

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体内動態に関する研究」

研究分担者 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

「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り、肺内に沈着した検体の体内動態に関する研究を行った。具体的には、カーボンナノチューブ (CNT) の一つである多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を検体として、マウスの肺から MWCNT を抽出し、繊維数を把握する方法の確立を行った。また、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。そのため、H23年度に MWCNT を高度に分散する方法 (Taquann 法) を独自に開発し (特許出願済)、H24年度は、その工程を改良して全身吸入装置へ使用するため量産体制を整えた。

Taquann 法処理検体 (MWCNT-Taq) は、MWCNT 原末に比較して凝集体が少なく、かつ単離した繊維成分が多く含まれ、液相及び気相に高度に分散する性質を有していた。MWCNT-Taq 10 ug、1 ug、0.1 ug に含まれる繊維数は、それぞれ 2.3×10^7 本、 4.0×10^6 本、 3.2×10^5 本であった。この検体をマウスに 1 日 2 時間、5 日間の反復全身暴露吸入を行った。5 日間の平均質量濃度は 1.8 mg/m^3 であった。暴露終了後にマウスの肺を採取し、アルカリ溶解して MWCNT を回収し繊維数と長さを計測した。並行して、無処置動物の肺に 1 ug の MWCNT-Taq を添加して同様に MWCNT を回収して繊維数と長さを計測した。その結果、全身暴露吸入を行った肺には 5.1×10^6 本の繊維が含まれていた。MWCNT-Taq 1ug の添加回収実験で回収された繊維数は 1.6×10^6 本であった。1 ug の添加回収量から計算すると、3.2 ug/動物が肺に取り込まれたと考えられる。

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 MWCNT-Taq の量産体制を確立した。実際に MWCNT-Taq をマウスに全身暴露吸入を行い、肺に含まれる MWCNT の繊維数を定量的に把握する方法を確立した。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。

A. 研究目的

「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。

低分子化合物の体内動態は、mass spectroscopy、あるいは isotope を用いて定量することが一般に行われている。CNT の体内動態の測定にもこれに準じた方法が適用され、isotope と mass spectroscopy を使用する方法¹⁾、Raman 分光を使用する方法²⁾、組織を灰化して除去後更に高温でCNTを酸化して二酸化炭素として定量する方法³⁾が報告されている。これらの測定方法は検量線を基に質量に換算されるため、定量性を有しておりCNTの体内動態の概要を把握するには優れた方法である。しかしながら、CNTの生体影響を評価するための情報として不十分な点がある。即ち、CNTのような繊維状で安定性が高い物質では、体内に蓄積された「本数」と「サイズ」が生体影響に対して重要な意味を持つ。粒子状物質の吸入において粒径分布はエアロゾルの特性を示す重要なパラメータであると同時に、呼吸器系の部位別の沈着率をある程度決定する。細気管支から肺胞まで到達する幾何学的な粒子径は0.5 μm 以下が主体であるが、CNTのように長さは数 μm であるが、アスペクト比が大きい繊維状物質では、空気動力学径 (Aerodynamic Diameter ; ADD) を考慮する必要がある。

本分担研究では、MWCNTの生体影響を評価するための情報として、体内に蓄積された「本数」と「サイズ」を直接的に把握する方法の確立、及び、当該研究班において実施さ

れる実験検体の測定を目的としている。具体的には、肺組織を溶解してMWCNTを回収し、走査型顕微鏡 (SEM) により観察する方法である。熱安定性が極めて高いアスベストでは、組織を灰化する方法が適用されている。ほぼ炭素のみから構成されるナノマテリアルでは高温処理は一般的でなく、熱に比較的安定なことが知られるMWCNTについては不可能ではないが、各種の塩を含む生体成分との混合状態での安定条件を設定することは容易ではない。本分担研究では、H23年度に肺組織を化学的に溶解後にMWCNTを遠心分離して回収する方法を開発し、実際に肺内に取り込まれたMWCNTの観察を行った。H24年度は、定量的に繊維数を把握する方法を開発した。

並行して、吸入させる検体の分散方法の改良を行った。既述したように、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。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。CNTの吸入試験に際しては、この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊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、凝集体によるこのような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

単離繊維成分のみからなる分散性の高い検体を得る処理法を開発した。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の量産体制と定量的検体分注法を整備した。

B. 研究方法

B-1. MWCNT検体

MWCNTは三井物産のMWNT-7を使用した。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm) ^{a)}
長さ	1-19 μm (> 5 μm 27.5%) ^{a)}
繊維数	3.55×10^{11} 本/g ^{a)}
製品形状	繭状凝集体を含む単離繊維
化学組成	炭素純度 99.5%以上
	鉄：3500 ppm (0.35%) ^{a)}
	硫黄：470 ppm ^{a)}
	塩素：20 ppm ^{a)}
	フッ素：<5 ppm ^{a)}
	臭素：<40 ppm ^{a)}

^{a)}東京都健康安全研究センターの測定データ
4, 5)

B-2. MWCNTの分散処理方法の開発（Taquann法）

Taquann法は走査型電子顕微鏡（SEM）の試料作製方法である「臨界点乾燥」に着想を得た技術である。乾燥時に表面張力を受けないため、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、200 mgのMWCNT原末をターシャルブタノール（TB、融点；25.69°C、関東化学株式会社 特級）500 mLに分散、懸濁させて、金属製フィルター（セイシン企業、目開き25 μm ）でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固化した状態のMWCNT懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ（Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK）で液相を介さずに乾燥させ、TBを分離除去することで、分散性の高い乾燥状態のMWCNTを得る（図1）。Taquann法の開発当初は、1回の処理（24時間）で1 mg程度の収量であった。H24年度は、TB

とMWCNTの混合方法、ろ過方法を工夫することにより、1回の処理で10 mg程度の収量が得られるようになった。まず、MWCNT原末をTBに十分に懸濁させるために、TBとMWCNTを混合してから氷冷し、TBをシャーベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混合し、その後、-25°Cで一晩凍結したのち約60°Cに加熱したTBを添加し再融解を行った。これにより、MWCNTのTBへの分散性が向上した。また、金属製フィルターには約5cmのリム（同径の筒）を増設し、そこに携帯電話に使用されている振動モーター（FM34F T. P. C. DC MOTOR、振動量：17.6 m/s²）を4個装着し、フィルターを振動させながらMWCNT懸濁液をろ過することにより、ろ過効率を向上させた。

MWCNT原末とTaquann法処理検体の特性の比較を図2～図4に示した。

以下、MWCNTの原末をMWCNT-Bulk、Taquann法処理MWCNTをMWCNT-Taqと記載する。

B-3. マウスの全身暴露吸入実験

MWCNT-Taqをマウスに全身暴露吸入し、その肺に含まれるMWCNT-Taqの測定を行った。動物は雄性マウス（C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、10-11週齢、体重 23.8-30.8 g）を使用した。直噴式ダスト発生装置を使用し、MWCNT-Taqを1日2時間、5日間の反復全身暴露吸入を行った。5日間の平均質量濃度は1.8 mg/m³であった（全身暴露吸入実験の詳細については、小川分担研究者の報告を参照）。この動物から肺を採取し実験に供した。また、無処置の動物からも肺を取り出し、MWCNTの抽出効率を求めるために使用した。

【倫理面への配慮】

動物の取扱いについては、動物の愛護及び管理に関する法律（昭和48年法律第105号、平成17年法律第68号一部改正）、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準（平成18年環境省告示第88号）、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針（平成18年6月1日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知）、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン（平成19年6月1日日本学術会議）、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程（平成19年4月1日）を遵

