

図 10. MIP1 α 遺伝子の増加傾向
と IL1- β 遺伝子の増加
A) MIP1 α 、B) IL-1 β

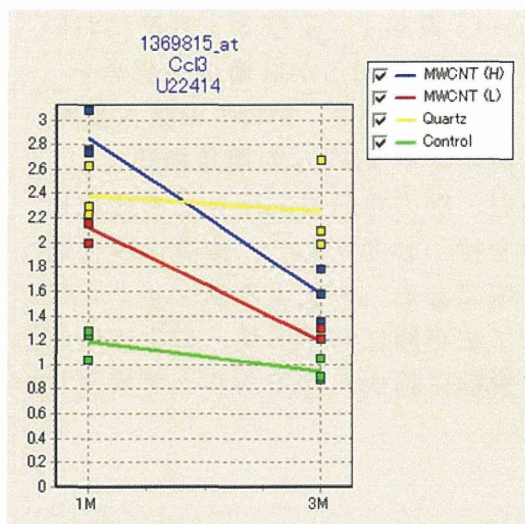


図 11. MWCNT 及び Quartz のラット
気管内投与試験での MIP1 α 遺伝子の
増加 (参考データ)

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ない、パスイュー解析を実施した結果、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。

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. 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.

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

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

「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」

分担研究者 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 部長

研究協力者 梅田 ゆみ 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
病理検査部病理検査室 室長補佐

妹尾 英樹 同
病理検査部病理検査室 室長補佐

齊藤 美佐江 同
病理検査部病理検査室 室長補佐

高信 健司 同
病理検査部病理検査室 室長補佐

戸谷 忠雄 同
病理検査部病理検査室

加納 浩和 同
試験管理部経口等試験室 室長

鈴木 正明 同
試験管理部経口等試験室 室長補佐

酒井俊男 酒井電子顕微鏡応用研究所 所長

研究要旨

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。そこでみられた病理組織学的変化は好中球、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であり、先行研究で行った MWCNT-Bulk をラットに単回気管内投与した際にみられた終末細気管支/肺胞管を中心とする領域における MWCNT 貪食肺胞マクロファージの集簇による肉芽腫や軽度な線維化病変とは異なるものであった。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。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今後解明を進める必要がある。

A. 研究目的

ヒトに吸入される粒子状物質は粒子径によって呼吸器への到達深度が異なり、大気汚染物質中の粒子径が $2.5\mu\text{m}$ より小さな粒子 (PM_{2.5}) によるヒト健康影響が関心を集めている。市販の多層カーボンナノチューブ原末 (MWCNT-Bulk) には、単繊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 $1\mu\text{m}$ 以下のサイズの単繊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、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) の開発に成功している。我々は、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法処理した単繊維状に分散したMWCNT (以下、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の単回気管内投与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を単回気管内投与した亜急性

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 (→B-1, C-1)。

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 (→B-2, C-2) 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 (→B-3, C-3) 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-4, C-4)。

B. 研究方法

B-1. MWCNT-Taqの単回気管内投与によるマウスを用いた亜急性毒性試験：この試験はマウス呼吸器に対するMWCNTの亜急性毒性のプロファイルを把握するためのもので、昨年度、雄性C57BL/6JマウスにMWCNT-Taq(0, 1.1, 3.3, 10 μ g/匹)の単回気管内投与を行い、気管内投与後1, 7, 28及び91日に剖検を行った。体重推移と肺重量データまでを昨年度の分担研究報告書で報告した。今年度、病理組織学的検査を行ってマウスの肺に生じる器質的変化の確定をした。病理組織学的検査では、MWCNT-Taqの沈着の状態の確認と肺の病理組織学的検査を行った。MWCNT-Taqの沈着の状態の確認では、気管内に投与したMWCNT-Taqの沈着の状態を確認するためにケルンエヒトロートによる単染色標本作製して光学顕微鏡(対物レンズ：4~40倍、接眼レンズ：10倍)で観察した。ケルンエヒトロート染色は細胞核を赤色に、細胞質を薄い赤色に染める染色法である。このため組織中では黒色のMWCNT-Taq繊維とのコントラストが極めて強く、単繊維に分散したMWCNT-Taqであっても組織中に存在するものを容易に認識することができる。また、光学顕微鏡に装着した偏光装置を併用してMWCNT-Taqの確認を行った。肺の病理組織学的検査では、通常の病理組織検査で使用されるヘマトキシリン・エオジン染標本と、肺胞構造と病変の関係を把握するためにエラスチカワンギーソン染色標本を全ての動物の肺組織について作製した。また、肺における線維化の状態を確認するために、一部の動物でマッソン・トリクローム染色標本作製した。診断には光学顕微鏡(対物レンズ：4~40倍、接眼レンズ：10倍)を用いた。

B-2. ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験(病理組織学的検査)：昨年度マウスに気管内投与した用量に相当する量の MWCNT-Taq を 60, 20, 6.7, 0 μ g/匹(ラットとマウ

スの肺の重量比 6 で補正)、及び先行研究の福島班での試験で用いた最高投与量である MWCNT-Bulk 60 μ g/匹を陽性対照としてラットに単回気管内投与し、気管内投与後、最長 91 日までの経過観察による病理組織検査を行う試験実施しているところである。

