



図 13 肺から抽出した MWCNT の走査型電子顕微鏡像

(a) 肺を 5%KOH で溶解して遠心分離 (20,000×g, 1 時間) して MWCNT を回収し、100uL の TritonX (0.1%) に懸濁後、1μL をフィルターに展開し、SEM で観察し繊維数を数えた。(b) 残渣が多く MWCNT 繊維の観察に障害となる。残渣は鉄と考えられ、肺組織の脱気、窒素雰囲気中での調製、溶解液にアスコルビン酸と EDTA・2Na を添加することで除去できた。Scale bars 10 μm. Taquahashi et al., JTS, 2013;38(4):619-28

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 「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/6J 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対象にパスウェー解析等を行った結果、1 及び 3 日目に免疫応答に関連する遺伝子群が増加し、特に暴露 1 日目に白血球血管外遊走シグナルが、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 シグナルがそれぞれ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/6J 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。MWCNT の暴露条件を表 1 に示す。

表 1. MWCNT の吸入暴露条件

相対濃度設定値:	200000 cpm/2.83L/min (70671 cpm/L/min)
粉塵発生装置からの流量:	2L/min
音響条件:	基底周波数:20Hz 最大周波数:30Hz 周波数の変化周期:10 秒 電圧ボリューム開度:1/2(約 1.5V)
PID:	P;0.481、I;16.3sec、D;2.42sec
暴露時間:	4時間(9:00~13:00)

暴露チャンバーは 40 L/min の流量で換気した。暴露チャンバー内の MWCNT の濃度のモニタリングは、相対濃度(count per minute; cpm)と質量濃度(mg/m³)を並行して行った。相対濃度は暴露チャンバー内のエアロゾルを 0.1cf/min(2.83 L/min)の流量で吸引してパーティクルカウンター(OPC-110GT、柴田科学)で測定した。この情報は音響式ダスト発生装置の制御部に入力して濃度制御のフィードバック制御に使用した。質量濃度測定は 10 L/min の流量で暴露チャンバー内のエアロゾルを吸引して MOUDI (Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor、Model 125 NanoMOUDI、KANOMAX)で測定した。暴露チャンバー内の目標とする相対濃度は 200,000 cpmとした。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

吸入暴露装置内の MWCNT 量の測定結果を表 2 及び図 1 に示す。2 回の暴露ともほぼ MWCNT の目標濃度が達成された。

表2 吸入暴露時のMWCNT量測定結果

1回目	
重量濃度:	274.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
平均相対濃度:	186,228 cpm/2.83L/min (65,805 cpm/L/min)
k値:	4.2 pg/cpm/ m^3
2回目	
重量濃度:	224.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$
平均相対濃度:	191,403 cpm/2.83L/min (67,634 cpm/L/min)
k値:	3.3 pg/cpm/ m^3

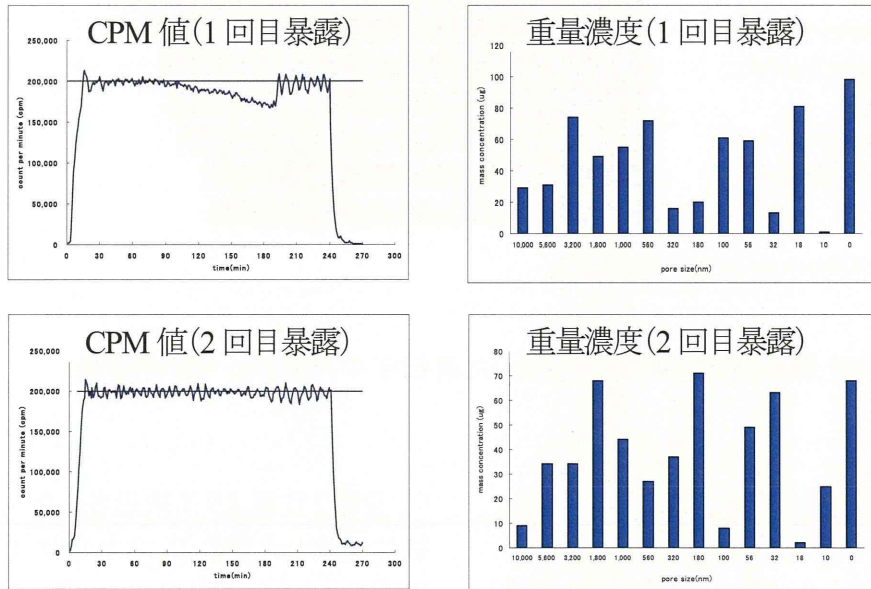


図1.吸入暴露時のMWCNT量の測定結果

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行った。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。これら遺

