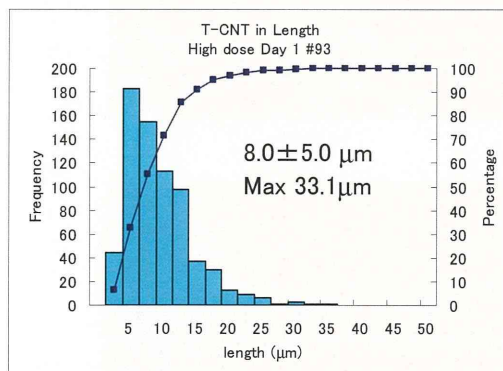


図5 T-CNTに含まれる繊維数と長さの分布

T-CNTは有効数字一桁の精度で $3 \times 10^6$ 本/・gの繊維数、平均長が平均8.0µmであると結論した。

A



群	高用量群 (ID #93)
暴露濃度	$2.52 \pm 0.35 \text{ mg/m}^3$
暴露時間	2時間/日 1回/週 × 5週間
サンプリング時期	最終暴露終了直後
MWCNT繊維数	$1.3 \times 10^7$ 本/動物
MWCNT質量	4.4 µg

B

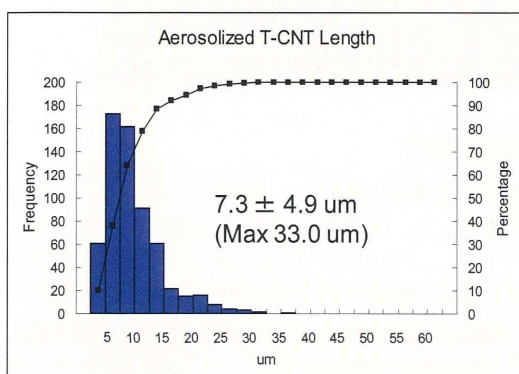
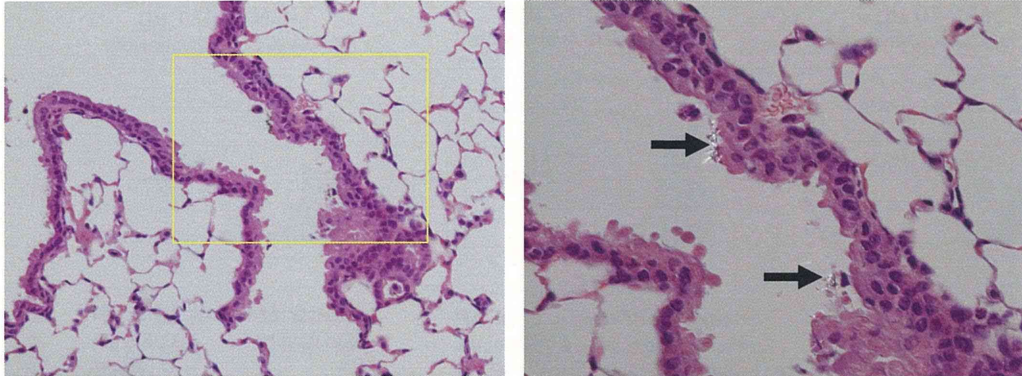


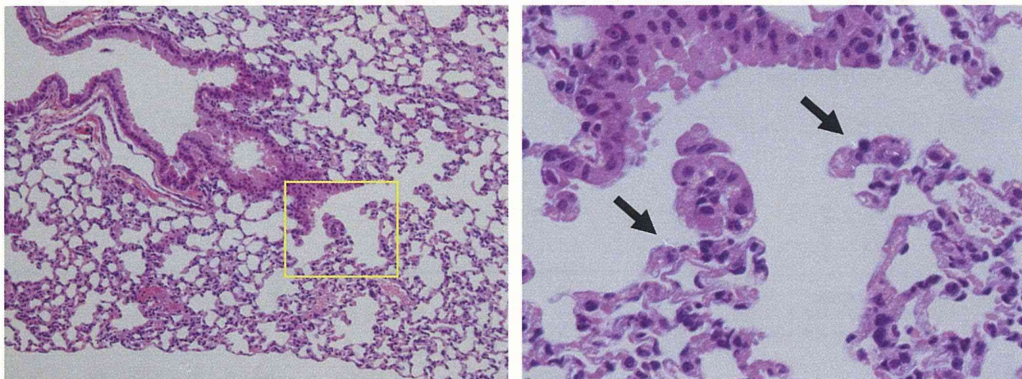
図6 全身暴露吸入したマウスの肺に含まれるT-CNTの繊維数と長さの分布

(A) p53+/-マウスにT-CNTを1日2時間、週1回、5週間の反復全身暴露吸入を行い、最終暴露終了後に肺を採取し、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(N=694)。(B) 暴露チャンバー内のT-CNTの長さを計測した(N=618)。暴露チャンバー内のT-CNTエアロゾルと肺から回収されたT-CNTの長さの分布は同じであった。

【吸入終了直後 肺 (高用量群 ID #86)】



【吸入終了後 13 週目 肺 (高用量群 ID #162)】



【吸入終了後 13 週目 横隔膜 (低用量群 ID #249)】

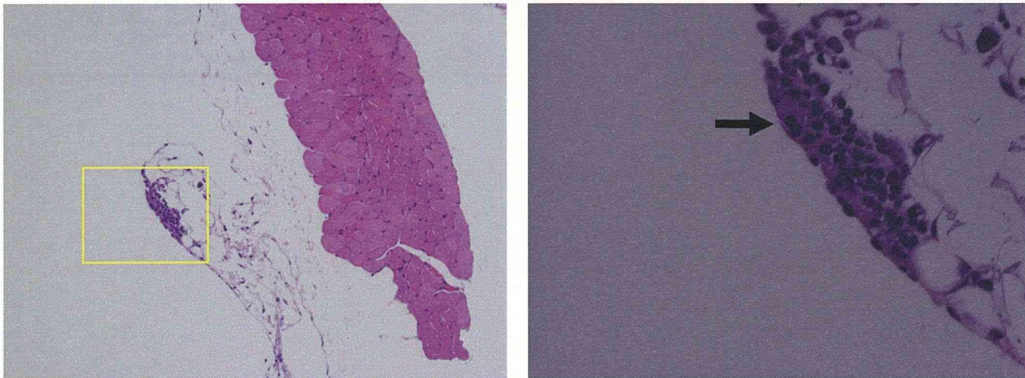


図7 p53+/-マウス全身暴露吸入した肺、横隔膜の病理組織像

p53+/-マウスにT-CNTを1日2時間、週1回、5週間の反復全身暴露吸入を行い、肺をパラホルムアルデヒド灌流固定し、常法に従ってHE標本作製し光学顕微鏡で観察した。凝集体・凝固体は観察されず、吸入終了直後には単離繊維が気管支上皮の粘液層に小集合としてトラップされている像(矢印)、及び単離繊維が肺胞内にまで到達しているのが観察された。吸入終了後13週目に軽微な好中球浸潤像を伴い、肺胞内マクロファージが単離MWCNT繊維を貪食する像を認めた。尚、凝集体及び異物肉芽腫を認めない。壁側胸膜面(横隔膜面)には、MWCNTを貪食したマクロファージを伴う円形細胞小集簇を認め、そこを被覆する中皮の立方上皮化を時に認める。右図中の矢印はMWCNTを示す。

