

- ISN-ESN-2011 23rd Biennial Meeting (2011.8-9), (Athens, Greece; アテネ市, ギリシャ国)
- Sato, K., Shigemoto-Mogami, Y., Ohno, Y., Sekino, Y. The role of activated microglia accumulated in the early postnatal SVZ (生後初期脳室下帯に集積しているミクログリアの役割) ISN Satellite meeting, Glial cells in (patho)physiology (2011.8), (Ljubljana, Slovenia; リュブリャナ市, スロベニア国)
- Sato, K., Takaki, J., Fujimori, K., Suzuki, T., Sekino, Y. Down-regulation of astrocyte L-glu transporters under inflammation is caused by glia-glia communication (炎症化のグルタミン酸トランスポーターの機能低下はグリア間コミュニケーションによって引き起こされる) Sfn2011 (2011.11), (Washington D.C., USA; ワシントン D.C., アメリカ合衆国)
- 清水広介、内山安里奈、西村哲治、広瀬明彦、奥直人. カーボンナノチューブ暴露による生体膜障害性の検討. 日本薬学会第132年会 (2012年3月、札幌) 最上(西巻)知子, 崔紅艶, 岩崎香里, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 鈴木和博, 広瀬明彦 多層カーボンナノチューブはNLRP3活性化を介してIL-1 $\beta$ 産生を促進する 第38回日本トキシコロジー学会学術年会 (2011.7) (横浜)
- 最上(西巻)知子, 崔紅艶, 岩崎香里, 奥平桂一郎, 内藤幹彦, 鈴木和博, 広瀬明彦 多層カーボンナノチューブによるIL-1 $\beta$ 産生促進とその機構 フォーラム2011 衛生薬学・環境トキシコロジー (2011.10)
- Kun'ichi Miyazawa and Ryohei Kato, "Laser polymerization of fullerene nanofibers", Proceedings of the JSME/ASME 2011 International Conference on Materials and Processing (ICMP&P2011), P. ICMP2011-51020, Oregon State University, USA, June 13-17, 2011.
- Ryohei Kato, Yinghui Wang and Kun'ichi Miyazawa, "Raman spectroscopy investigation on the structural change of heat-treated photopolymerized fullerene nanowhiskers", Abstract of The International Conference on Advanced Materials and Nanotechnology (ICAMN), Kathmandu, Nepal, October 21-23, 2011, pp.68-68.
- K. Miyazawa and C. Hirata, "Synthesis of C<sub>60</sub> nanowhiskers with controlled lengths and diameters", Abstracts of Twelfth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-12), Nagoya University, Japan, January 24-27, 2012, P.013.
- Ryohei Kato, Yinghui Wang and Kun'ichi Miyazawa, "Raman spectra analyses of the heat-treated photopolymerized fullerene nanowhiskers", 第41回フラーレン・ナノチューブ・グラフェン総合シ

ンポジウム講演要旨集, 2011年9月5日(月)～7日(水), 首都大学東京, フラレン・ナノチューブ・グラフェン学会, P.114.

宮澤 薫一, 加藤 良栄, 王 英輝, “フラレンナノウィスカーの光重合”, 日本機械学会 2011 年度年次大会講演論文集, pp. J044051\_1～J044051\_2, 一般社団法人日本機械学会, 東京工業大学大岡山キャンパス, 2011年9月11日(日)～14日(水).

平田睦子, 芹澤英樹, 鎌田栄一, 小野敦, 広瀬明彦: 単層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7)(横浜)

小野 敦, 平田 睦子, 須永 昌男, 古川 正敏, 鎌田 栄一, 広瀬 明彦: 多層型カーボンナノチューブの28日間反復経口投与毒性試験、第38回日本トキシコロジー学会学術年会(2011.7)(横浜)

Hirose, A., Ono, A., Hirata-Koizumi, M., Serizawa, H., Sunaga, M., Furukawa, M., Kamata, E., Nishimura, T: “Repeated dose 28-day oral toxicity studies of single- and multi-walled carbon nanotubes in rats、The 47th EUROTOX2011(2011.8)(France, Paris)

広瀬明彦: 国研の取組: 健康影響評価指針の国際動向について、日本薬学会第132年会, 2012年3月(札幌)

渡辺渡、吉田裕樹、広瀬明彦、紺野克彦、山中沙代子、黒木奈緒、黒川昌彦: 酸

化チタンナノ粒子のマクロファージおよびマウスモデルにおけるRSウイルス感染免疫応答への影響、日本薬学会第132年会, 2012年3月(札幌)

清水広介、内山安里奈、西村哲治、広瀬明彦、奥直人: カーボンナノチューブ暴露による生体膜障害性の検討、日本薬学会第132年会, 2012年3月(札幌).

#### H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得(出願中)

- 発明の名称: ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途  
出願日: 平成21年3月24日  
出願番号: 特願2009-071951  
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結荷  
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学
- 発明の名称: PCT 出願「ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途」  
出願日: 平成21年9月25日  
出願番号: PCT/JP2009/004848  
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結荷  
特許出願人: 津田洋幸
- 発明の名称: 国内優先出願「ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途」  
出願日: 平成22年3月26日  
出願番号: 特願2010-58903  
発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結荷  
特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学
- 発明の名称: 生分解性試験方法及びフラレンファイバー含有医用材料

発明者氏名: 榑島真一、宮澤薫一、奥田  
順子、谷口彰良

出願番号: 特願 2010-035688

出願人: 独立行政法人物質・材料研究機  
構

出願日: 2010年2月22日

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

平成23年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性暴露による有害性評価指標の開発に関する研究

研究分担者：菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長  
研究協力者：高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長  
研究協力者：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部主任研究官

