

であった。Taquann 法処理-MWCNT の走査電子顕微鏡像の例を示す。この繊維は繊維長4.75 $\mu$ m、繊維幅70.16nmであった(図7)。

C-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：

体重推移に関しては気管内投与後1日、3日及び4週のいずれも媒体対照群、Taquann 法処理-MWCNT 投与群で同様の推移を示し、Taquann 法処理 MWCNT の影響を認めなかった(表1、2、3)。

気管支肺胞洗浄液の回収は、1日、3日及び4週に媒体対照群、Taquann 法処理-MWCNT 投与群のいずれも80-85%の回収率を示し良好であった(図8)、気道閉塞時に起きる気管支肺胞洗浄液の回収率低下はみられなかった。

気管支肺胞洗浄液の生化学検査結果では、総蛋白、アルブミンは10 $\mu$ g/匹投与群で投与後1日から4週まで有意に増加がみられ、その値は投与後1日が最も高く、投与後4週に向かって漸減した(図9、10)。3.3 $\mu$ g/匹投与群では総蛋白が投与後1日と3日で、アルブミンが投与後3日と7日に有意な増加がみられた。総蛋白、アルブミンのこれらの変化は気管内投与後の肺毛細血管の透過性の亢進を示唆した。LDH は10 $\mu$ g/匹投与群で投与後1日から7日まで有意に増加がみられ、その値は投与後1日から漸増がみられるが、投与7日

をピークとして投与後4週には対照群のレベルまで回復した(図11)。3.3 $\mu$ g/匹投与群では投与後3日と7日に有意な増加がみられた。LDH の変化は動員された肺胞マクロファージの傷害を示唆するものと考えた。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査結果では、総細胞数が10 $\mu$ g/匹投与群で投与後1日から28日まで投与後7日をピークとした有意に増加がみられた。3.3 $\mu$ g/匹投与群にも投与後7日に有意な増加がみられた(図12)。

マクロファージ数は投与後28日に10 $\mu$ g/匹投与群で有意な増加がみられた。なお、投与後1日に1.1 $\mu$ g/匹投与群で有意な減少がみられたが投与用量に対応した変化ではなかった。(図13)。

白血球数(好中球)は10 $\mu$ g/匹投与群で投与後1日から28日まで投与後7日をピークとした有意に増加がみられた。3.3 $\mu$ g/匹投与群も投与後1日から7日に有意な増加がみられた(図14)。

C-II-(2) 肺の病理組織学的検査を行う実験：

体重推移は気管内投与後1日、1週及び4週後に解剖した群では、いずれも体重増加に Taquann 法処理-MWCNT 投与による影響を認めなかった(表4、5、6)。気管内投与後13週に解剖した群では、10 $\mu$ g/匹投与群で軽度な体重増加抑制がみられた

(表7、図15)。

肺(両側)重量は、 $10\mu\text{g}$ /匹投与群で投与後1週に有意に増加したが、その後は対照群との間に差はなかった(表8)。

病理組織的検査については、現在、組織標本の作製を進めている。

### C-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

肺胞壁から胸膜に続く肺間質に微小肉芽と広汎な水腫が認められた。中皮細胞には水腫性変化が認められ(図16)、この中皮細胞変化は肺胸膜の基底膜下にみられる間質水腫に继发した変性性の変化と考えた。(間質の水腫は肺胞壁内に移行したMWCNTやMWCNT貪食マクロファージによるリンパ流路の栓塞、鬱滞が原因と考えられた。

### D. 結論

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)の提供を受けて単回気管内投与による28日試験と3ヶ月試験と実施した。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 $10\mu\text{g}$ /匹よりもさらに低い $3.3\mu\text{g}$ /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)で保存した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/壊死を引き起こす知見を得た。今後、各分担研究と連携して針状MWCNTによる腫瘍性及び非腫瘍性病変の誘発に関わる背景、経過、要因を経時的に解析する予定である。

### E. 健康危機情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

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.

○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: 215-220.

## 2. 学会発表

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：2011年、第27回日本毒性病理学会、P-103

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-ブロモ-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：2011年、第27回日本毒性病理学会、P-014

○相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の肺を中心とする有害性：2011年、第26回発癌病理研究会、演題11

○相磯成敏、笠井辰也、齋藤美佐江、戸谷忠雄、西沢共司、有藤平八郎、長野嘉介、福島昭治：多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の全身吸入曝露 2)ラットを用いた単回吸入曝露実験、2011年、第84回日本産業衛生学会、P-1-107

妹尾秀樹、梅田ゆみ、高信健司、山崎一法、戸谷忠雄、鈴木正明、加納浩和、相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の気管内投与後28日のラット肺における間質と中皮細胞の超微細形態学的変化、2012年、第85回日本産業衛生学会（演題登録済み）