平成25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 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パスウェー解析を行った結果、暴露 1 日目に白血球血管外遊走シグナルが増加し、3 日後でマクロファージによると思われるカベオラを介した endocytosis シグナルが増加することが示された。

略号：

MWCNT：多層カーボンナノチューブ

#### 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、酸化的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  
フイメトリクス社の 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実  
験を実施し、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た。

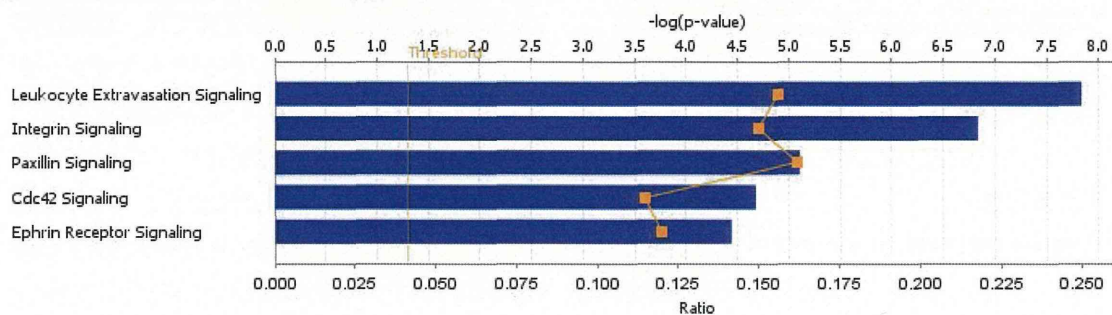
#### C, D. 研究結果及び考察

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、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。今年度は引き続き Ingenuity Pathway  
Analysis を用いたパスウェー解析を実施し  
た。

MWCNT 曝露1日後に増加した遺伝子を解析し  
た結果、既知のパスウェーとして、leukocyte  
extravasation signaling、integrin  
signaling、paxillin signaling、cdc42  
signaling、ephrin receptor signaling 等  
が Fisher's exact test で有意に抽出さ  
れた (図1)。これらは白血球血管外遊走、  
細胞移動、接着に関与するもので昨年度に抽  
出された免疫応答に関与するシグナルと関  
連すると考えられた。さらに個々のパスウェ  
ーを図2-6に示した。色がついている分子  
が変動遺伝子リストに含まれているもので  
ある。MWCNT 曝露3日後に増加した遺伝子を  
解析した結果、既知のパスウェーとして、  
caveolar-mediated endocytosis (カベオ  
ラを介したエンドサイトーシス) signaling、  
eif2 signaling、integrin signaling が  
Fisher's exact test で有意に抽出された  
(図7)。カベオラ依存エンドサイトーシス  
のパスウェーを図8に示した。このことから  
曝露3日後の肺においてマクロファージによ  
る異物取り込みが促進されていることが示  
唆された。一方、7日目の増加遺伝子、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)。

Analysis: 1d up 0.05 0.5copy - 2013-04-02 11:22 午前

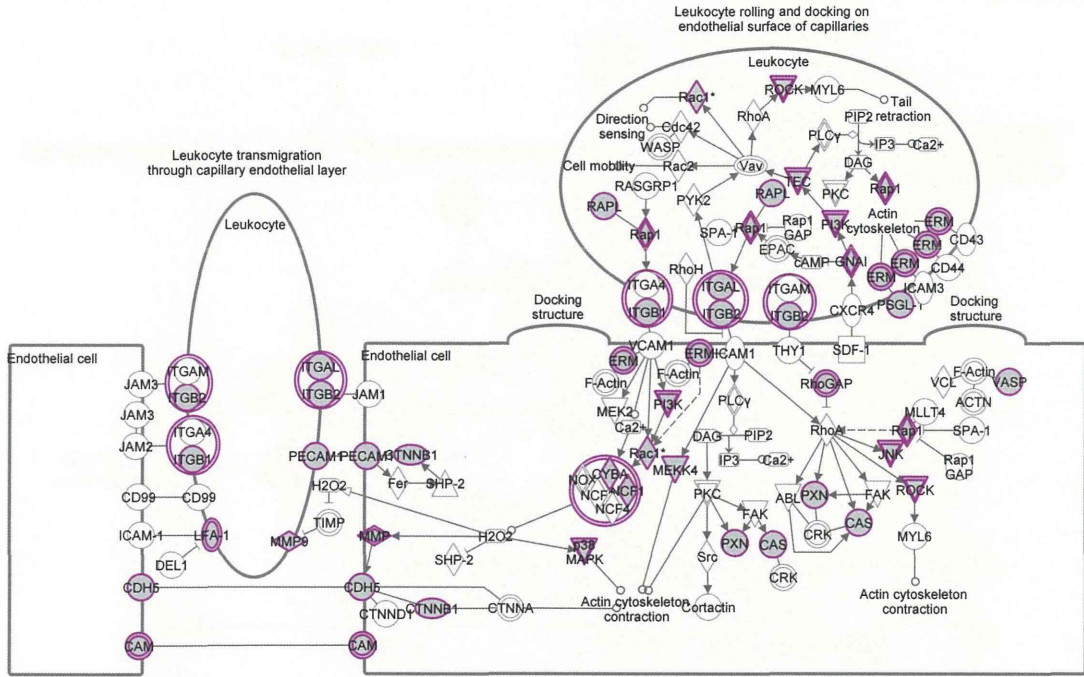
■ 1d up 0.05 0.5copy - 2013-04-02 11:22 □ □ ■ Ratio



