

平成 25 年度厚生労働科学研究補助金（化学物質リスク研究事業）
「ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法の開発研究」
分担研究報告書

ナノマテリアルの体内動態及び発生毒性評価手法に関する研究

研究分担者：小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室 室長

研究協力者：久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室 主任研究官

研究要旨

近年、ナノマテリアルの曝露による生殖・発生毒性に関する研究報告例がみられるようになった。ナノマテリアルの慢性毒性影響を評価する上で、生殖・発生毒性に関する評価は重要であるが、作用機序や曝露後の体内動態についてはまだ解明されておらず、より詳細な検討が必要と考えられる。既存研究から示唆されるように、「生体内に曝露したナノマテリアルが細胞膜を通過し血流に乗って全身を循環し、胎盤や胎児に移行することによって生殖・発生毒性が誘発」しているのかどうかを検証するためには、ナノマテリアルの生殖・発生毒性が発現する条件と、体内動態を評価することが必要である。そこで本研究では、ナノマテリアル曝露によって生殖・発生毒性が発現する作用機序と、体内動態に関する知見を得ることを目的に、妊娠マウスを用いた単回気管内投与および反復気管内投与試験を行った。

その結果、妊娠マウス単回気管内投与試験においては、血清および CMC-Na を溶媒として MWCNT を 3 mg/kg 以上の用量で妊娠 9 日の ICR マウスに気管内投与した結果、生存胎児重量および胎児の外表および骨格形成に影響を及ぼすことが分かった。母動物においては体重低下、肺の炎症、および血液中の細胞組成の変化がみられているものの、MWCNT の胎盤への沈着は確認されなかったことから、胎児におけるこれらの影響発現は、MWCNT の気管内投与による母動物の肺の炎症等による二次的な影響による可能性が示唆された。

一方、反復気管内投与においては、単回気管内投与試験①および②においてマウス胎児の奇形がみられた MWCNT の用量 (3 mg/kg) よりも高用量 (合計で最大 8 mg/kg) を投与しても、外表検査までの結果からは MWCNT の催奇形性は認められなかった。

今後は、一度に 3 mg/kg/day 以上の MWCNT を投与する反復気管内投与試験を行うことで、単回気管内投与と反復気管内投与の結果を比較するとともに、投与による肺の炎症性変化と胎児の奇形との関連性について更なる検討を行う予定である。

A. 研究目的

近年、ナノマテリアルの曝露による生殖・発生毒性に関する研究報告例がみられるようになった。例えば、二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子については、妊娠マウスへの皮下投与により、曝露後に胎児に移行して発達・機能障害を引き起こしたとの報告がある (Takeda et al., 2009; Shimizu et al., 2009)。また、カーボンナノチューブについては、単層カーボンナノチューブ (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の妊娠マウスへの腹腔内・気管内投与により胎児の奇形がみられたとの報告 (Pietrojusti et al., 2011; Fujitani et al., 2012) や、SWCNT のマウス単回経口投与により、吸収胚の有意な増加および胎仔の骨格異常がみられたとの報告 (Philbrook et al., 2011) がある。一方、MWCNT を妊娠ラットに反復経口投与しても生殖・発生毒性はみられなかったとの報告もある (Lim et al., 2011)。

ナノマテリアルの慢性毒性影響を評価する上で、生殖・発生毒性に関する評価は重要であるが、作用機序や曝露後の体内動態についてはまだ解明されておらず、より詳細な検討が必要と考えられる。

既存研究から示唆されるように、「生体内に曝露したナノマテリアルが細胞膜を通過し血流に乗って全身を循環し、胎盤や胎児に移行することによって生殖・発生毒性が誘発」しているのかどうかを検証するためには、ナノマテリアルの生殖・発生毒性が発現する条件と、体内動態を評価することが必要である。そこで本研究では、ナノマテリアル曝露によって生殖・発生毒性が発現する作用機序と、体内動態に関する知見を得ることを目的に、MWCNT を対象とし

た催奇形性試験を行った。

昨年度は、妊娠ラットおよびマウスを用いた単回尾静脈内投与試験を実施し、投与可能な最大量の MWCNT を妊娠 7~10 日の母動物に単回尾静脈内投与しても、胎児の奇形はみられないことが分かった。

また、妊娠マウスを用いた単回気管内投与試験を実施し、血清、CMC-Na のどちらかを MWCNT 懸濁液の媒体に用いた場合でも、妊娠 9 日の ICR マウスに 3~5 mg/kg の用量で単回気管内投与すると、生存胎児体重および胎盤重量の減少と、胎児の奇形を引き起こすことが示唆された。

今年度は、引き続き MWCNT の発生毒性評価を行うため以下の検討を行った。

1. マウス単回気管内投与試験の外表検査において胎児の奇形がみられたことから、奇形がみられた胎児の骨格検査とこれらの胎仔を出産した母動物の胎盤全ての病理組織学的検査を行った。また、胎児の奇形と肺の炎症反応との関係について調べるため、MWCNT 投与各群 1 例の母動物の肺の病理組織学的検査を行った。
2. 上述のマウス単回気管内投与試験（以下、試験①）は各群 5 匹のみの結果であり、用量-反応関係が明確ではなかったことから、再現性を確認するため各群の動物数を 10 匹に増やしたマウス単回気管内投与試験（以下、試験②）を再度実施した。
3. マウス単回気管内投与試験①および②では妊娠 9 日の投与しか行っておらず、

妊娠9日以外にMWCNTを曝露した場合においても、発生毒性が発現するかどうかを確認するため、器官形成期(妊娠6~17日)を通じた反復気管内投与試験を実施した。

B. 研究方法

1. 被験物質の調製

本研究では、実験動物に投与するMWCNTとして、MWNT-7(三井物産)を用いた。MWNT-7の概要を以下に示す。

サイズ：50-100 μm の凝集体

炭素含量：99.8% (蛍光X線分析)

G/D 比：11 (ラマン分光法)

BET 比表面積：36.7 m²/g (N₂ ガス吸着法)

昨年度の検討により、MWNT-7はマウス血清および2%CMC-Na PBS溶液中によく分散することが示されたことから、引き続きこれらの媒体を用いてMWCNTを調製した。なお、反復気管内投与試験においては、媒体中のCMC-Na濃度について再検討を行ってから懸濁液を調製した。

2. マウス単回気管内投与試験①の骨格検査、胎盤および肺の病理組織学的検査

マウス単回気管内投与試験の外表検査において胎児の奇形がみられたことから、奇形がみられた胎児13匹のうち5匹についての骨格検査を行った。また、本試験では、剖検時に外表異常のみられた胎児の胎盤を個別保存しなかったため、外表検査において異常のみられた胎児13匹を出産した母動物の胎盤全てについて病理組織学的検査を実施した。