Taquann 法処理—多層カーボンナノチューブ(MWCNT-Taq)と市販のMWCNT原末(MWCNT-Bulk)はそれぞれ国衛研究所毒性部(高橋主任研究官)提供と保土谷化学工業株式会社提供を使用した。動物は、雄性F344/DuCr1Cr1jラット(日本チャールス・リバー(株)、厚木飼育センター;SPF)90匹を生後12週齢で導入、1週間の検疫・馴化を経て、12週齢で群分けして供試した。被験物質の投与は、イソフルランの吸入による麻酔下で、被験物質懸濁液を気管内投与器具を使用して所定の投与量を気管内に単回強制投与した。観察期間は最長13週間(91日間)とし、投与後7日、投与後28日、投与後91日に動物を解剖、肉眼的な観察と、肺重量を測定して、全臓器を採取、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定を行った。MWCNT-Taqの投与量は60 μ g/匹、20 μ g/匹、6.7 μ g/匹の3段階(公比3)とし、1匹当たり0.3mlを投与した。なお、媒体対照群の動物にはMWCNT-Taqの媒体として使用した、滅菌生理食塩水にTween80を0.1%添加した溶液を単回投与(0.3ml/匹)した。MWCNT-Bulkの投与量は60 μ g/匹とし、1匹当たり0.3mlを投与した。投与量の設定理由は、前年度におこなったC57BL/6Jマウスへの単回気管内投与試験では、MWCNT-Taqの投与量を10 μ g/匹、3.3 μ g/匹、1.1 μ g/匹の3段階(公比3)で実施した。この試験でみられたマウス肺の生体反応と比較検証するために、ラットへのMWCNT-Taqの投与量

は、ラットとマウスの肺重量の比（ラットはマウスの6倍）で補正した値：60 μ g/匹、20 μ g/匹、6.7 μ g/匹の3段階（公比3）とした。

陽性対照群の投与量はMWCNT-Taqに合わせて60 μ g/匹とした。この投与量は、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総合研究（H20-22年度総合報告、一化学—一般—006）」の分担研究（研究課題「ナノマテリアルの吸入曝露による呼吸器への生体影響の評価手法に関する研究」）において、F344ラットへの単回気管内投与で、肺に軽度の線維化が認められた投与量（40 μ g/匹）に近い量であった。

被験物質懸濁液の調製方法は次のとおり、MWCNT-TaqはTween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に、各設定濃度となる様、被験物質を加え超音波を用いて懸濁した。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に再拡散させた。MWCNT-Bulk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、被験物質を加え超音波を用いて懸濁した。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に再拡散させた。

調整した被験物質のエンドトキシンの測定を外部委託した（委託先：(株)SRL）。動物の群構成は、媒体対照群1群、被験物質投与群3群及び陽性対照群1群の計5群とする。投与後7日、28日、91日の3期の解剖期を設け、各解剖期に5匹、合計で各群15匹とした。群分けに際して、検疫・馴化期間を通して一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から、検疫・馴化最終日の体重の中央値に近い75匹を選定した。群分けは、この選定した動物を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。飼育環境は、温度23 \pm 2 $^{\circ}$ C、湿度55 \pm 15%、明暗サイクル12時間点灯（8:00~20:00）/12時間消灯（20:00~8:00）、換気回数15~17回/時、ケージへの動物の収容方法は個別飼育とした。ケージはステンレス製2連網ケージ（170(W) \times 294(D) \times 176(H)mm/匹）を使用した。飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業(株)千葉工場製造のCRF-1固型（30kGy- γ 線照射滅菌飼料）を飼料給餌器により自由摂取させた。飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。一般状態の詳細な観察は投与日の投与前・後、投与翌日、投与3日後、投与7日後、それ以降は週1回行った。その他の日は、毎日1回以上、ケージ越しに状態を観察（生死・瀕死確認）することとした。体重の測定は、投与日の投与前、投与翌日、投与3日後、投与7日後、それ以降は週1回行うこととした。解剖には、3期の解剖期（解剖期1：投与後7日、解剖期2：投与後28日、解剖期3：投与後91日）を設け、各解剖期に各群5匹を解剖した（解剖期3の動物は、次年度の5月9日に解剖予定）。解剖では、ソムノペンチルを腹腔内注射して、痛覚消失を確認後、開腹、腹大動脈を切断し、放血致死（安楽死）させた。病理学検査では、解剖時に全動物について肉眼的に観察を行い、全動物について肺の湿重量を測定した。

臓器の採取・保存は、全動物について、以下の臓器・組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存した。

保存臓器：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、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臓器・組織。病理組織学検査は次年度に、全動物について、気管、肺、縦隔の組織（リンパ節等）の病理組織学検査を行う。検査は、固定後の臓器・組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い、光学顕微鏡で観察して行うこととした。肺についてはシリウスレッドまたはマッソン・トリクローム染色標本も作製し、線維化病変を詳細に観察する。

B-3： ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験（気管支肺胞洗浄液の生化学及び細胞学的検査）： この試験は前項（B-2）の病理組織検査を目的とした試験と一対で実施したもので、実験材料、動物、検体の投与濃度と調整方法などの基本的な試験設定項目はB-2の試験と共通で実施した。B-2の試験と異なる点を以下に示した。試験の群構成は、媒体対照群 1 群、被験物質投与群 3 群及び陽性対照群 1 群の計 5 群とし、2期の解剖期（気管内投与後 3 日と 7 日）を設け、各解剖期に 5 匹、合計で各群 10 匹とした。群分けに際しては、検査・馴化期間を通して一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から、検査・馴化最終日の体重の中央値に近い 50 匹を選定した。群分けは、この選定した動物を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。解剖時に気管から滅菌生理食塩水 7ml と注入、肺の中を注入した 7ml の生理食塩水で肺の中を三回丁寧に洗浄した洗浄液を回収した。この回収した洗浄液を用いて、生化学検査と細胞学的検査を全動物について行った。検査項目を以下に示した。生化学検査項目として総蛋白、アルブミン、ALP、LDH、細胞学的検査項目として総細胞数、マクロファージ・白血球分画。病理学検査では、解剖時に全動物について肉眼的な観察を行い、全動物について、下記の臓器・組織を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定、保存したが、病理組織標本の作製と病理組織学的検査は計画しなかった。保存臓器：皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、骨髄（大腿骨）、リンパ節（腋窩、鼠径等）、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臓器・組織。