伝子を対象に Ingenuity Pathway Analysis によるパスウェイ解析を行った結果、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 2)。

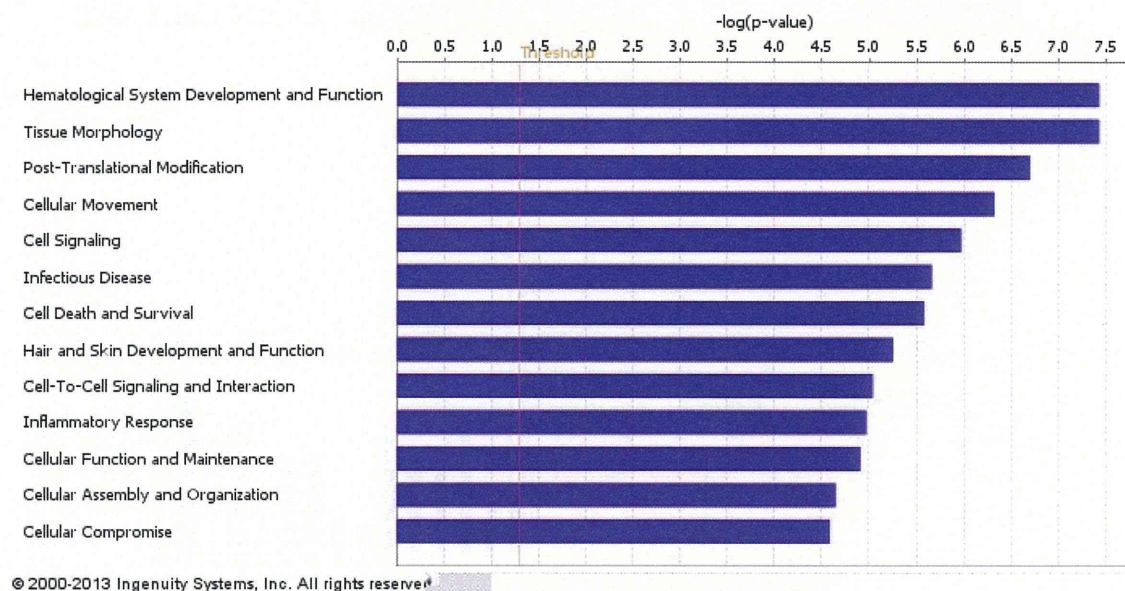


図 2. MWCNT 吸入暴露1日後に増加した遺伝子のパスウェイ解析結果

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 3 に示した。抽出された系としては、t-lymphocytes、leukocyte、cell movement、cell death、phagocytosis など、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。また、パスウェイ解析の結果、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

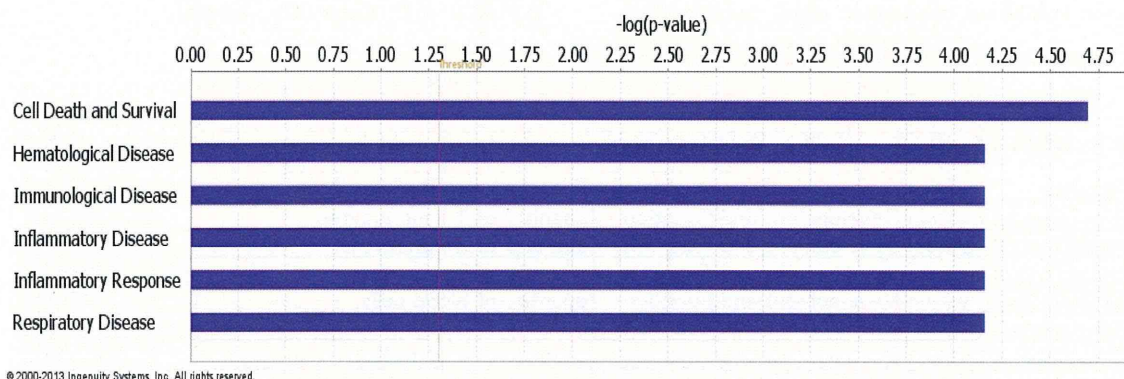
り、暴露 1 日後よりは抽出された category 数は減少した(図 3)。これらの Category 内の Function Annotation で p 値を低いものを同様にリストアップし、表 4 に示した。抽出された系としては、apoptosis of tumor cell line、allergic pulmonary eosinophilia (表 4 では重複して抽出された)などで、細胞死・アポトーシス系や免疫反応に関連する系の増加が注目された。7 日目の増加遺伝子では Lipid Metabolism、Small Molecule Biochemistry などの脂質代謝系の Category が抽出された(図 4)。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 5 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 3. 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

