

マウスへのMWCNT-Taq気管内投与の準備

昨年度報告

I MWCNT-Taqのマウスへの単回気管内投与による投与後91日までの呼吸器を主体とした毒性影響の検索

I -(1) MWCNT-Taq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、及び投与状態の確認
- ② MWCNT-Taq懸濁液の調整
- ③ MWCNT-Taq懸濁液の分散状態及び形状の確認

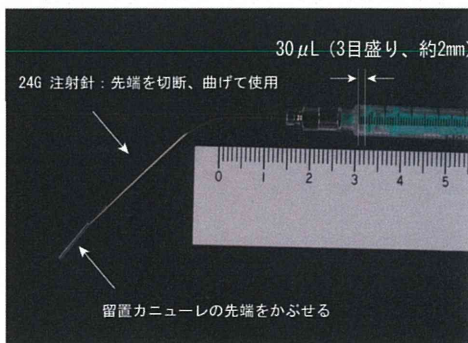
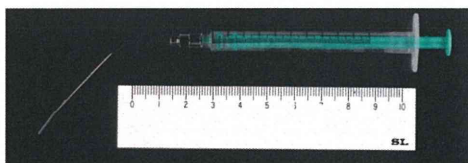
I -(2) 単回気管内投与による亜急性試験の実施

- ① 気管支肺胞洗浄液採取による生化学的検査、細胞学的検索
- ② 肺の病理組織学的検索

I-(1)-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

- 気管内投与器具の開発
- 開発した気管内投与器具の投与精度の確認
- 投与技術の習熟
 - 予備練習: Crlj:CD1(ICR)マウスの雌120匹を用いて反復練習、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
 - 投与容量: 0.03ml/匹
 - 仕上げ練習: C57BL/6Jマウスの雄24匹を使用

I-(1)-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



気管内投与器具



背側面 腹側面
墨汁50 μL 気管内注入
気管内投与直後のマウスの肺

	水 30 μL	水 50 μL
1	0.019	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	0.060
12	0.031	0.054
13	0.035	0.049
14	0.035	0.055
15	0.033	0.043
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 μL (左列)、50 μL (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 ± 4 (左列)、52mg ± 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。

気管内投与器具の検体吹き出し量の検証

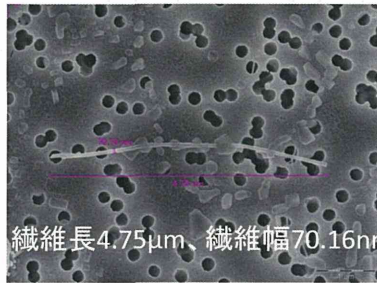
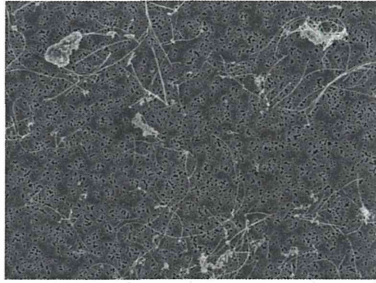
I-(1)-② MWCNT懸濁液の調整

- MWCNT-Taq懸濁液の調整：用時調整
Tween80を0.1%添加滅菌生理食塩水に懸濁
(超音波で拡散)
- 投与用量
 - 投与用量：MWCNT-Taq 0, 1.1, 3.3, 10 μ g/匹
 - 設定根拠：マウスの肺に毒性影響が報告されている最も低い用量を最高投与量とした
(D.W.Porter et al., 2010)

