推定されることから、肺に対する毒性影響を調べることは重要である。またCNTのアスベストとの構造類似性によりCNTの肺及び中皮発がん性が懸念されていることから、CNTの肺における突然変異誘発性を検討することは、そのリスクを評価する上からも重要である。今後、CNTの有効なトランスジェニック動物を用いる*in vivo*突然変異試験の試験プロトコールに関する研究、さらに有効な試験方法の開発が必要である。

E. 結論

ナノマテリアルの*in vivo*突然変異原性評価方法を検討する目的で、点突然変異及び欠失変

異の検出が可能なトランスジェニック動物である gpt delta ラットにMWCNTを気管内投与し、肺での突然変異誘発性を検討したが、その突然変異誘発性を認めることはできなかった。難溶性のナノマテリアルの主要な標的臓器は肺であるので、*in vivo*で肺における遺伝毒性を調べることはその毒性を評価する上で重要である。現在開発されている遺伝毒性を調べるトランスジェニック動物の中で gpt delta 動物は欠失変異を評価できる点からも最も有効な試験系である。さらに gpt delta 動物を用いる*in vivo*突然変異原試験の肺における評価方法の検討及び新に有効な試験系の開発が必要である。

参考文献

- 1) Illei PB, Rusch VW, Zakowski MF, Ladanyi M. Homozygous deletion of CDKN2A and codeletion of the methylthioadenosine phosphorylase gene in the majority of pleural mesotheliomas. *Clin Cancer Res*, 9:2108-2113. 2003.
- 2) Nohmi T, Katoh M, Suzuki H, Matsui M, Yamada M, Watanabe M, Suzuki M, Horiya N, Ueda O, Shibuya H, Ikeda H, Sofuni T. A new transgenic mouse mutagenesis test system using Spi- and 6-thioguanine selections. *Environ Mol Mutagenesis*, 28:465-470. 1993.
- 3) Hayashi H, Kondo H, Masumura K, Shindo Y, Nohmi T. Novel transgenic rat for *in vivo* genotoxicity assays using 6-thioguanine and Spi- selections. *Environ Mol Mutagenesis*, 28:465-470. 1993.

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

野口 忠、上垣外 智之、成見 香瑞範、高島
理恵、濱田 修一、真田 尚和、増村 健一、蓮
子 雅之、能美 健彦：gpt delta トランスジ
ェニックラットを用いた遺伝毒性試験の共同
研究 3) 亜硫化ニッケルの気管内投与による
遺伝毒性評価、2009年、第38回日本環境変異
原学会（2009年11月清水市）

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

図 1 試験結果 肺の gpt 突然変異頻度

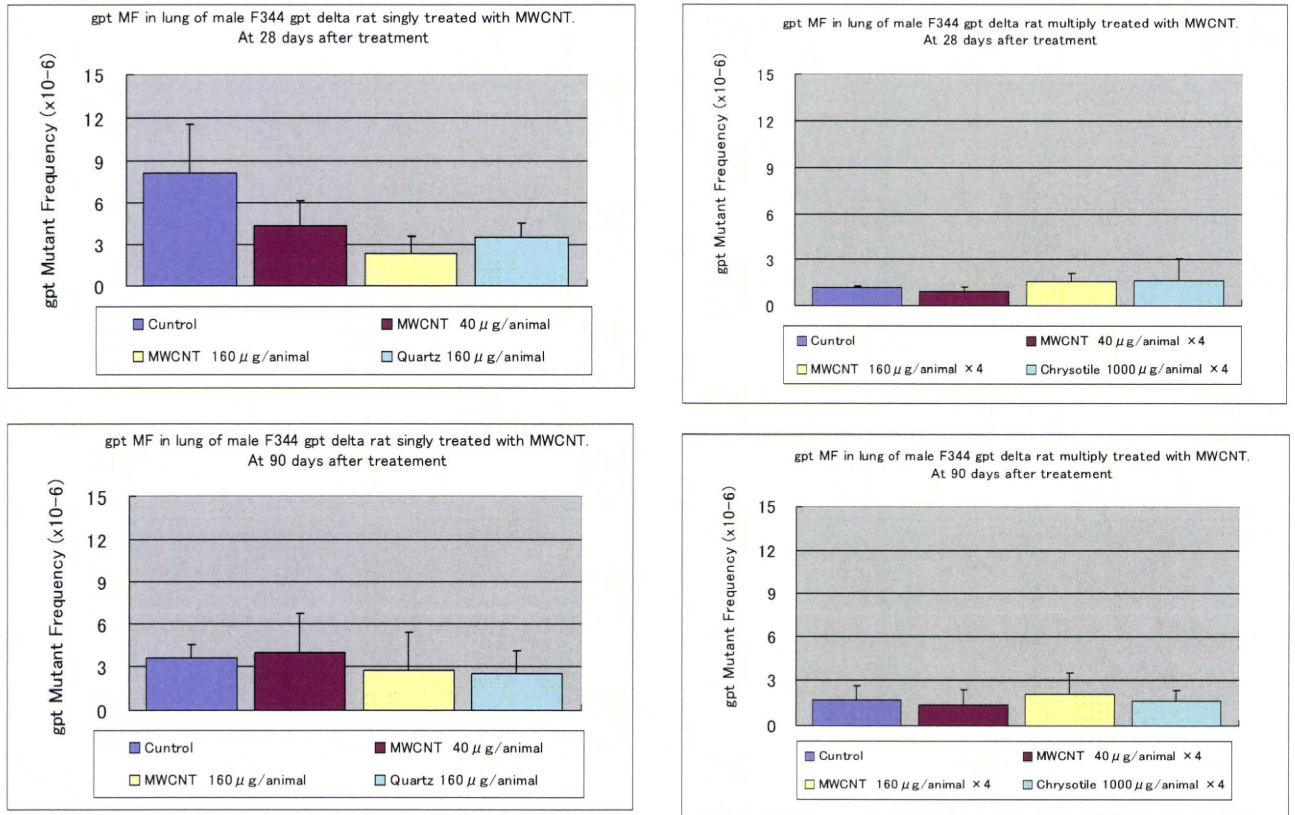
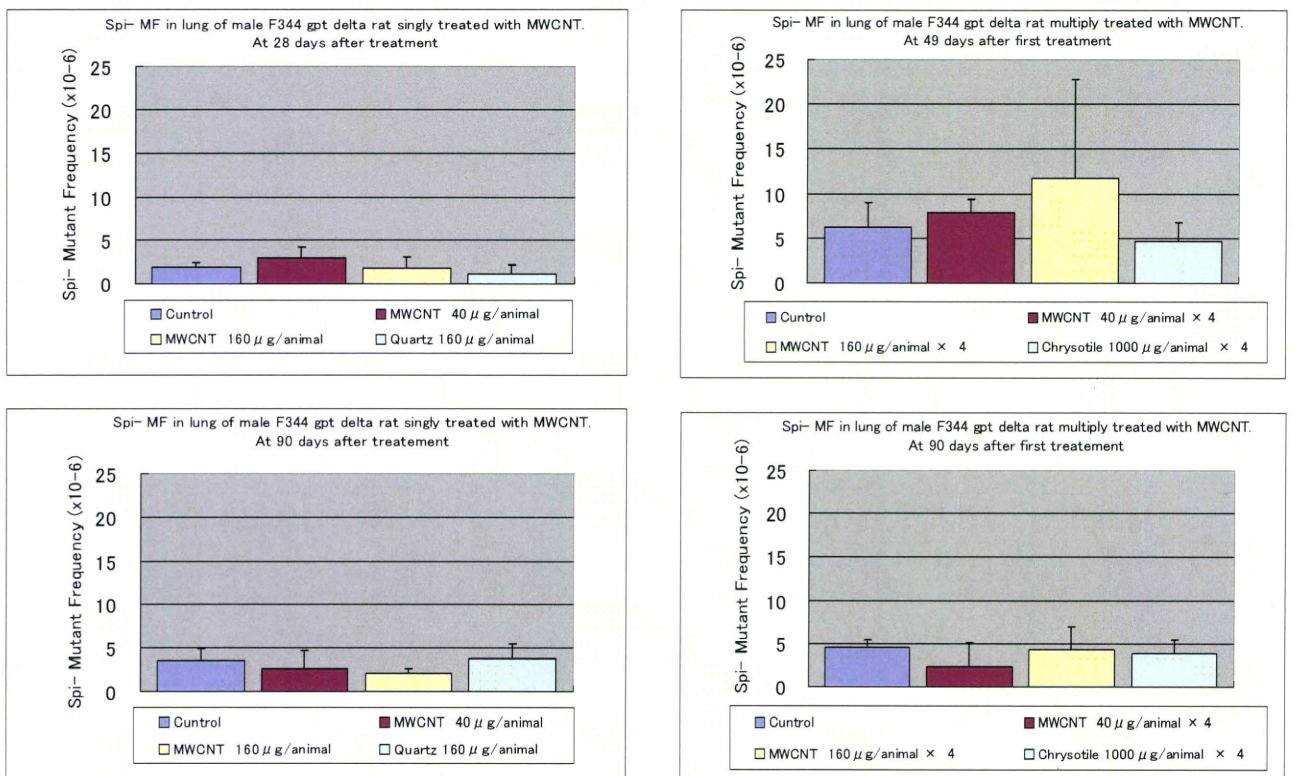