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

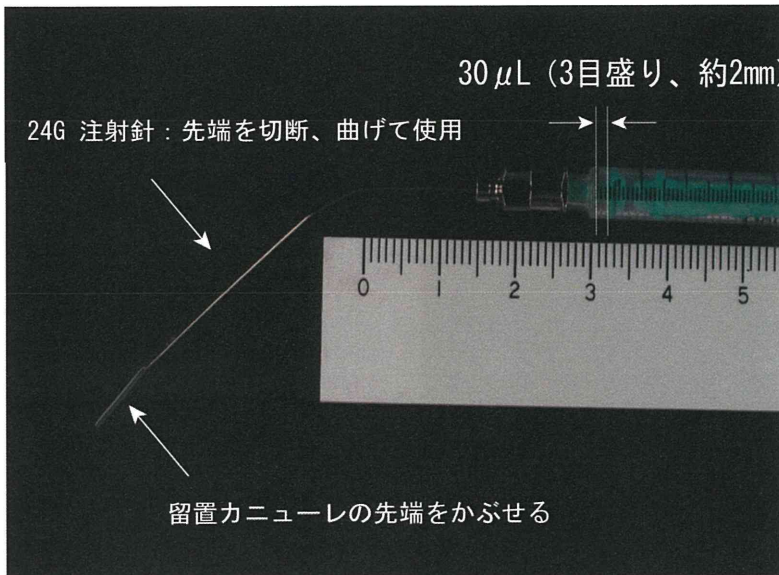
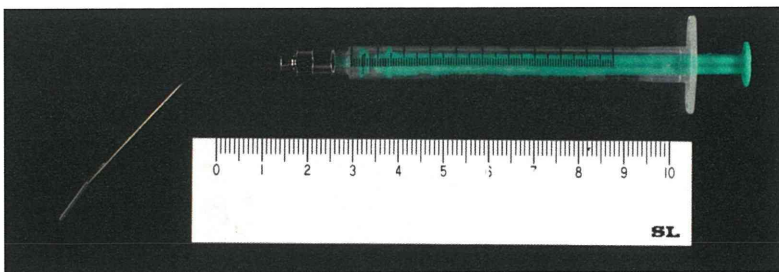


図 1. 気管内投与器具

	水 30 $\mu$ L	水 50 $\mu$ L
1	0.029	0.051
2	0.037	0.049
3	0.029	0.050
4	0.021	0.052
5	0.034	0.059
6	0.030	0.055
7	0.031	0.053
8	0.032	0.053
9	0.035	0.048
10	0.041	0.053
11	0.032	0.050
12	0.031	0.054
13	0.035	0.049
14	0.035	0.055
15	0.033	0.045
Ave	0.032	0.052
S.D.	0.004	0.003
MIN.	0.021	0.045
MAX.	0.041	0.059

蒸留水 30  $\mu$ L (左列)、50  $\mu$ L (左列) を気管内注入器のシリンジ内に吸い上げて、電子天秤の上に乗せた薬包紙にシリンジ内に吸い上げた蒸留水を吹き出して秤量した。15回の秤量した平均値と標準偏差は 32mg  $\pm$  4 (左列)、52mg  $\pm$  3 (右列) であった。本分担研究で開発した気管内投与器具を用いることで設定どおりの投与が可能であることが示された。

