

201236013A

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 -  
(23-化学 - 一般 - 005)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成25(2013)年3月

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 -  
(23-化学 - 一般 - 005)

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成25(2013)年3月

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 -  
(23-化学 - 一般 - 005)

平成24年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 今井田 克己  
平成25(2013)年3月

## 研究報告書目次

## 目 次

## I. 総括研究報告書

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 -

今井田 克己 ..... 1

## II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

今井田 克己 ..... 13

2. ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

小川 幸男 ..... 25

3. ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

高橋 祐次 ..... 37

4. DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

高木 篤也 ..... 49

5. 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

相磯 成敏 ..... 59

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 81

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 82

V. 班会議資料（2012年10月5日開催）

# I. 総括研究報告書

平成24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  
総括研究報告書

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 -

研究代表者 今井田 克己  
香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

## 研究要旨

先行研究において、厚労省の「ナノマテリアルの安全性対策に関する検討会」の方針に従い、高生産量ナノマテリアルのうち、特に、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ (Multi wall carbon nanotubes (MWCNT)) を対象として、経気道暴露時の生体影響について検討してきた。具体的には、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立衛研・環境保全型動物飼育棟内に人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。ナノマテリアル (NM) の有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、NMが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。

本研究では、NMのヒト健康影響の評価手法に関する研究として、MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定し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、三井物産 (現 現保土ヶ谷化学(株))) を共通の研究対象とした。各研究班を、次の5つの分担研究によって構成し研究を開始した。ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究 (小川)、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究 (高橋)、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析 (高木)、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 (相磯)、ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価 (慢性及び腫瘍性病変) (今井田) である。

初年度から、全身曝露方法の一つとして音響式ダスト発生装置 (米国 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) 考案) の基本概念を導入し、これに検体に触れる部品を廃棄可能な構造とした独自のチャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした上記施設を使用している。運用上残された課題は、検体の特性に合わせての暴露制御パラメータ (送风量・圧、音響音圧・周波数) の最適化であったが、平成24年度では、MWCNTの特性に合わせた暴露制御パラメータ (送风量・圧、音響音圧・周波数) の最適化に取り組み、MWCNT原末を検体として、4時間の暴露時間、目標相対濃度を200,000 cpmと設定した条件において、平均質量濃度が約 0.3 mg/m<sup>3</sup>が得られた。

また、粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を決める重要ファクターである。NMの全身暴露吸入実験において問題となるのが、その凝集性である。ヒ

トが現実的に暴露される環境下では、凝集体は鼻腔、気管等の上部呼吸器系で先に捕捉され、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。また、検体に用いたMWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。MWCNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道上部に捕捉されるため単離線維の吸入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、この影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るために、平成23年度の研究の中で、MWCNTを高度に分散させる方法として、Taquann法を開発した。H24年度は、Taquann法による分散処理を行ったMWCNT (MWCNT-Taq)を、より効果的に全身吸入暴露させるべく、曝露方法の改良にも取り組んだ。さらに、高度に分散処理を施したことで、MWCNT-Taqに含まれる線維数を計測することが可能となり、その線維数を計測した結果 MWCNT-Taq 10ug、1ug、0.1ugに含まれる線維数は、それぞれ、 $2.3 \times 10^7$ 本、 $4.0 \times 10^6$ 本、 $3.2 \times 10^5$ 本であった。

気管内投与実験では、多層カーボンナノチューブ原末 (MWCNT-Bulk) および MWCNT-Taqの気管内投与による影響の違いを検討することもできた。MWCNT-Bulkの気管内投与では、肺胞内にMWCNTを貪食した肺胞マクロファージが主体となり肉芽腫性変化及び軽度な線維化病変を形成していたのに対し、MWCNT-Taqの気管内投与では、肺胞内で好中球、マクロファージ、形質細胞が混在するフォーカルな炎症性変化が認められた。また、MWCNT-Taqを貪食した肺胞マクロファージの集簇はある程度認められたものの、これまでに先行研究などで経験しているようなMWCNT貪食肺胞マクロファージによる微小肉芽腫や線維化病変の形成を特徴とする生体反応ではなかった。

気管内投与による1年間での長期毒性を評価する実験を3つ進行させているが、いずれも順調に進行しており、来年では病理組織学的な検討を行い、長期毒性についての詳細な評価を行う予定である。また、MWCNT-Bulk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)を行なった結果では、免疫応答に関連する遺伝子の発現増加、及び Circadian rhythm に関係する遺伝子発現の変化が観察され、本年度ではより詳細な検討を行った結果、免疫応答、及び細胞死・アポトーシスに関係する遺伝子の発現増加が暴露1及び3日後に認められ、7日目に脂質代謝関連遺伝子発現が増加することが示された。

こうした各分担研究の結果から、ナノマテリアルの吸入毒性試験の技術基盤が確立し、人体の曝露様式に即した条件下での生体影響に関する情報が得られると考えられる。また、吸入毒性試験を実施する際の課題である至適条件の決定を迅速に行う総合的手順が整うことから、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

この結果、用量作用関係の詳細な検討が可能となり、ナノマテリアルの安全性確保の観点から閾値を設定することが可能であるか否かの総合的なリスク評価、また、そのリスクを最小化するための実質安全レベルの試算などを可能とする情報が得られると期待される。