B-4. MWCNT-Taq を投与したマウスでの肺の電子顕微鏡による検索： 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た試験で、少数のマウスに MWCNT-Taq を 60 μ g/匹を単回気管内投与後 1 日と 7 日後に、肺組織をサンプリングする試験を実施した。詳細を以下に示した。

MWCNT -Taq は国衛研究所毒性部(高橋

主任研究官提供) を使用した。動物は、雄性 C57BL/6J マウス (日本チャールス・リバー (株)、厚木飼育センター; SPF) 20 匹を生後 11 週齢で導入、1 週間の検疫・馴化を経て、12 週齢で群分けして供試した。被験物質の投与は、イソフルランの吸入による麻酔下で、被験物質懸濁液を気管内投与器具を使用して所定の投与量を気管内に単回強制投与した。観察期間は最長 3 日間とし、解剖は投与後 1 日と投与後 3 日に実施した。MWCNT-Taq の 1 匹当たりの投与用量は $10 \mu\text{g}$ とし、1 匹当たりの投与容量は 0.03ml とした。なお、媒体対照群の動物には被験物質の懸濁媒体として使用する滅菌生理食塩水に Tween80 を 0.1% 添加したものを投与 ($0.03\text{ml}/\text{匹}$) した。Sham 対照群にはステンレス製カニューレ (24G) を使用して気管内挿管を 1 回おこなった。MWCNT-Taq の投与量は、平成 23 年度厚生労働科学研究費補助金「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-」の分担研究 (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」) で C57BL/6J マウスへの MWCNT-Taq の単回気管内投与実験で、肺に強い巣状炎症性がみられた $10 \mu\text{g}/\text{匹}$ とした。被験物質懸濁液の調製は、Tween80 を 0.1% 添加した滅菌生理食塩水 0.03ml 当たり $10 \mu\text{g}$ の用量で被験物質を加え、超音波を用いて懸濁する。被験物質懸濁液は用時調製とし、投与直前に再拡散させておこなった。試験群の構成は、Sham 対照群と媒体対照群を各 1 群、被験物質投与群 1 群の計 3 群とし。投与後 1 日と投与後 3 日の合計 2 期の解剖期を設け、各解剖期に 3 匹 (Sham 対照群は、解剖期 I、II とともに各 2 匹) の動物をあてて、合計で各群 16 匹とした。群分けに際しては、検

疫・馴化期間を通して一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から、検疫・馴化最終日の体重の中央値に近い 16 匹を選定した。群分けは、この選定した動物を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。

飼育環境は、温度 $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度 $55 \pm 15\%$ 、明暗サイクル 12 時間点灯 (8:00 ~ 20:00) / 12 時間消灯 (20:00 ~ 8:00)、換気回数 15 ~ 17 回/時、ケージへの動物の収容方法は個別飼育とした。ケージはステンレス製 2 連網ケージ ($112(\text{W}) \times 212(\text{D}) \times 120(\text{H}) \text{mm}/\text{匹}$) を使用した。飼料は、全飼育期間を通して、オリエンタル酵母工業 (株) 千葉工場製造の CRF-1 固型 ($30\text{kGy}-\gamma$ 線照射滅菌飼料) を飼料給餌器により自由摂取させた。飲水は、全飼育期間を通して、市水 (神奈川県秦野市水道局供給) をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。一般状態の詳細な観察は投与日の投与前、投与翌日、投与 3 日後に行い、投与 2 日後は、ケージ越しに状態を観察 (生死・瀕死確認) をおこなった。体重の測定は、投与日の投与前、投与翌日、投与 3 日後に行った。解剖には、投与後 1 日と投与後 3 日の合計 2 期の解剖期を設け、各解剖期に各群 3 匹を解剖した (Sham 対照群は各解剖期に 2 匹を解剖した)。気管と肺の採取保存: ソムノペンチル腹腔内注射により麻酔後、腹大動脈から放血死させて開胸。甲状腺の下端で気管を切断、直ちに固定液を高さ 20cm の落下圧で気管の断端から肺内に注入した。固定液は 2% パラホルムアルデ

ヒド溶液（インスタント燐酸緩衝液 4、三菱化学ヤトロン（株）、1/15 mol/L、pH 7.2 をベース）にグルタルアルデヒドを 0.5% 添加して用いた。固定液の注入は、肺が胸郭内で生理的に拡張した状態で固定できるように目視で確認しながら慎重に行った。肺を気管とともに摘出後に左右の肺を切り離し、上記固定液に浸漬、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定 1 日を行った。その他の臓器の採取保存では、以下の器官、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；皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、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、胆嚢、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。肺の透過型電顕試料作製は次年度に、以下の手順で行う。固定した肺をショ糖を 3% 添加したリン酸緩衝液を交換しながら 1 週間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して 4℃ で 2 ヶ月間保存した。左肺の全割組織を主気管支に沿って 1mm 幅で長さ 10mm に切り出し、1% オスミウム酸で後固定、常法によりエポキシ樹脂に包埋する。ブロックを 3.5 × 10mm にトリミングし、Nanotome Thick ダイヤモンドナイフで肺全割組織のセミシン切片を切削する。トルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡下で肺全体の組織の保存性の良否の確認と、組織構造の保存状態を電顕で確認する部位を選定する。セミシン切片から直接、電顕検索を指定した部位を切り出してエポキシ樹脂に包埋したブロックか、セミシン切片を薄切した同じブロックの隣接