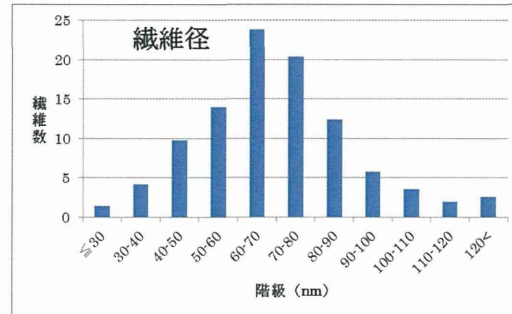
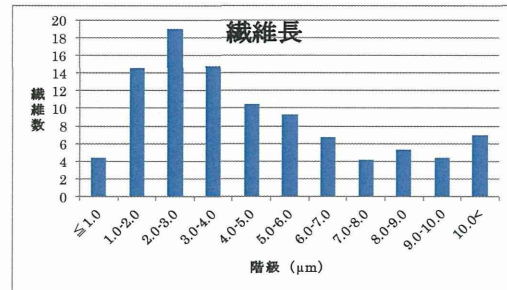
I-(1)-③ MWCNT-Taq懸濁液の分散状 および形状の確認

- 気管内投与に用いたT処理-MWCNT懸濁液の分散状態および形状を走査型電顕で観察(メンブランフィルターに滴下、白金蒸着)
 - 懸濁液の分散状態は良好であった
- MWCNT-Taqの繊維長と幅の平均値の算出
(繊維長 507本、繊維幅 500本を計測)

I-(1)-③ MWCNT-Taq懸濁液の分散状 および形状の確認



走査電顕像(懸濁液)



I-(2) マウスを用いたMWCNT-Taq気管内投与による亜急性試験の実施

I-(2)-①気管支肺胞洗浄液の採取による生化学的、細胞学的検査を
目的とした試験

I-(2)-②病理組織学的検査を目的とした試験

昨年度報告

動物、MWCNT-Taq投与懸濁液の調整

- 動物: 雄性C57BL/6J マウス
- 生後11週齢導入→12週齢で供試
- MWCNT: Taquann法処理-MWCNT(MWCNT-Taq)
(国衛研究所毒性部高橋主任研究官より提供)
- MWCNT-Taq懸濁液の調整: 用時調整
Tween80を0.1%添加滅菌生理食塩水に懸濁
(超音波で拡散)
- 気管内投与
- 投与回数: 単回、投与容量: 0.03ml/匹
- 投与用量: MWCNT-Taq 0, 1.1, 3.3, 10 μ g/匹 (公比3)

試験デザイン

①生化学的検査、細胞学的検査

10 μ g	7	7	7	7匹
3.3	7	7	7	7匹
1.1	7	7	7	7匹
0	7	7	7	7匹

気管内投与

生化学検査: 総蛋白、アルブミン、ALP、LDH
細胞学的検査: 総細胞数、
マクロファージ・白血球分画

②病理組織学的検査

10 μ g	5	5	5	5匹
3.3	5	5	5	5匹
1.1	5	5	5	5匹
0	5	5	5	5匹

気管内投与

肺重量測定: 全動物
病理組織検査: 全臓器/全動物

I -(2) マウスを用いたMWCNT-Taq気管内投与による亜急性試験の実施
 I -(2)-① 気管支肺胞洗浄液の採取による生化学的、細胞学的検査を
 目的とした試験結果

昨年度報告

I -(2)-① 生化学的検査、細胞学的検査 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	273 ± 1.6
1.1 μg	7	273 ± 1.2	273 ± 1.9
3.3 μg	7	275 ± 1.9	274 ± 2.0
10 μg	7	275 ± 1.4	273 ± 1.3