総じて、本研究成果は、ナノマテリアルによる人の健康障害を防止するためのリスク評価の基盤となる科学的な裏づけデータを得る手法として利用され、国内外の行政施策への貢献

を通して国民の健康維持に大きく貢献することが期待される。

次年度以降も、各分担研究同士が、さらなる連携を行い、針状MWCNTによる肺への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行っていく予定である。

以上、5つの分担研究により、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として、MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行うために重要な研究基盤構築を行うことができ、多数の研究成果を得ることができた。次年度も継続して、詳細な検討を継続し、MWCNTの全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う予定である。

## A. 研究目的

ナノマテリアル(NM)は極めて微細であることから、組成が同じものでも新たな物性が発揮される特徴がある。その為、毒性学的にも元のバルク形状のものの毒性情報があったとしても、新規のものとして取り扱う必要があるとの認識が支配的である。本研究の目的は、肺に焦点を絞り、工業的NMの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を迅速に確立することにある。

そもそも、粒子状物質の有害性に関する情報は極めて少ない。その理由は、吸入暴露を実施できる施設がごく限られることにある。NMは、凝集体を作りやすい傾向があり、その吸入暴露においては分散性を確保するために、更に高度な運用技術が必要とされ、国際的にも信頼できる吸入暴露実験を行える研究施設は少ない。しかしながら、NM開発で世界をリードする日本において、複数種のMWCNTに代表されるNMの製品化が急速に進んでおり、これらの安全性確認の方策の早期確立が必要である。過去のアスベストやトトロラストの事例が示す様に、物理化学的安定性が高い成分からなる粒子状物質は急性毒性が弱いことから、その慢性毒性が見過ごされる傾向にある。NMも炭素など安定性が高い成分で出来ている場合は、発がん性を含む慢性毒性を見極める必要がある。以上より、実験動物の個体を用いた全身暴露による吸入毒性試験の実施が必須であり、また、初期病像に加え、慢性影響を十分に観察する必要がある。

平成23年度の本研究開始時の段階では、先行研究で、NIOSHが考案した音響式ダスト発生装置による分散方式がカーボンナノチューブの吸入暴露に最適であるとの

判断の下に導入した施設(スピーカーからの音響エネルギー(定在波)を用いて、MWCNTを分散させるもの)を全身暴露方法の一つとして用い、検体に適合した制御パラメータ(送風量、送風圧、音響音圧・周波数)の最適化を行えば、早急に暴露実験を開始できるところにあった。平成23年度では、音響式ダスト発生装置の最適化も実現でき、平成24年度の研究では、高度に分散処理したMWCNTに対応した全身暴露方法の改良も行った。

本研究では、全身吸入暴露装置の制御パラメータ最適化や様々な暴露手法を確立し、次いでその暴露装置を用いてMWCNTを暴露したマウスの肺及び全身への蓄積性、肺の病理組織学的解析、肺の組織反応のDNAマイクロアレイによる網羅的遺伝子発現変動解析を行う。この研究は、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験の確立から、毒性発現メカニズムを含めた有害性情報の獲得までを総合的に手がけるものとして世界的に例が無く、詳細な検討を行うことが本研究の目的である。

## B. 研究方法

先行研究[H20-化学-一般-006]の成果を踏まえ、日本での使用量が最も多く、また、その形状からアスベストと同様の毒性が懸念される多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を被検物質として研究を行なう。本研究を遂行する香川大学、国立医薬品食品衛生研究所及び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は、ナノマテリアルを用いた動物実験を実施した実績を有している。

本研究では雄性マウスを使用してMWCNTの生体影響を調べる。国立医薬品食品衛生研究所では既に設置済みの全身吸入暴露施設の、検体に応じた運用条件の確立に注力し、全身暴露吸入試験を実施する。香川大学と中



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では、気管内投与方法により生体影響を評価する。これらと並行して、気管内暴露及び吸入暴露による肺の急性及び慢性反応について、病理組織学的評価（光顕、電顕、免疫染色、他）を行ない腫瘍性病変及び非腫瘍性病変の誘発に関わる背景、経過、要因を経時的に用量相関性を以って解析する。

#### B-I ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

ナノマテリアルの有害性は暴露経路により大きく変わることが既に示されている。人においては、全身暴露による吸入毒性が最も重要であることは関係者の一致した見解であるが、実際にはその検討が最も進んでいない。その最大の理由は、粒子状物質を定量的に吸入暴露させることが設備的にも技術的にも難しい上に、ナノマテリアルが凝集体を作り易く分散性の確保の面で更なる工夫を要する点にある。先行研究結果の判断の下、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入を実現できる装置として、米国NIOSHが考案した「音響式ダスト発生装置」を導入し、独自の暴露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした施設を国立医薬品食品衛生研究所 環境保全型動物飼育棟内（26号館）に設置した。H23年度は運用上の課題であるMWCNTの特性に合わせた暴露制御パラメータ（送風量・圧、音響音圧・周波数）の最適化に取り組み、MWCNT原末を検体して、4時間の暴露時間、目標相対濃度を200,000cpmと設定した条件において、平均質量濃度が約0.3mg/m<sup>3</sup>が得られた。

本年度は、H23年度に開発されたMWCNT原末を高度に分散処理する独自の方法（Taquann法）で処理したTaquann法処理MWCNTを気相に分散させ、動物に暴露する方法の開発に取り組んだ。

