

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

「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った。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した。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、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った。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原末を高度に分散処理したMWCNT (Taquann法処理-MWCNT : T-CNT) 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H25年度に終了した。

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、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 T-CNT 投与が可能になった。平成24年度に開始した気管内投与による長期毒性試験を開始することができ、平成25年度では、この長期実験を終了し、病理組織学的な評価も終えることができた。

3つの長期実験のうち、B-I ① T-CNT (10 μ 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では、実験開始後36週目から終了まで、control 群と比べて T-CNT 投与群が有意に体重増加抑制が見られ、実験終了時の肝臓、腎臓の相対臓器重量が有意差に増加していたが、病理組織学的評価においては、群間で有意な所見は見られなかった。なお、T-CNT 投与群のうち1匹の肺内に T-CNT が見られたが、その周囲では反応性病変は認められず、T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。B-I ② 超低濃度T-CNT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実験終了まで、いずれの群間にお

いても有意な体重差は見られず、臓器重量については絶対重量、相対重量いずれも control 群と比べて有意差は見られなかった。病理組織学的評価においては、最高用量である Group 3 (10 μ /mouse) のうち、2匹の肺内で T-CNT が認められ、その他の群では認められず、いずれの群においても T-CNT に関連した腫瘍性病変は見られなかった。B-II T-CNT (60 μ 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、実験終了まで群間での有意な体重増加抑制は見られなかった。臓器重量は T-CNT 投与群で腎臓の相対重量が control 群に比べて有意に減少していたが、病理組織学的評価においては、群間で有意差は見られなかった。なお、いずれの群においても肺内では比較的強い炎症像が見られていたが、病理組織所見においても群間で有意差は見られず、実験に用いた F344 ラットは気管内投与にて肺に炎症を励起しやすい特徴をもっているためと考えられた。今後も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継続していく予定である。

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。今井田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(Taquann法処理)の開発に成功し、T-CNT (Taquan法処理-MWCNT)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衛研での分担研究として行われている全身吸入暴露試験と併行し、本分担研究では、単回気管内投与によるT-CNT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 T-CNT 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 T-CNT (10 μ 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、分担研究者が実施する全身吸入暴露実験と同様に、12週齢の C57BL/6J マウスにて行うことを計画していたため、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がなく挿入でき、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使い、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 μ 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 T-CNT 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、T-CNT 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、全身曝露吸入試験と同様に、12週齢の雄性 C57BL/6J マウスに T-CNT を単回気管内投与を行った (図 6)。T-CNT 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。T-CNT の投与用量は 10 μ g/mouse とし、1匹当たりの投与用量は 0.02ml/匹とした。気管内投与は投与液 0.02ml の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 0.03ml 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、T-CNT 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った。なお、肺を中心に病理組織学的な評価は HE 染色標本を通常の光学顕微鏡により評価を行ったが、極小の針状構造物である T-CNT は通常の光学顕微鏡では観察しにくく、とらえにくいため、偏光顕微鏡 (オリンパス BX53-33p-DPH2, DP21, U-POT) による観察を合わせて行った。

② 超低用量 T-CNT の単回気管内投与による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 μ g/mouse の用量による実験を計画し開始した。しかし、その後、T-CNT の開発を行った高橋研究員らの研究により、T-CNT 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。

T-CNT の投与用量の決定は、B-I ①や下記に示す B-II で得られるであろう実験データ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 μ g/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 μ g/匹、2.0 μ g/匹、0.4 μ g/匹の 3 段階 (公比 5) の投与用量とし、1匹当たり 0.02ml 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 0.02ml を投与した群を設けた (図 7)。気管内投与は投与液 0.02ml の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 0.03ml 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、T-CNT 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。実験は順調に進行し、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った。なお、前述したように、病理組織学的な評価は HE 染色標本を通常の光学顕微鏡により評価を行ったが、T-CNT は通常の光学顕微鏡では観察しにくいため、偏光顕微鏡による観察を合わせて行った。

B-II T-CNT (60 μ 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

本研究では、12週齢の C57BL/6J マウスに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 12週齢の C57BL/6J 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、ラットで用いているゾンデでは気管の損傷が起こり、同様な処置は行うことが困難であることがわかった。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ことで、気管内投与の確実な投与が出来ることがわかったが、そうした器具の併用においても、ラットの気管内投与に比べて、手技の難易度が高いことや、投与の不正確性がラットに比べて相対的に高いことが予想されたため、習熟しているラットへの気管内投与実験も併行した。

B-I①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。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ラットでは約6倍の重量であることから、T-CNTの投与用量を $60.0 \mu\text{g}/\text{rat}$ とし、1匹当たり 0.12ml 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 0.12ml を投与した群を設けた(図8)。気管内投与は投与液 0.12ml の全量を、シリンジ内の投与液の後方に満たした空気 0.18ml 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、T-CNTを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-I①、②と同様に、DIMS型経気道ゾンデ（ラット用）(DIMS医科学研究所)およびラット気管内挿管器具(バイオリサーチセンター株式会社)の光ファイバー付きラット用喉頭鏡を併用することで確実にを行った。倫理面への配慮として、被験物質投与時の麻酔はネン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。実験は順調に進行し、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った。なお、通常の光学顕微鏡による観察に加えて、T-CNTの評価のため偏光顕微鏡による観察を合わせて行った。

C. 研究結果

C-I T-CNT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 T-CNT ($10 \mu\text{g}/\text{mouse}$)の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

実験開始時に、麻酔下で気管内投与を行う際に、T-CNTを投与する前にT-CNT投与群20匹のうち、1匹が死亡した。よって、投与群19匹、control群10匹で実験を開始し、52週後の実験終了まで全個体が生存した。実験経過としては、全個体、外観上は両群間で、全身状態に明らかな差はなかったが、実験開始36週目から実験終了まで、control群と比べて、T-CNT投与群が有意に体重増加抑制が見られた(図9)。解剖時肺においても外観からのマクロ観察では明らかな病変はみられなかった(図10)。臓器重量では、肝臓および腎臓の相対臓器重量の増加が見られたが、病理組織学的に著変は見られず、体重減少に伴った相対的な臓器重量の増加と考えられた(図11)。肺の病理組織学的所見として、pulmonary edema, pulmonary fibrosis, alveolar macrophage aggregation, focal granulomatous inflammation, bronchial hyperplasia, squamous metaplasia(図12)について検討し、炎症細胞の浸潤についてはリンパ球浸潤と好中球浸潤に分け、それぞれ気管支周囲の浸潤像であるか、もしくは肺胞内浸潤像であるかの項目にわけて、炎症の程度から、Grade+1, +2, +3の三段階に分類し検討を行った。(図13)その結果、いずれの因子においても、群間で有意差は見られなかった。肺、肝臓、脾臓および腎臓については、通常の光学顕微鏡に加えて、偏光顕微鏡による観察も行ったが、T-CNT投与群19匹のうち1匹で、MWCNTが肺内で観察された(図14)。投与後52週経過した後も、肺内にとどまっていたMWCNTが観察されたが、その周囲では強い反応は生じておらず、組織学的所見に乏しい印象であった。T-CNT投与に関わらず、気管支周囲のリンパ球浸潤が見られており、その原因としてはT-CNT投与時に溶媒に混合した界面活性剤による影響も考えられる。T-CNT投与群で1例に肺でhyperplasiaを生じた個体が見られたが、こ

の部に T-CNT とと思われる針状物質は認められなかった。なお、T-CNT 投与群のうち、1 匹に脾臓に malignant lymphoma の発生が見られたが、この部にも T-CNT は観察されず、自然発生腫瘍と考える。

② 超用量 T-CNT の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

実験開始から実験終了まで、4 群全てにおいて全ての個体が生存し、外観上はいずれの群間においても、全身状態に明らかな差は見られなかった。体重についても control 群と比べて、いずれの群間においても有意な差は見られなかった (図15)。解剖時肺においても外観からのマクロ観察では明らかな病変はみられなかった (図16)。臓器重量では、肝臓、肺および腎臓の絶対臓器重量と相対臓器重量のいずれも、control 群と比べて有意差は見られず、病理組織学的所見も有意差は見られなかった (図17)。なお、T-CNT の評価のため偏光顕微鏡による観察を合わせて行ったが、投与群のうち 2 匹の肺内で、それぞれ 1 本ずつ合計 2 本の T-CNT が見られた。一つは、気管支上皮に刺入していることが観察された (図18)。

なお、T-CNT 投与群のうち、1 匹に肝臓を原発とした histiocytic sarcoma の発生が見られたが、この部にも T-CNT は観察されず、自然発生腫瘍と考える。

C-II T-CNT (60 μ 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

実験開始後33週で、control 群10匹のうち、1 匹が死亡した。発見時には sacrifice を行うことが困難な状態であったため、病理組織学的な評価は行うことができなかったが、その他、control 群の9匹および投与群20匹は全ての個体が生存しており、外観上は両群間で、全身状態に明らかな差はなかった。実験開始から実験終了まで、両群の体重については有意差は見られなかったが、それぞれの平均体重が372.0g (MWCNT 投与群)、360.0g (control 群) とMWCNT 投与群で増加する傾