投与後1日にBALF採取群の体重

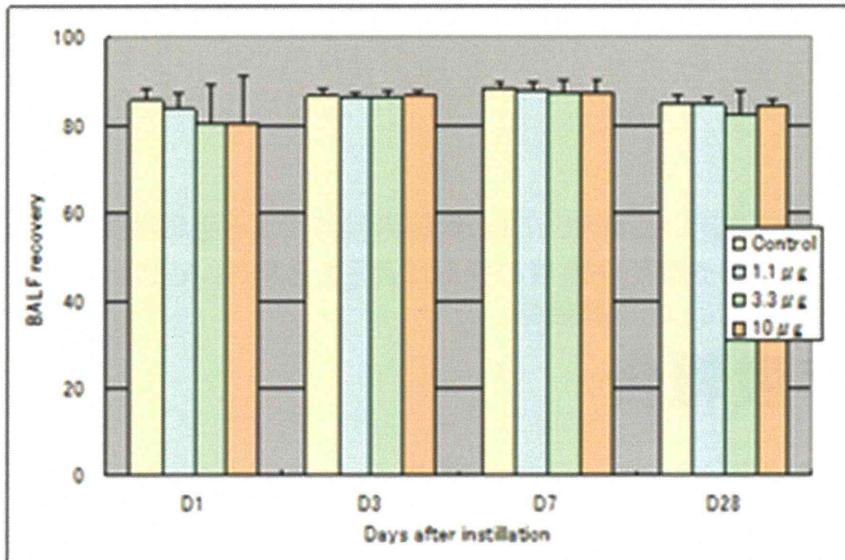
投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差		
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日 1日	3日
Control	7	273 ± 1.7	272 ± 1.9	272 ± 1.6
1.1 μg	7	271 ± 1.1	270 ± 1.2	271 ± 0.9
3.3 μg	7	268 ± 1.2	265 ± 1.6	265 ± 1.4
10 μg	7	272 ± 1.7	271 ± 1.7	273 ± 1.7

投与後3日にBALF採取群の体重

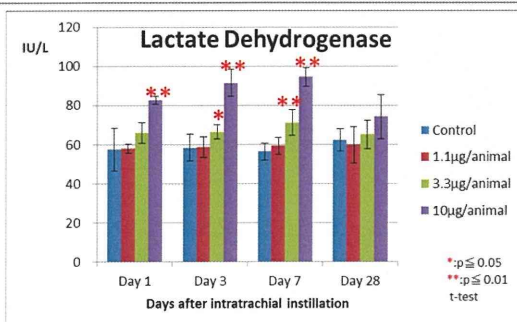
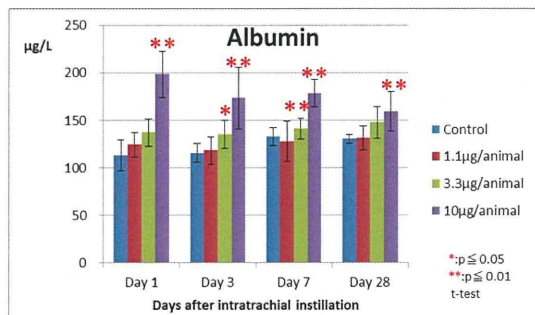
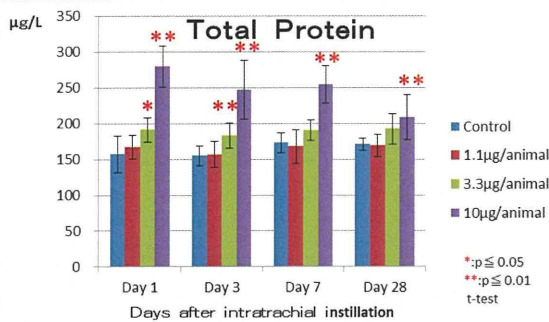
投与用量 (/匹)	動物 数	平均体重(g) ± 標準偏差					
		投与前測定 (投与日)	投与後測定日/週				
		1日	1週	2週	3週	4週	
Control	7	275 ± 1.5	271 ± 1.3	277 ± 1.8	282 ± 1.5	280 ± 1.1	287 ± 1.5
1.1 μg	7	267 ± 1.2	267 ± 1.1	269 ± 1.2	277 ± 1.0	276 ± 1.0	284 ± 0.6
3.3 μg	7	273 ± 1.3	273 ± 1.7	273 ± 1.5	281 ± 0.9	278 ± 1.1	285 ± 0.9
10 μg	7	274 ± 1.2	270 ± 1.2	276 ± 1.4	279 ± 1.1	277 ± 1.4	288 ± 1.1

