

表9. マウス反復気管内投与試験における帝王切開時の検査結果

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
検査母動物数		11	10	11	11	9	11
黄体数	合計	156	133	146	155	127	146
	平均±S.D.	14.2±1.3	13.3±1.2	13.3±2.1	14.1±1.3	14.1±1.4	13.3±2.4
着床痕数	合計 (%)	155 (99.4)	131 (98.6)	145 (99.2)	154 (99.4)	127 (100)	142 (97.3)
	平均±S.D.	14.1±1.4	13.1±1.2	13.2±2.2	14.0±1.2	14.1±1.4	12.9±2.3
子宮内死亡	合計 (%)	5 (3.2)	3 (2.4)	6 (3.4)	17 (11.3)	5 (4.1)	12 (8.9)
	平均±S.D.	0.5±0.7	0.3±0.5	0.5±1.0	1.5±1.2*	0.6±0.7	1.1±0.9
早期吸収胚	合計 (%)	4 (2.5)	2 (1.6)	4 (2.4)	5 (3.3)	2 (1.6)	10 (7.5)
	平均±S.D.	0.4±0.5	0.2±0.4	0.4±0.7	0.5±0.9	0.2±0.4	0.9±1.0
後期吸収胚	合計 (%)	0 (0)	0 (0)	1 (0.5)	9 (6.0)	1 (0.9)	0 (0)
	平均±S.D.	0	0	0.1±0.3	0.8±1.2	0.1±0.3	0
死亡胎児	合計 (%)	1 (0.6)	1 (0.8)	1 (0.5)	3 (2.0)	2 (1.6)	2 (1.4)
	平均±S.D.	0.1±0.3	0.1±0.3	0.1±0.3	0.3±0.5	0.2±0.4	0.2±0.4
生存胎児数	合計 (%)	150 (96.8)	128 (97.6)	139 (96.6)	137(88.7)	122 (96.0)	130 (91.1)
	平均±S.D.	13.6±1.4	12.8±1.5	12.6±1.6	12.5±1.9	13.6±1.7	11.8±2.6
性比 (雄%)	平均±S.D.	57.3±9.4	56.8±16.5	60.3±16.0	53.1±17.2	58.0±20.3	48.3±15.5
雄体重 (g)	平均±S.D.	1.03±0.08	1.05±0.09	1.03±0.07	0.97±0.10	0.96±0.08	0.94±0.06*
雌体重 (g)	平均±S.D.	1.00±0.07	1.00±0.09	0.97±0.08	0.92±0.11	0.92±0.10	0.90±0.07
雄胎盤重量(g)	平均±S.D.	0.10±0.01	0.10±0.01	0.10±0.01	0.11±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01
雌胎盤重量(g)	平均±S.D.	0.09±0.01	0.09±0.01	0.09±0.01	0.10±0.01	0.09±0.02	0.09±0.02
異常胎児数	合計 (%)	0 (0)	0 (0)	1 (0.6) <sup>a</sup>	0 (0)	1 (0.7) <sup>b</sup>	0 (0)

\*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

a: 裂手および巻尾, b: 短尾

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」

カーボンナノチューブの遺伝毒性評価に関する研究

分担研究者： 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長  
協力研究者： 安井 学 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部  
西村 哲治 帝京平成大学薬学部

研究要旨

ナノマテリアルとして広く知られている多層カーボンナノチューブ（MWCNT）について、これまで長さ、外径が大きな MWCNT が染色体の倍数性を誘発する知見を得た。今回、MWCNT 曝露時における細胞分裂の倍数化および多核化の発生機序に焦点をあて、染色体と動原体を蛍光タンパク質で可視化させたヒト細胞 MDA-435 を用いて共焦点ライブセルイメージング解析を行った。MWCNT（MWCNT-7、Lot No. 060125-01k）0、12.7、25.3、50.6  $\mu\text{g/ml}$  を含む培地で MDA-435 細胞の挙動を 37 度で 72 時間タイムラプス撮影した結果、二核細胞の形成が MWCNT 濃度 25.3 および 50.6  $\mu\text{g/ml}$  でそれぞれ 3.0、0.4% の頻度で観察された。MWCNT は積極的に細胞内に取り込まれ、分裂期に入っても染色体と相互作用せず、小核や染色体異常を形成させる原因とはならなかった。分裂後期において、比較的短い MWCNT 繊維（約 5  $\mu\text{m}$ ）は娘細胞のどちらかに速やかに移動できたが、長い MWCNT 繊維（約 20  $\mu\text{m}$ ）は収縮環内に残留することがあるため、サイトキネシス障害が起き結果的に二核細胞を形成させた。この毒性機序は、青石綿でも示唆されていることから、MWCNT の倍数性誘発機序は青石綿のそれと類似しているものと推察された。

キーワード：カーボンナノチューブ（MWCNT）、染色体異常、遺伝毒性、発がん性

A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中の多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プラスの電荷を持つ MWCNT はマイナスの電荷を持つ DNA と結合しやすいという性質を

応用し、MWCNT が DNA のセンサーに応用されているが、これは、CNT が DNA と作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示唆している。

また、MWCNT が酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進し、線維症は MWCNT が肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因

と考えられている。その他、MWCNT は青石綿と同様に p53<sup>+/-</sup>のトランスジェニックマウスに中皮腫を生じさせることが明らかになっている。このように MWCNT は、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNA や分裂装置と直接結合することで発がん性を示すと考えられている。

太くて長い MWCNT は、青石綿の物理的形狀と似ていることから毒性の類似性が指摘されている。いくつかの研究グループは、動物実験において腹腔内投与させた MWCNT は、青石綿と同様に中皮腫を高頻度に誘発させることを報告している。その結果は、石綿繊維の径が 0.25  $\mu\text{m}$  以下でかつ長さ 20  $\mu\text{m}$  以上の形状で発癌性が強いという“スタントン・ポットの仮説”とほぼ一致している。MWCNT の遺伝毒性に関しては、Kato らが野生型 ICR マウスに MWCNT (幅 70-110nm、長さ 1-4  $\mu\text{m}$ ) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化的 DNA 付加体の定量、そして一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学的解析を行ったところ、すべて陽性の結果が得られた。よって MWCNT の遺伝毒性は、過剰な炎症反応による酸化的ストレスが主な原因であるとされている。