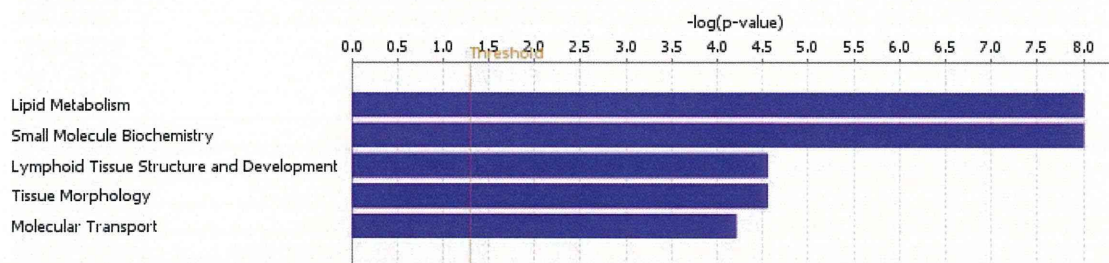


© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 3. 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 4. 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.

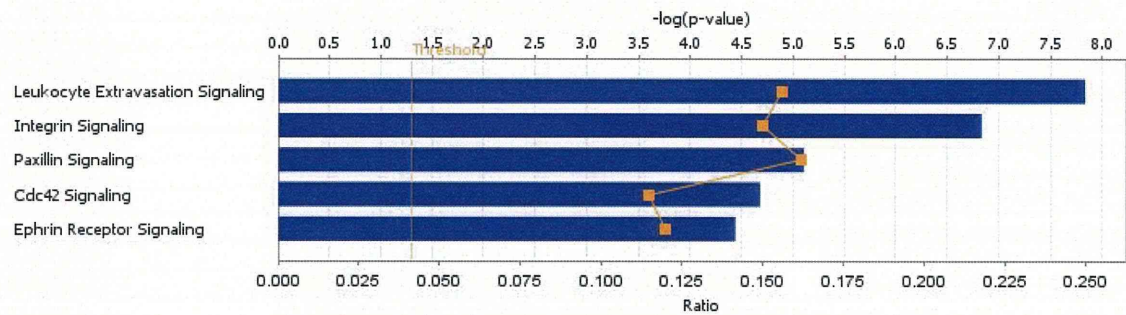
図 4. MWCNT 吸入暴露7日後に増加した遺伝子のパスウェー解析結果

表 5. 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

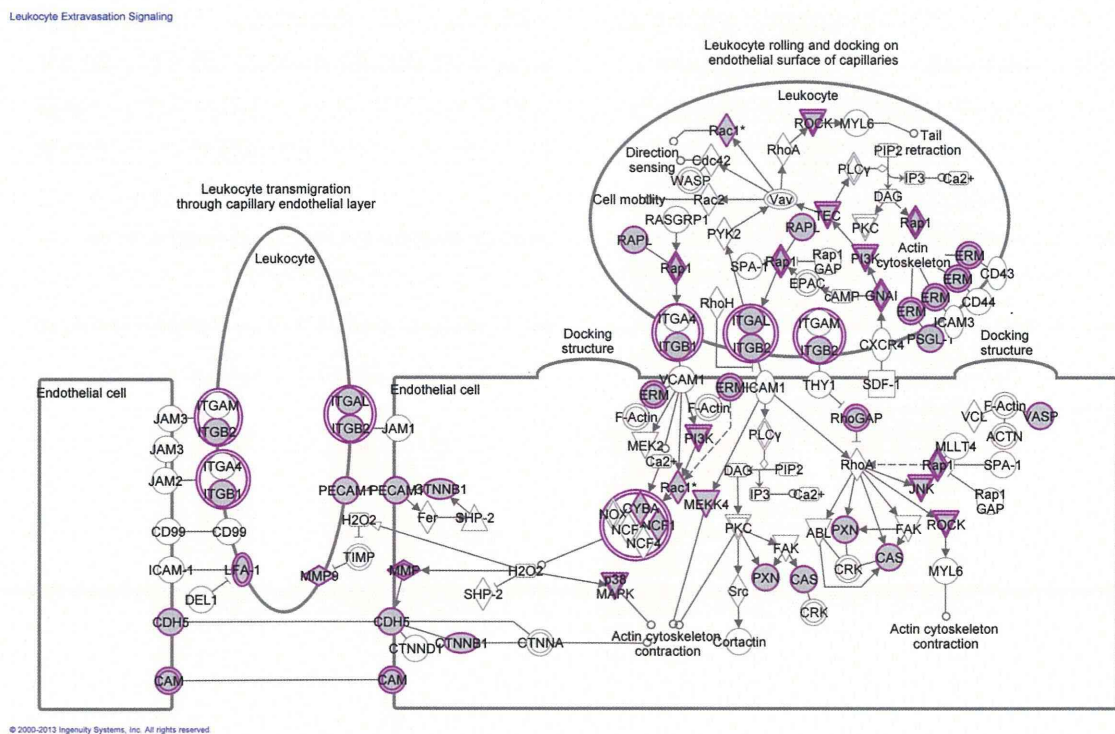
次に、Ingenuity Pathway Analysis を用いた「既知のパスウェー」を対象とした解析を実施した。MWCNT 暴露 1 日後に増加した遺伝子を解析した結果、leukocyte extravasation signaling、integrin signaling、paxillin signaling、cdc42 signaling、ephrin receptor signaling 等が Fisher's extract test で有意に抽出された(図 5)。これらは白血球血管外遊走、細胞移動、接着に関与するもので上記の解析で抽出された免疫応答に関与するシグナルと関連すると考えられた。さらに個々のパスウェーを図 6-10 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 暴露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 が有意に抽出された(図 11)。カベオラ依存エンドサイトーシスのパスウェーを図 12 に示した。このことから暴露 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)。