投与後4週にBALF採取群の体重

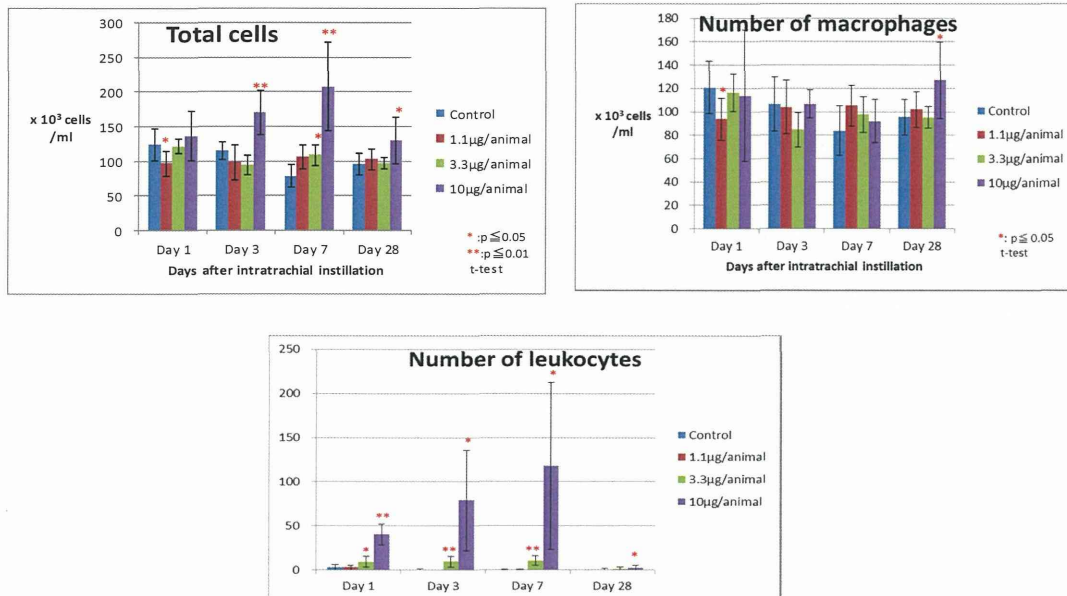
I -(2)-① 生化学的検査、細胞学的検査 気管支肺胞洗浄液の回収率



I -(2)-① 生化学的検査、細胞学的検査 生化学的検査の結果



I -(2)-① 生化学的検査、細胞学的検査 細胞学的検査の結果



マウスを用いたMWCNT気管内投与による亜急性試験の実施

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果

本年度报告

(体重及び肺重量に関するデータは昨年度に報告)

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果 体重

投与用量 (μ 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 1日
Control	5	27.3 \pm 1.3	27.5 \pm 1.6
1.1 μ g	5	28.0 \pm 1.4	28.3 \pm 1.5
3.3 μ g	5	27.4 \pm 1.2	27.1 \pm 0.9
10 μ g	5	27.5 \pm 1.7	27.2 \pm 1.5

投与後1週、解剖群の体重

投与用量 (μ 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 1日	投与後測定日 4週
Control	5	27.5 \pm 0.8	27.3 \pm 1.3	27.7 \pm 1.0
1.1 μ g	5	27.7 \pm 0.8	27.6 \pm 0.9	27.7 \pm 1.0
3.3 μ g	5	27.6 \pm 1.2	27.4 \pm 1.3	27.8 \pm 1.8
10 μ g	5	27.4 \pm 0.6	27.2 \pm 0.7	27.5 \pm 1.0

投与後 4週 解剖群の体重

投与用量 (μ 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			
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 μ 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 μ 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 μ 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)

