

図1 MWCNTの抽出方法の概要

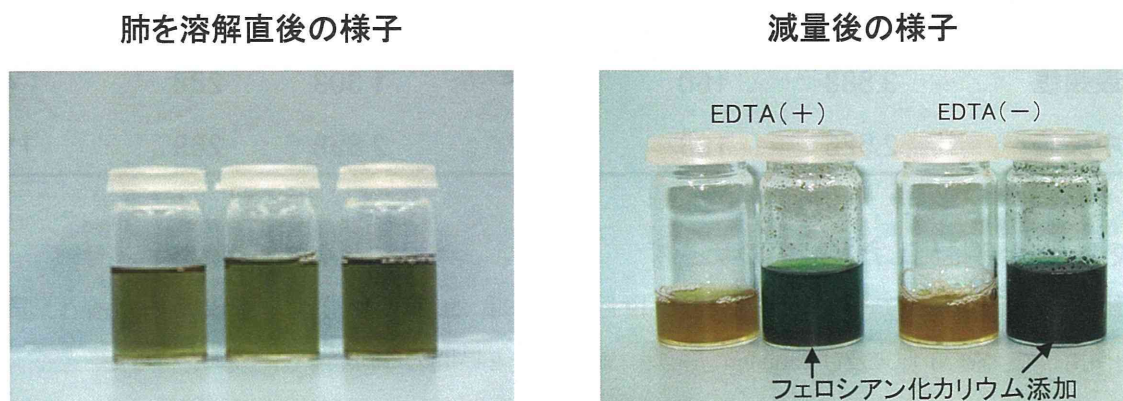


図2 肺溶解液の概観

溶解直後は淡緑色を呈しているが、次第に黄色を呈してくる。水酸化鉄によるものと考えられる。フェロシアン化カリウムを添加すると濃青色の沈殿が認められることから、鉄イオンの存在が確認された。

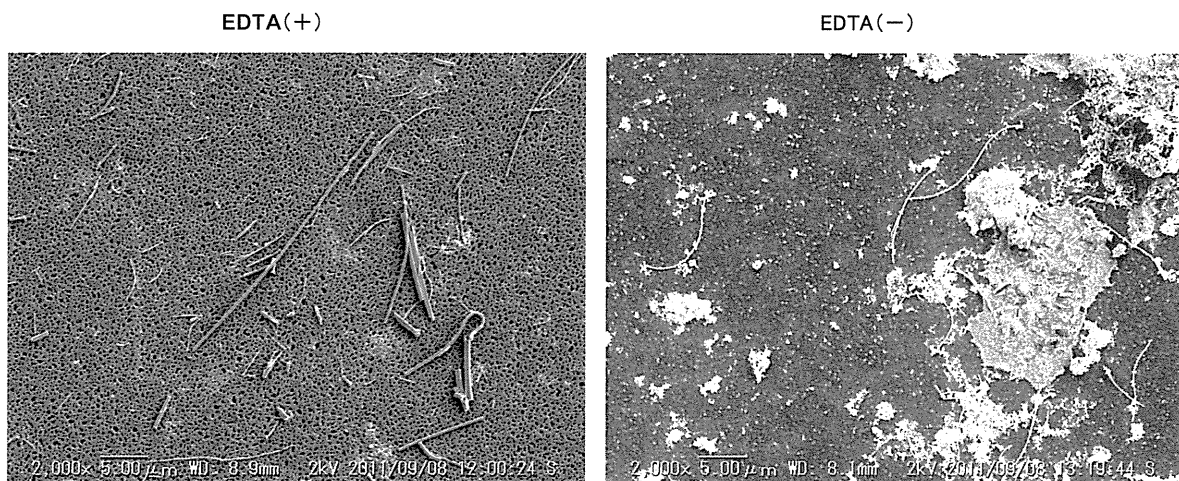


図3 肺から抽出したMWCNTのSEM像

水酸化カリウムとSDSのみでは、生体由来の夾雑物がフィルターに残り、観察の妨げになる。EDTAを添加することで、夾雑物を除去することで可能となり、SEM観察に適した試料が得られた。

	原末MWCNT			Taquann処理 MWCNT		
	繊維長 ( $\mu\text{m}$ )	繊維径 (nm)	アスペクト比	繊維長 ( $\mu\text{m}$ )	繊維径 (nm)	アスペクト比
幾何平均値	3.477	241	16.8	4.39	313	14.9
標準偏差	3.197	153	13.2	5.281	181	12.1
最大値	27.421	1103	85.8	66.430	1290	91.3
最小値	0.215	68	0.8	0.216	61	0.2
最頻値	3.588	160	10.3	1.308	288	4.7
中央値	2.526	188	13.7	2.858	269	11.4

表1 肺から抽出したMWCNTのサイズ

雄性マウス (C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、19週齢、体重 29.3-35.0 g) に、音響式ダスト発生装置を使用して、MWCNT 原末及び taquann 法処理 MWCNT を 2 時間の単回全身暴露吸入を行った。暴露濃度は  $1142.5 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (MWCNT 原末)、 $406.7 \mu\text{g}/\text{m}^3$  (taquann 法処理-MWCNT) であった。この動物から肺 (気管を含む) を採取し MWCNT を抽出して SEM で観察した。