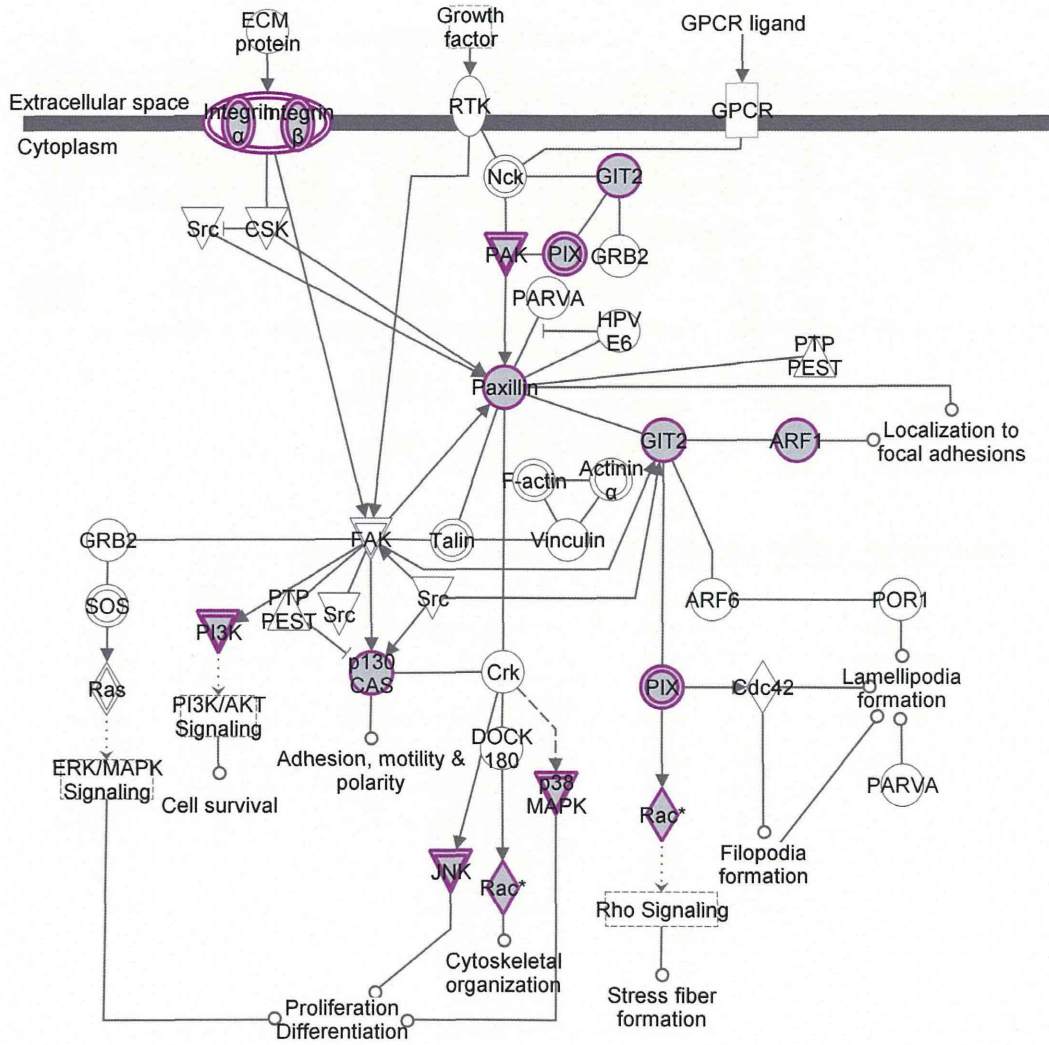
© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 5. 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