#### B-II ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

「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 -」では、肺に焦点を絞り、工業的ナノマテリアルの吸入暴露の人への外挿性の高い有害性情報を獲得する方法を

迅速に確立することを目的としている。そのために、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置を用いてナノマテリアルの全身暴露吸入試験を実施し、用量作用関係を含む有害性情報の取得、及びその詳細な病態解析を進めている。本分担研究では、生体影響の用量作用関係を明らかにするための情報として、ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究を行うため、吸入させる検体の分散方法の開発に取り組んだ。粒子状物質の吸入において、粒径分布は呼吸器系の部位への沈着量を定める重要ファクターである。微細な粒子は肺胞まで到達するが、大きな粒子は気道の上層部で効果的に除去される。一方、ナノマテリアルの全身暴露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。人が現実的に暴露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。また、検体に用いたMWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。MWCNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道上部に捕捉されるため単離線維の吸入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、この影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。以上の点から、凝集成分による影響が少なく、実際にヒトに吸入されることが想定される単離線維成分のみからなる分散性の高い検体を得る処理法が必要となった。H23年度の分担研究においてMWCNTを高度に分散する方法（Taquann法）を独自に開発した（特許出願済）。H24年度は、全身吸入装置へ使用するため量産体制を整えた。

#### B-III DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

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。

暴露装置には米国 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。得られたマイクロアレイデータを基に前年度に引き続いて詳細な解析を行った。

#### B-IV 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

市販のMWCNT-Bulkには、単線維に分散したナノサイズのものから大きな凝集塊まで様々なサイズのものが含まれるが、ヒトの肺胞まで到達するMWCNTは空気力学的質量中位径(mass median aerodynamic diameter, MMAD)にして1 $\mu$ m以下のサイズの単線維のものが主体になると考えられる。このため、ヒトが呼吸によって吸い込んだMWCNT-Bulkが肺胞まで到達する量(重量)は、これまでの研究報告で研究対象とされてきた用量よりも低い濃度域にあることが想定される。MWCNT-Bulkの毒性については、ヒトへの外挿並びにリスク評価を行うためには、MWCNT-Bulkの分散性の確保された検体を用いた低濃度域での毒性発現のプロファイルを明確にする必要がある。今井田班では国衛研の研究チームによってMWCNT-Bulkから単線維に分散した線維を効率的に取り出す方法(Taquan法処理)の開発に成功している。昨年度の分担研究として市販のMWNT-7((株)保土谷化学工業)をTaquan法処理した単線維状に分散したMWCNT(MWCNT-Taq)を検体としてマウスへの単回気管内投与による亜急性試験を実施し、採取した気管支肺胞洗浄液の検査データの収集までを終え、病理組織学的検査データの収集を本年度の分担研究に引き継いだ。

本年度は、「厚生労働科学研究費補助金申請書」の分担研究概要に掲げた、分散性を高めたMWCNTを単回投与した気管内暴露における急性反応について、病理組織学的評価を行うことを目的として、まず、昨年度から継続しているMWCNT-Taqの単回気管内投による亜急性試験の病死組織検査結果を確定した上で、本年度の研究計画を策定した。

MWCNT-Taqを単回気管内投した亜急性試験でマウスの肺に認められた組織反応は、先行研究の福島班でMWCNT-Bulkをラットに単回気管内投与した亜急性試験と大きく異なっていた。福島班で行ったMWCNT-Bulkをラットに単回気管内投与し、投与後3ヶ月まで経過観察をおこな

った試験では、終末細気管支や肺胞管を中心とした領域にMWCNTを貪食した肺胞マクロファージが主体となり肉芽腫性変化及び軽度な線維化病変を形成していたのに対し、MWCNT-Taqをマウスに単回気管内投与後し、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなった本分担研究では、好中球、マクロファージ、形質細胞が混在するフォーカルな炎症性変化が認められた。この試験では、MWCNT-Taqを貪食した肺胞マクロファージの集簇はある程度認められたものの、MWCNT貪食肺胞マクロファージによる微小肉芽腫や線維化病変の形成は主流となる生体反応ではなかった。

上記病理組織学的検査結果を受けて、本年度の分担研究は、先行研究で認められたMWCNT-Bulkに対するラットの組織反応と、本分担研究で示されたMWCNT-Taqに対するマウスの組織反応の違いが標的臓器である肺の毒性反応(線維化病変など)に違いが認められた。この違いは、MWCNTの分散状態(精製方法)の差に起因するとの仮説をたてた。この仮説を検証する目的で、MWCNT-Taq及び陽性対照としてのMWCNT-BulkをF344ラットに単回気管内投与し、投与後91日までの肺の毒性反応について病理組織学検査を行うラットを用いたMWCNT-TaqとMWCNT-Bulkの生体反応の対比試験と、気管内投与後最長28日までの経過観察による気管支肺胞洗浄液を採取して生化学、細胞学的パラメーターの検査を行うラットを用いたMWCNT-TaqとMWCNT-Bulkの生体反応の対比試験試験を実施した。さらに、MWCNT-Taqを投与したマウスでの肺の反応を超微細形態学的に解析することを目的として、MWCNT-Taqを投与したマウスでの肺の電子顕微鏡による検索に着手した。

#### B-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価(慢性及び腫瘍性病変)

本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNTの気管内投与による肺病変の検討を行う。平成23年度は、吸入したMWCNTの分布を確認するため、肺組織内での局在の同定の予備試験およびMWCNTの光学的特性の研究を行った。MWCNT-Taqを用いた単回気管内投与による予備実験を実施した。平成24年度は、マウスお