図 2 試験結果 肺の Spi- 欠失変異頻度



ナノマテリアルの吸入暴露情報に関する調査研究

研究分担者

(平成 20 年度) 平田睦子 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
総合評価研究室 主任研究官

(平成 21-22 年度) 山本雅也 国立医薬品食品衛生研究所 安全性生物試験研究センター
毒性部 主任研究官

研究要旨

フラーレン及びカーボンナノチューブ、酸化チタンのナノマテリアルの暴露及び吸入毒性に関する公開情報を、収集し、整理した。暴露情報に関しては、測定法の検討が進み、いくつかの労働現場の測定結果が得られた。毒性影響に関しては、従来に比べて長期の吸入暴露試験結果や、肺以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告された。本格的な暴露調査及び慢性影響や毒性メカニズム解明を意図した試験・研究が必要である。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは、その物理化学的性状が同一化学組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、電氣的、光学的、磁氣的、生物学的なその特異な性質から、様々な分野への応用が見込まれている。今後、多方面に利用が拡大し、生産、使用量が増加すると、生産現場のみならず、流通課程、商品等の廃棄により環境経由の暴露などヒト健康への影響が懸念される。しかし、その生体影響に関しては、未知な部分がほとんどある。産業用ナノマテリアルは、気中に拡散し、経気道的に容易に体内に侵入する可能性が高く、ヒトの健康への影響を評価するためには、実験動物にナノマテリアルを吸入暴露させ、その毒性影響を適切に評価する手法を確立することが必要である。そこで、本研究では、リスク評価法としての吸入暴露システムの開発のための適切な吸入暴露条件や毒性評価法等を提言することを目的として、暴露情報と吸入暴露を介した毒性影響に関する情報を収集し、整理した。

B. 研究方法

現時点では暴露情報は、労働現場に限定されているため、産業用ナノマテリアルの職業暴露情報に焦点

をあてて、その暴露情報及び気管内投与、咽頭吸引、吸入暴露による毒性発現に関する文献情報等の公開情報を収集し、整理した。文献検索には Medline を用い、特に 2004 年以降の最新情報に焦点をあてて検索を行った。酸化チタンについては、古くから多数の実験が行われているため、粒径がナノスケールのや、発がん性など重要な実験は適宜追加した。

(倫理面への配慮)

本研究は、公表情報を収集し、整理したものであり、倫理面での問題はない。

C. 研究結果

1. 暴露情報

1.1 フラーレン (Fullerene: C₆₀)

炭化水素-酸素混合物の燃焼により生成した煤から、混合フラーレン (C₆₀: 約 60%、C₇₀ 等: 約 25%) を抽出する工場で調査が行われ、走査型移動度粒径測定器 (Scanning Mobility Particle Sizer: SMPS) 及び光散乱式粒子計数器 (Optical Particle Counter: OPC) を用いて、粒子の個数/容積濃度を測定した結果、C₆₀ の攪拌過程や貯蔵タンクから C₆₀ を回収する作業の際に、1000 nm を超える粒子の容積濃度の増加が見られた。走査型電子顕微鏡により、両過程で得られ

た粒子の形態は類似しており、C₆₀の凝集体/塊であると考えられた(Fujitani *et al.* 2008)。

1.2 カーボンナノチューブ

単層カーボンナノチューブ (Single-walled Carbon Nanotube: SWCNT)を取り扱う4施設で、凝縮式粒子計数器及びOPCを用いてエアロゾルの計測を行った結果、SWCNTの回収、充填や移し替えの際に、粒子の個数/重量濃度の明確な増加は見られなかった。補修粒子中の鉄もしくはニッケル含量を基にSWCNT濃度を算出したところ、空气中濃度は最大で52.7 µg/m³となり、作業時のグローブへの付着量は片手につき0.22~6.0 mgとなった。走査型電子顕微鏡による捕集粒子の観察を行ったところ、HiPCO (High-Pressure Carbon Monoxide Process)法により生成されたSWCNTを取扱う施設では、100 µm~1mmの粒子は少なく、比較的オープンなナノローブ構造を示していた。一方、レーザー蒸発法で生成されたSWCNTを取扱う施設で捕集されたマイクロメートルサイズの粒子中には、ナノローブ構造が明確に観察された(Maynard *et al.* 2004)。

多層カーボンナノチューブ (Multi-walled Carbon Nanotube: MWCNT) 研究所のMWCNT合成施設、計量/噴霧 (spraying)施設及び混合施設において放出される粒子濃度をSMPS及び空力学的粒径測定器 (Aerodynamic Particle Sizer: APS)を用いて調査した結果、MWCNT混合作業を行う施設の総粒子濃度が、0.21~0.43 mg/m³と、最も高かった。エネルギー分散型X線分析装置を装着した走査透過型電子顕微鏡で観察した結果、個々のチューブ構造から凝集塊まで様々な形状のMWCNTが観察された。MWCNTを混和する施設では172.9~193.6 個/cm³のMWCNTが検出された。この施設で、エアロゾル粒子のリアルタイムモニタリングを行った結果、混合装置からのMWCNTの放出を示唆する結果が得られた(Han *et al.* 2008)。

Takayaらは、MWCNT製造工場の袋詰め作業における気中粒子をSMPSやOPCを使用し測定した。環境の質量濃度は、外気で0.17 mg/m³、手動工程と自動工程はいずれも0.24 mg/m³、作業者の曝露濃度は、手動工程が2.39/0.39 mg/m³ (粉じん/吸入性)、自

動が0.29/0.08 mg/m³ (粉じん/吸入性)であった。

また、捕集した粒子中のMWCNT量を、元素状/有機炭素モニター (EC/OC)を用いて測定したところ、屋外のバックグラウンド濃度は0.001 mg/m³、手動工程の袋詰め作業場近傍では、作業が無いときでも、環境濃度が0.01 mg/m³、曝露濃度が0.01 mg/m³であり、ともに一定量のMWCNTが観察された。手動工程の作業時では、環境濃度は0.068 mg/m³、作業者の曝露濃度は0.063 mg/m³であった。自動工程の作業では、作業者が普段立ち入らない自動製袋機が設置されている部屋の環境濃度が0.027 mg/m³で、個人曝露濃度は0.009 mg/m³と著しく低下していた(Takaya *et al.* 2010)。Leeらは、7つの製造工場などMWCNTを取り扱っている作業現場の暴露アセスメントを行った。空气中のエアロゾルをSMPS等で測定した結果、個人環境エリアと作業環境エリアでそれぞれ平均0.1063 mg/m³と0.0813 mg/m³であり、化学蒸着法によるMWCNTを製造している工場で採取した気体サンプルを、透過型電子顕微鏡(TEM)で解析したところ、MWCNTのチューブ構造が見られた (Lee *et al.* 2010)。

1.3 酸化チタン

米国において1976年から2000年に4つの酸化チタン生産工場の914の酸化チタン (TiO₂) ダストが分析され、空气中濃度は梱包・微粉工程従事者で最大で6.2 mg/m³であった(Fryzek *et al.* 2003)。欧州では、主に1990年代にフランス、イタリア、ノルウェー、イギリスなど7箇所のTiO₂生産工場のダスト中のTiO₂濃度が測定され、乾燥・梱包・混合などの各工程で、平均最大で5 mg/m³であった(Boffetta *et al.* 2004)。しかし、いずれも粒径など詳しい性状に関する情報は得られなかった。