培養細胞レベルでも、MWCNT と青石綿の遺伝毒性の特徴は類似しており、ともに倍数性細胞 (および多核細胞) を高頻度に誘発させることが知られている。これまでの我々の研究でも、6 種の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を用いて染色体異常誘発作用を検討した結果、染色体の構造異常や *in vitro* 発がん性は示さないが、太くて長い MWCNT は染色体の倍数性を誘発し、MWCNT の形状と染色体の数的異常誘発との関連性が示唆された。染色体の倍数化や異数化による染色体異常は、癌化に関与する様々な遺伝子発現を変化させるため、実験動物で観察できる石綿由来の中皮腫や気管支癌と

深く関わっていると考えられる。Jensen らは、石綿繊維がどのような機序で異常な二核細胞や多核細胞を発生させるかを調べるために、ライブセル観察が可能な顕微鏡を用いてタイムラプス解析した。その論文では、比較的長い青石綿 (15-50  $\mu\text{m}$ ) は、LLC-MK2 上皮細胞の分裂後期で収縮環内にトラップされ、サイトキネシスを物理的にブロックすることで、最終的に二核細胞を発生させることを報告した。一方、MWCNT に関しては、細胞の多核化および倍数化の因果関係を示す報告は数多くあるが、その発生機序を直接的に示す報告はほとんどない。

そこで本研究では、染色体と動原体を別々の蛍光タンパク質で染めた 2 色可視化ヒト細胞を用いて、MWCNT がどのように倍数性細胞を誘発させるのか、その発生機序を解明するために、高分解能な共焦点ライブセルイメージングシステムによるタイムラプス解析をした。我々は、約 5  $\mu\text{m}$  の短い CNT 繊維は、染色体分離後すぐに娘細胞のどちらかに移動するが、約 20  $\mu\text{m}$  の長い繊維は、anaphase において 2 つの娘細胞の間でブリッジ構造を形成し、サイトキネシス障害によって二核細胞を形成していることを確認した。この物理的なサイトキネシス障害は、前述の石綿で起きるそれと大変類似していた。

## B. 研究方法

### (1) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

本研究で使用された MWCNT は、MITSUI 製 MWCNT-7 (Lot No. 060125-01k) である。Takagi らの報告によると、その MWCNT 繊維の幅の長さは約 100nm、そして、長さ 5  $\mu\text{m}$  以上の MWCNT が 27.5% 含んでいる。MWCNT は、0.5% メチルセルロース (Shin-Etsu Chemical Co., Ltd.) 溶液で 3mg/ml に懸濁させ、121 度で 15 分間オートクレーブした。

その後、Tween 80 (Tokyo Chemical Industry Co., Ltd.) が最終濃度 1.0%になるように添加された。その溶液は、ultrasonic homogenizer (VP30s、TAITEC Co. Japan) を用いて超音波処理を行った。

## (2) 細胞培養

我々は、染色体を赤 (mCherry 融合 HistoneH3)、および動原体を緑 (EGFP 融合 CENP-A) の蛍光タンパク質で染色した 2 色の可視化 MDA-435 細胞を Dr. Kenji Sugimoto (Osaka Prefecture University, Osaka, Japan) から分与して頂いた。その細胞を D-MEM 培地 (10%牛胎児血清) 中で、37°C で培養 (二酸化炭素 5%、湿度 100%) した。

## (3) ライブセルイメージング解析

我々は、細胞を培養しながら撮影するためにヒューミッドチャンバーを備えたレーザー蛍光顕微鏡 FV1000 (Olympus Corp.) を使った。また、multi-Ar と He-Ne G レーザー、および 60 倍 (1.20 NA) の対物レンズを用いた。撮影中は、35mm ガラスベースディッシュ (IWAKI, ASAHI GLASS CO. Ltd., Tokyo) を用いて、 $5 \times 10^5$  の MDA-435 細胞を 2ml の D-MEM 培地中で培養 (37°C、二酸化炭素 5%、湿度 100%) した。細胞毒性を有するレーザー出力に対して、コントロール細胞が 24 時間後に 50%以上の細胞分裂が認められるようなマイルドなレーザー出力 (細胞毒性を最小限にするため) で実験を行った。得られた画像は、ボロシティソフトウェア (Improvision Inc., USA) で編集し動画を解析した。タイムラプス解析は、MWCNT (最終濃度 0、12.7、25.3、50.6  $\mu\text{g/ml}$ ) を培地に添加してから、分裂中期の細胞が多い撮影視野について 5 分ごとに 48~72 時間撮影した (z 軸方向は 2.0  $\mu\text{m}$  毎に撮影)。各濃度において、撮影視野にあ

る全細胞をカウントし、そのなかで細胞分裂できた細胞、分裂できずに死に至る細胞、および二核を形成する細胞のそれぞれの頻度 (%) をその全細胞数で除することによって算出した。

## C. 研究結果および考察

### (1) MWCNT のエンドサイトーシス

MWCNT のエンドサイトーシスがどのように行われるかを調べるために、50.6  $\mu\text{g/ml}$  の MWCNT 濃度でタイムラプス撮影を行った。その結果、MWCNT 添加後、数時間のうちに CNT 繊維を積極的に収集し取り込む細胞 (Fig. 1A, Supplementary movie 1) とそうでない細胞が存在した。human neonatal epidermal keratinocytes 細胞を用いる実験でも 24 時間以内で MWCNT を容易に取り込むことが報告されている。そして、細胞内に取り込まれた CNT 繊維は、細胞外に排出されることなく長時間とどまり、細胞分裂後も娘細胞のどちらかに移動した。また、細胞の表面に刺さる CNT 繊維が頻繁に観察された (Fig. 1B)。72 時間後、未処理のコントロール細胞群では、多核など異常な細胞はほとんど観察されなかった (Fig. 1C)。一方、MWCNT 処理の細胞群では、ほとんどの細胞が CNT 繊維と絡み合った状態にあり、多核細胞の存在を多く観察することができた (Fig. 1C)。

### (2) MWCNT の細胞毒性および二核細胞の出現頻度

MWCNT (0、12.7、25.3、50.6  $\mu\text{g/ml}$ ) を含む培地で MDA-435 細胞の挙動を 37 度で 72 時間タイムラプス撮影した。各濃度において 3 度実験を行い、それぞれ 232、112、170、282 の細胞を撮影した (Table 1)。MWCNT 未処理の細胞では、232 細胞中 93 (40%) が細胞分裂を完了することができ、わずか 4 細胞 (1.7%) が細胞分裂中に死に至った。MWCNT