### 研究要旨

高生産量（HPV）ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、ナノマテリアルの安全性評価に必要な条件を探ることを目的に、本年度はフラーレン投与マウスの腎への影響を確認する 1 年間の慢性毒性試験を実施した。その結果、明らかな腎障害は確認されなかった。また、繊維状物質の aspect ratio の差が悪性中皮腫誘発へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、純粋な炭素からなり、長さの異なるフラーレンナノウィスカー(FNW)を雄 p53(+/-)マウスに単回腹腔内投与し、観察期間 1 年間の発がん性試験を終了した。マウス中皮腫マーカーとしての有用性を明らかにするため、MWCNT 腹腔内投与 p53(+/-)マウスの 1 年間発癌性試験を開始した。

### A. 研究目的

ナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、この違いが産業的に新しい用途への開発として期待されているところであるが、一方で生体に対して、特にヒト健康影響に対する有害性評価に対しては、新たな危惧として捉えられる可

能性も含んでいる。平成18～20年度の厚生労働科学研究「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および体内動態評価に関する基盤研究」の分担研究課題「高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究」でマルチウォールカーボンナノチューブ（MWCNT）をp53(+/-)マウスに腹腔内投与すると中皮腫が発

生することを明らかにした。また、体内で再分散したC<sub>60</sub>などのナノマテリアルが再分布して影響を引き起こす可能性を示唆する知見を得た。一方、国外ではナノマテリアルの短期的影響の報告例は増えてきているが、慢性的影響を検討した報告はまだ少ない。そこで、中皮腫形成やナノ粒子の体内再分布に伴う慢性影響の発現メカニズムや新たな慢性影響の検索を行う。さらに、得られたエンドポイントを検出するための適切な指標を用いた短期的試験法やスクリーニング系の開発を行うことを目的とする。

## B. 方法

### 実験 1.

#### フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

フラーレン腹腔内投与がメチルセルロースを溶媒中に含む条件で生じることが示された腎障害のメチルセルロース非共存下での再現性を確認する目的で、C57BL/6 マウスにフラーレンを投与し、1年間経過観察する毒性試験を実施した。なお、陰性対照群として炭素からなる graphite (黒鉛) 投与群を設定した。1群 20 匹の雄 C57BL/6Cr マウス (12 週齢) を実験に使用した。フラーレンにはフロンティアカーボン社の最高純度の SUH (>99.9%、昇華精製品、Lot no. 7B 0044-A) を用いた。Graphite は Alpha

Aesar graphite powder, synthetic (conduction grade, -200 mesh, 99.9995%(metal basis)、Lot no.B17U014) (和光純薬工業) を用いた。フラーレンまたは graphite は注射用生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1%の tween80 を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。フラーレン または graphite は 3mg/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

### 実験 2.

#### 長さの異なるフラーレンナノウイスカーの p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験

繊維状物質の aspect ratio の差が悪性中皮腫誘発へ及ぼす影響を明らかにすることを目的に、純粋な炭素からなり (金属不純物の影響を排除出来る)、長さの異なる二種の焼結フラーレンナノウイスカー(FNW)を用いた発がん試験を以下のとおり実施した。雄 C57BL/6 とバッククロスした p53 ヘテロ欠失 (p53(+/-))マウス (雄、一群 20 匹、16~17 週令) を実験に使用した。900°C熱処理した FNW-long(FNW-L) (長さの平均 7.56µm、直径の平均 586nm)、FNW-short (FNW-S) (長さの平均 1.32µm、直径の平均 365nm)は独立行政法人物質・材料研究機構の宮澤薫一博士が作成したものを使用した。投与用量は線維数として各

群とも  $3 \times 10^7$  本/animal とし、陽性対照群には MWCNT (MWNT-7、保土ヶ谷化学工業) を用いた。各検体は注射用生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1% の tween80 を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

### 実験 3

#### MWCNT 腹腔内投与 p53(+/-)マウスの血中 Mesothelin 測定実験

本研究班の研究分担者である順天堂大学医学部樋野興夫教授はマウスの Mesothelin を ELISA 法により検出する方法を開発した。Mesothelin は正常な中皮細胞に存在するタンパク質であり、N 末側の断片が血液中に分泌される。中皮腫と診断された患者血清においては、その量が高まることが見出されており、早期腫瘍マーカーとして診断に利用できる可能性がある。本試験では、マウスに、分散性を高めた MWCNT (MWNT-7、保土ヶ谷化学工業) を腹腔内投与し、45 日毎に採血を行って Mesothelin 測定の試料に供すると共に、中皮腫発がんまでを観察する。雄 C57BL/6 とバッククロスした 12 週令の雄 p53(+/-)マウスを実験に使用した。検体の用量はこれまでに実施した試験での MWCNT の投与量から  $10\mu\text{g}/\text{animal}$  とし、単回腹腔内投与した。1 回の解剖当たり各群に 10 匹を供した。MWCNT は独自に開発した分散法

にて分散後、注射用生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1% の tween80 を加えソニケーションした。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

本実験は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の規則及び承認のもとに人道的に実施された。ナノマテリアル類の実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

### C. 研究結果

#### 実験 1.

##### フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

一般状態、生存率、体重に対照群と比較して変化は認められなかった。投与後 12 ヶ月の最終解剖動物において肉眼的に明らかな腎への影響は見られなかった。病理組織学的検索の結果、フラーレンによる腎障害の誘発は認められなかった。

#### 実験 2.

##### 長さの異なるフラーレンナノウィスカーの p53(+/-) マウスを用いた腹腔内

## 投与発がん性試験

本試験を2011年3月より開始した。1年後に、生存動物の最終解剖を終了した。FNW-L及び、FNW-S群とも対照群と比較して、体重及び生存率に有意な差は認められなかった。陽性対照のMWCNT群では投与後200日までに殆どの動物が中皮腫と思われる腫瘍を誘発し、死亡あるいは衰弱屠殺された。なお、対照群を含むFNW-L及び、FNW-S群に腹腔内腫瘍が少数例認められた。今後、病理組織学的検査を行う。