面を薄切、ウラン・鉛の二重染色を施して電顕による観察を行う。なお、本試験では気管内投与後、最長で 7 日までの採材に限定されることから、前年度に実施した、MWCNT-Taq の単回気管内投与によるマウスを用いた亜急性毒性試験（B-1.）で、気管内の投与後 91 日に解剖した高用量群の一部の同物について、ホルマリン固定材料から左肺の一部を切り出して電顕検索用にエポキシ樹脂包埋までを今年度に行った。本試験（B-4.）で電顕検索用に採材した肺組織とともに、気管内投与後 91 日の材料（B-1.）についても来年度、電顕検索を進める予定となっている。

倫理面への配慮

動物実験については、動物愛護に関する法律、基準、指針及び所属研究機関が定める動物実験に関する規定、指針を以下のとおり遵守した。平成 18 年 4 月 28 日付け、環境省告示第 88 号「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 6 月 1 日付け、厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「厚生労働省の所管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」及び平成 24 年 4 月 25 日付け、中央労働災害防止協会規程第 17 号「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」を遵守して行われた。また、本試験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査、承認された（承認 No. 0023、0029）。

C. 研究結果

C-1. 病理組織学的検査で、MWCNT-Taq を気管内に単回投与したマウスの肺に 7 日から好中球、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、この変化は用量-、時間-依存性に増加した。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、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認められなかった。昨年度に報告した気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査結果(図 7~9)は、MWCNT-Taq 60 μ g 投与群での病理組織変化を裏付けるものと考えられた。

C-2. ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験(病理組織学的検査)：この試験の最終解剖に係わる肺重量データと病理組織学的検査結果は次年度の中頃には出そろふ予定となっている。

現時点で、検討可能な投与後 28 日までの体重と肺重量データを図 10~12 に示した。体重では MWCNT-Bulk 60 μ g 投与群で体重の伸びがやや低調であるが、溶媒対照群を含めた各群は、ほぼ足並みを揃えて、ゆるい右肩上がりの推移が認められた。肺重量では投与後 7 日では MWCNT-Bulk 60 μ g 投与群だけが有意な増加であったが、投与後 28 日日には MWCNT-Taq 60 μ g 投与群が MWCNT-Bulk 60 μ g 投与群の肺重量を上回っていた。このことは、MWCNT-Taq は MWCNT-Bulk よりも肺に対する影響が持続すること考えられた。

C-3. ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験(気管支肺胞洗浄液の生化学及び細胞学的検査)：MWCNT-Taq 投与群では各パラメータとも、用量相関性に増加がみられた。MWCNT-Bulk は投与後 7 日に MWCNT-Bulk 60 μ g 投与群よりも高値を示したが、投与後 28 日では MWCNT-Taq 60 μ g 投与群の方が高値であった。

このことは、MWCNT-Taq は MWCNT-Bulk よりも肺に対する影響が持続すること考えられた。

C-4. MWCNT-Taq を投与したマウスでの肺の電子顕微鏡による検索：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た試験を実施して、MWCN による肺の投与後 1 日と 7 日での急性反応を超微細形態学的に解析する為のサンプルを得た。また、MWCNT-Taq を投与後 91 日の亜急性反応を解析するために、昨年度実施した B-1(C-1)の試験でホルマリンに浸漬保存していた肺のサンプルをエポキシ樹脂に包埋して、電顕検索に備えている。

D. 考察

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。

E. 結論

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。

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)