図 2. 気管内投与器具の検体吹き出し量の検証



図 3. 墨汁 50  $\mu$  L を気管内投与直後のマウスの肺

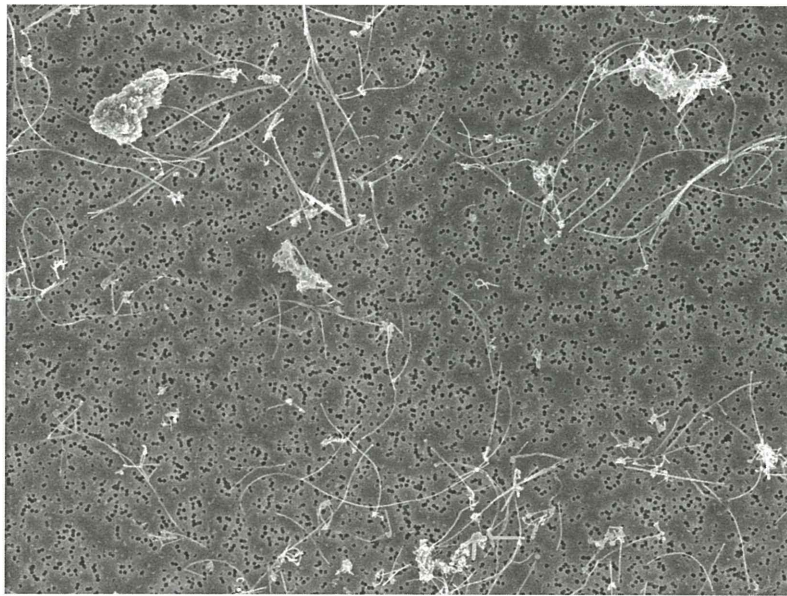


図 4. Taquann 法処理-MWCNT 懸濁液の走査電顕像

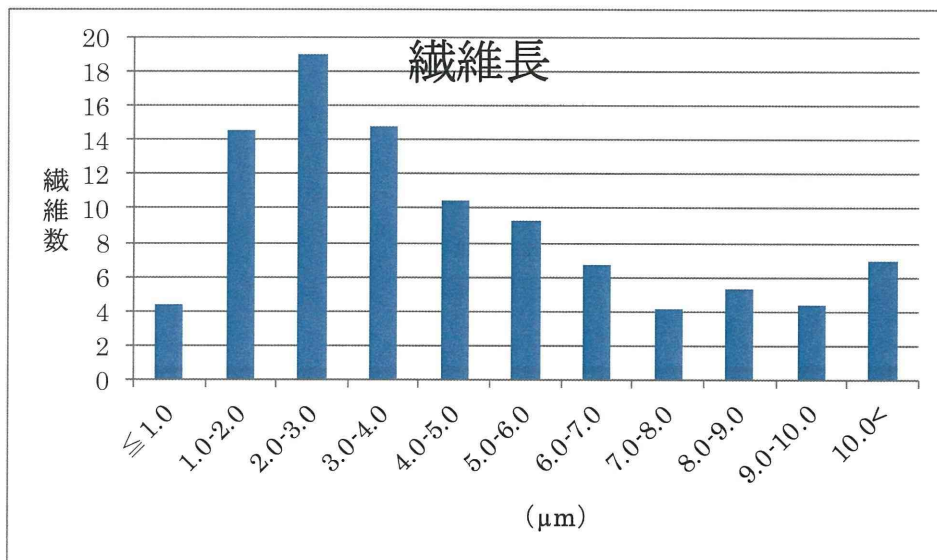


図 5. Taquann 法処理-MWCNT の繊維長



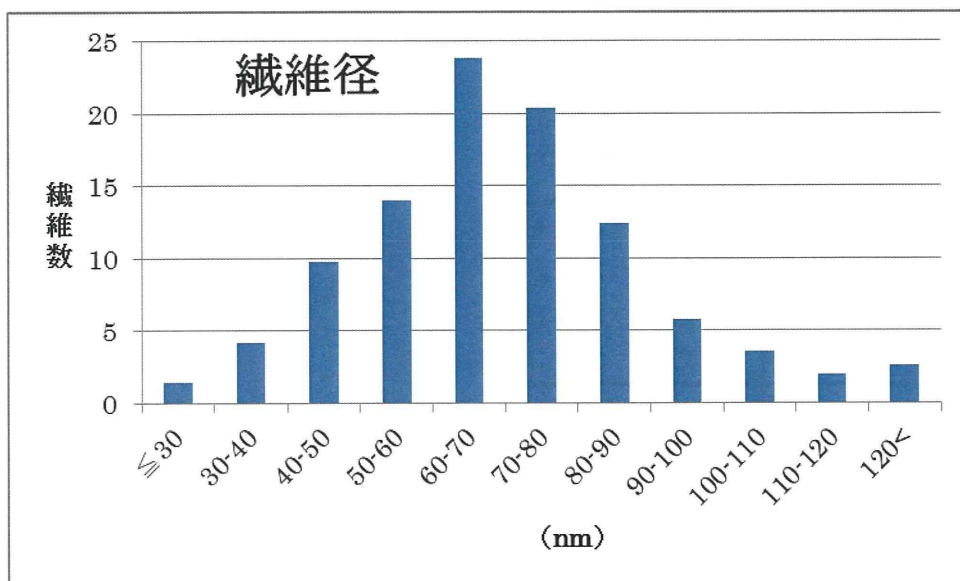


図 6. Taquann 法処理-MWCNT の繊維径

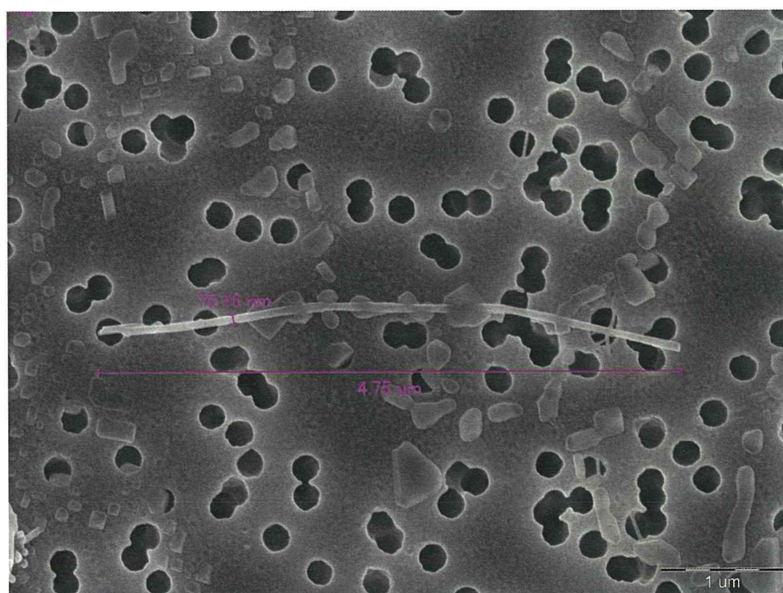


図 7. Taquann 法処理-MWCNT 懸濁液の走査電顕像

写真中央：ゆるやかに湾曲した MWCNT 繊維（繊維長 4.75 $\mu$ m、繊維幅 70.16nm）

MWCNT 繊維周囲の結晶は懸濁媒体（生理食塩）に含まれる塩化ナトリウム。

表 1. 気管内投与後 1 日に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差	
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日 1日
Control	7	275 ± 1.6	27.3 ± 1.6
1.1 μg	7	273 ± 1.2	27.3 ± 1.9
3.3 μg	7	275 ± 1.9	27.4 ± 2.0
10 μg	7	275 ± 1.4	27.3 ± 1.3