### 実験 3

#### p53 ヘテロ欠損マウスを用いた血中 Mesothelin 測定

実験を開始し、投与45日目に第一回の解剖を実施し、血清を採取、-80度で凍結保存した。今後、45日ごとにサンプリングを実施する。

### D. 考察

フラレンに関してはこれまでの実験でマウス単回腹腔内投与の結果、MCを溶媒に用いた場合はフラレン投与により肉眼的に腎の退色を伴った地図状の萎縮、組織学的に糸球体が比較的保持されたままの尿細管～集合管の高度の萎縮が巣状乃至腎全体に認められた。しかし、溶媒中のMCを除いた今回のフラレン腹腔内投与試験の結果、1年の観察中に肉眼的及び病理組織学的に腎障害は認められず、フラレン単独

では腎毒性は発揮せず、MCとの共存時にその腎障害性を高度に増強するものと結論された。

これまでに、アスベスト中皮腫の短期発がんモデル系として知られているp53(+/-)マウスを用いて、MWCNTの中皮腫の中皮腫誘発能を明らかにした。FNWは形状がカーボンナノチューブに似ている、100%炭素であり遷移金属を含まない、及び、今回長短の二種類のFNWが用意されたことから、長さの違いのみによる中皮腫誘発能の比較が可能となり、アスベスト様繊維状炭素化合物の発がんメカニズムの解釈を容易にすることが期待された。1年間の経過観察を終了し、肉眼所見からはFNW-L及びFNW-SはMWCNTより中皮腫誘発能は低い結果となった。中皮腫誘発能の最終確認は、病理組織学的検査結果を待つて実施する予定である。

p53ヘテロ欠損マウスを用いた血中Mesothelin測定実験を開始した。本実験で用いたMWCNTの投与量は中皮腫誘発量であり、経時的にMesothelinと組織学的変化を比較することにより、中皮腫発がんの前段階、発がん初期、後期の組織変化とMesothelin値の対比を行う。マウスMesothelin測定の毒性学的意義について有用な情報を提供することが期待される。

### E. 結論

1. フラレン単独では腎毒性は発揮し



ないことが示された。他の原因による腎障害性を高度に増強する可能性があることが指摘された。

2. 長さの異なるFNWの腹腔内投与後1年間経過観察実験を終了した。FNW-L及びFNA-S群の生存率に対照群と有意な差は認められなかった。最終判定は病理診断結果を基に実施する。
3. p 53ヘテロ欠損マウスにMWCNTを腹腔内投与し、経時的に血中Mesothelin測定を行う発がん実験を開始した。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
なし

2. 学会発表

毒性試験と評価に関する新たな課題へのアプローチ—厚生労働科学ナノマテリアル研究の展開—化学物質の安全管理に関するシンポジウム (2012.2.17) (東京)

菅野 純, 高木篤也, 西村哲治, 広瀬明彦、Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Nanomaterials、第70回日本癌学会学術総会、2011.10.4, 名古屋、口演

Jun Kanno, Atsuya Takagi, Tetsuji Nishimura, Akihiko Hirose, Nanomaterial Toxicology - Importance of Chronic Toxicity Assessment, Attendance at 5th International Conference on Nanotechnology – Occupational and Environmental Health, (2011.8.10) (Boston, USA), Oral

#### H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

平成 23 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価  
および体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

研究協力者：酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 教授

二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 准教授

深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 助教

徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科分子毒性学分野

研究員・非常勤講師

研究要旨

我々は吸入曝露肺発がんリスク短期検索法を確立した。この方法は我々が確立した経気管肺内噴霧法を用い、1) 発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法を用いた肺発がん性の評価、2) 被検物質の短期投与（500ppm, 14 日間に計 8 回）による肺毒性と肺発がんプロモーション機序の検索、3) 一次培養肺胞マクロファージを用いた毒性とプロモーション作用の *in vitro* 解析、4) 上記の試験にて肺胞上皮細胞等の明らかな毒性や増殖病変を見る場合にはその可逆性を観察する試験、をセットとする研究を実施し、肺毒性と発がんリスク評価を短期間で可能とする方法を開発してきた。その結果、ナノサイズ酸化亜鉛（nZnO, d=25nm）は、1) 16 週の試験において、発がんプロモーション作用は見られなかったが、nZnO の投与のみで肺胞壁の巣状線維化と終末細気管支上皮の過形成性増殖（Terminal bronchial epithelium hyperplasia, TBEH）が有意に増加することが判明したが、いずれも可逆性病変であった。2) 14 日間に 8 回投与（250, 500ppm, 0.1% Tween 生食懸濁、0.5ml を 1 回/2 週）する短期投与試験では間質性肺炎と CXCL5, CXCL11 および CCL7 などのケモカインの発現が増加した。3) *in vitro* の試験では nZnO に曝露した初代培養肺胞マクロファージの培養上清は、肺線維芽細胞の増殖を促進した。4) この病変はいままでに報告されていないので回復試験を実施したところ投与終了後 12 週で消失し、可逆性病変であることが判明した。また、アナターゼ型二酸化チタン（anTiO<sub>2</sub>, d=35 nm）については、試験法 2) において、マクロファージ誘導能、8OHdG、MIP1 $\alpha$  の産生能を検索し、試験法 3) において肺癌細胞株の細胞増殖促進作用を検索した。その結果、これらの作用は、anTiO<sub>2</sub> ではルチル型 TiO<sub>2</sub> (mTiO<sub>2</sub>) より弱いことが分かった。

## A. 研究目的

ナノテクノロジーにより製造されるナノ材料は表面積の画期的増大によって従来に無い物理化学的特性が得られることから、革新的素材として社会に大きな貢献をもたらすものとして期待されている。しかし、気中ではエアロゾル形態をとるために製造・使用において吸入曝露に際する安全性研究は製品の開発に遅れをとっている。吸入試験の実施には専用設備と膨大な稼働経費を要するために未だ十分なデータは得られていない。