よびラットへのMWCNTの気管内投与による長期実験を3つ計画し、いずれの実験も開始することができた。いずれの実験も、現在まで順調に進行している。

マウスへの気管内投与手技については、平成23年度では、様々な週齢のマウスを用いて行い、使用する器具についても工夫し、12週齢のC57BLマウスへの気管内投与を愛護的に、確実に行うことができるようになった。マウスへの気管内投与について予備試験を複数回行い、平成24年度に開始した気管内投与による長期毒性試験へと引き継ぐことができた。マウス用ゾンデだけでなく、マウス用気管挿管器具（光ファイバー付き喉頭鏡）を併用することで、気管や口腔内を損傷せずに、確実な投与を行うことが出来るようになり、超低用量のMWCNT-Taq投与が可能になった。長期試験として、(i) MWCNT-Taq (10  $\mu$ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験、(ii) 超低濃度MWCNT-Taqの単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験、(iii) MWCNT-Taq (60  $\mu$ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の3つの実験を行っており、実験終了後、病理組織学的に長期毒性影響の検討を行う予定である。

### C. 研究結果

#### C-I ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究

先行研究において、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示されたMWCNTを対象として、MWCNTの懸濁液の気管内投与を実施し、標的臓器である肺等への影響について多くの成果を得た。並行して、国立医薬品食品衛生研究所・環境保全型動物飼育棟内に、人体の暴露様式に即した全身暴露吸入試験装置の設置を行った。この装置は、米国NIOSHが考案した音響式ダスト発生装置を複製許可と共に導入し柴田科学で新たに設計したものである。これに独自に開発した暴露チャンバーを組み合わせ、1群最大16匹、3群の実験を可能とした。H23年度は、三井物産のMWNT-7の原末(MWCNT-Bulk)を検体として、暴露制御パラメータ(送風量・圧、音響音圧・周波数)の最適化を行い、実際にマウスに暴露を行い、DNAマイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析に供した。並行して、M

WCNT原末から凝集体を除去し、分散性に優れた検体の調製方法(Taquann法)が開発されたため、H24年度は、Taquann法の検体(T-CNT)を全身吸入暴露に適用する方法に取り組んだ。音響式ダスト発生装置を用いた検討では、音響エネルギーによる挙動がMWCNT-Bulkとは異なり、ダスト発生量も少なく十分な濃度調節ができなかった。T-CNTによる精度の高い暴露にはダスト発生装置の改造が必要となり、金属製のカートリッジに充填し、圧縮空気を吹き込んでカートリッジ内の検体を気相に分散させる方法を開発し、予備的にマウスに全身暴露吸入を行った。暴露チャンバー内のエアロゾルの形態観察では、単離している線維が多く観察され、良好な分散状態であることが確認された。一方で、暴露作業の自動化、暴露濃度を安定化する課題が残されており、今後はこの対策を進める。新たに開発したダスト発生装置は、Taquann法処理検体に適したダスト発生方法であるため、これらを組み合わせることで、MWCNTのみならずナノマテリアル全般の全身暴露吸入による生体影響を調べる有効な手段となることが期待される。

#### C-II ナノマテリアル吸入暴露による体内動態に関する研究

MWCNTの凝集はファンデルワールス力によるものであるが、凝集体が含まれないことが分散性を確保するためには重要であると考えられる。また、Taquann法の改良を行い、全身暴露吸入実験に供することのできる量を確保する体制を整えた。分散性を高める工程、及び、ろ過効率を高めることで、1回あたりの収率向上に寄与した。

MWCNT-Taqに含まれる線維数を計測したところ、MWCNT-Taq 10 $\mu$ g、1 $\mu$ g、0.1 $\mu$ gに含まれる線維数は、それぞれ、 $2.3 \times 10^7$ 本、 $4.0 \times 10^6$ 本、 $3.2 \times 10^5$ 本であった。線維長のヒストグラムからは、その分布に大きな変化は認められず、また、50%累積比率に相当する線維の長さは、10  $\mu$ g; 6.4  $\mu$ m、1  $\mu$ g; 7.2  $\mu$ m、0.1  $\mu$ g; 6.4  $\mu$ mであったことから、本研究で用いた方法は、線維の分布を偏り無く把握できていると考えられた。

本年度の分担研究では、Taquann法の改良を行い、全身暴露吸入実験が可能となるT-CNTの量産体制を確立した。実際にT-CNTをマウスに

全身暴露吸入を行い、肺に含まれるMWCNTの線維数を定量的に把握する方法を確立した。次年度はT-CNTを反復全身暴露吸入したマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにし、肺病変との関係を明らかにする計画である。

### C-III DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析

前年度においてマイクロアレイデータを解析した結果、免疫応答に関連する遺伝子の発現増加、及び Circadian rhythm に関係する遺伝子発現の変化が観察された。一方、前年度は有意差の認められたコピー数の低い遺伝子を含む全遺伝子を対象に解析しており、また、対照群で変動している遺伝子も全て含まれていたことから、一部で偶発的変動をとらえた可能性があると思われた。そこで、今年度は Percellome 法で用いた spike factor から想定されるデータの信頼性の高い 0.5copy/cell 以上の遺伝子を対象に解析を進めた。その結果、有意に ( $p < 0.05$ ) 増加した遺伝子数はMWCNT暴露1日目で977遺伝子、3日目で754遺伝子、7日目で37遺伝子であった。一方、有意に ( $p < 0.05$ ) 減少した遺伝子は、MWCNT暴露1日目で51遺伝子、3日目で2遺伝子、7日目で92遺伝子であった。詳細な検討を行った結果、免疫応答、及び細胞死・アポトーシスに関係する遺伝子の発現増加が暴露1及び3日後に認められ、7日目に脂質代謝関連遺伝子発現が増加することが示された。本法は肺における種々の生体反応を鋭敏に検出可能であると考察された。