マウス単回気管内投与試験のプロトコルを図1に示す。本試験では、マウス血清あるいは2%CMC-Naを用いて分散させたMWCNTを妊娠9日のICRマウスに0, 3, および5 mg/kg bwの用量で単回気管内投与した。各投与群ともに妊娠18日に帝王切開して病理組織学的にMWCNTの組織への沈着を確認するとともに、胎児への影響について検討した。

胎児の骨格検査については、胎児の外表観察において外表奇形がみられたマウス胎児5標本をアリザリンレッドSで染色し、50%グリセリン水溶液に浸漬して透明骨格標本作製し、実体顕微鏡下で骨化数を計測し評価した。

胎盤の病理組織学的検査については、生存胎児のうち外表検査で異常のみられた胎児9匹を出産した母動物5匹から採取した胎盤全て(60標本)について病理組織学的検査を実施するとともに、胎盤へのMWCNTの沈着の有無について検査した。

肺の病理組織学的検査においては、肉眼的病理学検査で肺の変色がみられた動物を各群1匹選択し、10%緩衝ホルマリン液にて固定された肺を常法に従いパラフィン包埋、薄切し、ヘマトキシリン・エオジンを用いて染色標本作製して鏡検した。

3. マウス単回気管内投与試験②

上記のマウス単回気管内投与試験は、各群の動物数が5匹のみの試験であり、また、結果についても用量-反応関係が明確ではなかったことから、各群の動物数を10匹に増やした追試を行った。

なお、追試においては、CMC-Na分散液を用いた催奇形性試験については既存研究(Fujitani et al., 2012)が存在することから、

本研究では、マウス血清分散液を中心に催奇形性の用量-反応関係を詳細に調べることとした。

試験プロトコルを図 2 に示す。本試験では、妊娠 9 日の ICR マウスに、マウス血清を用いて分散させた MWCNT を 0, 3, 5, および 7 mg/kg の用量で、2%CMC-Na を用いて分散させた MWCNT を 5 mg/kg の用量で単回投与した。各投与群ともに妊娠 17 日に帝王切開して病理組織学的に MWCNT の組織への沈着を確認するとともに、胎児への影響について検討した。各群の検査動物数（親）は 10 匹とした。

4. マウス反復気管内投与試験

試験プロトコルを図 3 に示す。1%CMC-Na PBS 溶液を用いて分散させた MWCNT を 0, 0.5, 1, 2 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に反復気管内投与した。通常の反復投与試験では、投与期間内に毎日投与を行うが、投与した MWCNT はすぐに体外に排出されないと考えられることから、気管内投与を繰り返すことによる母動物へ負荷を減らすため、3 日毎に合計 4 回の投与とした。また、無処置群と麻酔群を設定し、反復気管内投与自体の影響を調べた。妊娠 17 日に帝王切開を行い、病理組織学的に MWCNT の組織への沈着を確認するとともに、胎仔への影響について検討した。各群の検査動物数（親）は 9~11 匹とした。

5. 統計解析

一般状態を除く各検査項目について、コントロール群と MWCNT 投与群との統計学的有意差検定を行った。平均値の有意差検定は、5%有意水準で Bartlett 法による等分

散検定を行った。等分散の場合は、パラメトリックの Dunnett 法による両側検定を行い、不等分散の場合は、ノンパラメトリックの Steel 法による両側検定を行った。発生頻度については Fisher の直接確率検定（片側）を行い、病理所見については Wilcoxon 検定（両側）を行った。

C. 研究結果

1. 被験物質の調製

超音波による分散処理後の MWCNT 懸濁液の光学顕微鏡写真を撮影したところ、マウス血清および 2%CMC-Na PBS 溶液で分散させた MWCNT とともに液中に均一に分散していた（図 4）。液中の MWCNT は 10 μ m 程度の長さの孤立分散した状態で存在していたが、一部凝集塊も見られた。これらは原末の状態ですでにチューブ同士が融合しているものと思われる。また、血清分散液の方が、2%CMC-Na 分散液よりも凝集体が大きい傾向があった。

反復気管内投与試験においては、媒体中の CMC-Na 濃度について検討したところ、濃度を 1%とした方が、より分散状態がよく、なおかつ媒体自体の投与による実験動物への負荷も軽減できるため、1%CMC-Na PBS 溶液を媒体として用いた。

2. マウス単回気管内投与試験①の骨格検査、胎盤および肺の病理組織学的検査

2.1 骨格検査

マウス胎児の骨格検査結果を表 1 にまとめた。また、本試験においてみられた主な骨格異常について図 5 に示す。

骨格異常所見として、口蓋骨分離、腰椎弓癒合、腰椎弓と仙椎弓の癒合、仙椎弓癒

合、中手骨欠損(前肢), 指節骨欠損(前肢), および尺骨欠損がみられた。

骨格変異では 1 例に胸骨分節配列異常がみられたが, 検査施設の背景データの範囲内であった。

骨化数では, 中手骨および指節骨欠損に伴う中手骨, 前肢基節骨及び前肢中節骨化数の低値が 3 例, 指節骨欠損に伴う前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値および中手骨および指節骨欠損に伴う前肢基節骨及び前肢中節骨化数の低値が 1 例にみられた。また, 仙尾椎体骨化数の低値が 4 例にみられた。

なお, 骨化不全はいずれの動物においても観察されなかった。

2.2 胎盤の病理組織学的検査

母動物 5 匹から採取した胎盤 60 標本のいずれにおいても MWCNT の沈着やそれに伴う異物反応はみられず, 外表異常と胎盤における MWCNT 沈着との関連性を明らかにすることはできなかった。

2.3 肺の病理組織学的検査

病理組織学的検査の結果を表 2 および図 6 に示す。

血清分散 MWCNT の 3 mg/kg を投与した母動物においては, 肺胞における軽微な MWCNT の沈着および肺胞マクロファージの集簇, 軽微なリンパ球の浸潤, 肉芽腫および肺胞上皮の肥厚がみられた。

血清分散 MWCNT の 5 mg/kg を投与した母動物においては, 肺胞における顕著な MWCNT の沈着, 肺胞マクロファージの集簇, 肺胞における肉芽腫, 軽度なリンパ球の浸潤, および肺胞上皮の肥厚がみられた。

CMC-Na 分散 MWCNT の 3 mg/kg を投与

した母動物においては, 肺胞における顕著な MWCNT の沈着, 中等度の肺胞マクロファージの集簇, 肺胞における軽度の肉芽腫, および肺胞上皮の肥厚がみられた。

CMC-Na 分散 MWCNT の 5 mg/kg を投与した母動物においては, 肺の中皮における顕著な MWCNT の沈着, 中皮の肉芽腫および肥厚がみられた。また, 軽度な肺胞マクロファージの集簇および中皮の過形成がみられた。