守した。全身暴露吸入終了後、マウスをペントバルビタール（ソムノペンチル、共立製薬株式会社）麻酔下で放血により安楽死させ、肺のサンプリングを行った。

B-4. 肺からのMWCNT抽出方法

(1) 肺溶解液の調製

肺溶解液は5w/v% 水酸化カリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）、0.1w/v% SDS（和光純薬工業株式会社、試薬特級）に、生体由来の金属イオンを除去するため0.1 w/v% EDTA・2Na（同仁化学研究所、試験研究用）、及び、水酸化鉄（II）が酸化して不溶性の水酸化鉄（III）に変化することを防止する目的で、2w/v%アスコルビン酸ナトリウム（和光純薬工業株式会社、試薬特級）を加えた。各試薬は MilliQ 水に混合後、80°Cで加熱して完全に溶解した。

(2) 肺からのMWCNTの抽出

肺サンプル（約200 mg）をマイクロチューブ（エッペンドルフ、Protein LoBind、2 mL）に入れ、加温した肺溶解液を1.8 mL添加した。無処置動物の肺には、0.1w/v% Sodium dodecylbenzene sulfonate に懸濁したMWCNT-Taqを1ug添加した。このマイクロチューブを80°Cに設定したインキュベーター内で24時間放置して肺を溶解した。目視観察により肺溶解液が澄明であることを確認後、高速微量冷却遠心機（MX-205、TOMY）で25°C、20,000×g、60分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣にはMWCNTとSDSの結晶が含まれるため、1.5 mLの70%エタノール（和光純薬工業）を添加し、ボルテックスを用いて溶解し、再び20,000×g、25°C、60分の条件で遠心分離しMWCNTのみを回収した。上清を取り除いた後、マイクロチューブをインキュベーター内で80°Cの条件で加熱しエタノールを除去した。0.1w/v% TritonX（ICN）100 uLを添加し、40°Cに設定したインキュベーター内で24時間放置して沈渣を再分散した（図5）。

(3) SEM観察試料の作製と観察

ガラス繊維性フィルター（GF/F、φ21 mm、

Whatman）の中心を11 mmのポンチで打ち抜いて作製したドーナツ状のフィルターをロート型ガラス濾過器（51G-1、三商）に載せ、その中心上にアルミナフィルター（ワットマン、孔径0.02 μm、φ12mm、Anodisc）を置き、ピペッティングにより十分に分散させたMWCNT分散液1 uLをフィルター上に滴下し吸引ろ過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製SEM観察台（S-GA、φ15×5 mm、日新EM）にカーボンシール（φ12 mm、日新EM）で固定した。オスミウムコーター（HPC-1 SW型、真空デバイス）により5秒間オスミウムコートを行いSEM（VE-9800、KEYENCE）で2,500倍、加速電圧2～2.8 kVの条件で観察した。観察はフィルターの直径に沿って行った。MWCNTの繊維長と数の計測には、ImageJ（<http://rsbweb.nih.gov/ij/>）を使用した。

また、MWCNT-Taqの数を把握するために、Sodium dodecylbenzene sulfonate に懸濁したMWCNT-Taq（10、1及び0.1 ug）の観察を実施した。

(4) MWCNT繊維数の算出

MWCNT繊維の本数（Ct）は、SEM観察のために調製したMWCNT懸濁液の調製量（100 uL、V）、1 uLのMWCNT懸濁液がフィルターに展開した面積（S_i）、計測した繊維数（C）、繊維数を計測した面積（S_c）を基に以下の式で計算した。

$$Ct = C \times \frac{St}{Sc} \times V$$

計測した1視野当たりの面積は、1,818 μm²（49.23×36.92 μm）、1サンプル当たり500本以上の繊維数又は30以上の視野を観察した。なお、視野の辺縁に存在し、全長が確認できない繊維については計測対象から除外した。

C. 研究結果

MWCNT-Taq 10 ug、1 ug、0.1 ug に含まれる繊維数は、それぞれ、2.3×10⁷本、4.0×10⁶本、3.2×10⁵本、50%累積比率に相当する繊維の長さは、それぞれ6.4 μm、7.2 μm、6.4 μmであった（図6、表1）。MWCNT-Taq 1ug の添

加回収実験で回収された繊維数は 1.6×10^6 本、50%累積比率に相当する繊維の長さは 6.4 μm であった (図7、表1)。全身暴露吸入を行った肺には 5.1×10^6 本の繊維が含まれ、50%累積比率に相当する繊維の長さは 8.6 μm であった (図7、表1)

D. 考察及び結論

図2~3に示すように、MWCNT-Taq は凝集体が少なく、単離した繊維成分が多い。図4に示すように TB を除去して粉末となった後でも、液相での分散性を有しており、MWCNT-Taq の懸濁液の沈降は緩やかであった。気相においても分散性が保たれていることが示されている (小川分担研究者の報告)。CNT 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、Taquan 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。MWCNT-Bulk の TB への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。一方、Taquan 法の律速段階は、固化した TB を真空ポンプで除去する工程であり、500 mL のろ液から TB を除去するのに要する時間は24時間である。これに対しては、有機溶媒回収型ポンプの台数を増やすことで対応が可能であると考えられる。

MWCNT-Taq に含まれる繊維数を計測したところ、MWCNT-Taq 10 μg 、1 μg 、0.1 μg に含まれる繊維数は、それぞれ、 2.3×10^7 本、 4.0×10^6 本、 3.2×10^5 本であった。繰り返し実験を行っていないため、測定誤差は不明であるが、大凡 3×10^6 本/ μg の繊維数であると考えられる。繊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繊維の長さは、10 μg ; 6.4 μm 、1 μg ; 7.2 μm 、0.1 μg ; 6.4 μm であったことから、本研究で用いた方法は、

繊維の分布を偏り無く把握できていると考えられた。(図6、表1)。

MWCNT-Taq 1 μg の添加回収実験で回収された繊維数は 1.6×10^6 本、50%累積比率に相当する繊維の長さは 6.4 μm であった (図7、表1)。この結果から、回収率は40%と考えられる。全身暴露吸入を行った肺には 5.1×10^6 本の繊維が含まれ、50%累積比率に相当する繊維の長さは 8.6 μm であった (図7、表1)。

1 μg の添加回収量から計算すると、3.2 μg /動物が肺に取り込まれたと考えられる。

本年度の分担研究では、Taquan 法の改良を行い、全身暴露吸入実験が可能となる MWCNT-Taq の量産体制を確立した。実際に MWCNT-Taq をマウスに全身暴露吸入を行い、肺に含まれる MWCNT の繊維数を定量的に把握する方法を確立した。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。

【引用文献】

- 1) Sheng-tao Yang, et al., Biodistribution of Pristine Single-Walled Carbon Nanotubes In Vivo, *J. Phys. Chem. C*, 111 (48), 17761-17764, 2007
- 2) Zhuang Liu, et al., Circulation and long-term fate of functionalized, biocompatible single-walled carbon nanotubes in mice probed by Raman spectroscopy, *PNAS*, 105 (5) 1410-1415, 2008
- 3) Moritaka Tamra, et al., A determination method of pristine multiwall carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation exposure by combustive oxidation-nondispersive infrared analysis, *Talanta*, 84, 802-808, 2011
- 4) Takagi A, Hirose A, Nishimura T,

Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. , Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):105-16.

- 5) Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats., J Toxicol Sci. 2009 Feb;34(1):65-76.