© 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と関連する既知のパスウェー

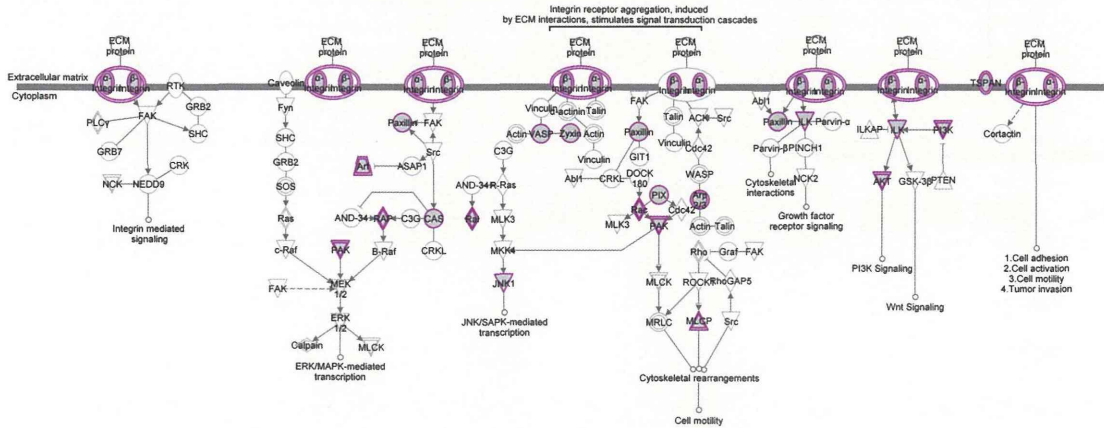
Leukocyte Extravasation Signaling



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

図2. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した leukocyte extravasation signaling (白血球血管外遊走シグナル)