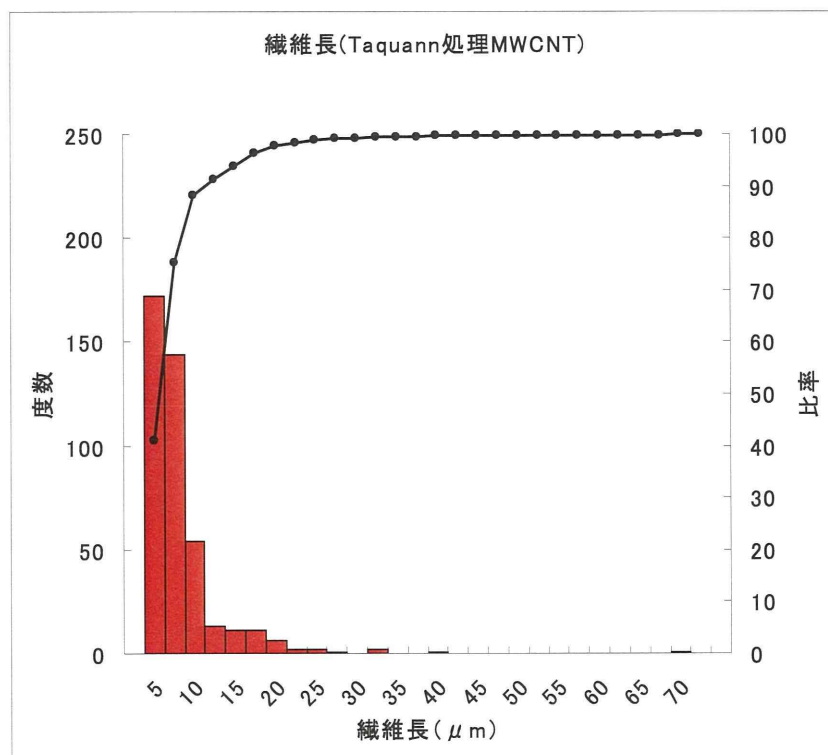
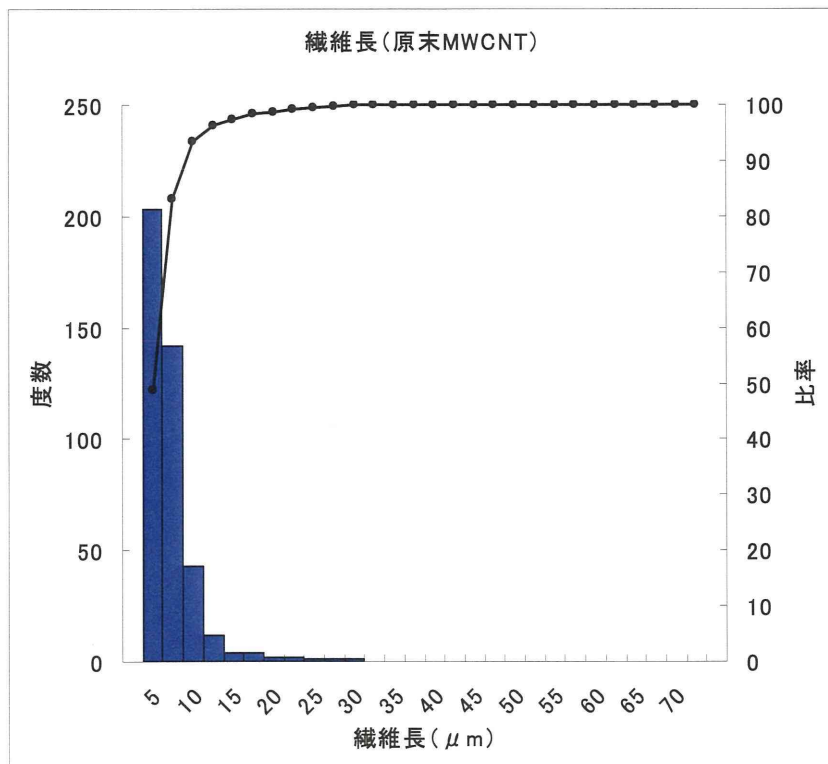


図4 肺から抽出したMWCNTの繊維長のヒストグラム

Taquann処理MWCNTは原末MWCNTに比較して、長い繊維が観察された。

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

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究

- 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究-

分担研究報告

分担研究課題 「DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析」

研究分担者 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

研究協力者 高橋祐次 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

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、雄 C57BL/6 マウスにナノマテリアルとして MWCNT を単回吸入暴露（4 時間全身暴露）後、1、3、及び 7 日目の肺を対象とした定量的なマイクロアレイ解析（Percellome 法）を行なった。曝露装置には米国 NIOSH が開発した音響式ダスト発生装置を基に毒性部が国立衛研内に設置した施設を用いた。マイクロアレイ解析の結果、免疫応答に関連する遺伝子発現が増加することが明らかとなった。また、Circadian rhythm に関係する遺伝子発現が変化していることが新たに明らかとなった。この変化については肺の炎症あるいはそれに反応した抗炎症作用に関連する可能性が考えられた。

### 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。これまでの研究で MWCNT を吸入した際の

肺への影響を分子レベルで明らかにするため、MWCNT を単回気管内投与し、1 及び 3 ヶ月後のラット肺を対象としたマイクロアレイ解析を実施した。

その結果、炎症、酸化ストレス等に関与する遺伝子の増加が明らかとなった。本研究では肺への影響を、より人で想定される曝露形態に近い全身吸入曝露により検討することとした。

## B. 研究方法

12週令の雄 C57BL/6 Cr マウス（日本チャールスリバー）に MWCNT (MWCT-7、保土ヶ谷化学) を 4 時間（9 時から 13 時まで）全身吸入曝露した。曝露装置には米国 NIOSH が開発した音響式ダスト発生装置を基に毒性部が国立衛研内に設置した独立した 3 系統からなる全身吸入曝露施設を用いた。MWCNT の曝露条件を表 1 に示す。

曝露チャンバーは 40 L/min の流量で換気した。曝露チャンバー内の MWCNT の濃度のモニタリングは、相対濃度 (count per minute; cpm) と質量濃度 (mg/m<sup>3</sup>) を並行して行った。相対濃度は曝露チャンバー内のエアロゾルを 0.1cf/min (2.83 L/min) の流量で吸引してパーティクルカウンター (OPC-110GT、柴田科学) で測定した。この情報は音響式ダスト発生装置の制御部に入力して濃度制御のフィードバック制御に使用した。質量濃度測定は 10 L/min の流量で曝露チャンバー内のエアロゾルを吸引して

MOUDI (Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX) で測定した。

曝露チャンバー内の目標とする相対濃度は 200,000 cpm とした。

曝露終了 1 時間後にマウスを曝露装置から飼育用ケージに移動した（14 時）。肺のサンプリングは曝露後 1、3、及び 7 日目の 14 時に実施した。サンプルサイズは一群当たり 3 匹を充てた。対照群には 1 系統を用いて空気のみを吸入させた。また、これらの群とは別に病理組織解析用及び MWCNT の body burden 解析用のサテライト群を設けた。吸入曝露は装置の収容匹数の制限（16 匹）から 2 回に分けて実施した。マイクロアレイ解析用肺サンプルは RNAlater (Ambion 社) で保存後 RNA を抽出、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。また、遺伝子発現の定量的比較を正確に行うために、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である 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、麻酔薬を使用し、苦痛の少ない方法を用い、本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。