### C-IV 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

MWCNT-Bulkをラットに単回気管内投与し、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなった試験では、終末細気管支や肺胞管を中心とした領域にMWCNTを貪食した肺胞マクロファージが主体となり肉芽腫性変化及び軽度な線維化病変を形成していたのに対し、MWCNT-Taqをマウスに単回気管内投与後し、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなった本分担研究では、好中球、マクロファージ、形質細胞が混在するフォーカルな炎

症性変化が認められた。この変化には肺の血管と関係する動きが伺われた。これについては、血管を中心とした炎症が溶媒対照群にも軽度ながら認められ、MWCNTによる異物反応のほかに、マウスの背景病変をMWCNTが押し上げた可能性も考えられた。本分担研究で行ったマウスを用いた試験では、MWCNT-Taqを貪食した肺胞マクロファージの集簇はある程度認められたものの、これまでに先行研究などで経験しているようなMWCNT貪食肺胞マクロファージによる微小肉芽腫や線維化病変の形成を特徴とする生体反応ではなかった。マウスとラットでは経気道で侵入したMWCNTに対する肺の反応が異なることが示された。この変化はマウスの背景病変をMWCNTが押し上げた可能性も考えられた。ヒトへの外挿をするための動物モデルとしてラットとマウスのどちらを使用するのが適切なのか、MWCNTに対する肺の反応種差をもたらす原因について解明を進める必要がある。

### C-V ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）

現在進行している3つの長期実験のうち、MWCNT-Taq ( $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の途中経過では、実験開始後31週目から、control群と比べて、MWCNT-Taq投与群が有意に体重増加抑制が見られた。この原因については、MWCNT-Taq投与による何らかの影響が生じていることが推測され、実験終了後の病理組織学的評価を迅速に行っていきたい。なお、投与後31週目以降に、体重増加抑制が生じてきていることは大変興味深いデータであり、MWCNT-Taqの気管内投与による長期毒性影響を観察する意義を示唆する所見である。また、気管内投与が単回であったにも関わらず、長期での試験においても影響が出ていることは今後の投与回数についても様々な検討を必要があると考える。超低濃度MWCNT-Taqの単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では、超低用量群のいずれの群間においても有意な体重差は生じていないが、今後、長期にわたり観察し、検討を続けていく予定である。MWCNT-Taq ( $60 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験では、MWCNT-Taq ( $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性

試験の経過で見られた、群間での有意な体重増加抑制は見られていない。マウスとラットでの種差や投与量が個体に与える影響等によるものも考えられるが、実験終了後の病理組織学的な評価をふまえて、その関連を検討する予定である。今後、各分担研究とさらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行う予定である。

#### D. 結論

本年度は、昨年度での研究成果を基盤として、各分担研究者が総合的な評価を行うために必要な検討を行った。それぞれが目標とする検討を行う上で必要な準備がでそい、さらなる研究成果を得ることができた。次年度までの最終目標の達成に向けて、長期実験の開始などを計画的な研究を行うことができた。

具体的には、全身暴露吸入試験装置の運用上課題としていた、MWCNT の特性に合わせた暴露制御パラメータ（送风量・圧、音響音圧・周波数）の最適化を行い、吸入暴露条件を確立することができた。また、MWCNT -Taq をより効率的に曝露する全身吸入曝露の方法として、新たに直噴式のダスト発生装置の開発も行うことができた。

アスベストに関する知見からも推測されるように、生体内に取り込まれた難分解性粒子は、急性毒性を示さないものの生体内で長期間留まり、重篤な慢性毒性を引き起こす可能性が懸念される。難分解性のナノマテリアルにおいても、慢性毒性を見落とさないことが重要であるほか、粒子がごく微細であることから、元のバルク形状での毒性とは異なった生体影響を示す可能性があり、その健康被害を未然防止するためには生体影響と暴露量の定量的な把握と毒性発現メカニズムに関する情報を得ることが必要である。本年度の分担研究では、高度な分散処理法である Taquann 法の改良を行い、全身暴露吸入実験に供することのできる量を確保する体制を整えた。分散性を高める工程、及び、ろ過効率を高めることで、1回あたりの収率向上に寄与した。

MWCNT-Taq の投与量（重量）とその線維数の関連を確かめるため、MWCNT-Taq に含まれる線維数を計測し、MWCNT-Taq 10ug、1ug、0.1ug

に含まれる線維数は、それぞれ、 $2.3 \times 10^7$  本、 $4.0 \times 10^6$  本、 $3.2 \times 10^5$  本であった。線維長のヒストグラムからは、その分布に大きな変化は認められず、線維の分布を偏り無く把握できていると考えられた。次年度は MWCNT-Taq を反復全身暴露吸入したマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにし、肺病変との関係を明らかにする計画である。