3. マウス単回気管内投与試験②

3.1 母動物への影響

3.1.1 一般状態

対象群および MWCNT 投与群の全動物において, 投与後に捻髪音があったが, 投与翌日には回復した。また, MWCNT を投与した全動物において, 投与後に緩徐呼吸および自発運動の低下がみられたが, 自発運動の低下は投与翌日に, 緩徐呼吸は投与 3 日後までには回復した。また, 血清分散 MWCNT の 7 mg/kg 投与群の 1 匹において立毛がみられたが投与翌日には回復した。その他の機関には, いずれの動物においても一般状態の変化はみられなかった。

3.1.2 体重

各群の平均体重を表 3 に示す。妊娠 14 日(投与 5 日後)および妊娠 17 日(投与 8 日後)では, MWCNT の投与群全てにおいて, 対照群と比較して体重の有意な低値あるいは低値傾向がみられた。

これらの体重変化に分散媒体や用量との明確な関連はみられなかったが, MWCNT の投与群全てにおいて体重の有意な低値あるいは低値傾向がみられたことから, MWCNT 投与による変化であると考えられ

る。

3.1.3 血液学的検査

各群の血液学的検査結果を表 4 に示す。CMC-Na 分散 MWCNT 投与群において、対照群と比較して好中球比率の有意な高値およびリンパ球比率の有意な低値が認められたが、他の投与群では対照群との間に有意差は認められなかった。

3.1.4 血液ガス検査

各群の血液ガス検査結果を表 5 に示す。水素イオン濃度(pH)、酸素分圧(pO₂)、および炭酸ガス分圧(pCO₂)のいずれの項目についても対照群と MWCNT 投与群との間に有意差は認められなかった。

3.2 胎児への影響

帝王切開時の検査結果を表 6 にまとめた。

全ての MWCNT 投与群において、対照群と比較して胎児体重の有意な低値が認められた。胎盤重量においては、血清分散 MWCNT の 7 mg/kg 投与群を除く全ての群で、対照群と比較して有意な低値が認められた。また、血清分散 MWCNT の 3 mg/kg 投与群において、母動物あたりの着床痕数が有意な低値を示したが、用量との関連は認められなかった。

外表検査の結果、血清分散 MWCNT 投与群および CMC-Na 分散 MWCNT 投与群において、気管内投与試験①と同様に、胎児の外表異常（曲尾、短尾、唇裂、口蓋裂、無顎、欠指、湾曲手、および伸展拘縮）がみられた（図 7）。しかし、総胎児数に対する外表異常の発生率（%）にばらつきが大きく、対照群との統計学的な有意差は認められなかった。

4. マウス反復気管内投与試験

4.1 母動物への影響

4.1.1 一般状態

いずれの投与群においても死亡動物は認められず、一般状態の変化も認められなかった。

4.1.2 体重

母動物の体重推移を表 7 および図 8 に示す。妊娠期間を通じて対照群と被験物質投与群との間で、統計学的な有意差は認められなかったが、2 mg/kg 群で対照群に比べ、妊娠 10 日以降体重の低値傾向が認められた。

なお、妊娠 17 日の体重については、母動物の体重に対する妊娠子宮の影響を除外するため、妊娠子宮重量を差し引いた補正值も算出した（表 7）。その補正值の比較では体重値および妊娠 0～17 日の体重増加量ともに 2 mg/kg 群と対照群との差は少なく、2 mg/kg 群で認められた体重の増加抑制傾向には、主として妊娠子宮重量が関与していることが示唆された。

無処置群は対照群・麻酔群と比べ体重が高値傾向を示したが、麻酔群と対照群との間に差は認められなかった。

4.1.3 摂餌量

対照群に比べ 2 mg/kg 群で妊娠 6～9 日および 9～12 日の平均 1 日摂餌量が統計学的に有意な低値を示した。対照群と無処置群ならびに麻酔群との間に差は認められなかった。

4.1.4 剖検所見

全ての被験物質投与群において、黒色斑

点を伴う肺の黒色化が全例に認められた(図9)。また、対照群(11例中3例, 27%)も含め、リンパ節(傍胸腺)の腫大が0.5, 1および2 mg/kg群の、それぞれ11例中5例(45%), 9例中6例(67%)および11例中9例(82%)でみられた。その他、心臓の白色斑点・脾臓の腫大・肺の褐色斑点・肝臓の赤色化および白色斑点・唾液腺の白色化・腎臓および卵巣の嚢胞ならびに眼の白色化が認められたが、いずれも発生例数が各群1~3例で、リンパ節の腫大でみられたような投与あるいは投与用量に関連した発生例数の増加が認められないため、自然発生病変あるいは偶発病変と考えられた。

4.1.5 妊娠子宮および肺重量

剖検日の体重、妊娠子宮および肺重量ならびにそれぞれの相対重量を表8に示す。対照群に比べすべての被験物質投与群で肺重量が絶対および相対重量ともに統計学的に有意な高値を示し、用量に関連した増加が認められた。また、無処置群および麻酔群では、対照群に比べ肺重量が絶対および相対重量ともに有意な低値を示した。妊娠子宮重量では対照群と被験物質投与群との間で有意差は認められなかったが、2 mg/kg群で絶対および相対重量ともに低値傾向が認められた。

4.2 胎児への影響

帝王切開による検査結果を表9に示す。対照群と比べ、2 mg/kg群で雄の胎児重量が統計学的に有意な低値を示し、雌の胎児重量も低値傾向を示した。また、0.5 mg/kg群で平均死亡胚・胎児数が有意な高値を示したが、1 mg/kg以上の群では対照群との間に有意差は認められなかった。その他、妊娠

黄体数、着床数、生存胎児数、性比、胎盤重量、着床率、胎児生存率および死亡胚・胎児率のいずれにも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。また、対照群と無処置群ならびに麻酔群との間にはいずれの指標にも有意な差は認められなかった。生存胎児の胎盤の異常としては、癒着胎盤が麻酔群および0.5 mg/kg群で各1例に観察されたが、自然発生病変あるいは偶発病変と考えられた。

D. 考察

マウス単回気管内投与試験①の保存臓器を用いた骨格検査では、口蓋骨分離、腰椎弓癒合、腰椎弓と仙椎弓の癒合、仙椎弓癒合、中手骨欠損(前肢)、指節骨欠損(前肢)および尺骨欠損がみられた。また、中手骨および指節骨の欠損に伴う骨化数の低値がみられ、検査施設の背景データと比較して仙尾椎体骨化数の低値がみられた。

また、肺の病理組織学的検査では、血清分散MWCNTの3, 5 mg/kg投与群およびCMC-Na分散MWCNTの3 mg/kg投与群において、肺胞におけるMWCNTの沈着、肺胞マクロファージの集簇あるいはリンパ球の浸潤、肉芽腫および肺胞上皮の肥厚がみられた。これらの変化は、MWCNTの気管内投与や吸入暴露(Kobayashi et al., 2009; Morimoto et al., 2012)で見られている所見とほぼ同じであった。なお、CMC-Na分散MWCNTの5 mg/kg投与群では中皮におけるMWCNTの沈着、顕著な肥厚・過形成、肉芽腫がみられ、肺胞内におけるMWCNTの沈着はわずかであったことから、被験物質の誤投与による影響と考えられた。