向があった (図19)。実験終了後、解剖時の肉眼的観察 (図20) および病理組織学的評価を行い、光学顕微鏡による観察に加えて、偏光顕微鏡による観察も行った。解剖時の臓器重量では、肺および腎臓の相対臓器重量の減少が見られたが、病理組織学的に著変は見られなかったため、T-CNT 投与群の体重増加傾向による相対臓器重量の減少が考えられた (図21)。肺の病理組織学的所見として、pulmonary edema, pulmonary fibrosis, alveolar macrophage aggregation, focal granulomatous inflammation, bronchial hyperplasia, squamous metaplasia (図22) について検討し、炎症細胞の浸潤についてはリンパ球浸潤と好中球浸潤に分け、それぞれ気管支周囲の浸潤像であるか、もしくは肺胞内浸潤像であるかの項目にわけて、炎症の程度から、Grade+1, +2, +3 の三段階に分類し検討を行った (図23)。その結果、いずれの因子においても、群間で有意差は見られなかった。T-CNT 投与に関わらず、両群いずれにも、リンパ球や好中球浸潤、focal granulomatous inflammation や bronchial hyperplasia などの病理組織学的所見が見られており、その原因としては T-CNT 投与時に溶媒に混合した界面活性剤による影響や F344 ラットのもつ炎症を励起しやすいという特徴によるものも考えられる。実験に使用した F344 ラットは気管内投与による炎症反応を励起しやすい動物であるため、気管内投与による両群ともに強い炎症が生じたものと考えられる。肺、肝臓、脾臓および腎臓については、通常の光学顕微鏡に加えて、偏光顕微鏡による観察も行ったが、T-CNT 投与群 20 匹のうち 5 匹の肺組織で合計 6 本の MWCNT が肺内で観察された (図24)。投与後52週経過した後も、肺内にとどまっていた MWCNT が観察されたが、その周囲では強い反応は生じておらず、組織学的所見に乏しい印象であった。

D. 結論

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、慢性毒性についての検討を行うことが重要であり、吸入暴露による影響を正確に評価するためにも、分散性の高い検体を用いた研究が必要である。本分担研究では、初年度である平成23年度では、肺内でのMWCNTの分布を観察する目的でMWCNTの光学的特性を分光蛍光光度計やシングルフォトンレーザー顕微鏡等を用いて検討した。また、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、確実に行うことが出来るようになった。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T-CNT投与が可能になった。

平成24年度から開始することができた3つの気管内投与による長期実験のうち、B-I① T-CNT (10 μ 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では、実験開始後36週目から実験終了まで、control群と比べて、T-CNT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、T-CNT投与による何らかの影響が生じていることが推測されるが、病理組織学的評価においては群間で有意な所見を得ることができなかった。MWCNT投与群において、単回気管内投与後52週間経過した後も、肺内にMWCNTがとどまっている個体が観察された。なお、投与後36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、T-CNT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おり、52週間経過した後も肺内にとどまっているMWCNTが存在す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。

B-I② 超低濃度 T-CNT 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かった。

B-II T-CNT (60 μ 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、B-I① T-CNT (10 μ 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なかった。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が考えられた。実験終了後の病理組織学的な評価では、T-CNT投与群20匹のうち5匹の肺組織で合計6本のMWCNTが肺内で観察された。投与後52週間経過した後も、肺内にMWCNTがとどまっていたことは興味深い所見であるが、MWCNTの周囲では強い炎症反応は生じておらず、組織学的所見に乏しい印象であった。なお、両群いずれも肺においても、気管支周囲や肺胞内において、やや強い炎症反応が観察されたが、群間で有意差は見られず、focal granulomatous inflammation や bronchial hyperplasia などの病理組織学的所見においても群間で差は認められなかった。

以上より、単回気管内投与による長期実験の結果から、単回気管内投与後52週間経過した後においても、肺内で残存するMWCNTが存在することが示されたが、今回の実験ではMWCNTに関連したと思われる腫瘍発生は観察されなかった。各分担研究の結果からも、MWCNTの呼吸器系への毒性評価については、全身暴露による検討が重要と考えられる。今後も、各分担研究者との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っていく予定である。

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。

E. 健康危機情報
なし

F. 研究発表
1. 論文発表

Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Saoo K, Kuno T, Imaida K. Lack of promoting effects

from physical pulmonary collapse in a female A/J mouse lung tumor initiated with 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) with remarkable mesothelial cell reactions in the thoracic cavity by the polymer. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 63:181-185, 2011

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.

Kishi S, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Importance of the progesterone receptor (PR) and the epidermal growth factor receptor (EGFR), but not the estrogen receptor (ER), for chemically induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 2013. in press.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 2013. in press.

Ninomiya F, Yokohira M, Kishi S, Nakano Y, Yamakawa K, Inoue T, Kuno T, Imaida K. Gender-dependent effects of gonadectomy on lung carcinogenesis by 4-(methylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) in female and male A/J mice. *Oncol Rep* 30: 2632-2638, 2013

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.*, 65(6):925-932, 2013.

2. 学会発表

横平政直、山川けいこ、中野裕子、沼野琢旬、岸宗佑、二宮英美子、竿尾光祐、今井田克己、F344 ラット、DHPN 誘発肺腫瘍および quartz 誘発肺炎炎症性病変における SP A, B, C, D の免疫組織学的検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10

山川けいこ、二宮英美子、岸宗佑、中野裕子、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、マウスおよびラット肺発がんモデルにおける adipophilin の発現に関する検討、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10

岸宗佑、横平政直、中野裕子、山川けいこ、二宮英美子、竿尾光祐、今井田克己、The relationship between lung carcinogenesis and hepatic CYP induction by combined treatments of DHPN and DMBA in F344 female rats、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10

中野裕子、横平政直、二宮英美子、山川けいこ、岸宗佑、橋本希、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、テストステロンの雌性 A/J マウス NNK 誘発肺腫瘍への影響、第 72 回日本癌学会学術総会、2013.10

横平政直、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮英美子、竿尾光祐、今井田克己、針状粒子 TISMO の胸腔内投与による胸膜中皮細胞の反応性変化についてのマウス系統差、第 29 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2013.01

横平政直、橋本希、中野裕子、山川けいこ、岸宗佑、二宮英美子、井上達史、竿尾光祐、今井田克己、胸腔内投与による針状微粒子 TISMO の影響、第 28 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2012.02

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、仙台国際センター、2012.
7

Yuhji Taquahashil, 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, July 17-20, 2012