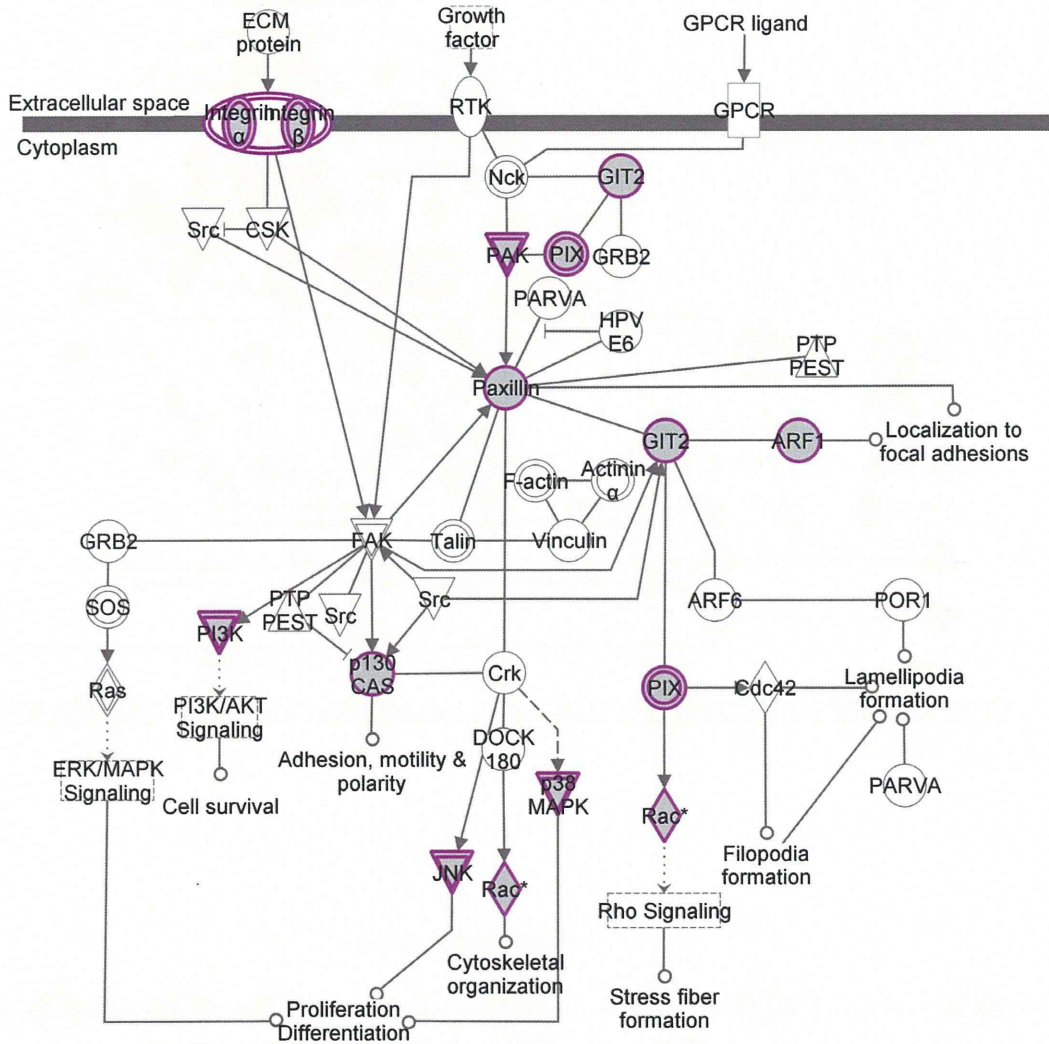
Integrin Signaling



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

図3. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した integrin signaling

Paxillin Signaling



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

図4. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した paxillin signaling



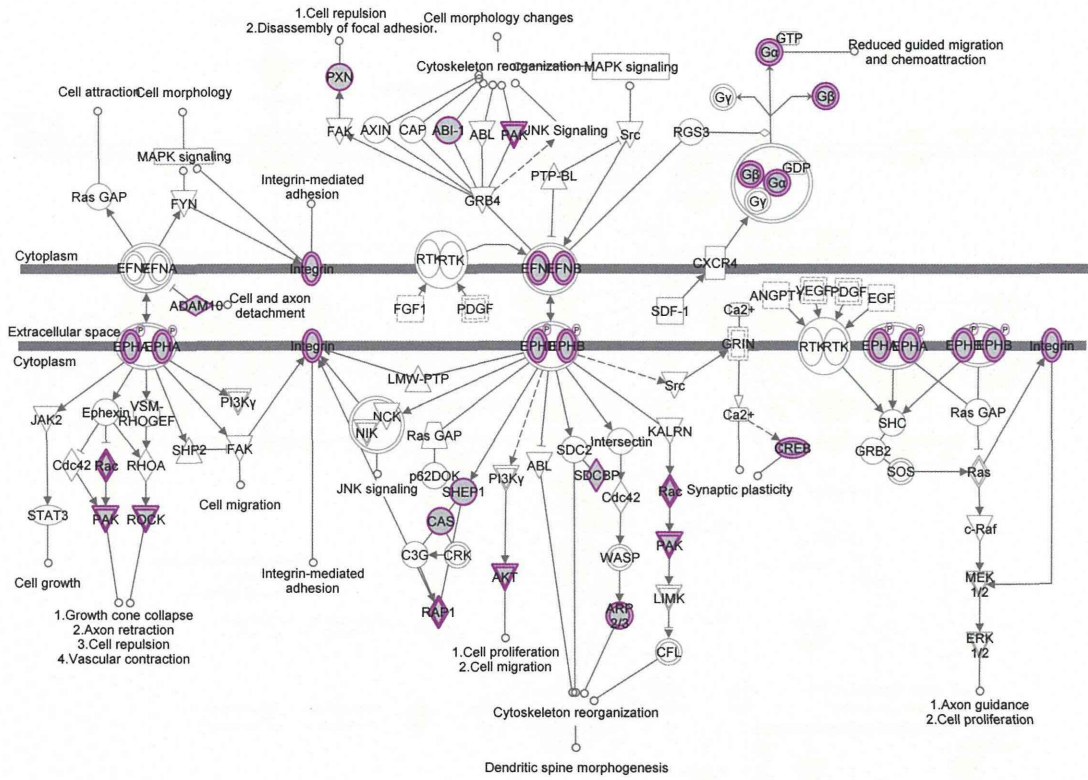


図6. MWCNT 吸入暴露1日後に増加した ephrin receptor signaling

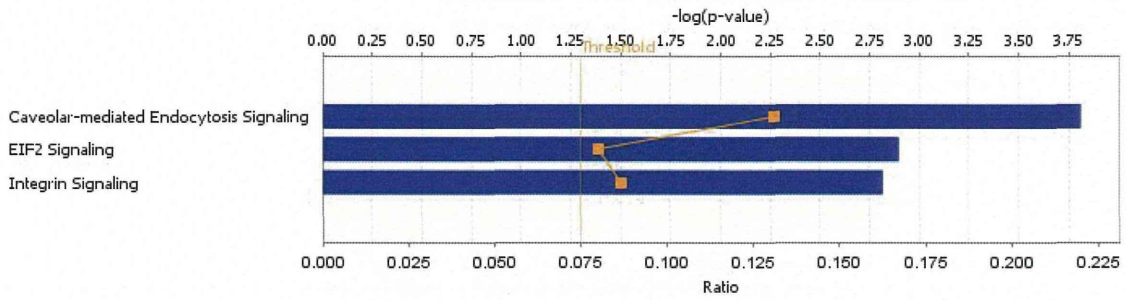
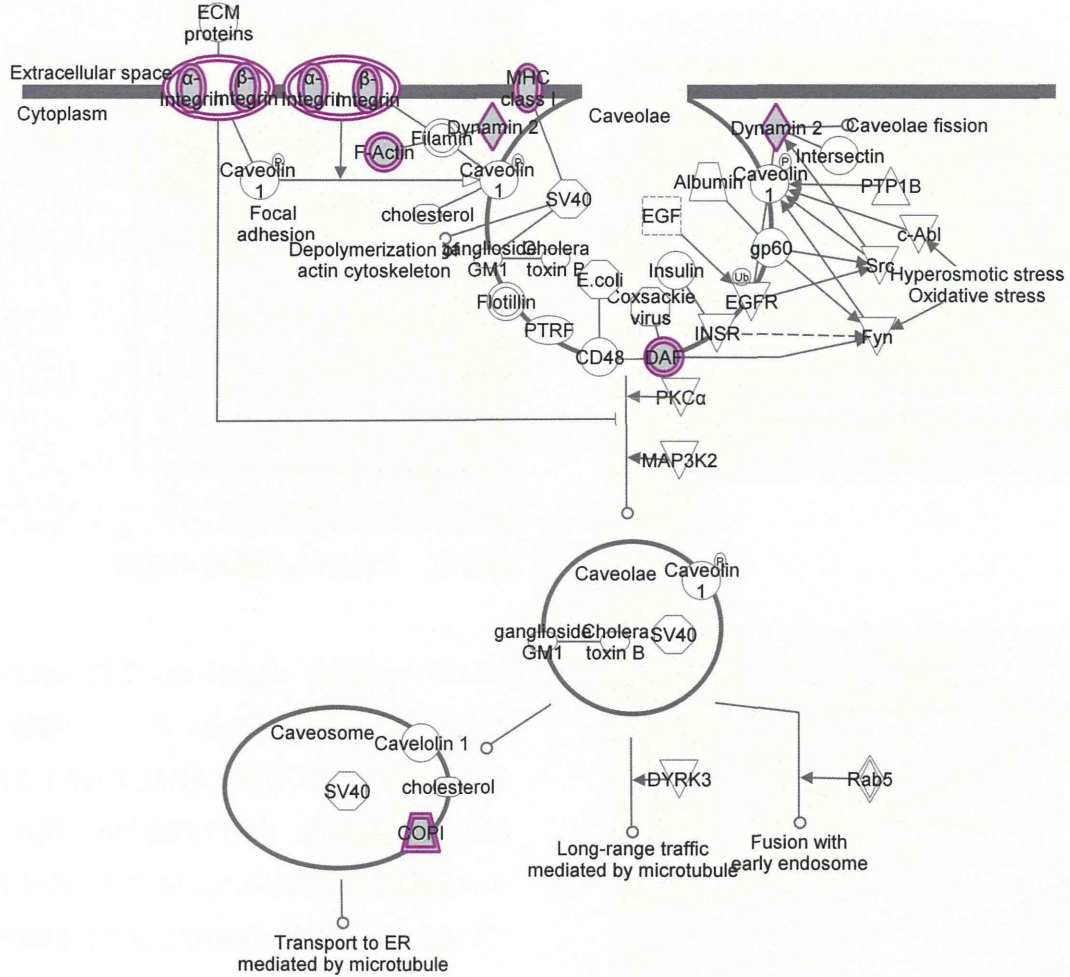