最近、Huangらは、酸化チタン顔料生産工場、多穴式捕集装置 (Multi-orifice Uniform Deposit Impactors: MOUDI)により収拾したサンプルの粒径は、1-10 µmであり、呼吸域粒子濃度と粒子数が最大であったのは、TiO₂を梱包する場所近辺であった。金属分析の結果、TiO₂の空气中濃度は最大で0.1738 µg/m³であった(Huang *et al.* 2010)。

2. 吸入暴露による毒性影響に関する情報

2.1 フラーレン (Fullerene: C₆₀)

C₆₀を超純水に懸濁し、0.2~3.0 mg/kgの用量で、Cri:CD(SD) IGS BR ラットに気管内投与した結果、投与1日後に、気管支肺胞洗浄液 (BAL)中の好中球数/率の一過性の増加がみられたものの、肺の病理組織学所見に変化は見られなかった。水酸化フラーレン (C₆₀(OH)₂₄: C₆₀骨格の表面に24個のOH基)投与でも同様の結果であった(Sayes *et al.* 2007)。

Roursgaardらは、水酸化C₆₀ (C₆₀(OH)_{20±2})を生理食塩水に溶解させ、0.02~200 µg/animalの用量でBALB/cJマウスに気管内投与し、24時間後に、BAL中の好中球数及びマクロファージ炎症性タンパク (Macrophage Inflammatory Protein; MIP) -2が増加したことを示した(Roursgaard *et al.* 2008)。

Fujitaらは、加圧型ネブライザー及びミストドライヤーを暴露チャンバーにつなげた全身暴露システムを使用し、0.1 mg/mL Tween 80に分散させ、粉碎後、ジルコニウム粒子と共に懸濁させ、遠心分離した0.12 mg/m³のC₆₀(平均粒径: 96 nm)をWistarラットに4週間(6時間/日、5日/週)暴露した。暴露3日後にC₆₀粒子は肺胞上皮細胞に認められ、暴露3日及び1ヵ月後には、肺胞マクロファージによる飲食されたC₆₀粒子が観察された。肺の遺伝子発現解析では、炎症反応、酸化ストレスやアポトーシスに関連する遺伝子の変化はほとんど見られず、主要組織適合複合体を介した免疫反応に関連した遺伝子の発現の上昇がみられた(Fujita *et al.* 2009)。

Bakerらは、中央粒径55 nm(計数モード)のナノ粒子と中央粒径0.93 µm(重量モード)の微小粒子からなるエアロゾル(2.22~2.35 mg C₆₀/m³)をF344ラットに10日間(3時間/日)鼻部暴露させ、その影響を調べた。両暴露群共に、暴露期間中に観察された明確な変化は鼻汁及び眼漏のみで、肺の病理組織学所見に変化は見られなかった。暴露期間終了後の肺のC₆₀含量をHPLCで分析の結果、ナノ粒子暴露群は78.89 µg/lung、微小粒子暴露群は55.86 µg/lungで、ナノ粒子の方が肺に沈着しやすく、半減期はそれぞれの26日及び29日と算出された(Baker *et al.* 2008)。

Morimotoらは、C₆₀(平均粒径: 33 nm)を0.1%Tween 80含有蒸留水に懸濁し、0.1, 0.2, 1.0 mg/kgの用量で、

雄Wistarラットに気管内投与し、投与3日後、1, 3, 6ヶ月後の気管支肺胞洗浄液 (BAL)中の炎症反応やサイトカインの遺伝子発現を検討した。その結果、1.0 mg/kg気管内投与群のみ好中球の一過性の増加と肺でのCINC-1, -2αβ, 3の発現がみられたが、肺の病理組織学所見に変化は見られなかった。また、Wistarラットに0.12 mg/m³のC₆₀(平均粒径: 96 nm)を4週間(6時間/日、5日/週)吸入暴露させ、3日後、1, 3, 6ヶ月後について同様の検討を行ったものでは、いずれも変化はみられなかった (Morimoto *et al.* 2010)。

Parkらは、C₆₀(平均粒径: 46.7 nm)をリン酸緩衝生理食塩水(Phosphate Buffered Saline: PBS)に懸濁し、雄ICRマウスに0.5, 1, 2 mg/kgの用量で気管内投与し、1, 7, 14, 28日後のBAL内の細胞周期、サイトカイン濃度、及び血液の免疫検査などを行った。C₆₀は、BAL細胞のG1休止を増加させ、IL-1, TNF-α, IL-6などの炎症性サイトカインや、IL-12, IFN-γなどのTh1サイトカインを増加させた。また、血清中のIgE増加やMHC class II分子の発現やT細胞の分布の増加見られた (Park *et al.* 2009)。

Naotaらは、C₆₀(粒径: 0.68 nm)をPBSに懸濁し、雌ICRマウスに625, 1000 µg気管内投与し、肺から血液循環系の移行経路を検討した。C₆₀は、光学顕微鏡で投与直後に肺毛細管腔及び肺リンパ節に見られた。電子顕微鏡では、I型肺胞上皮細胞と内皮細胞内に様々なサイズの飲小胞の数の増加が認められ、その中にはC₆₀を含有したものも見られた。また、様々なサイズのC₆₀が血液-空気関門に見られた (Naota *et al.* 2009)。

2.2 カーボンナノチューブ

単層カーボンナノチューブ (SWCNT)

Shvedovaらは、SWCNT(10~40 µg/animal)をPBSに懸濁させ、C57BL/6マウスに咽頭吸引させた。BAL検査では、投与1日後にはTNF-α及びIL-1βの顕著な増加を伴う好中球の蓄積が観察され、その後、TGF-β1やリンパ球及びマクロファージの増加が認められた。さらに、タンパク含量、LDH及びGGTの用量依存的な増加がみられ、4-hydroxy-2-nonenalの蓄積やGSHの枯渇も認められた。肺の病理組織学

検査では、投与7日後より、SWCNT凝集体の周囲の肉芽腫性炎症病巣と、SWCNTの凝集体から離れた部位では、主に肺胞壁の肥厚を伴うびまん性間質性線維症が認められた。SWCNT投与による肺機能への影響を調べたところ、持続的な呼吸時間の増加や肺からの細菌排除能の低下が認められた(Shvedova *et al.* 2005)。

CDF(F344)/CrIBR ラットに2 mg/kgのSWCNT(粉碎後、0.1%Pluronic F-68含有PBSに懸濁)を咽頭吸引させ、投与1及び21日後にBAL検査及び病理組織学検査を行った結果、明確な炎症反応は認められなかったが、投与21日後には、肺に炭素様物質を含むマクロファージの塊が観察され、肺胞領域ではその周囲に小さな間質性線維性病巣が散在していた。線維性病変形成部位には、細胞増殖活性の増加が認められた。肺の様々な前線維化成長因子及びプロコラーゲンの遺伝子発現を調べた結果、投与1日後に血小板由来成長因子の増加が見られたが、投与21日後には変化はなかった(Mangum *et al.* 2006)。

Mercerらは、SWCNTを蒸留水に懸濁させ、10分間超音波処理を行った後、アセトンで希釈し、さらに、24時間超音波浴に分散させたSWCNTと、分散させていないものを用いて、肺組織への影響を比較した。PBSに懸濁後、10 µg/animalの用量でC57BL/6マウスにそれぞれ咽頭吸引させた結果、分散させないSWCNT投与群の肺組織片には直径2~20 µmの大きな凝集体が観察され、これらの大きな凝集体への肺の反応として、類上皮マクロファージによる浸潤、取り込みや結合組織を豊富に含む肉芽腫性炎症が観察された。一方、分散させたSWCNT投与群では、凝集体の沈着はほとんどみられず、肉芽腫様変化も見られなかった。両者共に肺胞壁にコラーゲンの蓄積を引き起こしたが、この変化は分散させたSWCNT投与群でより顕著であった。また、分散させないSWCNT投与群ではSWCNT凝集体の周辺にコラーゲンの蓄積が見られたのに対し、分散したSWCNT投与群ではこの変化は肺全体の肺胞壁内に広範に観察された。金コロイドもしくは蛍光性量子ドットで標識した両者のSWCNTを同様の方法でC57BL/6マウスに咽頭吸引させ、肺内分布を調べた