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

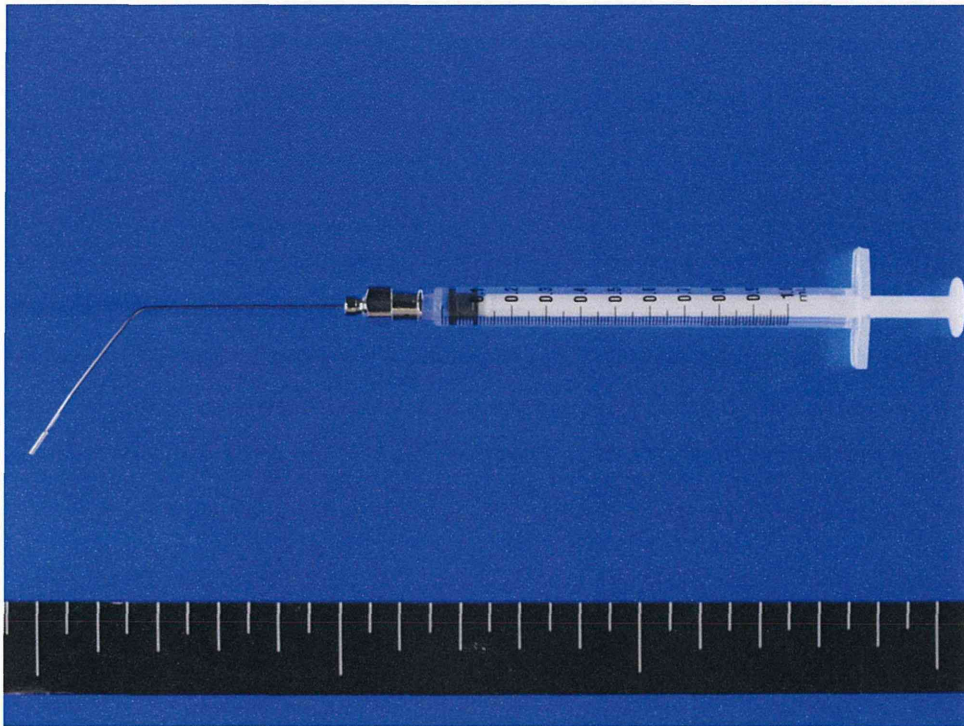


図 1. DIMS 型経気道ゾンデ（マウス用）（DIMS 医科学研究所）および 1cc ツベルクリン用シリンジ（テルモ）

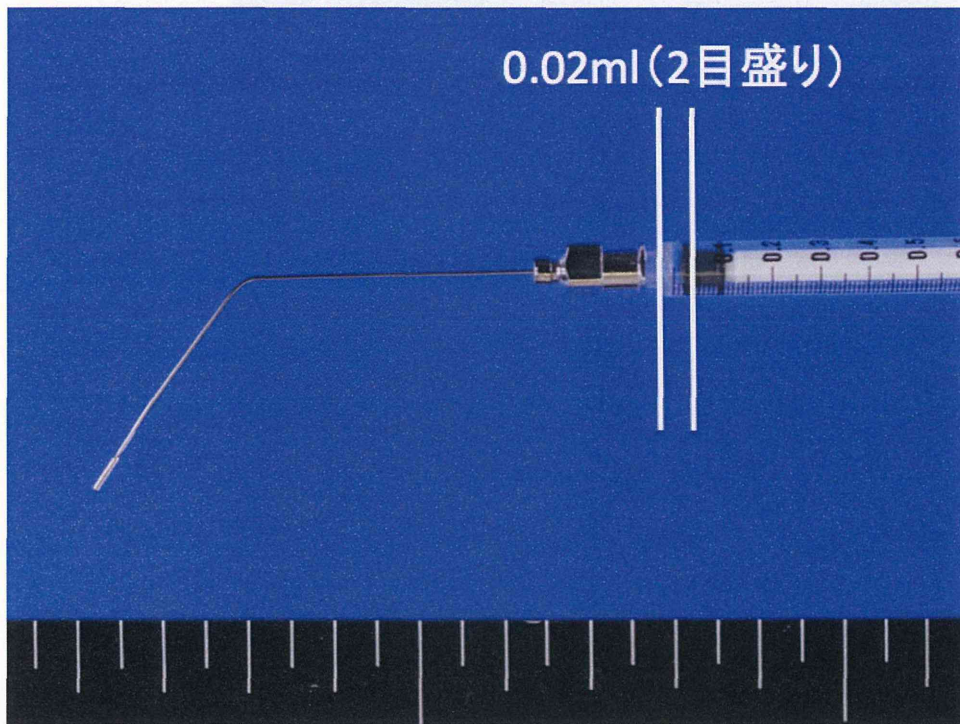


図 2. DIMS 型経気道ゾンデ（マウス用）（DIMS 医科学研究所）および 1cc ツベルクリン用シリンジ（テルモ）

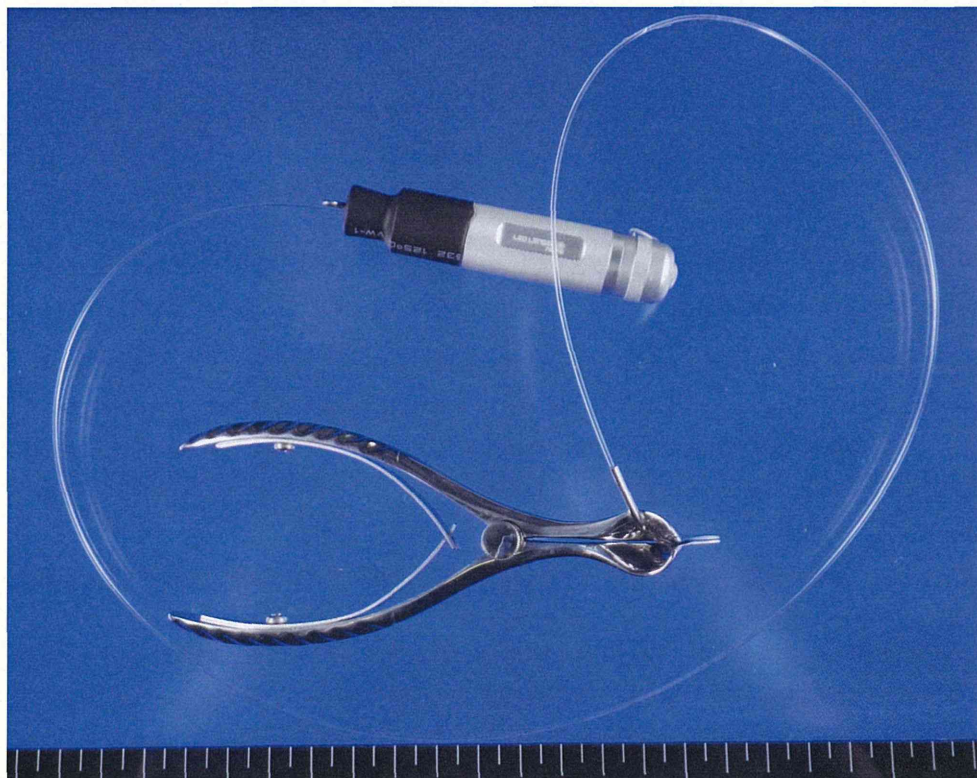


図 3. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
電源、光ファイバー、マウス用喉頭鏡

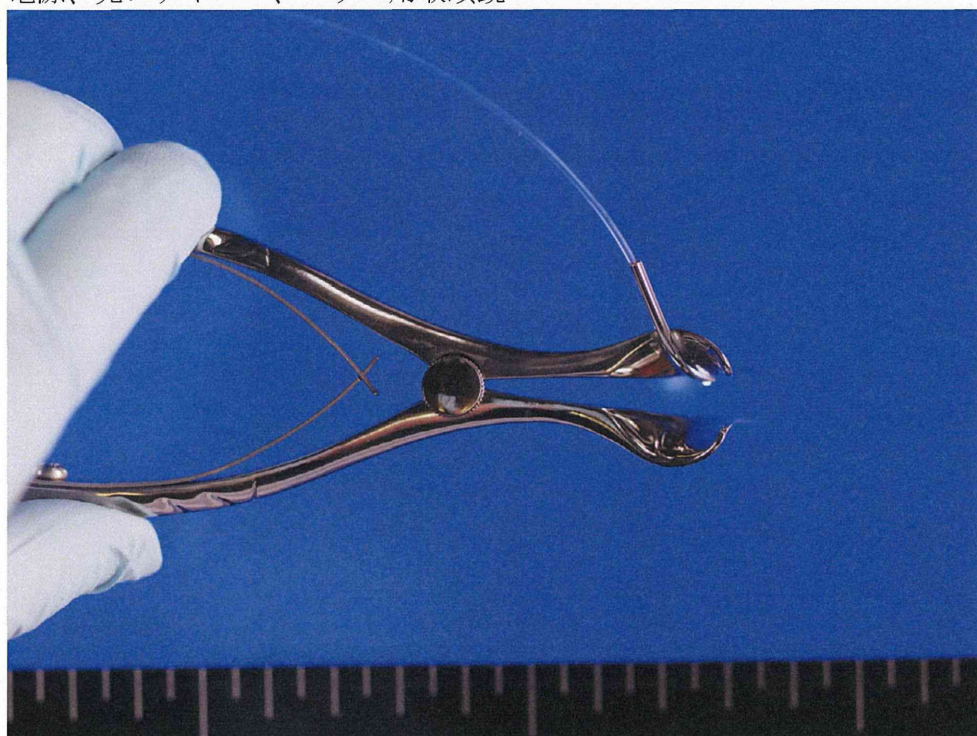


図 4. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
電源点灯時のマウス用喉頭鏡

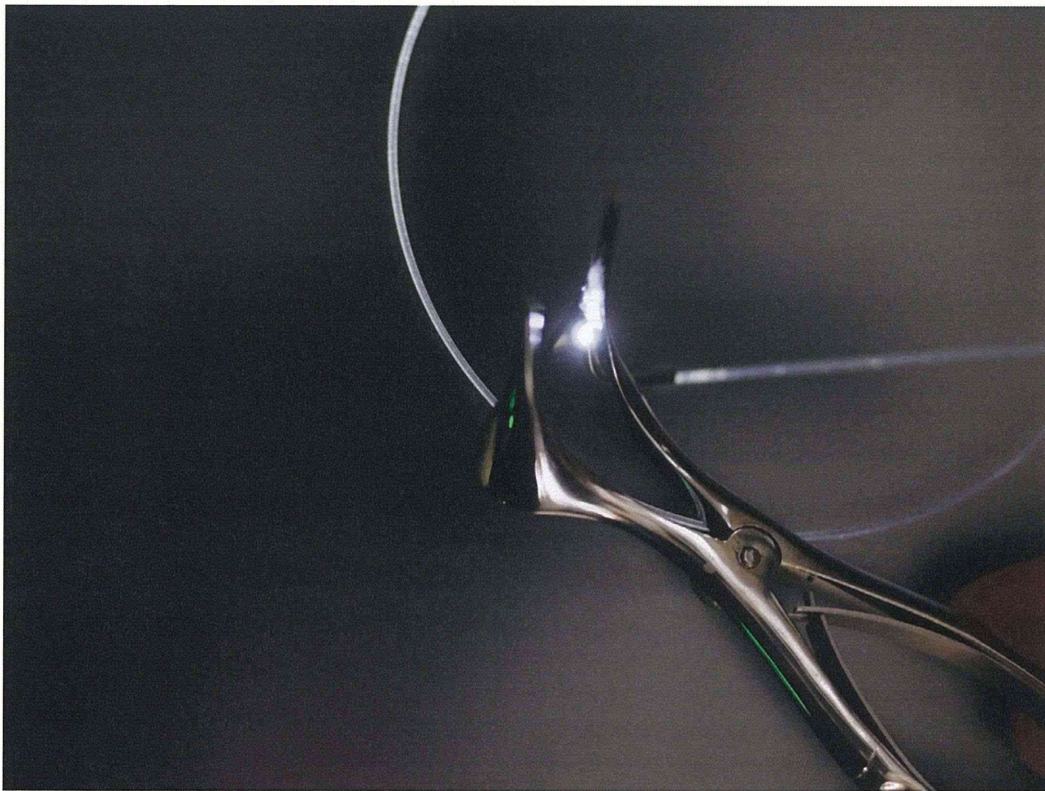
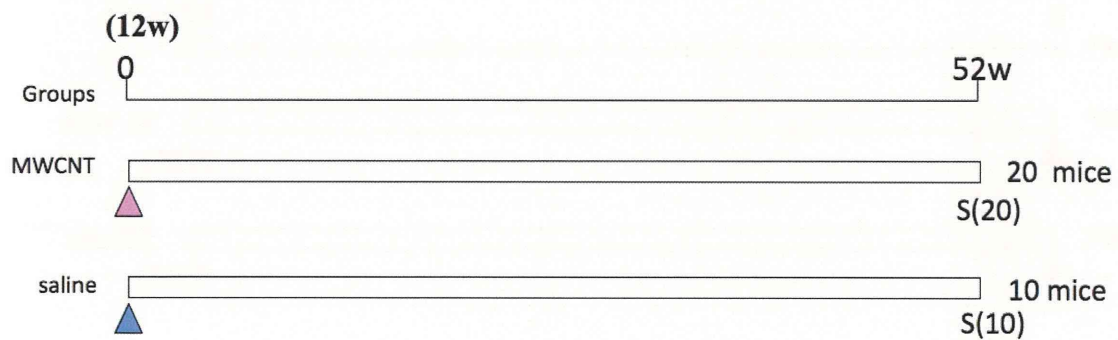


図 5. マウス気管内挿管器具 (バイオリサーチセンター株式会社)
暗所での光源点灯時のマウス用喉頭鏡

Experimental design:

12週齢の雄性 C57BL6/J マウスにおける MWCNT 気管内投与実験



Animals: C57BL6/J male mouse, 12-week-old