図7. MWCNT 吸入暴露3日後に増加した遺伝子と関連する既知のパスウェー





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

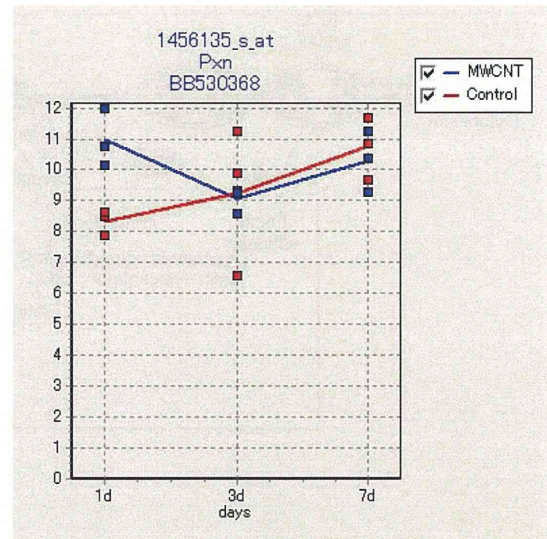
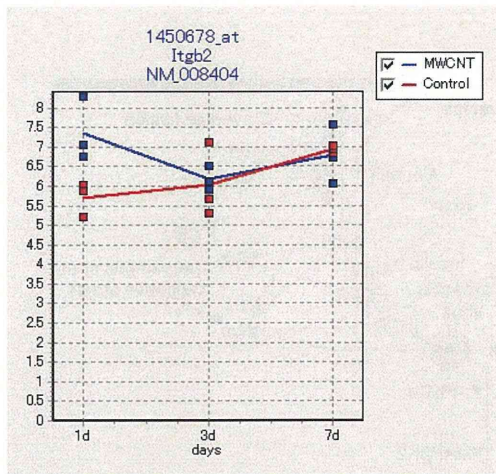
図 8. MWCNT 吸入暴露 3 日後に増加したカベオラ依存エンドサイトーシス signaling

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。

leukocyte extravasation signaling、integrin signaling、paxillin signaling 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 9)。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)が形成され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)



B)

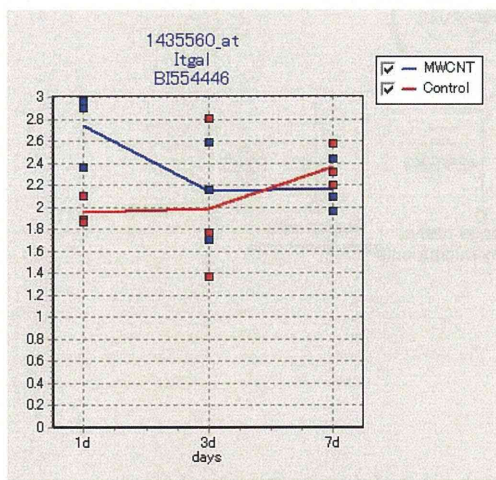


図10. Paxillin 遺伝子の増加

ephrin receptor signaling では 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 11)。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9. Integrin 遺伝子の増加

A) Itgb2、B) Itgal

B) 縦軸は遺伝子発現量 (copy/cell) 以下同様

さらに、paxillin 遺伝子の増加を示す (図 10)。Paxillin は細胞運動に関与していることが知られている蛋白である。

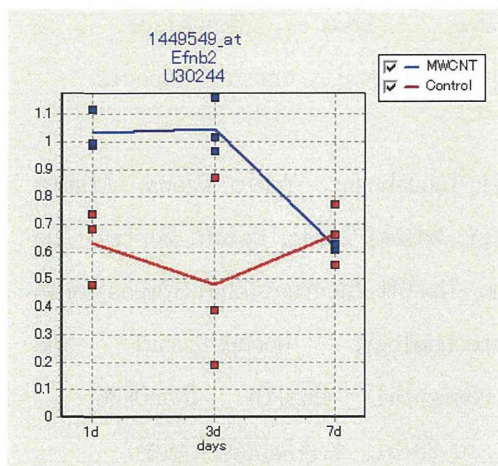


図 1 1. ephrin B2 遺伝子の発現増加

MWCNT 曝露 3 日後に増加した遺伝子を解析した結果、既知のパスウェーとして、caveolar-mediated endocytosis (カベオラ依存エンドサイトーシス) signaling が抽出された。この中で 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 1 2)。以上、パスウェー解析の結果、曝露 1 日目に白血球血管外遊走シグナルが増加し、1 及び 3 日後でマクロファージによると思われるカベオラを介した endocytosis シグナルが増加することが示された。

今後、MWCNT の原体と新規に開発した分散型 MWCNT (Taquann 法による) をそれぞれ同質量濃度にて、単回吸入曝露し、1 及び 3 日後に肺のマイクロアレイ解析を実施することにより反応性の違いを比較する実験を実施する予定である。

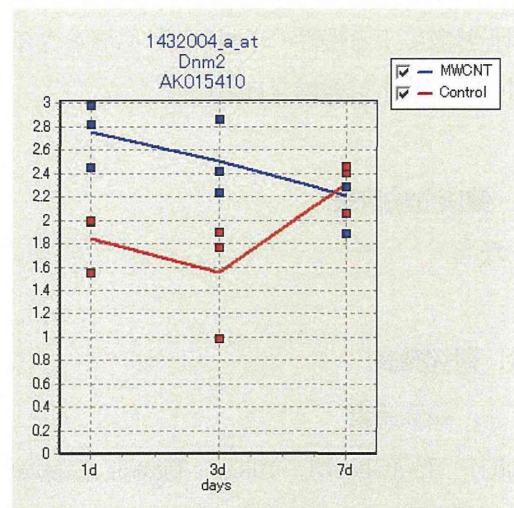


図 1 2. Dynamin2 遺伝子の発現増加

以上は、比較的初期の変化をとらえたデータであり、異物としての MWCNT のマクロファージによる貪食等に係る分子機構を反映したものと考察される。尚、NLRP3 の発現変動は本実験条件下では観測されなかった。

同一検体を高分散処理後に全身暴露吸入した別途進行中の研究では、吸入終了後 13 週目の肺において、軽度ながら慢性的な変化が散在性に確認されている。その様な変化を予見する所見は明らかではなかった。その理由として、MWCNT の吸入量が比較的低い点があげられる。

別途進行中のシックハウス症候群レベルの低濃度化学物質吸入暴露研究では、明瞭な遺伝子発現変化が 2 時間吸入直後から 6 日反復後にかけて観測されている。これに対し、MWCNT の様な溶解性の無い粉体の場合は、反応する細胞、一義的にはマクロファージが想定されるが、その絶対数が少ないことが原因であると考えられる。より長期間にわたる観

測が、MWCNT等の非分解性の粒子状物質の低用量暴露による慢性の予見には、必要となる可能性があると考察される。

## F. 健康危険情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno. , An Improved Dispersion Method of Multi-wall Carbon Nanotube for Inhalation Toxicity Studies of Experimental Animals, The Journal of Toxicological Sciences Submitted May 5, 2013; Accepted June 9, 2013

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.