Development and Function、Immune cell trafficking、Tissue development であり、特に免疫反応に関連する系の増加が注目された(図2)。

#### C, D. 研究結果及び考察

吸入曝露装置内の MWCNT 量の測定結果を表 2 及び図 1 に示す。2 回の曝露ともほぼ MWCNT の目標濃度が達成された。全遺伝子中で有意 ( $p < 0.05$ ) に増加した遺伝子数は MWCNT 曝露 1 日目で 1449 遺伝子、3 日目で 1800 遺伝子、7 日目で 365 遺伝子であった。一方、有意 ( $p < 0.05$ ) に減少した遺伝子は、MWCNT 曝露 1 日目で 455 遺伝子、3 日目で 20 遺伝子、7 日目で 431 遺伝子であった。これらの中から目視にて生物学的に意味が有ると思われる遺伝子を MWCNT 曝露 1 日目で 30 遺伝子、3 日目で 25 遺伝子、7 日目で 6 遺伝子選択した。これらは、いずれも増加遺伝子であった。選択した遺伝子を対象にパスウェイ解析を Ingenuity Pathway Analysis により実施した。特に高い確率で抽出されたのは (フィッシャー正確率検定)、MWCNT 曝露 1 日に増加する遺伝子群であった。抽出された系としては、Cell to Cell Signaling and Interaction、Hematological System

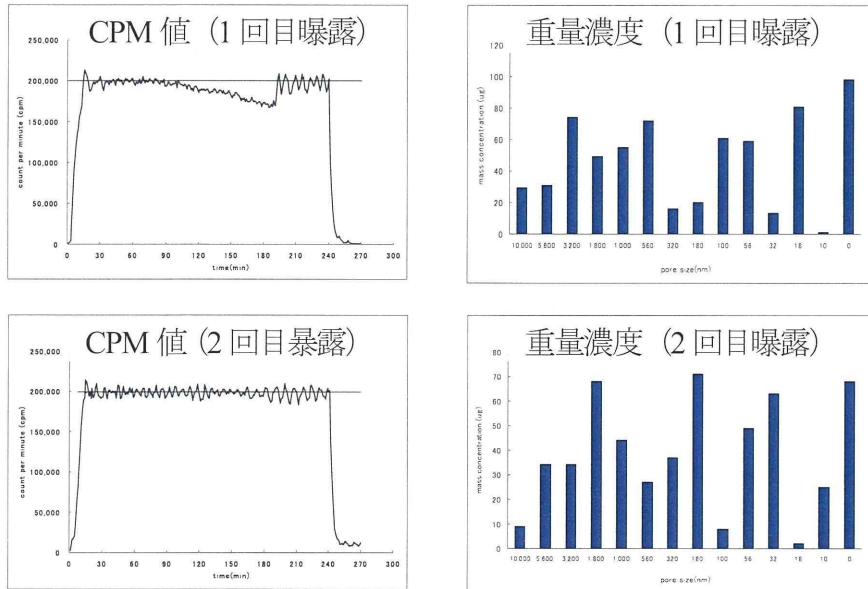


図 1. 吸入曝露時の MWCNT 量の測定結果

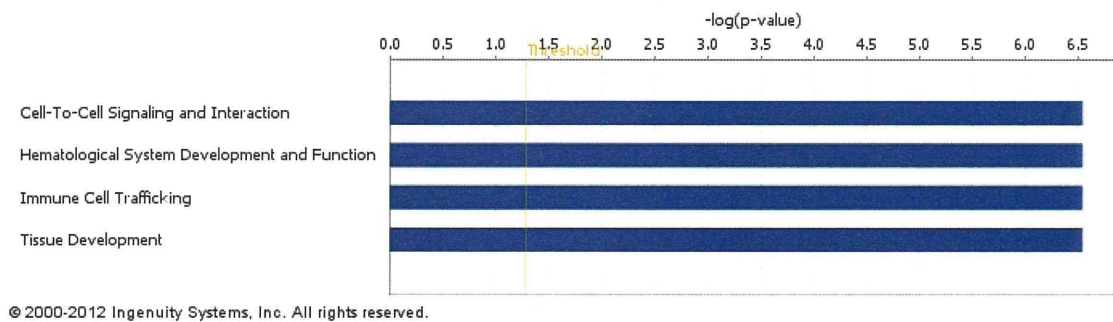


図 2. MWCNT 吸入曝露1日後に増加した遺伝子のパスウェー解析結果



個別の遺伝子発現のグラフを以下に示す。

ephrin b2(Efnb2)が1及び3日後に有意に増加した(図3)。Efnb2 は胸腺発達、末梢 T 細胞分化、抗ウイルス免疫応答に関与していることが知られている。このEfnb2 の増加についてはMWCNTに対する免疫応答に関連していることが示唆される。

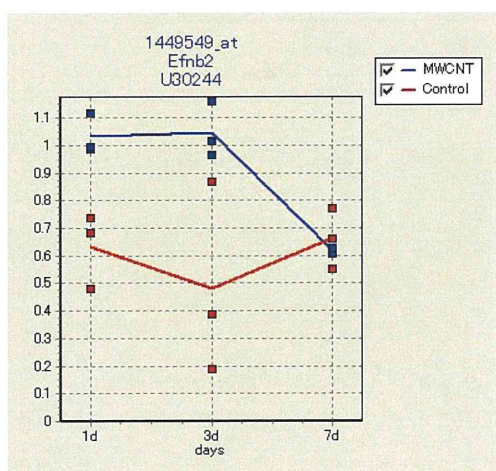


図 3. ephrin B2 遺伝子の発現増加

\* 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell)  
以下同様

Dynamin2(Dnm2)遺伝子の有意な増加が1及び3日後に認められた。Dnm2 はGTPase のメンバーであり、endocytosis に関与し、また、抗原提示細胞にも発現していることが知られている(図4)。

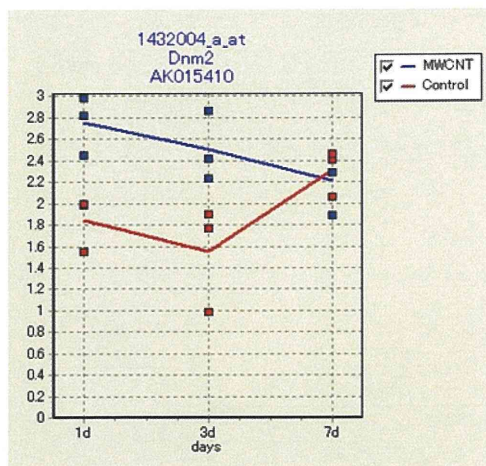


図4.Dynamin2 遺伝子の発現増加

Dual specificity phosphatase 16 (Dusp6)の有意な増加が1及び3日後に認められた。この酵素はヘルパーT 細胞分化に関与していることが知られている(図5)。