処理群では、各濃度 (12.7、25.3、50.6  $\mu$ g/ml) に対して、細胞分裂できた細胞数はそれぞれ 40 (38%)、49 (27%)、34 (12%)、そして、細胞死に至った数はそれぞれ 4 (3.2%)、11 (5.9%)、21 (7.6%) であった。MWCNT 濃度の増加に相関して細胞分裂数は減少し、細胞死数は増加したことから、MWCNT の濃度依存的に細胞毒性が上昇していた。また、二核細胞の数は、それぞれ 0、5 (3%)、1 (0.4%) になった。二核細胞の出現頻度が 25.3  $\mu$ g/ml よりも最高用量の 50.6  $\mu$ g/ml が低くなった理由は、前述のとおり最高用量では細胞分裂できる頻度が低く、また、そもそも分裂期に入れず撮影時間のあいだ間期の状態にある細胞が非常に多かったことが考えられる。

### (3) サイトキネシス障害による二核細胞の形成

MWCNT が関与する典型的な細胞分裂のタイムラプスを Fig. 2 に示した。正常な細胞分裂は、metaphase の染色体分離から 30 分以内に完了した (Supplementary movie 2)。Fig. 2A で示した約 5  $\mu$ m の CNT 繊維が関与する細胞分裂は、未処理の細胞群と同じようにスムーズに行われ 30 分以内に完了した Supplementary movie 3。その短い CNT 繊維は、染色体分離後すぐに娘細胞に移動 (白い矢印 in Fig. 2A) し、核および細胞質の分裂時に致命的なダメージを与えていないものと予想できた。一方、約 20  $\mu$ m の CNT が関与する細胞分裂は、約 3 時間を必要とした (Fig. 2B and Supplementary movie 4)。CNT 繊維が長いと、anaphase で 2 つの娘細胞の間でブリッジ構造を形成し (arrowheads in Fig. 2B)、収縮環内に取り残された (2:30)。その後、核分裂はわずかに遅延するが、小核を発生させずに正常に完了した (2:50)。しかしながら、同時期にサイトキネシスが抑制されるため、次第に

収縮環のくびれが消失した (3:20)。その後、2 細胞の境界線が消失する (4:40) ことで、結果として二核細胞が形成した (5:40、白い点線)。このサイトキネシス障害は、青石綿のそれと非常に良く似ていた。

### (4) MWCNT による酸化的 DNA 損傷

使用された MWCNT は、約 3500ppm の鉄が含まれており、フェントン反応による活性酸素種が細胞ゲノムに酸化的 DNA 損傷を形成させる可能性がある。しかしながら、非常にサイズの小さい小核も検出できる本研究の解析システムであっても、今回の 72 時間の撮影中には CNT 繊維による小核、および染色体の数的異常や複数の中心体が関与する多極分裂の形成等を観察することはなかった。Asakura からも同じメーカーが製造する MWCNT-7 (長さ 5  $\mu$ m 以上は 38.9%、鉄含有は 4400ppm) を用いて、Chinese hamster lung (CHL/IU) 細胞による染色体異常試験、in vitro 小核試験、そして hgpert アッセイを行った結果、すべて陰性という報告がある。しかし、MWCNT 暴露濃度の上昇にともない二核および多核細胞の増加が観察された。これらの結果は、本研究で得られた減少と非常に一致している。つまり、CNT 繊維の毒性は、活性酸素種による DNA 損傷よりも、前述のような物理的なサイトキネシス障害による影響が大きいと考えられる。そして、それは核や染色体に細胞分裂を止めるほど致命的なダメージを与えないため、サイトキネシスの抑制はするが、細胞の二核化、そして倍数化へと分裂させ続けられたものと予想できる (Fig. 1C 中央)。

### D. 結論

これまで実施した 6 種類の MWCNT の染色体異常試験の結果から、外径の長い MWCNT が倍数性細胞を誘発し、比較的外形が短い MWCNT は倍数性細胞を誘発しないことから、

染色体の倍数性誘発には MWCNT の形状、特に太さが関与していると考えられた。MWCNT 暴露時による細胞分裂時の倍数化の発生機序を解明するために共焦点ライブセルイメージング解析を行った。その結果、比較的長い MWCNT (約 20  $\mu\text{m}$  以上) は、細胞分裂時にサイトキネシスを抑制し、二核細胞を形成させたが、短い MWCNT はそうでなかった。よって、MWCNT の初期の毒性作用機序は青石綿のそれと非常に類似していることが明らかとなった。

#### E. 健康危機情報

特になし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

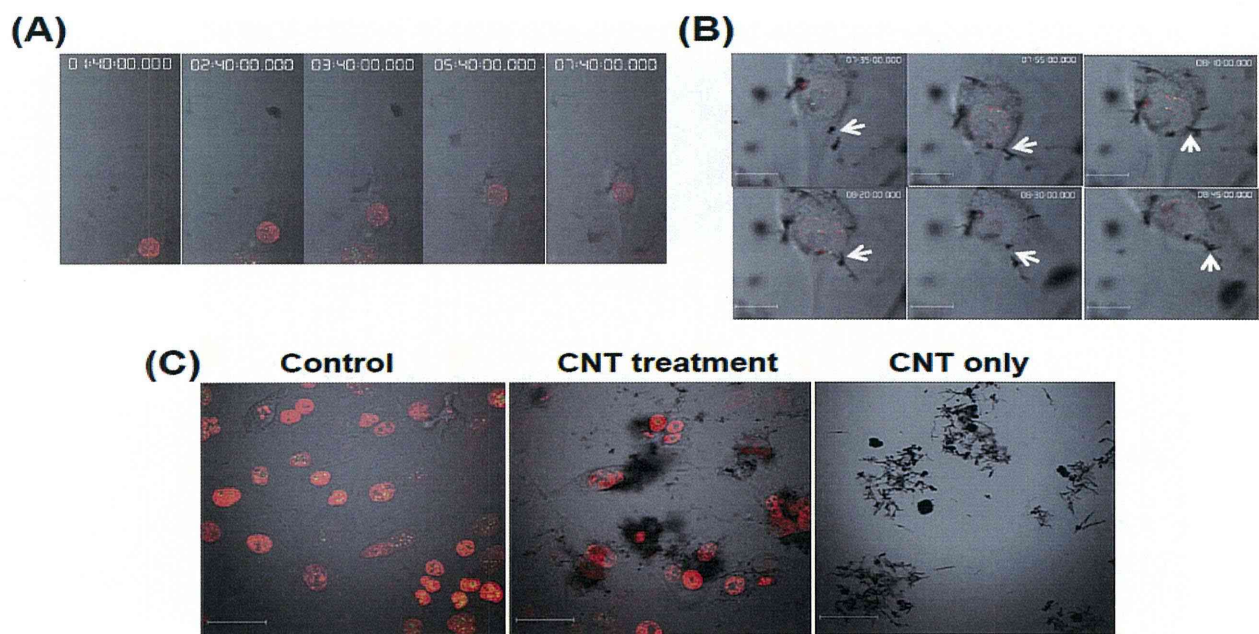
Stefan Pfuhler, Rosalie Elespuru, Marilyn Aardema, Shareen H. Doak, E. Maria Donner, Masamitsu Honma, Micheline Kirsch-Volders, Robert Landsiedel, Mugimane Manjanatha, Tim Singer, James H. Kim, Genotoxicity of Nanomaterials: Refining Strategies and Tests for Hazard Identification. Environment Mol. Mutagen. 54, 229-239 (2013)