表 2. 気管内投与後 3 日に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差		
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日	
			1日	3日
Control	7	273 ± 1.7	27.2 ± 1.9	27.2 ± 1.6
1.1 μg	7	271 ± 1.1	27.0 ± 1.2	27.1 ± 0.9
3.3 μg	7	268 ± 1.2	26.5 ± 1.6	26.5 ± 1.4
10 μg	7	272 ± 1.7	27.1 ± 1.7	27.3 ± 1.7

表 3. 気管内投与後 4 週に BALF 採取群の体重

投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差					
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日/週				
			1日	1週	2週	3週	4週
Control	7	275 ± 1.5	27.1 ± 1.3	27.7 ± 1.8	28.2 ± 1.5	28.0 ± 1.1	28.7 ± 1.5
1.1 μg	7	267 ± 1.2	26.7 ± 1.1	26.9 ± 1.2	27.7 ± 1.0	27.6 ± 1.0	28.4 ± 0.6
3.3 μg	7	273 ± 1.3	27.3 ± 1.7	27.3 ± 1.5	28.1 ± 0.9	27.8 ± 1.1	28.5 ± 0.9
10 μg	7	274 ± 1.2	27.0 ± 1.2	27.6 ± 1.4	27.9 ± 1.1	27.7 ± 1.4	28.8 ± 1.1