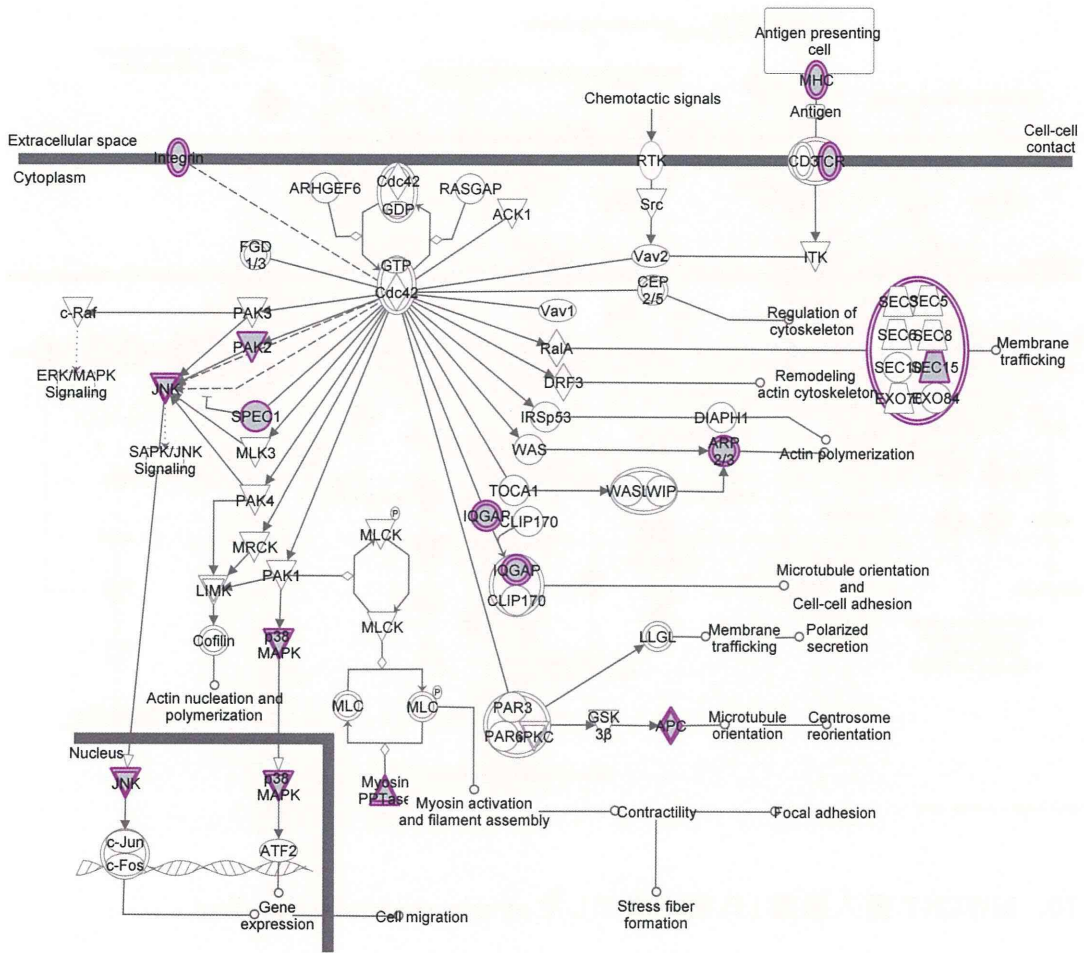
© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 6. 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)