以上の結果から、MWCNTを妊娠9日の

ICR マウスに気管内投与することにより、病理組織学的にはMWCNTの肺胞内への沈着およびそれに伴う異物反応がみられ、また、胎児の外表異常だけでなく骨格形成にも影響を及ぼす可能性が示唆された。

一方、胎盤の病理組織学的検査では、検査を行ったいずれの標本についてもMWCNTの沈着やそれに伴う異物反応はみられなかった。したがって、単回気管内投与によって胎児の外表・骨格異常がみられた原因は、投与したMWCNTが胎盤を通じて胎児へ移行することによるものではなく、母動物への影響（肺の炎症、酸素欠乏、あるいは他の何らかのストレス）に起因するものと考えられる。これらのストレス因子は、マウス、ウサギにおいて奇形の要因となることが報告されている（谷村, 1992; Datta et al., 1999）。この仮説を検証するには、MWCNTを投与した妊娠マウスにおいて、肺の炎症パラメーターの変化について詳細に検討するだけでなく、血中の酸素欠乏パラメーターの変化についても確認する必要がある。

マウス単回気管内投与試験②においては、各投与群の動物数を10匹に増やし、用量反応関係についてより詳細に検討するとともに、MWCNT投与による母動物の血中酸素濃度および炎症性パラメーターについて検索し、胎児への影響との関連性について検索した。

その結果、気管内投与試験①と同様に、血清分散MWCNT投与群およびCMC-Na分散MWCNT投与群において、胎児の外表異常が多数みられ、MWCNTの投与による影響と考えられた。また、全てのMWCNT投与群において、対照群と比較して胎児体重の有意な低値が認められた。胎盤重量にお

いては、血清分散MWCNTの7 mg/kg投与群を除く全ての群で、対照群と比較して有意な低値が認められた。

血液学的検査においては、CMC-Na分散MWCNTの5 mg/kg投与群において好中球数比率の有意な高値およびリンパ球数比率の有意な低値が認められ、血清分散MWCNT投与群と比較して、炎症性変化が強くみられているものと考えられた。一方、血液ガス検査の結果、MWCNT投与による血中の水素イオン濃度、酸素分圧及び炭酸ガス分圧の影響は認められなかった。

以上の結果から、これまでに実施した気管内投与試験（①および②）の結果を総括すると、血清およびCMC-Naを溶媒としてMWCNTを3 mg/kg以上の用量で妊娠9日のICRマウスに気管内投与した結果、生存胎児重量および胎児の外表および骨格形成に影響を及ぼすことが分かった。また、母動物においては体重低下、肺の炎症、および血液中の細胞組成の変化がみられているものの、MWCNTの胎盤への沈着は確認されなかったことから、胎児におけるこれらの影響発現は、MWCNTの気管内投与による母動物の肺の炎症等による二次的な影響による可能性が示唆された。

ただし、上記の試験では妊娠9日の投与による影響のみしか分からないため、他の妊娠日の投与による影響について検索するため行ったマウス反復気管内投与試験においては、2 mg/kg群で雌雄の胎児重量が低値を示し、被験物質投与による胎児の発育抑制と考えられた。また、0.5 mg/kg群で平均死亡胚・胎児数が有意な高値を示したが、1 mg/kg以上の群ではその変化は認められず用量に関連しないことから被験物質投与の影響とは判断しなかった。その他、妊娠黄

体数，着床数，生存胎児数，性比，胎盤重量，着床率，胎児生存率および死亡胚・胎児率のいずれにも対照群と被験物質投与群との間に有意な差は認められなかった。胎盤の異常として，0.5 mg/kg 群で癒着胎盤が，生存胎児の外表異常として，1 mg/kg 群で短尾が観察されたが，いずれも単発性に認められたものであり，2 mg/kg 群では認められていないことから，用量と関連性のない，自然発生性の変化と考えられた。

また，対照群と無処置群および麻酔群との比較では，いずれの指標にも差は認められなかったことから，反復気管内投与自体の胎児に及ぼす影響はないと考えられた。

単回気管内投与と反復気管内投与で催奇形性に違いがみられた原因として，1 回に投与する MWCNT の用量の差が考えられる。すなわち，反復気管内投与試験では，合計で最大 8 mg/kg/day の MWCNT を投与しているが，1 回の投与量は最大で 2 mg/kg/day であり，これは単回気管内投与で影響がみられた 3 mg/kg/day よりも 1 回あたりの用量は低い。繰り返し少量の MWCNT を投与し，結果として大量に体内に蓄積するよりも，一度に大量の MWCNT を投与する方が，投与に伴う肺の炎症反応が大きく，それに起因して胎児の奇形が引き起こされることが考えられる。

E. 結論

ナノマテリアルの一種である MWCNT を吸入等によって呼吸器系に曝露した場合の発生毒性の発現について評価するため，妊娠マウスを用いた単回気管内投与および反復気管内投与試験を行った。

妊娠マウス単回気管内投与試験の結果か

ら，血清および CMC-Na を溶媒として MWCNT を 3 mg/kg 以上の用量で妊娠 9 日の ICR マウスに気管内投与した結果，生存胎児重量および胎児の外表および骨格形成に影響を及ぼすことが分かった。母動物においては体重低下，肺の炎症，および血液中の細胞組成の変化がみられているものの，MWCNT の胎盤への沈着は確認されなかったことから，胎児におけるこれらの影響発現は，MWCNT の気管内投与による母動物の肺の炎症等による二次的な影響による可能性が示唆された。

一方，反復気管内投与においては，単回気管内投与試験①および②においてマウス胎児の奇形がみられた MWCNT の用量 (3 mg/kg) よりも高用量 (合計で最大 8 mg/kg) を投与しても，外表検査までの結果からは MWCNT の催奇形性は認められなかった。

今後は，一度に 3 mg/kg/day 以上の MWCNT を投与する反復気管内投与試験を行うことで，単回気管内投与と反復気管内投与の結果を比較するとともに，投与による肺の炎症性変化と胎児の奇形との関連性について更なる検討を行う予定である。これらの検討により，MWCNT の発生毒性に関する無毒性量 (NOAEL) あるいは最小毒性量 (LOAEL) を明らかにすることで，ヒトのリスク評価に有用な基礎情報を提示することができると思われる。

F. 引用文献

Datta N, Singh G: Potentiation of Teratogenicity by Acute Hypoxia in Animal Model and Its Hypothetical Clinical Implications. *Journal of the Anatomical Society of India*, **48**, 83–89 (1999)

- Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. *The Journal of Toxicological Sciences*, **37**, 81–89 (2012).
- Kobayashi N, Naya M, Ema M, Endoh S, Maru J, Mizuno K, Nakanishi J: Biological response and morphological assessment of individually dispersed multi-wall carbon nanotubes in the lung after intratracheal instillation in rats. *Toxicology*, **276**, 143–153 (2010).
- Lim J, Kim S, Shin I, Park N, Moon C, Kang S, Kim S, Park S, Kim J: Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Research (Part B)*, **92**, 69–76 (2011).
- Morimoto Y, Hirohashi M, Ogami A, Oyabu T, Myojo T, Todoroki M, Yamamoto M, Hashiba M, Mizuguchi Y, Lee BW, Kuroda E, Shimada M, Wang WN, Yamamoto K, Fujita K, Endoh S, Uchida K, Kobayashi N, Mizuno K, Inada M, Tao H, Nakazato T, Nakanishi J, Tanaka I: Pulmonary toxicity of well-dispersed multi-wall carbon nanotubes following inhalation and intratracheal instillation, *Nanotoxicology*, **6**, 587–599 (2012).
- Philbrook NA, Walker VK, Afroz ARMN, Saleh NB, Winn LM: Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, **32**, 442–448 (2011).
- Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L: Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS NANO*, **5**, 4624–4633 (2011).
- Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K: Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period alters gene expression related to brain development in the mouse. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 20 (2009).
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M: Nanoparticle transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, **55**, 95–102 (2009).
- 谷村孝編：毒性試験講座 11 発生毒性。地人書館，p.82 (1992)

G. 研究発表

1. 論文発表

- Kumiko Shimizu, Reiji Kubota, Norihiko Kobayashi, Maiko Tahara, Naoki Sugimoto, Tetsuji Nishimura, Yoshiaki Ikarashi: Cytotoxic Effects of Hydroxylated Fullerenes in Three Types of Liver Cells. *Materials*, **6(7)**, 2713–2722 (2013).

2. 学会発表

- 小林憲弘, 沼野琢旬, 中島弘尚, 河部真弓, 久保田領志, 広瀬明彦：妊娠マウスを用いた気管内投与による多層カーボンナ

ノチューブの生殖・発生毒性の評価. 第
40回日本毒性学会学術年会 (2013. 6.17
千葉県千葉市).

Norihiro Kobayashi, Takamasa Numano, Reiji
Kubota, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose:
Developmental toxicity assessment of
multi-wall carbon nanotubes in pregnant
mice after intratracheal instillation. 53rd
Annual Meeting of the Society of
Toxicology (SOT 2014) (2014.3.24 Phoenix,
AZ, USA).

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含
む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