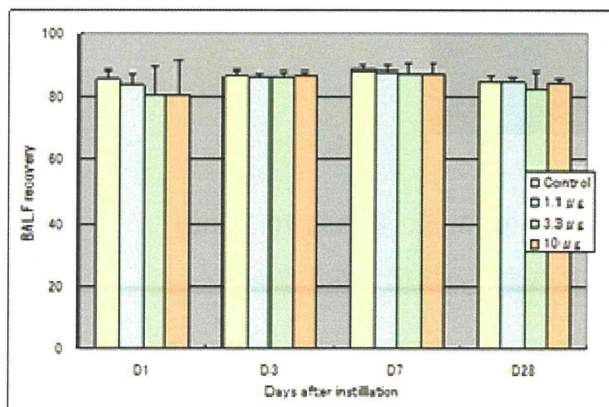


図 8. 気管支肺胞洗浄液の回収率

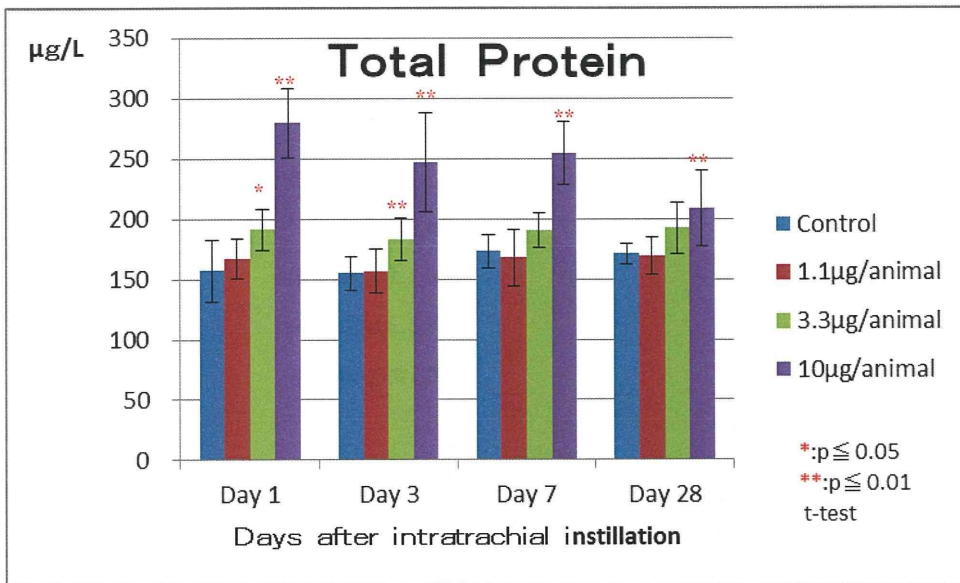


図 9. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査：総蛋白

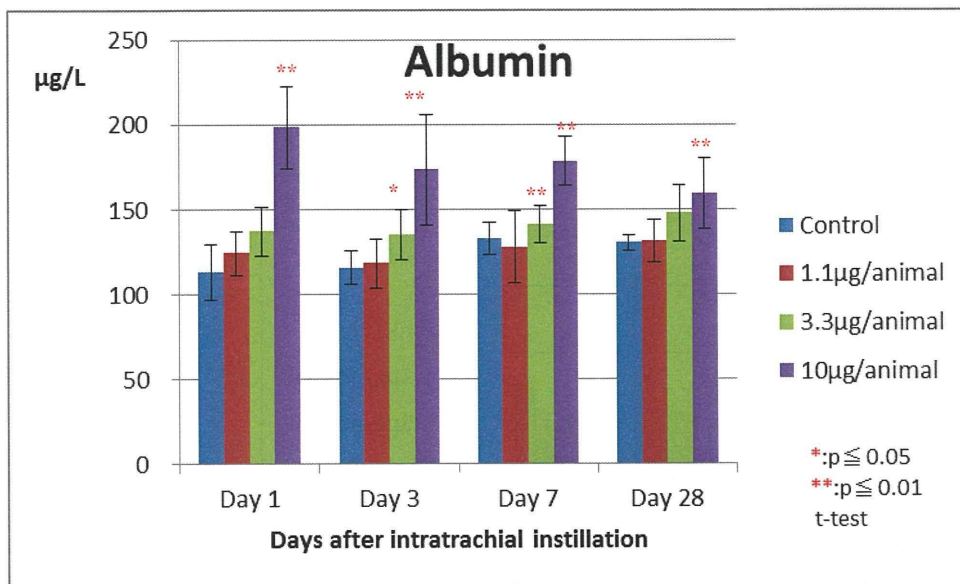


図 10. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査：アルブミン



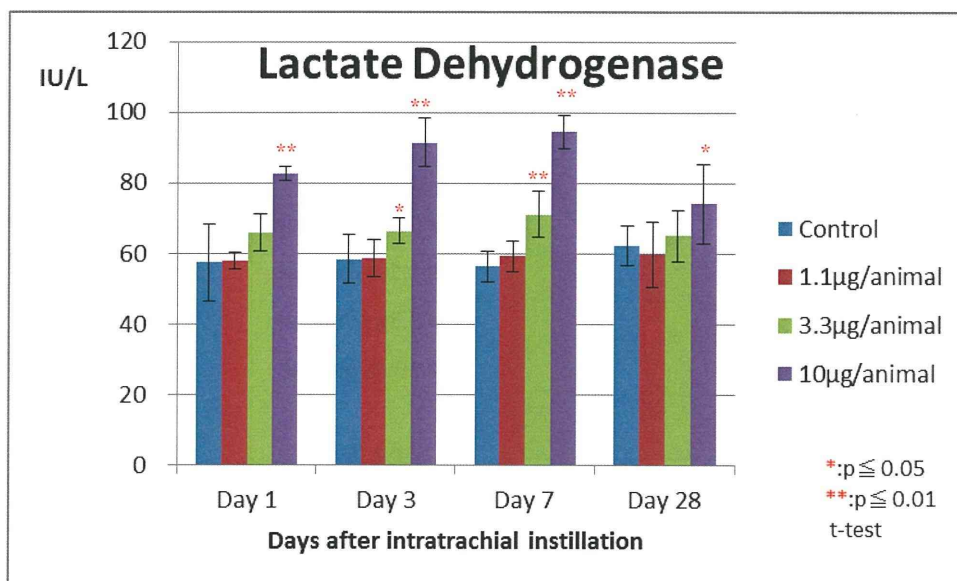


図 11. 気管支肺胞洗浄液の生化学検査 : LDH

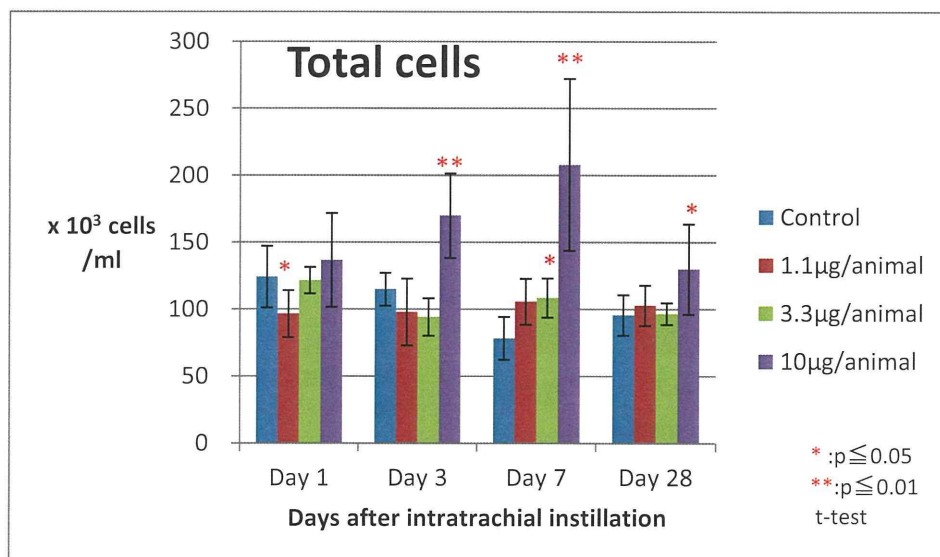


図 12. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査 : 総細胞数

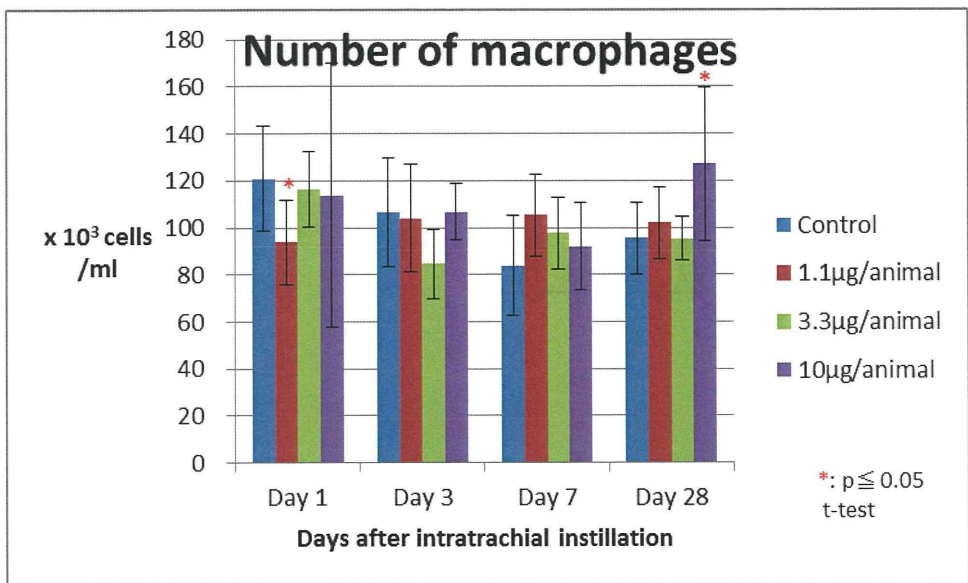


図 13. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査：マクロファージ数

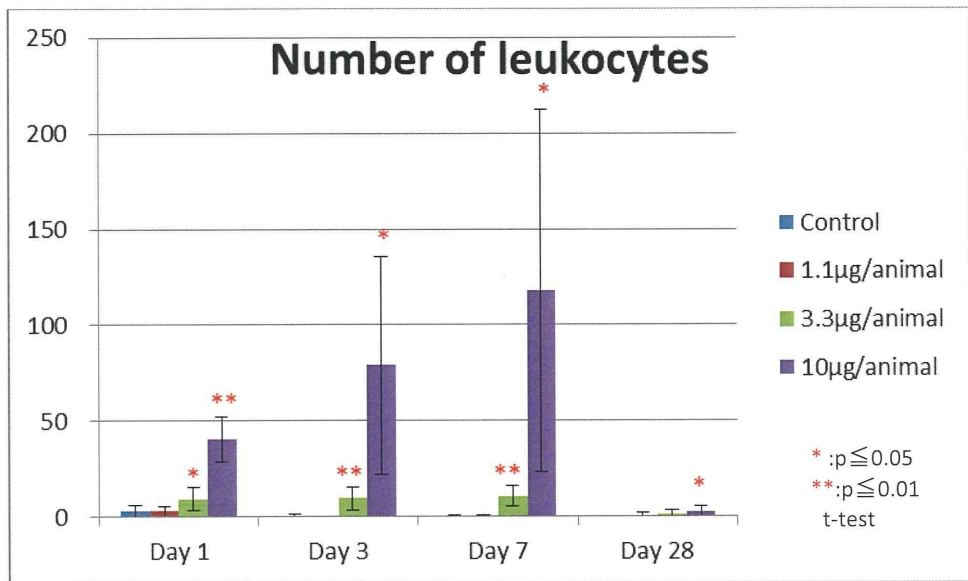


図 14. 気管支肺胞洗浄液の細胞検査：白血球（好中球）数

表 4. 気管内投与後 1 日解剖群の体重

投与用量 (µg)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差	
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日 1日
Control	5	27.3 ± 1.3	27.5 ± 1.6
1.1 µg	5	28.0 ± 1.4	28.3 ± 1.5
3.3 µg	5	27.4 ± 1.2	27.1 ± 0.9
10 µg	5	27.5 ± 1.7	27.2 ± 1.5

表 5. 気管内投与後 1 週解剖群の体重

投与用量 ( $\mu\text{g}$ )	動物 数	平均体重(g) $\pm$ 標準偏差		
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日/週	
			1日	1週
Control	5	27.5 $\pm$ 0.8	27.3 $\pm$ 1.3	27.7 $\pm$ 1.0
1.1 $\mu\text{g}$	5	27.7 $\pm$ 0.8	27.6 $\pm$ 0.9	27.7 $\pm$ 1.0
3.3 $\mu\text{g}$	5	27.6 $\pm$ 1.2	27.4 $\pm$ 1.3	27.8 $\pm$ 1.8
10 $\mu\text{g}$	5	27.4 $\pm$ 0.6	27.2 $\pm$ 0.7	27.5 $\pm$ 1.0