### 2. 学会発表

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013.10.28-31、名古屋国際会議場)

Lecture from Organizer 1  
Nanotoxicology-its chronic aspects

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno, The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013.10.28-31、名古屋国際会議場)

An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System

Koichi Yamada, Akihiko Iwasa, Tomoyuki Kondo, Mie Kurosawa, Rieko Arakaki, Akiko Yamada, Yasusei Kudo, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Jun Kanno, Naozumi Ishimaru, The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE6、2013.10.28-31、名古屋国際会議場) In vivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system

## 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25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
	妹尾 英樹	同 病理検査部病理検査室	技術専門役
	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

平成23年度に市販の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の分散性を高めた Taquann 法処理 MWCNT (T-CNT) をマウスに単回気管内投与して、投与後3ヶ月まで経過観察をおこなって得た試料を、遠隔臓器への移行に焦点を絞った精査を行った。その結果、マウスの全身諸臓器に T-CNT の存在が確認された。脳、腎臓及び肝臓ではマクロファージに貪食されずに血流中に入った T-CNT が検出され、脾臓や肝臓で確認された T-CNT には脾臓や肝臓の貪食細胞でトラップされている可能性が考えられる。今後、マクロファージに貪食されていない T-CNT が直接血流に入るか否かを検証する必要がある。また、T-CNT を気管内投与後3日に採材した肺サンプルを透過型電子顕微鏡で検索した結果、通常の光学顕微鏡や偏光装置を利用した検索では検出が困難なサイズの T-CNT を肺胞マクロファージが貪食していることが確認された。このため、MWCNT による生体影響の検索には電子顕微鏡の利用が有用であることが示された。

## A. 研究目的

市販の多層カーボンナノチューブ(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、それぞれのサイズによって毒性の発現が異なると考えられる。MWCNTの主な暴露経路となる吸入暴露では、一般に粒子状物質は上部気道で大きな凝集塊がトラップされ、肺胞に到達できるのは小さな粒子である。このためMWCNTも大小さまざまなサイズのMWCNTが混在する環境中の濃度よりも、分散した少量のMWCNTだけが到達し、肺胞内のMWCNT濃度はかなり低いと考えられる。本研究課題では、低濃度域でのMWCNTの毒性発現のプロファイルを明確にすることによりMWCNTの毒性について、ヒトへの外挿、リスク評価に役立たせることを目的として針状型のMWCNT原末を高度に分散したTaquann法処理MWCNT(T-CNT、国衛研で開発)を研究班で共通の検体とし、主としてマウスを用いた研究を進めている。生体内で安定であると考えられているMWCNTの体内移行による生体影響が懸念されることから、本分担研究では、吸入暴露されたT-CNTの生体組織への侵入と、その後の全身諸臓器への移行についての調査を目的とした。

## B. 研究方法

吸入暴露されたMWCNTの生体組織への侵入の調査(B-1)と、肺組織内に侵入した後の全身諸臓器への移行についての調査(B-2)を実施した。

### B-1 吸入暴露されたT-CNTの肺組織侵入経路の解明：

吸入暴露されたMWCNTの生体組織への侵入の調査についてはT-CNTをC57BL/6Jマウスに気管内投与し、T-CNTの細気管支腔及び肺胞腔から肺胞壁内への移行の様子を透過型電子顕微鏡で検索した。マウスへの気管内投与と肺の採材はH24年度に実施、以下①～②にその方法の概略を示した。電子顕微鏡試料作製と電子顕微鏡を用いた観察は本年

度を実施、その方法を③に示した。

① T-CNT 10 $\mu$ g/匹投与した肺の材料の採取と固定・保存材料(平成24年度実施)：

C57BL/6Jマウス(雄、SPF、日本チャールス・リバー(株))を生後12週齢で導入、一週間の検疫、馴化の後、生後13週齢でイソフルランの吸入による麻酔下で、T-CNT懸濁液0.03mlを気管内投与器具を使用して気管内に単回投与した。T-CNTの投与用量は10 $\mu$ g/匹とし、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。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した滅菌生理食塩水にTween80を0.1%添加したものを投与(0.03ml/匹)した。また、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。マウスは単回投与後、最長3日間観察した。解剖は解剖期1(投与後1日)、解剖期2(投与後3日)に実施した。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群とした。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とも各2匹)、合計で各群16匹を使用した(図1)。各解剖期の解剖では、ソムノペンチルを腹腔内注射して、動物の痛覚消失を確認後、開腹、腹大動脈を切断し、放血致死(安楽死)させた。T-CNTの投与量の設定は、平成23年度の分担研究として実施したC57BL/6JマウスへのT-CNTの単回気管内投与実験で、肺に顕著な巣状炎症がみられた10 $\mu$ gとした。T-CNT懸濁液の調製方法は、Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に、設定濃度の10 $\mu$ gとなる様、T-CNTを加え超音波を用いて懸濁させた。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。飼育環境は次の通り。温度：23 $\pm$ 2 $^{\circ}$ C、湿度：55 $\pm$ 15%、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：個別飼育。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- $\gamma$ 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。

② 気管と肺の採取保存（平成24年度実施）：

ネンブタールi. p. 麻酔下、腹大動脈から放血死させて、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、真空デシケーター内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った（図2）。

③ 透過型電子顕微鏡（TEM）観察試料の作製方法とTEMによる観察（本年度実施）：

固定した肺はショ糖を3%添加したリン酸緩衝液を交換しながら9日間リンス、その後、リン酸緩衝液に浸漬して4°Cで3ヶ月間保存した。左肺の全割組織を主気管支（細気管支）に沿って1mm幅で切り出し、1%オスミウム酸で後固定（90分）、常法によりエポキシ樹脂に包埋した。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作製した（図3）。セミシン切片をトルイジンブルーで染色後、光学顕微鏡下で肺全体を精査して透過型電顕で超微細形態学的検索を実施する部位を選定した（図4）。透過型電顕検索に選定した部位をスライドガラスに張り付いているセミシン切片から切り出し、切り出した組織片をエポキシ樹脂に再包埋して、ダイヤモンドナイフで超薄切切片を作製（図5）。未染色で透過型電子顕微鏡による観察を行った。

## B-2 肺組織内侵入後のT-CNTの遠隔臓

### 器への移行調査：

T-CNTをC57BL/6Jマウスに単回気管内投与してその後、最長91日まで経過観察を行って採材した毒性試験の病理組織標本を利用（平成23年度に動物実験の実施と病理組織標本を作製）して、T-CNTのリンパ系組織（肺関連リンパ節、脾臓、胸腺）と脳、腎臓及び肝臓への移行を簡易偏光装置を備えた光学顕微鏡を用いて検索した（マウスを用いたT-CNTの亜急性毒性試験はH25年度に実施）。以下①に試験デザイン、気管内投与と肺の採材方法及び②にケルンエヒトロート染色標本によるT-CNTの遠隔臓器への移行の調査の方法を示した。