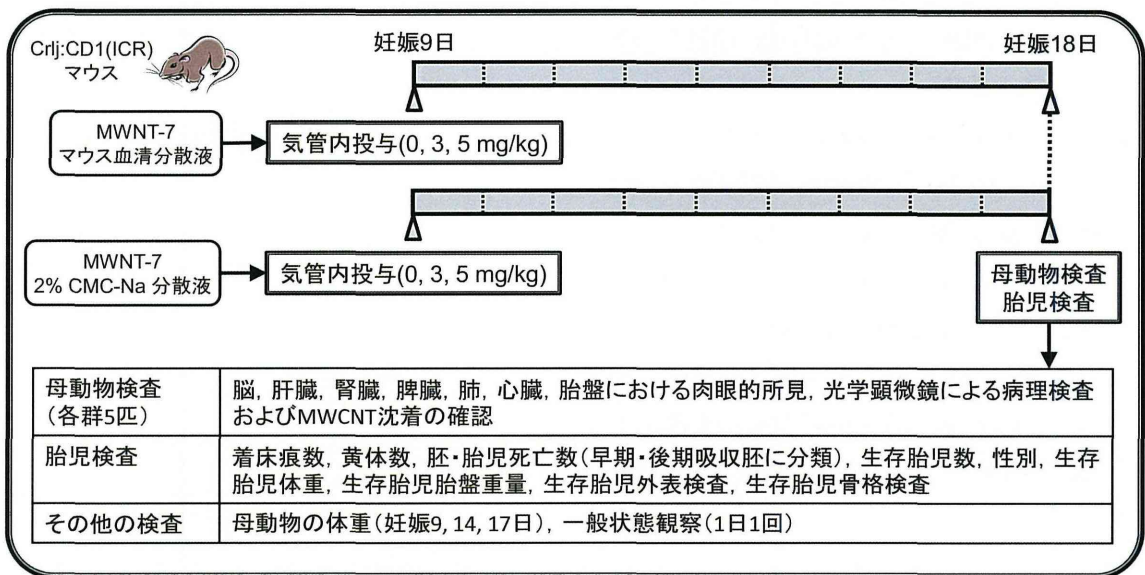


図1. マウス単回気管内投与試験①のプロトコル

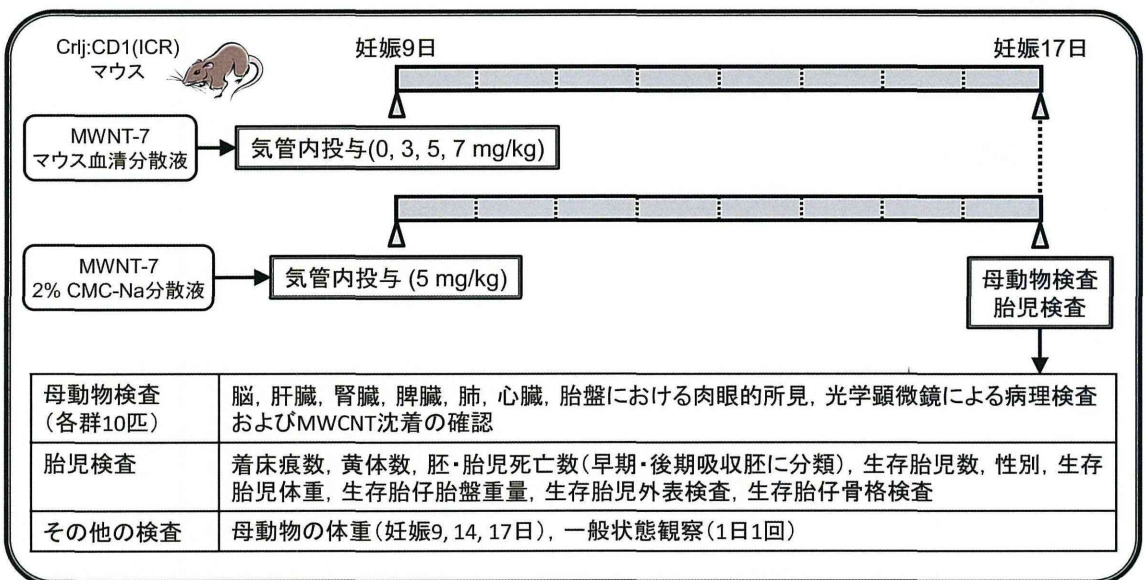


図2. マウス単回気管内投与試験②のプロトコル

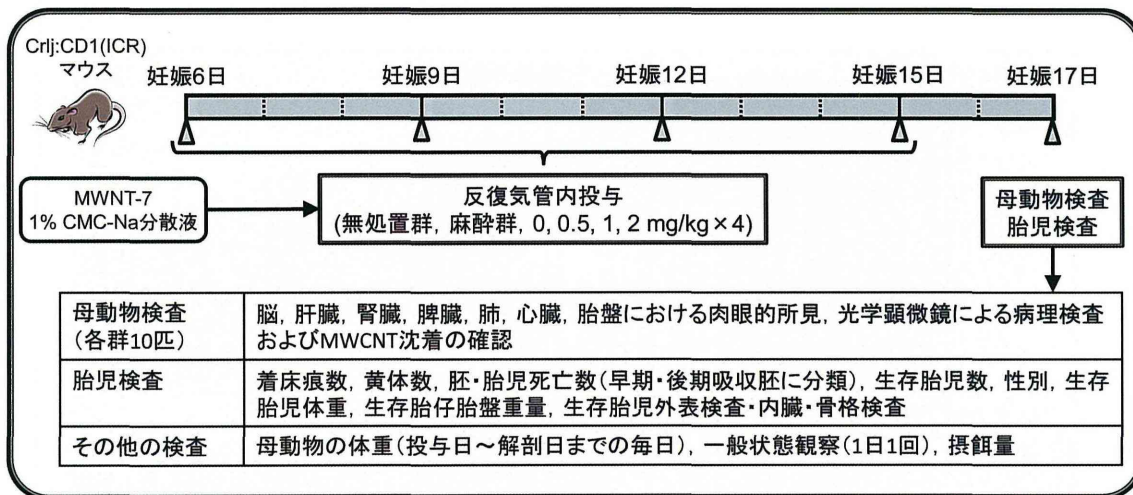


図3. マウス反復気管内投与試験のプロトコル

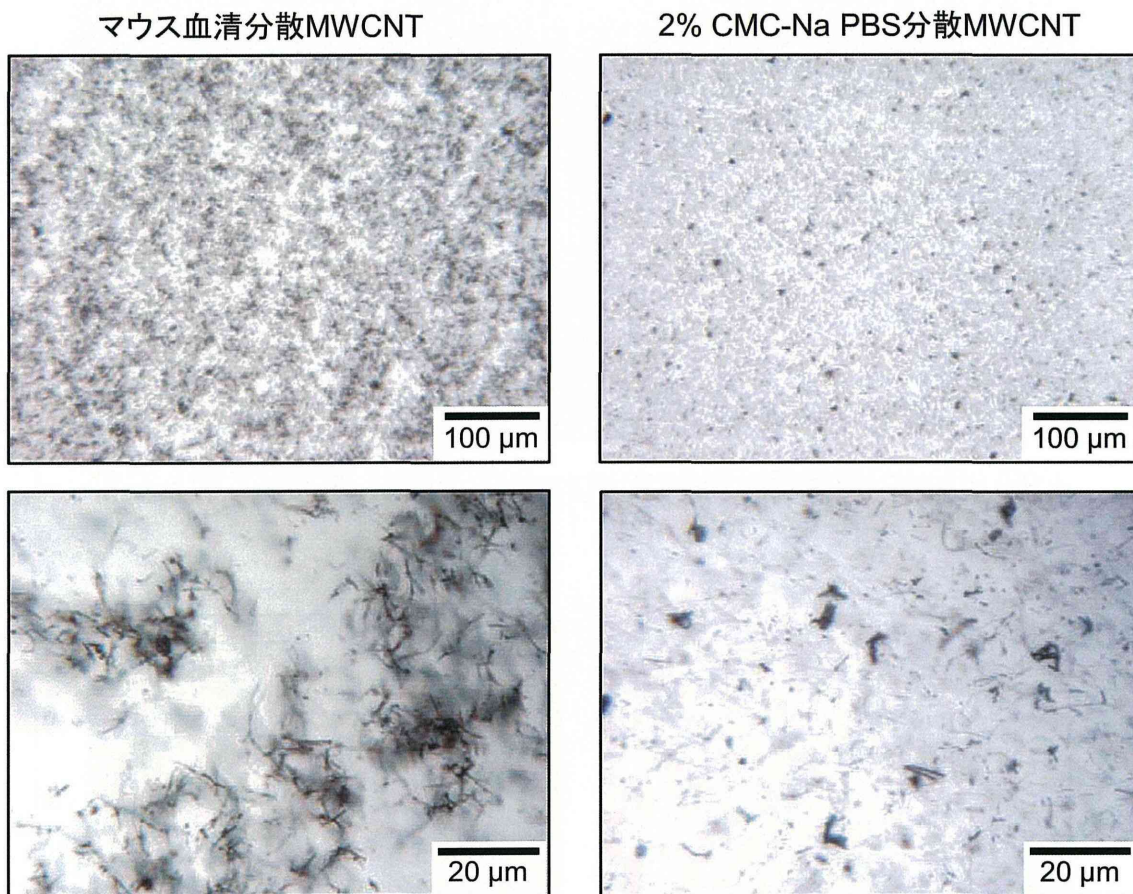


図4. MWCNT懸濁液の光学顕微鏡写真



図5. マウス単回気管内投与試験①における胎児にみられた骨格異常

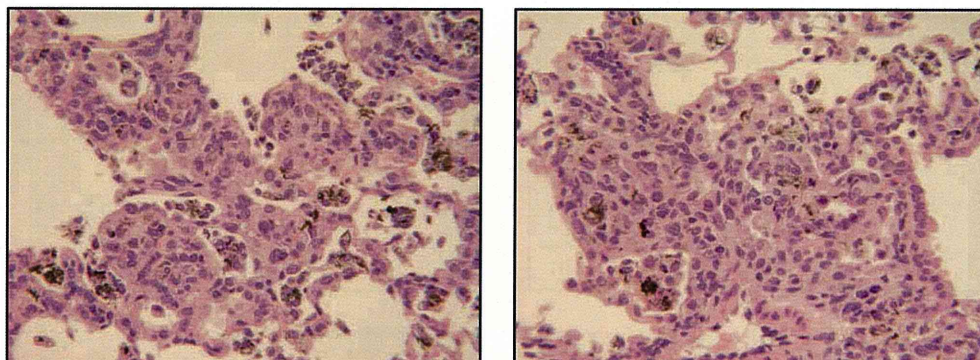


図6. マウス単回気管内投与試験①における母動物の肺の光学顕微鏡写真

(×400)