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

2. 学会発表

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）

G. 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

C-1. MWCNT-Taq の単回気管内投与による マウスを用いた 亜急性毒性試験

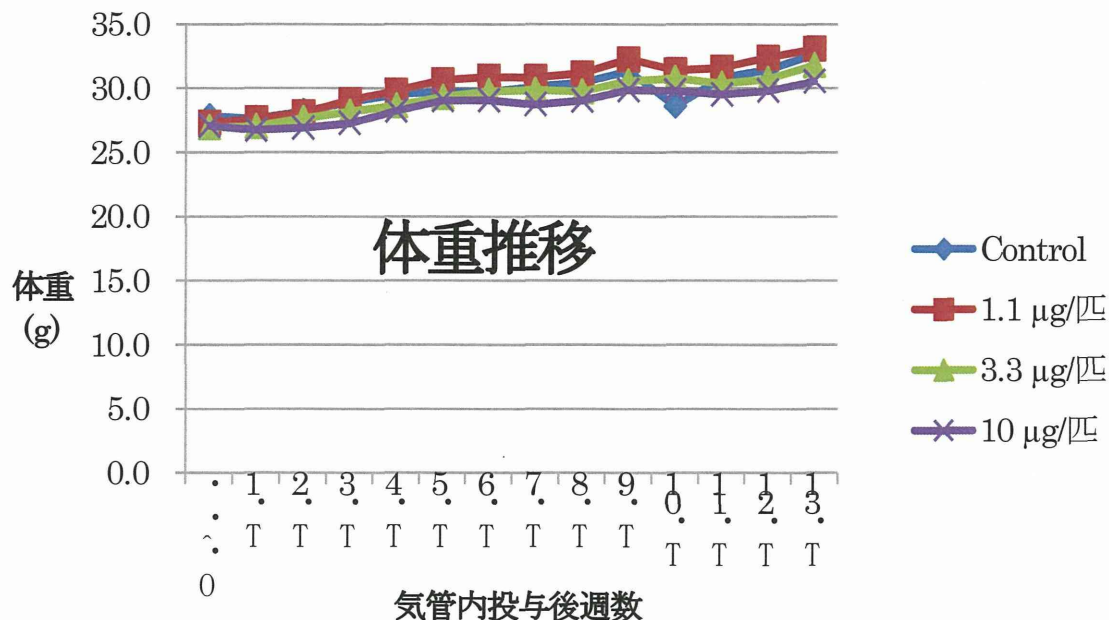


図1 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスの体重推移 (昨年度報告)

表1 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスの肺重量

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

(投与後1日、1週、4週、13週) (昨年度報告)

表 2 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスの下部気道における
MWCNT-Taq の沈着

	Days after instillation			
	1	7	28	91
Vehicle control				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	-	-	-	-
MWCNT, phagocytosed	-	-	-	-
Alveoli				
MWCNT, free form	-	-	-	-
MWCNT, phagocytosed	-	-	-	-
1.1 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	1	1	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	1	2	0
Alveoli				
MWCNT, free form	1	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	3	3	5	3
3.3 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	1	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	4	1	
Alveoli				
MWCNT, free form	2	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	4	5	5	5
10 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Bronchiole				
MWCNT, free form	4	1	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	5	3	0
Alveoli				
MWCNT, free form	5	0	0	0
MWCNT, phagocytosed	5	5	5	5

表 3 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスの肺に認められた病理組織変化

	Days after instillation			
	1	7	28	91
Vehicle control				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	0	0	0	1+: 1
Accumulation of alveolar macrophages	0	0	0	0
1.1 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	1+: 1	0	1+: 1	1+: 2
Accumulation of alveolar macrophages				
3.3 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	1+: 4	1+: 2, 2+: 2, 3+: 1	1+: 1, 2+: 2	1+: 2, 3+: 1
Accumulation of alveolar macrophages			1+: 1	0
10 μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	1+: 2, 2+: 2, 3+: 1	1+: 2, 2+: 3	1+: 3, 3+: 2	1+: 1, 2+: 3, 3+: 1
Accumulation of alveolar macrophages	0	0	0	0