① マウスを用いたT-CNTの毒性試験デザイン、気管内投与と肺の採材：

T-CNT 10、3.3、1.1、0 µg/匹をC57BL/6Jマウスに気管内投与後 7、28、91日後に動物を安楽死させて、全身の諸臓器を採取、10%中性燐酸緩衝ホルマリン溶液に浸漬して固定・保存した。動物は各投与濃度、各解剖期毎に5匹を用いた。気管内投与に用いたT-CNT懸濁液調整方法、動物の飼育条件気、解剖時の麻酔方法等はB-1と同様におこなった。

② ケルンエヒトロート染色標本によるT-CNTの遠隔臓器への移行の調査：

ホルマリン固定組織から常法により肺関連リンパ節、脾臓、胸腺、脳、腎臓及び肝臓のパラフィン包埋切片を作製し、ケルンエヒトロートによる単染色を行った。

先に掲げた各臓器へのT-CNTの移行をケルンエヒトロート染色標本に対して通常の光学顕微鏡を用いた観察と、簡易偏光装置を用いた光学的観察を併用して調べた（図6）。組織内に沈着したT-CNTの判定は、形状と色調から確実にT-CNTと判定できるものだけを拾い上げて集計した。リンパ系組織の肺関連リンパ節と脾臓ではT-CNTは主としてマクロファージに貪食された状態で認められる（図6）。このためT-CNTはマクロファージの細胞質内に複数の繊維が集まって認められることが多く、厳密に一本単位での拾い上げは不可能であり、肺関連リンパ

節、脾臓及び胸腺でのT-CNTの移行については、ひとつのまとまりと認識できるT-CNT（もしくは、T-CNTの集簇箇所）を1スポットとして記録した。集計に際しては、1～10スポットが認められたものを1+、11～20スポットが認められたものを2+、21スポット以上50未満を3+とした。一方、脳、腎臓及び肝臓ではT-CNTの移行は単繊維でみとめられることから1本単位で移行本数を記録した。対照群であるT-CNT 0 µg/匹投与群には懸濁媒体のTween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水0.03mlを投与した。本試験ではSham対照群を設置しなかった。

### 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、ここで報告した各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。

## C. 研究結果

### C-1 吸入暴露されたT-CNTの生体組織への侵入の調査：

T-CNT投与群は気管内投与後1日に解剖に付して採材した3匹全ての肺と気管内投与後7日に解剖に付して採材した3匹のうち1匹の肺について、透過型電子顕微鏡による検索を行った。その結果、

T-CNT投与後1日に採材した肺には、肺腔内にT-CNTやT-CNTを貪食したマクロファージが認められたが（図7-9）、肺組織に侵入したT-CNTは確認できなかった。また、血管腔内にもT-CNTは確認されなかった。気管内投与後7日採材した肺では、透過型電子顕微鏡で検索した1匹の結果であるが、マクロファージにT-CNT貪食したが認められ、この貪食されたT-CNTは外径27.4nm、内径11.8nmの中空構造を持つMWCNTであることが確認された（図10）。肺組織に侵入したT-CNTは確認できなかった。

### C-2. 肺組織内に侵入した後の全身諸臓器への移行の調査：

T-CNTの肺からリンパ系組織への移行では、以下の結果を得た。肺関連リンパ節には10µg投与群は気管内投与後1日から移行が認められ、投与量が低いほど7日、28日と遅れてみられた（図12）。脾臓には、10µg投与群は気管内投与後7日から移行が認められ、3.3µg投与群では28日だけに移行が認められた（図13）。肺関連リンパ節、脾臓とも10µg投与群では、時間経過とともに移行が認められた動物数と沈着の程度が増加した（図12、13）。T-CNTが沈着した部位に著明な組織反応は認められなかった。胸腺にはT-CNTの移行を認めなかった。

脳、腎臓及び肝臓への移行では、以下の結果を得た（図14）。脳への移行はから認められ、投与後7日に3本/匹、投与後28日に5本/匹、投与後91日では11本/匹が認められた。腎臓への移行は投与後1日から認められ、投与後1日に0.8本/匹、7日に5.4本/匹、投与後28日に5.2本/匹、投与後91日では9.2本/匹が認められた。肝臓への移行も投与後1日から認められ、投与後1日に0.8本/匹、7日に



13本/匹、投与後28日に9.6本/匹、投与後91日では14.8本/匹が認められた。脳、腎臓で確認されたT-CNTの数は少ないものの、観察日数の経過と共に増加が認められた。

また、これらの臓器での沈着は、肺関連リンパ節や脾臓でマクロファージの細胞質に複数のT-CNTが認められたのとは異なり、いずれも単繊維の状態では炎症などの組織反応を伴わないものであった(図11)。肝臓では、T-CNTは類洞内に認められ、その数は観察日数の経過と共に増加し脳、腎臓よりも多く認められた。また脳や腎臓での事例と同様単繊維の状態が認められたがクッパー細胞に引っかかっていると思われる所見も認められた(図15)。

#### D. 考察

本研究で、マウスの気管内に投与されたT-CNTは、気管内投与後1日ないし7日の早い時期から遠隔臓器の中に存在し、投与後の観察期間の経過とともに遠隔臓器でのT-CNTの数も増加することが確認された。脳、腎臓及び確認されたT-CNTはいずれも単繊維の状態では炎症などの組織反応を伴わないものであり、おそらく血流に乗って全身を巡っているものの一部が、今回、確認されたものと思われる。これに対して肺関連リンパ節と脾臓では複数のT-CNTが沈着したスポットとして認められることが多く、恐らくマクロファージが積極的にT-CNTを貪食した結果、マクロファージの細胞質中にT-CNTが集積された状態を観察したものと思われる。また、肝臓では脳や腎臓よりもT-CNTが多く認められた。このことは、肝臓の類洞壁に存在するクッパー細胞が関与している可能性が考えられた。

肺関連リンパ節へのT-CNTの移行は、

投与部位である肺からT-CNT貪食マクロファージが移行した可能性が考えられる。一方、脾臓でのT-CNTの沈着を考えると、マクロファージに貪食されないT-CNTが血流に乗って全身を循環し、その途上で脾臓に定着している貪食細胞に捕食された可能性も考えられる。今回、マウスにT-CNTを気管内投与後1日と3日に肺を採材して、透過型電子顕微鏡による詳細な検索を行ったが、肺の組織中にT-CNTが直接侵入した証拠を確認することができなかった。今後、マクロファージに貪食されていないT-CNTが直接血流に入るか否かを検証する必要がある。また、透過型電子顕微鏡による検索で、肺胞内のマクロファージの細胞質中に通常の光学顕微鏡や偏光装置を用いた観察で検出が困難なサイズのT-CNTの存在が確認された。このことは、MWCNTの生体影響評価には電子顕微鏡レベルの観察が有用であると考えられた。