##### 2. 学会発表

特になし

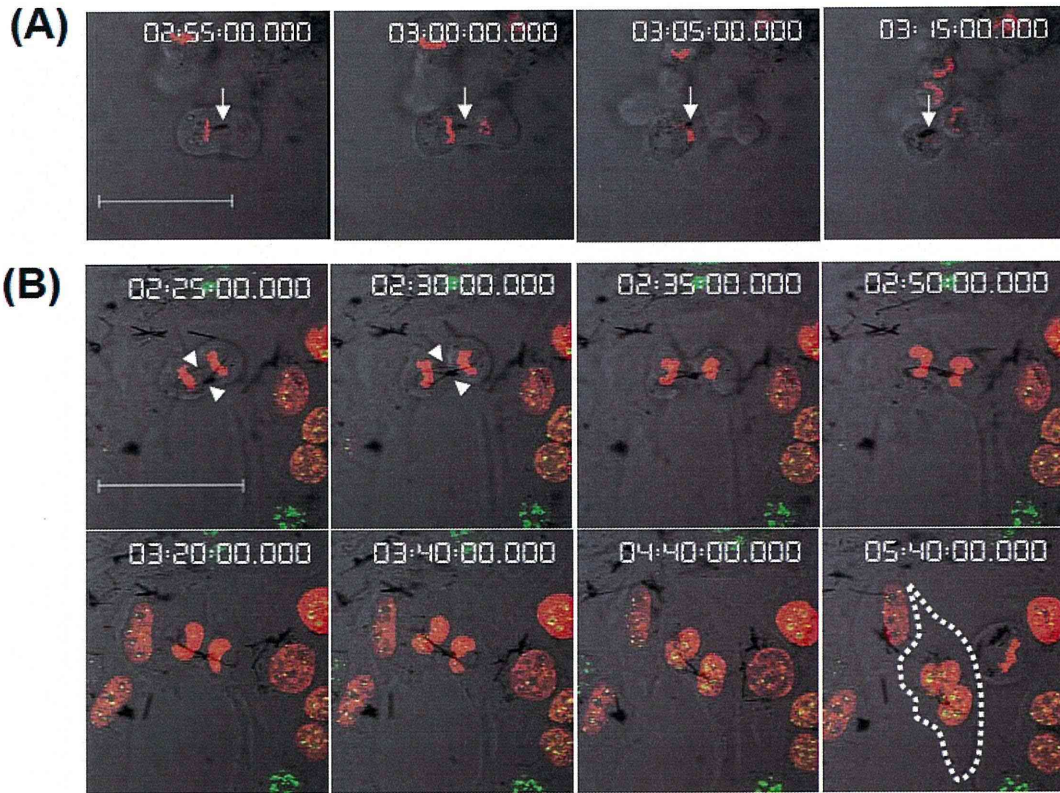
#### G. 知的所有権の取得状況

なし



**Fig.1**

細胞内および外の MWCNT 繊維の分布。(A) 細胞のエンドサイトーシス, (B) 細胞膜に刺さる MWCNT 繊維, (C) MWCNT 未処理 (control) および処理の細胞の比較(72 時間後)



**Fig.2**

Fig. 2. MWCNT 繊維が関与する細胞分裂のタイムラプス解析。(A) 短いMWCNT 繊維 (約  $5\mu\text{m}$ ) は細胞分裂を妨げない。(B) 長いMWCNT 繊維 (約  $20\mu\text{m}$ ) は、サイトキネシスを妨げ、二核細胞を形成させた (5h40min の画像の白い点線)。Time (in h:min) in upper. Bar,  $41\mu\text{m}$ .



Table 1. ライブセルイメージングを用いたMWCNTが関与する細胞分裂の観察

MWCNT( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Experiments	Recorded cells	Divided cells	Dead cells	Binucleated cells
0	1	76	37	1	0
	2	74	27	2	0
	3	82	29	1	0
	<b>total</b>	<b>232</b>	<b>93 (40%)</b>	<b>4 (1.7%)</b>	<b>0</b>
12.7	1	33	16	0	0
	2	32	13	1	0
	3	47	11	3	0
	<b>total</b>	<b>112</b>	<b>40 (38%)</b>	<b>4 (3.2%)</b>	<b>0</b>
25.3	1	38	5	2	1
	2	51	19	2	2
	3	81	25	7	2
	<b>total</b>	<b>170</b>	<b>49 (27%)</b>	<b>11 (5.9%)</b>	<b>5 (3.0%)</b>
50.6	1	86	12	10	1
	2	101	11	5	0
	3	95	11	6	0
	<b>total</b>	<b>282</b>	<b>34 (12%)</b>	<b>21 (7.6%)</b>	<b>1 (0.4%)</b>

研究課題名：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

分担研究課題名：ナノマテリアルの細胞内異物処理メカニズムに関する研究

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 代謝生化学部 部長

#### 研究要旨

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）ならびに高温焼結フラーレンナノウィスカー（HTCFNW）のマクロファージへの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて側方散乱光（SSC）の増加により測定した。また MWCNT-7 および MWCNT-SD1 がマクロファージから IL-6 および IL-1 $\alpha$  の放出を促進すること、これらの応答は自然免疫受容体 NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) に依存していることを siRNA ノックダウンにより明らかにした。