1+: slight, 2+: moderate, 3+: severe

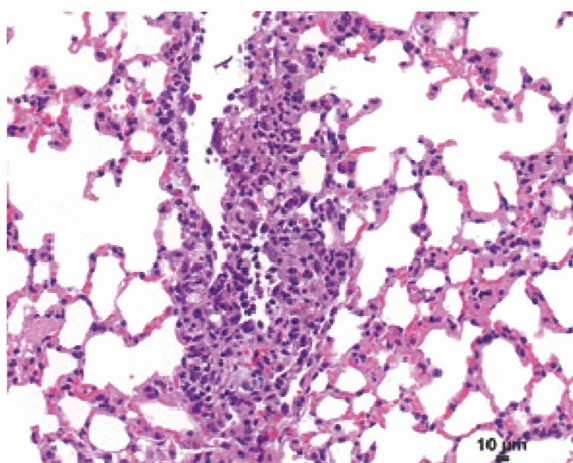


図 2 溶媒対照群、91日の肺、inflammation, focal

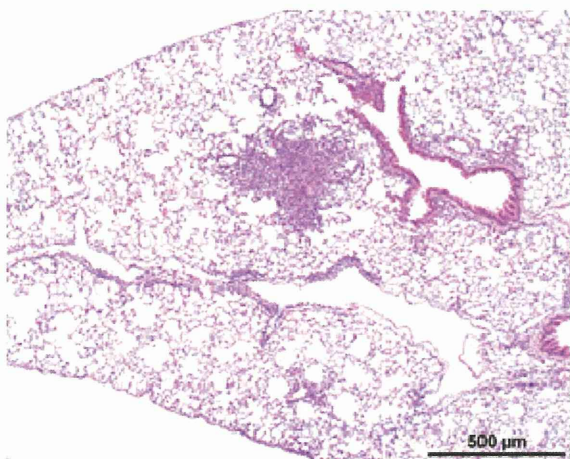


図3 MWCNT-Taq 10 μg/匹投与群、91日の肺、inflammation, focal

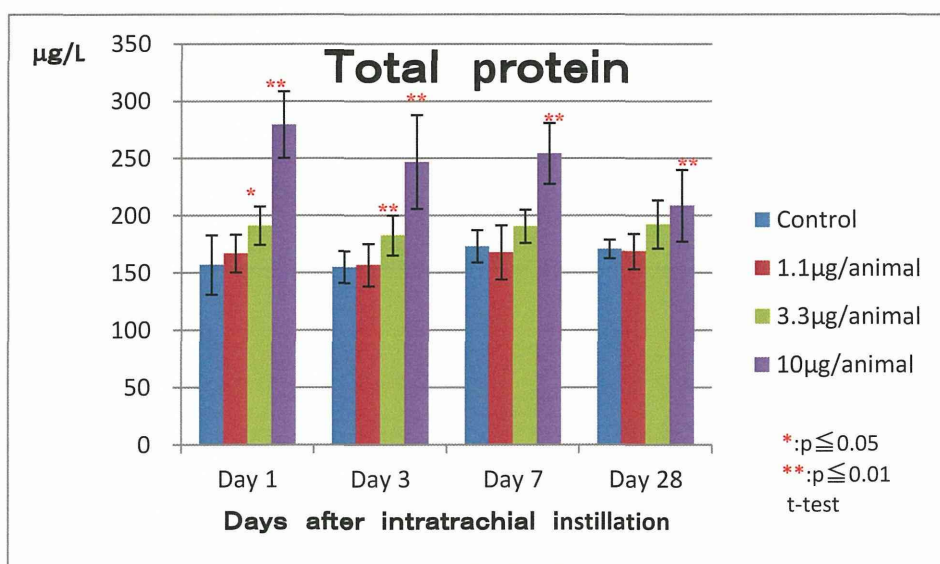


図4 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：総蛋白（昨年度報告）

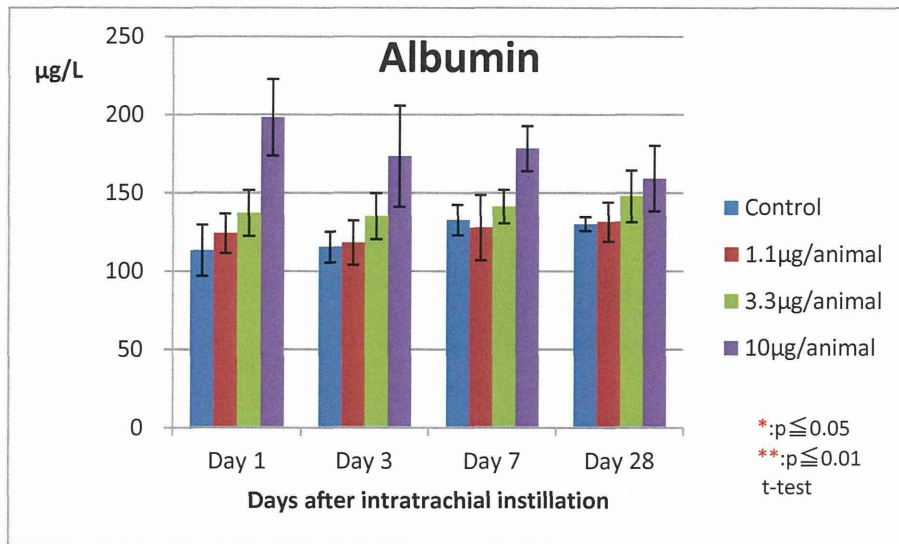


図5 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：アルブミン（昨年度報告）

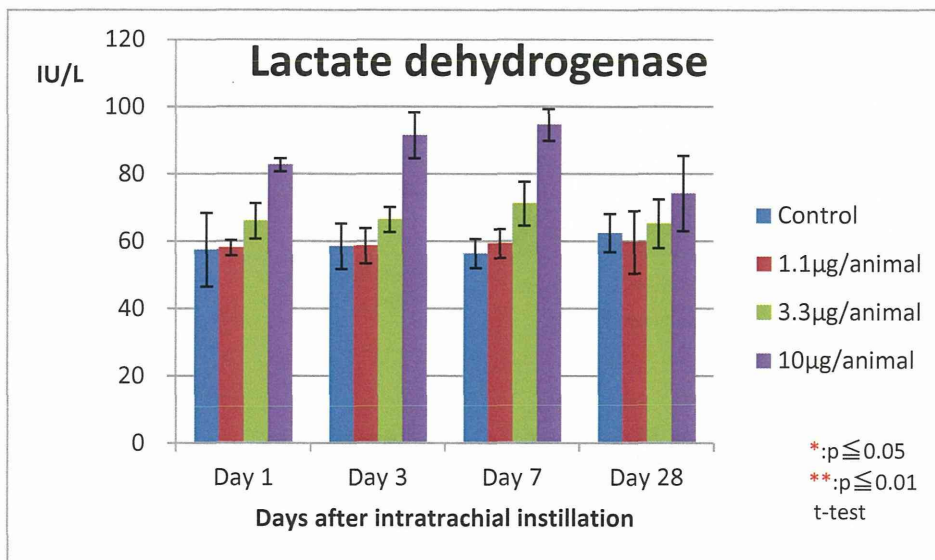


図6 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：LDH（昨年度報告）

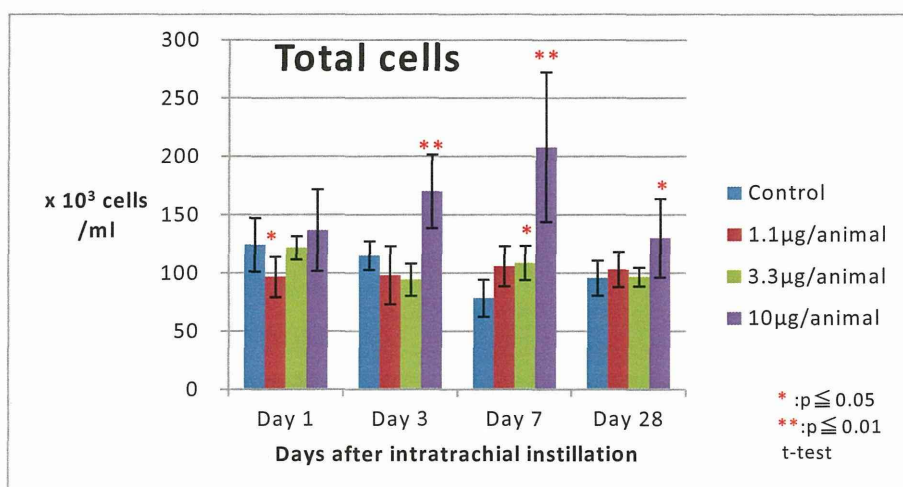


図7 MWCNT-TaQ 単回気管内投与マウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：総細胞数（昨年度報告）