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

- (1) 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)
- (2) 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)
- (3) 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)

- (4) 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)
- (5) 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)

G. 知的財産の出願・登録情報

1. 特許取得
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

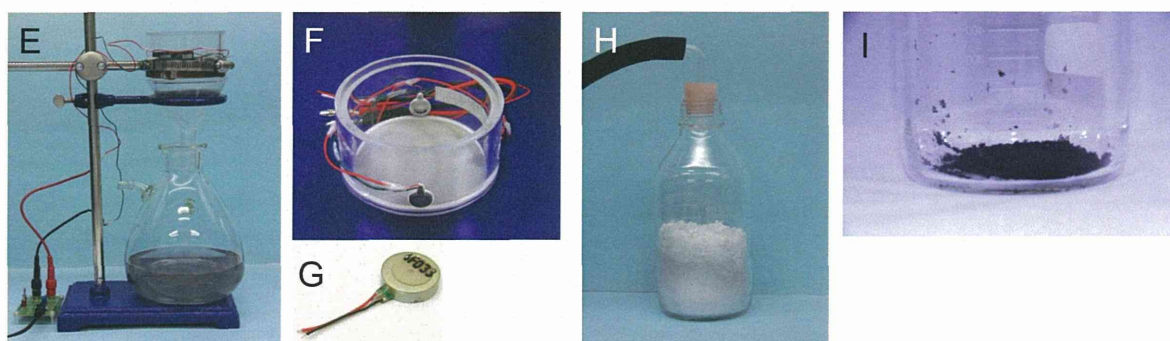
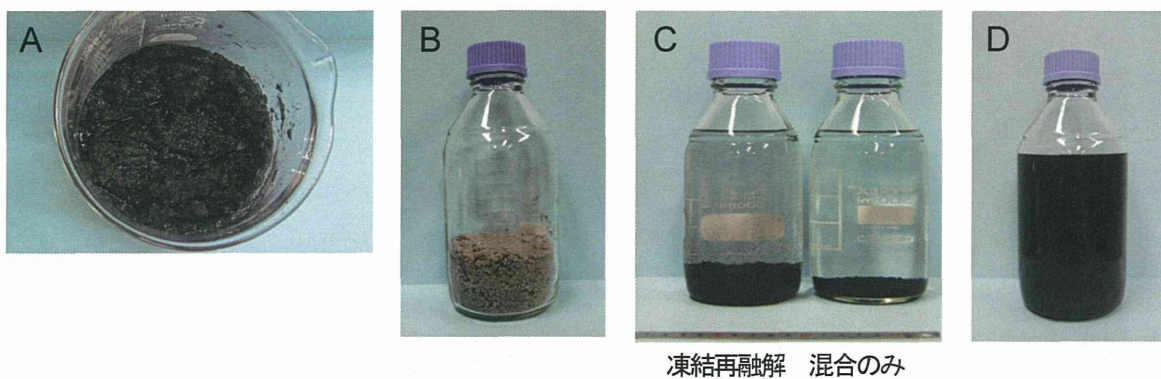


図1 Taquan 法の概要

200 mg の MWCNT 原末 (MWCNT-Bulk) をターシャルブタノール (TB) 約 200 mL に混合して氷冷して TB をシャーベット状にして金属性スパーテルで混ぜ十分に混和する (A)。その後、 -25°C で一晩凍結したのち (B)、TB を 60°C に加温したものを加え全量を 500 mL とし凍結再融解を行った (D)。凍結再融解により、TB への分散性が向上する。金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 μm) でろ過し大型の凝集体を除く (E)。ろ過効率を向上させるため、金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター (FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量: 17.6 m/s^2 、G) をリムに 4 個装着し (F)、フィルターを振動させながら MWCNT 懸濁液をろ過する。ろ液は直ちに液体窒素で凍結・固化させる (H)。固化した状態の MWCNT 懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ (Vacubrand、MD4CNT+AK+EK) で液相を介さずに乾燥させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る (I)。

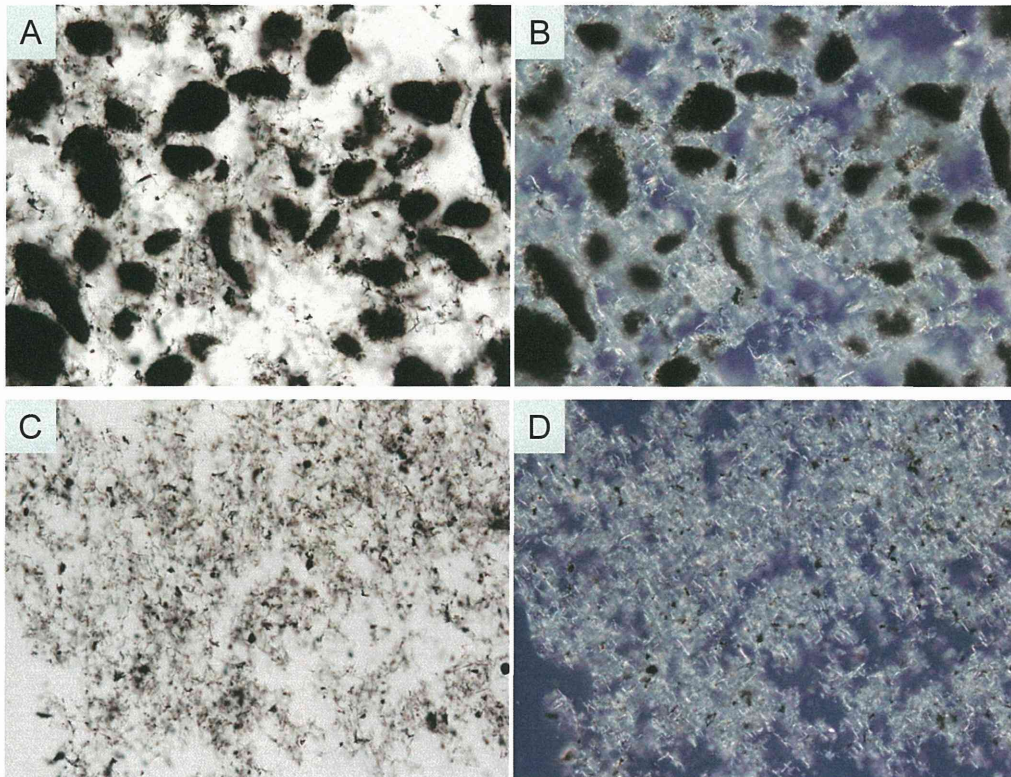


図2 Taquann 法処理検体 (MWCNT-Taq) の光学顕微鏡像

MWCNT の原末 (MWCNT-Bulk、A、B) と Taquann 法処理検体 (C、D)。MWCNT-Bulk には大きな凝集体が認められるが、MWCNT-Taq には大きな凝集体は認められず、単離した繊維が多く認められる。A と B は通常の光源で観察した像、C と D は偏光で観察した像。