結果、分散させないSWCNT投与群では、特に近位肺胞領域に大きな凝集体が見られ、さらに、より小さなナノチューブ構造が間質内に観察された。分散させたSWCNT投与群ではより微細な、そしてびまん性の分布パターンが観察され、多くが肺胞間質スペースに取りこまれていることが明らかになった(Mercer *et al.* 2008)。

Shvedovaらは、SWCNTの吸入暴露試験を実施し、咽頭吸引による影響との比較を行っている。0.7%PBSに懸濁させたSWCNT(5~20 µg/animal)をC57BL/6マウスに咽頭吸引で与えたところ、エアロゾル[5.52 mg SWCNT/m³; 粒径: 約4.2 µm(重量モード), 約240 nm(計数モード)]をC57BL/6マウスに4日間(5時間/日)全身暴露群でより顕著な影響[炎症反応、細気管支上皮細胞肥大、肉芽腫性炎症病巣、線維症など]が認められた。肺のK-Ras遺伝子への影響については、吸入暴露群において変異の増加が認められた(Shvedova *et al.* 2008)。

Chouらは、SWCNTをICRマウスに、0.5 mg/animalの用量で、気管内投与し、投与3, 14日後の肺の組織学的検査を行った。投与3日後には、マクロファージの浸潤の増加、肺胞領域のSWCNTを取り込んだ泡状マクロファージ形成が見られた。投与14日後には、多病巣性肉芽腫形成が見られた(Chou *et al.* 2008)。

Teeguardenらは、C57BL/6マウスに40 µgのSWCNTとアスベスト(クロシドライト)をカルシウム・マグネシウム不含PBSに懸濁後、週2回、3週間、咽頭吸入し、プロテオミックス、組織学的検査及びBAL中のサイトカインの解析を行い、両者を比較した。プロテオミックス解析では、SWCNT暴露とアスベスト暴露による肺組織や炎症に対する反応は似ていたが、炎症と繊維化の頻度と強さなど組織学的検査では、SWCNT暴露が同質量濃度では作用が大きかった(Teeguarden *et al.* 2010)。

Liらは、SWCNT暴露による心血管系への影響について検討するため、*Ho1-luc* レポータートランスジェニックマウス(FVB/N-TgN(*Ho1-luc*) Xenマウス)にSWCNT(10~40 µg/mouse)を単回咽頭吸引させた、7日後に、大動脈、心臓及び肺のヘムオキシゲナーゼ-1活性の一過的な増加をみいだした。ApoE⁺トラ

ンスジェニックマウス (B6.129P2-Apoe^{tm1Unc} マウス) を用いた研究では、SWCNT (20 µg/mouse を 1 週間おきに 4 回咽頭吸引)が高脂肪食誘発性のアテローム斑の形成を促進させた(Li *et al.* 2007b)。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

Sprague Dawley (SD) ラットに MWCNT 及びボールミルで粉碎した MWCNT (ground MWCNT) を、1% の Tween80 を含む生理食塩水に懸濁させ、0.5~50 mg/animal の用量で気管内投与した結果、MWCNT 投与群では気管内に凝集体が局在するのに対し、ground CNT は肺組織に広く分布しているのが確認された。MWCNT 中に含まれるコバルトを指標に、肺内残留量を調べたところ、ground MWCNT と比較して MWCNT の排出速度が著しく遅かった。

MWCNT 及び ground MWCNT 共に肺の炎症性及び線維性反応を引き起こしたが、MWCNT 投与群ではコラーゲン豊富な肉芽腫が部分的もしくは完全に気管支を塞いだのに対し、ground MWCNT は肺実質組織に良く分散しており、間質組織に肉芽腫を引き起こした(Muller *et al.* 2005)。

Mitchell らは、C57BL/6 マウスに 0.3~5 mg/m³ の濃度の MWCNT [中央粒径: 0.7~1.8 µm (重量モード), 平均粒径: 350~400 nm (計数モード)] を 7, 14 日間 (6 時間/日) 全身暴露させたが、肺の炎症や組織損傷は認められなかった。脾臓から調整した細胞を用いて、全身性免疫機能への影響を調べた結果、T 細胞依存性抗原反応の抑制、分裂促進剤存在下での T 細胞増殖能の低下及び NK 細胞による Yac-1 標的細胞溶解の抑制が認められた(Mitchell *et al.* 2007)。さらに免疫抑制のメカニズムを検討したところ、1.0 mg/m³ の MWCNT 暴露の脾臓では、シクロオキシゲナーゼ活性が上昇していた。シクロオキシゲナーゼ阻害剤イブプロフェンを飲ませたマウスでは、MWCNT 暴露による免疫機能の抑制は、部分的に回復した。また、シクロオキシゲナーゼ Cox-2 のノックアウトマウスでは、MWCNT を暴露しても免疫抑制は見られなかった。暴露動物の BAL 由来のタンパク質を添加すると、無処置動物の脾臓細胞の抗体産生や T 細胞増殖が抑制されたが、Cox-2 ノックアウトマウスに MWCNT を暴露した動物の BAL 由来のものでは抑

制されなかった。暴露動物の BAL 由来のタンパク質による脾臓細胞の免疫細胞の抑制は、抗 TGF-β 抗体で阻害された。また MWCNT 暴露により BAL 中の TGF-β 濃度が上昇した。無処置の脾臓細胞を BAL 由来のタンパク質で 24 時間処理すると TGF-β 処理と同様に、プロスタグランジン E2 や IL-10 が浮遊細胞液中に分泌され、その分泌は抗 TGF-β 抗体で阻害された。これらの結果から、MWCNT 暴露により肺から分泌された TGF-β が、脾臓のシクロオキシゲナーゼ系を活性化することにより、プロスタグランジンや IL-10 の産生を引き起こし、T 細胞不全や全身の免疫機能に影響を与えたことが示唆された (Mitchell *et al.* 2009)。

Li らは、MWCNT の吸入暴露試験及び気管内投与試験を行い、その結果を比較した。吸入暴露試験では、チャンバー内の平均 MWCNT 濃度は 32.61 mg/m³ であり、8, 16 及び 24 日目の肺内沈着量はそれぞれ 0.07, 0.14 及び 0.21 mg/animal と算出された。Kunming マウスを 24 日間 (90 分暴露を 4 回/日、4~5 日/週、計 15 日間暴露) 全身暴露させた結果、気管支内壁には MWCNT 凝集塊の付着が認められたが、その周囲に炎症性細胞は観察されなかった。肺胞内ではより小さな凝集塊がみられ、その周囲では肺胞壁の増殖や肥厚化などが認められたが、これらの病変は軽度であり、一般的な肺胞の網状構造は保たれていた。一方、0.05 mg/animal の MWCNT (1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁) を気管内投与した Kunming マウスでは、24 日後には、気管支内壁の炎症が観察され、肺胞では網状構造の顕著な崩壊がみられた (Li *et al.* 2007a)。

Elgrabli らは、ウシ血清アルブミンを用いて分散させた MWCNT (1, 10, 100 µg/animal, 凝集体の 80% が 10 µm 未満) を SD ラットに気管内投与し、肺への影響を検討した結果、肺胞マクロファージのアポトーシスが観察されたが、肺の機能や病理組織学所見に変化は見られなかった(Elgrabli *et al.* 2008a)。

Nemmar らは、Swiss マウスに 200 もしくは 400 µg/animal の MWCNT (粉碎したものを 0.1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁し、気管内投与したところ、抹消の血栓形成性が用量依存的に高まったことを報

告した。その後の研究から、MWCNTの作用には血小板と組織因子を含むP-セレクチン依存性のメカニズムの関与が示唆された(Nemmar *et al.* 2007)。

Carrero Sanchezらは、竹状構造を示すことが知られている nitrogen doped MWCNT (CNx MWCNT: 一部の炭素原子を窒素に置き換えた MWCNT)を対象とした試験を実施し、炭素原子のみからなる MWCNT との比較を行った。CNx MWCNT 及び MWCNT (1~5 mg/kg)をPBSに懸濁させ、近交系 CD-1 マウスに気管内投与した結果、MWCNT 投与群では呼吸困難を伴う用量依存的な死亡が認められたが、CNx MWCNT 投与群ではこのような変化は観察されなかった。両投与群共に、肺に肉芽腫性炎症反応が認められたが、その変化は MWCNT 投与群でより顕著であった(Carrero-Sanchez *et al.* 2006)。

