

A. 研究目的

研究班全体として、先行研究で国立医薬品食品衛生研究所内に設置されたマウス用全身吸入暴露設備を活用してヒトがMWCNTに暴露される条件下を想定した全身吸入暴露実験を行い、MWCNTが生体に及ぼす有害性情報を動物実験から分子生物学的研究までを網羅した研究体制で詳細な病態解析が企画された。本分担研究は急性から亜慢性の生体影響を光学顕微鏡による病理組織学的検索と透過型電子顕微鏡(TEM)による超微細形態学的検索を併用した研究を展開することを課題とした。今井田班として既存の吸入暴露実験装置を改造して評価に耐えうる全身吸入暴露実験の準備が整うまで期間に、下記A-1-(1), (2), (3), (4) 及びA-2-(1), (2), (3)の基盤研究と技術開発を行った。

A-1. 動物実験を用いたT-CNTによる生体影響の検索

吸入暴露試験に代わるスクリーニング法として利用されている気管内投与法によってT-CNTをマウスの肺内に入れ、投与後3ヶ月程度までの亜急性の毒性プロファイルを気管支肺胞洗浄液の細胞学的、生化学的検査と光学顕微鏡による病理組織学的検査によって把握を目的として、マウスへの気管内投与技術の確立から行った。

・ A-1-(1) マウスへの気管内投与技術の確立に係わる基盤研究の実施・・・初年次

マウスはラットよりも体が小さく、同一週齢でマウスの体重はラットの約十分の一であることから気管内投与もラットと比べて極めて困難である。本研究班では、遺伝的な背景情報が豊富なC57BL/6J

マウスを用いることとされている。そこで、まず、基盤研究としてマウスへの気管内投与技術の確立と、マウスに気管内する検体投与液の量を決定した。

・ A-1-(2) T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握のためのマウスを用いた試験の実施

・・・初年次から二年次

これまでにMWCNTを用いた動物実験で報告されているよりも低濃度のMWCNT(T-CNT)をマウスに気管内投与して呼吸器に現れる短期の毒性影響を調べた。

気管支肺胞洗浄液を採取して生化学的検査、細胞学的検査を行う実験①(図1)と、肺の病理組織学的検査を行う実験②(図2)を実施した。

・ A-1-(3) T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い(確認実験)

・・・二年次

先行研究でMWCNT原体を気管内投与したラットにみられた肺の毒性と、A-1-(2)で行ったT-CNTを気管内投与したマウスでの肺毒性の様相が異なっていた。このこのため、T-CNTとMWCNT原体の違いによってラットとマウスの肺で呼吸器毒性の違いが現れたのか否かを、ラットを用いて調べた。気管支肺胞洗浄液を採取して生化学的検査、細胞学的検査を行う実験①(図3)と、肺の病理組織学的検査を行う実験②(図4)を実施した。

・ A-1-(4) 肺組織内侵入後のT-CNTの遠隔臓器への移行調査の実施・・・三年次

T-CNTをマウスに気管内投与した13週間試験で採取・保存した組織を用いて病理組織学的検索したもので、動物実験と

病理組織標本の作製は初年次から二年次にかけて実施。また、これに関連して遠隔臓器に移行したT-CNTの体内への侵入経路を調べる目的でT-CNTを気管内投与後1日と3日後のマウスの肺に対するTEM検索を実施した(A-2-(3)-②参照)。

A-2. 電子顕微鏡を用いたT-CNTによる生体影響の検索

生体内で安定であると考えられているMWCNTについては体内移行によるヒトの健康障害が懸念される。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光学顕微鏡による病理組織検査とTEMを用いた検索を連携させた研究を進めることに力を注ぎ、ナノマテリアルの生体影響検索に応用可能な透過型電子顕微鏡による検索方法の開発を行った。

・A-2-(1) ナノマテリアルの生体影響検索に有効なTEM検索方法の開発

・・・初年次から二年次

・A-2-(2) MWCNT原体(MWCNT-7)を気管内投与したラット肺のサンプルを用いた短期毒性病態の超微細形態学的検索

・・・初年次

・A-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM検索

・・・二年次から三年次

A-2-(1) ナノマテリアルの生体影響検索に有効なTEM検索方法の開発は、次の観点から初年次から二年次にかけて取り組んだ。臓器は様々な機能を持った細胞・組織が機能的・合目的に組み合わさって成り立っている。臓器内での外来異物や毒物に対する生体反応は、各臓器内

で特定の機能を有する細胞や組織が行い、これらの生体反応は当該する生体反応に関与する細胞や組織が分布する臓器内の特定の場所で行われる。TEMによる検索でも、この外来異物や毒物に反応する特定の場所「病変の座」に焦点を絞って検索することが重要となるが、従来のTEM検索では「病変の座」に焦点を絞った検索が不可能であった。そこで、本分担研究では、病理組織学的検査での腫瘍診断と遺伝子検索をブリッジするマイクロダイセクション法をイメージした検索方法を開発した。すなわち、病理組織検査で用いる光顕標本と同程度の大きさの、電顕標本としては超大型のセミシン切片(以下、超大型セミシン切片)を作製し、この超大型セミシン切片を光学顕微鏡で観察して病理組織学的に有意義な変化が認められた組織・細胞を切り出してTEM検索試料を作製することにより、光学顕微鏡で確認した「病変の座」に対して直接TEMによる観察が可能なる。本分担研究で、この方法の開発と応用を進めた。