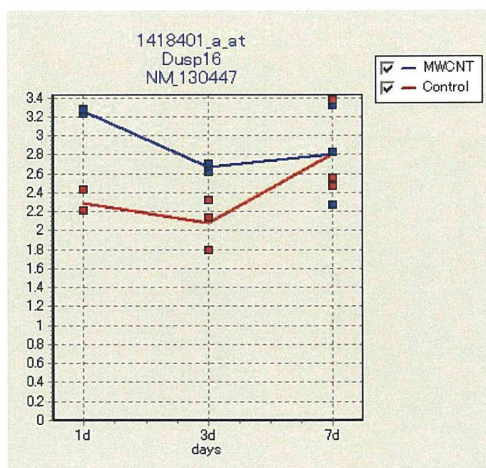


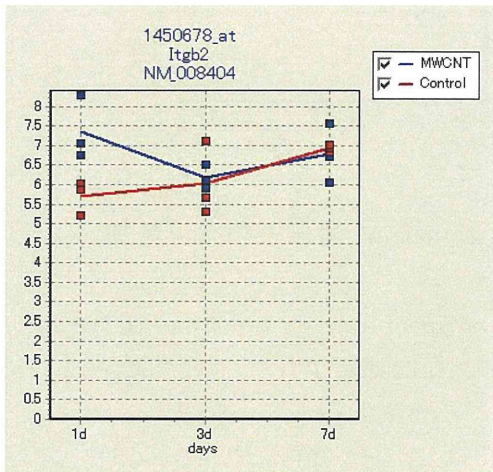
図 5. Dual specificity phosphatase 16 遺伝子の増加

Integrin beta 2 (Itgb2)の有意な増加が1日目に認められた。また、他のインテグリン分子として integrin alpha L (Itgal)が1日目に有意に増加した(図 6)。Itgb2 と Itgal のヘテロダイマーにより、Lymphocyte



function-associated antigen 1 (LFA1; リンパ球機能関連抗原)を形成することが知られている。LFA1 は T 細胞、B 細胞、白血球、マクロファージ等に発現し、抗原提示細胞と接着することにより情報伝達に関与することが知られている。

A)



B)

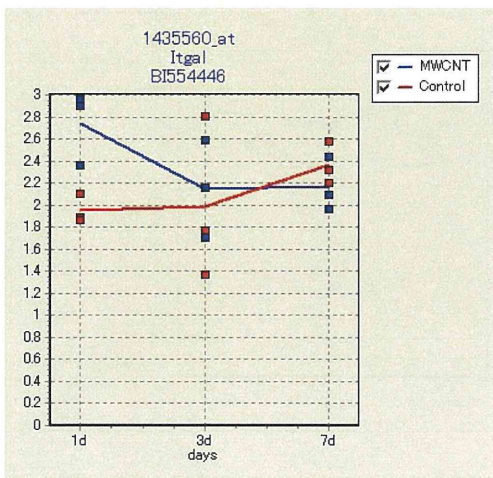


図 6. Integrin 遺伝子の増加

A) Itgb2、B)Itgal

次いで、免疫反応以外の遺伝子についてグラフで示した。ストレス応答遺伝子として知られている Heat shock protein 1B (Hspa1b)の有意な増加が1及び3日後に

認められた。

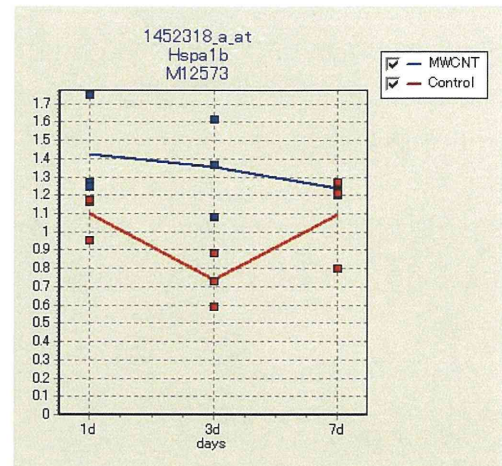


図 7. Heat shock protein 遺伝子の増加

Bone morphogenetic protein 4 (BMP4)の有意な増加が1及び3日後に認められた。BMP4 は肺の気管形成や発生期における気道上皮細胞の分化に関与していることが知られている。また、気道の急性障害における再生にも関与していることが知られている(図 8)。

