

平成 2 5 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

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: 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（H24-化学-指定-009）

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究

研究分担者： 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 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

本研究では、高生産量ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行い、ナノマテリアルによる生体影響評価のための、特に慢性影響・遅発影響を適切に検出する評価手法の開発を目標としている。先行研究において、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）をアスベスト中皮腫発癌に高い感受性を示す p53+/-マウス腹腔内投与モデルに適用して評価し、MWCNT が 3～3,000 μg /動物の範囲で用量依存的に中皮腫を誘発することを示した。その際、中皮腫の誘発には散在性の MWCNT 孤立繊維を貪食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、他方、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽種及びその線維化瘢痕形成は中皮腫発癌に寄与しないことが示唆された。ナノマテリアル検体の分散状況が毒性強度、性質に大きく寄与することが判明したことから、我々は MWCNT を例に、高度に分散する検体調製方法（Taquann 法、特許出願中）を独自に開発し、研究を進めた。H24 年度は、Taquann 法処理検体を用い、腹腔内投与時の生体反応が分散状態に依存することを明らかにすることと、中皮腫発癌過程と血中 Mesothelin 値の関係を明らかにすることを兼ね、10 μg /動物の Taquann 法処理 MWCNT（T-CNT）を p53+/-マウス腹腔内に単回投与する実験を行った。その結果、中皮腫誘発は、初発までの潜伏期間、初期病理組織像を含め、今までの我々の実験結果と良く一致した。その際、検体の重量ベースで、発癌性が従来法による検体の大凡 200 μg /動物に相当することが判明した。これは、T-CNT が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと良く一致していた。この結果は、繊維一本が中皮腫を誘発する確率が等しいこと、散在した繊維を貪食したマクロファージによる所謂 frustrated phagocytosis に相当すると考えられる非肉芽腫性の局所性遷延性慢性炎症巣が重要であるという仮説を支持するものであった。

H25 年度は、MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的の実験を行った。その結果、T-CNT 10 μg /動物の単回腹腔内投与により、野生型マウスにおいても中皮腫が誘発されることを確認した。p53+/-マウスに単回腹腔内投与した実験の中皮腫発癌の初発時期は 134 日、野生型マウスでの初発時期は 204 日であった。何れも、文献で報告されている Crocidolite の初発時期よりも早期であった。本研究で投与した繊維数は、T-CNT は約 3×10^7 本/動物、Crocidolite は約 9×10^7 本/動物であり、繊維数は Crocidolite が約 3 倍程度多

い。重量ベース、繊維数ベースにおいても MWCNT は Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられた。その理由として、MWCNT は、frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれることが考えられた。表面活性の差の可能性については、さらなる検討が必要であると考えられた。

A. 研究目的

本研究では、高生産量ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行い、ナノマテリアルによる生体影響評価のための、特に慢性影響・遅発影響を適切に検出する評価手法の開発を目標としている。

平成 18～20 年度の厚生労働科学研究「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価及び体内動態評価に関する基盤研究」の分担研究課題「高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究」では、過去にアスベスト代替繊維の発癌性評価に用いられた腹腔内投与試験系と、Agnes Kane らの p53+/- マウスにおけるアスベスト中皮腫発癌の知見¹⁾を基盤に、MWCNT が雄性 p53 +/- マウス腹腔内投与により 3 µg/動物から 3,000 µg/動物の範囲で、用量依存的に中皮腫を誘発することを示した^{2,3)}。

その際、初発までの潜伏期間に用量依存性が認められないこと、及び、中皮腫前駆病変と考えられる異型中皮過形成巣の誘発には散在性の MWCNT 単離繊維を貪食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽腫及びその線維化瘢痕はそれに寄与しないことが示唆された。尚、これらの実験では MWCNT 原末を一般的な分散方法で調製しており、投与検体には凝集体を含んでいた。ここでの経験、及び気管内投与と文献の知見から、MWCNT の生体影響を正しく評価するためには、凝集体を含まない、より高度に分散された検体を使用することが重要であることが再認識された。

そこで、本研究では実験動物による MWCNT

の生体影響の評価・予測の人への外挿を高める為に、MWCNT の原末に含まれる凝集体を高率に除去し単離繊維を高度に分散する方法 (Taquann 法、特許出願済) を開発し、動物実験用の検体として使用している⁴⁾。

H24 年度には、Taquann 法処理した MWCNT を p53+/- マウス腹腔内投与モデルに適用し、経時的に採血を行い、血清 Mesothelin 測定を試料に供すると共に、中皮腫発癌までを経時的に組織観察し、既に実施した実験 (MWCNT 原末を一般的分散法により投与) の組織変化との比較を行った。その結果、中皮腫誘発は、初発までの潜伏期間、初期病理組織像を含め、先行研究の実験結果と良く一致した。一方、検体の重量ベースで、Taquann 処理検体の 10 µg/動物の発癌性が従来法による検体の大凡 200 µg/動物に相当することが判明した。これは、Taquann 処理検体が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと良く一致していた。

H25 年度は、MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的で実験を行った。H24 年度の実験と同様に、T-CNT 10 µg/動物を野生型マウスに単回腹腔内投与し、その後 1 年 6 箇月の観察を行う計画で実験を開始した。

B. 研究方法

B-1. 検体

1) MWCNT

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm) ^{a)}
長さ	1-19 µm (> 5 µm 27.5%) ^{a)}
繊維数	3.55 × 10 ¹¹ 本/g ^{a)}
製品形状	繭状凝集体及び単離繊維

化学組成	炭素純度 99.5%以上
	鉄：3500 ppm(0.35%) ^{a)}
	硫黄：470 ppm ^{a)}
	塩素：20 ppm ^{a)}
	フッ素：<5 ppm ^{a)}
	臭素：<40 ppm ^{a)}

^{a)}東京都健康安全研究センターの測定データ^{2,3)}

MWNT-7の原末はTaquann法⁴⁾を適用して使用した。以下、T-CNTと記載する。

Taquann法は、走査型電子顕微鏡(SEM)の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念と、液相での分散と濾過を組み合わせた技術であり、濾液の分散媒を除去する際に表面張力を生じないため、分散質の分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、MWCNT原末を三級ブタノール(TB、融点；25.69、関東化学株式会社 特級)に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルター(セイシン企業、目開き 25 μ m)でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ(Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK)により減圧し、液相を介さずに昇華させ、TBを分離除去することで、分散性の保たれた乾燥状態のMWCNTを得る。

T-CNTには、 3×10^6 本/ μ gの繊維数が含まれる⁴⁾。

2) Crocidolite (陽性対照)

Crocidolite (UICC-grade)は国立医薬品食品衛生研究所で保管している検体を使用した²⁾。Crocidoliteには 2.93×10^9 本/mgの繊維数が含まれる^{2,5)}。

3) 溶媒

溶媒は0.1%Tween80(「日局」ポリソルベート 80 (HX)、日油株式会社)を含む生理食塩液(大塚製薬工場)を用いた。

4) 検体の調製方法

T-CNTとCrocidoliteはガラスバイアル内で生理食塩液と混合、オートクレーブで滅菌処理した後にTween80を添加し、超音波浴槽(SU-3TH、出力40W、発振周波数34kHz、柴田科学)で超音波を5分間照射し、懸濁液とした。

B-2. 使用動物、飼育管理

1) 使用動物

先行研究では、C57BL/6NCrSlc(日本エスエルシー株式会社)をバックグラウンド(40代以上)とするp53^{+/+}-マウス(自家繁殖)を使用して研究を進めてきたのに対し、本研究では、C57BL/6NCrSlcの野生型雄性マウスを使用した。合計260匹の6週齢マウスを1週間の期間を空けて130匹ずつ2回に分けて購入し、6週間の馴化期間を設け12週齢で実験に供した。

2) 飼育管理

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1ケージ当り10匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置(VICシステム、ダイダン株式会社)を使用した。飼育条件は、温度； 25 ± 1 、湿度； $55 \pm 5\%$ 、換気回数；約20回/h、照明時間；8時~20時点灯(照明明暗サイクル12時間)とし、固型飼料CRF-1(オリエンタル酵母工業株式会社)を付属の給餌器を使用して自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

個体識別は、耳介にハサミで切り込みを入れる方法で行った。

全ての動物について、一般状態観察を2日毎、体重測定を4週間毎に実施した。一般状態の悪化が認められた動物は直ちに解剖に供した。

B-3 群構成、投与 (表 1)

1) 群構成

動物は媒体対照群80匹、T-CNT100匹、Crocidolite投与群80匹に設定した。最初に購入した130匹の動物をAグループ、2回目に購入した130匹をBグループのサブグループとし、それぞれのサブグループ毎に、投与前日の体重を指標にして群わけを行った。投与前日の体重の平均は、Aグループ 27.2 ± 1.6 g、Bグループ 26.2 ± 1.5 gであり、グループ間に差は認められなかった。

2) 投与

投与量は0.5mL/動物とした。媒体対照群には溶媒のみ、T-CNT群には10 μ g/動物、Crocidolite群には30 μ g/動物を単回腹腔内投与した。T-CNT群では、動物1匹当たりに投与した繊維数は、約 3×10^7 本である。Crocidolite群では、動物1匹当たりに投与した繊維数は約 9×10^7 本である。

B-4 解剖及び病理組織標本

1) 解剖及びサンプリング

投与後20週毎に10~20匹の動物を定期解剖に供し、観察期間1年6カ月(80週)の計画とした。

動物は吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用いイソフルラン(イソフル、DSファーマアニマルヘルス)麻酔下で眼窩より採血し、腋下動脈を切断して放血による安楽死後に剖検を行った。血液は、室温で約30分静置後、4、2,500 \times gで血清を分離し-80 $^{\circ}$ Cで保存した。肝、腎(左右)、脾、心は固定前重量を測定した。全ての臓器は10%中性緩衝ホルマリンで固定した。横隔膜は胸郭下口に付着させた状態で固定した。腹壁はろ紙に伸展させ、ゴム板に虫ピンで固定した後に固定液に浸漬した。

2) 病理組織標本

固定後に臓器を切り出しし、常法に従って脱水、パラフィン包埋し、薄切してH&E染色標本作製した。

組織中のMWCNTの観察は、偏光フィルタ

ーを装着した通常の光学顕微鏡(オリンパスBX50+DP70)及び、高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム(High Resolution Adapter (HRA)、CytoViva[®])を使用した。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

本年度、投与後20週及び40週の定期解剖を実施した。現在、投与後50週を経過し観察を継続中である。

C-1 体重推移

投与開始時の平均体重は媒体対照群 26.8 ± 1.6 g、T-CNT群 26.8 ± 1.8 g、Crocidolite群 26.5 ± 1.6 gであった。

T-CNT群では、投与16~32週、44週に有意な体重増加抑制が認められた。

Crocidolite群では、投与後4~32週、40~44週に有意な体重増加抑制が認められた。

C-2 臓器重量

1) 投与後20週の定期解剖

各群19匹の解剖を行った。

T-CNT群の腎、脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意増加が認められた。

Crocidolite群では、脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意増加が認められた。

2) 投与後40週の定期解剖

各群10匹の解剖を行った。

T-CNT 群では、臓器絶対重量及び相対重量に媒体対照群との間に差は認められなかった。

Crocidolite 群では、肝の相対重量に有意な増加が認められた。

C-3 剖検所見

1) 定期解剖

(1) 投与後 20 週

媒体対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。

T-CNT 群では、腎、脾の被膜（漿膜）のびまん性網状肥厚が 10/19 例、肝の辺縁鈍化が 16/19 例に認められた。

Crocidolite 群では、全ての動物に異常は認められなかった。

(2) 投与後 40 週

媒体対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。

T-CNT 群では、肉眼的に腎、脾の被膜（漿膜）のびまん性網状肥厚が 10/10 例、及び、被膜肥厚起因すると考えられる肝の辺縁鈍化が 9/10 例に認められた。

Crocidolite 群では、全ての動物に異常は認められなかった。

2) 途中死亡例と切迫屠殺例（投与後 50 週まで）

(1) 媒体対照群

2 例の死亡が認められ、3 例を切迫屠殺に供した。死亡例はファイティングによる外傷 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 1 例であった。切迫屠殺例は、肺水腫とそれに伴う心拡張（肺性心）が 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 1 例、斜頸と体重減少を認めたもの 1 例であった。

(2) T-CNT 群

3 例の死亡が認められ、8 例を切迫屠

殺に供した。死亡例は、肺水腫とそれに伴う肺性心が 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 1 例であった。切迫屠殺例では、5 例に中皮腫を認め、初発例の解剖は投与後 204 日であった。一般状態観察において腹部膨満を認め、解剖では血性腹水の貯留、胃大弯部に壁外発育型の腫瘤病変、横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面に微細白色顆粒状の播種様の中皮腫病変を認めた。その他、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、胸腺腫 1 例、胸腺の黄緑色、腎及び脾の漿膜のびまん性網状肥厚、肝の辺縁鈍化認めたもの 1 例であった。

(3) Crocidolite 群

2 例の死亡が認められ、5 例を切迫屠殺に供した。死亡例は腎と腹壁の癒着を認めたもの 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 1 例であった。切迫屠殺例では、ファイティングによる外傷 1 例、嚢胞腎 2 例、脾及び鼠径リンパ節腫大と精嚢硬化を認めたもの 1 例、肺水腫とそれに伴う肺性心を認めたもの 1 例であった。

C-4 病理組織検査

T-CNT 群で認められた辺縁が鈍を呈した肝臓では、漿膜がびまん性に 20～100µm 程度の線維性肥厚を示していた。現在、詳細な評価を進めている。

C-5 Kaplan-Meier 法による中皮腫による死亡率

投与後 50 週目までを観察期間として、中皮腫による死亡率について、Kaplan-Meier 法により計算した結果、p53+/- マウスでは中皮腫発癌による死亡の初発時期は 134 日、野生型マウスでの初発時期は 204 日であった。

D. 考察

本分担研究では、MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的で実験を行った。T-CNT 10 µg/動物を単回腹腔内投与し、野生型マウスにおいても p53+/-マウスと同様に中皮腫が誘発されることが明らかとなった。病理組織の詳細な評価については現在実施中である。中皮腫が誘発されて切迫屠殺を実施した例では、一般状態観察において腹部膨満を認め、解剖では血性腹水の貯留、胃大弯部に壁外発育型の中皮腫、横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面に微細白色顆粒状の中皮腫を認めた。これらの所見は、p53+/-マウスで中皮腫が誘発され切迫屠殺した際の所見と同様であった。

野生型マウスに比較して、p53+/-マウスはアスベスト腹腔内投与による中皮腫発癌に高い感受性を示すことが報告されている¹⁾。p53+/-マウスでは、200 µg の Crocidolite を週 1 回、12 週間の腹腔内投与により約 30 週後に中皮腫が誘発されるが、野生型マウスでは 60 週を超えた時期に観察されている。

先行研究では、このモデルを適用し、MWCNT が 3~3,000 µg/動物の範囲で用量依存的に中皮腫を誘発することを示した^{2,3)}。その際、初発時期に用量依存性の早期化が認められないこと、及び、中皮腫の誘発には散在性の MWCNT 単離繊維を貪食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、他方、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽種及びその線維化癩痕形成は中皮腫発癌に寄与しないことが示唆された。