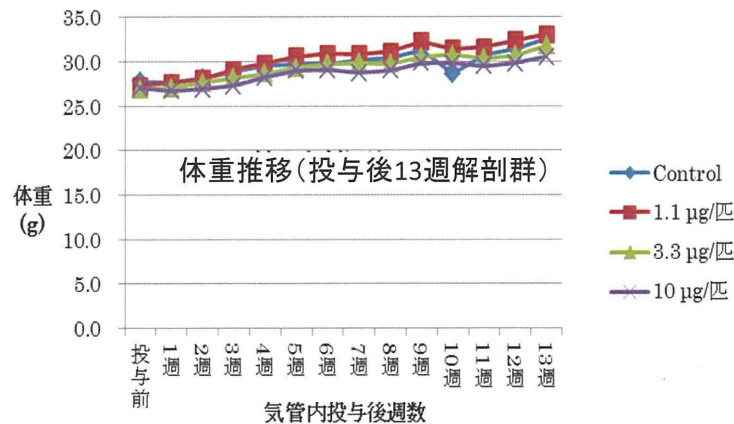
投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差				
		投与後測定週				
Control	5	29.7 \pm 1.0	29.7 \pm 1.2	30.1 \pm 0.9	30.4 \pm 0.9	31.3 \pm 0.8
1.1 μ g	5	30.6 \pm 1.0	30.9 \pm 1.2	30.8 \pm 1.1	31.1 \pm 1.1	32.3 \pm 0.8
3.3 μ g	5	29.3 \pm 1.3	29.8 \pm 1.7	29.8 \pm 2.1	29.7 \pm 1.8	30.5 \pm 1.4
10 μ g	5	29.0 \pm 1.0	29.1 \pm 0.9	28.7 \pm 1.2	29.0 \pm 1.0	29.8 \pm 1.0

(続)

投与用量 (μ g)	動物 数	平均体重(g) \pm 標準偏差			
		投与後測定週			
Control	5	28.6 \pm 1.3	30.8 \pm 0.9	31.4 \pm 1.5	32.6 \pm 1.5
1.1 μ g	5	31.4 \pm 0.8	31.6 \pm 1.2	32.4 \pm 1.0	34.1 \pm 1.0
3.3 μ g	5	30.8 \pm 1.7	30.4 \pm 1.9	30.7 \pm 2.0	31.8 \pm 1.8
10 μ g	5	29.8 \pm 1.0	29.5 \pm 0.7	29.8 \pm 0.6	30.5 \pm 0.7

投与後13週に解剖群の体重

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果 体重推移



I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果 肺重推移

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週解剖群の肺重量

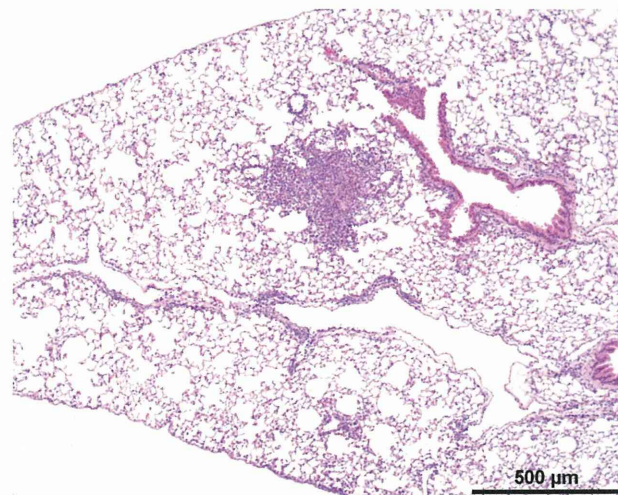
I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果 MWCNT-Taqの肺内沈着

	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	-	-	-	-
1.1µg				
<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
3.3µg				
<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
10µg				
<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

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果
**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**

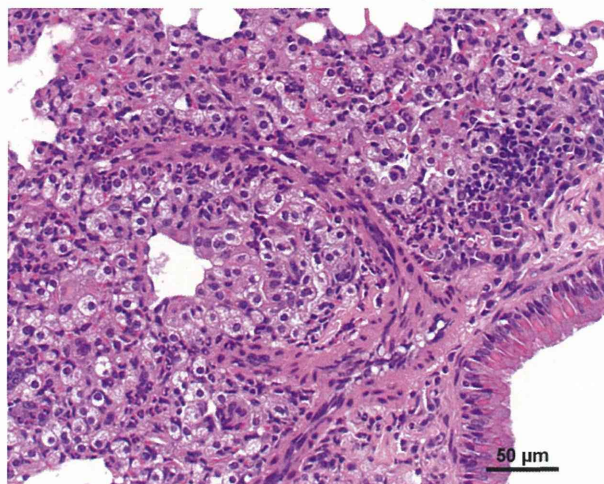
	Days after instillation			
	1	7	28	91
Vehicle control				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	0	0	0	1+: 1
Accumulastion of alveolar macrophages	0	0	0	0
1.1μg				
<Number of animals examined>	<5>	<5>	<5>	<5>
Inflammation, focal	1+: 1	0	1+: 1	1+: 2
Accumulastion of alveolar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