最近、MWCNTの比較的長期(三ヶ月)の吸入暴露試験が2報報告されている。Ma-Hockらは、GLP遵守の OECD テストガイドライン 413 に従い、Wistar ラットにエアロゾルの MWCNT (0.1, 0.5, 2.5 mg/m³) を6時間/日、5日/週、13週(65日間)頭-鼻部吸入暴露した。0.5, 2.5 mg/m³では、濃度依存的に肺の臓器重量の増加、肺及び肺関連リンパ節で多病巣性肉芽性炎、びまん性組織球・好中球炎症、肺胞内リポ蛋白化みられた。2.5 mg/m³では、わずかな血液の好中球増加を伴っていた。0.1 mg/m³では、肺及び肺関連リンパ節でわずかな肉芽性炎がみられた

((Ma-Hock *et al.* 2009b))。Pauluhn らは Wistar ラットに MWCNT (0.1, 0.4, 1.5, 6 mg/m³)を6時間/日、5日/週、13週鼻部吸入暴露し、BAL 検査と病理組織学的検査を投与後6ヶ月後まで行い、気管支及び全身毒性、肺及び肺リンパ節での MWCNT のキネティックを検討した。MWCNT のリンパ節への移動には 1.5 mg/m³以上の濃度で13週を要し、肺及びリンパ節重量が増加した。0.4 mg/m³以上の MWCNT 暴露では、BAL 中の多形核好中球及び可溶性コラーゲンの増加、病理組織学的検査では、気道に杯状細胞過形成・化生、好酸性杯状細胞、下気道の細気管支-肺胞に炎症変化及びコラーゲン陽性間質の増加などが見られた。6 mg/m³の MWCNT 暴露では肉芽腫形成及び継時的な細気管支-肺胞増生がみられた。

NOAEL は 0.1 mg/m³としている(Pauluhn 2010)。

Ryman-Rasmussen らは、吸入暴露による胸膜繊維化と中皮腫の可能性を検討するため、雄 C57BL6 マウス MWCNT (30 mg/m³)を単回6時間鼻部吸入暴露し、1日、2, 6, 14 週後の肺の組織を観察した。MWCNT は暴露1日後に胸膜下壁に到達し、胸膜下マクロファージ内に存在した。胸膜表面の単核球細胞の凝集塊の数とサイズの増加が暴露1日後にみられ、病巣の中にはナノチューブを取り込んだマクロファージがみられた。胸膜下の繊維化の顕著な増加が暴露2週後と6週後に見られた(Ryman-Rasmussen *et al.* 2009)。

Porter らは C57BL/6J マウスに MWCNT (10, 20, 40 µg)を咽頭吸引した。1, 7, 28, 56 日後の肺への影響を検討した。BAL 中のマーカーの解析により、肺の炎症と損傷は濃度依存的であり、投与7日がピークであることが示された。投与56日までに、最高用量を除いて肺の炎症と損傷は対照群と同様のレベルまで回復した。病理組織学的検査では、MWCNT は投与7日までに肺の繊維化を引き起こし、持続的な肉芽性炎が投与56日までみられた。また、MWCNT は胸膜に到達することが示された(Porter *et al.* 2010)。

Mercer らは、上記の試験について、暴露した MWCNT の分布を検討し、投与1日後、気道、肺胞、胸膜下で、18%、81.4%、0.6%であった。胸膜下組織及び胸膜内へ到達した MWCNT の繊維の数は、投与7日には、投与1日後に比べ肺胞マクロファージやリンパ球による除去のためか減少するが、投与28日から56日後では、増加し定常状態になった(Mercer *et al.* 2010)。

Ellinger-Ziegelbauer らは、Wistar ラットに MWCNT (11, 241 mg/m³)を6時間単回吸入暴露し、3ヶ月後まで BAL 検査と肺の病理組織学的検査、負荷試験及び遺伝子発現解析を行った。肺の炎症は濃度依存的で、時間経過とともに減少した。逆に、陽性対照として暴露したクオーツでは、炎症は時間経過とともに増悪した。MWCNT による炎症の時間経過は、不純物として含有するコバルトの量に寄らなかった(Ellinger-Ziegelbauer & Pauluhn 2009)。

Kobayashi らは、SD ラットに MWCNT (0.04, 0.2, 1

mg/kg)を気管内投与し、3日、1週、1,3,6ヶ月後のBAL検査と肺、肝臓、腎臓、脾臓、大脳の病理組織学的検査を行った。1 mg/kg 投与群のみで肺の一時的な炎症が見られた。肺に沈着したMWCNTは、肺胞マクロファージに貪食され、暴露6ヶ月後までにマクロファージは気泡に集積した。TEM解析によるとMWCNTは肺胞マクロファージと間質のマクロファージ内に存在し、間質組織には存在しなかった。また、血管新生や繊維化などは見られなかった(Kobayashi *et al.* 2010)。

Kimらは、雄C57BL/Cマウスに気管支内投与で無処理のMWCNTと酸処理したMWCNTそれぞれ(0.01, 0.1 mg/animal)を生理食塩水に懸濁後、気管支内投与し、24時間後、1,2週間後、3,4ヶ月後に解剖した。BAL検査では、無処理のMWCNTが酸処理したものに比べ、より強い急性炎症細胞の集積を誘導した。肺の病理組織学検査では、濃度依存的な多病巣炎症肉芽腫がみられたが可逆的であり、酸処理MWCNTによる肉芽腫は無処理MWCNTによるものに比べて、早く回復した。時間経過と共に、肉芽腫の領域は減少したが、過形成や有糸分裂像、核大小不同、赤血球大小不同のような形成異常が依然見られた(Kim *et al.* 2010)。

Aisoらは、雄F344ラットにMWCNT(40, 160 mg)をPBS-Tween 80に懸濁後、気管支内投与し、1,7,28,91日後に解剖し、BAL検査及び肺の病理組織学検査を行った。肺重量、BAL中の総蛋白、アルブミン、乳酸脱水素酵素、アルカリホスファターゼ、炎症に伴う肺病変、II型肺胞上皮細胞増生、小肉芽腫、繊維化が時間及び濃度依存的に見られ、MWCNTによる肺病変は投与91日後も保持された。貪食及びフリーのMWCNTは細気管及び肺胞に存在した。気管支のリンパ節中へのMWCNT沈着は投与後徐々に増加した。持続したマクロファージの浸潤、主に好中球による細胞炎症の浸潤、MWCNTを貪食マクロファージに関連した小肉芽腫、肺胞肥厚を伴う肺胞II型肺胞上皮細胞増生と繊維化、多核肺胞マクロファージの数が濃度依存的に上昇した(Aiso *et al.* 2010)。

Hanらは、雌C57BL/6マウスにMWCNT(20, 40 mg)をPBSに懸濁後、気管支内投与し、1,7日後に解剖し、BAL、血液及び肺組織について炎症と酸化

的ストレスマーカーの検討を行った。投与1,7日後のBAL中の総細胞数と多形核白血球数の増加が見られた。投与1日後では顕著な増加を見せた多くの炎症マーカーが、投与7日後には対照群と同じレベルに減少したが、MUC-5acムチンとSurfactant protein-D(SP-D)は、増加がしたままであった。また、尿中の8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシンのレベルは上昇しており、全身性の酸化的ストレスが示唆された。ウェスタン分析では、細胞外スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)は減少していたが、銅/亜鉛及びマンガンのSODは変化しなかった(Han *et al.* 2010)。

Elgrabliらは、MWCNT中に含まれるニッケルを指標に、MWCNTの体内動態を調べた。雄SDラットにウシ血清アルブミンを用いて分散させたMWCNT(1, 10, 100 µg/animal, 凝集体の80%が10 µm未満)を気管内投与した結果、MWCNTは顕著に肺領域(pulmonary barrier)を超えず、肺内に留まり、数は減るが6ヶ月後には残存が確認された。その時、MWCNTは化学的修飾を受け、短くなっていた。また、その際、周囲に炎症性細胞は観察されなかった(Elgrabli *et al.* 2008b)。

2.3 酸化チタン(TiO₂)