表 6. 気管内投与後 4 週解剖群の体重

投与用量 ( $\mu\text{g}$ )	動物 数	平均体重(g) $\pm$ 標準偏差				
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週			
			1週	2週	3週	4週
Control	5	27.2 $\pm$ 1.4	27.5 $\pm$ 1.5	27.8 $\pm$ 1.7	28.0 $\pm$ 1.5	28.7 $\pm$ 1.8
1.1 $\mu\text{g}$	5	27.7 $\pm$ 1.4	27.0 $\pm$ 1.1	27.1 $\pm$ 1.4	27.4 $\pm$ 1.2	28.2 $\pm$ 1.8
3.3 $\mu\text{g}$	5	27.3 $\pm$ 0.6	27.6 $\pm$ 0.6	27.7 $\pm$ 0.4	28.5 $\pm$ 1.0	29.6 $\pm$ 0.7
10 $\mu\text{g}$	5	27.8 $\pm$ 1.2	27.9 $\pm$ 0.9	27.6 $\pm$ 1.6	28.1 $\pm$ 1.7	29.0 $\pm$ 1.6

表 7. 気管内投与後 13 週解剖群の体重

投与用量 ( $\mu\text{g}$ )	動物 数	平均体重(g) $\pm$ 標準偏差				
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週			
			1週	2週	3週	4週
Control	5	27.8 $\pm$ 1.5	27.6 $\pm$ 1.9	28.2 $\pm$ 1.7	28.9 $\pm$ 1.2	29.5 $\pm$ 0.9
1.1 $\mu\text{g}$	5	27.3 $\pm$ 0.9	27.6 $\pm$ 1.0	28.1 $\pm$ 0.9	29.1 $\pm$ 1.1	29.8 $\pm$ 1.1
3.3 $\mu\text{g}$	5	26.9 $\pm$ 1.6	27.0 $\pm$ 1.1	27.6 $\pm$ 1.1	28.2 $\pm$ 1.4	28.6 $\pm$ 1.4
10 $\mu\text{g}$	5	27.1 $\pm$ 1.4	26.7 $\pm$ 1.1	26.9 $\pm$ 1.1	27.3 $\pm$ 1.0	28.2 $\pm$ 1.2

(続)

投与用量 ( $\mu\text{g}$ )	動物 数	平均体重(g) $\pm$ 標準偏差				
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週			
			5週	6週	7週	8週
Control	5	29.7 $\pm$ 1.0	29.7 $\pm$ 1.2	30.1 $\pm$ 0.9	30.4 $\pm$ 0.9	31.3 $\pm$ 0.8
1.1 $\mu\text{g}$	5	30.6 $\pm$ 1.0	30.9 $\pm$ 1.2	30.8 $\pm$ 1.1	31.1 $\pm$ 1.1	32.3 $\pm$ 0.8
3.3 $\mu\text{g}$	5	29.3 $\pm$ 1.3	29.8 $\pm$ 1.7	29.8 $\pm$ 2.1	29.7 $\pm$ 1.8	30.5 $\pm$ 1.4
10 $\mu\text{g}$	5	29.0 $\pm$ 1.0	29.1 $\pm$ 0.9	28.7 $\pm$ 1.2	29.0 $\pm$ 1.0	29.8 $\pm$ 1.0

(続)

投与用量 ( $\mu\text{g}$ )	動物 数	平均体重(g) $\pm$ 標準偏差			
		投与前測定 (投与日)	投与後測定週		
			10週	11週	12週
Control	5	28.6 $\pm$ 1.3	30.8 $\pm$ 0.9	31.4 $\pm$ 1.5	32.6 $\pm$ 1.5
1.1 $\mu\text{g}$	5	31.4 $\pm$ 0.8	31.6 $\pm$ 1.2	32.4 $\pm$ 1.0	34.4 $\pm$ 1.0
3.3 $\mu\text{g}$	5	30.8 $\pm$ 1.7	30.4 $\pm$ 1.9	30.7 $\pm$ 2.0	31.8 $\pm$ 1.9
10 $\mu\text{g}$	5	29.8 $\pm$ 1.0	29.5 $\pm$ 0.7	29.8 $\pm$ 0.6	30.5 $\pm$ 0.7