A-2-(2) MWCNT原体(MWCNT-7)を気管内投与したラット肺のサンプルを用いた短期毒性病態の超微細形態学的検索は、超大型セミシン切片を光学顕微鏡で観察して把握した「病変の座」に対する直接TEMによる検索の有効性の確認も視野に入れて行った。

A-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM検索は、二年次にT-CNTを気管内投与後1日と3日のマウスからTEM検索を目的とした固定を施した肺を採取して保存。三年次に、この保存した肺を用いて超大型セミシン切片を作製して「肺病変の座」に絞り込んだTEM検索を行った。

B. 研究方法

MWCNTの毒性について、動物実験結果をヒトに外挿してリスク評価を行うためには分散性が確保されたMWCNTを用いてヒトが実際に暴露される低濃度域を想定した研究を行うことが重要である。このため研究班として国衛研の研究チームが開発した市販のMWCNTから高度に分散したMWCNTを効率的に集めることができる方法（Taquan法）によって処理したMWCNT（T-CNT）を検体として用いることとした。T-CNTの原体は市販のMWNT-7（（株）保土谷化学工業）を使用した。また、使用する動物の種と系統を国立衛研での遺伝子発現に関する実績があるC57BL/6Jマウスを用いた。

B-1. 動物実験を用いたT-CNTによる生体影響の検索

B-1- (1) マウスへの気管内投与技術の確立に係わる基盤研究の実施

B-1- (1)-① 気管内投与器具の開発、投与量の検討、投与状態の確認

マウスへの気管内投与では、ゾンデを無理なく気道に挿入して気道粘膜を傷つけることがなく、正確な量の検体を肺内に均一に投与できる気管内投与器具が必要となる。東日本大震災の影響でDIMS型経気道ゾンデ、Model M-1（（株）DIMS医科学研究所）等の市販品の入手が困難となったので、医療・実験用汎用器具の中からシリンジと投与ゾンデを組み合わせて使用することとした。シリンジとしてはガスクロ用ガスカートリッジ、ツベルクリン用ディスポーザブル1mmシリンジ等から、ツベルクリン用ディスポーザブル1mmシリンジを選択し、気管内投与用ゾンデは注射針の中からマウスの気管の内径に合わせたものを選択した。このシリンジとゾンデの組み合わせで、気管内投与器として所定の液量を正確に注入できることを、蒸留水30 μ lと50 μ lを気管内注入器のツベルクリン用シリンジ内に吸い上げ、その全量を電子天秤の上に載せた薬包紙に吹き出すことで実際に注入できる液量を検証した。

投与技術の習熟にはCr1j:CD1(ICR)マウス雌120匹を導入して繰り返し練習開始し、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、実験に用いるC57BL/6Jマウス雄24匹を用いて投与練習の仕上げをおこなった。

気管内投与方法は、先行研究（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）でラットの気管内投与に用いた方法をマウスに応用した。

以上によって、気管内投与のゾンデを無理なくマウスの気道に挿入して、検体を正確な量で肺内に均一に投与することが可能とする準備をおこなった。

B-1- (1)-② T-CNT懸濁液の調整

MWCNT原末を高度に分散処理したT-CNTを所定の用量となるように滅菌生理食塩水に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/匹、3.3 μ g/匹、1.1 μ g/匹の3段階（公比3）とし、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。なお、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。気管内投与直前に超音波によりT-CNT懸濁液を再度分散させ、投与するT-CNT懸濁液0.03mlの全量を、シリンジ内の投与懸濁液後方に充填した空気0.17mlとともに押し込むことによって肺内に注入することにした。

B-1- (1)-③ T-CNT懸濁液T-CNT懸濁液中のT-CNTの分散状態及び形状の確認

気管内投与に用いたT-CNT懸濁液をメンブランフィルターに滴下、白金蒸着した試料を走査型電子顕微鏡で観察、写真撮影してT-CNTの繊維長と幅を、それぞれ計測可能な繊維約500本を計測することとした。

B-1- (2) T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握のためのマウスを用いた試験の実施

雄性C57BL/6J マウスにT-CNT 1.1、3.3、10 μg を単回気管内投与を行い、気管支肺胞洗浄液を採取して生化学的検査、細胞学的検査を行う実験①(図1)と、肺の病理組織学的検査を行う実験②(図2)を実施した。

マウスは、生後11週齢で導入、1週間の検疫・順化の後、12週齢で群分けを行って実験に供試した。気管支肺胞洗浄液を採取する実験には134匹を導入して112匹を実験に供試し、病理組織検査を行う実験には96匹を導入して80匹を実験に供試した。供試動物の各群への割り当て(群分け)は、投与前日に行い、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。

動物の飼育はステンレス製金網ケージで個別飼育し、室温 $24\pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 $55\pm 5\%$ 、12時間点灯(8:00~20:00)の環境下で、固形飼料(CRF-1、オリエンタル酵母工業)と水道水(フィルターろ過した後、紫外線照射)を自由に摂取させて飼育した。一般状態の観察は毎日行い、体重及び摂餌量を週1回測定した。