▲ : MWCNT, 10 μ g/mouse, i.t.

▲ : Saline + 0.1% Tween 80

Total 30 mice

図 6. B-I ① T-CNT (10 μ 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実験デザイン

Experimental design:

12週齢の雄性 C57BL6/J マウスにおける超低用量 MWCNT 気管内投与実験

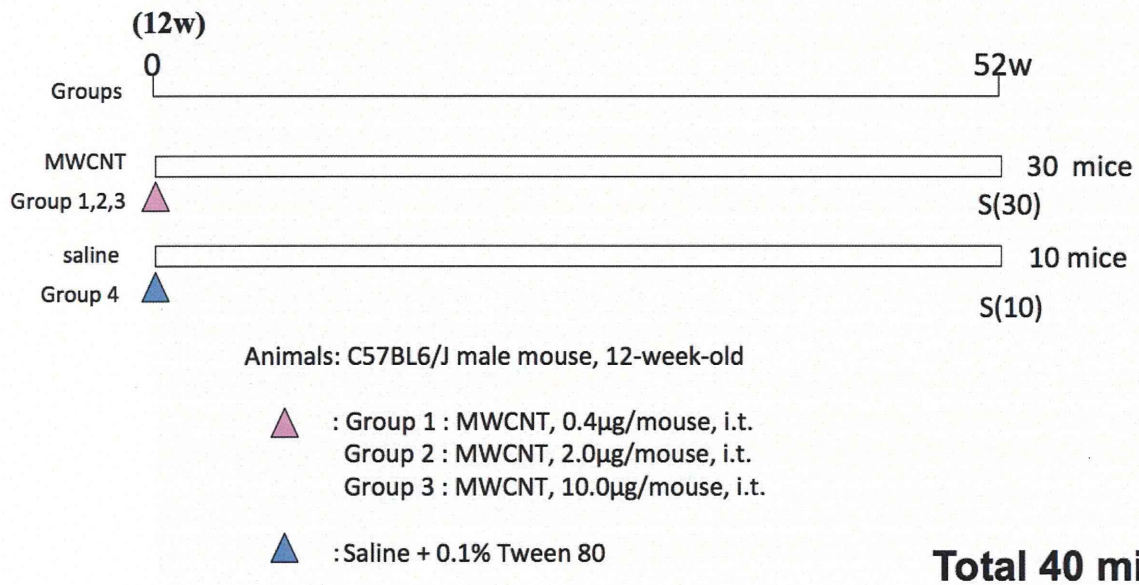


図 7. 超低濃度 T-CNT の単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の実験デザイン

Experimental design:

6週齢の雄性 F344 ラットにおける MWCNT 気管内投与実験

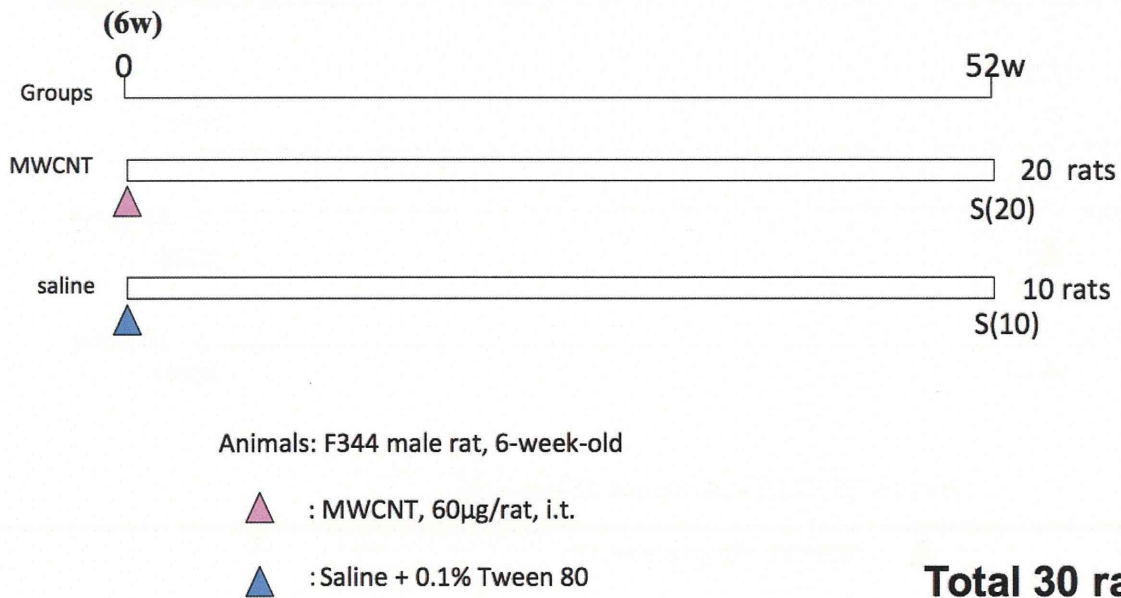


図 8. T-CNT (60 µg/rat) の単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の実験デザイン

MWCNT-Taq (10 μ 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

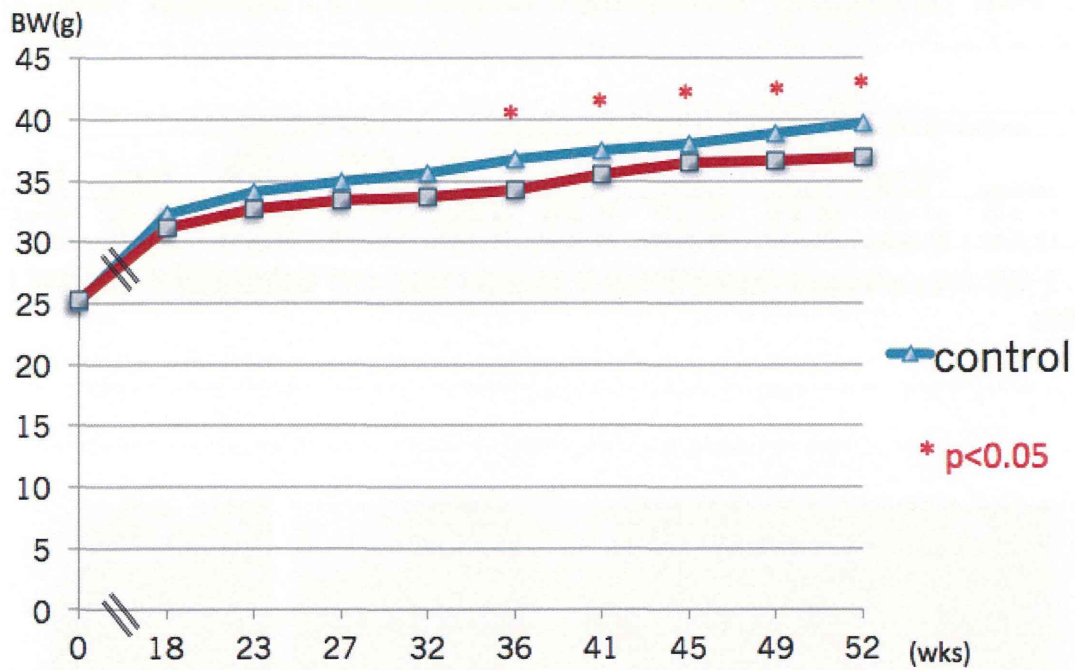


図 9. T-CNT (10 μ g/mouse) 単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験の体重曲線