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果
肺の病理組織変化



マウス、10μg投与群、気管内投与後91日、
 Inflammation, focal
 巣状炎症は左右両肺で1カ所程度、多く認められた動物で
 数カ所程度であった。

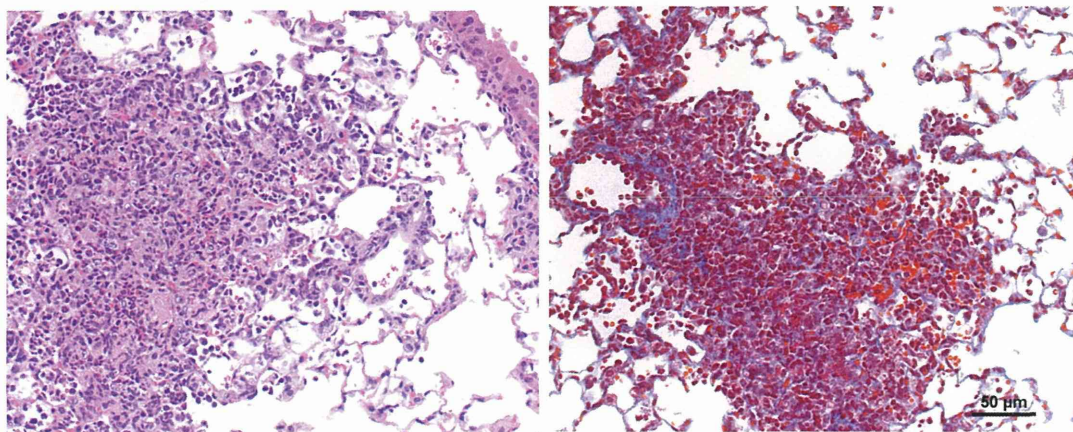
I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果
肺の病理組織変化



マウス、10μg投与群、気管内投与後28日、
Inflammation,focal

炎症病巣では好中球、マクロファージの浸潤に加えて、形質細胞の浸潤を認める

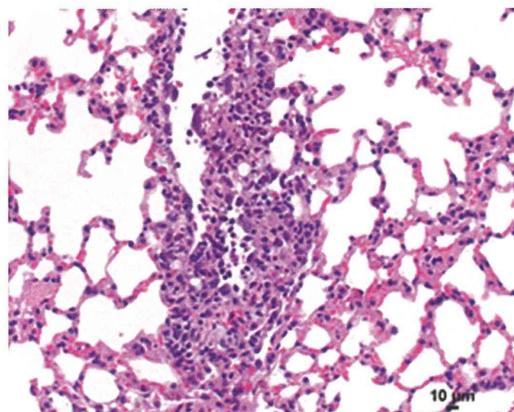
I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果
肺の病理組織変化