H24 年度の実験では、検体の重量ベースで、Taquann 処理検体の 10 µg/動物の発癌性が従来法による検体の大凡 200 µg/動物に相当することが判明した。これは、T-CNT が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと

良く一致していた。この結果は、繊維一本が中皮腫を誘発する確率が等しいこと、散在性の繊維を貪食したマクロファージによる所謂 frustrated phagocytosis に相当すると考えられる非肉芽腫性の局所性遷延性慢性炎症巣が重要であるという仮説を支持するものであった。

T-CNT 10 µg/動物を p53+/-マウスに単回腹腔内投与した実験では中皮腫発癌の初発時期は 134 日、野生型マウスに投与した場合の初発時期は 204 日であった。何れも、文献で報告されている Crocidolite の初発時期よりも早期である。本研究においても、50 週を経過した時点で Crocidolite 群には中皮腫が観察されていない。

T-CNTには、約 3×10^6 本/µgの繊維が含まれ⁴⁾、Crocidoliteには 2.93×10^9 本/mgの繊維が含まれる^{2,5)}。本実験で投与した繊維数は、T-CNTで約 3×10^7 本/動物、Crocidoliteでは約 9×10^7 本/動物であり、繊維数は Crocidoliteが約3倍程度多い。本研究結果からは、重量ベース、繊維数ベースにおいてもMWCNTはCrocidoliteよりも中皮腫誘発能が高いと考えられる。その理由の一つとして、繊維長の分布が異なっていることが考えられる。T-CNTの繊維長分布は、5 µm以下が32~40%、5 µmを超える繊維が60~64%である。本研究で使用したCrocidoliteの繊維長は測定していないが、5 µm以下が72.5~98.9%、5 µmを超える繊維が1.1~27.4%という報告がある^{6,7)}。MWCNTは、frustrated phagocytosisを引き起こす長さの繊維が多く含まれるため、中皮腫発癌をCrocidoliteより早期に誘発する可能性がある。

E. 結論

本分担研究では、MWCNT が野生型マウスにおいても中皮腫を誘発することを明らかにした。MWCNT は重量ベース、繊維数ベースにおいても Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられ、その機序として

frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれることが原因である可能性がある。MWCNT の表面特性による差については、さらなる検討が必要である。

F. 参考文献

1 . Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53+/- mice. *Toxicol Sci.* 2002 Aug;68(2):331-8.

2. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.

3. 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.* Aug;103(8):1440-4, 2012

4 . Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

5 . Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1987Sep;128(3):426-45.

6 . Langer AM, Mackler AD, Pooley FD. Electron microscopical investigation of asbestos fibers. *Environ Health Perspect.* 1974 Dec;9:63-80.

7 . Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1987 Sep;128(3):426-45.

G. 研究発表

1 . 論文発表

Numano, T., Xu, J., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Furukawa, F., Kanno, J., Hirose, A., Tsuda, H., Suzui, M. (2014), Comparative Study of Toxic Effects of Anatase and Rutile Type Nanosized Titanium Dioxide Particles in vivo and in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev.*;15(2):929-35

Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H (2013) Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol.* 2014 Jan;88(1):65-75

Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J. An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. 2013 *J Toxicol Sci.* 38(4):619-28.

2 . 学会発表

Jun Kanno, An Improved Dispersion Method (Taquann Method) of Multiwall Carbon Nanotube for a Whole-Body Inhalation Exposure System, . the 53rd Annual Meeting of the Society of Toxicology (2014.3.26) Phoenix, USA, poster

菅野 純、炎症と癌 異物発癌としての中皮腫繊維発癌からの考察、平成 25 年度

「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、(2014.2.17)、大津、基調講演

高橋 祐次、小川 幸男、高木 篤也、辻 昌貴、森田 紘一、菅野 純、多層カーボンナノチューブの p53+/-マウス全身暴露吸入実験、平成 25 年度「個体レベルでのがん研究支援活動」ワークショップ、2014 年 2 月 18 日、大津、ポスター

菅野 純、高橋祐次、多層カーボンナノチューブの中皮腫瘍がん性をモデル標的としたナノマテリアル高度分散全身吸入 Taquann システムによるマウス吸入毒性病変評価、第 30 回日本毒性病理学会総会および学術集会、(2014.1.31)、徳島、シンポジウム

Jun Kanno, Nanotoxicology-its chronic aspects, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE2013) , (2013.10.29), Nagoya, Japan, lecture from organizer

Yuhji Taquahashi, Yukio Ogawa, Atsuya Takagi, Masaaki Tsuji, Koichi Morita, Jun Kanno, An Improved Dispersion Method of MWCNT for Whole Body Inhalation Exposure System, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (NanOE2013) , (2013.10.28), Nagoya

菅野 純、ナノマテリアル安全性評価の進捗 - 発がん性に関わる知見を中心に -、第 20 回がん予防学会、(2013.7.5)、東京、シンポジウム

菅野 純、高橋祐次、ナノマテリアルの高分散小型全身暴露吸入システムの開発、第

40 回日本毒性学会学術年会、(2013.6.17)、千葉、シンポジウム

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

表1 群構成

Group	Dose ($\mu\text{g}/\text{animal}$)	Concentration ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Volume (mL/animal)	scheduled sacrifice	Number of animals
Vehicle Control	0	0	0.5	20W (140D)	80
				40W (280D)	
				60W (420D)	
				80W (560D)	
T-CNT	10	20	0.5	20W (140D)	100
				40W (280D)	
				60W (420D)	
				80W (560D)	
Crocidolite (Positive control)	30	60	0.5	20W (140D)	80
				40W (280D)	
				60W (420D)	
				80W (560D)	

**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：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学 特任教授
研究協力者：酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 教授
二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 准教授
深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 講師
沼野 琢 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 大学院生
徐 結苟 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 研究員
David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野
研究員・非常勤講師

研究要旨

目的と方法：ナノサイズ二酸化チタニウム（TiO₂）のうち、光触媒活性の強い特性を利用して屋外建築物等の被覆塗料等に用いられているアナターゼ型の（anTiO₂）の毒性と発がん性関連作用について、光触媒活性が低く化粧品等に多く使われているルチル型（ruTiO₂）と対比しつつ *in vivo* と *in vitro* の系において比較検討した。

方法：我々が開発した経気管肺内噴霧法を用い、①アナターゼ型（非コーティング、直径 25nm）およびルチル型（非コーティング、直径 20nm）の雌ラットへの短期投与（500ppm, 14 日間に計 8 回）による肺組織における肺胞上皮・間質細胞に対する毒性とその機序の比較、②*in vitro* における初代培養（正常ラットの肺より得た）肺胞マクロファージ（Mφ）を介する肺がん細胞株、間質細胞株に対する毒性と増殖作用、および UVB 照射下における両粒子の直接の細胞毒性の比較も行なった。**結果**：アナターゼ二酸化チタニウム（anTiO₂）をラットに 2 週投与した実験では肺組織における Mip1α の蛋白発現、8-OHdG 値はルチル型より低値であった。*In vitro* おける Mφ からの Mip1α 発現はルチル型二酸化チタニウム（anTiO₂）より低値またはその傾向が示された。さらにヒト肺線維芽細胞（CCD34）、ヒト肺がん細胞（A549）に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型はルチル型より低値であった。*in vitro* における紫外線（UVB）照射下においてもアナターゼ型とルチル型の細胞毒性に明らかな差異は無かった。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性、細胞増殖作用は anTiO₂ はる TiO₂ よりつよいという所見は得られなかった。

A. 研究目的

二酸化チタニウム（TiO₂）粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。しかし、WHO 国際がん研究機関（IARC）は、TiO₂ 粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示す（動物において発がん性を

示す十分な証拠がある）ことから Group2B（ヒトに対して発がんの可能性があると分類している。鉱物として製錬された TiO₂ 粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、アナターゼ型

(anTiO₂)は主として外壁塗料に、ルチル型(ruTiO₂)は化粧品等に用いられている。これまでに我々は、ruTiO₂にはラットにおいて肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序にはruTiO₂を貪食したMφの産生するラジカルによる細胞障害、および分泌される炎症性タンパク(Mip1)の細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた。一方、アナターゼ型はその強い光触媒活性を利用して外壁塗装等に大量に生産されているが、UV照射下でヒト皮膚線維芽細胞およびヒト肺がん細胞に対してルチル型の100倍以上の細胞毒性を有するという報告がある(Wu, J., *et al.*, *Toxicol Lett*, 191, 2009)。anTiO₂はその光触媒活性を利用して、塗料用として大量に生産されているが、毒性学的影響についての知見は乏しく、光・UV照射下でのリスク知見は乏しい。本研究ではアナターゼ型の毒性について、*in vivo* および *in vitro* の実験系においてルチル型との比較しつつ検討した。

B. 研究方法

試料のanTiO₂とruTiO₂は日本化粧品工業会より提供された(広瀬明彦主任研究者経由)。

① 14日間投与による肺発がん機序の検索

SDラットを用い、anTiO₂およびruTiO₂を500μg/mlの濃度にて0.05% Tween20含有生理食塩水に懸濁して2日に1回の割合で合計8回肺内噴霧投与した。14日目の最終投与の6時間後に屠殺剖検した。対照群は0.05% Tween20含有生理食塩水のみを投与した。右肺はパラホルムアルデヒド固定後、肺胞Mφによる貪食の状態、炎症の程度ならびにパラフィンブロックからの戻しエポソ再包埋電顕試料による観察を行った。左肺は凍結し、肺組織におけるMip1 mRNA発現(RT-PCR

法)、タンパク発現(ELISA法)および8-OHdG量(ELISA法)にて測定した。

② *in vitro*系における細胞毒性、発がんメカニズムの検索

1)ラットの肺内に気管よりチオグリコレートを噴霧投与して肺胞Mφを誘導し、肺組織より初代培養Mφを採取分離し、この培養液に最終濃度が10μg/mlとなるようにanTiO₂およびruTiO₂を加え、24時間後に培養上清を回収した。この培養上清によるヒト肺腺癌細胞(A549)およびヒト肺線維芽細胞(CCD34)の細胞増殖に対する影響をCell Counting Kit-8を用いて測定した。

2)上記のanTiO₂およびruTiO₂を貪食したMφと培養上清におけるMip1αのmRNAをRT-PCR法、とタンパク量をELISA法にて測定した。

3)UVBによる光触媒活性による直接の毒性発現の解析のために、UVB照射下でA549に対する細胞毒性を比較検討した。UVBの照射にはTransilluminator (Vilber Lourmat, France)を用い、照射波長は312nm(270nm~330nm)、照射エネルギーは1000 mW/cm²とし、培養細胞が死滅しないUVB照射時間を設定して、照射下におけるルチル型とアナターゼ型の細胞毒性の発現と程度を比較した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った(H22-M19)。

C. 研究結果

① 14日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索

病理組織学的にはMφ主体の炎症細胞浸

潤が見られた。誘導された肺胞内 M ϕ の数はルチル型のほうにより多かった(対ルチル比 77%)。M ϕ の細胞質内には貪食された anTiO₂ および ruTiO₂ の凝集体が多数みられ、これらには X 線解析でチタニウム元素が検出された。肺組織における Mip1 の mRNA 発現量は生食対照群を 1 とするとルチルは 5.35、アナターゼ 2.79 であった(対ルチル比 77%、 $p < 0.001$)。さらに、MIP1 α のタンパク発現量は対照に比べルチル 4.84 倍、アナターゼ 1.34 倍であったが、ルチル型よりアナターゼ型は有意の低値(対ルチル比 27%、 $p < 0.001$)となった。我々が見出した曝露指標である血清 Mip1 値

② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索

1) ヒト肺がん細胞およびヒト肺線維芽細胞増殖促進作用(肺胞上皮および間質に対する毒性と増殖作用の観察):
ラットの肺から採取した初代培養 M ϕ の培養皿中に anTiO₂ または ruTiO₂ を加えて M ϕ に貪食させ、その培養上清を取り出して肺がん細胞(A549)とヒト肺線維芽細胞(CCD34)に対する毒性と細胞増殖促進作用を検討した。その結果、ルチル型は A549 細胞増殖を 115%に増加させたが、アナターゼ型には両作用は観察されなかった。

2) 貪食 M ϕ における Mip1 α 発現量:
上記の *In vitro* での anTiO₂ または ruTiO₂ 貪食 M ϕ における Mip1 α mRNA 発現量(RT-PCR)の対照比はルチル 15.26 倍、

アナターゼ 11.96 倍であったが、両者の差はなかった。Mip1 α の蛋白発現では対照比はルチル 2.70 倍、アナターゼ 1.51 倍でありアナターゼでルチル型より有意の低値(対ルチル比 56%、 $p < 0.001$)であった。培養上清の Mip1 α のタンパク発現では対照比はルチル 2.70 倍、アナターゼ 1.51 倍であり、ルチル型より有意の低値(対ルチル比 56%、 $p < 0.001$)であった。

3) UVB 照射下における細胞毒性の比較:

UVB 照射エネルギー 1000 mW/cm²、照射波長 312nm の条件下にて、照射時間 0 秒、30 秒、1 分、2 分、5 分および 10 分において、観察対象の A549 細胞の死滅しない照射時間は 2 分以内であることを見出した。この条件において、A549 細胞培養液中にアナターゼとルチル型を 0(対照)~10ppm の用量で加えた場合の viability を観察したところ、総ての用量で両者の差は無かった。以上から、紫外線照射下において、A549 細胞に対する毒作用はアナターゼとルチル型は同等であると考えられた。

D. 考察

我々の開発したナノ粒子吸入曝露短・中期毒性・発がん性リスク評価法、① 14 日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索および、② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索において、すでにラットにおいて肺発がん性の明らかにされている(WHO/IARC Group2B) ruTiO₂(無コーティング)について M ϕ の分泌する Mip1 α を介するが発がん促進作用を見出した(Xu et al., Carcinogenesis, 31, 927, 2010)。また、ruTiO₂ を障害された皮膚に塗布して場合には障害作用は見られなかった(Xu et al., Food Chem Toxicol. 49:1298-302. 2011 および Sagawa et al., J

Toxicol Sciences, 37, 317, 2012)
以上の知見に基づき、光触媒活性による生物毒性が強力である可能性が危惧されている anTiO₂ について、①②の方法にて毒性と発がんに関与する細胞増殖誘発作用について ruTiO₂ との比較対照実験を実施した。
本研究では、① 2 週投与実験では肺組織における Mip1α の蛋白発現はアナターゼ型のほうが低く (p < 0.001) 8-OHdG 値もアナターゼ型が低値傾向であった。In vitro おける Mφ からの Mip1α 発現においてもアナターゼ型のほうが低値 (p < 0.001) であった。さらに② ヒト肺がん細胞 (A549) とヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する細胞増殖活性においてもアナターゼ型が低値であった。UVB 照射下においては、肺がん A549 細胞に対する毒作用はアナターゼとルチル型に差異はないことも明らかとなった。以上から、in vivo においてのみならず、in vitro における紫外線 (UVB) 照射下においても、アナターゼ型がルチル型より細胞毒性において顕著であることは無かった。今後発がん性については、代替法としての中期の発がんプロモーション試験、さらには吸入慢性毒性実験が実施が望ましい。