#### A. 研究目的

産業用ナノマテリアルは、特異な物理化学特性から未知の生理作用を有する可能性があり、とりわけ多層カーボンナノチューブ（MWCNT）はアスベストと似た形状を持つことから、ヒトへの健康影響が懸念されている。

気道曝露などにより体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の食食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応である。昨年度までの研究において、針状の多層カーボンナノチューブ MWCNT-7 および-SD1、また高温焼結したフラーレンナノウィスカー（HTCFNW）をマクロファージに曝露すると炎症性サイトカイン IL-1 $\beta$  の産生が亢進すること、またこの応答には NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) を含む インフラマソームが関与することを明らかとした。IL-1 $\beta$  は免疫細胞の活性化や炎症応答の誘導などの多彩な役割を有しており、MWCNT が排除されずに細

胞組織に滞れば、炎症が慢性化することが懸念される。本研究ではナノマテリアルの細胞内での挙動を追跡し、インフラマソーム活性化を介した炎症の慢性化機構を明らかにし、慢性影響の評価につなげることを目的とする。

今年度は MWCNT および HTCFNW のマクロファージへの取り込みと NLRP3 インフラマソーム活性化との関係を解明するとともに、これらのナノマテリアルが他の炎症性サイトカイン産生を促進する可能性とその機序を検討した。

#### B. 研究方法

##### 1. 実験材料および試薬

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は M 社より提供された MWCNT-7（平均長 3.3  $\mu$ m、径 40-50 nm）、S 社より提供された MWCNT-SD1（長さ 8  $\mu$ m、径 150 nm）および SD2（長さ 3  $\mu$ m、径 10-15 nm）を用いた。高温焼結フラーレンナノウィスカー（HTCFNW）-L（長さ 7.6 $\pm$ 4.5  $\mu$ m、径 586

nm) および CNF-S (長さ  $1.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$ , 径  $365 \text{ nm}$ ) は  $900^\circ\text{C}$  熱処理したフラーレンナノウィスカーであり、独立行政法人物質・材料研究機構の宮沢薫一博士が作成したものである。サイトカイン測定にはミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いた。Stealth™ Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

## 2. MWCNT および HTCFCNW の分散

MWCNT-7, SD1 および SD2 は 0.5% Tween 20 あるいは Tween 80 を含む PBS に  $5 \text{ mg/mL}$  の濃度で懸濁し、1~5 分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティングにより分散した。

高温焼結フラーレンナノウィスカー HTCFCNW は、昨年度の報告書においては、非晶質カーボンナノファイバー CNF と記載している。本所毒性部において、0.1% Tween 80 を含む PBS に懸濁・超音波処理し、最終濃度を HTCFCNW-L ( $0.58 \text{ mg/mL}$ ) および HTCFCNW-S ( $0.62 \text{ mg/mL}$ ) に調整されたものを用いた。

## 3. マクロファージ系細胞からのサイトカイン放出の測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、 $0.3 \mu\text{M}$  PMA と 10% FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化し、さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.002% とした。培養上清を回収後、MILLIPLEX™ MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

## 4. フローサイトメトリーによる細胞への MWCNT の取り込みの測定

PMA 分化した THP-1 細胞を各種 MWCNT あるいは HTCFCNW (Tween 80 を最終濃度 0.002% として分散) に 20 時間暴露した。細胞を洗浄後、トリプシン処理し、10% FBS を含む PBS に懸濁し、 $100 \mu\text{m}$  ナイロンメッシュで濾過した。細胞へのナノチューブ類の取込はフローサイトメトリー (FACSCalibur, BD Biosciences) で側方散乱光 SSC および前方散乱光 FCS を 10,000 カウント測定した。

## 5. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

細胞から RNA は RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems) と ABI Prism 7300 を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

## C. 研究結果

### 1. MWCNT および HTCFCNW のマクロファージへの取り込みの測定

フローサイトメトリーを用いて MWCNT の細胞への取り込みを解析した。側方散乱光 (SSC) は細胞の内部構造や細胞内顆粒の性状に直接に関係しており、マクロファージがラテックスビーズ等を貪食すると SSC 値が増加することが知られている。細胞に MWCNT-7 および SD1 を  $3, 6, 12 \mu\text{g/mL}$  の濃度で暴露すると、 $6 \mu\text{g/mL}$  までは濃度依存的に SSC が増加した。 $6 \mu\text{g/mL}$  における増加はそれぞれ約 40%、50% であり、cytochalasin D ( $0.2 \mu\text{M}$ ) 処理により抑制されることから、これら MWCNT は貪食による細胞内への取り込みが起こったことが推定される。一方、MWCNT-SD2 を暴露した場合には有意な増加は認められなかった。また高温焼結したフラーレンナノウィスカー HTCFCNW-L と HTCFCNW-S はどちらも 20%

の SSC 増加を引き起こし、HTCFNW は長短に関わらず、貪食されることが示唆された。

## 2. MWCNT-7, -SD1 および HRCFNW-L は IL-6 および IL-1 $\alpha$ 産生を促進する

MWCNT-7, -SD1 および HRCFNW-L を 2.2 ~ 6.6  $\mu\text{g/mL}$  の濃度でマクロファージに暴露すると、濃度依存的な IL-6 放出促進が認められた。また MWCNT-7 および -SD1 暴露マクロファージからは IL-1 $\alpha$  の放出が認められた。

## 3. MWCNT-SD-1 は NLRP3 を介して IL-6 および IL-1 $\alpha$ 産生を促進する

昨年度までの MWCNT-7 による IL-1 $\beta$  産生には、Nod 様受容体の一つ NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) が関与することを明らかにした。そこで MWCNT-SD-1 が引き起こす IL-6 および IL-1 $\alpha$  分泌も NLRP3 を介するものかどうか、特異的 siRNA を用いて NLRP3 をノックダウンし調べた。NLRP3 に対する NLRP3 siRNA 三種類(#1, #2, #3)はいずれも細胞内の NLRP3 mRNA の発現量を negative control siRNA (GC high) の約 40% にまで低下させた。このとき MWCNT-SD1 (6.6  $\mu\text{g/mL}$ ) による IL-6 分泌は対象の 9~12% にまで低下した。また IL-1 $\alpha$  分泌も対象の 4~20% にまで低下した。したがって、MWCNT-SD-1 が引き起こす IL-6 および IL-1 $\alpha$  分泌には NLRP3 が関与すると結論される。