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

図 8. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した paxillin signaling



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

図 9. MWCNT 吸入暴露 1 日後に増加した cdc42 signaling

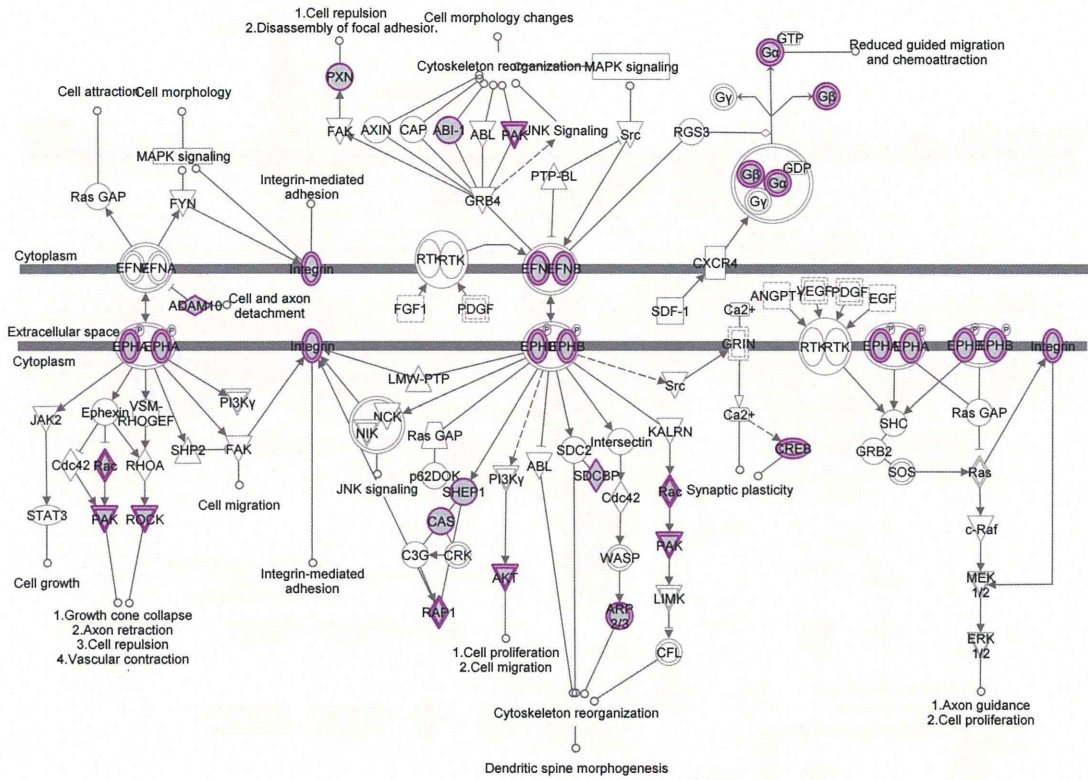