気管内投与に用いるT-CNT懸濁液の調整は、Tween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水に設定濃度となる様、T-CNTを加え超音波を用いて懸濁しておこなった。T-CNT懸濁液は用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散させて使用した。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0.03ml/匹投与した。

気管内投与はイソフルランの吸入による麻酔下でステンレス製カニューレ(24G)を使用してMWCNT懸濁液を気管内に投与した。投与用量をT-CNT 0、1.1、3.3、10 μg /匹の4段階(公比3)とし、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。T-CNT 0 μg /匹投与群(対照群)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。気管内投与に際して、投与カニューレ(24G)

に装着したシリンジ内にMWCNT懸濁液とともに空気0.17mlを充填して置き、この空気をT-CNT懸濁液の後から肺内にピストンで押し込むことによってT-CNT懸濁液0.03mlの全量を注入した。投与濃度はT-CNTのマウス肺への影響として報告されている最も低い濃度を本実験の最高投与濃度とした。すなわち、D. W. Porter et al. (2010)の報告(文献2)で、C57BL/6J マウスの肺に10 μg /匹以上の群に毒性変化(BAL中のマクロファージの数、LDH、Albuminの有意な増加)が認められたことから、10 μg /匹を最高用量とし、中間用量を3.3 μg /匹、最低用量を1.1 μg /匹(公比3)とした。

B-1-(2)-① T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査

この試験は次項(B-1-(2)-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B-1-(2)-②の試験と共通の試験条件は前項(B-1-(2))に記した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)112匹を28匹ずつ4群に分け、投与用量をT-CNT 0、1.1、3.3、10 μg の4段階(公比3)とし、1匹当たり0.3mlを単回気管内投与した。T-CNT 0 μg /匹投与群(対照群)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。投与後1、3、7、28日に各群7匹の動物をネンブタール(製品名：ソムノペンチル、製造元：共立製薬株式会社)の20倍希釈液(生理食塩水、用事調整)を0.1 ml/10gbwの腹腔内投与による麻酔下で気管支肺胞洗浄液を採取して、生化学的検査(総蛋白、アルブミン、ALP、LDH)並びに細胞学的検査(総細胞数、マクロファージ・白血球分画)を行って肺毒性を調べた。

気管支肺胞洗浄液の採取は滅菌生理食塩水1mlを気管から自然落下で注入、注入した洗浄液で二度両肺を洗浄して回収した(洗浄液回収容器の液面を $\pm 25\text{cm}$ の高さで二度上下して洗浄)。採取

した気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査では、総細胞数をADVIA 120で計数、細胞分画は700回転/分、5分間遠心(55g)して収集、メイギムザ染色による塗沫標本作製して光学顕微鏡下で一匹につき600以上の細胞を分類して各細胞成分の比率を求めた。ADVIA 120で計数した1 μ l当たりの総細胞数に各細胞成分の比率を乗じて各細胞分類毎に1 μ l当たりの細胞数を求めた。生化学的検査の乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)、総蛋白、アルブミン量の計測は自動分析装置(日立7080型自動分析装置)で行った。動物は気管支肺胞洗浄液採取後にソムノペンチル麻酔下で腹大動脈より放血して安楽死させた。

B-1-(2)-② T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：病理組織学的検査

この試験は前項(B-1-(2)-①)の気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査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B-1-(2)-①の試験と共通の試験条件は前項(B-1-(2))に記した。

12週齢の雄性C57BL/6Jマウス(日本チャールスリバー)80匹を20匹ずつ4群に分け、各群にT-CNT 0、1.1、3.3、10 μ g/匹の用量で単回気管内投与した。T-CNT 0 μ g/匹投与群にはTween80を0.1%添加した滅菌生理食塩水0.03mlを投与した。投与後1、7、28、91日に各群5匹の動物をネンブタール(製品名：ソムノペンチル、製造元：共立製薬株式会社)の20倍希釈液(生理食塩水、用事調整)を0.1ml/10g bwの腹腔内投与による麻酔下で腹大動脈より放血して安楽死させて解剖した。肉眼的に臓器の異常を調べ、肺重量を測定、全動物について、皮膚、鼻腔、鼻咽頭、喉頭、気管、肺、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、膵臓、腎臓、膀胱、下垂体、甲状腺、上皮小体、副腎、精巣、精巣上体、精囊、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を摘出し、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で保存した。病理組織学的検査のために10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で保存した臓器から、肺と縦隔の肺関連リンパ節組織を切り出し、パラフィン包埋、薄切、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。

病理組織学的検査では、T-CNTの沈着の状態の確認と肺の病理組織学的検査を行った。T-CNTの沈着の状態の確認では、気管内に投与したT-CNTの肺内で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ため、組織中では黒色のT-CNT繊維とのコントラストが極めて強く、単繊維に分散したT-CNTであっても組織中に存在するものを通常のヘマトキシリン・エオジン染色標本を用いる場合よりも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T-CNT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-1-(3) T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い(確認実験)