ラットにおける簡便な経気管肺内噴霧法による1) 二段階肺発がんモデルを用いたプロモーション作用の評価による肺発がん性中期検索法の開発 (2-Step lung carcinogenesis study)、2) 9日間投与による肺発がん機序の検索 (Short term *in vivo* mechanism study)、および、3) *in vitro* 発がんメカニズムの検索 (*In vitro* mechanism study)、4) 肺胞上皮細胞等の明らかな増殖病変を見る場合にはその可逆性を観察する試験、の4つの試験系からなる短期に毒性と発がん性の機序の得られる検索法を開発し、金属ナノマテリアルの安全性についての実証研究を進めつつ提案した試験法の実際の使用を目指した妥当性の検証を行った。

これまでに我々は、この検索法を用いてラットにおける肺発がん性の報告されている (WHO/IARC Group 2B) のルチル型ナノ粒子二酸化チタン ( $m\text{-TiO}_2$ ) の肺内噴霧による肺発がんリスクとその機序を検索し、二酸化チタンは肺胞マクロファージに貪食され、このマクロファージからケモカインの MIP1 $\alpha$  が分泌され、MIP1 $\alpha$  には肺がん細胞株の増殖促進作用のあることを見出し、

肺発がんプロモーション作用のメカニズムの一端を明らかにした。このような金属ナノマテリアルは化学的反応性が高いが、生体内において分解されることはほとんど無く、体外への排泄についての知見は乏しい。本研究では化粧品、白色顔料、医薬品、電子部品などに幅広く用いられているナノサイズ酸化亜鉛粒子 ( $n\text{ZnO}$ )、および可視光下においてラジカル発生等の光触媒活性が  $m\text{TiO}_2$  よりも強いアナターゼ型二酸化チタン ( $an\text{TiO}_2$ ) について、肺毒性と発がんへの関与を観察し、提案の試験モデルの妥当性を検証した。

## B. 研究方法

### 1) 2-Step lung carcinogenesis study

雌ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (SD 系統由来、6週齢、乳腺発がん高感受性、肺発がん感受性は野生型と同じ) を用い肺発がん物質

N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN) を実験開始から2週間0.2%の用量で飲水投与して発がんイニシエーション措置とした。その2週間後より、被検物質の  $n\text{ZnO}$

( $d=35\text{nm}$ ) を 250 および 500 $\mu\text{g/ml}$  の濃度で 0.05% Tween20 含有生理食塩水に懸濁して、2週に1回の割合で16週まで気管内噴霧投与した。肺および全身諸臓器を取り出し、パラホルムアルデヒドで1日固定後病理学的に肺腫瘍性病変 (肺胞上皮過形成、腺腫、腺がん) の発生頻度と個数の定量解析を行った。さらに、この実験では終末気管支上皮の過形成増殖像および巣状肺線維化 (間質性肺炎) が顕著であったので、発生病変の可逆性についての観察を実施した。

### 2) Short term *in vivo* mechanism study

上記と同じ方法で nZnO および anTiO<sub>2</sub> を 500µg/ml の濃度を 2 日に 1 回の割合で合計 8 回、肺内に噴霧した。14 日目の最終不噴霧の 6 時間後に屠殺剖検し、右肺を採取した後右肺はパラホルムアルデヒド固定後、マクロファージの nZnO の貪食の状態、炎症の程度ならびにパラフィンブロックからの電顕試料による観察を行った。左肺は凍結して炎症関連遺伝子と蛋白発現を生化学的に解析した。

### 3) *In vitro* mechanism study

ラットの肺より初代培養マクロファージを分離採取し、この培養液に最終濃度が 10µg/ml となるように nZnO および anTiO<sub>2</sub> を加え、24 時間後に培養上清を回収した。マクロファージの培養上清によるヒト肺腺癌細胞 (A549)、ヒト中皮腫細胞 (Mesol) (安田女子大学薬学部・柳原教授) およびヒト肺線維芽細胞 CCD34 の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

4) この研究では、nZnO によって終末細気管支の増殖病変 (TBEH) が観察されたので、nZnO 500µg/ml to 比較対照物質として塩化亜鉛 (ZnCl<sub>2</sub>) (500ppm 相当量の 6.14µmol) 投与群も加え 4 週間に 8 回投与しその後無処置とし、直後、2 週後、4 週後、8 週、10 週、12 週、16 週後に屠殺した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った (H22-M19)。

## C. 研究結果

### 1. 酸化亜鉛 (nZnO)

#### 1) 2-step lung carcinogenesis study

実験終了で屠殺剖検し肺を検索したところ、肺野の単位面積あたりの肺胞上皮過形成と腺腫を合わせた腫瘍性病変の平均発生個数/cm<sup>2</sup> は、DHPN\*無処置のみの群、

DHPN\*250µg/ml 群および DHPN\*500µg/ml 群、saline\*500ppm 群でそれぞれ 2.43±1.29、1.76±1.03、2.26±1.21 および 0.58±0.79 と有意差は見られなかった。さらに、DHPN の投与に関係なく nZnO 投与群に巣状の間質性肺炎が見られたため、Azan-Mallory 膠原線維染色を行い、標本上の線維化巣の面積をイメージアナライザーにて計測した結果、肺の 1cm<sup>2</sup> あたりの面積は、対照群の 1.7mm<sup>2</sup> に対し、250µg/ml 群で 5.6mm<sup>2</sup>、500µg/ml 群で 8.0mm<sup>2</sup> と用量依存性に有意に増大した (p<0.01)。さらに終末細気管支-肺胞移行部の終末細気管支上皮の巣状過形成増殖

(Terminal bronchial epithelium hyperplasia, TBEH) が標本上に観察され、肺の 1cm<sup>2</sup> あたりの平均発生個数は、DHPN\*無処置のみの群、DHPN\*250µg/ml、DHPN\*500µg/ml 群、および saline\*500µg/ml 群でそれぞれ 0、0.86±0.86、4.93±1.95、3.91±1.29 であって nZnO 群では DHPN 投与群と比較して濃度依存性に増加した (p<0.01)。マクロファージの細胞質には、nZnO 粒子は全く観察されず胞体内に泡沫状の小体が多数観察された。電顕(TEM)による泡沫状の小体部分には元素分析では亜鉛元素は全く検出されなかったが、肺組織中の亜鉛元素は、nZnO 群で有意に増加していた (p<0.01)。また乳腺腫瘍の発生には nZnO 投与は影響しなかつ