E. 結論

以下のことが明らかとなった。
アナターゼ二酸化チタニウム (anTiO₂) を雌 SD ラットに 2 週投与した実験では肺組織における Mip1α の蛋白発現、8-OHdG 値はルチル型より低値であった。In vitro おける Mφ からの Mip1α 発現はルチル型二酸化チタニウム (anTiO₂) より低値またはその傾向が示された。さらにヒト肺線維芽細胞 (CCD34) ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖活性

においてもアナターゼ型はルチル型より低値であった。さらに in vitro における紫外線 (UVB) 照射下においてもアナターゼ型とルチル型の細胞毒性に明らかな差異は無かった。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性、細胞増殖作用は anTiO₂ はる TiO₂ よりつよいと言う所見は得られなかった。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohba T., Sagawa E., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Tsuda H., and Imaizumi Y. Enhancement of Ca²⁺ Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K⁺ Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells. J Pharmacol Exp Ther 347:145-153, 2013.
2. Xu J., Futakuchi M., Alexander D.B., Fukamachi K., Numano T., Suzui M., Shimizu H., Omori T., Kanno J., Hirose A., Tsuda H. : Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Arch Toxicol., 88: 65-75, 2014
3. Numano T., Xu J., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander D.B., Shimizu H., Furukawa F., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Suzui M., : Comparative study of the toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro, Asian Pacific J Cancet Prev, 15(2): 929-935, 2014

2 . 学会発表

1. 二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄 (2013)。ナノ材料の吸入曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索；第 29 回日本毒性病理学会 筑波, 1月31日-2月1日 .
2. 二口充、徐結苟、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄 (2013)。ナノ材料の噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 40 回日本毒性学会学術年会 千葉, 6月17日-19日.
3. Numano, T., Xu, J., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Furukawa, F., Tsuda, H., and Suzui, M. (2013). Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage 2013 American Assoc.Cancer Res.
4. Suzui, M., Ikenaga, S., Isoda, Y., Numano, T., Fukamachi, K., Futakuchi, M., and Tsuda, H. (2013). Inflammation profile and gene expression status induced by intratracheal instillation of the multiwall carbon nanotube into rat lung. The XIII International Congress of Toxicology 2013 Seoul, Korea, June 30. - July 34.
5. Numano, T., Ikenaga, S., Isoda, Y., Fukamachi, K., Futakuchi, M., and Suzui, M. (2013). Inflammation profile and gene expression status induced by intratracheal instillation of the multiwall carbon nanotube. 72nd Annual Meeting of the Japanese Cancer Association Yokohama, Oct. 3. - Oct. 5.
6. CCL3 as a serum biomarker bfor asbestos exposure and possible biomarker for malignant mesothelioma, Xu, J., Alexander, DB., Iigo, M., Takahashi, S., Yokoyama, T., Kato, M., Usami, I., Tokuyama, T., Tsutsumi, M., Tamura, M., Oguri, T., Niimi, A., Hayasho, Y., Yokoyama, Y., Tonegawa, K., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Suzui, M., Kamijima, M., Hirose, A., Kanno, J., and Tsuda, H.(2013)The 72th Annual Meeting of the Japanese Meeting of Cancer Association, Yokohama
7. Xu, J., Futakuchi, M., Alexander, DB., Fukamachi, K., Suzui, M., Kanno, J., Hirose, A. and Tsuda, H. *Dissolution of nano-ZnO is responsible for reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles.* (P-02-41). The 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, October 28-31, 2013, Nagoya, Japan.
8. Xu, J., Alexander, DB., Futakuchi, M., Numano, T., Fukamachi, K., Suzui, M. and Tsuda, H. *Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition and fibrogenesis by MWCNT dosed to the rat lung.* (WS2-2). The 30th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, January 30-31, 2014, Tokushima, Japan.
9. Tsuda, H., Xu, J., Alexander, D.B., Tokuyama, T., Usami, I., Hayashi, Y., Oguri, T., Takahashi, S. and Suzui, M. *CCL3 as a serum biomarker for asbestos exposure and malignant mesothelioma.* (WS1-4). The 30th Annual Meeting of the Japanese Society of Toxicologic Pathology, January 30-31, 2014, Tokushima, Japan.
10. Xu, J., Alexander, DB., Kanno, J., Hirose, A. and Tsuda, H. *Size- and shape-dependent toxicokinetics and*

fibrogenesis of MWCNT. OECD Expert Meeting on Toxicokinetics of Nanomaterials, February 25-28, 2014, Seoul, Republic of Korea.

なし

2. 実用新案登録
該当なし

**H. 知的財産所有権の出願・登録状況
(予定も含む)**

3. その他
該当なし

1. 特許取得

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 および 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 (Pietroiusti 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 ）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 ）を再度実施した．
3. マウス単回気管内投与試験 およびでは妊娠 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、現在は保土谷工業から提供) 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 m^2/g (N_2 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 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

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、胎児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 μm 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既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 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。

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

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、投与後に捻髪音がしたが、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。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 5 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。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 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 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（ および ）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、反復気管内投与と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 および 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, Norihiro 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) 無し

1. 特許取得
無し
2. 実用新案登録
無し
3. その他

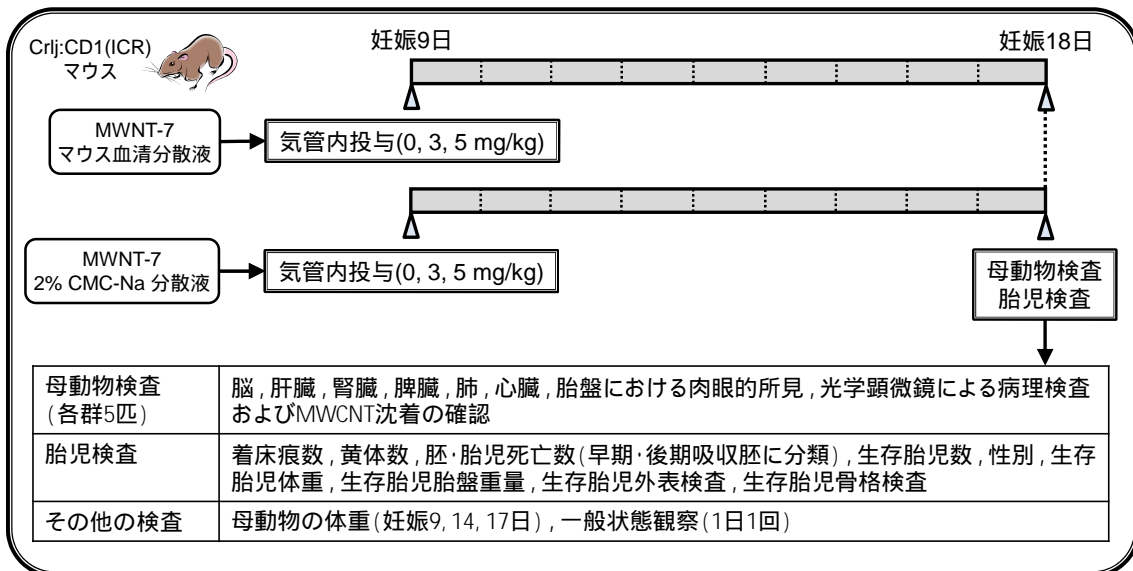


図1. マウス単回気管内投与試験 のプロトコル

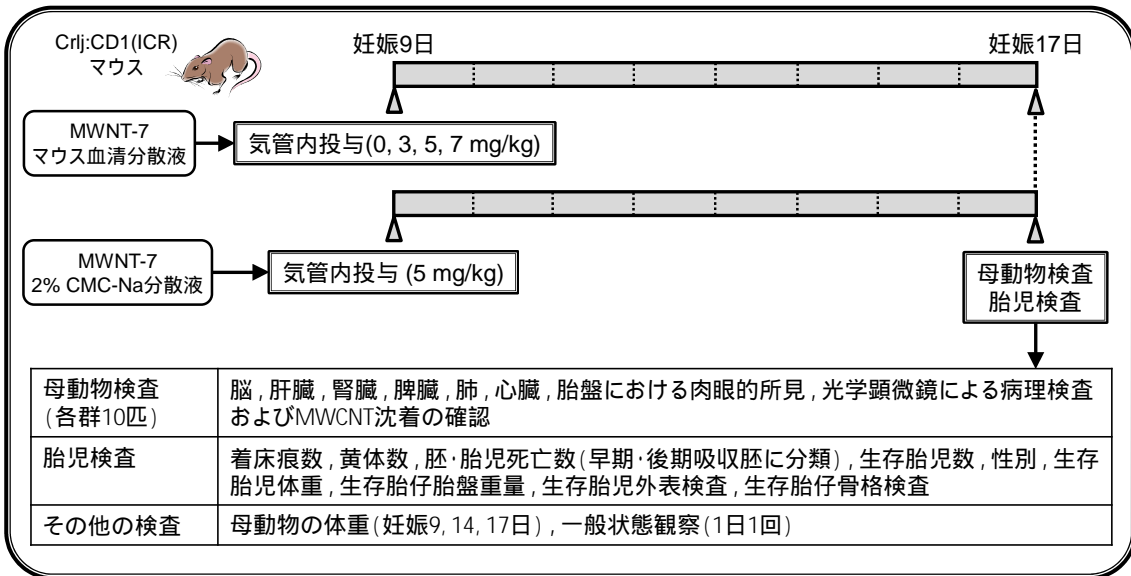


図2. マウス単回気管内投与試験 のプロトコル

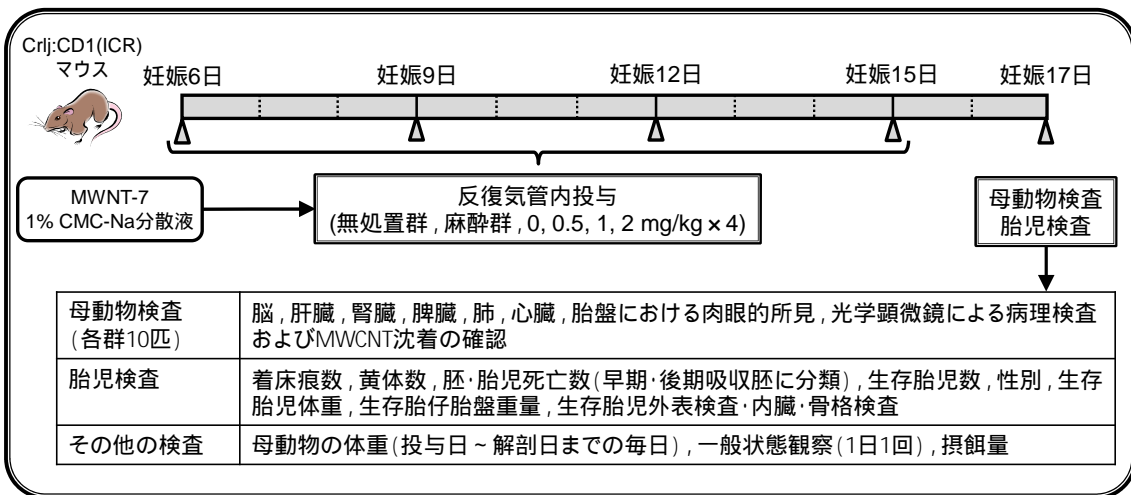
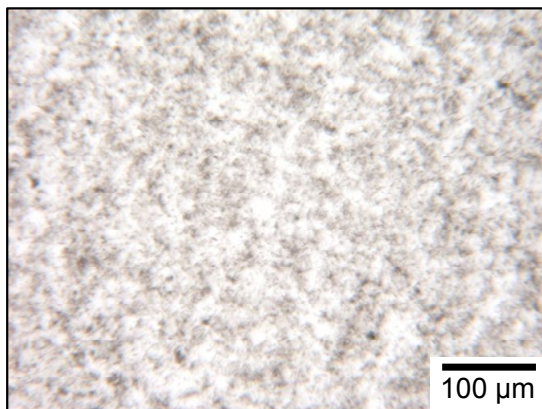


図3. マウス反復気管内投与試験のプロトコル

マウス血清分散MWCNT



2% CMC-Na PBS分散MWCNT

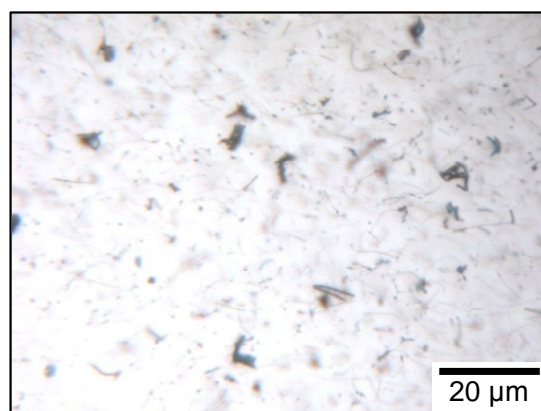
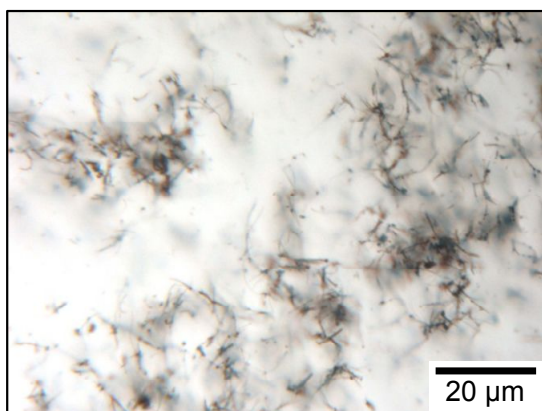
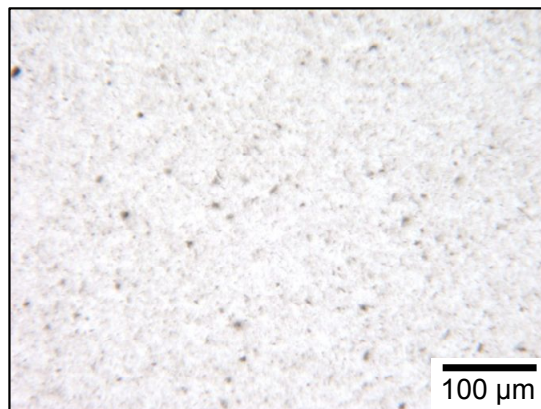