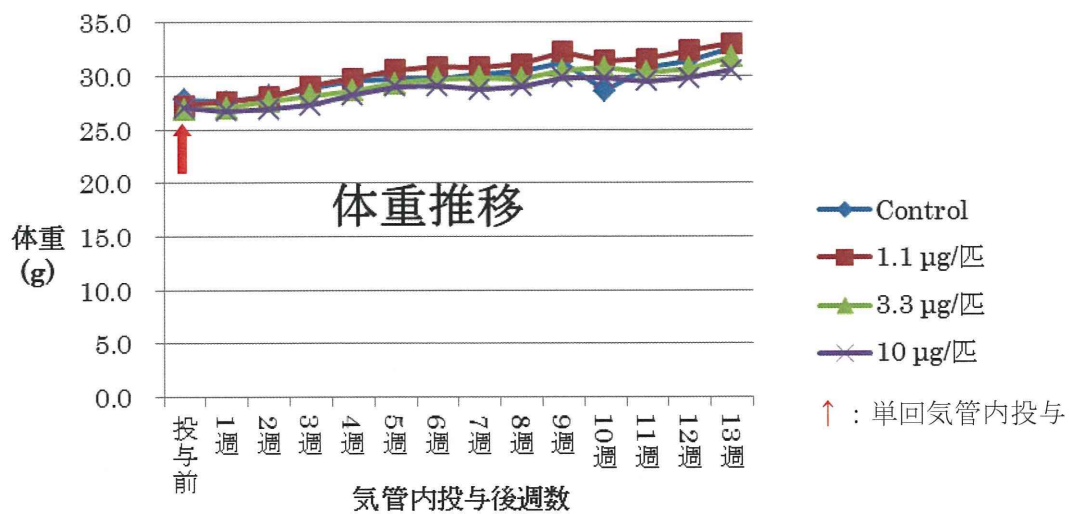


図 15. 気管内投与後 13 週解剖群の体重推移

表 8. 気管内投与後 1 日、1 週、4 週、13 週解剖群の肺重量

動物数	肺重量平均(mg) ± 標準偏差							
	投与後測定 日/週							
	1 日		1 週		4 週		13 週	
5	140.6	± 6.9	144.8	± 7.9	161.0	± 8.5	159.2	± 6.5
5	141.2	± 3.3	145.6	± 14.3	150.0	± 10.7	153.8	± 8.5
5	141.0	± 7.9	150.4	± 14.2	170.8	± 21.5	161.6	± 13.3
5	140.4	± 4.2	157.6	± 6.5 *	177.0	± 15.1	158.6	± 13.0

\* :p≤0.05  
t-test

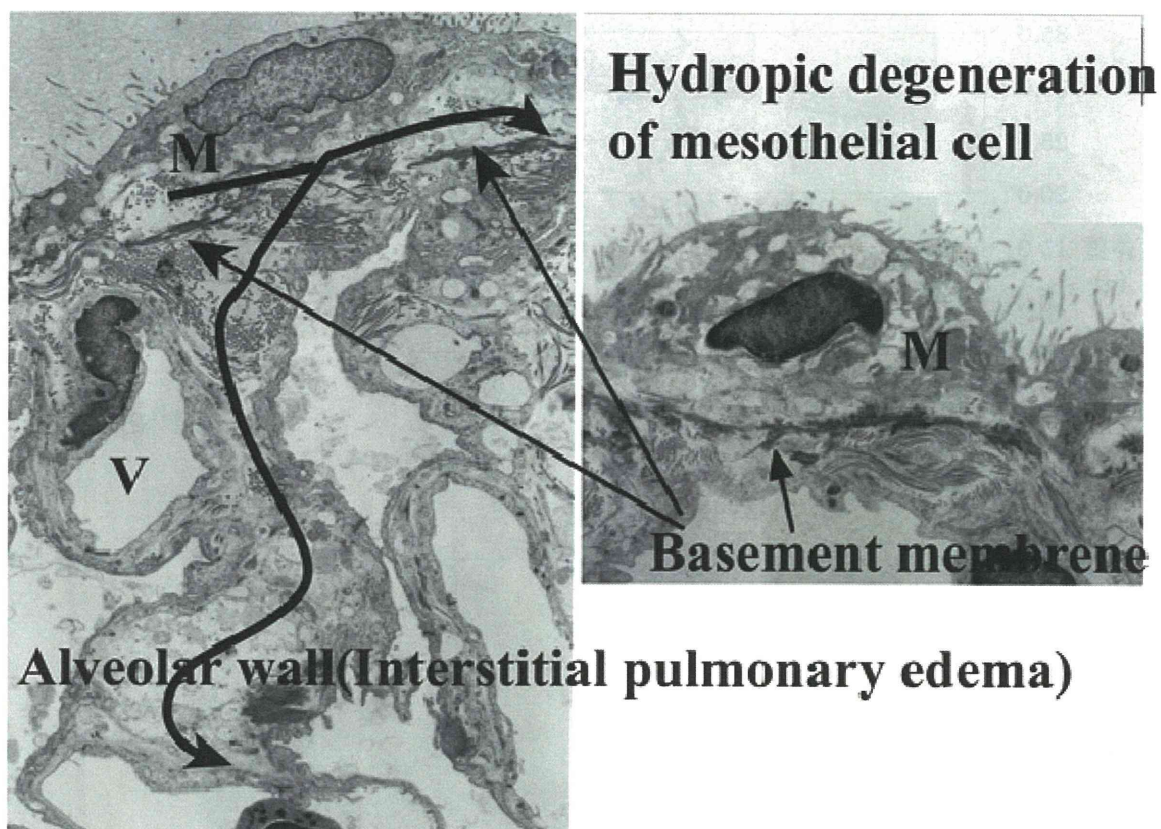


図 16. F344 雄ラットの肺の透過型電子顕微鏡写真

MWCNT160 $\mu$ g/匹を 13 週齢で単回気管内投与し、投与後 28 日に解剖  
 双方向矢印で示した部位に間質の水腫を認める。



### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

本年度該当なし。

## IV. 研究成果の刊行物・別刷

本年度該当なし。