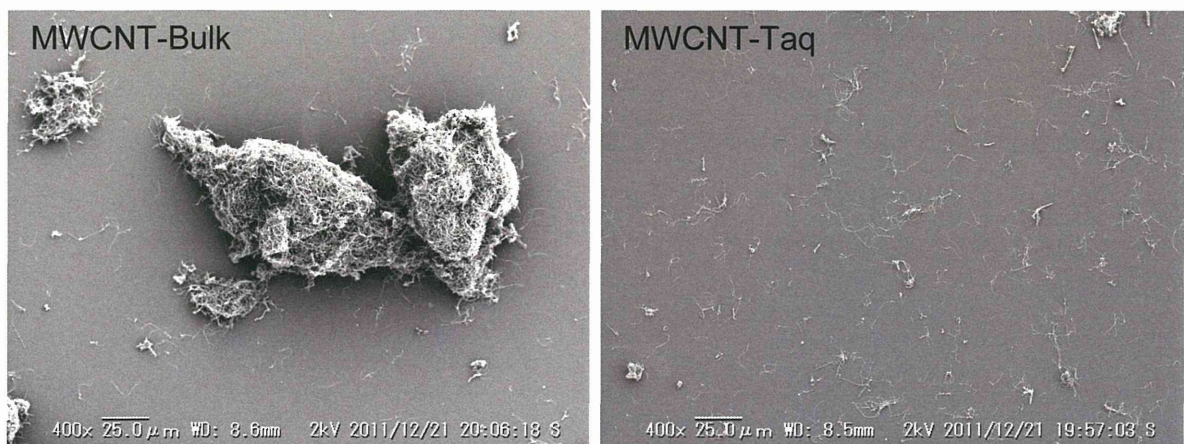


図3 MWCNT-Taq の走査型電子顕微鏡像

MWCNT-Bulk には大きな凝集体があり、単離している繊維も少ない。一方、MWCNT-Taq はその殆どが単離した繊維として観察される。凝集体も観察されるが、フィルターの見開きである 25 μm を超えるものは観察されない。

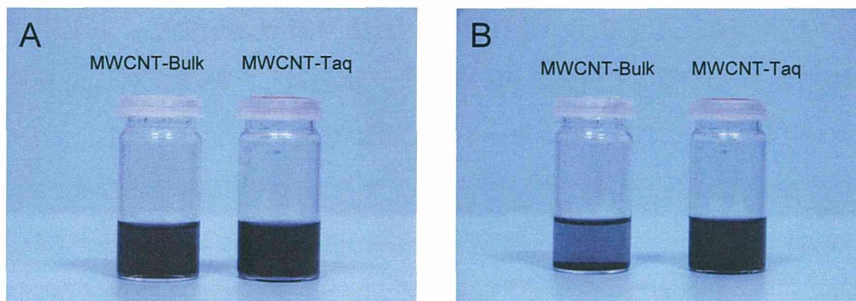


図4 MWCNT-Taqの分散性

1 mg の MWCNT-Bulk 及び MWCNT-Taq を 5 mL の TB に再懸濁し、静置してその様子を観察した。MWCNT-Taq は転倒混和により容易に再懸濁し (A)、その状態は静置後 2 時間保たれた (B)。

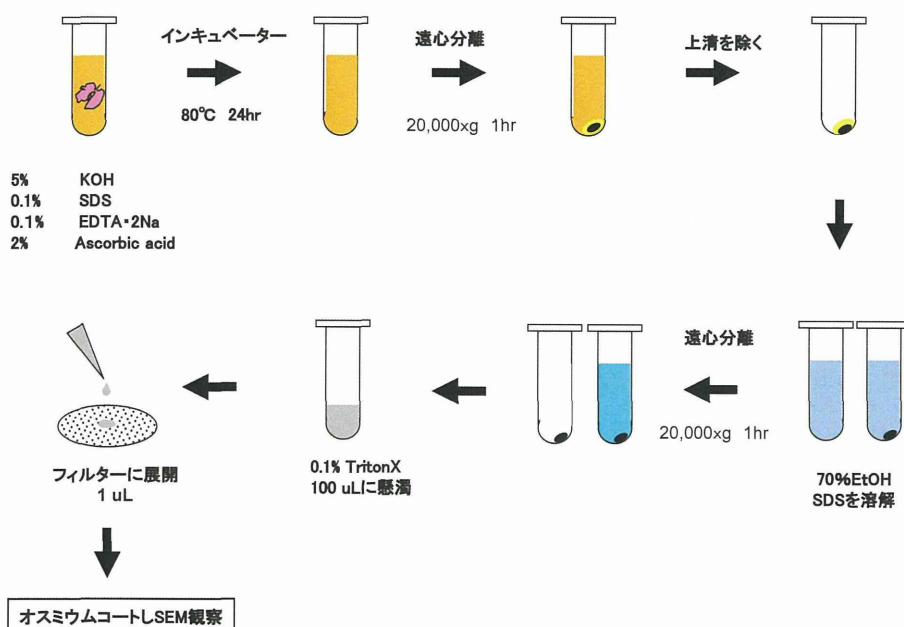


図5 肺からのMWCNT抽出方法の概略図

肺サンプル (約 200 mg) をマイクロチューブ (2 mL) に入れ、80°Cに加熱した肺溶解液 (5w/v% 水酸化カリウム、0.1w/v% SDS、0.1 w/v% EDTA・2Na、2w/v%アスコルビン酸ナトリウム) を加えた。このマイクロチューブを 80°Cに設定したインキュベーター内で 24 時間放置して肺を溶解した。高速微量冷却遠心機 (MX-205、TOMY) で 25°C、20,000×g、60 分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣にはMWCNT と SDS の結晶が含まれるため、1.5 mLの 70%エタノール(和光純薬工業)を添加し、ボルテックスを用いて溶解し、再び 20,000×g、25°C、60 分の条件で遠心

分離し上清を除去しMWCNTのみを回収した。0.1w/v% TritonX (ICN) 100 uL を添加し、40°Cに設定したインキュベーター内で24時間放置して沈渣を再分散した。再分散した懸濁液を1 uL を分取し、アルミナ製フィルターに展開し、オスミウムコートしてSEMで観察した。

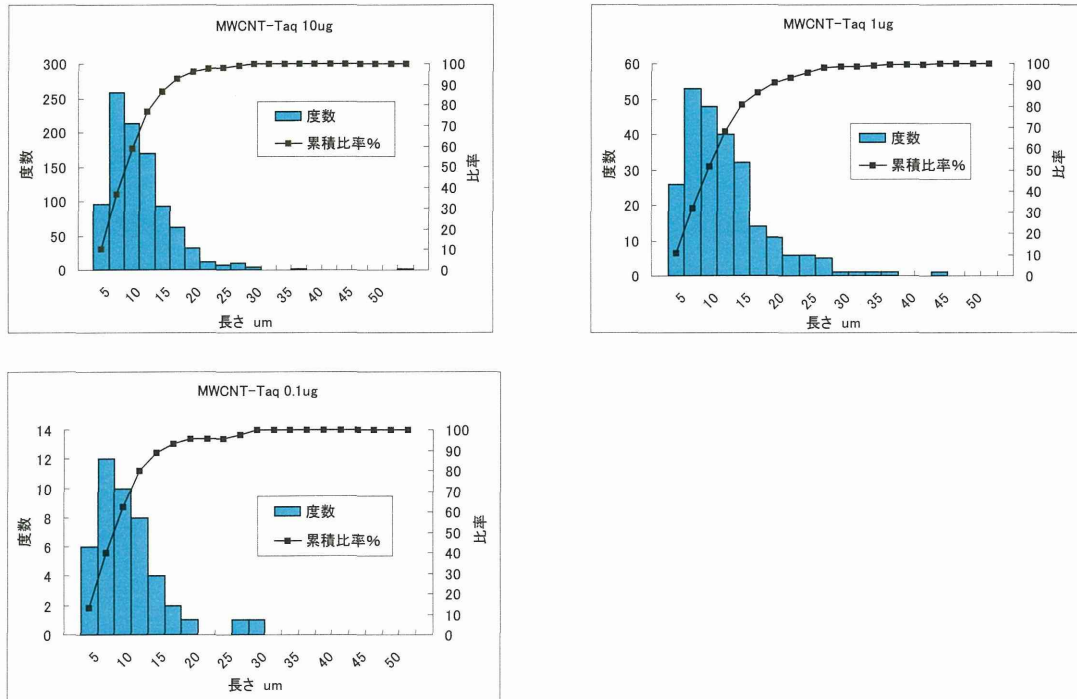


図6 MWCNT-Taqに含まれる繊維数と長さの分布

MWCNT-Taq 10 ug、1 ug、0.1 ug をアルミナ製フィルターに1 uL 展開し、含まれる繊維数と長さを計測した。繊維数は、それぞれ、10 ug ; 2.3×10^7 本、1 ug ; 4.0×10^6 本、0.1 ug ; 3.2×10^5 本、50%累積比率に相当する繊維の長さは、10 ug ; 6.4 um、1 ug ; 7.2 um、0.1 ug ; 6.4 um であった。