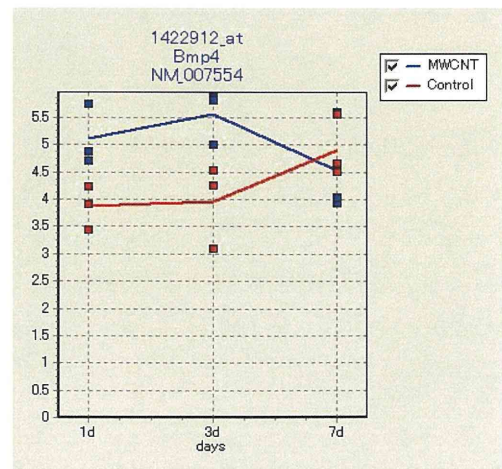


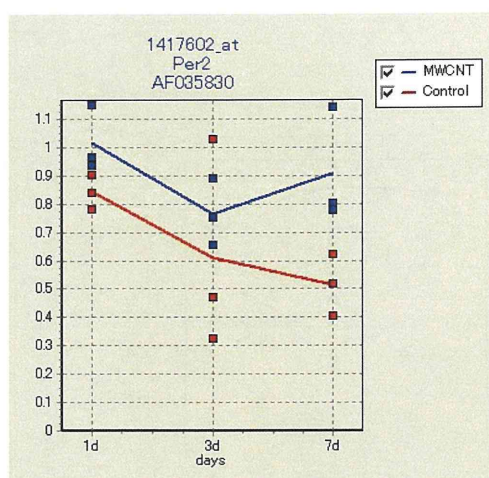
図 8. BMP4 遺伝子の増加

その他の遺伝子として、Period homolog 2(Per2)が 7 日後で有意に増加、D-site

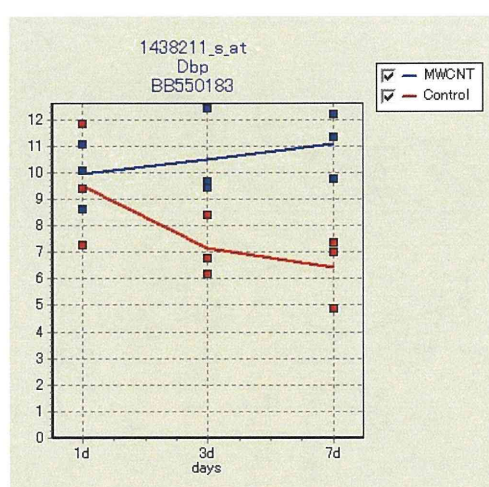
albumin promoter binding protein (DBP) が 3 及び 7 日後に有意に増加、Cryptochrome 1 (Cry1) と Nr1d2 が 3 日後に有意に増加、Casein kinase 1 delta (Csnk1d) が 1 及び 3 日後に有意に増加した。一方、Arntl が 7 日後に有意に減少した(図 9)。本実験では解剖時刻を 14 時にそろえており、少なくとも解剖時刻の違いによるバラツキの可能性は排除出来る。また、これら Circadian rhythm を示す遺伝子の既知の日内変動パターンからは、時計が進んだ可能性と遅れた可能性の両方がありうるものと考えられた。

一方で肺におけるこれらの発現変動の毒性学的意義については現時点では明らかではないが、ラットに金ナノ粒子を静脈内投与すると、肝と脾で Circadian rhythm に関する DBP と per2 遺伝子発現の増加認められたとの報告が有る<sup>1)</sup>。また、カドミウムでコートされたシリカ粒子をラットに気管内投与すると肺で Circadian rhythm に関する遺伝子の Per1、Per2、Per3、Nr1d1 遺伝子発現が増加し、Arntl、Npas2 の遺伝子発現が減少したとの報告が有る<sup>2)</sup>。さらに、Per2 のマウス肺の組織学的解析から Per2 はクララ細胞に発現してグルココルチコイド受容体と共存し、ex-vivo の実験からはグルココルチコイドは Per2 発現のピークを早める、あるいは遅らせる作用を有することが報告されている<sup>3)</sup>。前回のラット気管内投与試験においても同様の Circadian rhythm の変動が認められており(data not shown)、これらの変化は肺の炎症あるいはそれに反応した抗炎症作用に関連する可能性が考えられた。

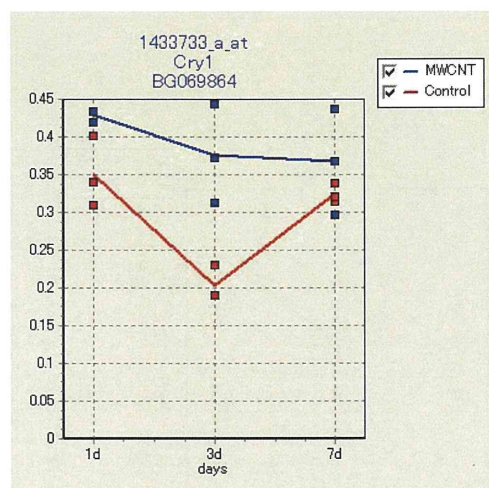
A)



B)

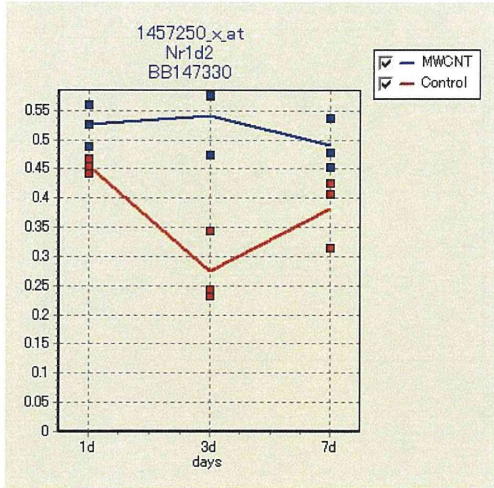


C)

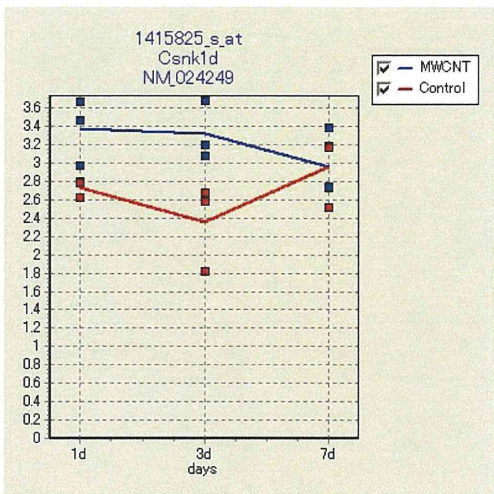




D)



E)



F)

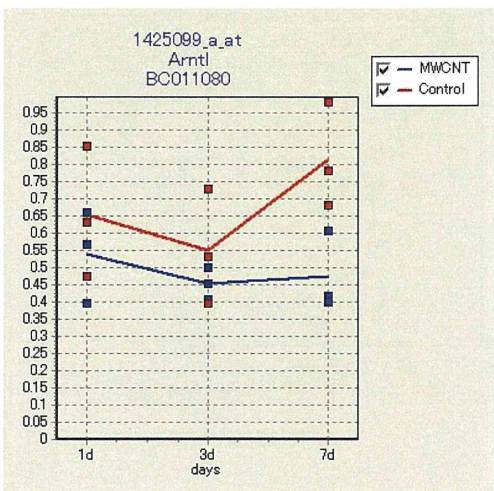


図 9. Circadian rhythm 遺伝子の変化  
A)Per2、B)DBP、C)Cry1、D)Nr1d2、  
E)Csnk1d、F)Arntl

### E. 結論

MWCNT を吸入暴露したマウス肺を対象に定量的マイクロアレイ解析を行った結果、免疫応答に関連する遺伝子の増加が認められた。また、Circadian rhythm に関する遺伝子の発現変動が認められた。

本研究の肺には、病理形態学的な病変が誘発されていることから、発現している遺伝子の由来を in situ hybridization 等により詳細に確認する作業が必要である。今後、遺伝子発現と形質発現の関係を明らかにしつつ更に解析を進める。

### F. 健康危険情報

なし

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J., Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice, *Cancer Sci.* in press, 2012.