この実験はT-CNTとWCNT原体の違いによってラットとマウスの肺で呼吸器毒性に違いが現れたのか否かを、T-CNTとMWCNT原末をラットに単回気管内して用いて調べた。雄性F344/DuCr1CrljラットにT-CNTとMWCNT原末を下記用量で単回気管内投与を行い、気管支肺胞洗浄液

を採取して生化学的検査、細胞学的検査を行う実験①（図3）と、肺の病理組織学的検査を行う実験②（図4）を実施した。

ラットへのT-CNTの気管内投与用量はB-1-(2)のC57BL/6Jマウスの試験で用いた用量（0、1.1、3.3、10 μ g/匹）をラットとマウスの肺の重量比6で補正した量のT-CNT（0、6.7、20、60 μ g/匹、公比3）とした。

MWCNT原末の投与量はT-CNT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ラットに単回気管内投与した結果、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。また、1匹当たりの投与容量は0.03ml/匹とした。

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）を生後12週齢で導入、1週間の検疫・馴化を経て、13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、被験物質懸濁液は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。

被験物質懸濁液の調製方法は次のとおり、T-CNT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、投与直前に超音波で再拡散させた。MWCNT原体は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。MWCNT原体懸濁液も用時調製とし、投与直前に超音波で再拡散させた。

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）。

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50匹（B-1-(3)-①生化学的、細胞学的検査）または75匹（B-1-(3)-②病理組織学的検査）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。

気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査を行う試験（B-1-(3)-①）では気管内投与後3日まで、病理組織学的検査を行う試験（B-1-(3)-②）では最長91日まで経過観察をして、解剖・採材を行った。

B-1-(3)-① T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い（確認実験）：気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査

この試験は次項（B-1-(3)-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B-1-(3)-②の試験と共通の試験条件は前項（B-1-(3)）に記した。

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、全体で50匹の動物を使用した。

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。

また、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-1-(3)-② T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い（確認実験）：病理組織学的検査

この試験は前項（B-1-(3)-①）の気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的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B-1-(3)-①の試験と共通の試験条件は前項（B-1-(3)）に記した。

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、3期の解剖期（気管内投与後7、28、91日）を設け、各解剖期に5匹、合計で各群15匹、全体で75匹の動物を使用した。

一般状態の詳細な観察は投与日（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（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。

予定された三つの解剖期（気管内投与後7、28、91日）にソムノペンチルを腹腔内注射による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。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。肉眼的に変化のみられた臓器・組織。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こととした。肺についてはシリウスレッドとマッソン・トリクローム染色標本を作製し、線維化病変を詳細に観察した。

また、解剖では、下記の全臓器を採取、10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で浸漬固定を行った。

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）

B-1-(4) 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（初年次に実施したB-1-(2)-②の病理組織標本（ヘマトキシリン・エオジン染色、ケルンエヒトロート染色）を利用して、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について簡易偏光装置を備えた光学顕微鏡を用いて検索し

た(試験デザインはB-1-(2)-②、図5 参照)。

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。このためT-CNTはマクロファージの細胞質内に複数の線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。

B-2. 電子顕微鏡を用いたT-CNTによる生体影響の検索

B-2-(1) ナノマテリアルの生体影響検索に有効なTEM検索方法の開発

外来異物・毒物に反応する特定の場所「病変の座」に焦点を絞ってTEM検索を行う方法として病理組織学的検査での腫瘍診断と遺伝子検索をブリッジするマイクロダイセクション法をイメージした検索方法の開発を進めた。これについては本分担研究と同一年度に実施された厚生労働科学研究補助金化学物質リスク研究事業、化学物質の経気道暴露による毒性評価の迅速化、定量化、高精度化に関する研究、「シックハウス症候群を考慮した低濃度暴露における肺病変の確認、及び中枢神経影響を包含する新評価体系の開発」(H23-化学一般-001)に参画した研究協力と基本的な部分が重複するため、本研究分担では、H23-化学一般-001での成果を利用して研究を進めた。すなわち、光学顕微鏡で超大型セミシン切片を観察して、病理組

織学的にTEM検索が必要と判断された組織・細胞そのものを超大型セミシン切片から切り出して、TEMによる観察を可能とするH23-化学一般-001で開発した方法を本分担研究に応用することによって研究を進めた。

B-2-(2) MWCNT原体(MWCNT-7)を気管内投与したラット肺のサンプルを用いた短期毒性病態の超微細形態学的検索

この研究は、先行研究に使用した材料は、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研究(福島班)で保存したMWCNT原体を気管内投与したラットの肺サンプルを用いた。

先行研究で採取したサンプルの概要: 0.1% Tween 80添加した生理食塩水に懸濁させたMWCNT原体 160 μ g/匹を13週齢のF344雄ラットに単回気管内投与し、投与後28日にソムノペンチル(Sodium pentobarbital)麻酔下で開腹、生理食塩水を肝門脈より注入、Glutaraldehyde 0.5%を添加したParaformaldehyde 2%溶液でラットの上半身を灌流した後、頸静脈から灌流液を排出した。灌流液が透明に変化した後、固定液に切り替え、灌流固定を行った。灌流固定後、胸腔内臓器を一括摘出して寒天ブロックに包埋。寒天ごと厚さ0.5-0.8mmの胸腔内臓器の全割断連続スライスを行った。この胸腔内臓器の全割断組織をOsmium tetroxideで後固定、エポン樹脂で平板包埋を行った。エポン樹脂包埋ブロックから肺組織を切り出して1~2 μ m厚のセミシン標本を作製、光学顕微鏡で電顕で検索するポイントを肺胞壁、腫脹/肥厚した肺胸膜、腫大した中皮細胞に絞り込んだ。セミシン標本から、絞り込んだポイント含む組織片約2mm \times 1mmを切り取って、エポン樹脂に再包埋、超薄切切片を電顕用試料とした。JEM-1400で観察、一部の試料は、H-800でフィルム写真を撮影した。