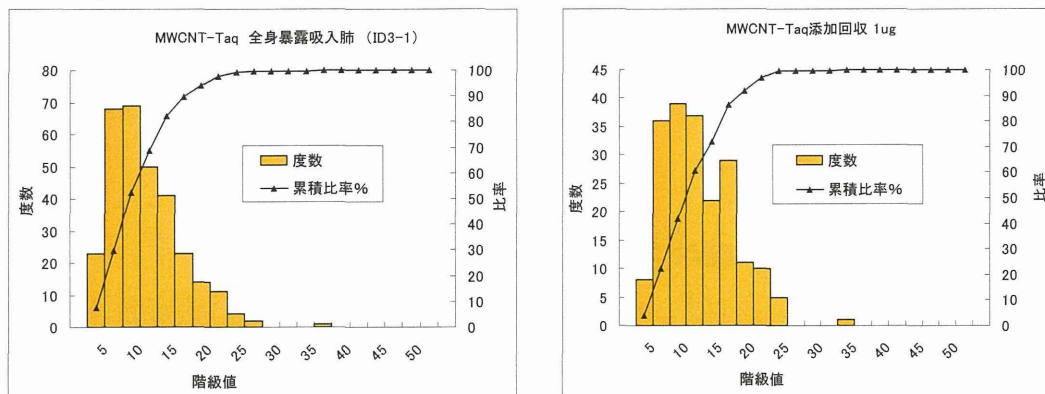


図7 全身暴露吸入したマウスの肺に含まれるMWCNT-Taqの繊維数と長さの分布

MWCNT-Taq をマウスに全身暴露吸入を行い、その肺に含まれるMWCNT-Taqの測定を行った。動物は雄性マウス (C57BL/6NCrSlc、SPF、SLC、10-11 週齢、体重 23.8-30.8 g) を使用した。MWCNT-Taq

を1日2時間、5日間の反復全身暴露吸入を行った。5日間の平均質量濃度は1.8 mg/m³であった。このマウスから肺を採取し、アルカリ溶解してMWCNTを回収して繊維数と長さを計測した。並行して、無処置動物の肺にMWCNT-Taq 1 ugを添加し、同様にアルカリ融解してMWCNTを回収して繊維数と長さを計測した。全身暴露吸入を行った肺には5.1×10⁶本の繊維が含まれ、50%累積比率に相当する繊維の長さは8.6 umであった。MWCNT-Taq 1 ugの添加回収実験で回収された繊維数は1.6×10⁶本、50%累積比率に相当する繊維の長さは6.4 umであった。

表1 MWCNT-Taqの繊維数と長さの分布のまとめ

サンプル	繊維数
MWCNT-Taq 10ug	2.3 × 10 ⁷
MWCNT-Taq 1ug	4.0 × 10 ⁶
MWCNT-Taq 0.1ug	3.2 × 10 ⁵
MWCNT-Taq 1ug 添加回収	1.6 × 10 ⁶
MWCNT-Taq全身暴露吸入肺	5.1 × 10 ⁶

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「DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現変動解析」

分担研究者 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。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結果、暴露 1 及び 3 日目に免疫応答及び細胞死・アポトーシスに関連する遺伝子群が、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。

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暴露形態に近い全身吸入暴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、三井物産）を 4 時間（9 時から 13 時まで）全身吸入暴露した。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独立した 3 系統からなる全身吸入暴露施設を用いた。暴露終了 1 時間後にマウスを暴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暴露後 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、計 45 匹に吸入暴露した。吸入暴露は装置の収容匹数の制限から 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。

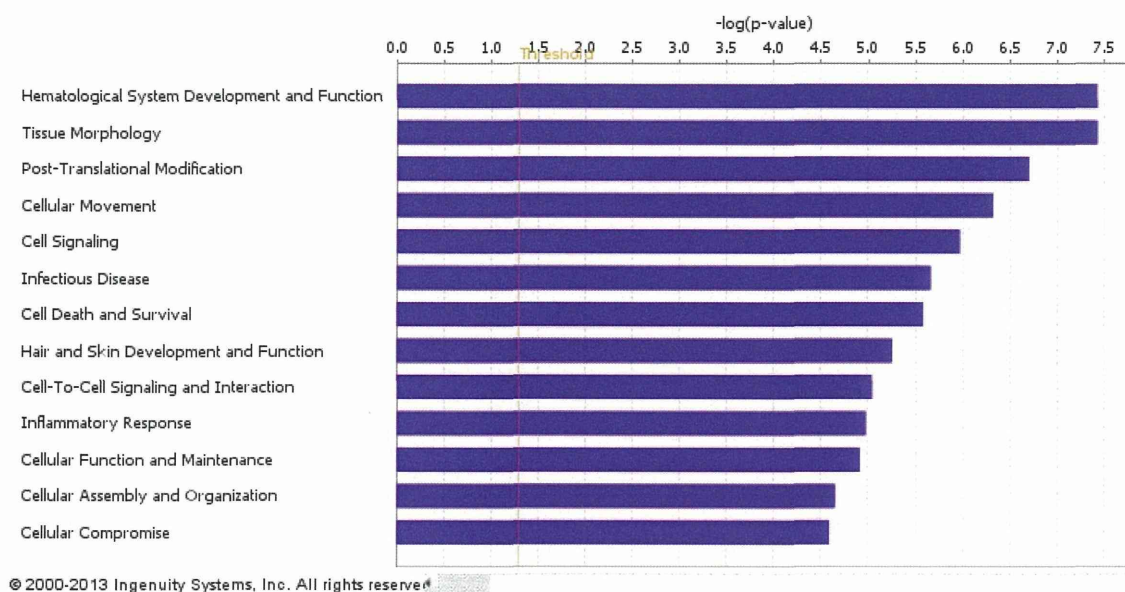
（倫理面への配慮）

本研究所の動物実験計画承認書を得ており、飼育、吸入暴露、及び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るなど本研究所の実験動物取り扱い倫理規定を遵守した対応を行っている。

C, D. 研究結果及び考察

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。これらの中から目視にてデータのバラツキが少なく、さらに、対照群の変動が少なく、生物学的に意味が有ると思われる遺伝子を MWCNT 暴露 1 日目で 15 遺伝子、3 日目で 4 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。しかし、高い確率で抽出された（フィッシャー正確率検定）Category は認められなかった。これは目視で対象となる遺伝子を限定しすぎたためと考えられた。そこで、0.5copy/cell 以上で有意に変化した全遺伝子を対象にパスウェイ解析を行った。特に高い確率で抽出されたのは、MWCNT 暴露 1 日目に増加する遺伝子群であった。抽出された Category としては、Hematological System Development and Function、Tissue Morphology、Post-translational Modification、Cellular Movement、Cell Signaling、Infection Disease などであった（図 1）。



© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 1. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した遺伝子のパスウェー解析結果

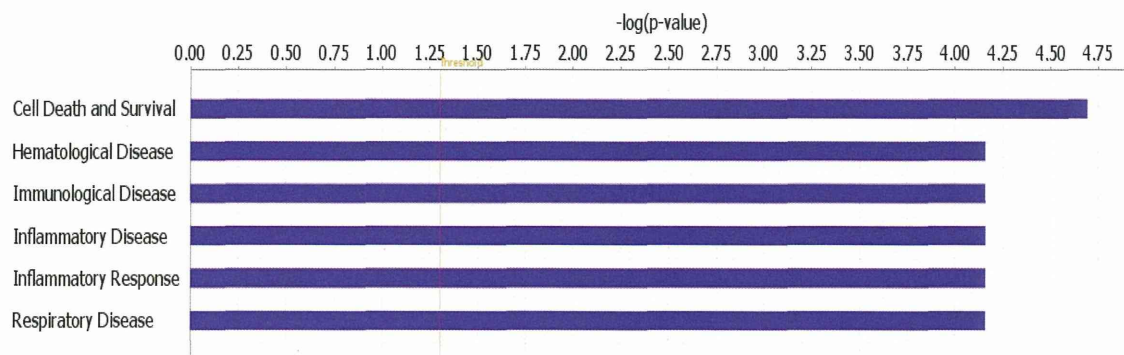
さらに上記の Category 内の Function Annotation で p 値を低いものをリストアップし、表 1 に示した。抽出された系としては、t-lymphocytes、leukocyte、cell movement、cell death、phagocytosis などで、特に免疫反応に関連する系や細胞死・アポトーシス系の増加が注目された(表 1)。

また、パスウェー解析の結果、MWCNT 暴露 3 日目に増加する遺伝子群で特に高い確率で抽出されたのは、Cell Death and Survival、Hematological Disease、Immunological Disease、Inflammatory Response、Respiratory Disease などであり、暴露 1 日後よりは抽出された category 数は減少した(図 2)。これらの Category 内の Function Annotation で p 値を低いものを同様にリストアップし、表 2 に示した。抽出された

系としては、apoptosis of tumor cell line、allergic pulmonary eosinophilia (表 2 では重複して抽出された)などで、細胞死・アポトーシス系や免疫反応に関連する系の増加が注目された。7 日目の増加遺伝子では Lipid Metabolism、Small Molecule Biochemistry などの脂質代謝系の Category が抽出された(図 3)。これらの Category 内の Function Annotation で p 値を低いものを同様にリストアップし、表 3 に示した。特に高い確率で抽出されたのは metabolism of stearic acid、metabolism of oleic acid など脂肪酸代謝系の遺伝子であった。一方、1、3、7 日目の減少遺伝子ではパスウェー解析で特定の系は抽出されなかった(data not shown)。

表 1. MWCNT 暴露 1 日後に増加した遺伝子の Category 別 Function Annotation 一覧表

Category	Functions Annotation	p-Value
Hematological System Development and Function	quantity of T lymphocytes	3.72E-08
Hematological System Development and Function	quantity of lymphocytes	3.25E-07
Hematological System Development and Function	quantity of leukocytes	1.03E-05
Hematological System Development and Function	quantity of blood cells	1.43E-05
Hematological System Development and Function	quantity of hematopoietic progenitor cells	6.30E-05
Hematological System Development and Function	quantity of thymocytes	8.71E-05
Tissue Morphology	quantity of T lymphocytes	3.72E-08
Tissue Morphology	quantity of lymphocytes	3.25E-07
Tissue Morphology	quantity of leukocytes	1.03E-05
Tissue Morphology	thickening of epithelial tissue	1.38E-05
Tissue Morphology	quantity of blood cells	1.43E-05
Tissue Morphology	quantity of hematopoietic progenitor cells	6.30E-05
Tissue Morphology	thickening of basement membrane	6.86E-05
Tissue Morphology	quantity of thymocytes	8.71E-05
Post-Translational Modification	phosphorylation of protein	2.00E-07
Post-Translational Modification	ubiquitination of protein	1.06E-05
Cellular Movement	cell movement	4.75E-07
Cellular Movement	migration of tumor cell lines	7.41E-07
Cellular Movement	cell movement of tumor cell lines	1.23E-06
Cellular Movement	migration of cells	3.55E-06
Cellular Movement	invasion of cells	2.96E-05
Cell Signaling	protein kinase cascade	1.07E-06
Cell Signaling	serine phosphorylation	5.85E-05
Cell Signaling	cell surface receptor linked signal transduc	8.71E-05
Infectious Disease	Viral Infection	2.18E-06
Infectious Disease	infection of tumor cell lines	5.01E-05
Cell Death and Survival	cell death of epithelial cell lines	2.62E-06
Cell Death and Survival	necrosis of kidney	1.45E-05
Cell Death and Survival	cell death of kidney cells	2.07E-05
Cell Death and Survival	apoptosis of epithelial cell lines	2.17E-05
Cell Death and Survival	cell death of epithelial cells	3.17E-05
Cell Death and Survival	apoptosis of fibroblast cell lines	3.30E-05
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	6.96E-05
Cell Death and Survival	cell death of kidney cell lines	7.18E-05
Cell Death and Survival	apoptosis	9.73E-05
Hair and Skin Development and Function	pallor	5.53E-06
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	response of myeloid cells	9.10E-06
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	immune response of phagocytes	1.06E-05
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	phagocytosis of blood cells	1.23E-05
Cell-To-Cell Signaling and Interaction	immune response of macrophages	1.69E-05
Inflammatory Response	immune response of phagocytes	1.06E-05
Inflammatory Response	phagocytosis of blood cells	1.23E-05
Inflammatory Response	immune response of macrophages	1.69E-05
Inflammatory Response	immune response of cells	7.52E-05
Cellular Function and Maintenance	phagocytosis of blood cells	1.23E-05
Cellular Function and Maintenance	organization of cytoplasm	2.23E-05
Cellular Function and Maintenance	organization of cytoskeleton	2.47E-05
Cellular Function and Maintenance	engulfment of blood cells	2.62E-05
Cellular Function and Maintenance	engulfment of cells	3.34E-05
Cellular Assembly and Organization	organization of cytoplasm	2.23E-05
Cellular Assembly and Organization	organization of cytoskeleton	2.47E-05
Cellular Assembly and Organization	quantity of autophagic vacuoles	5.45E-05
Cellular Compromise	condensation of nucleus	2.57E-05

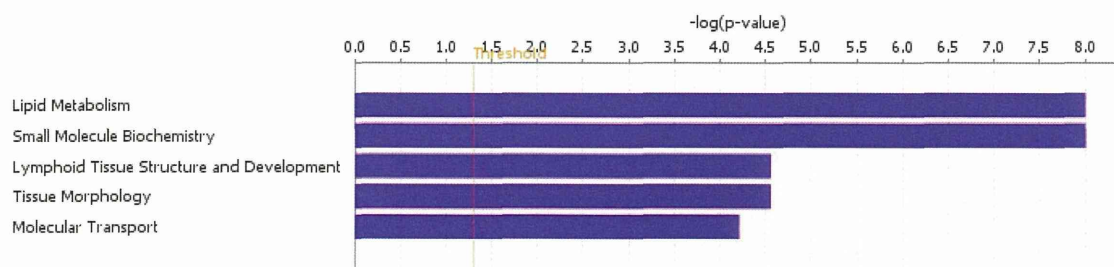


© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 2. MWCNT 吸入暴露 3 日後に増加した遺伝子のパスウェー解析結果