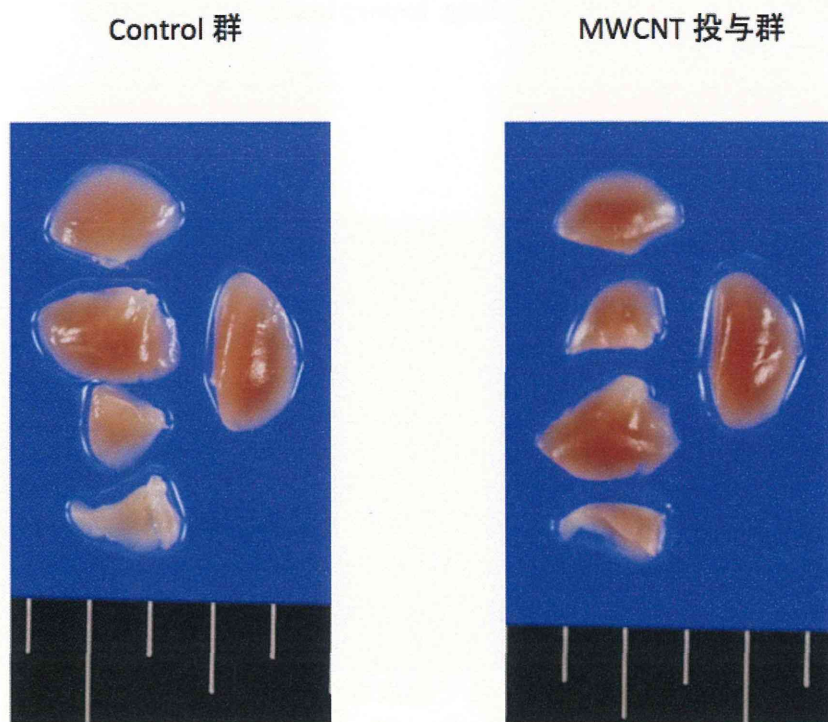


図 10. T-CNT (10 μ g/mouse) 単回気管内投与 52 週後のマウス肺マクロ像

Group	body weight	Liver weight		Lung weight		Kidney weight	
		absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight
control	39.68 ± 3.58	1.63 ± 0.16	0.041 ± 0.002	0.18 ± 0.03	0.005 ± 0.001	0.37 ± 0.03	0.009 ± 0.001
MWCNT	36.97 ± 2.40 *	1.62 ± 0.11	0.045 ± 0.003 *	0.17 ± 0.02	0.005 ± 0.001	0.37 ± 0.03	0.010 ± 0.001 *
	p=0.0083		p=0.0017	p=0.383			p=0.0260

図 1 1. T-CNT (10 μg/mouse) 単回気管内投与 52 週後の体重および臓器重量 (単位: g)

Group	No.	Lymphocyte infiltration		Neutrophil infiltration		Histopathological changes					
		peritracheal	in the spaces of alveoli	interstitial (wall)	in the spaces of alveoli	Pulmonary edema	Pulmonary fibrosis	Alveolar macrophage aggregation	Focal granulomatous inflammation	Bronchial hyperplasia	Squamous metaplasia
Control	10	1.1 ± 0.9	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0
MWCNT	19	1.3 ± 1.0	0.1 ± 0.2	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.0 ± 0.0	0.1 ± 0.5	0.0 ± 0.0

図 1 2. T-CNT (10 μg/mouse) 単回気管内投与 52 週後の肺における病理組織学的所見および炎症性変化

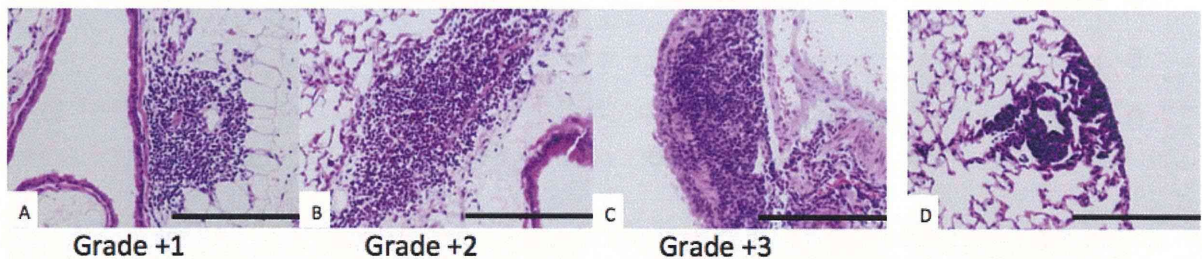


図 1 3. T-CNT (10 μg/mouse) 単回気管内投与 52 週後の肺に生じた気管支周囲リンパ球浸潤の炎症性 grade と T-CNT 投与群のうち 1 匹に生じた lung hyperplasia の病理組織像 (実測倍率 x40 : スケールバー 200 μm)

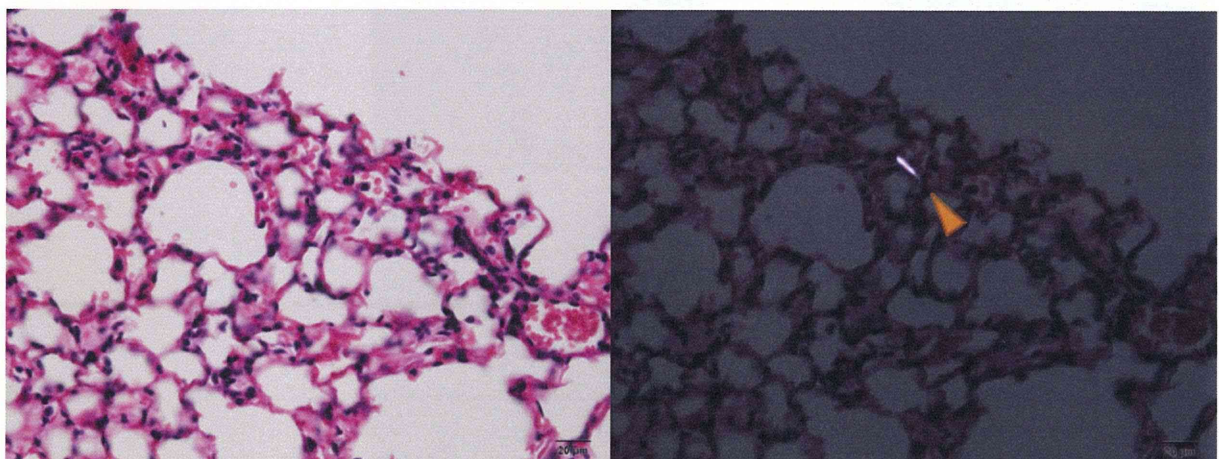


図 1 4. T-CNT (10 μg/mouse) 単回気管内投与群の 1 匹で観察された T-CNT (左:HE 標本、右:偏光顕微鏡観察) (いずれもスケールバー 20 μm)