図4. MWCNT懸濁液の光学顕微鏡写真

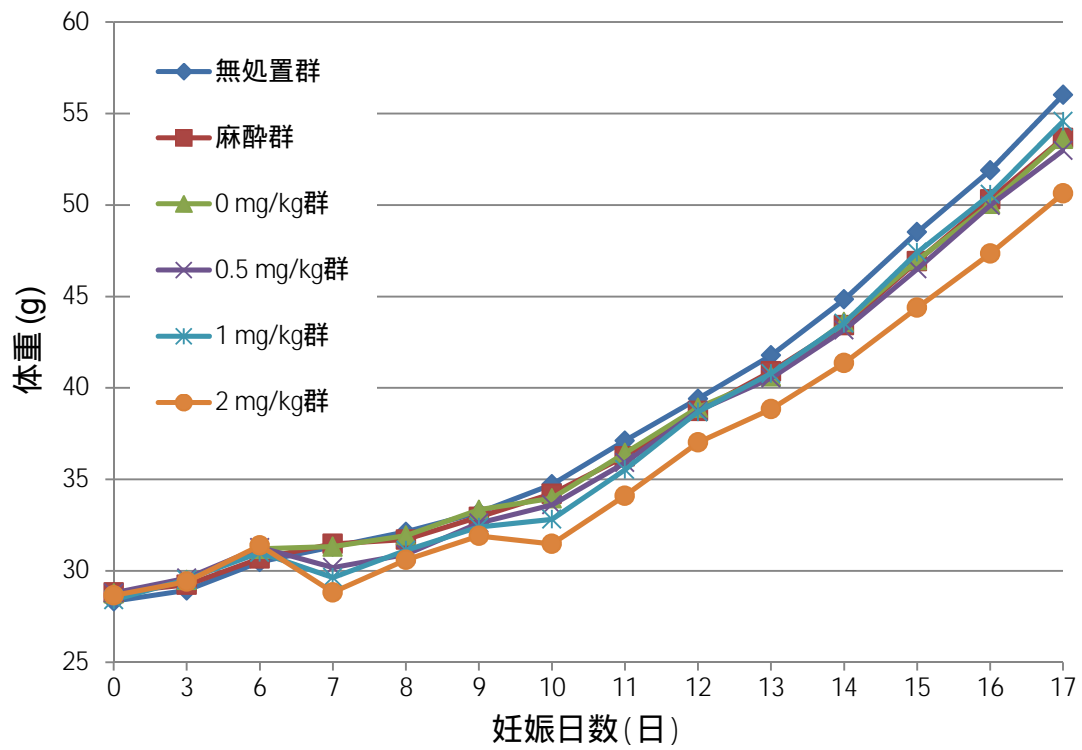


図5. マウス反復気管内投与試験における母動物の体重推移

表1. マウス単回気管内投与試験 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 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 投与量	血清		2%CMC-Na	
		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 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 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 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 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	麻醉群	対照群	MWCNT投与群		
		0 mg/kg	0 mg/kg	0 mg/kg	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	麻醉群	対照群	MWCNT投与群		
		0 mg/kg	0 mg/kg	0 mg/kg	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)

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) ^a	0 (0)	1 (0.7) ^b	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 μm ）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 μm ）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^{+/-} 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、青石綿の物理的形状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 μm 以下でかつ長さ 20 μm 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 μm) 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 μm) 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 μm 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 μm 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 μm 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、 5×10^5 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 μm 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 μ 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 μ g/mlよりも最高用量の50.6 μ 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ら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 μ 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 μ 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らも同じメーカーが製造するMWCNT-7(長さ5 μ 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hgpRT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 μm 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

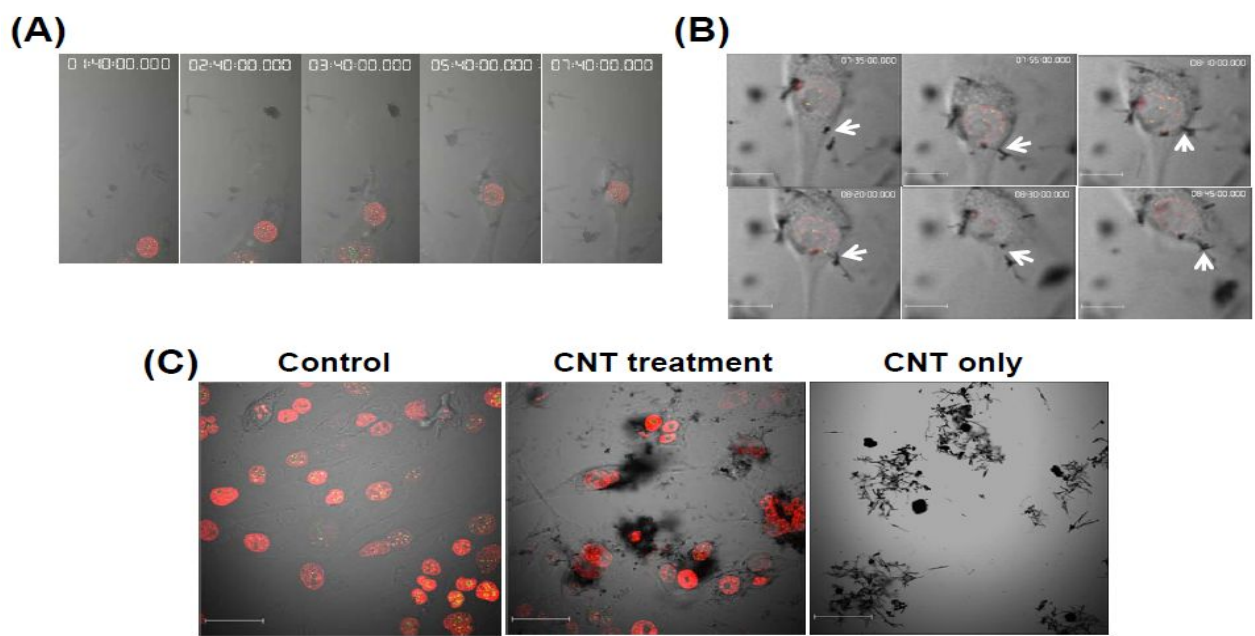


Fig.1

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)

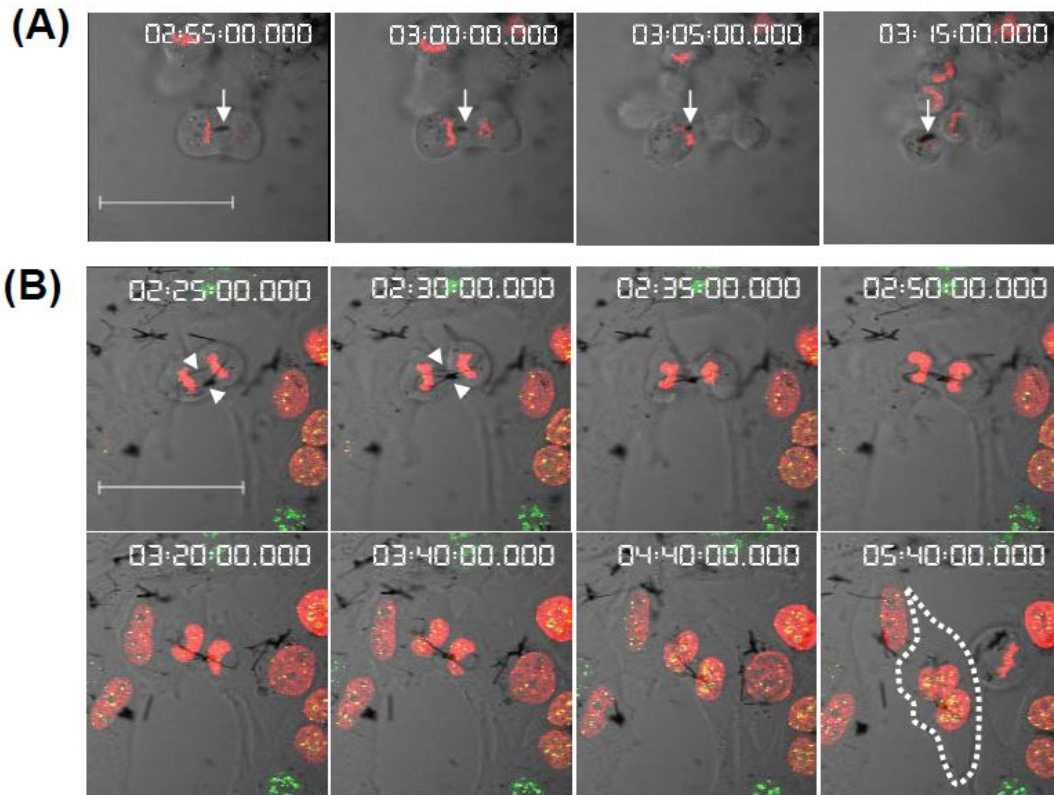


Fig.2

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
	total	232	93 (40%)	4 (1.7%)	0
12.7	1	33	16	0	0
	2	32	13	1	0
	3	47	11	3	0
	total	112	40 (38%)	4 (3.2%)	0
25.3	1	38	5	2	1
	2	51	19	2	2
	3	81	25	7	2
	total	170	49 (27%)	11 (5.9%)	5 (3.0%)
50.6	1	86	12	10	1
	2	101	11	5	0
	3	95	11	6	0
	total	282	34 (12%)	21 (7.6%)	1 (0.4%)

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 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貪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 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 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 μm 、径 40-50 nm)、S 社より提供された MWCNT-SD1 (長さ 8 μm 、径 150 nm) および SD α (長さ 3 μm 、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 μm 、径 586

nm)および CNF-S(長さ $1.8 \pm 0.8 \mu\text{m}$, 径 365 nm)は 900 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 HTC FNW 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 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 HTC FNW 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 HTC FNW-L (0.58 mg/mL) および HTC FNW-S (0.62 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 HTC FNW (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 HTC FNW 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 HTC FNW-L と HTC FNW-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 産生を促進する

MWCNT-7, -SD1 および HRCFNW-L を 2.2 ~ 6.6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 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 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 産生を促進する

昨年度までの MWCNT-7 による IL-1 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 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 $\mu\text{g}/\text{mL}$) による IL-6 分泌は対象の 9~12% にまで低下した。また IL-1 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 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 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 分泌を促進するが、MWCNT-SD2 および HTCFNW-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 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 HTCFNW 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 HTCFNW-S は細胞に取り込まれても IL-1 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 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 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 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 HTCFNW 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。またこれらのナノ材料は炎症性サイトカイン IL-6 および IL-1 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 α 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 α 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 α 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(Taquann 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、秤量後に超音波破碎機や 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 5×10^5 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 に保管した。その後に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- γ 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 α 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)ヴィベック社に委託し、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であるケモカインRANTES とMIP-1 α 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- γ 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 α 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- γ レベルやRANTES、MIP-1 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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 α 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
なし

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/lpr(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/lpr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Taquan 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 μ gおよび10 μ 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/lpr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、添付のプロトコールに従って解析した。

C . 研究結果

実験プロトコールは図1に示す。8週齢雌C57BL/6マウスに0、1、10 μ 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MWCNT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、MWCNT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と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。

正常B6マウスへのMWCNT腹腔内投

与では投与後6ヶ月前後での末梢血のT細胞分化やサイトカイン分泌に影響があることを、平成24年度の研究で見出していたが、投与後18ヶ月ではT細胞分化に大きな影響は見られなかった。18ヶ月後の変化として、MWCNT投与による腹膜の肥厚、乳糜腹水貯留、肝臓の分葉状変化などの肉眼で変化が観察された。また、M1マクロファージへの分化が促進していることも判明した。M1マクロファージは炎症性サイトカインであるTNF- α 、IFN- γ などを産生することが知られており、炎症を促進するような役割を有していることが知られている。18ヶ月における加齢的变化とMWCNT投与がどのように関連しているかは不明であるが、MWCNTの長期暴露により、マクロファージを介したサイトカインシフトの可能性が考えられる。

自己免疫疾患モデルであるMRL/lprマウスはFas遺伝子の変異を有し、全身のリンパ節腫脹に加え、関節リウマチ、SLE、シェーグレン症候群の疾患モデルとして知られている。病態は末梢でのT細胞のFasを介した維持機構に異常を来すことによって、自己反応性T細胞の増殖が促進されてしまうと考えられており、活性化したT細胞中に自己反応性T細胞を含んでいる可能性が知られている。MRL/lprマウスでの、すでに偏った免疫状態におけるMWCNTの暴露では、末梢の免疫システムへの影響は細胞分画の点では大きな影響は観察されなかったが、投与後、1、2ヶ月の段階で自己抗体の一つであるリウマチ因子がMWCNT投与によって低下することが判明した。自己抗体の産生と炎症状態は相関していることが知ら

れているが、投与後1、2ヶ月は3、4ヶ月齢に相当し、MRL/lprマウスのリウマチ因子が上昇してくる時期である。MWCNT投与直後の免疫システムへの影響、特に自己抗体産生機序への影響が考えられた。

今後、自己免疫疾患病変へのMWCNTの長期暴露の影響を確認する必要があり、自己抗体への影響を含め、免疫システム全体への影響を評価する予定である。MRL/lprマウスの6ヶ月齢を過ぎると死亡し始めることから、このモデルでの投与実験は投与後6ヶ月が限度であると考えられる。

来年度は自己免疫疾患病変へのMWCNT長期暴露の影響、吸引実験との比較などを通してナノマテリアルの免疫システムへの影響を検討する予定である。

E. 結論

3. 正常B6マウスへのMWCNT腹腔内投与による長期暴露によって、腹膜および腹腔臓器表層部に反応性の変化が観察された。
4. B6マウスへのMWCNT長期暴露によって腸間膜リンパ節の細胞数が減少していた。
5. B6マウスへのMWCNT長期暴露によってT細胞への影響は確認されなかった。
6. B6マウスへのMWCNT長期暴露によって末梢でのM1マクロファージへの分化が促進していることが判明した。
7. MRL/lprマウスへのMWCNT暴露によって免疫細胞の分画には大きな影響は観察されなかった。
8. MRL/lprマウスへのMWCNT暴露において、投与後1、2ヶ月で自己抗体の

産生が低下していた。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Iizuka S, Ishimaru N, Kudo Y. Matrix metalloproteinases: the gene expression signatures of head and neck cancer progression. *Cancers*. 13:396-415, 2014
2. Yano K, Carter C, Yoshida N, Abe T, Yamada A, Nitta T, Ishimaru N, Takada K, Butcher GW, Takahama Y. Gimap3 and Gimap5 cooperate to maintain T-cell numbers in the mouse. *Eur J Immunol*. 44:561-572, 2014
3. Tsunematsu T, Takihara Y, Ishimaru N, Pagano M, Takata T, Kudo Y. Aurora-A controls pre-replicative complex assembly and DNA replication by stabilizing geminin in mitosis. *Nat Commun*. 4:1885, 2013
4. Kawakami E, Kawai N, Kinouchi N, Mori H, Ohsawa Y, Ishimaru N, Sunada Y, Noji S, Tanaka E. Local applications of myostatin-siRNA with atelocollagen increase skeletal muscle mass and recovery of muscle function. *PLoS One*. 8:e64719. 2013.
5. Shimizu N, Nakajima NI, Tsunematsu T, Ogawa I, Kawai H, Hirayama R, Fujimori A, Yamada A, Okayasu R, Ishimaru N, Takata T, Kudo Y. Selective enhancing effect of early mitotic inhibitor 1 depletion on the sensitivity of doxorubicin

or X-ray treatment in human cancer cells. *J Biol Chem*. 288:17238-17252, 2013

6. Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N. Targeting IL-1 in Sjögren's syndrome. *Expert Opin Ther Targets*. 17:393-401. 2013.
7. Shikama Y, Ishimaru N, Kudo Y, Bando Y, Aki N, Hayashi Y, Funaki M. Effects of free Fatty acids on human salivary gland epithelial cells. *J Dent Res*. 92:540-546. 2013.