B-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM検索

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二年次に実施、以下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三年次に実施した。

T-CNT 10 μ g/匹投与した肺の材料の採取と固定・保存材料（二年次に実施）：

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 μ 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6）。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、初年次から二年次に実施したC57BL/6JマウスへのT-CNTの亜急性試験（A-2-(2)-②、B-2-(2)-②、C-2-(2)-②）で、肺に顕著な巣状炎症がみられた10 μ 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 μ 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（30 kGy- 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。

気管と肺の採取と保存：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、真空デシケータ内で肺内の残存空気を脱気、浸漬固定1日を行った（図7）。

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（三年次に実施）：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 $^{\circ}$ 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 \times 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8）。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9）。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片を作製（図10）。未染色で透過型電子顕微鏡による観察を行った。

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、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- (1) マウスへの気管内投与技術の確立に係わる基盤研究の実施

C-1- (1)-① 気管内投与器具の開発、投与量の検討、投与状態の確認

気管内投与用ゾンデは24G注射針の鋭利な先端部を切断、その断端を砥石で丸めたものをツベルクリン用ディスプレイ1ml シリンジに装着して使用した。作成した気管内投与用ゾンデはマウスの咽喉から気管内にスムーズに挿入できるように撓めて使用し、また先端部分にテフロン製留置カニューレの先端部分を装着した（図11）。これによってマウスに投与する際、無理なくゾンデを気道に挿入

することができ、気道粘膜を傷つける懸念が払拭された。この投与器具を用いることで、イソフルランによる吸入麻酔下に安定して気管内投与を実施できることを確認した。

この気管内投与器で所定の液量が注入できるかを検証した結果を図12に示した。これは蒸留水30 μ lと50 μ lをツベルクリン用シリンジに刻まれた目盛りによって目視で吸い上げたもので、30 μ lと50 μ lともに15回の測定結果は良好であり、実験に十分使用できる精度で気管内投与が可能であることが示された。実際にマウスに墨汁を投与して肺の状態を確認した結果、被験物質懸濁液の肺内注入量は0.05mlでも十分肺の各葉に均一に分布する（図13）が、時として気管内に注入した投与液が咽喉から溢れることもあり、0.03mlが適当であると判断した。その際、投与液全量をシリンジ内の被験物質懸濁液の後方に満たした空気0.17mlで後ろから肺内に押し込んで注入する方法を採用することにした。

C-1- (1)-② T-CNT懸濁液の調整

T-CNTはTween80を0.1%添加した滅菌生理食塩に懸濁させて超音波をかけることで良く分散し、目視、実体顕微鏡、走査型電子顕微鏡（図14）で懸濁液の分散状態が良好であることを確認した。

C-1- (1)-③ T-CNT懸濁液中のT-CNTの分散状態及び形状の確認

気管内投与に用いたT-CNT懸濁液を走査型電子顕微鏡像観察してT-CNTの繊維長と幅を、それぞれ計測可能な繊維約500本を計測した。その結果、繊維長（507本計測）は平均4.7 μ m（SD 3.38 μ m、図15）で10 μ m以上の繊維の占める割合は

6.9%であった。繊維径（500本計測）は平均70.7nm（SD 22.5nm、図16）であった。一例として走査電子顕微鏡像を示したT-CNTの繊維は繊維長4.75 μ m、繊維幅70.16nmであった（図17）。

C-1-(2) T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握

C-1-(2)-① T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査

体重推移は気管内投与後1日、3日及び4週に気管支肺胞洗浄液を採取した群、いずれも媒体対照群、T-CNT投与群ともに、気管内投与の影響を認めなかった（表1、2、3）。

気管支肺胞洗浄液の回収は、1日、3日及び4週に気管支肺胞洗浄液を採取した群、いずれも媒体対照群、T-CNT投与群ともに80-85%の回収率を示し良好であった（図18）、気道閉塞時に起きる気管支肺胞洗浄液の回収率低下はみられなかった。

気管支肺胞洗浄液の生化学検査結果では、総蛋白、アルブミンは10 μ g/匹投与群で投与後1日から4週まで有意に増加がみられ、その値は投与後1日が最も高く、投与後4週に向かって漸減した（図19、20）。3.3 μ g/匹投与群では総蛋白が投与後1日と3日で、アルブミンが投与後1日に有意な増加がみられた。総蛋白、アルブミンの変化は気管内投与直後の肺毛細血管の透過性の亢進を示唆した。

LDHは10 μ g/匹投与群で投与後1日から7週まで有意に増加がみられ、その値は投与後1日から漸増がみられるが、投与7日をピークとして投与後4週には対照群のレベルまで回復した（図21）。LDHの変化は動員された肺胞マクロファージの傷害を示唆するものと考えた。