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、MWCNT-Bulk 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。前年度、マイクロアレイデータを解析した結果、免疫応答に関連する遺伝子の発現増加、及び Circadian rhythm に関係する遺伝子発現の変化が観察され、本年度ではより詳細な検討を行った結果、免疫応答、及び細胞死・アポトーシスに関連する遺伝子の発現増加が暴露 1 及び 3 日後に認められ、7日目に脂質代謝関連遺伝子発現が増加することが示された。本法は肺における種々の生体反応を鋭敏に検出可能であり、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していく予定である。

気管内投与実験として、MWCNT-Bulk および MWCNT-Taq の気管内投与による影響の違いを検討することもできた。MWCNT-Bulk の気管内投与では、肺胞内に MWCNT を貪食した肺胞マクロファージが主体となり肉芽腫性変化及び軽度な線維化病変を形成していたのに対し、MWCNT-Taq の気管内投与では、肺胞内で好中球、マクロファージ、形質細胞が混在するフォーカルな炎症性変化が認められた。また、MWCNT-Taq を貪食した肺胞マクロファージの集簇はある程度認められたものの、これまでに先行研究などで経験しているような MWCNT 貪食肺胞マクロファージによる微小肉芽腫や線維化病変の形成を特徴とする生体反応ではなかった。このように元々は同一の MWCNT であるが、高度に分散処理をおこなったもの（MWCNT-Taq）と MWCNT-Bulk とでは、病理組織像が異なっていることも確認できた。

気管内投与による長期の実験に関しては、現在進行中である、3つの長期実験のうち、MWCNT-Taq (10  $\mu$ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の途中経

過では、実験開始後 3 1 週目から、control 群と比べて、MWCNT-Taq 投与群で有意に体重増加抑制が見られた。長期実験は順調に進行しており、来年に病理組織学的な検討を行い、長期毒性についての詳細は評価を行う予定である。

こうした各分担研究の結果から、ナノマテリアルの吸入毒性試験の技術基盤が確立し、人体の暴露様式に即した条件下での生体影響に関する情報が得られると考えられる。また、吸入毒性試験を実施する際の課題である至適条件の決定を迅速に行う総合的手順が整うことから、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

この結果、用量作用関係の詳細な検討が可能となり、ナノマテリアルの安全性確保の観点から閾値を設定することが可能であるか否かの総合的なリスク評価、また、そのリスクを最小化するための実質安全レベルの試算などを可能とする情報が得られると期待される。

本研究成果は、ナノマテリアルによる人の健康障害を防止するためのリスク評価の基盤となる科学的な裏づけデータを得る手法として利用され、国内外の行政施策への貢献を通して国民の健康維持に大きく貢献することが期待される。

次年度以降も、各分担研究同士が、さらなる連携を行い、針状 MWCNT による肺への腫瘍性病変を含めた有害性評価を行っていく予定である。

#### E. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Non-invasive X-ray Micro-computed Tomographic Evaluation of Indomethacin on Urethane-induced Lung Carcinogenesis in Mice. Ueno T, Imaida K, Yoshimoto M, Hayakawa T, Takahashi M, Imai T, Yanaka A, Tsuta K, Komiya M, Wakabayashi K and Mutoh M, Anticancer Research, 2012 in press.

Yokohira M, Nakano Y, Hashimoto N, Yamakawa K, Ninomiya F, Kishi S, Saoo K, Imaida K.

Toxicity of nicotine by repeated intratracheal instillation to F344 rats. J. Toxicol. Pathol., 25:257-263, 2012.

Nakada T, Kiyotani K, Iwano S, Uno T, Yokohira M, Yamakawa K, Fujieda M, Saito T, Yamazaki H, Imaida K, Kamataki T. Lung tumorigenesis promoted by anti-apoptotic effects of cotinine, a nicotine metabolite through activation of PI3K/Akt pathway. J. Toxicol. Sci., 37: 555-563, 2012.

Yokohira M, Nakano Y, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Saoo K, Imaida K. Strain differences in pleural mesothelial cell reactions induced by potassium octatitanate fibers (TISMO) infused directly into the thoracic cavity. Exp. Toxicol. Pathol., 2013 in press.

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. 103, 1440-4, 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.

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

Kishi S, Yokohira M, Hashimoto N, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Imaida K Toxicity and Mesothelial Cell Reactions Induced by Potassium Octatitanate Fibers (TISMO) Induced into the Left Thoracic Cavity in A/J Female Mice. Society of Toxicology 2012 Annual meeting, San Francisco, USA, 2012.

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸入と肺内負荷量の測定、第39回日本毒性学会学術年会 (2012.7.18)

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an Acoustical Dust Generator and Measurements of Its Body Burden in Lung, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012.7.20)

高橋祐次、小川幸男、高木篤也、相磯成敏、今井田克己、菅野純、音響式ダスト発生装置を用いた多層カーボンナノチューブの全身暴露吸入と肺内負荷量の測定、第39回日本毒性学会学術年会 (2012.7.18)

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Shigetoshi Aiso, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Whole Body Inhalation Exposure of Multi-Walled Carbon Nanotube by Using an Acoustical Dust Generator and Measurements of Its Body Burden in Lung, The 6th International Congress of Asian Society of Toxicology (2012.7.20)

高橋祐次、高木篤也、菅野純、高度に分散性を高めた多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠損マウス腹腔内投与による中皮腫発がん、第27回発癌病理研究会 (2012.8.28)