Hirose A, Takagi A, Nishimura T, Tsuda H, Sakamoto Y, Ogata A, Nakae D, Hino O, Kanno J., [Importance of researches on chronic effects by manufactured nanomaterials]., *Yakugaku Zasshi.* 2011 Feb;131(2):195-201. Review. Japanese.

## 2. 学会発表

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) Balasubramanian S.K. et al., Biodistribution of gold nanoparticles and gene expression changes in the liver and spleen after intravenous administration in rats, Biomaterials, 31, 2034-2042, 2010.
- 2) Coccini T. et al., Gene expression analysis in rat lungs after intratracheal exposure to

nanoparticles doped with cadmium, J. Physics, Conference Series, 304, 012025, 2011.

- 3) Gibbs J.E. et al., Circadian timing in the lung; A specific role for bronchiolar epithelial cells, Endocrinology, 150, 268-276, 2009.

表 1. MWCNT の吸入曝露条件

---

相対濃度設定値:	200000 cpm/2.83L/min (70671 cpm/L/min)
粉塵発生装置からの流量:	2L/min
音響条件:	基底周波数:20Hz 最大周波数:30Hz 周波数の変化周期:10 秒 電圧ボリューム開度:1/2(約 1.5V)
PID:	P;0.481、I;16.3sec、D;2.42sec
暴露時間:	4時間(9:00~13:00)

---

表 2 吸入曝露時の MWCNT 量測定結果

---

1 回目	
重量濃度:	274.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
平均相対濃度:	186,228 cpm/2.83L/min (65,805 cpm/L/min)
k値:	4.2 pg/cpm/ $\text{m}^3$
2回目	
重量濃度:	224.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
平均相対濃度:	191,403 cpm/2.83L/min (67,634 cpm/L/min)
k値:	3.3 pg/cpm/ $\text{m}^3$

---

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  
 ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究  
 - 全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究 -  
 分担研究報告

分担研究課題

「強制経気道投与方法を用いた粒子状物質の呼吸器への生体影響に関する研究」

研究分担者	相磯 成敏	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	病理検査部
研究協力者	梅田 ゆみ	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	妹尾 英樹	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	齋藤 美佐江	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	高信 健司	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	近藤 ひとみ	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	戸谷 忠雄	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部
	山崎 一法	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	加納 浩和	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	鈴木 正明	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部
	酒井 俊男	酒井電子顕微鏡応用研究所	

研究要旨

Multi wall carbon nanotubes (MWCNT) の健康影響評価手法に関する研究として、実際にヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定したマウスを用いた全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験の詳細検索を三か年計画で実施する。本研究班では針状タイプのMWCNT (MWNT-7、三井) を共通の研究対象とし、雄性C57BL/6J マウスを用いて動物実験を行うことに統一した。初年度は各研究分担者が、それぞれの分担研究分野で研究班全体の研究基盤構築に寄与する研究を行った。本分担研究では、マウス気管内投与器具の開発と投与技術を確立し、MWCNT原末を高度に分散処理したMWCNT (Taquann法処理-MWCNT) を用いて単回気管内投与による28日試験と3ヶ月試験を実施した。28日試験では気管支肺胞洗浄液を採取して各パラメータを測定した。その結果、高度に分散処理した針状型MWCNTではこれまで報告されている10 μg/匹よりもさらに低い3.3 μg/匹で肺に影響が認められることが示された。病理組織的検索を目的とした3ヶ月試験では、投与後3ヶ月の解剖を終え、現在、病理組織標本の作製を進めている。先行研究（平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究（福島班）で得られたMWCNT気管内投与ラット肺サンプルの透過型電子顕微鏡による検索を行い、針状MWCNTによる肺胞壁/胸膜でのリンパ流路の循環障害が中皮細胞に二次的な変性を引き起こす知見を得た。

## A. 研究目的

粒子状物質のヒトへの暴露は吸入による経気道経路が主な暴露経路であるが、粒子の形状、長さ、太さ、粒子表面の物理化学的性状、金属不純物等がその毒性発現に関与し、単粒子/繊維に分散したものと大きな凝集塊を形成したものでは、肺への到達深度が異なり、その毒性発現も異なる。多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の呼吸器毒性も暴露されるCNTのサイズによって異なると予想される。製品として販売されているMWCNT原末には、単繊維に分散したものと大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれており、先行研究の平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究（福島班）では、MWCNT原末の気管内投与によるラットへの毒性影響を調べて、一定の成果を得た。ヒトが吸入暴露を受けた際、大きな凝集塊は上部気道でトラップされて除去されるため、肺には分散したMWCNTが暴露されるという低濃度域での暴露が予想される。本分担研究では、実際にヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した高度に分散したMWCNTの気管内投与によるマウスを用いた短期間の実験を行って、呼吸

器を主体とした毒性影響を、光学顕微鏡レベルの検索と超微細形態レベルでの検索を併用して検索する。また、先行研究（平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究（福島班）で得られたMWCNT気管内投与ラット肺サンプルについて透過型電子顕微鏡によるMWCNTによる肺毒性の病態解析を進める。

## B. 研究方法

B-I MWCNTのマウスへの気管内投与方法の検討

- ① 気管内投与器具の開発、投与量の検討、および投与状態の確認

マウスに投与する際、ゾンデを無理なく気道に挿入して気道粘膜を傷つけることがなく、検体を正確な量で肺内に均一に投与することが可能な気管内投与器具の開発をめざして、医療・実験用汎用器具の中からシリンジと投与ゾンデを組み合わせることで検討することとした。DIMS型経気道ゾンデ、Model M-1（（株）DIMS 医学研究所）と同等以上の気管内投与器具の開発を目指した。シリンジとしてはガスクロ用ガスタイトシリンジ、ツベル

クリン用ディスポーザブル1mm1 シリンジ等から、ツベルクリン用ディスポーザブル1mm1 シリンジを選択し、気管内投与用ゾンデは注射針の中からマウスの気管内径に合わせたものを選択することとした。開発した気管内投与器で所定の液量を正確に注入することができることを、蒸留水30 $\mu$ lと50 $\mu$ lを気管内注入器のツベルクリン用シリンジ内に吸い上げ、その全量を電子天秤の上に載せた薬包紙に吹き出すことで実際に注入できる液量を検証した。