た。

## 2) Short term *in vivo* mechanism study

病理組織学的にはリンパ球主体の軽度の炎症細胞浸潤巣と多数の肺胞マクロファージが散見された。誘導されたマクロファージの数は投与群で有意に増加していたが、壊死に陥ったマクロファージも数多く観察された。16週の試験と同じようにマクロファージの細胞質には、亜鉛粒子は全く観察されず胞体内に泡沫状の小体が多数観察されなかった。次に、マイクロアレイを用いた検索を行ったところ、CXCL5, CXCL11 および CCL7 の発現が増加していることが判明した。

## 3) *In vitro* mechanism study

培養皿中でラットの肺より採取したマクロファージに初代培養マクロファージに nZnO を貪食させ、その培養上清のヒト肺線維芽細胞(CCD34), ヒト肺がん細胞 (A549) およびヒト中皮腫細胞(Meso1)に対する細胞増殖促進作用を検索した。その結果、この培養上清を添加すると CCD34 の細胞増殖率は対照の 122%まで増大したが A549 および Meso1 の細胞増殖率には変化はなかった。次に、このマクロファージの培養上清中に含まれる、線維芽細胞の増殖促進因子を同定する目的でマイクロアレイを用いた検索を行ったところ、Interleukin 6 (IL-6), や細胞増殖に関与する colony stimulating factor 3 (CSF3)および Insulin growth factor binding protein 5 (IGFB5)の発現が増加していることが判明した。

4) nZnO は TBEH を発生させたことに基づき、nZnO 500 $\mu$ g/ml を 4 週間の 8 回投与しその後無処置とし、直後、2 週後、4 週後、8 週、10 週、12 週、16 週後に屠殺したと

ころ、TBEH と肺巣状線維化は経時的に減少して 12 週後には全く見られなくなった。同様に線維化巣もほぼ消失した。したがって、nZnO には発がん物質プロモーション作用（発がん作用）はなく、DHPN の投与に関係なく、TBEH 増殖と線維化を伴う巣状の間質性肺炎は可逆性病変であることが分かった。

## 2. アナターゼ型二酸化チタニウム (anTiO<sub>2</sub>)

アナターゼ二酸化チタニウム (anTiO<sub>2</sub>) の肺毒性と発がんへの関与について、提案の試験モデルの妥当性を mTiO<sub>2</sub> と比較対照しつつ検証する実験を行った。

## 2) Short term *in vivo* mechanism study

病理組織学的にはリンパ球主体の細胞浸潤と肺胞マクロファージが散見された。肺胞内マクロファージの数は生食対照群より有意に増加したが、mTiO<sub>2</sub> より少なかった（対ルチル比 77%）。マクロファージの細胞質には明らかな TiO<sub>2</sub> 凝集体の貪食がみられこれらにはチタニウム元素が検出された。肺組織における MIP1 $\alpha$  の蛋白発現量は対照に比べ mTiO<sub>2</sub> 4.84 倍、anTiO<sub>2</sub> 1.34 倍と増加していたが、ルチル型よりアナターゼ型は有意の低値（対ルチル比 27%、 $p < 0.001$ ）であった。ラジカル産生の指標の 8-OHdG 値はルチル型より低値傾向（対ルチル比 64%）であった。

## 3) *In vitro* mechanism study

*in vitro* おけるマクロファージからの Mip1 $\alpha$  の蛋白発現の対照比はルチル 2.70 倍、アナターゼ 1.51 倍であり、ルチル型より有意の低値（対ルチル比 56%、 $p < 0.001$ ）であった。ヒト肺線維芽細胞 (CCD3)、ヒト肺が

ん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもルチル型より低値傾向にあった。

#### D. 考察

我々の開発したナノ粒子吸入曝露短期リスク評価法において、nZnO は気管内噴霧投与によって、肺発がん促進作用はみられず、間質性肺炎と TBEH が発生することが明らかとなった。nZnO に吸入による発がん性の報告動物、ヒトともに報告は見られ無い。この研究から発がん性はないものと考えられ、提案している発がん二段階試験法の妥当性が示された。特記すべきは TBEH の発生であり、回復試験において比較対照物質として投与された塩化亜鉛でも同様に発生し、しかも可逆性であったことである。その機序については不明であるが、亜鉛自体の終末細気管支への特異的毒作用に起因する可能性がある。本法によって発がんに関係のない反応性の増殖病変の観察、さらに発がんには直接関与しない間質性肺炎と肺線維症のリスク評価が可能であることが実証された。

気管内に噴霧された nZnO は、予測に反して肺胞上皮細胞内には全く観察されず、マクロファージの細胞質には、元素分析によって亜鉛の検出されない抜け殻のような泡沫状の小体が観察された。マクロファージは、貪食した物質を分解するのに酸を産生することが知られている。また酸化亜鉛は安定ではあるが、酸性環境下では分解されることから、nZnO は一旦マクロファージに貪食された後に酸性となったマクロファージの細胞質内で分解されて亜鉛イオンとして流出した可能性がある。また、nZnO を貪食したマクロファージでは、ケモカイン

の CXCL5, CXCL11 および CCL7 の発現が上昇していること、またその培養上清は、ヒト肺線維芽細胞である CCD34 の細胞増殖を促進することが明らかとなった。これらの結果から、nZnO を貪食したマクロファージは、CXCL5 などケモカインを分泌し、線維芽細胞の増殖を促進することが示された。TBEH と同様にこの巣状線維化も可逆性であった。今後、亜鉛の投与と TBE、巣状線維化発生 of 機序については毒性学上解明されることが望まれる。