### D. 考察

昨年度までの研究において、多層カーボンナノチューブおよび高温焼結フラーレンナノウィスカーをマクロファージに暴露すると、針状の形状と長さに依存して IL-1 $\beta$  放出を促進することを明らかにした。MWCNT-SD1 および -M、HTCFNW-L は強力に IL-1 $\beta$  分泌を促進するが、MWCNT-SD2 および HRCFNW-S の作用は上記物質の数%

と極めて低いことを報告している。

今年度はこれらのナノチューブ類のマクロファージへの取り込みを、フローサイトメトリーを用いて評価した。多層カーボンナノチューブ MWCNT-SD1 および -M は 40-50% の SSC 増加により顕著な取り込みが示されたが、MWCNT-SD2 の取り込みは検出できず、取り込みと IL-1 $\beta$  分泌とに関係が示された。一方高温焼結フラーレンナノウィスカー HRCFNW は長さに関わらず同程度の SSC 増加を示したことから、短い HRCFNW-S は細胞に取り込まれても IL-1 $\beta$  分泌を誘導しないことが示唆された。

引き続き多層カーボンナノチューブや高温焼結フラーレンナノウィスカーをマクロファージに暴露すると、炎症性サイトカイン IL-6 および IL-1 $\alpha$  の産生も促進することを見いだした。特に作用が顕著な MWCNT-SD1 を用いて検討を行い、これらのサイトカイン産生誘導においても Nod 様受容体 NLRP3 が関与することを siRNA でノックダウンにより明らかにした。

NLRP3 を含むインフラマソームは内外の危険因子により活性化され、IL-1 $\beta$  および IL-18 の切断による成熟を促進し、炎症応答の中心として様々な慢性疾患の病態に関わることが明らかにされている。本研究により多層カーボンナノチューブならびに高温焼結フラーレンナノウィスカーが NLRP3 に依存して IL-1 $\alpha$  や IL-6 の産生も誘導することを見いだした。このように複数の炎症性サイトカイン産生を誘導することが、炎症の遷延化や慢性化の機序に関わる可能性が推定される。

### E. 結論

MWCNT ならびに HRCFNW をマクロファージに暴露し、側方散乱光の増加により細胞への取り込みを評価した。またこれらのナノマテリアルは炎症性サイトカイン IL-6 およ

び IL-1 $\alpha$  の産生を NLRP3 依存的に促進することを見いだした。

## F. 研究発表

### 1. 学会発表

1. Nishimaki-Mogami, T, Cui H, Wu W, Okuhira K, Naito M, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D, Miyazawa K, Hirose, A.

High-temperature calcined fullerene nanowhiskers and multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce IL-1beta secretion through NLRP3- dependent mechanism, depending on their lengths EUROTOX 2013 (9.3) (Interlaken, Switzerland)

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）

分担研究報告書

研究課題名：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

分担研究課題名：ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

### 研究要旨

多層型カーボンナノチューブ MWNT-7 および SD-1 について、respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて肺炎マーカーを指標に影響評価を行った。SD-1 曝露 (0.25 mg/kg) マウスの BALF 中では、肺炎増悪化のマーカーであるケモカイン RANTES と MIP-1 $\alpha$  のレベルが対照と比較して 20~30% 程度上昇し、病理組織像で間質性肺炎の若干の増悪化が確認できた。MWNT-7 では、複数回の曝露により低用量 (0.025 mg/kg/day) では有意な MIP-1 $\alpha$  の減少が、逆に高用量 (0.25 mg/kg/day) では有意な上昇が認められた。さらに病理組織像では高用量で顕著な炎症性細胞の浸潤が確認された。また、高度分散化処置 MWNT-7 (Taquan サンプル) を単回曝露で同様に評価したが、通常サンプルとの差別化はできなかった。

### A. 研究目的

多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) は、その物理的特性から IC 基盤の材料などに汎用されている。その一方でマウス腹腔内投与により中皮腫を誘導するなど、アスベスト様の生物災害を引き起こす危険性が多方面から指摘されている。

本研究では、MWCNT の免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響を

respiratory syncytial virus (RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行っている。このモデルではマウスにおけるウイルス由来の肺炎病態の変動を通じて、臭素化難燃剤や有機リン系農薬など化学物質の免疫毒性が評価できることが知られている。

今年度は、BALF 中の RANTES や MIP-1 $\alpha$  などケモカインの変動と肺の病理組織学的な変化の連動性を確認するとともに、MWCNT の複数回曝露の効果を確認することを目的としている。

## B. 方法

### RSV マウス感染実験

MWNT-7 (MITSUI)、高度分散化 MWNT-7 (Taquan サンプル) および SD-1 (S社製) を実験に用いた。これらの MWCNT について、秤量後に超音波破砕機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02% Tween 20 -phosphate buffered saline (PBS) に均一懸濁した。これらの MWCNT (0.01 および 0.1 mg/mL) を 50 uL ずつ BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 ug/g, xylazine 6 ug/g、筋注) で経鼻投与した。なお、対照には 0.02% Tween 20-PBS を投与した。MWCNT 曝露 5 日後あるいは 1、3、5 日後に RSV A2 株  $5 \times 10^5$  PFU を麻酔下で経鼻感染させた。陽性対照にはシクロフォスファミド (CY) を用い、PBS に溶解させてウイルス感染の 5 日前に 100 mg/kg を腹腔内に投与した。RSV 感染 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保管した。その後肺を無菌的に摘出し液体窒素中で急速凍結した。

### BALF 中のサイトカインの定量

IFN- $\gamma$  の定量は eBioscience 社製の Mouse Ready-to-Go ELISA キットシリーズを用い、RANTES および MIP-1 $\alpha$  の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA

キットシリーズを用いた。なおそれぞれの定量は添付のプロトコルに準じて実施した。

### 肺組織の病理組織学的解析

肺の病理組織学的検討を行う際は BALF を取得せず、麻酔下で摘出した肺を中性緩衝ホルマリンで一晩固定した。なお、標本作成は (有) ヴィペック社に委託し、評価は HE 染色下で実施した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