超低用量T-CNTの単回気管内投与によるマウスを用いた長期毒性試験

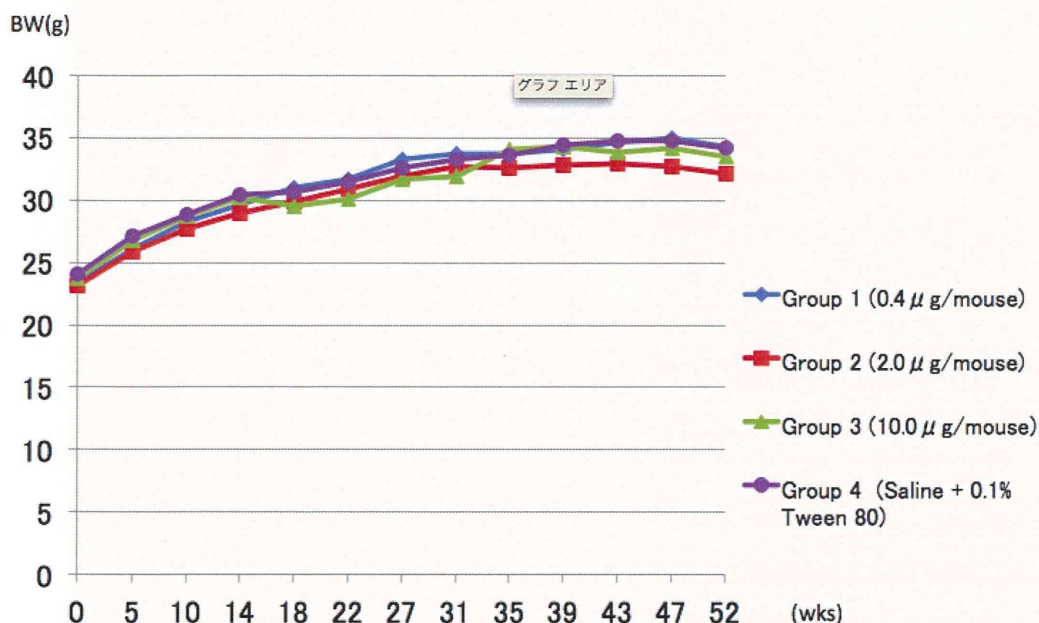


図 15. 超低用量 T-CNT の単回気管内投与による長期毒性試験の体重曲線

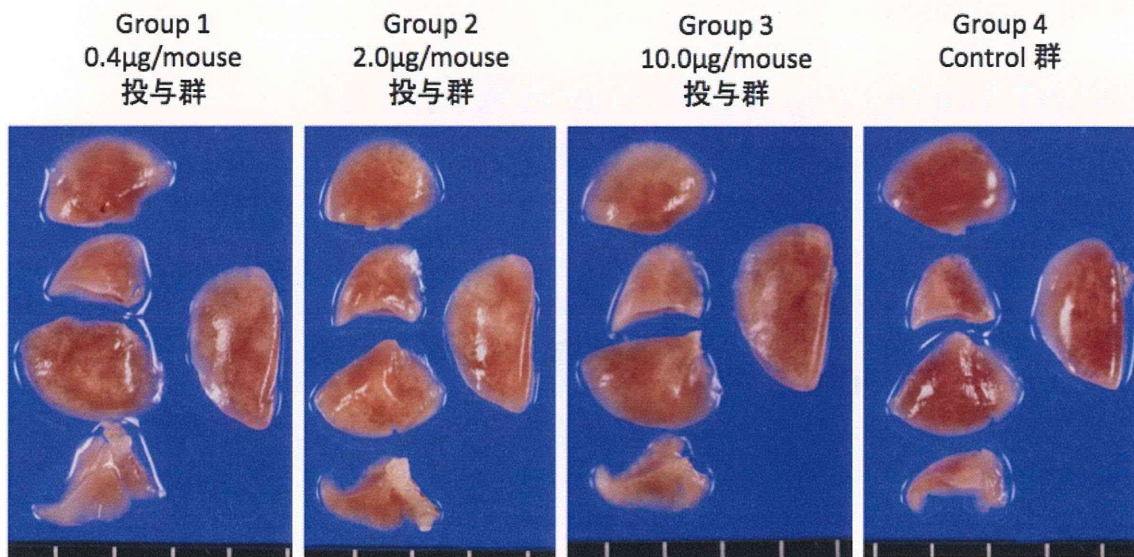


図 16. 超低用量 T-CNT の単回気管内投与 52 週後のマウス肺マクロ像

Group	Liver weight			Lung weight		Kidney weight	
	average weight	absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight
Group 1 (0.4 μg/mouse)	34.34 ± 2.04	1.29 ± 0.20	0.038 ± 0.006	0.25 ± 0.03	0.007 ± 0.001	0.40 ± 0.08	0.012 ± 0.002
Group 2 (2.0 μg/mouse)	32.10 ± 2.48	1.22 ± 0.13	0.039 ± 0.007	0.24 ± 0.03	0.007 ± 0.001	0.36 ± 0.07	0.011 ± 0.002
Group 3 (10.0 μg/mouse)	33.48 ± 1.44	1.51 ± 0.93	0.045 ± 0.028	0.26 ± 0.07	0.008 ± 0.002	0.40 ± 0.07	0.012 ± 0.002
Group 4 (Saline + 0.1% Tween 80)	34.13 ± 2.69	1.23 ± 0.17	0.036 ± 0.006	0.26 ± 0.05	0.008 ± 0.001	0.44 ± 0.07	0.013 ± 0.002

図 17. 超低用量 T-CNT 単回気管内投与と単回気管内投与 52 週後の体重および臓器重量 (単位: g)

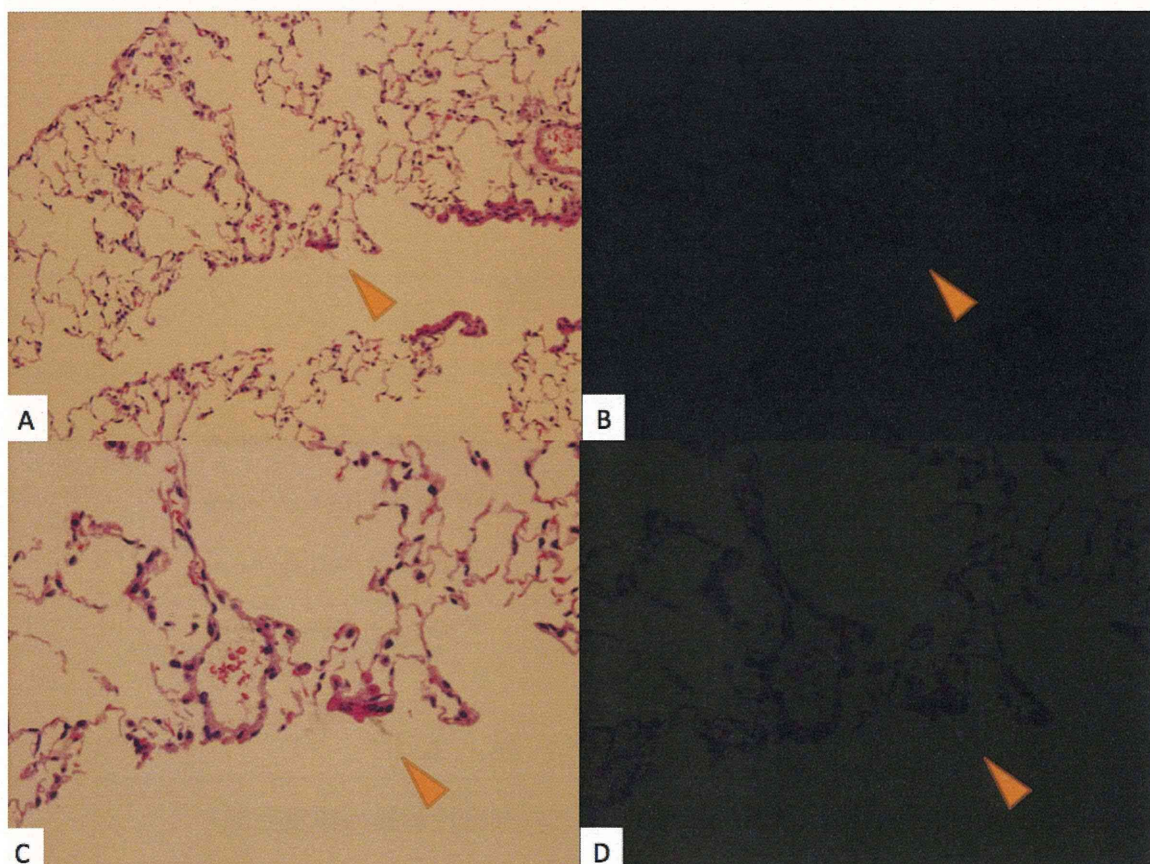


図 18. 超低用量 T-CNT 単回気管内投与単回気管内投与 52 週後で観察された T-CNT (左:HE 標本、右:偏光顕微鏡観察)