投与技術の習熟には Cr1j:CD1(ICR) マウス(日本チャールスリバー)の雌120 匹を導入して繰り返し練習開始し、この過程でマウス1匹あたりの投与量、投与方法を決定した。その後実際に実験に用いる C57BL/6J マウス(日本チャールスリバー)の雄24 匹を導入して投与練習の仕上げをおこなった。

気管内投与方法は、先行研究(平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究(福島班))でラットの気管内投与に用いた方法をマウスに応用した。

以上によって、気管内投与のゾンデを無理なくマウスの気道に挿入して気道粘膜を傷つけることがなく、検体を正確な量で肺内に均一に投与することが可能とする準備をおこなった。

## ② MWCNT 懸濁液の調整

MWCNT 原末を高度に分散処理した MWCNT (Taquann 法処理-MWCNT、高橋主任研究官、国衛研究所毒性部；全身吸入暴露による生体影響を分担研究) から提供を受け、この Taquann 法処理-MWCNT を所定の用量となるように滅菌生理食塩水に Tween80を0.1%添加した媒体に懸濁させ、超音波で分散させた。

Taquann 法処理-MWCNT の投与用量は 1.1、3.3、10 $\mu$ g/匹の3段階(公比3)とし、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。なお、対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用した滅菌生理食塩水に Tween80を0.1%添加したものを投与(0.03ml/匹)した。Taquann 法処理-MWCNT 懸濁液は、気管内投与直前に超音波により再度分散させた。気管内投与は投与液0.03mlの全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気0.17mlで押し込むことによって肺内に注入した。

## ③ Taquann 法処理-MWCNT 懸濁液の分散状態及び形状の確認

気管内投与に用いた Taquann 法処理-MWCNT 懸濁液をメンブランフィルターに滴下、白金蒸着した試料を走査型電子顕微鏡的に観察し、分散状態および形状を観察した。さらに、分散した MWCNT の繊維長と幅の平均値を、計測可能な繊維約

500本（繊維長の計測：507本、繊維幅の計測：500本）を用いて算出した。

## B-II 亜急性試験による肺毒性の検出

雄性 C57BL/6J マウス（日本チャールスリバー）に Taquann 法処理-MWCNT を0、1.1、3.3、10  $\mu$ g/匹の用量で単回気管内投与を行い、気管支肺胞洗浄液を採取して生化学的検査、細胞学的検査を行う実験（B-II-(1)）と、肺の病理組織学的検査を行う実験（B-II-(2)）を実施した。

マウスは、生後11週齢で導入し、1週間の検疫・順化の後、12週齢で群分けを行って実験に供試した。気管支肺胞洗浄液を採取する実験には134匹を導入して112匹を実験に供試した。病理組織検査を行う実験には96匹を導入して80匹を実験に供試した。供試動物の各群への割り当て（群分け）は、投与前日に行い、体重の重い順より各群に1匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した。動物の飼育はステンレス製金網ケージにて個別飼育し、室温 $24 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 5\%$ 、12時間点灯（8:00～20:00）の環境下で、固形飼料（CRF-1、オリエンタル酵母工業）と水道水（フィルターろ過した後、紫外線照射）を自由に摂取させて飼育した。一般状態

の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を週1回測定した。

気管内投与に用いる MWCNT 懸濁液の調整は、Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に設定濃度となる様、MWCNT を加え超音波を用いて懸濁しておこなった。MWCNT 懸濁液は用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散させた。対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用した滅菌生理食塩水に Tween80を0.1%添加したものを0.03ml/匹投与した。気管内投与はイソフルランの吸入による麻酔下でステンレス製カニューレ（24G）を使用して MWCNT 懸濁液を気管内に投与した。投与用量は1.1、3.3、10  $\mu$ g/匹の3段階（公比3）とし、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。なお、対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用した滅菌生理食塩水に Tween80を0.1%添加したものを0.03ml/匹投与した。気管内投与に際して、投与カニューレ（24G）に装着したシリンジ内に MWCNT 懸濁液とともに空気0.17mlを充填して置き、この空気を MWCNT 懸濁液の後から肺内にピストンで押し込むことによって MWCNT 懸濁液0.03mlの全量を注入した。

なお、投与濃度は MWCNT のマウス肺への影響として報告されている最も低い濃度を本実験の最高投与濃度とした。すなわち、D.W.Porter et al. (2010)の報告（文献2）で、MWCNT を咽頭から吸引させ

た C57BL/6J マウスの肺に10  $\mu$ g/匹以上の群に毒性変化 (BAL 中のマクロファージの数、LDH、Albumin の有意な増加) が認められたことから、本試験では、10  $\mu$ g/匹を最高用量とし、中間用量を3.3  $\mu$ g/匹、最低用量を1.1  $\mu$ g/匹 (公比3) とした。

B-II-(1) 気管支肺胞洗浄液の生化学的検査、細胞学的検査を行う実験：

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本チャールスリバー)112匹を28匹ずつ4群に分け、各群に MWCNT を 0、1.1、3.3、10  $\mu$ g/匹の用量で単回気管内投与した。MWCNT 0  $\mu$ g/匹投与群には懸濁媒体の Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水0.03ml を投与した。投与後1、3、28日にネンブタール(ソムノペンチル、共立製薬株式会社)の20倍希釈液(生理食塩水、用時調整)を0.1 ml/10g bw の投与用量にて腹腔内投与することによる麻酔下で気管支肺胞洗浄液を採取して、生化学検査で総蛋白、アルブミン、ALP、LDH、並びに細胞学的検査で総細胞数、マクロファージ・白血球分画の各パラメータを測定ないし計測して肺毒性を調べた。動物は気管支肺胞洗浄液を採取後に腹大動脈より放血して安楽死させた。

気管支肺胞洗浄液の採取は滅菌生理食塩水1ml を気管から自然落下で注入、注入した洗浄液で二度両肺を洗浄して回収

した(洗浄液回収容器の液面を $\pm$ 25cm の高さで二度上下して洗浄)。採取した気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査では、総細胞数を ADVIA 120で計数、細胞分画は700回転/分、5分で遠心(55g)して収集、メイギムザ染色をした塗沫標本を作製して光学顕微鏡下で一匹につき600以上の細胞をを分類して各血球成分の比率を求めた。ADVIA 120で計数した1 $\mu$ l 当たりの総細胞数に各細胞成分の比率を乗じて各細胞分類毎の1 $\mu$ l 当たりの細胞数を求めた。生化学的検査の乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、総蛋白、アルブミン量の計測は自動分析装置(日立 7080型自動分析装置)で行った。