マウス、10μg投与群、気管内投与後91日、
Inflammation,focal

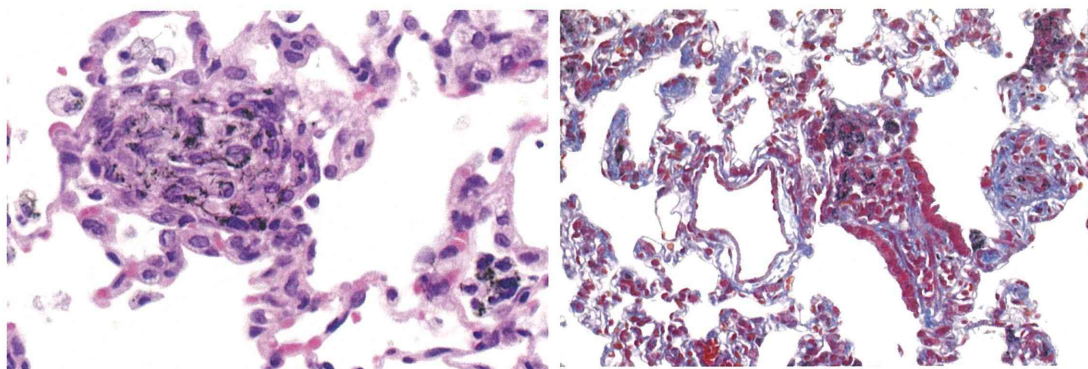
炎症病巣では好中球の浸潤が目立つ

I -(2)-② 病理組織学的検査を目的とした試験結果 肺の病理組織変化



マウス、溶媒対照群、91日の肺、Inflammation,focal
マウスでは溶媒対照群の肺にも巣状炎症が認められることがある

ラットの肺に認められた病理組織変化 (先行研究、福島班)



微小肉芽腫、ラット、
MWCNT 160 μg /rat,
気管内投与後7日

線維化、限局性、ラット、
MWCNT 160 μg /rat,
気管内投与後91日

MWCNT-Bulkをラットに気管内投与（先行研究、福島班）では、
MWCNT食食マクロファージによる微小肉芽腫及び限局性の線維化が
気道終末部～肺胞管を中心とした領域に認められた
（マクロファージによる異物反応）

初年次(H23年度)の研究計画

- ① マウスのMWCNT-Taqを単回気管内投与、肺への毒性影響を最長投与後91日まで経時的な検索を実施、MWCNTによるマウスの呼吸器への亜急性毒性のプロファイルを明確にする。
- ② 平成20-22年度厚労科研補助金 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)での保存サンプルを活用して、MWCNT-Bulkの生体影響について踏み込んだ研究を行う。

二年次(H24年度)の研究計画

- ① MWCNT-Taq投与マウスと、MWCNT-Bulk投与ラットではそれぞれの肺にみられた毒性病変が異なることが判明した。この相異について詳細な病態解析を実施する。
 - ラットに対してマウスで用いた投与量のMWCNT-Taq(体重比で補正)を単回気管内投与して、ラットでのMWCNT-Taqの病態を確認する。
 - 気管内に投与されたMWCNT-Taqのマウス肺における動態を電子顕微鏡で検索する。本年度は、MWCNT-Taqをマウスに気管内投与し、投与翌日と投与1週間後の電顕用に固定した肺のサンプルを採取して次年度の検索に備える。
- ② 初年次に実施したマウスのMWCNT-Taqを単回気管内投与試験で保存した脳、肝、腎、脾臓などの諸臓器への、MWCNT-Taqの遠隔臓器への移行を病理組織学的に検索を今年度から次年度にかけて行う。

三年次(H25年度)の研究計画

- ① MWCNT-Taq投与マウスと、MWCNT-Bulk投与ラットでは肺に生じる毒性病変が異なることが判明した。この相異について詳細な病態解析を進める。
- ② MWCNT-Taqの気道・気腔内から肺組織への侵入経路、肺から遠隔臓器への移行について、光学顕微鏡と電子顕微鏡を連携させた検索を行う。
- ③ 三カ年の総括

予想される成果

- ヒトが実際に暴露されると想定される低濃度域でのMWCNTの呼吸器毒性に関するプロファイルを得ることができる。
- MWCNTの気管内投与によって起こる呼吸器病変について、ラットとマウスでの病態の相異を明確にすることで、ヒトへの外・リスク評価に有用な成果が得られる。
- 急性、亜急性に肺に起こる変化を、電顕検索レベルで詳細に検索することで、体内動態に関する基礎データ、ことに肺組織への侵入経路の解明が期待される。
- 各分担研究者と連携して針状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、要因の解析が可能である。