MWCNT-Taq (60 μ 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

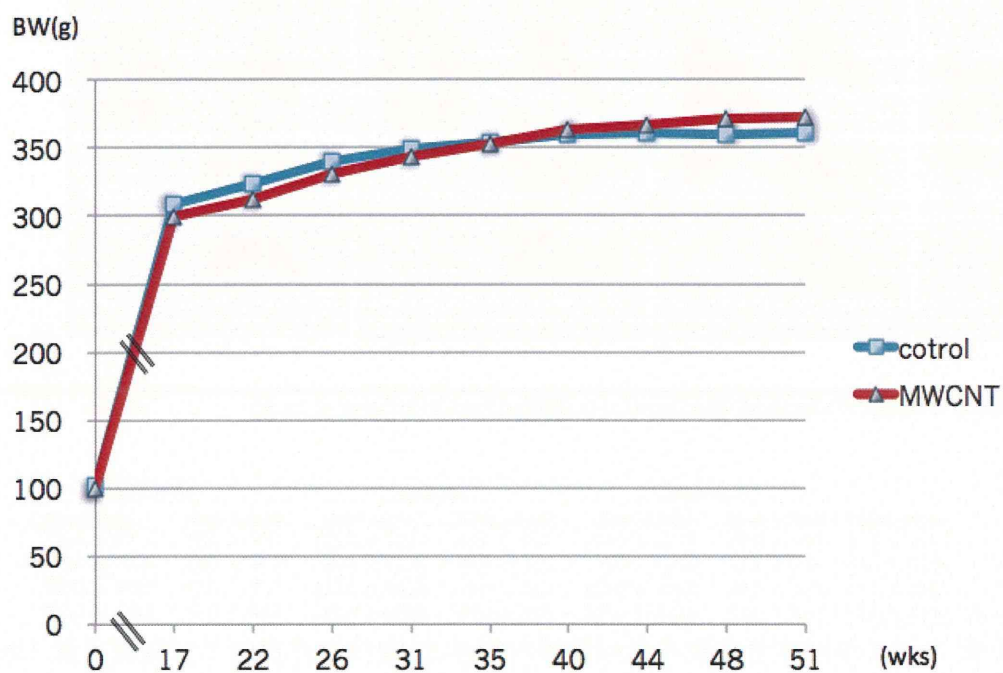


図 19. T-CNT (60 μ g/rat) 単回気管内投与によるラットを用いた長期毒性試験の体重曲線

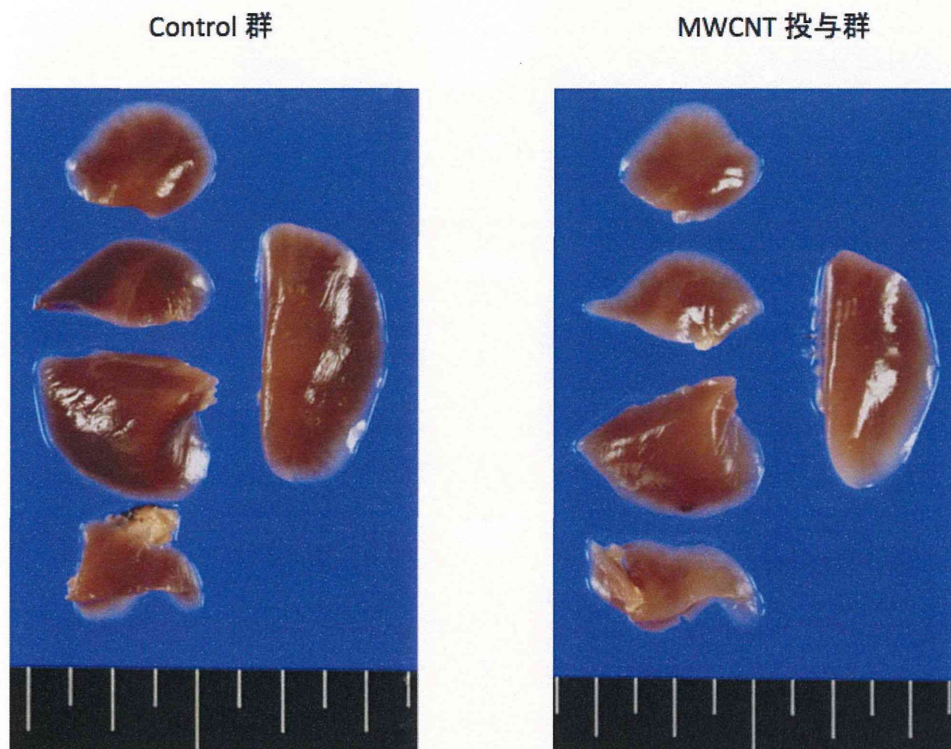


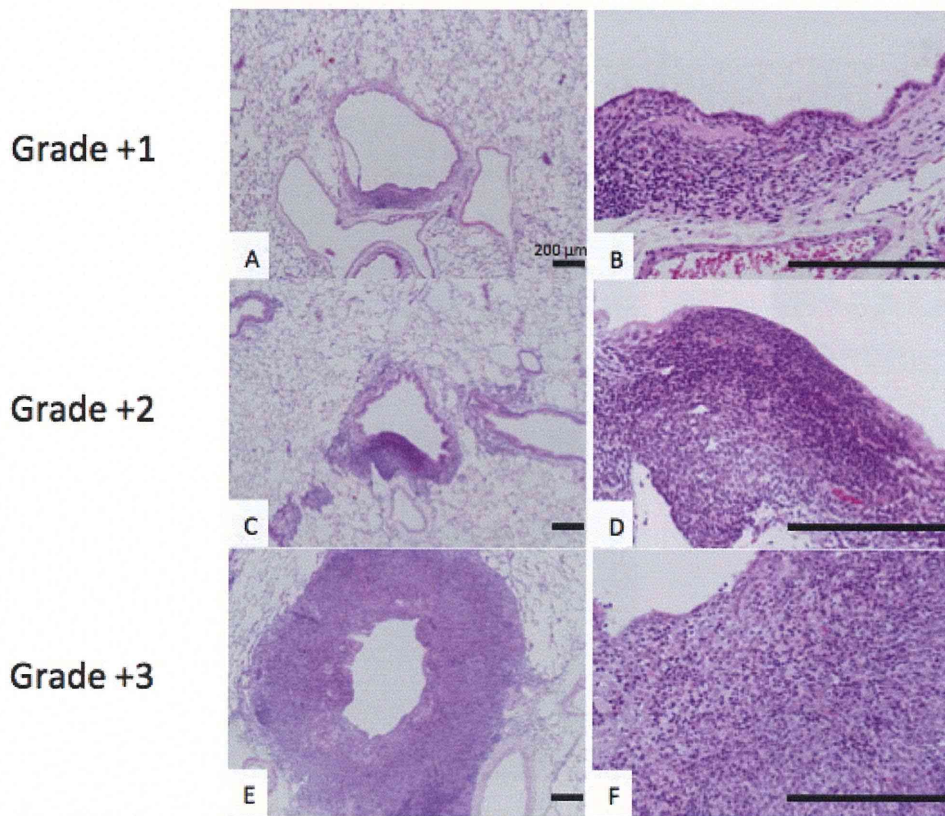
図 20. T-CNT (60 μ g/rat) 単回気管内投与単回気管内投与 52 週後のラット肺マクロ像

Group	body weight	Liver weight		Lung weight		Kidney weight	
		absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight	absolute weight	relative weight
control	360.63 \pm 28.52	9.62 \pm 0.93	0.027 \pm 0.001	2.17 \pm 0.60	0.006 \pm 0.002	2.01 \pm 0.11	0.006 \pm 0.000
MWCNT	372.74 \pm 24.31	9.83 \pm 0.89	0.026 \pm 0.001	1.70 \pm 0.47	0.005 \pm 0.001	2.01 \pm 0.13	0.005 \pm 0.000*
				p = 0.03	P = 0.02	p=0.502	P=0.0472

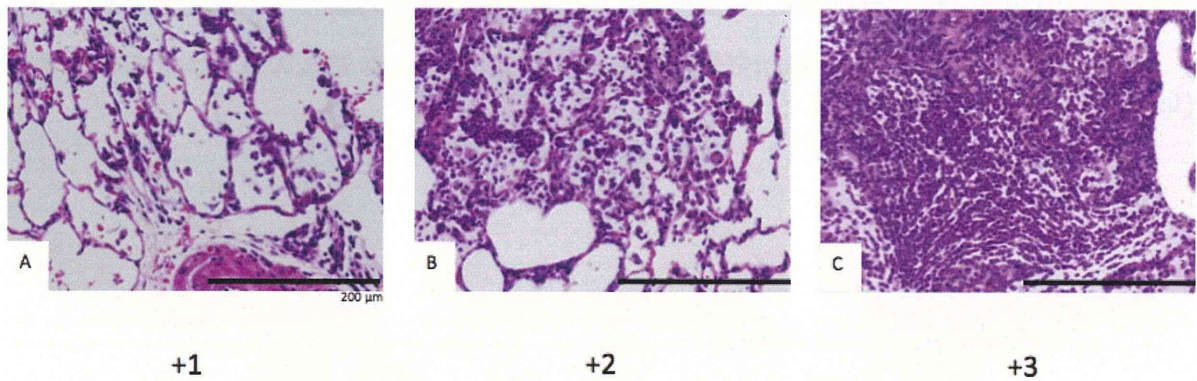
図 21. T-CNT (60 μ g/rat) 単回気管内投与単回気管内投与 52 週後の体重および臓器重量 (単位: g)

Group	No.	Lymphocyte infiltration		Neutrophil infiltration			Histopathological changes				
		peritracheal	in the spaces of alveoli	interstitial (wall)	in the spaces of alveoli	Pulmonary edema	Pulmonary fibrosis	Alveolar macrophage aggregation	Focal granulomatous inflammation	Bronchial hyperplasia	Squamous metaplasia
Control	9	2.6 \pm 0.9	0.4 \pm 0.8	0.8 \pm 0.4	0.8 \pm 0.7	0.2 \pm 0.4	0.6 \pm 0.5	1.2 \pm 1.1	2.1 \pm 2.5	2.6 \pm 2.0	0.0 \pm 0.0
MWCNT	20	2.5 \pm 0.8	1.1 \pm 0.6	1.0 \pm 0.8	0.9 \pm 0.8	0.4 \pm 0.7	0.8 \pm 0.6	1.2 \pm 1.2	2.8 \pm 3.8	4.8 \pm 4.5	0.0 \pm 0.0