雌NMRIマウスと雌Wistarラットを用い、P25 ultrafine TiO₂(21 nm)を平均10 mg/m³で2年間[7.2 mg/m³で4ヶ月、14.8 mg/m³で4ヶ月、9.4 mg/m³で5.5ヶ月(マウス)、16ヶ月(ラット)]吸入暴露した後、9.5ヶ月(マウス)、6ヶ月(ラット)クリーンな空気で飼育した。実験終了時、マウスでは肺ガン発生率に曝露の影響は特に認められなかった。ラットでは、曝露により死亡率が上昇し、肺胞クリアランスが低下した。また、30ヶ月後の肺ガンは曝露群で32/100、対照群で1/217であった(Heinrich *et al.* 1995)。Leeらは、雌雄CDラットにpigment grade TiO₂(粒径不明[rutile型])を10, 50, 250 mg/m³のエアロゾルを2年間(6時間/日、5日/週)全身吸入暴露実験した(Lee *et al.* 1985a; Lee *et al.* 1985b; Lee *et al.* 1986)。それについて、Warheitらが扁平上皮癌について再評価を行い、最高用量で、気管支肺胞腺腫(12/77雄、13/74雌)、扁平上

皮癌 (1/77 雄、13/74 雌) とした(Warheit & Frame 2006)。また、Pott らは、雌 Wister ラットに P25 TiO₂ (25 nm) もしくは TiO₂ (200 nm) を 3 または 6 mg/animal の用量で 7 日間連続気管内投与した結果、腺腫、上皮腫、腺癌、扁平上皮癌の増加に統計的優位差があると報告した(Pott & M. 2005)。以上を根拠に、WHO 国際がん研究機関 (International Agency for Research on Cancer : IARC) は、酸化チタンについて、疫学データからは発がん性の根拠は不十分だが、吸入及び気管支内投与の動物実験の結果から動物で発がん性の根拠に十分であるとして、酸化チタンの IARC 分類を従来の Group 3 (発がん性物質と判断不可能な物質) から、2006 年に Group 2B (発がん性を有する可能性のある物質) に変更した(Baan *et al.* 2006)。

Ferin らは、Fisher 344 ラットに ultrafine TiO₂ (21 nm[anatase 型]) または fine TiO₂ (250 nm[anatase 型]) のエアロゾルを 23 mg/m³ の用量で 12 週間全身曝露し、64 週後の肺への影響を検討した。ultrafine TiO₂ は、肺胞間隙に分布し、BAL 中の好中球数が増加した。クリアランスは、ultrafine TiO₂ で、半減期 501 日、fine の TiO₂ で、半減期 174 日であった(Ferin *et al.* 1992)。

Bermudez らは(Bermudez *et al.* 2004)、F344 ラット、雌 B3C3F1/CrIBR マウス、Lak: LVG (SYR) BR ハムスターに ultrafine TiO₂ (21 nm) のエアロゾル [粒径 1.37 μm] を 0.5, 2.0, 10 mg/m³ の用量で 13 週間 (6 時間/日、5 日/週) 全身吸入曝露し、その後最大 52 週飼育し、肺への影響の種差を検討した。肺の炎症は、ラットで強く起こり、マウスがそれに次いだが、ハムスターでは起こらなかった。TiO₂ の肺でのクリアランスは、最高用量の 10 mg/m³ でラット及びマウスで著しく低かったが、ハムスターでは影響を受けなかった。別の実験で、fine TiO₂ (1.4 μm) のエアロゾル [粒径 1.37 μm] を 10, 50, 250 mg/m³ の用量で全身吸入曝露した実験でも、同様に感受性はラット>マウス>ハムスターの順であった (Bermudez *et al.* 2002)。

Ma-Hock らは、雄 Wistar ラットに TiO₂(rutile:14%、anatase:86%、直径 25.1 nm) のエアロゾルを 2, 10, 50

mg/m³ の濃度で、6 時間/日、5 日間曝露し、曝露 0 日、3 日及び 16 日後に解剖した。50 mg/m³ 曝露群で肺重量の増加がみられた。肺の炎症に伴って、BAL 中の総細胞数、好中球数、総蛋白量、酵素活性及び炎症マーカーの発現の上昇みられた。全ての TiO₂ 曝露群で、気管支における 5-ブromo-2'-デオキシウリジンの取り込みによる細胞複製は増加していた (Ma-Hock *et al.* 2009a)。

Grassian らは、C57Bl/6 マウスに 3.5 nm[anatase 型] の TiO₂ を 8.88 mg/m³ のエアロゾルで単回 4 時間全身曝露または 10 日間 反復(4 時間/日) 全身吸入曝露し、BAL 中の炎症マーカーや肺の組織学的検査を行った。単回曝露の高用量と反復曝露で BAL 中のマクロファージ数が増加したが、肺の病理組織学所見や LDH には変化は見られなかった。反復曝露のマクロファージ数は、曝露 2 週後まで増加したが、曝露 3 週では差はなかった(Grassian *et al.* 2007b)。また、別の実験では、C57Bl/6 マウスに 5 nm[anatase 型] 及び 21 nm [anatase/rutile 混合型] の TiO₂ (0.7, 70 mg/m³) のエアロゾルを 4 時間全身曝露した結果、4 時間後の BAL 中の細胞数が 5 nm の高用量、21 nm のすべての用量で、肺胞マクロファージ数が 5 nm と 21 nm の高用量で増加したが、LDH や肺の病理組織学検査では、変化は見られなかった。曝露に用いたエアロゾルの粒径は、119-153 nm の範囲で、径の大きい 21 nm の TiO₂ は 5 nm に比べ、スペースをもって弱く凝集していた (Grassian *et al.* 2007a)。

雄 Wister ラットに ultrafine TiO₂ (29 nm) もしくは fine TiO₂ (250 nm) を 125 及び 500 μg/animal の用量で無菌食塩水に懸濁後、気管内投与した結果、24 時間後に、いずれの TiO₂ 投与でも肺胞マクロファージの貪食能が阻害された。また、ultrafine TiO₂ 投与で気管支肺胞洗浄液 (BAL) 中の好中球の遊走、LDH、GGT、走化因子 C5a へのマクロファージの遊走能が、増加した(Renwick *et al.* 2004)。

Warheit らは、球状 TiO₂ (~10 nm [anatase 型])、円柱状 TiO₂ (200 nm x 35 nm [anatase 型]) もしくは fine TiO₂ (~300 nm [rutile 型]) を PBS に懸濁し、1 及び 5 mg/animal の用量で雄 Fisher 344 ラットに気管内投与し、1 日、1 週間、1 ヶ月または 3 ヶ月後の

BAL 中の炎症マーカーや肺の組織学的検査を行った。球状ナノスケール TiO₂、円柱状ナノスケール TiO₂ ともに 24 時間後に一時的な炎症と細胞障害を引き起こしたが、fine TiO₂ と差異は認められなかった。粒子径や粒子の表面積でなく、粒子表面の性質や結晶構造が毒性に重要な結果えられた。(Warheit *et al.* 2006)。また、ultrafine-1 (～136 nm [粒子表面アルミナコート、rutile 型])、ultrafine-2 (～149.4 nm [粒子表面シリカ・アルミナコート、rutile 型])、ultrafine (P25) (～129 nm [80%: anatase 型、20%: rutile 型])、fine (R-100) (～382 nm [rutile 型]) の TiO₂ を用いた同様の実験では、ultrafine (P25) TiO₂ でのみ、BAL 中の炎症マーカーの上昇及び好中球の浸潤を伴う肺の炎症が認められた。ultrafine の TiO₂ でも粒子の表面の組成や結晶構造により肺への毒性は異なることが示された(Warheit *et al.* 2007)。

上記の Warheit の実験では、PBS の懸濁中の TiO₂ の凝集塊が 2 μm 以上であるのに対し、Sager らは気管内投与の際、粒子を分散させるため無処置の BAL 中に懸濁する方法を用いた。電子顕微鏡で懸濁液中の TiO₂ の凝集塊を測定したところ、ultrafine TiO₂ で 200-300 nm、fine TiO₂ で 1 μm であった。ultrafine TiO₂ (21 nm [80%: anatase 型、20%: rutile 型]) もしくは fine TiO₂ (250 nm [rutile 型]) を BAL 中に懸濁し、それぞれ 0.02, 0.52, 1.04 mg/animal (0.0313, 0.0625, 0.125 粒子表面積 cm²/肺胞表面表面積 cm²) の用量で雄 Fisher 344 ラットに気管内投与し、1、7 及び 42 日後の炎症マーカー、肺障害、マクロファージ活性を検討した。炎症や毒性の指標 (PMN, LDH, TNF-α, MIP-2 など) を投与質量で比較すると ultrafine TiO₂ は、fine TiO₂ より約 40 倍の値だが、投与粒子の表面積で比較すると約 2 倍程度であった。この結果から、TiO₂ の肺への障害を検討する際、粒子の表面積が投与用量の指標になりうるとしている(Sager *et al.* 2008)。