表 2. MWCNT 暴露 3 日後に増加した遺伝子の Category 別 Function Annotation 一覧表

Category	Functions Annotation	p-Value
Cell Death and Survival	apoptosis of tumor cell lines	2.03E-05
Hematological Disease	allergic pulmonary eosinophilia	6.92E-05
Immunological Disease	allergic pulmonary eosinophilia	6.92E-05
Inflammatory Disease	allergic pulmonary eosinophilia	6.92E-05
Inflammatory Response	allergic pulmonary eosinophilia	6.92E-05
Respiratory Disease	allergic pulmonary eosinophilia	6.92E-05



© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 3. MWCNT 吸入暴露 7 日後に増加した遺伝子のパスウェー解析結果

表 3. MWCNT 暴露 7 日後に増加した遺伝子の Category 別 Function Annotation 一覧表

Category	Functions Annotation	p-Value
Lipid Metabolism	metabolism of stearic acid	9.88E-09
Lipid Metabolism	metabolism of oleic acid	3.95E-08
Lipid Metabolism	metabolism of palmitic acid	9.85E-08
Lipid Metabolism	metabolism of linoleic acid	5.49E-07
Lipid Metabolism	metabolism of arachidonic acid	1.28E-05
Small Molecule Biochemistry	metabolism of stearic acid	9.88E-09
Small Molecule Biochemistry	metabolism of oleic acid	3.95E-08
Small Molecule Biochemistry	metabolism of palmitic acid	9.85E-08
Small Molecule Biochemistry	metabolism of linoleic acid	5.49E-07
Small Molecule Biochemistry	metabolism of arachidonic acid	1.28E-05
Lymphoid Tissue Structure and Development	quantity of lymphatic system cells	2.77E-05
Lymphoid Tissue Structure and Development	abnormal morphology of spleen primary B follicle	2.86E-05
Tissue Morphology	quantity of lymphatic system cells	2.77E-05
Molecular Transport	excretion of Na ⁺	6.16E-05

次に、個別の遺伝子発現のグラフの代表的な例を以下に示す。

Function Annotation の t-lymphocyte、leukocyte、cell movement で共通に ephrin b2 (Efnb2) の増加が認められた。この遺伝子は 1 及び 3 日後に有意に増加した (図 4)。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。

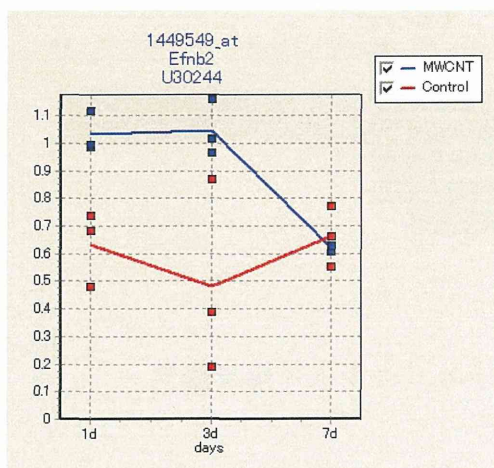
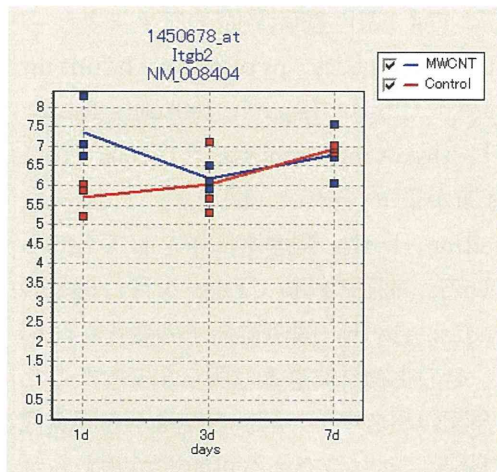


図 4. ephrin B2 遺伝子の発現増加

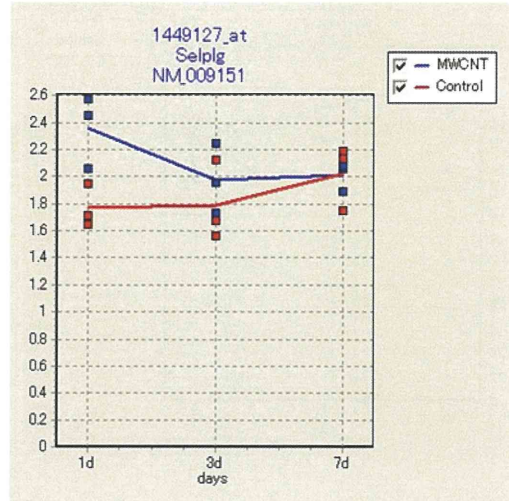
* 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell) 以下同様

また、Function Annotation で t-lymphocyte、leukocyte、cell movement で共通に Integrin beta 2 (Itgb2) の有意な増加が 1 日目に認められた。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 5)。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。また、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。

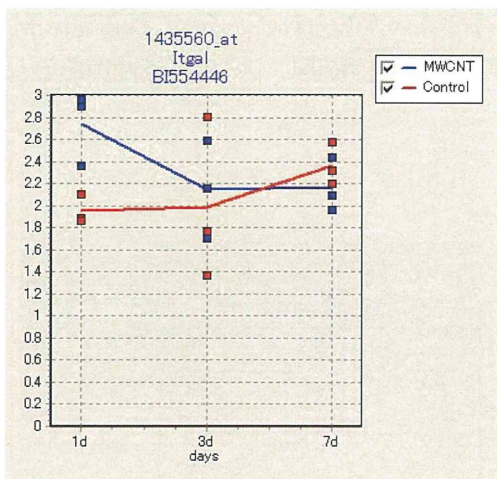
A)



A)



B)



B)

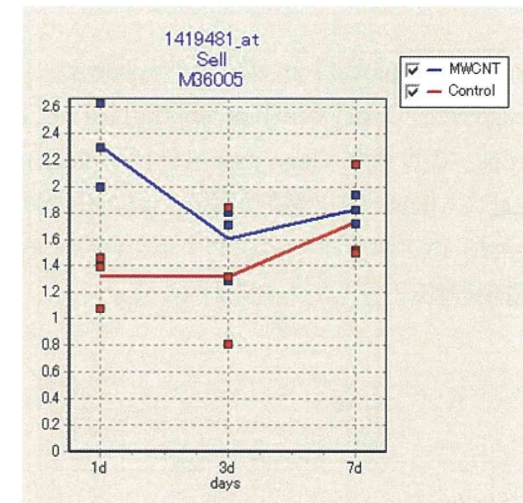


図5. Integrin 遺伝子の増加
A) Itgb2、B) Itgal

図6. Selectin 関連遺伝子の増加
A) Selplg、B) Sell

さらに、白血球に発現する Selectin P ligand (Selplg) および Selectin L (Sell) の増加が認められた (図6)。

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や細胞移動に関与し、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7)。