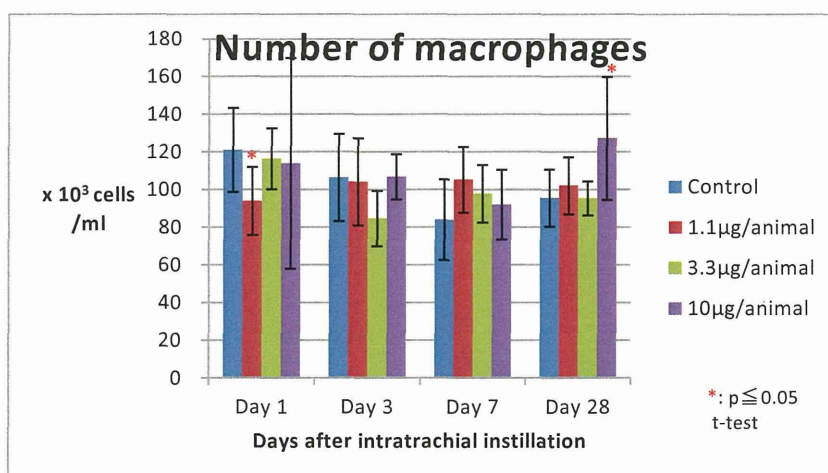


図8 MWCNT-TaQ 単回気管内投与マウスから採取した
気管支肺胞洗浄液：マクロファージ数（昨年度報告）

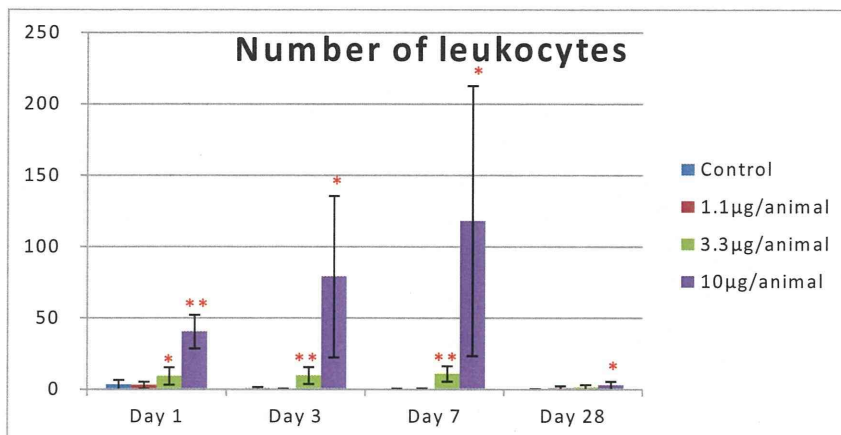


図9 MWCNT-Taq 単回気管内投与マウスから採取した気管支肺胞洗浄液：白血球数（昨年度報告）

C-2. ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験（病理組織学的検査）

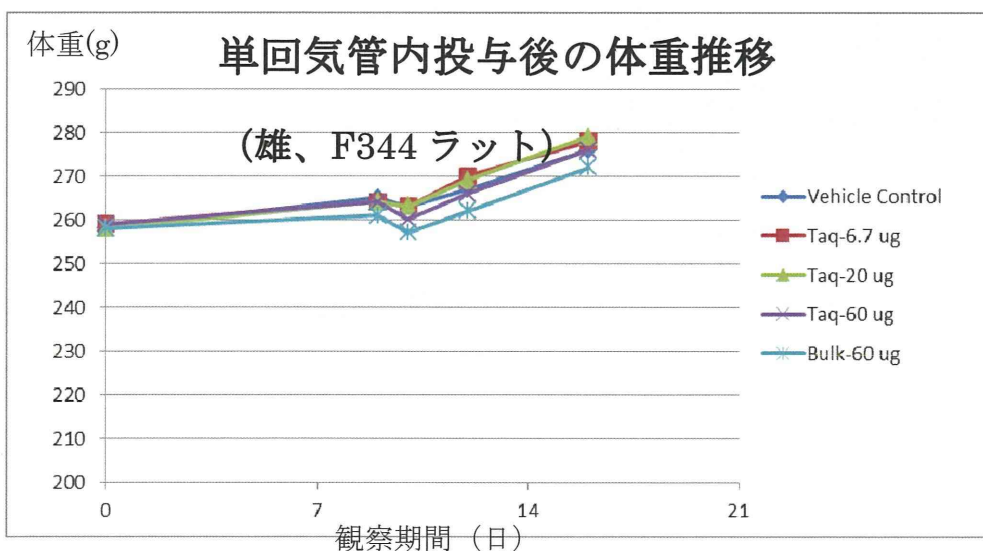


図10 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットの体重推移

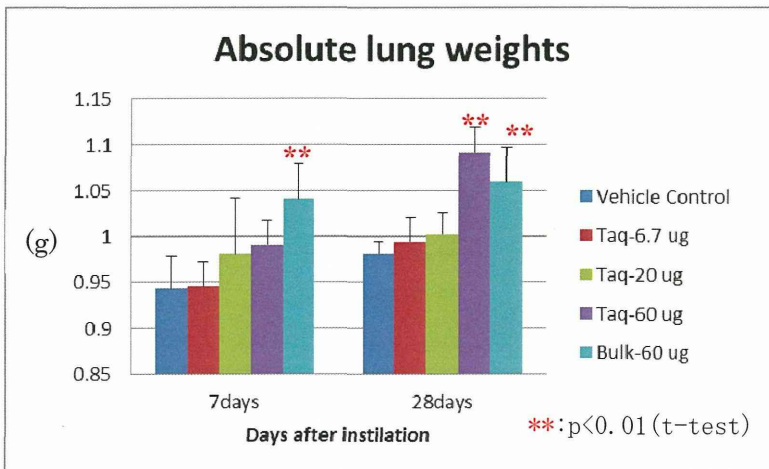