図 10. MWCNT 吸入暴露1日後に増加した ephrin receptor signaling

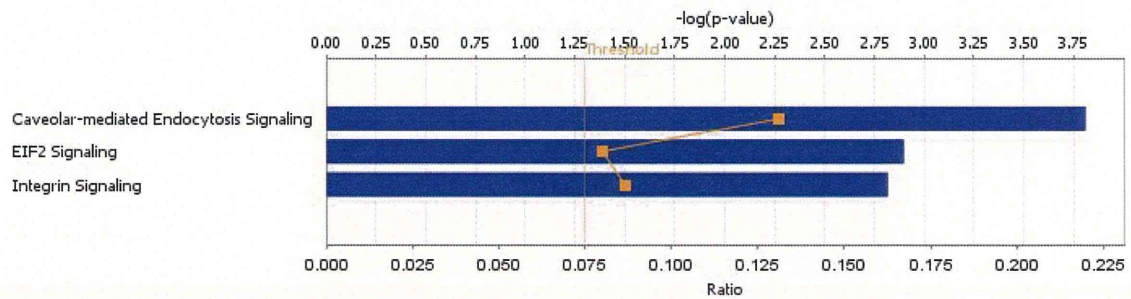
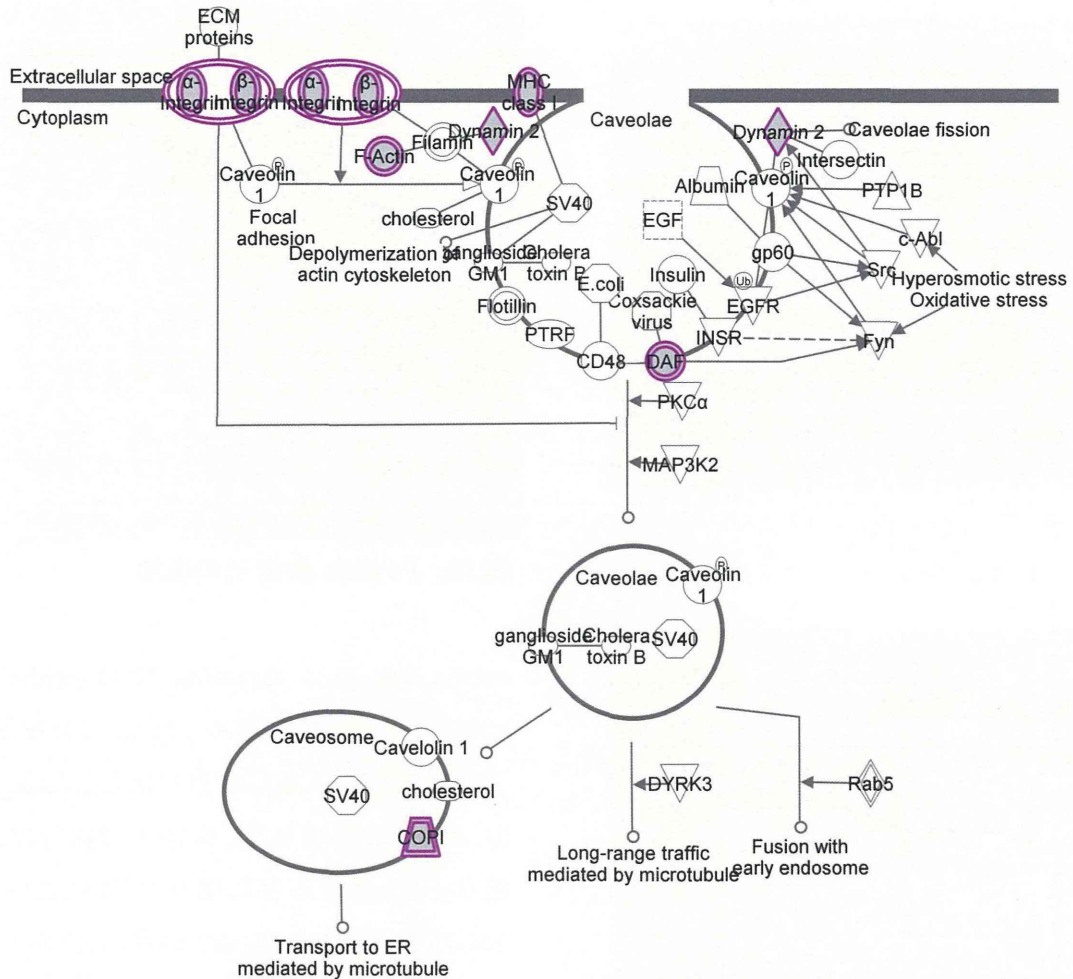


図 11. MWCNT 吸入暴露3日後に増加した遺伝子と関連する既知のパスウェー



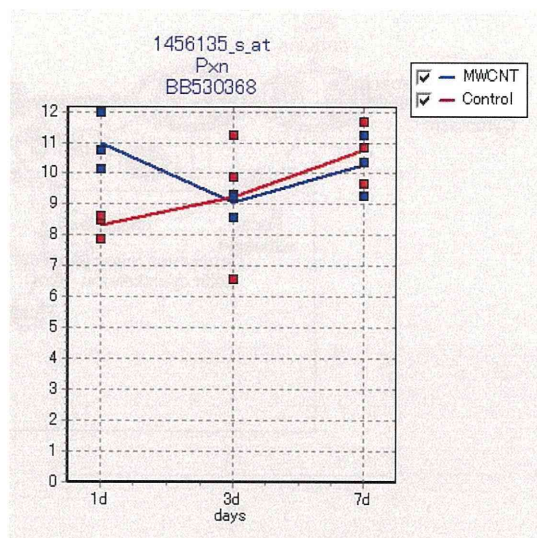
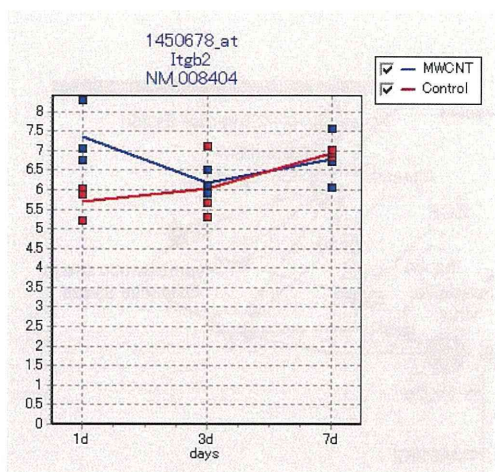
© 2000-2013 Ingenuity Systems, Inc. All rights reserved.