光触媒活性がルチル型二酸化チタニウム (mTiO<sub>2</sub>) よりも強いアナターゼ型二酸化チタニウム (anTiO<sub>2</sub>) は生物毒性がルチル型より顕著である可能性が危惧されている。2週投与実験では肺組織における Mip1α の蛋白発現はルチル型低値 (p<0.001) であった。8-OHdG 値もルチル型より低値傾向であった。in vitro おけるマクロファージからの Mip1α 発現においてもルチル型より低値 (p<0.001) であった。さらにヒト肺線維芽細胞 (CCD3)、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもルチル型より低値であった。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性はアナターゼ型より弱いものと考えられた。

#### E. 結論

本研究によって、以下のことが明らかとなった。

##### 酸化亜鉛 (亜鉛華、nZnO)

雌ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラット (乳腺発がん高感受性、肺発がん肺発がん感受性は野生型と同じ) を用いた実験では、nZnO はマクロファージ

に取り込まれた後に溶出し、肺組織には検出されなかった。2-step lung carcinogenesis study では肺発がんプロモーション作用はなかったことから、肺に対する発がん作用は無く、従来との報告と一致した結果であり、提案の発がん二段階試験法の妥当性が示された。また、イニシエーション処置として投与した発がん物質の投与とは関係なく、終末細気管支上皮の巣状過形成増殖

(Terminal bronchial epithelium hyperplasia, TBEH) が瀰漫性に発生した。この増殖はマクロファージから分泌される IL-6, CSF3, IGFBP5 等のサイトカインが肺胞上皮細胞の増殖を促進することが示唆された。さらに炎症性変化として巣状の間質性肺炎が発生した。nZnO を食食したマクロファージが CXCL5, CXCL11 および CCL7 などのケモカインを分泌し、肺線維芽細胞の増殖を促進することが示唆された。これらの病変は経時観察では可逆性であって、肺組織からの nZnO の溶出によって増殖刺激が消失したものと考えられた。乳腺腫瘍の発生には nZnO の投与は影響しなかった。

#### アナターゼ二酸化チタニウム (anTiO<sub>2</sub>)

雌 SD ラットに 2 週投与した実験では肺組織における Mip1 $\alpha$  の蛋白発現、8-OHdG 値はルチル型より低値であった。in vitro おけるマクロファージからの Mip1 $\alpha$  発現はルチル型より低値またはその傾向が示された。さらにヒト肺線維芽細胞 (CCD3)、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型はルチル型より低値であった。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性はルチル型より弱いものと考えられた。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

- 1) Xu, J., Sagawa, Y., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Furukawa, F., Ikarashi, Y., Uchino, T., Nishimura, T., Morita, A., Suzui, M., Tsuda, H. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on ultraviolet B-initiated skin carcinogenesis in rats. Food Chem Toxicol, 49, 1298-1302, 2011
- 2) Sagawa, Y., Futakuchi, M., Xu, J., Fukamachi, K., Sakai, Y., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Suzui, M., Tsuda, H., Morita, A. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. J Toxicol Sci, 37, 317-327, 2012

##### 2. 学会発表

- 1) Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Sakai Y, Suzui M, et al. Intra-pulmonary sprayed carbon nanotubes reach the pleural cavity and induce proliferation of visceral mesothelial cells. 70th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Nagoya, 2011
- 2) 二口充, 徐結苟, 深町勝巳, 酒々井眞澄, 津田洋幸. ナノサイズ酸化亜鉛の

気管内噴霧による間質性肺炎の発生.  
第38回日本トキシコロジー学会; 横浜,  
2011

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大  
学

- 3) 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄, 徐結  
苟, 津田洋幸. 単層および多層カーボ  
ンナノチューブのマクロファージを  
介した肺がん細胞増殖促進作用. 第38  
回日本トキシコロジー学会; 横浜,  
2011

2. 実用新案登録  
該当なし  
3. その他  
該当なし

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得 (出願中)

発明の名称: ナノ粒子の吸入曝露による  
発がんリスクマーカーおよびその用途

出願日: 平成 21 年 3 月 24 日

出願番号: 特願 2009-071951

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大  
学

発明の名称: PCT 出願「ナノ粒子の吸入  
曝露による発がんリスクマーカーおよび  
その用途」

出願日: 平成 21 年 9 月 25 日

出願番号: PCT/JP2009/004848

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 津田洋幸

発明の名称: 国内優先出願「ナノ粒子の  
吸入曝露による発がんリスクマーカーお  
よびその用途」

出願日: 平成 22 年 3 月 26 日

出願番号: 特願 2010-58903

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟



平成23年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）  
「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む  
基礎的有害性情報の集積に関する研究」  
分担研究報告書

ナノマテリアルの生体内動態解析と短期的スクリーニング評価手法の開発に関する研究

研究分担者： 西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部長  
研究協力者： 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター 環境保健部長  
坂本 義光 東京都健康安全研究センター 環境保健部主任  
前野 智和 東京都健康安全研究センター 環境保健部主任  
藤谷 知子 東京都健康安全研究センター 環境保健部主任  
中江 大 東京都健康安全研究センター 医薬品部長  
杉本 直樹 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部室長  
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部主任研究官  
小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部研究員  
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部非常勤職員

#### 研究要旨

フラレン C<sub>60</sub> の代謝物として生体内に存在する可能性がある水酸化フラレン C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> を対象に、フラレン C<sub>60</sub> 及びフラレン C<sub>70</sub> を含めて、LC-MS/MS を用いた一斉分析法の開発を試みた。プローブに ESI を使用し、LC においては F5C6 系カラムを用い、移動相としてトルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離することで、3 物質ともピーク形状、分離状況、検出感度について良好な感度が得られることが明らかとなった。検液中の定量下限値は、フラレン C<sub>60</sub> が 0.1 μg/L 及びフラレン C<sub>70</sub> が 0.2 μg/L と、我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS の定量下限値に比べ、それぞれ 100 倍、50 倍高感度な定量分析が可能であることが明らかとなった。水酸化フラレン C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> についても 1 μg/L の定量下限まで測定可能であることが明らかとなった。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体への影響を検討した結果、MWCNT 投与群における血清 N-ERC/メソテリン濃度は中皮過形成の発生に伴って増加し、中皮腫の発生と進展に伴いさらに増加した。これらの結果から、N-ERC/メソテリンは、バイオマーカーとして中皮腫の発性経過や発生メカニズムの解析に利用できることが示された。また、MWCNT 繊維サイズの違いにより中皮腫誘発性の差異が認められたことから、形態は中皮腫誘発性の重要な因子のひとつと考えられた。