Grassian らは、C57Bl/6 マウスに 5 nm [anatase 型] の TiO₂ (5, 20, 30 μg/50 μl) 及び 21 nm [anatase/rutile 混合型] の TiO₂ (25, 100, 150 μg/50 μl) を無菌 0.9% 食塩水に懸濁し、鼻部曝露した。24 時間後に、BAL 中の細胞数、LDH、IL-1β、IL-6 が 21 nm 投与のみ増加

した。好中球は、5 nm の中高用量、21 nm のすべての用量で、増加した (Grassian *et al.* 2007a)。

Kobayashi らは、同工場で、同製造法で作られ、同じ結晶構造の TiO₂ を用いて、粒径の相違と凝集状態の影響に着目した 2 つの実験を行った。まず、雄 SD ラットにいずれも anatase 型の ultrafine TiO₂ (4.9 nm)、semifine TiO₂ (23.4 nm) もしくは fine TiO₂ (154.2 nm) をそれぞれ 5 mg/kg の用量で、気管内投与し、1, 3, 7, 28 日後に BAL 検査と病理組織学的検査を行った。肺の炎症は、投与 7 日後までは、小さい粒径がより強かったが、その後は、肺の炎症は回復傾向を示し、差はなくなった。また、上記の ultrafine TiO₂ (anatase 型、4.9 nm) について、懸濁液を調整することで、分散後の濃度を、2, 3.4, 13 mg/mL の TiO₂ 懸濁液を作成し、同様の実験を行ったところ、肺の炎症はみられたが、凝集状態の違いにより差はみられなかった (Kobayashi *et al.* 2009)。

Rossi らは、BALB/c マウスに TiO₂ (ニードル型 rutile、10 × 40 nm、SiO₂ コーティング) を 10 mg/m³ の濃度で、2 時間、2 時間/日で 4 日連続、2 時間/日で 4 日連続かつ 4 週間、それぞれ全身吸入曝露した。BAL 中の TNF-α と CXCL1 の上昇と肺の炎症が見られ、ほとんどの TiO₂ は、肺胞マクロファージ内に存在した。同様の実験で、粗 TiO₂ (rutile 型、4 μm)、TiO₂ (rutile: anatase=9:1、30 nm)、TiO₂ (anatase 型、25 nm)、SiO₂ (amorphous 型、10 nm) の曝露では、肺の炎症等の反応は起こらなかった (Rossi *et al.* 2010)。

Chen (Chen *et al.* 2006) らは、雄 ICR マウスに 1 及び 5 mg/kg の ultrafine TiO₂ [Degussa] (21 nm) 又は micro TiO₂ [Fisher] (180-250 nm) を生理食塩水に懸濁後、0.1 及び 0.5 mg/animal の用量で気管内投与し、3 日、1 及び 2 週後の肺の組織の組織学検査及びマイクロアレイ解析を行った。ultrafine TiO₂ 投与は、肺気腫、マクロファージ集積、肺胞間隔の拡張・破壊、タイプ II 型肺胞増殖、上皮のアポトーシス引き起こした。placenta growth factor (PlGF) やケモカイン (CXCL1, CXCL5, and CCL3) などの発現が上昇した。micro TiO₂ (180-250 nm) 投与では、肺気腫など肺の組織学変化など同様の影響は見られなかった。

Xuらは、ラットの肺に肺内噴射によるイニシエーションプロモーション法 (IPS) により TiO_2 の発がん性を検討した。雌 c-Ha-ras トランスジェニックラットにジイソプロパノールニトロソアミン (DHPN) を飲水で投与し、その後 TiO_2 (rutile 型、直径 20 nm、コーティングなし) を IPS にて暴露した。DHPN 誘発の肺胞細胞過形成・肺腺腫の多重性が顕著に増加した。 TiO_2 の凝集体はもっぱら肺胞マクロファージ内に局在し、直径 107.4nm だった。また、同時に、肺腺腫の多重性と重量が増加した。そこで、野生型ラットに 9 日間に 5 回 IPS にて TiO_2 を暴露したところ、肺での、8-ヒドロキシ-2'-デオキシグアノシン濃度、SOD 活性、マクロファージ炎症性タンパク質 1 α (MIP-1 α) 発現が顕著に増加した。MIP-1 α は、 TiO_2 を取り込んだ肺胞マクロファージの細胞質及び TiO_2 を暴露した Hras128 ラットの血清と肺腺腫でも検出された。*in vitro* の細胞株の実験などから、 TiO_2 を取り込んだ肺胞マクロファージから分泌される MIP-1 α が肺胞・乳腺の細胞増殖を引き起こすことを示し、 TiO_2 の発がんプロモーション効果は局所的な肺胞内だけでなく、MIP-1 α の循環系を介して移動の後、離れた乳腺でも作用する可能性があることを示した (Xu *et al.* 2010)

Wang (Wang *et al.* 2008) は、ICR 雌マウスに rutile (80 nm) 及び anatase (155 nm) の TiO_2 (500 μ /animal) を 30 日間鼻部内投与し、脳への影響を調べた。 TiO_2 は、特に、海馬に高濃度でみられ、顕著なニューロンの形態的变化、CA4 領域の GFAP 陽性アストロサイトの増加が認められた。脳全体で、グルタミン酸、酸化窒素の過分泌、脂肪過酸化、タンパク酸化、カタラーゼ活性の増加など酸化ストレスが顕著であった。

Hougaard らは、 TiO_2 の胎生期暴露と神経行動系への影響を検討した。C57BL/6 の妊娠マウスにポリアルコールコート TiO_2 (rutile 型、21 nm) を 42 mg/ m^3 のエアロゾルパウダー (1.7 X 10⁶ m/cm³、ピークサイズ: 97 nm) で 1 時間/日で胎生 8-18 日全身吸入暴露した。暴露された親動物は、暴露 5 日後の肺に 38 mg Ti/kg が検出され、暴露 5 及び 26-27 日後の BAL 中の好中球は増加し、肺での炎症が示された。胎生

期に暴露された胎児は、幼若期の神経行動試験で、オープンフィールドで中心部を避ける傾向がみられ、雌は、プレパルス抑制の増強が見られた。しかし、認識機能試験では、影響は見られなかった (Hougaard *et al.* 2010)。

Scuri らは、離乳期 (2 週齢) 及び新生児 (2 日齢) のラットに TiO_2 を 12 mg/ m^3 のエアロゾルパウダー (ピークサイズ: 100 nm) で 3 日間 (5.6 時間/日) 全身吸入暴露し、神経発達や気道知覚神経の反応に重要な神経成長因子 (NGF) や脳由来神経栄養因子 (BDNF) などの神経栄養因子が肺で上昇することを見いだした。しかし、成熟動物 (12 週齢) の暴露では同様の変化はみられなかった (Scuri *et al.* 2010)。

D. 考察

ナノマテリアルに関する情報は、生産量や使用量を反映して、フラーレン、カーボンナノチューブ及び酸化チタンに関するものが多数報告されている。このため、本研究では、それらの物質について、現時点では暴露情報は、労働現場に限定されているため、職業暴露情報に焦点を当てて、暴露及び吸入暴露を介した毒性影響に関する公開情報を収集し、整理を行った。

暴露に関しては、最近、労働現場のアセスメントのために、生産や使用過程で放出されるナノマテリアルについて、検出、測定、分析などの方法が検討されている。測定の際は、粒子濃度、粒子数など複数の指標について計測を行い、バックグラウンドレベルを考慮して、検出されたものが予想されたナノマテリアルかあるいは副産物かなどを含め、凝集状態などを TEM 等で形態的に確認する作業が必要である。Methner らは、米国の国立労働安全衛生研究所 (NIOSH) が提唱している方法での 12 箇所のナノマテリアルを取り扱う工場や研究所での MWCNT などを取り扱う場所で、換気装置を作動させない環境でのフード内などのナノマテリアルの現地調査結果を報告している (Methner *et al.* 2010)。