図 11 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットの肺実重量

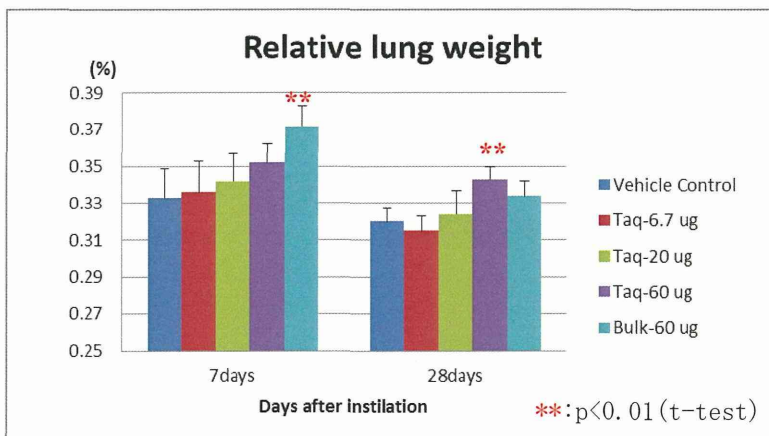


図 12 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットの肺比重量

C-3. ラットを用いた MWCNT-Taq と MWCNT-Bulk の生体反応の対比試験（気管支肺胞洗浄液の生化学及び細胞学的検査）

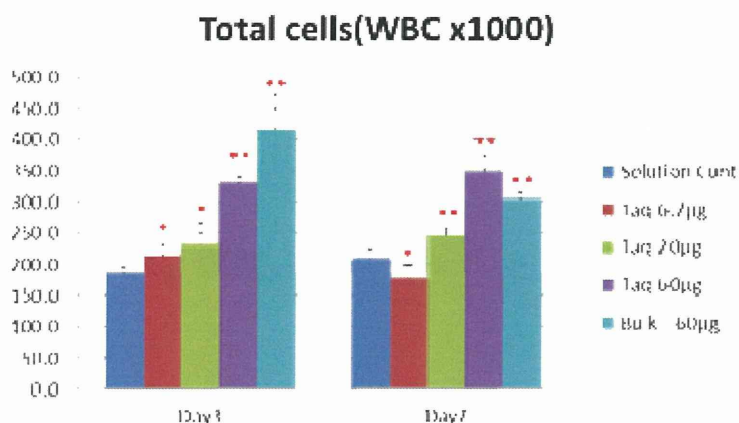


図 13 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：総細胞数

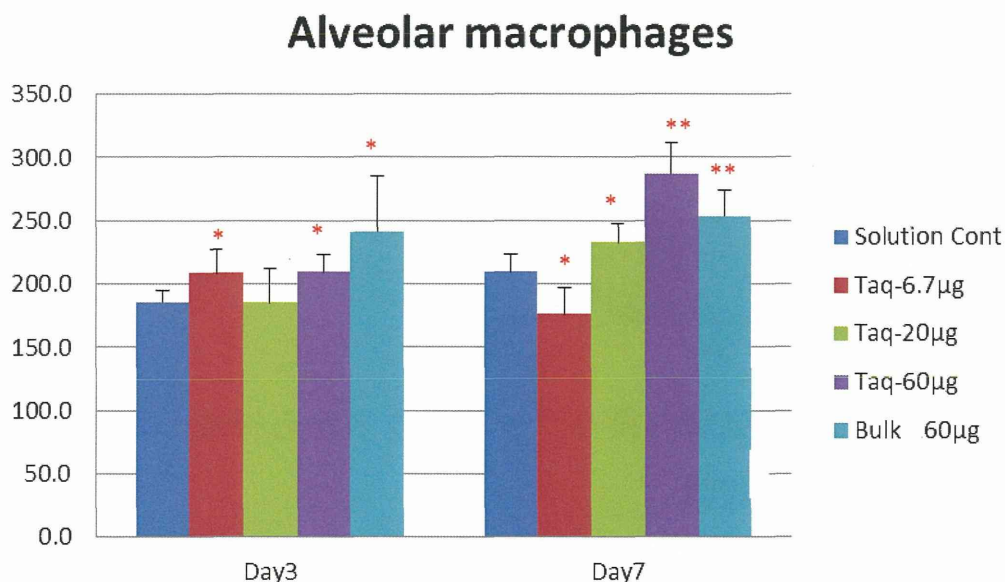


図 14 MWCNT-Taq 単回気管内投与ラットマウスから採取した気管支肺胞洗浄液：肺胞マクロファージ