#### A. 研究目的

ナノマテリアルであるフラレン類は、

様々な産業用材として適用されているが、  
これらのフラレン類がヒトに曝露した場

合の健康影響、体内動態等についての情報は極めて少なく、それらの評価が急務となっている。我々が以前に行ったフラーレン C<sub>60</sub> のラットへの尾静脈投与による反復投与後の体内分布の経時変化では、臓器中に分布したフラーレン C<sub>60</sub> が殆どの臓器において経時的に減少する傾向が認められ、代謝排泄による減少の機構が推測された。そこで、フラーレン C<sub>60</sub> の生体内挙動の解明を目的に、生体内代謝産物の一つとして考えられる水酸化フラーレン C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> について、分析法の開発を試みた。

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体影響を解明する目的で、ラットにおいて、陰嚢腔及び腹腔内投与により認められた MWCNT による中皮腫誘発性の確認を行うとともに、中皮腫誘発性における用量相関性の有無、陰嚢腔と腹腔の投与部位の違いによる発現の有無、増殖性病変の進展と中皮腫のバイオマーカーとして臨床的に応用されている血清 N-ERC/メソテリン濃度との相関性について検討を行った。また、MWCNT の中皮腫の発現には繊維サイズや Fe 含有量などの物理化学的性状が影響するとの考えのあることから、性状の違う 5 種の MWCNT による中皮腫の発現に及ぼす影響を、腹腔内投与により検討した。

## B. 研究方法

### 1. 水酸化フラーレンの分析法の開発

水酸化フラーレン C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> は、合成・精製した。

フラーレン C<sub>60</sub>、フラーレン C<sub>70</sub> 及び水酸化フラーレン C<sub>60</sub>(OH)<sub>2</sub> のフラーレン類は、液体クロマトグラフィー-タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用い、電子イオン化法 (ESI) のネガティブイオンモードで、の定

性定量を行った。HPLC による分離は、Develosil RPFULLERENE、Sunfire C18、Sunfire C8 及び Discovery HS F5 のカラムを用いて検討した。移動相は、トルエン、メタノール及びアセトニトリルを用いて検討した。

### 2. MWCNT のラット腹膜中皮腫誘発性と血清 N-ERC/メソテリン濃度の変動

#### 2. 1 中皮腫誘発性における用量相関性と投与部位による影響の観察

F344 DuCr1Cr1j 12 週齢雄ラットに MWCNT (0.1、0.3、1.0 mg/kg 体重、各 12 匹:MWCNT 群)、クロシドライト (1 mg/kg 体重、10 匹:Cro 群) 及び 2% CMC (5 匹:対照群) を陰嚢腔または腹腔内に単回投与し、52 週間を目処に飼育し、中皮腫の発現を観察した。メソテリンの血清濃度測定は、ELISA 法 (サンドイッチ型 Rat N-ERC/Mesothelin Assay kit ; IBL) により行った。病理組織学的観察は常法により組織標本作製、H&E 染色およびメソテリン免疫染色 (抗ラット C-ERC/mesotelin、IBL) を施し観察した。

#### 2. 2 MWCNT の中皮腫誘発性における物理化学的性状の影響

F344 ラット (雄、10 週齢) を用い、MWNT-7 (M-CNT、長さ 1-9 μm 74.3%、>10 μm 25%、径 50-80nm 97.2%) に加えて、N 社 (N-CNT、長さ 1-9 μm 79.1%、>10 μm 21%、径 50-80nm 94.8%)、W 社 (2 種; WL-CNT、長さ 0.5-10 μm、径 85-200nm) 及び WS-CNT (長さ 0.5-2 μm、径 40-70nm) 及び T 社 (T-CNT、長さ 10-100 μm、径 20-100nm) の計 5 種の MWCNT を 2%CMC に懸濁し、1 mg/kg 体重の用量で、各群 12 匹の腹腔内に単回投与した。

## C. 研究結果及び考察

## 1. 水酸化フラーレンの分析法の開発

始めに、我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS 法によるフラーレン類の分析法を用いて、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  の定量分析が可能か検討したところ、ピーク等は観察されず、同じ条件での一斉分析は困難であることがわかった。そこで、LC-MS/MS のプローブに ESI を用いて、分析条件を検討した。まず、フラーレン  $C_{60}$ 、フラーレン  $C_{70}$  及び水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  のトルエン/メタノール溶液を調製し、キャピラリー電圧、コーン電圧の条件を順次、最適化してシリンジポンプを用いたインフュージョン法で試料溶液を MS に導入し、それぞれのスキャンスペクトログラムを確認した。その結果、フラーレン  $C_{60}$ 、フラーレン  $C_{70}$  及び水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$ 、それぞれについて、化合物由来のフラグメントがメインピークとして観察され、同様に化合物と溶媒由来の反応生成物と思われるピークも観察された。

フラーレン  $C_{60}$ 、フラーレン  $C_{70}$  及び水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  の分離は、分離カラムとして Develosil RPFULLERENE (C30 系カラム)、Sunfire C18 (C18 系カラム)、Sunfire C8 (C8 系カラム) 及び Discovery HS F5 (F5C6 系カラム) を、移動相はトルエン、メタノール及びアセトニトリルを用いて検討した。

10ppm の混合標準液を、移動相としてトルエン 70%、メタノール 15% 及びアセトニトリル 15% のアイソクラティック法の条件で測定した結果、分離カラム Sunfire C18 の場合では、3 物質のピーク形状は良好であったものの保持時間は 2~3 分に集中しており良好な分離は得られず、一方で、分離カラム Develosil RPFULLERENE では 3 物質ともに良好な分離 (フラーレン  $C_{60}$  : 約 9