図 12. 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 13)。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)

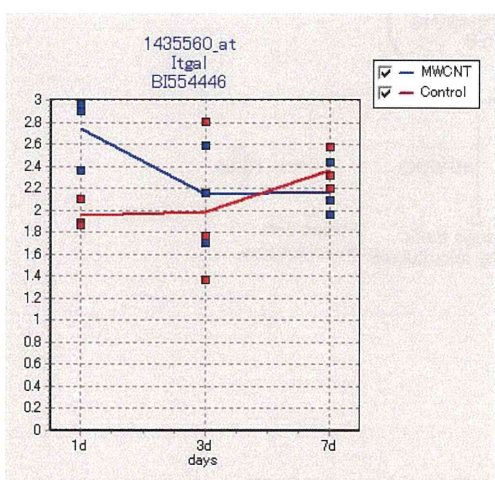


図14. Paxillin 遺伝子の増加

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15)。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13. 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14)。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。

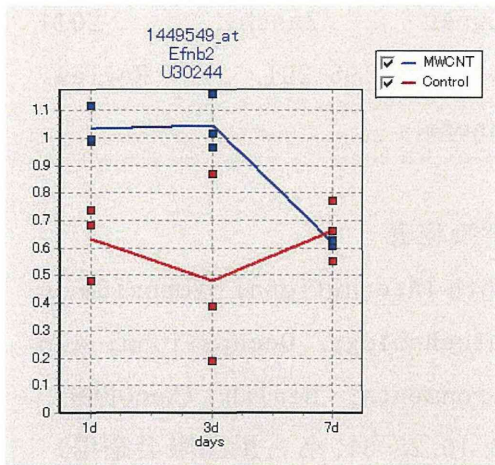


図15. ephrin B2 遺伝子の発現増加

MWCNT 暴露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16)。以上、パスウェー解析の結果、暴露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、単回吸入暴露し、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。

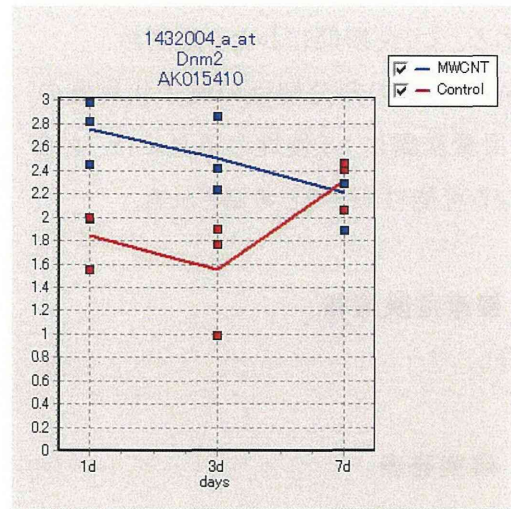


図16. Dynamin2 遺伝子の発現増加

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えられる。

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 38, 619-628, 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.

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

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

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

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)
In vivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system

Koichi Yamada, Akihiko Iwasa,
Tomoyuki Kondo, Mie Kurosawa,
Rieko Arakaki, Akiko Yamada,
Yasusei Kudo, Yuhji Taquahashi,
Atsuya Takagi, Jun Kanno, Naozumi
Ishimaru

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

「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

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)をヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した投与濃度で雄性 C57BL/6J マウスに気管内投与して亜急性の生体影響を調べた。被験物質にはMWCNT 原体(MWNT-7, 三井)から高度に分散した多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を効率的に集めたMWCNT(T-CNT)を用いた。T-CNTをマウスに単回気管内投与した短期毒性試験で、気管支肺胞洗浄液の各種パラメータに、これまでMWCNTで報告されている $10\mu\text{g}/\text{匹}$ よりも低い $3.3\mu\text{g}/\text{匹}$ の用量で肺に影響が認められた。病理組織的検査では、マウスの肺に好中球、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、先行研究のMWNT 原体を単回気管内投与したラットの肺で認められた肺胞マクロファージによるMWCNTの貪食、肉芽腫や線維化の形成を特徴とする生体反応は認められなかった。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が適切なのか、MWCNTに対する肺の生体反応にみられた種差の原因について今後解明を進

める必要がある。T-CNT を気管内投与したマウスでの体内移行の研究では、全身諸臓器に肺からの T-CNT の移行が確認され、脳、腎臓及び肝臓にはマクロファージによる貪食を受けずに血流中に入ったと考えられる T-CNT が検出された。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。透過型電子顕微鏡を用いた検索で、通常の光学顕微鏡や偏光装置を利用した肺の検索では検出が困難なサイズと考えられる T-CNT の存在が肺胞マクロファージの細胞質中に確認され、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。