2. 学会発表

- (1)新垣理恵子、山田安希子、工藤保誠、江口洋、三田村佳典、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群モデルを用いたレバミピド点眼薬によるドライアイの改善効果とその作用機序 第102回日本病理学会総会 102巻1号：306 2013.6 札幌
- (2)岩浅亮彦、近藤智之、黒澤実愛、新垣理恵子、山田安希子、田中栄二、工藤保誠、石丸直澄：アロマターゼ遺伝子欠損マウスにおける肥満とシェーグレン症候群様病変との関連 第102回日本病理学会総会 102巻1号：436 2013.6 札幌
- (3)近藤智之、工藤保誠、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫システムの解析 第102回日本病理学会総会 102巻1号：439 2013.6 札幌
- (4) Yamada A, Arakaki R, Kurosawa M, Kondo T, Koichi Y, Hayashi Y, Ishimaru N: Difient differentiation of Treg cells in a murine model of Sjögren's syndrome. 15th International Congress of

Immunology 25th Aug. 2013 Milan

- (5) 石丸直澄：シェーグレン症候群の病理診断の新機軸 第22回日本シェーグレン症候群学会学術集会 2013.9 大阪
- (6) Yamada K, Iwasa A, Kondo T, Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Taquahashi Y, Takagi A, Kanno J, Ishimaru N: Invivo effect of multi-wall carbon nanotubes on immune system. 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. Nov. 2013 Nagoya
- (7) Kurosawa M, Ishimaru N, Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Kondo T: A novel role of CXCR7 in controlling autoreactive T cells of a murine model for Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：110 2013.12 千葉
- (8) Iwasa A, Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tanaka E, Kudo Y, Ishimaru N: Relationship between aromatase-related obesity and autoimmunity in Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：146 2013.12 千葉
- (9) Arakaki R, Eguchi H, Yamada A, Kudo Y, Mitamura Y, Hayashi Y, Ishimaru N: Eye drop administration of rebamipide is effective to a dry eye symptom in a model mice of Sjögren's syndrome. 第42回日本免疫学会総会 42巻：148 2013.12 千葉

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
なし

図1

Experiment 1

Mice : ♀ C57BL/6 (8 weeks of age)
Group (n=5): 0 μ g/mouse, 1 μ g/mouse, 10 μ g/mouse
MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MCNT-7, Mitsui)
was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.
Vehicle: 0.1% Tween80/saline

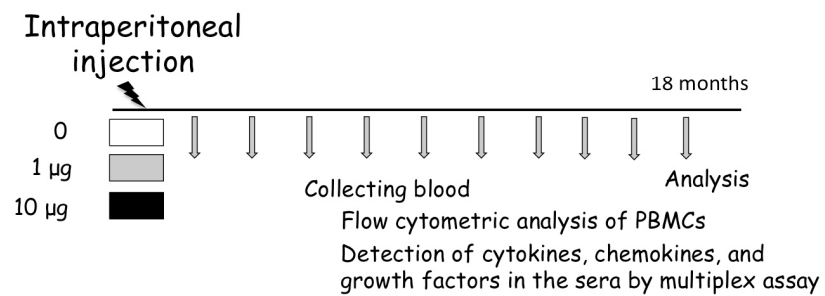


図1: 正常C57BL/6マウスへのMWCNT投与実験プロトコール

図2

Body Weight of MWCNT-administered Mice

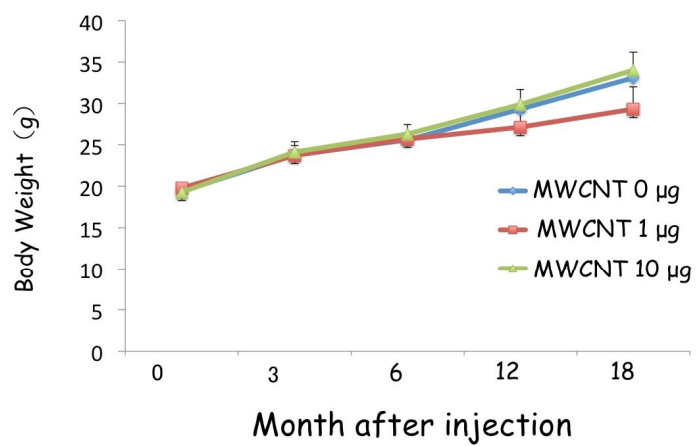


図2: 正常C57BL/6マウスへのMWCNT投与による体重変化。各群の体重を経時的に示す。結果は平均±SDで示す。

図3

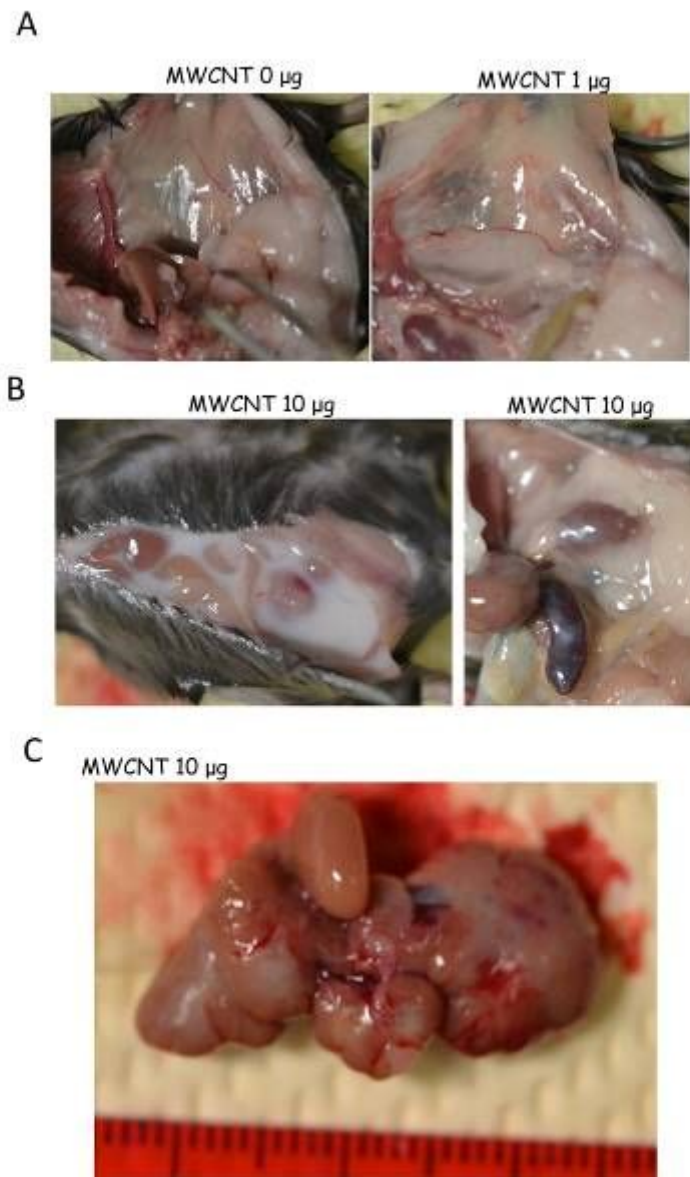


図3: MWCNT投与による腹腔内の肉眼的変化。(A)腹膜 (B) 腹水および脾、腎表面の白濁肥厚 (C) 肝臓の分葉状変化 写真は各群の代表。

図4

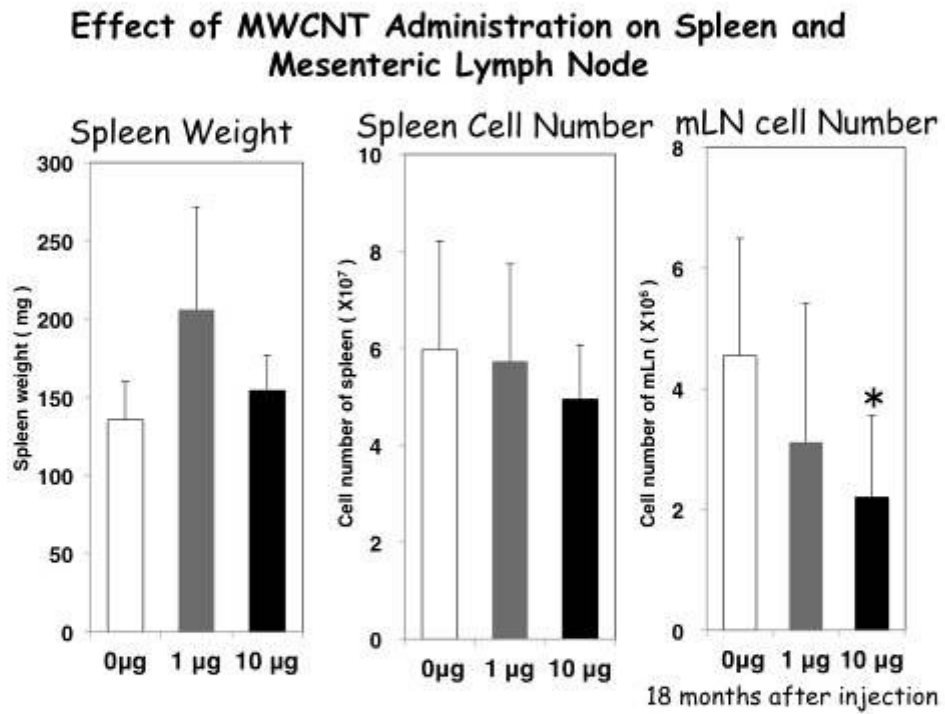


図4: MWCNT投与による脾重量、脾細胞数および腸間膜リンパ節細胞数の変化。結果は平均($n=5$) \pm SDで示す。* $p<0.05$

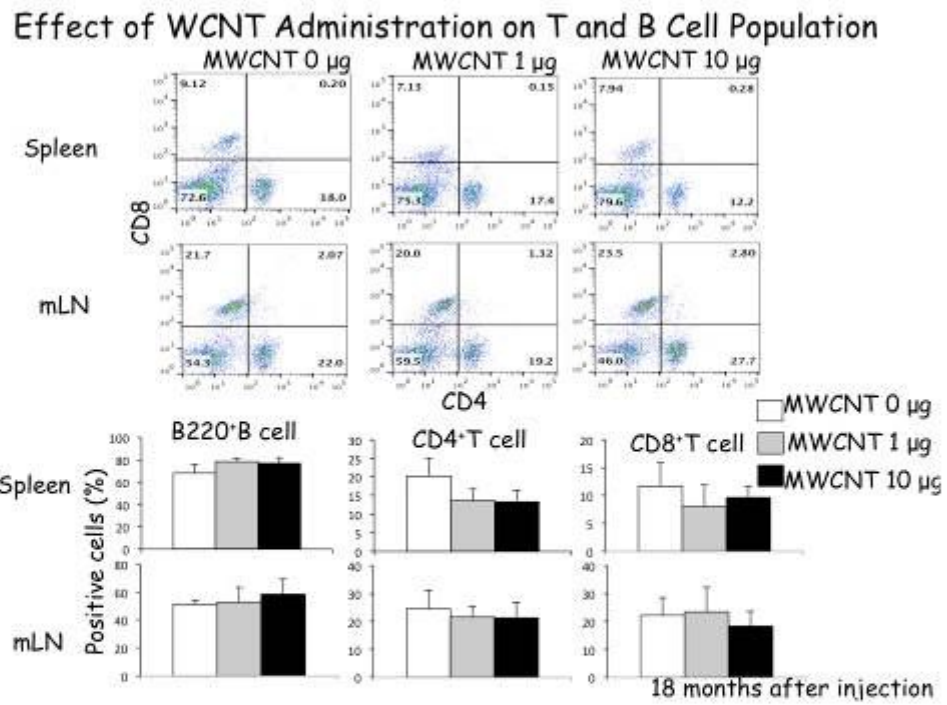


図5: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節におけるT、B細胞分画の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。下段のグラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。

図6

Effect of MWCNT Administration on Regulatory T Cell (Treg)

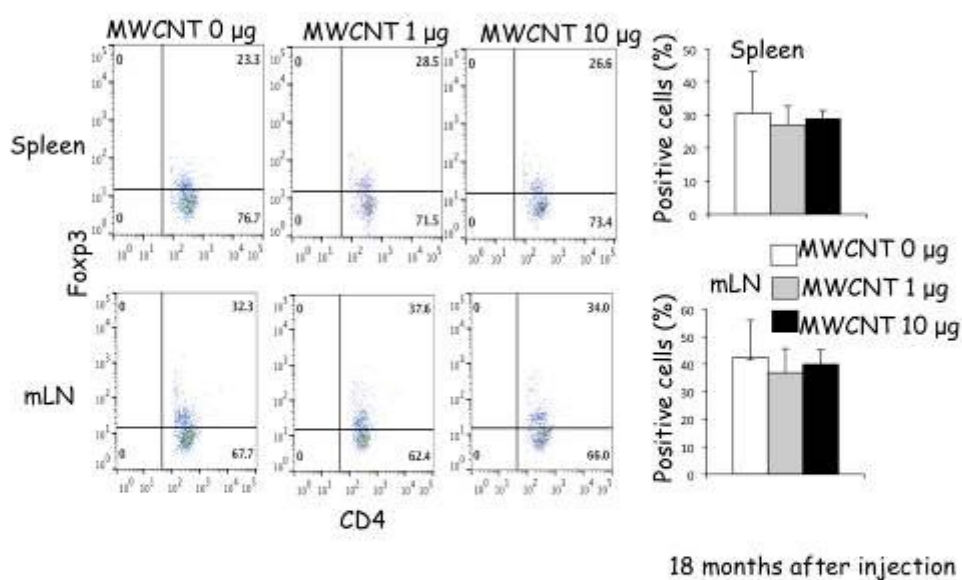


図6: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節における制御性T細胞の割合の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフは平均(n=5)±SDで示す。

図7

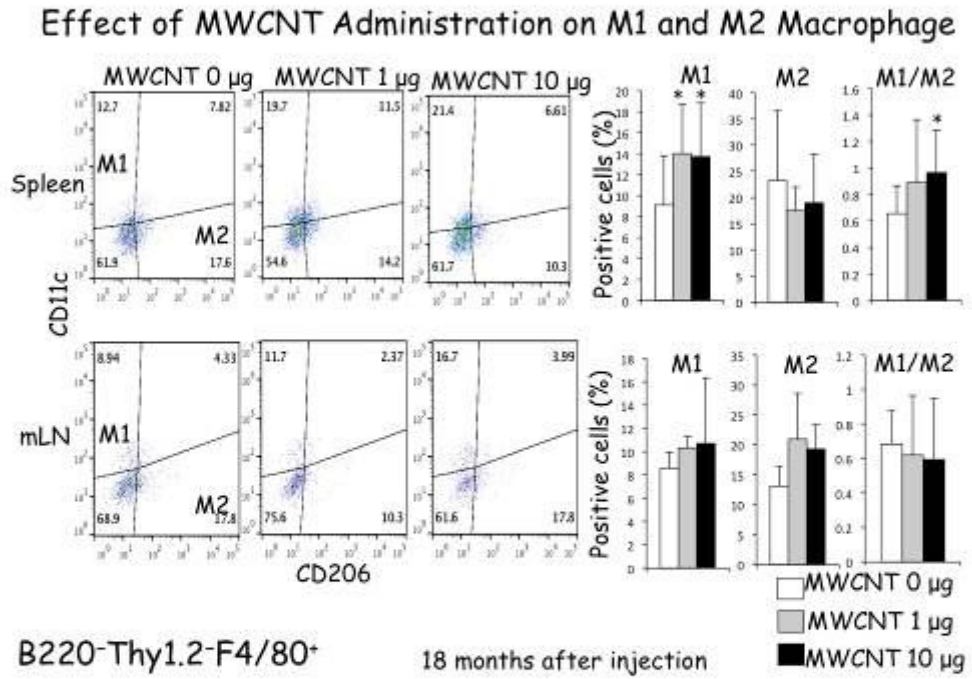


図7: MWCNT投与による脾臓および腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画への影響
 フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。
 グラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。*p<0.05

図8

Experiment 2

Mice : ♀ MRL/lpr (fas gene mutation, an model for autoimmune diseases such as SLE, RA, SS) and ♀ MRL+/+ (control)

Group (n=5): 0 µg/mouse, 1 µg/mouse, 10 µg/mouse

MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MCNT-7, Mitsui) was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.