分、フラーレン  $C_{70}$  : 約 11 分、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  : 約 4 分) が観察されたが、3 物質全てにおいてピーク形状が良好ではなく、ピークトップがブロードであった。次に、分離カラム Sunfire C8 を用い、移動相をトルエン 20% 及びメタノール 80% のアイソクラティック法の条件で測定した。その結果、3 物質とも良好に分離され、それぞれの保持時間はフラーレン  $C_{60}$  が約 8 分、フラーレン  $C_{70}$  が約 11 分、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  が約 4 分であった。しかし、標準液濃度 1ppm では、フラーレン  $C_{70}$  及び水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  は共にピークのテーリングが見られた。標準液 100ppb で同様の測定を行った結果、フラーレン  $C_{70}$  についてはテーリングが収まり、良好なピーク形状となったが、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  ではテーリングは収まらず、また、感度不足もみられた。次に、分離カラム Discovery HS F5 を用い、移動相をトルエン 20% 及びメタノール 80% のアイソクラティック法の条件で 100ppb の標準液を測定した結果、フラーレン  $C_{60}$  及びフラーレン  $C_{70}$  は共に良好なピーク形状及び分離を示し、また、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  のピーク形状はややテーリングしているものの、分離カラム Sunfire C8 の条件に比べて高感度であった。また、フラーレン  $C_{60}$  が 5.62 分、フラーレン  $C_{70}$  が 7.621 分、水酸化フラーレン  $C_{60}(OH)_2$  が 3.73 分と分離も良好で、10 分以内で全ての化合物が溶出することが明らかとなった。

検討の結果、分離カラム Discovery HS F5 を用いて、移動相をトルエン 20% 及びメタノール 80% のアイソクラティック法の条件で分離定量する方法が、最も良いと結論できた。図 1 に、それぞれの検量線を示した。この測定条件による検液中の定量下限値は、

定量下限値付近の低濃度標準液を 5 回測定し、標準偏差の 10 倍 ( $10\sigma$ ) を定量下限とすると、フラーレン  $C_{60}$  が  $0.1\mu\text{g/L}$ 、フラーレン  $C_{70}$  が  $0.2\mu\text{g/L}$ 、水酸化フラーレン  $C_{60}(\text{OH})_2$  が  $1\mu\text{g/L}$  であった。

## 2. MWCNT のラット腹膜中皮腫誘発性と血清 N-ERC/メソテリン濃度の変動

### 2. 1 中皮腫誘発性における用量相関性と投与部位による影響の観察

中皮腫の発現は、MWCNT-陰嚢群では  $0.3\text{mg}$  群から、MWCNT-腹腔群では  $0.1\text{mg}$  群から認められ、用量に伴って増加した。中皮腫の進展の程度は、腹腔群が陰嚢群に比べて強く現れた(表 1)。N-ERC/メソテリン濃度は、MWCNT-陰嚢腔及び腹腔群ともに  $0.1\text{mg}$  群から用量に比例して増加し、腹腔群では陰嚢群に比べ高値を示した。Cro 群では増加しなかった。MWCNT 両群における血清 ERC/メソテリン濃度は中皮過形成の発生に伴って増加し、中皮腫の発生と進展に伴いさらに増加した(図 2)。

### 2. 2 MWCNT の中皮腫誘発性における物理化学的性状の影響

WL-CNT では 26 週目より 43 週までに全例、M-CNT では投与後 32-50 週の死亡例 (4/12) と瀕死例 (7/12) 及び N-CNT では投与後 39-53 週の死亡例 (5/10) と瀕死例 (2/10) を解剖した。WS-CNT 及び T-CNT では、全例が 55 週まで生存した。投与後 55 週目に、各群の生存例 (M-CNT 1/12、N-CNT 3/10、WS-CNT 及び T-CNT 全例) を屠殺、解剖した。M-CNT、N-CNT 及び WL-CNT では、死亡例及び瀕死例を含む全例で、中皮腫に特徴的な腹腔内腫瘍結節形成と出血性腹水貯留を認めた。WS-CNT 及び T-CNT では、全例で腫瘍結節及び出血性腹水を認めなかった(表 2)。

### 2. 3 電子顕微鏡を用いた MWCNT の生体内

## 分布に関する検討

22 年度までに、動物臓器を溶解後に遠心分離することで CNT が回収できることが実証された。しかしながら、溶解残渣などの観察妨害物や、遠沈管の破裂などの問題が残った。

今年度は、溶解する動物臓器の重量を増加させつつ、CNT の紛失を防ぐために水洗工程を省略したほか、溶解液の中和、希釈を行った。この結果、CNT の紛失は防げるものの溶解残渣は取り除くことはできず、臓器重量の増加分だけ溶解残渣が増え、CNT 検出が難しくなった。界面活性剤の使用や遠心時の温度制御など、工程を工夫した結果、溶解残渣が減少することが確認出来た。

改良した方法で、溶解した 48 試料(肝臓、嗅球、脾臓、肺、脳、腎臓を各 8 試料)を走査型(SEM)電子顕微鏡で観察したが、カーボンナノチューブ(CNT)は観察されなかった。

## D. 結論

フラーレン  $C_{60}$  の代謝物として生体内に存在する可能性がある水酸化フラーレン  $C_{60}(\text{OH})_2$  を対象に、フラーレン  $C_{60}$  及びフラーレン  $C_{70}$  を含めて、LC-MS/MS を用いた一斉分析法の開発を試みた。プローブに ESI を使用し、LC においては F5C6 系カラム Discovery HS F5 を用い、移動相としてトルエンとメタノールのアイソクラティック法で分離することで、3 物質ともピーク形状、分離状況、検出感度について良好な感度が得られることが明らかとなった。検液中の定量下限値は、フラーレン  $C_{60}$  が  $0.1\mu\text{g/L}$  及びフラーレン  $C_{70}$  が  $0.2\mu\text{g/L}$  と、我々が以前に開発した LC-APCI-MS/MS の定量下限値に比べ、それぞれ 100 倍、50 倍高感度