気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査結果では、総細胞数（白血球総数）が投与後7日で有意に増加、投与4週には減少した（図22）。

マクロファージ数は投与後4週に若干の増加がみられたが、統計学的な有意差はなかった（図23）。

炎症性細胞（好中球）、白血球数は投与後1日から投与後7日に向かって増加し投与後7日にピークとなった後、投与後4週にはほぼ回復した（図24）。

C-1-(2)-② T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握：病理組織学的検査

体重推移は気管内投与後1日、1週及び4週後に気管支肺胞洗浄液を採取した群では、いずれも体重増加にT-CNT投与による影響を認めなかった（表4、5、6）。気管内投与後13週に解剖した群では、10 μ g/匹投与群で軽度な体重増加抑制がみられた（表7、図25）。

肺（両側）重量は、10 μ g/匹投与群で投与後1週に有意に増加したが、その後は対照群との間に差はなかった（表8）。

病理組織学的検査でT-CNT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。T-CNT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。気管支肺胞洗浄液の細胞学的検査結果（表9-10、図26~27）は、T-CNT 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-1-(3) T-CNTとMWCNT原体による呼吸

器毒性発現の違い（確認実験）

B-1-(3)-① T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い（確認実験）：気管支肺胞洗浄液の生化学的、細胞学的検査

T-CNT 投与群では各パラメーターとも、用量相関性に増加がみられた。MWCNT 原体は投与後 7 日に T-CNT 60 μ g 投与群よりも高値を示したが、投与後 28 日では T-CNT 60 μ g 投与群の方が高値であった（図 28-34）。このことは、T-CNT は MWCNT 原体よりも肺に対する影響が持続することが考えられた。

C-1-(3)-② T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い（確認実験）：病理組織学的検査

投与後 28 日までの体重と肺重量データを図 35-37 に示した。体重では MWCNT 原体 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 原体 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 T-CNT 60 μ g 投与群が MWCNT 原体 60 μ g 投与群の肺重量を上回っていた。このことは、T-CNT は MWCNT 原体よりも肺に対する影響が持続すること考えられた。病理組織学的検査は C-2-(3) 気管内投与した T-CNT の肺組織内侵入経路の解明を目的とした TEM 検査を優先して実施したため、本報告書とりまとめにまでには完結するに至らなかった。今後、病理組織学的検査を進めておく。

C-1-(4) 肺組織内侵入後の T-CNT の遠隔臓器への移行調査

T-CNT を単回期間内投与したマウスには、肺以外の臓器に T-CNT が認められた（図 38）。

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 10 μ g 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 39）。脾臓には、10 μ g 投与群は気管内投与後 7 日から移行が認められ、3.3 μ g 投与群では 28 日だけに移行が認められた（図 40）。肺関連リンパ節、脾臓とも 10 μ g 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 39、40）。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。脳への移行は投与後 7 日から認められ、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（図 41）。

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炎症などの組織反応を伴わないものであった（図 38）。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で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

42)。

C-2. 電子顕微鏡を用いたT-CNTによる生体影響の検索

C-2-(1) ナノマテリアルの生体影響検索に有効なTEM検索方法の開発

H23-化学-一般-001での技術開発が順調に進み、本研究分担「B-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM検索」は、その成果を利用して研究を進めた。

C-2-(2) MWCNT原体 (MWCNT-7) を気管内投与したラット肺のサンプルを用いた短期毒性病態の超微細形態学的検索

肺胞壁から胸膜に続く肺間質に微小肉芽と広汎な水腫が認められた。中皮細胞には水腫性変化が認められ (図43)、この中皮細胞変化は肺胸膜の基底膜下にみられる間質水腫に继发した変性性の変化と考えた。間質の水腫は肺胞壁内に移行したMWCNTやMWCNT貪食マクロファージによるリンパ流路の栓塞、鬱滞が原因と考えられた (酒井電子顕微鏡応用研究所との共同研究で実施)。

C-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM検索

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、TEM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、肺胞腔内に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44-46)、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、T-CNTを貪食したマクロファージが

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47)。肺組織に侵入したT-CNTは確認できなかった。

D. 考察

本分担研究では、マウス気管内投与器具の開発と投与技術を確立し、T-CNTの単回気管内投与によるマウスを用いた亜急性毒性を実施して以下の結果を得た。気管支肺胞洗浄液を採取して各パラメータを測定結果ではT-CNT (高度に分散処理した針状型MWCNT) ではこれまで報告されている $10\mu\text{g}/\text{匹}$ よりもさらに低い $3.3\mu\text{g}/\text{匹}$ で肺に影響が認められることが示された。病理組織的検索では好中球、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の投与が押し上げた可能性も考えられた。T-CNT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の福島班で行ったMWCNT原体をラット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の形成を特徴とする生体反応は認められなかった。このように、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。

肺組織内侵入後のT-CNTの遠隔臓器へ

の病理組織学的検査による移行調査本研究と吸入暴露された T-CNT の肺組織侵入経路の解明を目的とした TEM による検索で、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、腎臓及で確認された T-CNT はいずれも単繊維の状態で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、TEM 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

高度に分散した針状型の MWCNT はこれまで報告されている $10 \mu\text{g}/\text{匹}$ よりもさらに低い $3.3 \mu\text{g}/\text{匹}$ でマウスの肺に影響を及ぼすことが明らかになった。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、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ものか、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。T-CNT の生体内移行では肺内に吸引された T-CNT がマクロファージに貪食されずに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は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 の影響についても研究が必要であり、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. 論文発表

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.