B-II-(2) 肺の病理組織学的検査を行う実験：

12週齢の雄性 C57BL/6J マウス(日本チャールスリバー)80匹を20匹ずつ4群に分け、各群に MWCNT 0、1.1、3.3、10  $\mu$ g/匹の用量で単回気管内投与した。MWCNT 0  $\mu$ g/匹投与群には懸濁媒体の Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水0.03ml を投与した。投与後1、7、28、91日に各群5匹の動物をネンブタール(ソムノペンチル、共立製薬株式会社)の20倍希釈液(生理食塩水、用時調整)を0.1 ml/10g bw の投与用量にて腹腔内投与することによる麻酔下で腹大動脈より放血して安楽死させて解剖した。肉眼的に臓器の異常を

調べ、肺重量を測定、全動物について、皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、腹壁等）、胸腺、脾臓、心臓、舌、唾液腺、食道、胃、小腸（十二指腸を含む）、大腸、肝臓、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精嚢、前立腺、乳腺、脳、脊髄、末梢神経（坐骨神経）、眼球、ハーダー腺、筋肉、骨（大腿骨）、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保存した。現在、病理組織学的検査のために10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で保存した臓器から、肺と縦隔の肺関連リンパ節組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製している。また、肺の線維化の状態を調べるためにシリウスレッドまたはマッソン・トリクローム染色標本作製した。現在、病理組織学的検索を進めている。MWCNT 繊維の幅は光学顕微鏡の解像度未満であるため、MWCNT 繊維の呼吸器内沈着状態については、走査型電子顕微鏡や透過型電子顕微鏡による超微細形態学的検索を併用して行っている。

### B-III MWCNT 気管内投与ラット肺サンプルの電子顕微鏡による亜急性毒性病態の解析

研究に使用した材料は、平成20-22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、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究（福島班）での研究で保存した MWCNT 気管内投与ラット肺サンプルを用いた。0.1% Tween 80 添加した生理食塩水に懸濁させた MWCNT（MWCNT-7）160 $\mu$ g/匹を13週齢の F344雄ラットに単回気管内投与し、投与後28日にネンプタール（ソムノペンチル、共立製薬株式会社）麻酔下で開腹、生理食塩水を肝門脈より注入、Glutaraldehyde0.5%を添加した2%Paraformaldehyde溶液でラットの上半身を灌流した後、頸静脈から灌流液を排出した。灌流液が透明に変化した後、固定液に切り替え、灌流固定を行った。灌流固定後、胸腔内臓器を一括摘出した。胸腔内臓器を、寒天ブロックに包埋。寒天ごと厚さ0.5-0.8mmの胸腔内臓器の全切断連続スライスを行った。この胸腔内臓器全切断組織をOsmium tetroxideで後固定、エポキシ樹脂で平板包埋を行った。エポキシ樹脂包埋ブロックから肺組織を切り出して1~2 $\mu$ m厚のセミシン標本作製、光学顕微鏡で電顕検索の標的ポイントを肺胞壁、腫脹/肥厚した肺胸膜、腫大した中皮細胞に絞り込んだ。セミシン標本から、絞り込んだ標的ポイント含む組織片約2mm $\times$ 1mmを切り取って、エポキシ樹脂に再包埋、超薄切切片を電顕用試料とした。JEM-1400で観察、一部の試料は、H-800

でフィルム写真を撮影した。

統計処理については、対照群と投与群の間の有意差の検定をStudentのt検定によりおこないP値が0.05未満の場合を有意と判定した。

## C. 研究結果

### C-1 MWCNTのマウスへの気管内投与法の検討

#### ① 気管内投与器具の開発、投与量の検討、および投与状態の確認

気管内投与用ゾンデは24G注射針の鋭利な先端部を切断、その断端を砥石で丸めたものをツベルクリン用ディスプレイ1mlシリンジに装着して使用する事とした。作製した気管内投与用ゾンデはマウスの咽頭から気管内にスムーズに挿入できるように撓めて使用し、また先端部分にテフロン製留置カニューレの先端部分を装着した(図1)。これによってマウスに投与する際、無理なくゾンデを気道に挿入することができ、気道粘膜を傷つけることがない投与器具を開発した。この投与器具を用いることで、イソフルランによる吸入麻酔下に安定して気管内投与を実施できることを確認した。

この気管内投与器で所定の液量が注入できるかを検証した結果を図2に示した。これは蒸留水 $30\mu\text{l}$ と $50\mu\text{l}$ をツベルクリン用シリンジに刻まれた目盛りによって目視で吸い上げたもので、 $30\mu\text{l}$ と

$50\mu\text{l}$ ともに15回の測定結果は良好であり、実験に十分使用できる精度で気管内投与が可能であることが示された。実際にマウスに墨汁を投与して肺の状態を確認した結果、被験物質懸濁液の肺内注入量は $0.05\text{ml}$ でも十分肺の各葉に均一に分布する(図3)が、時として気管内に注入した投与液が喉頭から溢れることもあり、 $0.03\text{ml}$ が適当であると判断した。その際、投与液全量をシリンジ内の被験物質懸濁液の後方に満たした空気 $0.17\text{ml}$ で後ろから肺内に押し込んで注入する方法を採用することにした。

#### ② MWCNT懸濁液の調整

Taquann法処理-MWCNTはTween80を0.1%添加した滅菌生理食塩に懸濁させて超音波をかけることで良く分散した。目視、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡(図4)で懸濁液の分散状態は良好であることが示された。

#### ③ Taquann法処理-MWCNT懸濁液の分散状態及び形状の確認

気管内投与に用いたTaquann法処理-MWCNT懸濁液のMWCNTの分散状態は良好で、針状のものが多く、一部に凝集したMWCNTが認められた。分散した針状MWCNTの繊維長(507本計測)は平均 $4.7\mu\text{m}$ (SD $3.38\mu\text{m}$ 、図5)で $10\mu\text{m}$ 以上の繊維の占める割合は6.9%であった。繊維径(500本計測)は平均 $70.7\text{nm}$ (SD $22.5\text{nm}$ 、図6)