高橋祐次、高木篤也、菅野純、多層カーボンナノチューブの慢性影響について、平成24年度公益社団法人日本実験動物学会 維持会員懇談会 (2012.11.16)

高橋祐次、高木篤也、菅野純、マウスを用いた多層カーボンナノチューブの中皮腫発がん評価、平成24年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ (2013.2.7)

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

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-プロモ-3-クロロプロパンの13週間吸入曝露によるラットとマウスの鼻腔病変：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

梅田ゆみ、笠井辰也、相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 13 週間吸入曝露で誘発されたラットの呼吸器毒性、第 27 回 発癌病理研究会 (2012. 8. 28)

### 3. 書籍

横平政直，今井田克己．疾患モデルの作製と利用ーがん．第 4 章 呼吸器系，第 1 項 肺，373-382，（株）エル・アイ・シー，2012

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許出願：柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入曝露試験装置」、特願2012-148848 (2012. 7. 2)

特許出願：菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343 (2012. 7. 17 )

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし



## Ⅱ. 分担研究報告書

平成24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

「ナノマテリアル吸入暴露による肺の病理組織学的評価（慢性及び腫瘍性病変）」

研究分担者 今井田 克己 香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究協力者 岸 宗佑 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
横平 政直 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
山川 けいこ 香川大学医学部医学科腫瘍病理学  
中野 裕子 香川大学医学部医学科腫瘍病理学

## 研究要旨

本研究では、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として、全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験を三か年計画で実施する。針状のMulti wall carbon nanotubes (MWCNT) (MWNT-7、三井系統：保土ヶ谷化学工業)を分散処理 (Taquann法処理) したMWCNT を研究対象とし、雄性C57BL/6J マウスならびに雄性F344ラットを用いて動物実験を行うこととした。本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布、肺病変の発現程度を比較検討するため、MWCNTの気管内投与による肺病変の検討を行う。平成23年度は、吸入したMWCNTの分布を確認するため、肺組織内での局在の同定の予備試験および MWCNT の光学的特性の研究を行った。MWCNT原末 (MWCNT-Bulk) を高度に分散処理したMWCNT (MWCNT-Taq) を用いた単回気管内投与による予備実験を実施した。平成24年度は、マウスおよびラットへのMWCNTの気管内投与による長期実験を3つ計画し、いずれの実験も開始することができた。いずれの実験も、現在まで順調に進行している。

マウスへの気管内投与手技については、平成23年度では、様々な週齢のマウスを用いて行い、使用する器具についても工夫し、12週齢の C57BL マウスへの気管内投与を愛護的に、確実に行うことができるようになった。マウスへの気管内投与について予備試験を複数行い、平成24年度に開始した気管内投与による長期毒性試験へと引き継ぐことができた。マウス用ゾンデだけでなく、マウス用気管挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社製) を併用することで、気管や口腔内を損傷せずに、確実な投与を行うことが出来るようになり、超低用量の MWCNT-Taq 投与が可能になった。

現在進行している3つの長期実験のうち、① MWCNT-Taq ( $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$ ) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の途中経過では、実験開始後 3 1 週目から、control 群と比べて、MWCNT-Taq 投与群が有意に体重増加抑制が見られた。この原因については、MWCNT-Taq 投与による何らかの影響が投与後長期間経過後にはじめて発生する可能性が考えられ、実験終了後の病理組織学的評価を迅速に行い、その原因をつきとめたい。なお、投与後31週目以降に、体重増加抑制が生じてきていることは大変興味深いデータであり、MWCNT-Taq の気管内投与による長期毒性影響を観察する意義を示唆する所見である。

また、気管内投与が単回であったにも関わらず、長期での試験においても影響が出ていることは今後の投与回数についても様々な検討を行う必要があると考える。② 超低濃度の用量相関性を検討することを目的としたMWCNT-Taqの単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験では、現在13週を経過しているが超低用量群のいずれの群間においても有意な体重差は生じていないが、今後、長期にわたり観察し、検討を続けていく予定である。③ MWCNT-Taq (60  $\mu$ g/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験では、現在38週を経過しているが① MWCNT-Taq (10  $\mu$ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の経過で見られた、群間での有意な体重増加抑制は見られていない。マウスとラットでの種差や投与量が個体に与える影響等によるものも考えられるが、実験終了後の病理組織学的な評価をふまえて、その関連を検討する予定である。今後、各分担研究者の班員とさらなる連携を行い、針状MWCNTによる肺組織への、腫瘍性病変を含めた有害性評価を行う予定である。

## 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のサイズや凝集程度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から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。本研究班における高橋研究員らによる昨年度の分担研究において、MWCNT-Bulkを臨界点乾燥により分散処理し、単繊維に分散した繊維を効率的に取り出す方法(Taquan法処理)の開発に成功し、MWCNT-Taqを用いた全身曝露吸入実験が進行中である。ヒトが吸入暴露した場合のモデルとして国立医薬品食品衛生研究所での分担研究として行われている全身吸入曝露試験と併行し、本分担研究では、単回気管内投与によるMWCNT-Taqのマウスおよびラッ

トを用いた1年間の実験を行い、呼吸器を主体とした毒性影響を、病理組織学的に検討する。

## B. 研究方法

B-I MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

① MWCNT-Taq (10  $\mu$ g/mouse) の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