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

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romo-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回発癌病理研究会、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

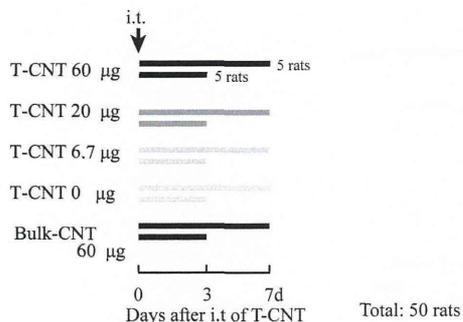
2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

B-1- (2) T-CNTの気管内投与による短期毒性のプロファイル把握のためのマウスを用いた試験



Animals: F344/DuCrIcrlj male rat, 13-week-old

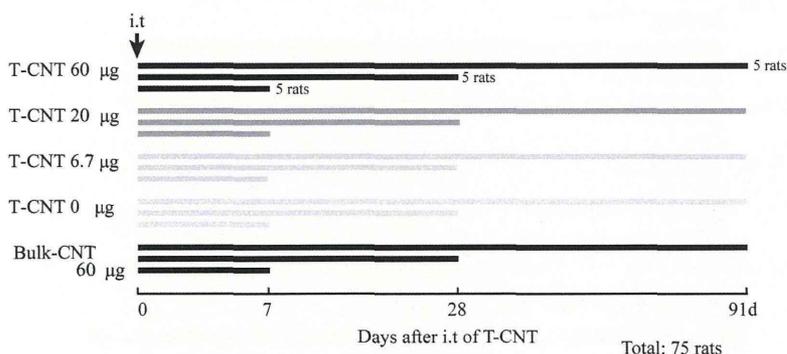
Intra tracheal instillation (i.t.): T-CNT suspensions were administrated at 13-week-old

T-CNT 60, 20, 6.7µg suspended with saline + 0.1% Tween 80

0.3ml of T-CNT suspension was administered each rat

Broncho alveolar lavage fluid (BALF) were collected at each termination under anesthesia

図 1 気管支肺胞洗浄液の細胞学及び生化学的検査のための 4 週間試験



Animals: F344/DuCrIcrlj male rat, 13-week-old

Intra tracheal instillation (i.t.): T-CNT/ Bulk-CNT suspensions were administrated at 13-week-old

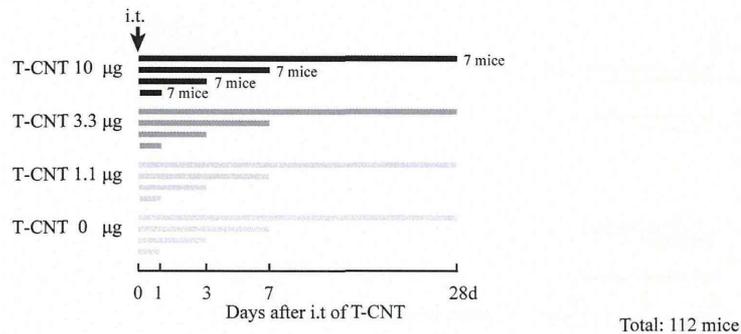
T-CNT 60, 20, 6.7µg suspended with saline + 0.1% Tween 80

0.3ml of T-CNT / Bulk-CNTsuspension was administered each rat

Organs were removed, measured lung weight, and fixed with neutral buffered 10% formalin for histopathology at each termination under anesthesia

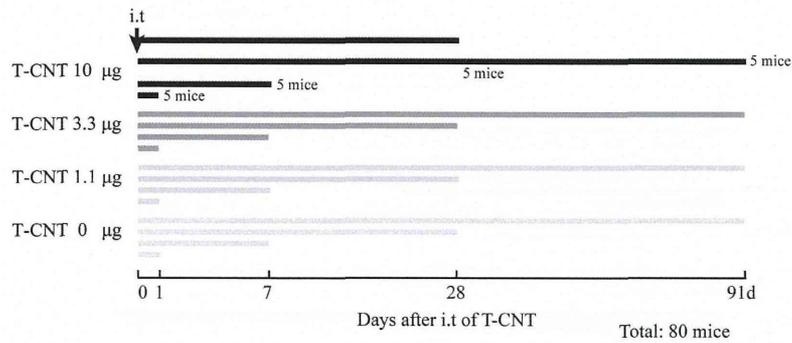
図 2 病理組織学的検査のための 13 週間試験

B-1- (3) T-CNTとMWCNT原体による呼吸器毒性発現の違い(確認実験)



Animals: C57BL/6J male mouse, 12-week-old
 Intra tracheal instillation (i.t.): T-CNT suspensions were administrated at 12-week-old
 T-CNT 10, 3.3, 1.1µg suspended with saline + 0.1% Tween 80
 0.03ml of T-CNT suspension was administered each mouse
 Broncho alveolar lavage fluid (BALF) were collected at each termination under anesthesia