図7. マウス単回気管内投与試験②における胎児の外表異常

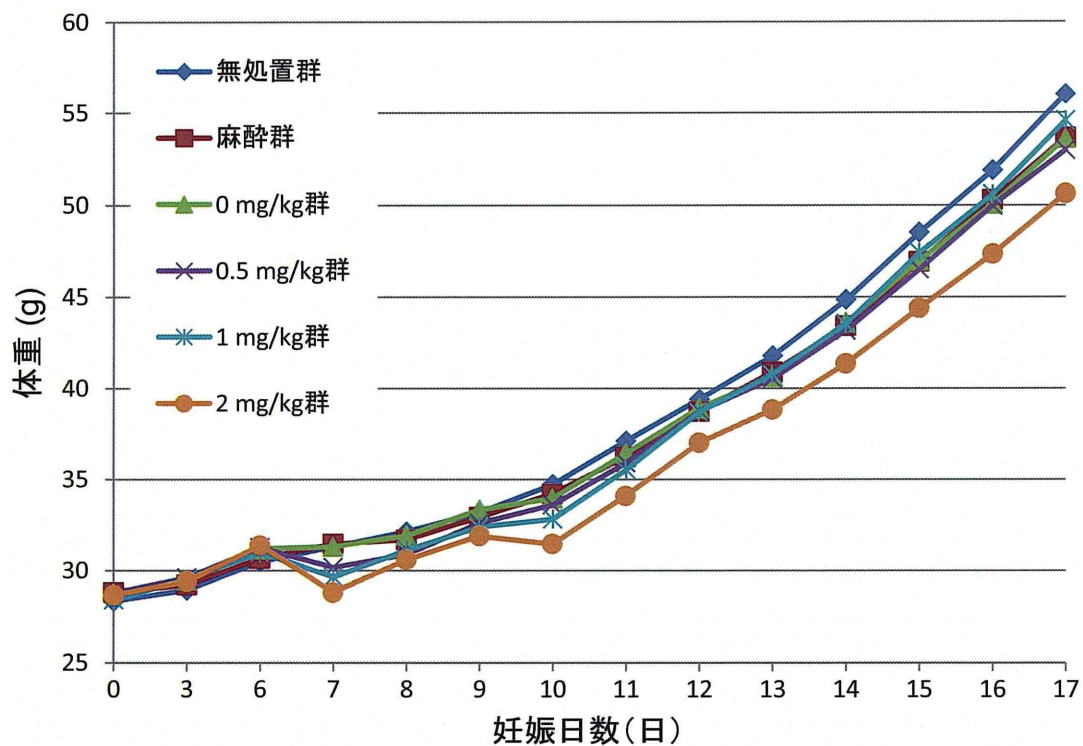


図8. マウス反復気管内投与試験における母動物の体重推移

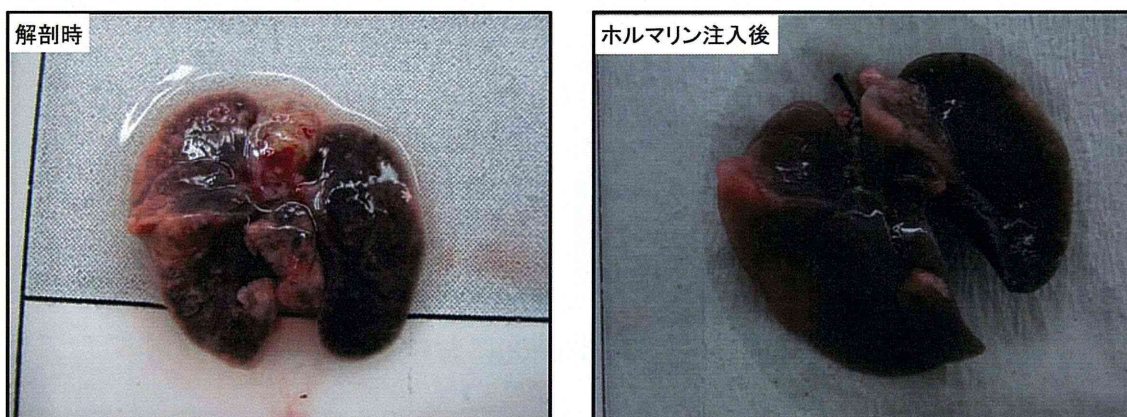


図9. マウス反復気管内投与試験における母動物の肺の写真

表1. マウス単回気管内投与試験①における胎児の骨格検査結果

胎児	検査項目	所見
1	骨格異常	口蓋骨分離，腰椎弓癒合，中手骨欠損，指節骨欠損（前肢）
	骨格変異	なし
	骨化数	中手骨および指節骨欠損に伴う中手骨，前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値，仙尾椎体骨化数の低値
	骨化不全	なし
2	骨格異常	口蓋骨分離，腰椎弓と仙椎弓の癒合，指節骨欠損（前肢）
	骨格変異	なし
	骨化数	指節骨欠損に伴う前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値，仙尾椎体骨化数の低値
	骨化不全	なし
3	骨格異常	口蓋骨分離，腰椎弓と仙椎弓の癒合，仙椎弓癒合，中手骨欠損，指節骨欠損（前肢）
	骨格変異	なし
	骨化数	中手骨および指節骨欠損に伴う中手骨，前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値
	骨化不全	なし
4	骨格異常	中手骨欠損，指節骨欠損（前肢）
	骨格変異	なし
	骨化数	中手骨および指節骨欠損に伴う中手骨，前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値，仙尾椎体骨化数の低値
	骨化不全	なし
5	骨格異常	仙椎弓癒合，尺骨欠損，中手骨欠損（前肢），指節骨欠損（前肢）
	骨格変異	胸骨分節配列異常がみられたが，検査施設の背景データにも認められている
	骨化数	中手骨および指節骨欠損に伴う前肢基節骨および前肢中節骨化数の低値，仙尾椎体骨化数の低値
	骨化不全	なし

表2. マウス単回気管内投与試験①における母動物の肺の病理組織学的検査結果

所見	分散媒体		血清		2%CMC-Na	
	投与量	3 mg/kg	5 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	
肺胞におけるMWCNT沈着		2+	4+	4+	-	
中皮におけるMWCNT沈着		-	-	-	4+	
マクロファージ集簇		2+	4+	3+	2+	
リンパ球浸潤		1+	2+	-	-	
肺胞における肉芽腫		1+	4+	2+	-	
中皮における肉芽腫		-	-	-	4+	
肺胞上皮の肥厚		1+	2+	2+	-	
中皮の肥厚		-	-	-	4+	
中皮の過形成		-	-	-	1+	

1+: Minimal, 2+: Slight, 3+: Moderate, 4+: Severe

表3. マウス単回気管内投与試験②における母動物の体重変化 (単位: g)

測定日	分散媒体		血清			2%CMC-Na
	投与量	0 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	7 mg/kg	5 mg/kg
妊娠 9 日	平均±S.D.	37.03±2.20	36.25±2.06	37.17±2.78	37.35±3.10	36.68±2.13
妊娠 14 日	平均±S.D.	48.69±3.17	41.48±4.24*	43.60±4.95*	45.72±5.58	44.54±4.10*
妊娠 17 日	平均±S.D.	61.41±4.81	51.69±5.73*	54.95±6.90	57.86±7.70	56.26±5.62*

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表4. マウス単回気管内投与試験②における母動物の血液学的検査結果