## C. 研究結果

### SD-1 の感染影響

RSV 感染 5 日前に SD-1 曝露 (0.25 mg/kg) を実施したマウスの BALF 中では、肺炎増悪化のマーカーであるケモカイン RANTES と MIP-1 $\alpha$  のレベルが対照と比較して 20~30% 程度上昇していた。その際、肺の病理組織学的検討では、肺胞への炎症細胞の浸潤や肺動脈周辺の巣状リンパ球の浸潤など間質性肺炎の若干の増悪化が確認できた。

### MWNT-7 の複数回曝露による感染影響

MWNT-7 を感染 5、3、1 日前に 3 回曝露して評価を実施した。その結果、BALF 中の IFN- $\gamma$  量はあまり変動しなかったのに対して、低用量 (0.025 mg/kg/day) 曝露群では RANTES と MIP-1 $\alpha$  の有意な ( $P < 0.001$ ) 減少が認められた。一方、高用量 (0.25

mg/kg/day) では逆に有意な ( $P<0.001$ ) 上昇が認められた。病理組織学的な検討を実施したところ、高用量では肺胞中隔へのリンパ球や好中球の浸潤による肺胞中隔の肥厚がコントロール群と比較して顕著であった。なお、低用量ではその差が小さかった。

高度分散化MWNT-7曝露による影響  
高度分散化処置MWNT-7 (Taquannサンプル) をRSV感染5日前に単回曝露 (0.025 mg/kg/day) し同様に評価した。その結果、BALF中のIFN- $\gamma$ レベルやRANTES、MIP-1 $\alpha$ レベルは通常のMWNT-7と比較して顕著な優位性は示さなかった。今後、複数回曝露および高用量曝露において検討を実施する。

#### D. 考察

MWNT-7およびSD-1を曝露したRSV感染マウスでは、MIP-1 $\alpha$ などBALF中の肺炎マーカーの変動を肺の病理組織学的な検討で確認できた。とくに肺胞中隔への炎症細胞の浸潤などRSV感染での間質性肺炎の増悪化を良く反映していた。今後もMIP-1 $\alpha$ 等のケモカインが重要な影響指標と考えている。

MWNT-7の頻回曝露では、RANTESを含め、これらのマーカーが二相性の変動(低用量での減少と高用量での増加)を示した。しかしながら、病理組織学的な検討では、低用量での増悪化はあまり顕著ではなかった。MIP-1 $\alpha$ の産生は主にマクロファージであるため、RAW264.7

など *in vitro* 培養マクロファージ細胞を利用して生理的な意義や増悪化への寄与などを検証する予定である。

高度分散化サンプルでは、肺組織への分布能が高いことが推測されるため、今後Taquannサンプルの頻回曝露による感染影響を検討する予定である。そしてこれらの結果を総括してナノマテリアルの感染影響の標的細胞を明らかにしていきたい。

#### E. 結論

1. MWNT-7およびSD-1曝露マウスでは、MIP-1 $\alpha$ などBALF中の肺炎マーカーの変動について病理組織学的に肺炎増悪化を確認できた。
2. MWNT-7の頻回曝露では、MIP-1 $\alpha$ 等の肺炎マーカーが二相性の変動を示した。

#### F.健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

1. 論文発表  
Watanabe, W., Yoshida, H., Hirose, A., Akashi, T., Takeshita, T., Kuroki, N., Shibata, A., Hongo, S., Hashiguchi, S., Konno, K., Kurokawa, M. Perinatal exposure to insecticide methamidophos suppressed production of proinflammatory cytokines responding to virus infection in lung tissues in mice. *BioMed. Res. Int.* (2013) 2013, Article ID 151807, 7 pages.



Doi:10.1155/2013/151807.

Takeshita, T., Watanabe, W., Toyama, S., Hayashi, Y., Honda, S., Sakamoto, S., Matsuoka, S., Yoshida, H., Takeda, S., Hidaka, M., Tsutsumi, S., Yasukawa, K., Park, Y.K., Kurokawa, M. Effect of Brazilian propolis on exacerbation of respiratory syncytial virus infection in mice exposed to tetrabromobisphenol A, a brominated flame retardant. *Evid.-Based Compl. Alt. Med.* (2013); 2013:698206. doi: 10.1155/2013/698206..

Takeda, S., Kawahara, S., Hidaka, M., Yoshida, H., Watanabe, W., Takeshita, M., Kikuchi, Y., Bumbein, D., Muguruma, M., Kurokawa, M. Effect of oral administration of probiotics from Mongolian dairy products on Th1 immune response in mice. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (2013) 77, 1372-1378.

Konno, K., Miura, M., Toriyama, M., Motohashi, S., Sawamura, R., Watanabe, W., Yoshida, H., Kato, M., Yamamoto, R., Yasukawa, K., Kurokawa, M. Antiviral activity of diarylheptanoid stereoisomers against respiratory syncytial virus *in vitro* and *in vivo*. *J. Nat. Med.* (2013) 2013 67(4):773-81.

## 2. 学会発表

橋口誠子、吉田裕樹、徳田健治、紺野

克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡  
多層型カーボンナノチューブ曝露に  
よる RS ウイルス感染免疫への影響、  
第 61 回日本ウイルス学会学術集会、  
2013.11.10, 大阪、ポスターP1-032

橋口誠子、吉田裕樹、徳田健治、紺野  
克彦、明石 敏、広瀬明彦、黒川昌彦、  
渡辺 渡 多層型カーボンナノチュ  
ーブ曝露による RS ウイルス感染免疫  
への影響、日本薬学会第 134 年会、  
2014.2.28, 熊本、ポスター28pmS-064

Wataru Watanabe, Hiroki Yoshida,  
Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa  
Perinatal exposure to an insecticide  
methamidophos affected the immune  
response to virus infection in the next  
generation of mice. EUROTOX2013,  
(2013.9.2) (Interlaken, Switzerland),  
poster P11-15

## H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他

平成 24 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）

分担研究報告書

研究課題名：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

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

研究分担者：石丸 直澄 徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部教授  
研究協力者：菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長  
研究協力者：高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長  
研究協力者：高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部主任研究官

研究要旨

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本研究では、多層化カーボンナノチューブの長期における免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。正常マウスへのカーボンナノチューブの腹腔内投与後 18 ヶ月では、脾臓における M1 マクロファージの割合が増加していることが判明した。自己免疫疾患モデルである MRL/lpr マウスへのカーボンナノチューブの腹腔内投与により、投与後、1、2 ヶ月で血清中のリウマチ因子の有意な低下が見られた。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さらに、カーボンナノチューブの吸入曝露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ曝露により抑制されることが報告されている。これまでに報