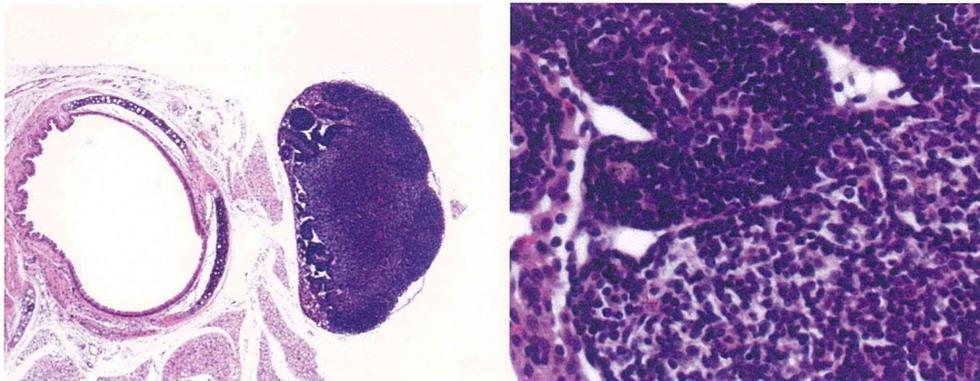
図 3 気管支肺胞洗浄液の細胞学及び生化学的検査のための 4 週間試験



Animals: C57BL/6J male mouse, 12-week-old
 Intra tracheal instillation (i.t.): T-CNT suspensions were administrated at 12-week-old
 T-CNT 10, 3.3, 1.1µg suspended with saline + 0.1% Tween 80
 0.03ml of T-CNT suspension was administered each mouse
 Organs were removed, measured lung weight, and fixed with neutral buffered 10% formalin for histopathology at each termination under anesthesia

図 4 病理組織学的検査のための 13 週間試験

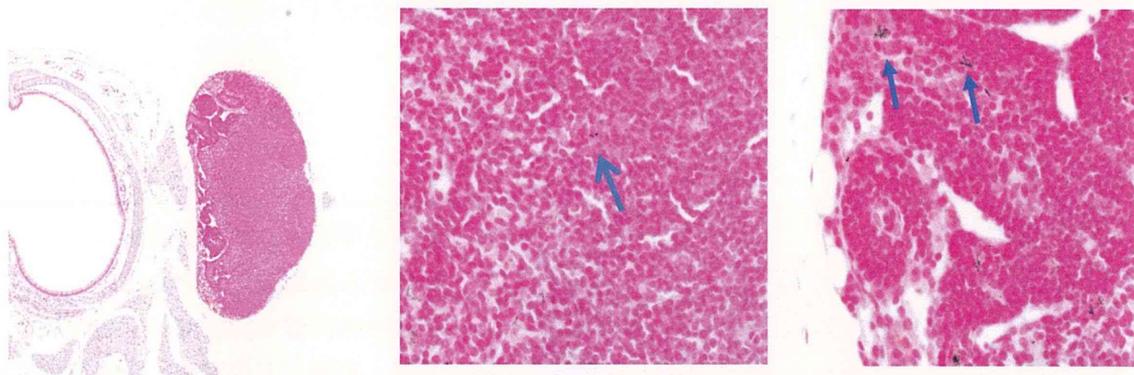
B-1-(4) 肺組織内侵入後の T-CNT の遠隔臓器への移行調査



肺関連リン節は気管に隣接したリンパ節を検索

黒色の T-CNT は、ヘマトキシリンで紫色に染まった組織と判別が困難

ケルンエヒトロート染色と偏光装置付顕微鏡を利用

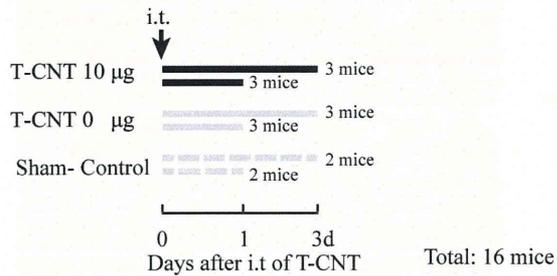


リンパ系組織の肺関連リンパ節と脾臓では T-CNT は主としてマクロファージに貪食された状態で認められる(右図矢印)

投与 91 日後の肺関連リンパ節(ケルンエヒトロート染色)

図 5 肺関連リンパ節に沈着した T-CNT の検出

**B-2-(3) 気管内投与したT-CNTの肺組織内侵入経路の解明を目的としたTEM
検索**



Animals: C57BL/6J male mouse, 13-week-old

Intra tracheal instillation (i.t.): T-CNT suspensions were administrated at 13-week-old

T-CNT 10 µg suspended with saline + 0.1% Tween 80

0.03ml of T-CNT suspension was administered each mouse

Lungs were removed and fixed with 2% paraformaldehyde (added 0.5% glutaraldehyde)

for TEM examination at each termination under anesthesia

**図 6 気管内投与した T-CNT の肺組織内侵入経路の解明
を目的とした TEM 検索**



- 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 7 肺組織の固定手順