吸入暴露を介した毒性影響に関しては、近年、*in vivo* 試験の結果が蓄積されつつある。これらの研究では、気道内投与や咽頭吸引試験に加え、エアロゾ

ルへの鼻部/全身暴露の結果が公表されてきている。フラーレンに関しては、投与/暴露後、一過性の炎症反応が見られてものの、肺の病理組織への報告はなかった。カーボンナノチューブに関する試験では、投与/暴露後、比較的初期から、肺に肉芽腫性変化や繊維性変化がみられた。酸化チタンに関しては、多くの試験で、肺の炎症、好中球の浸潤、貪食マクロファージの蓄積がみられた。

リスクアセスメントの面では、NIOSHは2005年11月に「酸化チタンの健康ハザード評価と作業環境暴露に関する勧告」でNIOSH-REL（国立職業安全衛生研究所の推奨暴露限度）の許容値として、微粒子に対して 1.5 mg/m^3 を、超微粒子（100 nm以下）に対して 0.1 mg/m^3 を提案した(NIOSH 2005)。これは過去の TiO_2 暴露試験のデータを用い、暴露量として粒子の表面積を用いると、用量—作用曲線が得られたとする見解に基づいている(Kuempel *et al.* 2006)。酸化チタンの毒性を、表面積で説明できるかは意見がわかれている。これは、酸化チタンをはじめナノマテリアルの影響は、粒径、組成、表面の性状、結晶構造、実際の分散状態など様々な要因があるため、毒性の評価や実験を行う場合も、これらを十分に考慮する必要がある。また、暴露については、気体中の粒径、粒子の形状やその存在比率などのより詳細な調査が必要である。

また、最近の研究では、従来に比べて長期（90日間）のカーボンナノチューブの吸入暴露試験結果や、投与部位（肺）以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告されてきている。このため、今後、発がん性、発生や神経への影響なども含めナノマテリアルについて、総合的な毒性メカニズムの解明を意図した試験・研究が重要である。

Takagらは、p53ヘテロ欠損(p-53(+/-))マウスにMWCNTを単回腹腔内投与し中皮腫が起こることを示した(Takagi *et al.* 2008)。遺伝子組み換えを行っていない野生型F344ラットにMWCNTを単回陰嚢腔内投与した試験においても、腹腔内に中皮腫(Takaya *et al.* 2010)が観察された(Sakamoto *et al.* 2009)。また、Polandらは、長さの異なる4種類のMWCNTを単回

腹腔内投与し7日後の中皮細胞の増殖性を検討し、長いタイプの2種類について腹腔側にCNTを取り込んだ群でのみ肉芽が形成されることを見いだした(Poland *et al.* 2008)。今回、2つのグループにより吸入暴露によるMWCNTの胸膜への到達が示された。今後、吸入暴露による、カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用を含めた慢性的な影響を検討することが必要である。

E. 結論

暴露情報及び吸入暴露を介した毒性影響に関する公開情報を収集し、整理した。その結果、暴露に関しては、測定法の検討が進み、いくつかの労働現場の測定結果が得られたが、その数は限られていた。一方、毒性影響に関しては、最近の研究では、従来に比べて長期（90日間）のカーボンナノチューブの吸入暴露試験結果や、投与部位（肺）以外での液性因子を介した免疫系や他の臓器への影響や発がん性のメカニズムに関する研究が報告されてきている。ナノマテリアルの吸入毒性には、粒子の形状や大きさ、分散状態等が重要な役割を果たしている。粒子の詳細な測定を含む本格的な暴露調査及び毒性メカニズム解明を意図した試験・研究が必要である。また、発がん性を含めた慢性的な影響を検討することも重要である。

参考文献

- Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S (2010). Pulmonary Toxicity of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes in Male Fischer 344 Rats. *Ind Health*.
- Baan R, Straif K, Grosse Y, Secretan B, El Ghissassi F, Coglianò V (2006). Carcinogenicity of carbon black, titanium dioxide, and talc. *Lancet Oncol*. 7, 295-296.
- Baker GL, Gupta A, Clark ML, Valenzuela BR, Staska LM, Harbo SJ, Pierce JT, Dill JA (2008). Inhalation toxicity and lung toxicokinetics of C60 fullerene nanoparticles and microparticles. *Toxicol*

- Sci.* **101**, 122-131.
- Bermudez E, Mangum JB, Asgharian B, Wong BA, Reverdy EE, Janszen DB, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2002). Long-term pulmonary responses of three laboratory rodent species to subchronic inhalation of pigmentary titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* **70**, 86-97.
- Bermudez E, Mangum JB, Wong BA, Asgharian B, Hext PM, Warheit DB, Everitt JI (2004). Pulmonary responses of mice, rats, and hamsters to subchronic inhalation of ultrafine titanium dioxide particles. *Toxicol Sci.* **77**, 347-357.
- Boffetta P, Soutar A, Cherrie JW, Granath F, Andersen A, Anttila A, Blettner M, Gaborieau V, Klug SJ, Langard S, Luce D, Merletti F, Miller B, Mirabelli D, Pukkala E, Adami HO, Weiderpass E (2004). Mortality among workers employed in the titanium dioxide production industry in Europe. *Cancer Causes Control.* **15**, 697-706.
- Carrero-Sanchez JC, Elias AL, Mancilla R, Arrellin G, Terrones H, Lacleste JP, Terrones M (2006). Biocompatibility and toxicological studies of carbon nanotubes doped with nitrogen. *Nano Lett.* **6**, 1609-1616.
- Chen HW, Su SF, Chien CT, Lin WH, Yu SL, Chou CC, Chen JJ, Yang PC (2006). Titanium dioxide nanoparticles induce emphysema-like lung injury in mice. *FASEB J.* **20**, 2393-2395.
- Chou CC, Hsiao HY, Hong QS, Chen CH, Peng YW, Chen HW, Yang PC (2008). Single-walled carbon nanotubes can induce pulmonary injury in mouse model. *Nano Lett.* **8**, 437-445.
- Elgrabli D, Abella-Gallart S, Robidel F, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G (2008a). Induction of apoptosis and absence of inflammation in rat lung after intratracheal instillation of multiwalled carbon nanotubes. *Toxicology.* **253**, 131-136.
- Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G (2008b). Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. *Part Fibre Toxicol.* **5**, 20.
- Ellinger-Ziegelbauer H, Pauluhn J (2009). Pulmonary toxicity of multi-walled carbon nanotubes (Baytubes) relative to alpha-quartz following a single 6h inhalation exposure of rats and a 3 months post-exposure period. *Toxicology.* **266**, 16-29.
- Ferin J, Oberdorster G, Penney DP (1992). Pulmonary retention of ultrafine and fine particles in rats. *Am J Respir Cell Mol Biol.* **6**, 535-542.
- Fryzek JP, Chadda B, Marano D, White K, Schweitzer S, McLaughlin JK, Blot WJ (2003). A cohort mortality study among titanium dioxide manufacturing workers in the United States. *J Occup Environ Med.* **45**, 400-409.
- Fujita K, Morimoto Y, Ogami A, Myojyo T, Tanaka I, Shimada M, Wang WN, Endoh S, Uchida K, Nakazato T, Yamamoto K, Fukui H, Horie M, Yoshida Y, Iwahashi H, Nakanishi J (2009). Gene expression profiles in rat lung after inhalation exposure to C60 fullerene particles. *Toxicology.* **258**, 47-55.
- Fujitani Y, Kobayashi T, Arashidani K, Kunugita N, Suemura K (2008). Measurement of the physical properties of aerosols in a fullerene factory for inhalation exposure assessment. *J Occup Environ Hyg.* **5**, 380-389.
- Grassian VH, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, O'Shaughnessy PT, c PST (2007a). Inflammatory response of mice to manufactured titanium dioxide nanoparticles: Comparison of size effects through different exposure routes. *Nanotoxicology.* **1**, 211-226.
- Grassian VH, O'Shaughnessy P T, Adamcakova-Dodd A, Pettibone JM, Thorne PS (2007b). Inhalation exposure study of titanium dioxide nanoparticles with a primary particle size of 2 to 5 nm. *Environ Health Perspect.* **115**, 397-402.
- Han JH, Lee EJ, Lee JH, So KP, Lee YH, Bae GN, Lee