告されてきた *in vivo* の研究は曝露後数週間での解析がほとんどで、ナノマテリアルの曝露から慢性的な免疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。本研究では、カーボンナノチューブの投与による免疫システムへの影響を長期間観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価することを目的としている。平成24年度には、カーボンナノチューブの投与後7

ヶ月までの解析を行い、末梢でのT細胞分化(CD4、CD8、Th17)に影響が及ぼされている可能性、サイトカイン分泌に変化が生じる可能性が示された。今年度はさらにカーボンナノチューブ投与後18ヶ月における、免疫システムへの影響を解析した。加えて、自己免疫疾患モデルマウスにカーボンナノチューブを投与することによる免疫制御機構への影響を検討した。

## B. 方法

### マウス

2ヶ月齢のC57BL/6マウス(雌)(日本SLC)、MRL/*Ipr*(雌)(チャールスリバー)を用い、各群5匹ずつで多層化カーボンナノチューブ(MWCNT)を腹腔内に投与し、1ヶ月毎に末梢血単核球を分離した。B6マウスに関しては投与後18ヶ月にて解析し、MRL/*Ipr*マウスに関しては投与後6ヶ月で解析した。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

### MWCNT

多層化カーボンナノチューブはMWCNT-7(保土ヶ谷化学)を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官によりTaquann処理されたMWCNTを供与された。溶媒として0.1%Tween80/生理食塩水が用いられ、1 $\mu$ gおよび10 $\mu$ gの

MWCNTが腹腔内に注射された。

### フローサイトメトリー解析

MWCNTの投与マウスの脾臓及び腸間膜リンパ節から単核球を採取し、蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー(CD4、CD8、B220、NK1.1、CD11b、CD11c)に対する抗体にて染色後、解析装置(FACSCant BD Biosciences)にてそれらの発現を経時的に検討した。また、細胞内転写因子(Foxp3)の発現に関しては、表面マーカー抗体染色後に、0.2%パラホルムアルデヒド含有固定液(eBioscience)にて固定、洗浄後、サポニン含有処理液(eBioscience)を用いて細胞膜透過性を向上させ、蛍光標識転写因子抗体にて染色、洗浄を行った。

### ELISA法

MRL/*Ipr*の血清を用いて、リウマチ因子(RF)をELISA法にて定量化した。測定にはMouse Rheumatoid Factor Ig's ELISA Kit(AlphaDiagnostic International)を使い、添付のプロトコルに従って解析した。

## C. 研究結果

8週齢雌C57BL/6マウスに0、1、10 $\mu$ g量のMWCNTを腹腔内投与後、体重は投与18ヶ月まで3、6、12ヶ月の時点でそれぞれの群で有意な差は観察されなかった(図2)。

MWCNTの投与による肉眼的変化として、腹膜の粗造な肥厚(図3A)、乳糜腹水の貯留(図3B)、脾臓および腎臓被膜の白濁(図3B)に加えて、肝臓の分葉状変化(図3C)が投与群5匹中2匹あるいは3匹で認められた。腸間膜リンパ節の細胞数は

MWCNT投与で有意に減少していた(図4)。MWCNT投与後18ヶ月での脾臓と腸間膜リンパ節におけるT細胞分画をフローサイトメーターで検討すると、脾臓においてCD4陽性及びCD8陽性T細胞の割合が減少傾向であったが統計学的な有意差はなかった(図5)。さらに、Foxp3陽性CD4陽性の制御性T細胞の割合に関しても、脾臓、腸間膜リンパ節での割合はWMCNT投与によって変化は観察されなかった(図6)。また、脾臓、腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画について検討した。B220陰性Thy1.2陰性F4/80陽性におけるCD11cあるいはCD206にてM1マクロファージ(炎症性マクロファージ)とM2マクロファージ(抗炎症性マクロファージ)の分化パターンを解析すると、WMCNT投与によって脾臓におけるM1マクロファージに分画の割合が対照群に比較して有意に増加していることが判明した(図7)。さらに、M1/M2比を検討すると、高濃度のMWCNT投与で有意に上昇していることも明らかになった(図7)。腸間膜リンパ節ではM1およびM2マクロファージへの分化パターンにMWCNT投与で変化は見られなかった(図7)。

自己免疫疾患(関節リウマチ、SLE)の代表的動物モデルマウスであるMRL/lprマウスおよび対照マウスであるMRL+/+マウスを用いて、MWCNTを8週齢にて腹腔内に投与して、投与後6ヶ月にて免疫系の解析を加えた(図8)。投与後6ヶ月での体重に関しては、MWCNT投与で各群ともに変化は無かった(図9)。脾臓の重量に関しては、MRL/lprマウスにおいてMWCNT投与にて低下していた(図10)。さらに、脾細胞数はMRL/lprおよび

MRL+/+マウスのいずれもMWCNT投与で減少することが判った(図10)。

T細胞分画に関して検討すると、MRL/lprマウス、MRL+/+ともにMWCNT投与にてCD4/CD8分画に大きな変化は認められなかった(図11)。また、脾臓におけるFoxp3陽性CD4陽性の制御性T細胞の割合はMWCNT投与にて変化はなかった(図12)。さらに、MWCNT投与によるT細胞の活性化に対する影響をCD44およびCD62Lにて検討すると、それぞれの群でMWCNTの投与による影響は認められなかった(図12)。

一方で、MWCNT投与によるマクロファージおよび樹状細胞の分画への影響を検討すると、それぞれの群でMWCNT投与による変化は観察されなかった(図13)。

MWCNTの投与から1ヶ月毎に血清中のリウマチ因子をELISAにて検討すると、投与後1ヶ月および2ヶ月でのリウマチ因子の濃度が高濃度のMWCNT投与群で有意に低下していることが判明した(図14)。3ヶ月以降はMWCNT投与による影響は見られなくなった(図14)。

#### D. 考察

MWCNTの暴露に関する*in vivo*の研究では、吸引による暴露の影響を評価したものが多く、肺を中心としたマクロファージの活性化や分布などが焦点とされてきた。今回の研究では、腹腔内へのMWCNT投与でによる長期暴露を通して、全身の免疫システムへの影響を正常マウス及び自己免疫疾患モデルマウスを用いて検討を加えた。