Vehicle: 0.1% Tween80/saline

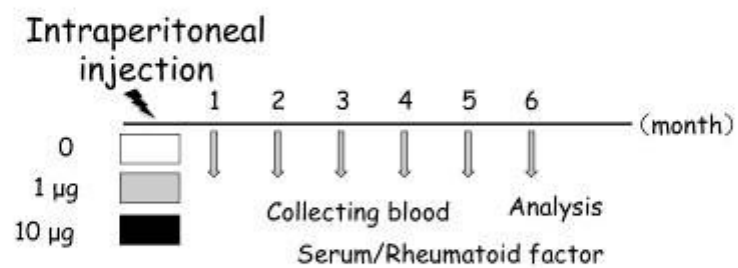


図8: MRL/lprマウスへのMWCNT投与実験プロトコール

図9

Body Weight of MWCNT-injected MRL/lpr and MRL+/+ Mice (6m)

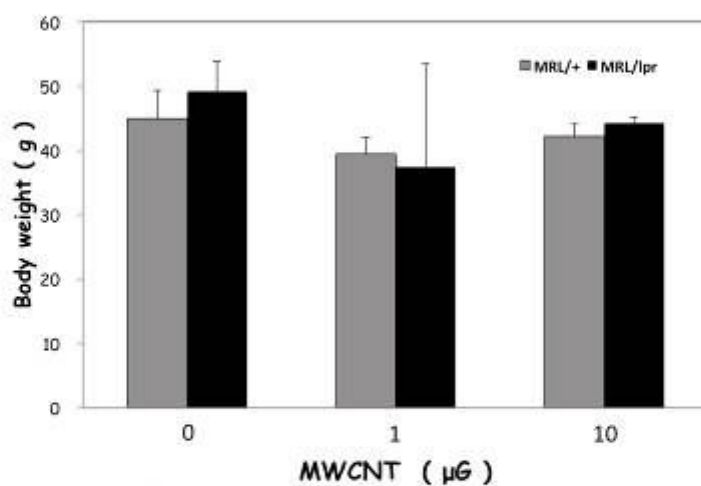


図9: MWCNT投与による体重変化。結果は平均(n=5)±SDで示す。

Spleen Weight and Spleen Cell Number in MWCNT-injected Mice (6m)

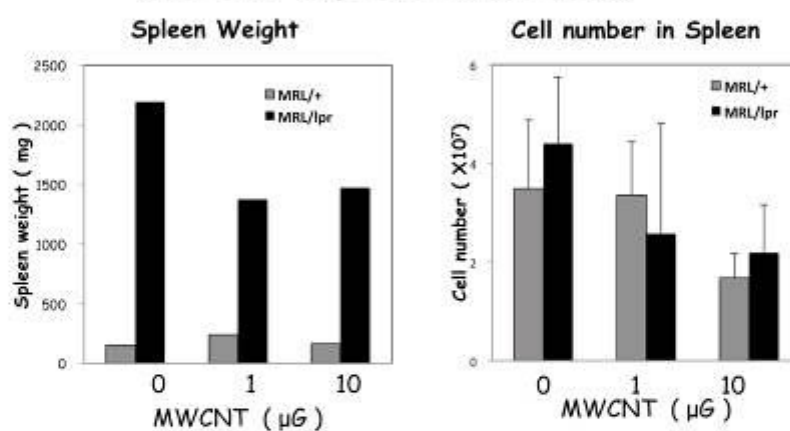


図10: MWCNT投与による脾重量と脾細胞数。結果は平均(n=5)±SDで示す。

図11

Effect of MWCNT administration on T population in MRL mice

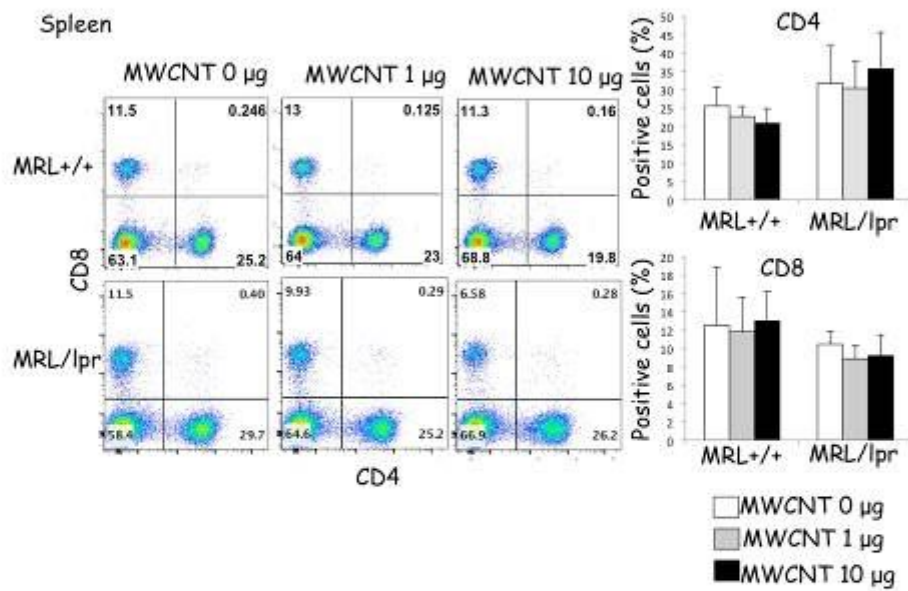


図11: MWCNT投与による脾臓におけるT細胞分画の変化。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフの結果は平均(n=5)±SDで示す。

図12

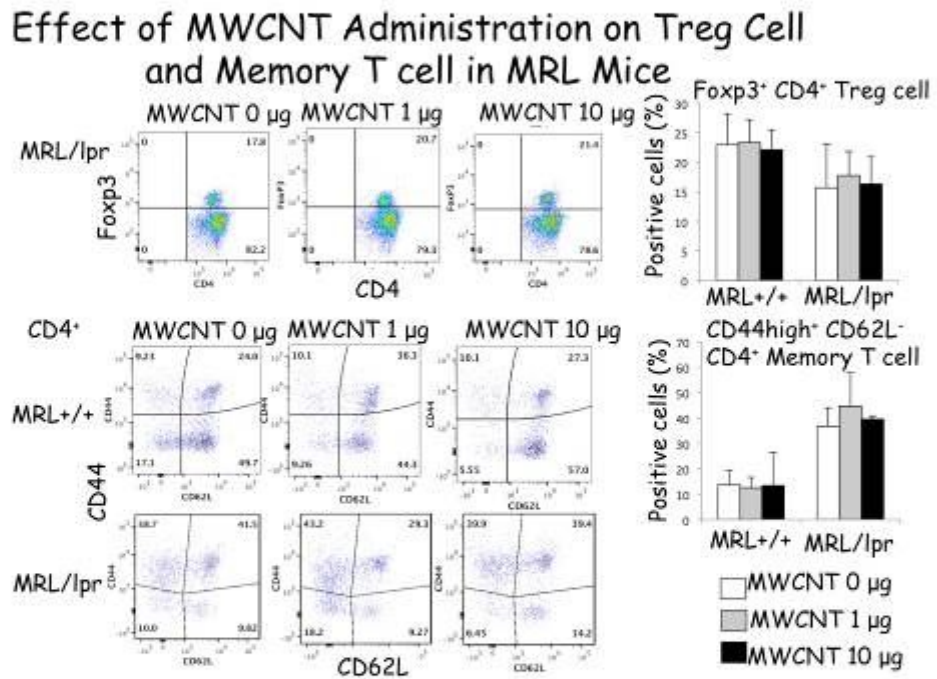


図12: MWCNT投与による脾臓における制御性T細胞とメモリー型T細胞への影響。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。結果は平均 (n=5)±SDで示す。

図13

Effect of MWCNT Administration on Macrophage and DC in MRL Mice

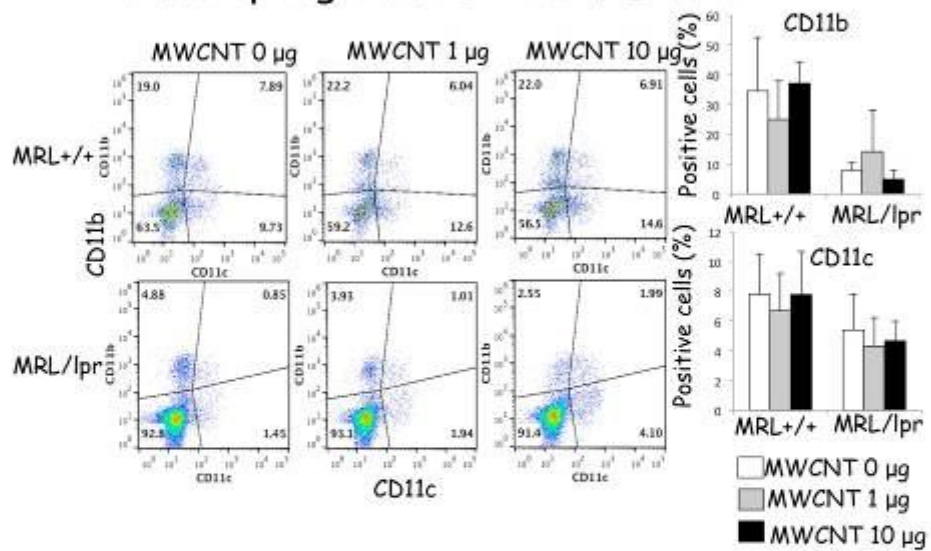


図13: MWCNT投与による脾臓におけるマクロファージ及び樹状細胞分画への影響。フローサイトメータ解析によるパネルは各群の代表的結果を示す。グラフは平均(n=5)±SDで示す。

図14

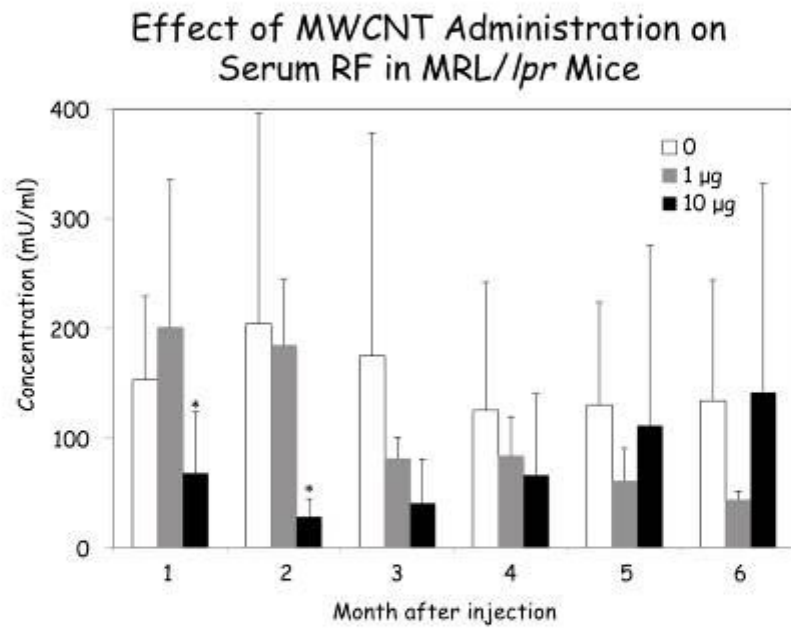


図14: MWCNT投与による血清リウマチ因子の経時的変化。
グラフは平均 (n=5) ±SDで示す。*p<0.05

分担研究課題名：炭素系ナノマテリアルの生体影響試験における物性測定に関する研究

分担研究者：宮澤 薫一 独立行政法人物質・材料研究機構 先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ グループリーダー

研究協力者：若原 孝次 独立行政法人物質・材料研究機構 先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ 主幹研究員

平田 千佳 独立行政法人物質・材料研究機構 先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ 研究業務員

今野 俊生 独立行政法人物質・材料研究機構 先端材料プロセスユニット フラーレン工学グループ 研究業務員

研究要旨

C₆₀ ナノウィスカーに、C₆₀ よりもわずかに大きな C₇₀ 分子を固溶させることによって C₆₀ ナノウィスカーの物性を様々に変化させることができると期待される。そこで、本研究では、C₆₀ ナノウィスカーの成長が C₇₀ の添加によってどのように変化するかを調査した。また、C₆₀ ナノウィスカーの機械的な性質について、C₇₀ の添加によってヤング率がどのように変化するかを複合型透過電子顕微鏡を用いて調べた。その結果、固溶硬化の発現によって、C₆₀ ナノウィスカーのヤング率が C₇₀ の添加によって著しく増大することが見出された。

A. 研究目的

フラーレンナノウィスカーは、C₆₀、C₇₀、C₆₀[C(COOC₂H₅)₂]、Sc₃N@C₈₀ などの様々なフラーレン分子から構成される細いひげ結晶であり、その直径は 1000nm 未満と定義されている[1]。C₆₀ は直径 0.71nm の球形分子であり、C₇₀ は長径 0.85nm、短径 0.72nm のラグビーボール形の分子である。C₆₀ は紫外光も可視光も吸収するが、C₇₀ は C₆₀ に比べてより長波長の光を吸収する。それゆえ、C₆₀ と C₇₀ の両成分を含むフラーレンナノウィスカー(FNW)は広い波長の光を吸収することが可能となり、C₆₀ ナノウィスカー(C₆₀NW)に比べて