今までに当教室では、ラットでの気管内投与実験を数多く行っており、ラットへの気管内投与手技は確立している。本研究では、平成23年度の段階でマウスを用いた気管内投与に関して予備的な検討を行った。マウスへの気管内投与は問題なく行うことができることが確認できた。なお、気管内投与を完遂し、気道粘膜を傷つけることなく挿入でき、検体を投与することができる DIMS 型経気道ゾンデ(マウス用、DIMS 医科学研究所)をマウスへの気管内投与器具として用い、実験を行った(図1、図2)。なお、気管内投与による気管や口腔内への傷害を出来る限り軽減し、可能な限り気管内投与の成功させるため、バイオリサーチセンター株式会社製のマウス気管内挿管器具の光ファイバー付きマウス用喉頭鏡を併用することで、気管内投与を正確に行う事が出来た。(図3、4、5)

実際にヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した気管内投与実験を行うため、MWCNT(10  $\mu$ g/mouse)の用量にて気管内投与

を行った。当分担研究では、高橋研究員らが行っている MWCNT-TaQ の全身曝露吸入試験による毒性評価と比べて、単回気管内投与による長期毒性影響を比較検討するため、実験を計画したが、これまで、MWCNT-TaQ の気管内投与による長期試験は行われておらず、併行して研究されている全身曝露吸入試験の結果と比較検討する上でも重要な研究である。当分担研究では、12週齢の雄性 C57BL/6J マウスに MWCNT-TaQ を単回気管内投与を行った。(図 6) MWCNT-TaQ を滅菌生理食塩水に Tween80を0.1%添加した媒体に懸濁させ、超音波で分散させた。MWCNT-TaQ の投与用量は $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$  とし、1匹当たりの投与用量は $0.02\text{ml}/\text{匹}$ とした。気管内投与は投与液 $0.02\text{ml}$  の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 $0.03\text{ml}$  で押し込むことによって肺内に注入した。被験物質懸濁液の調製方法としては、Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に、MWCNT-TaQ を設定濃度となる様に加え、超音波を用いて懸濁した。倫理面への配慮として、被験物質投与時の麻酔はネブタールの腹腔内投与により、過度の疼痛を与えることなく倫理的観点をふまえ、安全に行うことができた。実験は現在まで順調に継続している。1年間の実験期間の後、倫理面に即した麻酔下で解剖を行い、病理組織学的な評価を行い、MWCNT による肺毒性の評価を行う予定である。

## ② 超低濃度 MWCNT-TaQ の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

B-I ①は、ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した気管内投与実験として、MWCNT :  $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$  の用量による実験を計画し開始した。しかし、その後、MWCNT-TaQ の開発を行った高橋研究員らの研究により、MWCNT-TaQ の分散は、MWCNT-Bulk と比べて約20倍の分散を示していることなどが報告され、B-I ①で行っている低濃度よりも、より低濃度での気管内投与による実験の必要性が明らかになり、以下の超低濃度条件においての実験を計画した。

MWCNT-TaQ の投与用量の決定は、B-I ①や下記に示すB-IIの実験との関連も検討できると考え、最高用量をB-I ①での投与量と

同じく、 $10.0 \mu\text{g}/\text{匹}$ とし、その約20分の1に近い値として、公比5での超低用量の用量設定を行った。具体的には、 $10.0 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、 $2.0 \mu\text{g}/\text{匹}$ 、 $0.4 \mu\text{g}/\text{匹}$ の3段階(公比5)の投与用量とし、1匹当たり $0.02\text{ml}$ を投与した。その他、コントロール群として、被験物質の媒体である Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水を同様に、1匹当たり $0.02\text{ml}$ を投与した群を設けた(図7)。気管内投与は投与液 $0.02\text{ml}$ の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 $0.03\text{ml}$ で押し込むことによって肺内に注入した。被験物質懸濁液の調製方法としては、Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に、MWCNT-TaQ を各設定濃度となる様に加え、超音波を用いて懸濁した。気管内投与には、B-I ①と同様に、DIMS 型経気道ゾンデ(マウス用)(DIMS 医科学研究所)およびマウス気管内挿管器具(バイオリサーチセンター株式会社)の光ファイバー付きマウス用喉頭鏡を併用することで確実に行った。倫理面への配慮として、被験物質投与時の麻酔はネブタールの腹腔内投与により、過度の疼痛を与えることなく倫理的観点をふまえ、安全に行うことができた。実験は現在まで順調に継続している。1年間の飼育期間の後、倫理面に即した麻酔下で解剖を行い、病理組織学的な評価を行う予定である。

## B-II MWCNT-TaQ ( $60 \mu\text{g}/\text{rat}$ ) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験

本研究班では、マウスを用いて全身曝露吸入実験を計画しており、気管内投与も同様にマウスに行う必要があった。平成23年度に行った予備試験として、マウスでの気管内投与について、検討を行ったが、12週齢のマウスは気管径が非常に細く、前述である DIMS 型経気道ゾンデ(マウス用)やマウス用喉頭鏡を併用する必要がある。今回は動物種差を検討するためのラットを用いた気管内投与の実験も行った。

B-I ①では、ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した気管内投与実験として、マウスに対して MWCNT :  $10 \mu\text{g}/\text{mouse}$  の用量による実験を行ったが、Charles River 社から報告されている C57BL/6J マウスと F344 ラットの肺重量データを比較し、F344 ラット