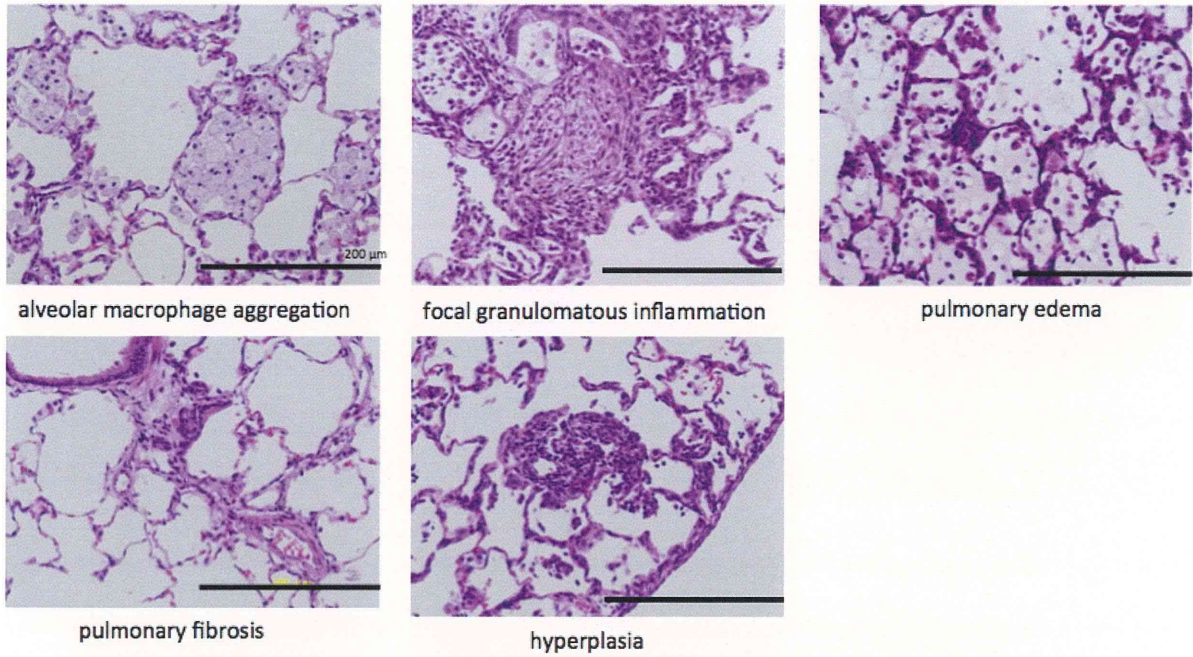
図 22. T-CNT (60 μ g/rat) 単回気管内投与 52 週後の肺における病理組織学的所見および炎症性変化



Peribronchial lymphocyte infiltrations Inflammation scores of lung lesions



Alveolar neutrophil infiltrations Inflammation scores of lung lesions



Histopathological findings of lung lesions

図 2 3. T-CNT (60 μ g/rat) 単回気管内投与 52 週後の肺に生じた気管支周囲リンパ球浸潤や好中球浸潤の grade と炎症に伴う病理組織的变化 (いずれも実測倍率 $\times 40$: スケールバー 200 μ m)

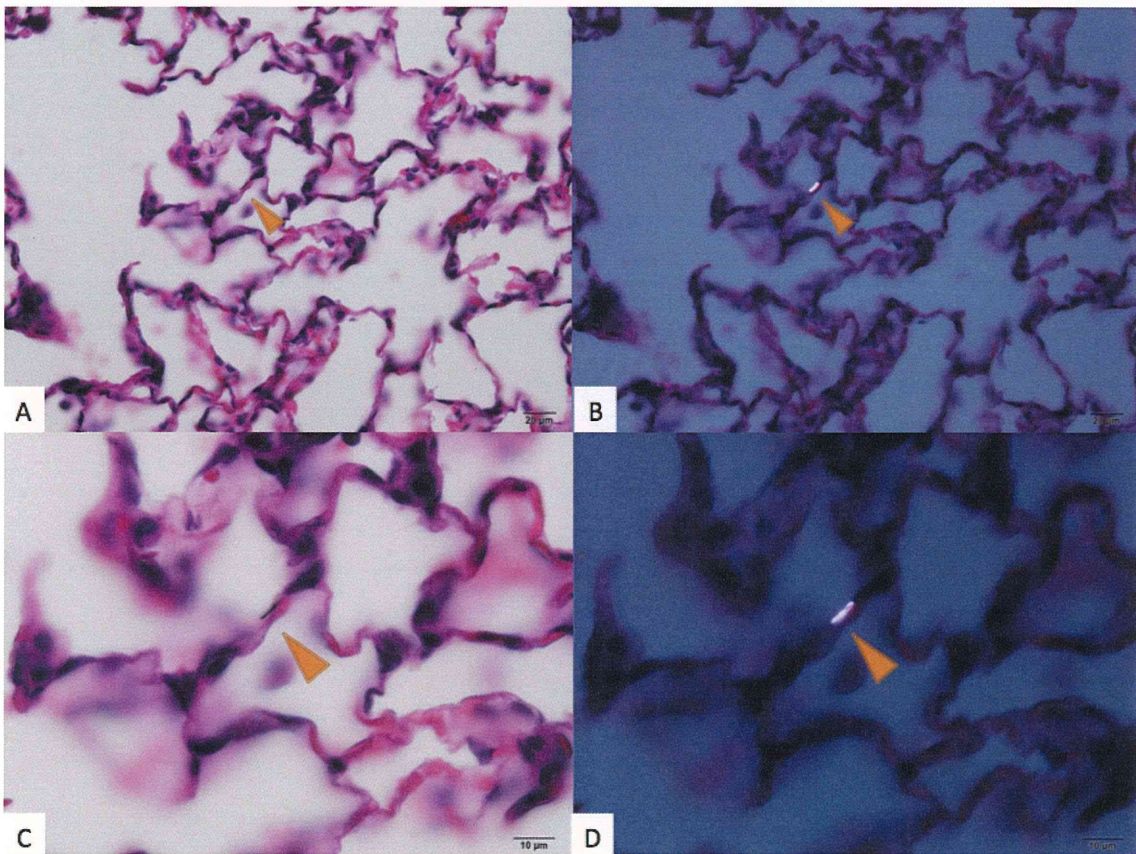


図 2 4. T-CNT (60 μ g/rat) T-CNT (10 μ g/mouse) 単回気管内投与群で観察された T-CNT (左: HE 標本、右: 偏光顕微鏡観察) (スケールバー AB: 10 μ m, CD: 20 μ m)

平成23-25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 「ナノマテリアルの全身暴露吸入方法に関する研究」

研究分担者 小川幸男 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
研究協力者 生田達也 柴田科学株式会社
研究協力者 鶴田祐吾 柴田科学株式会社

研究要旨

本分担研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアルの毒性評価を人ヒトで想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入により実施することにある。ナノマテリアルの全身暴露吸入が小型実験動物に対して実施可能な装置を開発し、野生型及び p53+/-マウスを用いて全身暴露吸入試験を実施した。先行研究[H20-化学一般-006]の判断の下、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 (MWCNT) を対象として、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 National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH) が考案した「音響式ダスト発生装置」を導入し、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 MWCNT (MWNT-7、三井) 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) の最適化を行い、4 時間の暴露時間、 2.0×10^5 cpm を目標濃度とした条件において、約 0.3 mg/m^3 の質量濃度が得られた。この条件でマウスに単回暴露を行い、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、本研究班では検体そのものの分散性を高める方法の開発が行われた。すなわち、凝集体・凝固体を除去し分散性の高い検体を得られる Taquann 法が開発された。本分担研究では、H23 ~H24 年度にかけて Taquann 法処理検体 (T-CNT) を音響式ダスト発生装置による気相への分散する方法を検討したが、音響エネルギーによる挙動が原末の MWCNT (U-CNT) とは異なりダスト発生量が少なく十分なダスト濃度を保つことが出来なかった。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、H24 年度にカートリッジ直噴式ダスト発生装置を開発した。暴露条件の検討を行い、2 時間の暴露条件を確立して 5 日間の反復全身暴露吸入による性能評価試験を実施した。相対濃度は、 $8.3 \sim 23.0 \times 10^5$ 個/L/min、質量濃度は $1.28 \sim 3.46 \text{ mg/m}^3$ であった。H25 年度は、p53+/-マウスを用い、1 日 2 時間、週 1 回、5 週間実施の反復全身暴露吸入による慢性影響評価試験を、対照群、低用量群、高用量群の 3 群で実施した。2 時間の相対濃度の平均値は、低用量群； $8.2 \pm 2.7 \times 10^5$ 個/L/min、高用量群； $19.2 \pm 4.0 \times 10^5$ 個/L/min であった。質量濃度は、低用量群 $1.19 \pm 0.16 \text{ mg/m}^3$ 、高用量群 $2.52 \pm 0.35 \text{ mg/m}^3$ であった。相対濃度と質量濃度には