#### E. 結論

高分散性のT-CNTをマウスに気管内投与して、マウスの全身諸臓器にT-CNTの存在が確認された。脳、腎臓ではマクロファージに貪食されずに血流中に入ったT-CNTが検出され、脾臓や肝臓で確認されたT-CNTにはこれらのT-CNTを脾臓や肝臓に定着している貪食細胞が捕食している可能性が考えられた。今後、マクロファージに貪食されていないT-CNTが直接血流に入るか否かを検証する必要がある。また、MWCNTによる生体影響の検索で、通常の光学顕微鏡や偏光装置の利用では検出できないサイズのT-CNTの関与を補足する必要があると、電子顕微鏡の利用が有用であることが示された。

## F. 研究発表

### 1. 参考論文

Umeda, Y., Matsumoto, M., Aiso, S., Nisgizawa, T., Nagano, k., Arito, H., and Fukushima, S.: Inhalation carcinogenicity and toxicity of 1,2-dichloropropane in rats, *Inhalation Toxicology*, 2010, 22: 1116-1126.

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 Multi-wall Carbon Nanotubes to Lung-Associated Lymph Nodes in Rats, *Industrial Health*, 2011, 49: 215-220.

### 2. 論文発表

Kano, H., Suzuki, M., Senoh, H., Yamazaki, K., Aiso, S., Matsumoto, M., Nagano, k., and Fukushima, S.: 2,4-Dichloro-1-nitrobenzene exert carcinogenicities in both rats and mice by two years feeding,

*Arch Toxicol*, 2012, 86: 1763-1772.

Umeda, Y., Kasai, T., Saito, M., Kondo, H., Toya, T., aiso, S., Okuda, H., Nishizawa, T., and Fukushima, S.: Two-week Toxicity of Multi-walled Carbon nanotubes by wholebody Inhalation Exposure in Rats, *J Toxicol Pathol* 2013, 26: 131-140.

Saito, A., Sasaki, T., Kasai, T., Katagiri, T., Nishizawa, T., Noguchi, T., Aiso, S., Nagano, K., and Fukushima, S.: hepatotumorigenicity of ethyl tertiary-butyl ether with 2-year inhalation exposure in f344 rats, *Arch Toxicol* (2013)87: 905-914.

### 3. 学会発表

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

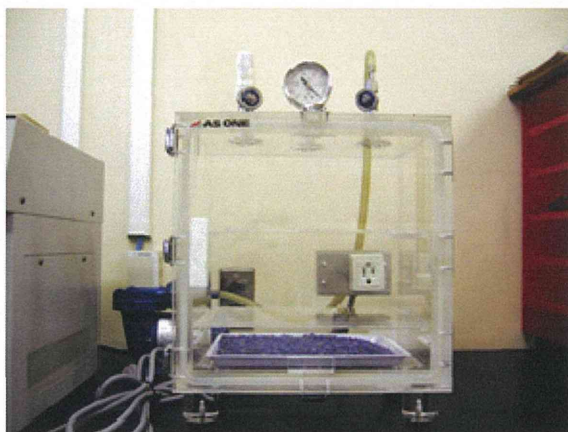
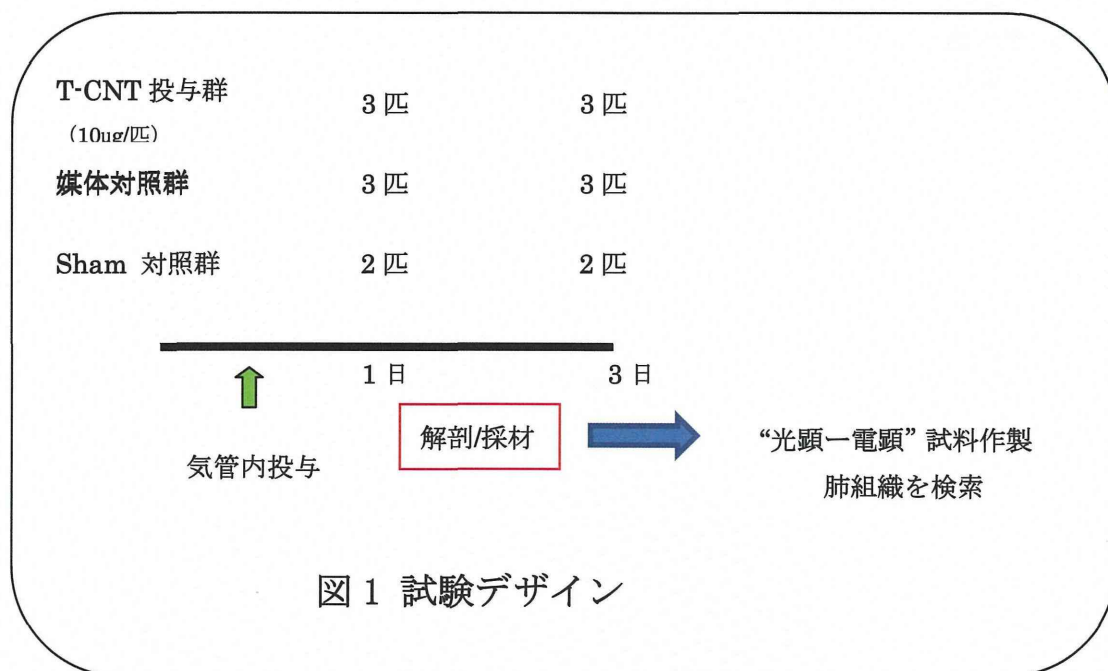
梅田ゆみ、笠井辰也、相磯成敏、福島昭治：多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の 13 週間吸入暴露で誘発されたラットの呼吸器毒性、第 27 回 発癌病理研究会 (2012. 8. 28)

○相磯成敏、齋藤美佐江、酒井俊男：電子顕微鏡の毒性病理学への応用に向けた取り組み：2013 年、第 45 回日本臨床分子形態学会

## 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

方法：B-1 気管内投与した T-CNT の肺組織内侵入する経路解明



- 気管を甲状腺の下端で切断、
- 断端から固定液を肺内に注入
- 両肺を肺門部で気管支から切断
- 左肺、右肺とも固定液に浸漬（肺は液面に浮いた状態）
- 真空デシケータで陰圧(0.05~0.06MPa)にして、肺胞内の残存空気を脱気
- 常圧に戻して、放置  
→肺は固定瓶の底に沈降

図 2 肺組織の固定手順