太陽電池や光センサーなどの光学デバイスにおいて、より広い波長での応用範囲が可能となる。また、C₇₀ 分子は C₆₀ 分子に比べて少し大きいため、C₆₀ ナノウィスカー(C₆₀NW)母相中に C₇₀ を固溶させることにより、結晶格子を歪ませる効果や転位の移動を妨げる効果によって、変形しにくくなり、C₆₀NW の機械的な強度が増大することが期待される。そこで、本研究では、C₆₀-C₇₀2 成分ナノウィスカー(C₆₀-C₇₀NW)の合成を行い、その機械的な性質を調べることを目的とした。

B. 研究方法

1. C₆₀-C₇₀NW の合成

C₆₀ 飽和トルエン溶液と C₇₀ 飽和トルエン溶液を作製し、それらを混合することによって、C₆₀ と C₇₀ の 2 成分を含有するトルエン溶液を作製した。この混合溶液を用いて、貧溶媒をイソプロピルアルコール(IPA)とする液 - 液界面析出法(LLIP法)によって、仕込み組成で、C₆₀-5mass%C₇₀NW、C₆₀-10mass%C₇₀NW、C₆₀-15mass%C₇₀NW、C₆₀-23mass%C₇₀NW を合成した。

2. C₆₀-C₇₀NW の機械的性質の評価

筑波大学木塚研究室の複合機能型透過電子顕微鏡(複合 TEM)によって、C₆₀-C₇₀NW のヤング率を測定した。この複合 TEM は、原子間力顕微鏡(AFM)の探針を用いて試料に荷重を印加し、その荷重 - 変位曲線から試料のヤング率を計測できるように設計されている。

C. 研究結果

直線形状で成長軸方向に沿って一様な直径を持つ C₆₀-C₇₀NW が合成された。表 1 に C₆₀-C₇₀NW の長さ と直径の測定結果を示す。C₇₀ 含量の増加とともに直径が増加するのに対して、長さは C₆₀-10mass%C₇₀NW で最小となっている。

複合 TEM により測定された C₆₀-C₇₀NW のヤング率の組成依存性を検討した結果、

C₇₀ を添加することにより、600nm ~ 1200

表 1 C₆₀-C₇₀NW の長さ と直径の平均値

仕込み組成	長さ(μm)	直径(nm)
C ₆₀ -5mass%C ₇₀ NW	5.8±1.8	478±134
C ₆₀ -10mass%C ₇₀ NW	3.5±1.7	629±145
C ₆₀ -15mass%C ₇₀ NW	11.9±4.7	1040±375

nm 未満の範囲の直径において、C₆₀-C₇₀NW のヤング率が著しく増加することがわかった[2]。

D. 考察

表 1 で C₆₀-10mass%C₇₀NW のときに長さが最小となることが分かった。これは C₇₀ の添加量が

小さい場合は、C₇₀ は C₆₀NW の成長を阻害するように働くこと、すなわち、C₇₀ が C₆₀NW 上での C₆₀ の拡散を阻害することを示している。しかし、C₇₀ の添加量をさらに増加させると、より長く成長することがわかる。この現象は、添加量が少ないときは、C₆₀ の拡散を阻害する不純物として C₇₀ が作用するが、添加量がさらに増加すると、C₇₀ はフラレン分子の脱溶媒和反応を促進して、フラレン分子のウィスカー中への取り込みが容易になる結果、より長く成長するためと考察される。

直径 600nm ~ 1100nm の C₆₀-C₇₀NW において、C₇₀ 無添加のものに比べて、C₇₀ を添加したもののヤング率は、2 ~ 5 倍程度高くなった[2]。これは、C₇₀ 分子による固溶硬化によるものと理解される。

C₇₀ 無添加の C₆₀NW のヤング率は直径の減少とともに増加したが、これは、C₆₀NW の内部が軟らかく、外表面が硬いコア - シェル構造になっているためである[3]。また、C₆₀-23 mass%C₇₀ の組成のものにおいては、直径の増加とともにヤング率が急速に減少しており[2]、C₆₀-23 mass%C₇₀NW においても、コア - シェル構造となっていることが示唆される。

約 1350nm の直径の C₆₀-23 mass%C₇₀NW のヤング率は、C₇₀ 無添加の C₆₀NW と同程度のヤング率となっており、C₇₀ の固溶硬化現象が反映されていないように観察された。これは、C₆₀-23 mass%C₇₀NW が太く多孔質なコアが支配的であるためと考察される。つまり、C₇₀ による固溶硬化の寄与に比べて、多孔質構造による軟化の寄与が強く働いているためであると考察される。

E. 結論

(1) C₆₀-C₇₀NW の直径は、C₇₀ の添加とともに増加した。しかし、C₆₀-C₇₀NW の長さは、C₇₀ の添加量が小さい場合は抑制されるが、添加量をさらに増加させると長さが増加することが見出された。

(2) C₆₀NW のヤング率は、C₇₀ を添加することによってもたらされる固溶硬化の発現によっ

て、著しく増大することが判明した。

参考文献

- [1] Kun'ichi Miyazawa, J. Nanosci. Nanotechnol. **9** (2009)41
- [2] 松浦大輔, 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, 木塚徳志, “C₆₀/C₇₀ 合金ナノウィスカーのヤング率の組成依存性”, 2014 年春期講演大会(第 154 回) 日本金属学会講演大会概要集、P.22
- [3] Ryoei Kato and Kun'ichi Miyazawa, Diamond & Related Materials, **20** (2011) 299

F. 健康危険情報

該当なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) K. Miyazawa, C. Hirata, R. Kano, T. Wakahara, H. Takeya, T. Yamaguchi, Y. Takano, J. Tang, Y. Lin and M. Tachibana, “Structural characterization of the C₆₀ nanowhiskers heat-treated at high temperatures for potential superconductor application”, Trans. Mat. Res. Soc. Japan, 38[4](2013)517-520

2. 学会発表

- (1) 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, “C₆₀-C₇₀2 成分ナノウィスカーの合成”, ナノファイバー学会第 4 回年次大会講演予稿集, P.26, 2013 年 7 月 5 日, つくば
- (2) D. Matsuura, C. Hirata, T. Konno, T. Wakahara, K. Miyazawa, T. Kizuka, “In Situ Transmission Electron Microscopy of Bending Process of C₆₀/C₇₀ Nanowhiskers”, Abstracts of APCC12, The 12th Asia Pacific Physics Conference, pp. 865-865, 2013 年 7 月 14-19 日, 千葉
- (3) T. Konno, T. Wakahara and K. Miyazawa,

"Synthesis and Structural Analyses of C₆₀-C₇₀ Two-Component Fullerene Nanowhiskers", Abstracts of 23rd Annual Meeting of MRS-Japan 2013, P.J-O9-006, Dec. 9-11, 2013, Yokohama Port Opening Plaza, Yokohama

- (4) Kun'ichi Miyazawa, Chika Hirata, Toshio Konno, Takatsugu Wakahara, Ryosuke Kano, Masaru Tachibana, "Synthesis of C₆₀-C₇₀ two-component fullerene nanowhiskers by LLIP method", nanoeh6abs program, P.28-28, 6th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health, Nagoya Congress Center, October 28 - 31, 2013, Nagoya
- (5) 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, “C₆₀-C₇₀2 成分ナノウィスカーの合成と構造解析”, 日本物理学会講演概要集, 第 68 巻第 2 号第 4 分冊, P.740, 2013 年秋季大会, 2013 年 9 月 25 日 ~ 9 月 28 日, 徳島
- (6) 松浦大輔, 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, 木塚徳志, “C₆₀/C₇₀ 合金ナノウィスカーのヤング率の組成依存性”, 2014 年春期講演大会(第 154 回) 日本金属学会講演大会概要集, P.22, 2014 年 3 月 21 日 ~ 23 日, 東京

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. なし
2. 実用新案登録
(該当なし)
3. その他
(該当なし)

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：ナノマテリアルの慢性影響および生殖発生毒性評価系に関する研究

研究分担者：広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所総合評価研究室	室長
研究協力者：小縣 昭夫	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任研究員
坂本 義光	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任
山本 行男	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任
藤谷 知子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任
北條 幹	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 主任
猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 科長
中江 大	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部 部長
西村 哲治	帝京平成大学薬学部薬学科	教授
平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 主任研究員
小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 主任研究員
高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 研究員
松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 研究員
加藤 日奈	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 研究員
川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 研究員
小林 克己	国立医薬品食品衛生研究所	総合評価研究室 研究員
江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所	客員研究員

研究要旨

本研究では、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研究の一環として、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与および気管内投与による中皮腫誘発性について繊維長が及ぼす影響、MWCNTにより誘発されたラット中皮腫のプロテオーム解析および、ナノマテリアルの催奇形性について解析を行っている。25年度は、経気管反復投与においても誘発率としては弱いもののMWCNTが中皮腫誘発性を示すことを確認した。また、投与した試料の繊維長の解析からは、気管内投与による中皮腫誘発性にも繊維長が関連していることが示唆された。また、中皮腫誘発性の高い形状を持つMWCNTの方が、誘発率の弱いものに比べて血清中のタンパク質の発現変動に与える影響も大きいことが、プロテオーム解析から検証された。しかし、そこで発現するタンパク質と中皮腫との関連性についてはさらなる検討は必要である。一方、多層カーボンナノチューブに形状が類似しているアスベストについてもCNTの10倍量の大量投与により催奇形性作用を示すことが確認され、奇形発現要因の一つとしても繊維本数や繊維長との関連性のあることが示唆された。

A . 研究目的

近年、新素材である産業用ナノマテリアルは、新たな用途や特性をもたらすと期待されている。物理化学特性により、ヒト健康にも未知の影響を及ぼす可能性が指摘されているが、そのための適切な健康リスク評価を行えるほどの知見は未だ十分に集積したとは言えない。この問題は 2004 年頃から現在まで国内外共に社会的な関心として高い状態である。国際機関においても OECD が 2006 年から産業用ナノマテリアルの作業グループを設置し、有害性情報の収集、評価に対してスポンサーシッププログラムを中心とした活動が行なわれている。このプログラムでは、現在までに得られた情報を整理すると共に、更なる知見の必要性やガイドラインの見直し等の検討が行われているところである。我々のこれまでの研究では、その研究開始当初より体内残留性に基づいた慢性影響が最も懸念すべき健康影響であるとの認識に則り、特にアスベスト様形状を持つ多層型カーボンナノチューブ (MWCNT) については中皮腫を誘発するポテンシャルを持つことを明らかにしてきた。さらに、我々は MWCNT の曝露が催奇形性ポテンシャルを持つことも平成 23 年度の研究で明らかにした。25 年度は MWCNT による気管内投与による慢性影響と中皮腫誘発時におけるプロテオーム解析、及び催奇形性誘発関するアスベストとの類似性に関する研究を行うことを目的とした。

B . 研究方法

1 . 多層カーボンナノチューブのラットによる経気管反復投与及び投与後 52 週間飼育実験

ヒトへのばく露条件を考慮した経気管反復投与及び投与終了後長期飼育による多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット呼吸器系への影響を観察した。動物は、RccHan™:WIST 系、雄性ラット 10 週齢を用いた。MWCNT は、M 社製 MWCNT-7 [長さ 2 μm , 径 75 nm, Fe 含有量 0.344%] を分散液に懸濁し、0.01 (L 群), 0.05 (M 群) 及び 0.25 mg/kg 体重 (H 群) の用量で、各群 20 匹に、1 回/4 週間、計 12 回、経気

管噴霧投与した。分散液の調整は MWCNT の 20 倍量のショ糖でらい解した後、さらに 20 倍量の Tween 80 を加え、らい解した後、イオン交換水で MWCNT 濃度として 0.25% になるよう調整した (特許公開 2008-230935)。動物は、投与後 52 週間を目処に飼育し、終了時生存例について、病理学的に検索した。

2 . 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) により誘発されたラット中皮腫のプロテオーム解析

MWCNT 投与実験 (F344 (12 週令, n=10)) の腹腔内に形状の異なる MWCNT (S 社製 SD-1: L= 8 μm , = 150 nm ; SD-2: L= 3 μm , = 10-15 nm) を単回投与 (1.0mg/kg) 後、50 週前後で血液を採取し血清に分離した。

二次元電気泳動による発現差異解析および LC/MS/MS による有意変動タンパク質の同定: 血清サンプルは前処理により、アルブミンと IgG を分離除去した。次いで、サンプル (対照群, SD-1 投与群, SD-2 投与群) 各 25 μg を蛍光色素 (Cy2, Cy3, Cy5: 各 200 pmol/25 μg) で標識した。標識サンプルは、蛍光ディフェレンスゲル二次元電気泳動法 (2D-DIGE) に従い、等電点電気泳動そして SDS 電気泳動を行なった。二次元に分離展開したタンパク質スポットの画像を取り込み、DeCyder 解析ソフトを用いて発現スポットの検出、マッチング、有意差検定を行った。得られた有意スポットをトリプシン消化後、LC/MS/MS 法にて分析し、候補タンパク質を同定した。

3 . 多層カーボンナノチューブ類似物質としてのアスベストの催奇形性 (腹腔内投与)

UICC のアスベスト (クロシドライト、クリソタイルおよびアモサイト) を 2% カルボキシメチルセルロースナトリウム (東京化成工業) / リン酸緩衝生理食塩水を用いて、磁気端子攪拌機および超音波処理により懸濁した後、高圧蒸気滅菌し、妊娠 9 日目の CD1 マウスに 4mg あるいは 40mg/kg 体重を腹腔内投与した。妊娠 18 日に胎仔の外表面奇形と骨格奇形を検査した。

C . 研究結果

1. 多層カーボンナノチューブのラットによる 経気管反復投与及び投与後 52 週間飼育実験

投与期間中の途中死亡例、瀕死例の発現、終了時生存例の一般症状及び体重増加推移に投与と関連した異常は認められなかった。終了時生存例について、組織学的に、MWCNT の沈着は、主にマクロファージに貪食された状態で肺胞内、細気管支や血管壁周囲のリンパ組織内に認められた。最終投与終了後 52 週目の MWCNT の肺内沈着量は、L、M 群に比べて、H 群で顕著に多かった。また肺の呼吸細気管支、肺胞管及び肺胞における、末梢性の増殖性病変が認められた(表 1)。中皮組織の組織学的変化では、M 及び H 群で腹腔内中皮腫各 1 例が、また H 群に心嚢膜中皮腫が 1 例、臓側胸膜中皮細胞の肥大及び過形成が夫々 1 例ずつ観察された(表 2)。

2. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)により 誘発されたラット中皮腫のプロテオーム解析

血清サンプルの発現差異解析は、各群 6 サンプルずつ 2 回行った。本解析では、マスターゲル上で 951 ケのタンパク質スポットを検出した。対照群に対する投与群のサンプルにおける発現量の変化は、T 検定($p < 0.05$)において SD-1 投与群が 5.3%、SD-2 投与群が 3.7%の有意変動を認めた。また、2 倍以上の発現量比を示すものは、SD-1 投与群が 17.9%と SD-2 投与群が 12%であった。更に両方の条件を満たすものは、それぞれ 2.1%(20 ケ)と 0.9%(9 ケ)のタンパク質が認められた(表 3)。これらのスポットのうち、発現変動の影響が大きい SD-1 投与群の 6 ケについて、LC/MS/MS による同定を行った。その結果、タンパク質分解の調節作用、酸化酵素、ヘムタンパク質の結合調節作用、リポタンパク質の運搬作用を持つタンパク質が同定され、現在、確認作業を行っている(表 4)。

3. 多層カーボンナノチューブ類似物質としての アスベストの催奇形性(腹腔内投与)

クロシドライト、クリソタイルおよびアモサイトの 4mg/kg 体重の投与では、母体あたりの、総着床数と、早期死胚数、後期死胚数、生存胎仔数

およびそれらの総着床数中の%、生存胎仔総重量および胎仔の平均重量(雌雄)は、対照群と各投与群間で有意差はなかった。クロシドライト投与群で外脳と多指がそれぞれ 1 例ずつ、アモサイト投与群で眼瞼開裂が 1 例見られたが、その発現頻度は、対照群と有意差はなかった(表 5)。

しかし、投与量 40mg/kg 体重では、クロシドライト投与群で着床数中の生存胎仔の割合(%)が有意に低下し、クリソタイル投与群およびアモサイト投与群で早期死胚を有する母体の頻度が有意に増加した。また、アモサイト投与群で四肢減形成を主とする外表奇形および脊柱の癒合・四肢減形成を主とする骨格奇形が、クロシドライト投与群およびクリソタイル投与群で脊柱の癒合を主とする骨格奇形が有意に発現した(表 6)。

D. 考察

気管内投与で認められた中皮細胞の増殖性病変としては、0.05 及び 0.25 mg/kg 群で腹腔内中皮腫、0.25mg/kg 群で心嚢膜の中皮腫、臓側胸膜の中皮細胞の過形成及び肥大が認められたが、いずれも発現率が低かった。また MWCNT 投与群における肺実質及び胸膜における腫瘍の発現は認められなかった。ラットに経気管投与した MWCNT は肺の増殖性病変と低頻度ながら中皮種を誘発する可能性を示したが、その生物学的意義については現在なお検討中である。

今回の MWCNT の経気管反復投与実験において、経気管投与用に調製した分散液中の MWCNT-7 繊維サイズの分布は、繊維長が 1-4 μm 以下が 95.8%、5 μm 以上が 4.2%と既報の腹腔内投与に用いた MWCNT より繊維長の短いものであったが、この試料を 0.25 mg/kg で腹腔内単回投与した場合の腹膜中皮腫の発現率は 4/20 例(20%)であった。尚、参考データとして表 2 に示したように、MWCNT-7 の 2%CMC で懸濁液を 0.1 及び 0.3mg/kg 体重で単回腹腔内投与し約 52 週後の中皮腫発生率は 64-83%であることから、今回の試験で呼吸器系上皮及び体腔膜上皮の反応が想定される反応より、弱かった理由としては、投与試料とした MWCNT の

サイズが短かった可能性がある。しかし、この経気管投与のための試料でも中皮腫誘発性を有することが確認された。

中皮腫誘発性に関する血清中タンパク質の発現差異解析から、長さおよび径の相対的に大きな構造をもつ SD-1 投与が、小さな構造を持つ SD-2 投与に比較して、血清中のタンパク質の発現変動に与える影響が大きかった。このことは、MWCNT のラット投与後 50 週前後で、結節や中皮腫などの病理組織所見に認められるように全身性の病態変化を引き起こし、投与部位から血液循環系へ影響が波及した結果と考えられる。現在、LC/MS/MS の結果から同定されたタンパク質は、中皮腫発症との関連性について解っておらず今後の課題となっている。今後、病理組織所見による結節および中皮腫の発現がある病変組織をサンプルとして、解析を進めていくことが重要と考えられる。

多層カーボンナノチューブ類似物質として試験した 3 種のアスベスト（クロシドライト、クリソタイルおよびアモサイト）の 40mg/kg 体重の腹腔内投与でも、H23 年に報告した M 社製 MWCNT-7 や H24 年に報告した N 社製 MWCNT を投与した実験と同様の奇形が認められた、その発現用量は MWCNT に比べると、はるかに高用量によるものであった。しかしながら、今回の試験によりアスベストにも催奇形性作用のあることが確認されると共に、M 社製 MWCNT や N 社製 MWCNT との発現する奇形の類似性を考えると、奇形発現要因の一つには繊維本数や繊維長との関連も示唆された。今後は、繊維長や分散性の異なる CNT においても検討を加えていく必要があると考えられた。

E . 結論

今回の研究では、経気管反復投与においても誘発率としては弱いものの MWCNT が中皮腫誘発性を示すことを実証した。また、投与した試料の繊維長の解析からは、気管内投与による中皮腫誘発性にも繊維長が関連していることが示唆された。ま

た、中皮腫誘発性の高い形状を持つ MWCNT の方が、誘発率の弱いものに比べて血清中のタンパク質の発現変動に与える影響も大きいことが、プロテオーム解析から検証された。しかし、そこで発現するタンパク質と中皮腫との関連性についてはさらなる検討は必要である。一方、多層カーボンナノチューブに形状が類似しているアスベストについても CNT の 10 倍量の大量投与により催奇形性作用を示すことが確認され、奇形発現要因の一つにも繊維本数や繊維長との関連性のあることが示唆された。

F . 健康危機情報

該当無し

G . 研究発表

(論文発表)

- Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Arch Toxicol. 88:65-75. (2014)
- Taquahashi, Y, Ogawa, Y, Takagi, A, Tsuji, M, Morita, K, Kanno, J. An improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 38(4):619-28. (2013)
- Numano T1, Xu J, Futakuchi M, Fukamachi K, Alexander DB, Furukawa F, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Suzui M. Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. Asian Pac J Cancer Prev. 15(2):929-935. (2014)
- 広瀬明彦, ナノマテリアルの健康影響評価指針の国際動向, 薬学雑誌, 133(2), 175-180. (2013)
- (学会発表)

Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi, Tomoko Fujitani, Yoshimitsu Sakamoto, Yasuo Yoshioka, Yasuo Tsutsumi, Hiroyuki Tsuda, Jun Kanno :
Nanotoxicity and nano safety science in various exposure scenarios. (Symposium invited)
EUROTOX2013 (2013.9, Switzerland, Interlaken)

Akihiko Hirose, Norihiro Kobayashi, Mayumi Kawabe*1, Hironao Nakashima*1, Takamasa Numano*1*2, Reiji Kubota, Yoshiaki Ikarashi:
Developmental toxicity by intratracheal instillation of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice.
6th International Symposium Nanotechnology, Occupational and Environmental Health (2013.10, Nagoya)

坂本義光, 小縣昭夫, 湯澤勝弘, 久保喜一, 安藤弘, 長澤明道, 高橋博, 矢野範男, 西村哲治, 広瀬明彦, 井上義之, 橋爪直樹, 猪又明子, 中江 大 “ラットにおいて多層カーボンナノチューブの経気管噴霧反復投与が及ぼす影響” 第30回 日本毒性病理学会 2014. 1. 徳島

坂本義光, 小縣昭夫, 猪又明子, 西村哲治, 広瀬明彦, 中江 大 “繊維長の異なる多層カーボンナノチューブによるラット中皮腫誘発性の検討” 第40回 日本毒性学会 2013.6, 幕張

藤谷知子, 安藤弘, 久保喜一, 猪又明子, 小縣昭夫, 広瀬明彦, 西村哲治, 中江大: マウスにおけるナノマテリアルの催奇形性に関する研究。第40回日本毒性学会学術年会, 2013, 6,17-19, 幕張

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, 6,17-19, 幕張

山本行男, 坂本義光, 大貫文, 猪又明子, 小縣昭夫,

広瀬明彦, 中江大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) 投与による中皮腫誘発ラットにおけるプロテオーム解析 (第三報): 形状の異なる MWCNT 投与ラットにおける血清タンパク質の発現変動。第86回日本生化学会大会, 2013, 9,11-13, 横浜

Sakamoto Y, Ogata A, Nishimura T, Hirose A, Nakae D. Induction of mesothelioma by an intraperitoneal administration of 7 different manufactured multi-wall carbon nanotubes. 72 th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association ; Yokohama, 2013,10

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)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

表1 呼吸器系組織所見

実験群/ 用量 (mg/kg)	観察 例数	泡沫細胞 集簇	炎症	線維化	増殖性病変				
					細気管支		終末細気管支 - 肺胞		肺泡領域 細気管支 /肺泡上皮細胞
					非線毛性	線毛性	非線毛性	線毛性	
对照群(分散液)	18	4 (22)	4 (22)	6 (35)	2 (11)	1 (6)	1 (6)	0	
0.01	15	2 (13)	3 (20)	4 (56)	5 (33)	2 (13)	1 (7)	0	
0.05	16	4 (25)	6 (40)	8 (52)	6 (40)	3 (19)	3 (19)	0	
0.25	15	5 (37)	12 (82)*	14 (98)*	4 (29)	4 (29)	5 (33)	7(48)*	

()内%

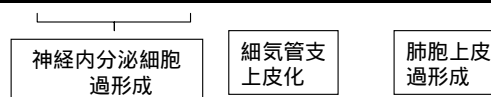


表2 中皮細胞増殖性病変

実験群/ 用量 (mg/kg)	観察 例数	肉眼所見 腫瘍結節 出血性体液			組織所見									
		心膜	胸膜	腹膜	心膜			胸膜			腹膜			
					肥大	過形成	中皮腫	肥大	過形成	中皮腫	肥大	過形成	中皮腫	
気管内投与群														
対照群	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.01	16	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05	20	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1(5%)
0.25	17	0	0	0	0	0	1(6%)	1	1	0	0	0	0	1(6%)
腹腔内投与群														
対照群	19	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
0.25	20	0	0	1	0	0	0	0	0	0	7	1	4 (20%)	
(参考データ:既報の試料による腹腔内投与実験)														
0.1	11													7 (64%)
0.3	12													10 (83%)

表3 プレプロテオーム発現差異解析の結果

グループ	検出スポット数	T 検定 (P<0.05) (A) スポット数	発現量比 (2 倍の増減) (B) スポット数	(A) & (B)
SD-1	951	50 (5.3%)	167 (16.7%)	20 (2.1%)
SD-2	951	35 (3.7%)	114 (12.0%)	9 (0.9%)

検出スポット数はマスターゲル上の数を示す。(A)コントロールに対する発現強度の T 検定では、SD-1 投与群と SD-2 投与群では、5.3%と 3.7%と有意の変動が得られた。(B) 2 倍以上の発現量比を示すものは、SD-1 投与群で 16.7%、一方、SD-2 投与群で 12%だった。有意かつ 2 倍以上の変動を示すものとしては、各群それぞれで 2.1%と 0.9%であった。

表4 有意の発現差異を示すスポット (対照群と SD-1 投与群間) の MS/MS データ

ID 番号	タンパク質名	分子量	等電点	マッチ数	回収率(%)	PGDS スコア
P14046	-1 inhibitor III	163669	5.63	6	5.7	133.1
P13635	Ceruloplasmin EC 1 16 3 1	120763	5.22	5	4.8	176.8
P04639	Apolipoprotein A-IV	44428	4.94	4	12.4	279.1
P06866	Haptoglobin	38524	6.09	2	18.7	163.1

LC/MS/MS 分析は、Waters 社の nano-Acquity-Synapt を用いて行った。

マッチ数は、トリプシン消化後のペプチドの数を示し、回収率は、全配列に対する回収したペプチドの割合を示す。

PGDS スコアは、同定に対する信頼性を示す数値で、50 より大きい数値ほど信頼性が高い。

表5 アスベスト 4mg/kg 体重の腹腔内投与の影響

	対照群	クロシドライト	クリソタイル	アモサイト
母体数	9	10	10	10
体重				
投与時	39.0±1.9	35.8±4.2	36.3±2.8	37.0±3.2
最終	70.2±6.0	65.0±2.0	66.7±8.3	65.3±7.8
黄体数	16.8±1.5	16.6±1.5	16.7±1.3	16.5±1.8
着床数	16.0±2.1	14.6±1.6	145.1±2.3	15.2±2.3
吸収胚				
早期(数/母体)	1.0±0.7	0.3±0.5	0.6±0.7	1.5±2.5
後期(数/母体)	0±0	0.3±0.5	0.1±0.3	0.1±0.3
生存胎仔数	15.0±2.4	14.0±1.6	14.2±2.5	13.6±3.5
生存胎仔平均重量				
雄	1.45±0.09	1.45±0.08	1.45±0.08	1.49±0.06
雌	1.40±0.08	1.37±0.08	1.39±0.06	1.41±0.06
外表奇形を有した母体数	0	2	0	1
外表奇形を有した胎仔数/全胎仔数	0/135	2/140	0/142	1/136
観察された奇形		外脳・眼瞼開裂・多指		眼瞼開裂
骨格奇形を有した母体数	0	2	0	0
骨格奇形を有した胎仔数/全胎仔数	0/135	2/140	0/142	0/136
観察された奇形		頭骨形成不全・多指		

数値は、母体毎の平均値±標準偏差、あるいは、観察された頻度。

表6 アスベスト 40mg/kg 体重の腹腔内投与の影響

	対照群	クロシドライト	クリソタイル	アモサイト
母体数	9	10	9	10
体重				
投与時	37.5±2.1	37.9±1.1	36.6±1.8	37.6±2.0
最終	67.0±6.0	59.5±8.7	60.0±6.9	65.1±8.2
黄体数	17.9±1.8	19.3±1.3	18.7±1.3	18.5±1.4
着床数	14.6±2.5	14.4±1.6	14.2±1.2	14.9±1.4
吸収胚				
早期(数/母体)	0.1±0.3	5.1±5.5	3.9±4.3	3.2±3.3
(吸収胚を有する母体数)	1	5	8**	8**
後期(数/母体)	0±0	0.2±0.4	0±0	0.1±0.3
生存胎仔数	14.4±2.7	9.2±5.3	10.3±3.9	11.6±3.7
生存胎仔平均重量				
雄	1.47±0.08	1.42±0.12	1.43±0.04	1.40±0.08
雌	1.39±0.08	1.33±0.09	1.35±0.06	1.33±0.08
外表奇形を有した母体数	0	1	1	4*
外表奇形を有した胎仔数/全胎仔数	0/130	1/92	1/93	5/116*
観察された奇形		少指	眼瞼開裂	少指、顔面裂、無尾
骨格奇形を有した母体数	0	3	4*	7**
骨格奇形を有した胎仔数/全胎仔数	0/130	6/92*	5/93*	13/116***
観察された奇形		少指・脊椎癒合	脊椎癒合・肋骨癒合	少指・脊椎癒合・肋骨癒合

数値は、母体毎の平均値±標準偏差、あるいは、観察された頻度。