検査項目	分散媒体		血清			2%CMC-Na
	投与量	0 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	7 mg/kg	5 mg/kg
HGB (g/dL)	平均±S.D.	11.40±1.57	12.02±1.37	11.53±1.06	10.88±0.79	11.80±0.93
リンパ球 (%)	平均±S.D.	66.66±2.76	55.94±9.72	63.08±6.95	59.20±7.08	56.46±3.03*
好中球 (%)	平均±S.D.	29.04±3.78	36.32±10.46	29.88±5.82	35.53±7.61	36.96±4.08*
単球 (%)	平均±S.D.	2.38±0.95	3.20±1.11	3.15±1.58	2.73±0.74	3.36±1.62
好酸球 (%)	平均±S.D.	1.92±0.81	4.54±2.61	3.90±1.46	2.55±0.81	3.22±1.34
好塩基球 (%)	平均±S.D.	0	0	0	0	0

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表5. マウス単回気管内投与試験②における母動物の血液ガス検査結果

検査項目	分散媒体		血清			2%CMC-Na
	投与量	0 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	7 mg/kg	5 mg/kg
pH	平均±S.D.	7.458±0.028	7.476±0.043	7.443±0.051	7.489±0.017	7.422±0.044
pCO ₂	平均±S.D.	28.16±2.23	25.90±4.45	28.80±6.10	24.93±2.76	32.90±7.49
pO ₂	平均±S.D.	117.4±13.36	115.0±11.28	112.9±28.02	128.0±5.35	116.0±31.11

表6. マウス単回気管内投与試験②における帝王切開時の検査結果

検査項目	分散媒体		血清			2%CMC-Na
	投与量	0 mg/kg	3 mg/kg	5 mg/kg	7 mg/kg	5 mg/kg
検査母動物数		10	10	10	10	10
黄体数	合計	158	137	153	155	152
	平均±S.D.	15.8±2.1	13.7±1.8	15.3±2.3	15.5±1.8	15.2±1.1
着床痕数	合計	156	131	151	151	149
	平均±S.D.	15.6±2.3	13.1±2.0*	15.1±2.5	15.1±2.1	14.9±1.0
死亡胎児	合計 (%)	19 (11.8)	24 (18.4)	18 (12.0)	16 (12.6)	10 (6.6)
	早期吸収胚合計 (%)	15 (9.3)	17 (13.3)	14 (9.3)	15 (11.9)	8 (5.3)
	後期吸収胚合計 (%)	4 (2.5)	7 (5.0)	4 (2.8)	1 (0.7)	2 (6.6)
生存胎児数	合計	137	108	133	136	140
	平均±S.D.	13.7±3.0	10.8±3.1	13.3±2.9	13.6±4.1	14.0±2.4
性比 (雄/雌)	平均±S.D.	1.46±0.47	1.31±1.02	1.64±1.08	1.20±1.06	0.98±0.57
胎児体重 (g)	平均±S.D.	1.13±0.08	0.87±0.13*	0.86±0.17*	0.98±0.13*	0.95±0.13*
胎盤重量 (g)	平均±S.D.	0.10±0.01	0.08±0.01*	0.08±0.01*	0.09±0.01	0.08±0.01*
外表異常数	合計 (%)	0 (0)	13 (12.3)	20 (18.6)	9 (8.7)	10 (9.0)

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表7. マウス反復気管内投与試験における母動物の体重推移 (単位: g)

妊娠日数	投与群 投与量	無処置群 0 mg/kg	麻酔群 0 mg/kg	対照群 0 mg/kg	MWCNT投与群		
					0.5 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg
0日	平均±S.D.	28.3±2.0	28.8±2.2	28.8±2.2	28.8±2.3	28.4±1.6	28.7±2.5
3日	平均±S.D.	28.9±2.0	29.2±2.7	29.5±2.4	29.6±2.5	29.5±1.6	29.4±2.8
6日	平均±S.D.	30.5±2.0	30.7±1.8	31.2±2.7	31.3±2.5	31.0±1.7	31.4±2.9
7日	平均±S.D.	31.3±2.4	31.5±1.9	31.3±2.9	30.2±2.6	29.6±1.9	28.8±2.9
8日	平均±S.D.	32.1±2.4	31.7±1.8	31.9±2.8	30.9±3.1	31.1±1.9	30.6±3.2
9日	平均±S.D.	33.2±2.4	32.9±2.1	33.3±2.7	32.6±2.8	32.4±1.7	31.9±2.9
10日	平均±S.D.	34.7±2.7	34.2±2.2	34.0±2.6	33.6±2.6	32.8±1.9	31.5±2.9
11日	平均±S.D.	37.1±2.8	36.3±2.5	36.4±2.8	35.9±2.9	35.5±2.1	34.1±3.1
12日	平均±S.D.	39.4±3.0	38.7±2.7	38.9±3.2	38.8±3.1	38.7±2.1	37.0±4.0
13日	平均±S.D.	41.8±3.3	40.9±2.4	40.6±3.5	40.5±3.1	40.8±2.2	38.8±3.8
14日	平均±S.D.	44.8±3.6	43.4±2.7	43.6±3.9	43.2±3.4	43.5±2.5	41.4±4.3
15日	平均±S.D.	48.5±4.2	46.9±3.0	47.0±4.2	46.5±3.8	47.4±3.0	44.4±4.9
16日	平均±S.D.	51.9±4.6	50.3±3.1	50.1±4.7	50.0±4.1	50.6±3.6	47.3±5.3
17日	平均±S.D.	56.0±5.0	53.7±3.5	53.6±5.0	53.0±4.9	54.6±4.0	50.6±6.1
17日*	平均±S.D.	36.7±3.0	35.5±1.9	35.7±2.7	35.8±2.7	35.9±2.2	34.6±2.8

*: 体重－妊娠子宮重量

表8. マウス反復気管内投与試験における妊娠子宮および肺重量

検査項目	投与群 投与量	無処置群 0 mg/kg	麻酔群 0 mg/kg	対照群 0 mg/kg	MWCNT投与群		
					0.5 mg/kg	1.0 mg/kg	2.0 mg/kg
体重 (g)	平均±S.D.	56.0±5.0	53.7±3.5	53.6±5.0	53.0±4.9	54.6±4.0	50.6±6.1
肺重量 (g)	平均±S.D.	0.19±0.02*	0.19±0.01*	0.24±0.02	0.30±0.02*	0.34±0.03*	0.35±0.05*
肺重量 (%)	平均±S.D.	0.34±0.02*	0.36±0.02*	0.46±0.04	0.57±0.06*	0.62±0.07*	0.70±0.09*
子宮重量 (g)	平均±S.D.	19.33±2.25	18.13±2.10	17.90±2.41	17.20±2.76	18.66±2.11	16.01±4.01
子宮重量 (%)	平均±S.D.	34.45±1.43	33.72±2.28	33.29±1.79	32.31±3.01	34.12±1.78	31.23±4.59

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)