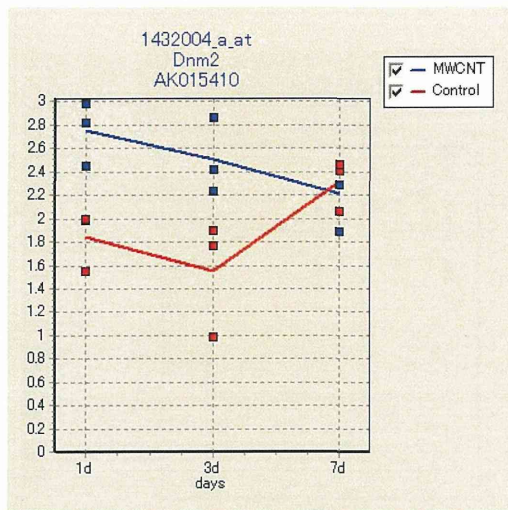


図 7. Dynamin2 遺伝子の発現増加

Function Annotation の t-lymphocyte、leukocyte、cell death of epithelial cell lines で共通に Ras association domain family 5 (Rassf5) の増加が認められた(図8)。Rassf5 はアポトーシスシグナルを仲介する癌抑制遺伝子としても知られている。

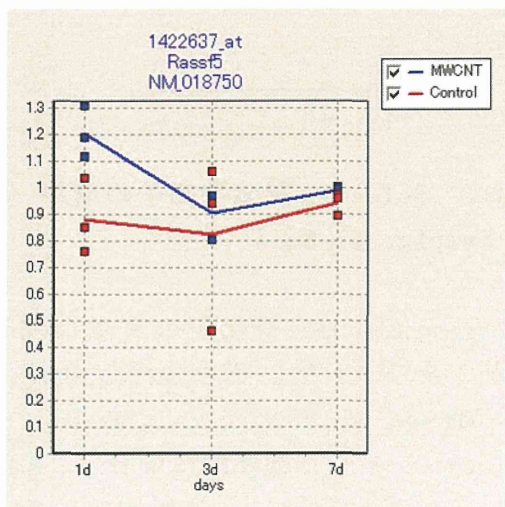
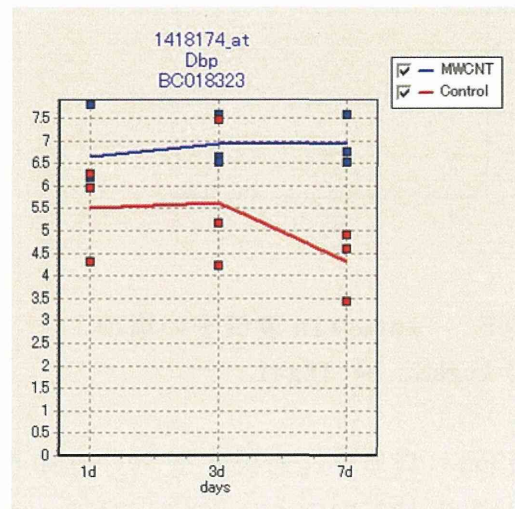


図 8. Rassf5 遺伝子の増加

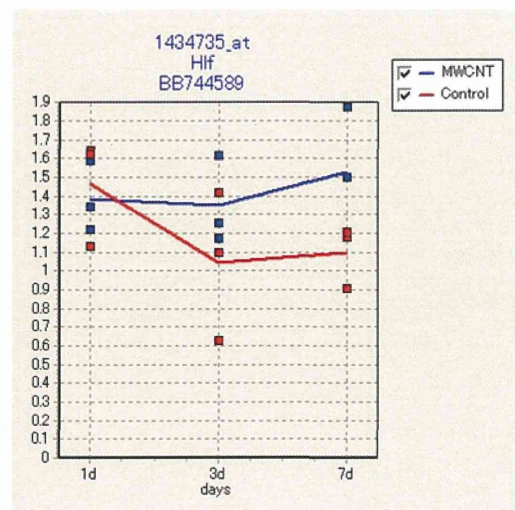
暴露 7 日後に増加した遺伝子の Function Annotation の stearic acid metabolism、oleic acid metabolism、palmitic acid

metabolism、linoleic acid metabolism 等で共通に PAR bZIP 型転写因子ファミリーの D-site albumin promoter binding protein (Dbp)、hepatic leukemia factor (Hlf)、thyrotroph embryonic factor (Tef) の増加が認められた(図9)。これらは circadian rhythm 関連遺伝子としても知られている。前回の解析で Dbp を含む複数の circadian rhythm 関連遺伝子の変化が認められ、その生物学的意義は明らかでなかったが、今回のパスウェー解析の結果から脂質代謝に関連したものである可能性が考えられた。肺胞上皮はリン脂質とタンパクからなる肺サーファクタントを分泌しており、炎症で増加することが知られている。これら遺伝子の増加も炎症と関連している可能性がある。

A)



B)



C)

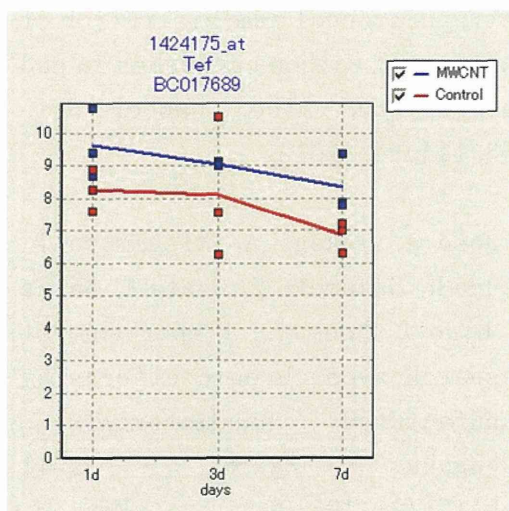


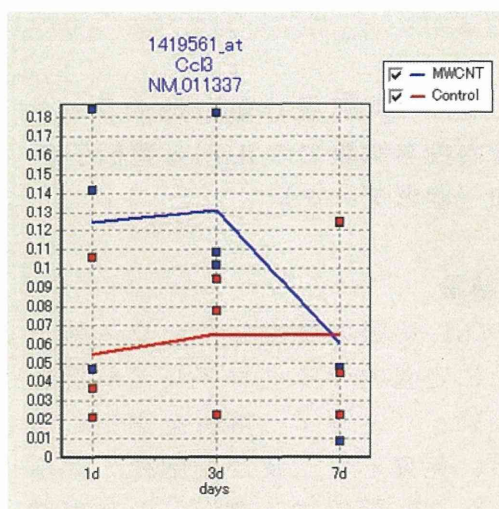
図9. 転写因子 Db p、H1 f、Tef 遺伝子の増加

A) Db p、B) H1f、C) Tef

名古屋市立大の津田らはナノサイズの二酸化チタンをラット肺にスプレー噴霧による投与でマクロファージ炎症タンパク MIP1 α が増加することを報告した (Carcinogenesis, 31, 927, 2010)。MIP1 α は有用なリスクマーカーとなることが期待されている。そこで、本実験系での MIP1 α を含む炎症関連サイトカイン遺伝子の発現について調べた。遺伝子として IL-1 α 、IL1 β 、IL-6、IL-18、INF γ 、TNF α 、G-CSF、GM-CSF、GRO、MCP1、MIP1 α 、VEGF-A、B、Cについて検索した。その結果、MIP1 α の発現量は比較的少なく有意差は認められなかったが、暴露3日目で2倍程度の増加傾向が認められた。また、IL1- β が暴露1日後に有意に増加した (図10)。その他の遺伝子発現には変化は見られなかった (data not shown)。この結果、MWCNTの吸入暴露においても MIP1 α が増加する可能性が示唆された。以前実施した、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における MIP1 α のグラフを比較のため図11に示した。その試験において、MWCNT及び Quartz 投与1、及び3ヶ月後において MIP1 α の明らかな増加が認められている。今後、MWCNTの吸入暴露負荷による MIP1 α の用量相関性の検討、肺の組織学的所見との比較検討を待つ必要があり、後者は現在進行中である。以上より本マイクロアレイ法が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。

A)



B)

