

201428013A

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究  
- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -  
(26-化学 - 一般 - 003)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究  
- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -  
(26-化学 - 一般 - 003)

平成26年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 今井田 克己

平成27(2015)年3月

厚生労働科学研究費補助金  
化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究  
- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -  
(26-化学 - 一般 - 003)

平成26年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 今井田 克己  
平成27(2015)年3月

研究報告書目次

目 次

I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -

今井田 克己 ..... 1

II. 分担研究報告書

1. ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価（免疫組織学）

今井田 克己 ..... 19

2. ナノマテリアル吸入暴露実験及び組織負荷量の研究

高橋 祐次 ..... 29

3. ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

石丸 直澄 ..... 47

4. 多層カーボンナノチューブの吸入暴露で誘発された肺毒性のメカニズム研究

相磯 成敏 ..... 61

III. 研究成果の刊行に関する一覧表 ..... 87

IV. 研究成果の刊行物・別刷 ..... 88

V. 班会議資料（2014年10月8日開催）

# I. 総括研究報告書

ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究

- 全身暴露吸入による毒性評価研究 -

研究代表者 今井田 克己

香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

## 研究要旨

厚労省の「ナノマテリアルの安全性対策に関する検討会」の方針に従い、高生産量ナノマテリアルのうち、特に、腹腔内投与によって中皮腫発がん性が示された多層カーボンナノチューブ (Multi wall carbon nanotubes (MWCNT)) を対象として、経気道暴露時の生体影響について検討してきた。

先行研究 [H20-化学一般-006] において中皮腫発がん性 (J Toxicol Sci. 33:105-116, 2008) の検討に用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を事例対象として、凝集体/凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法 (Taquann 法) 及び、それを空气中に一定濃度で浮遊させるカートリッジ直噴式ダスト発生装置 (以下、直噴システム) を独自開発した (J Toxicol Sci. 38:619-628, 2013)。この方式によりマウスの肺に単繊維が肺胞内にまで到達し、細気管支から肺胞レベルの病変を誘発すること、凝集体はほとんど認められないこと確認した (執筆準備中)。本研究は、この新システムによる吸入試験を用いる点を特徴としている。体内動態、病理組織学的評価 (光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価にわたり、計画的経時解析により、腫瘍性及び非腫瘍性の組織病変の同定、それらの形成に関連する病態の急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みる点も本研究の特徴である。本研究に用いる吸入試験法は原理的に他の NM に適応が可能であり、既に酸化チタンについて検討を開始し、予備的な知見を得ている。そこで、ナノマテリアルの中で産業応用が進んでいる各種 MWCNT、酸化チタンを検体とし、マウスに対して全身暴露投与を行い (高橋)、体内動態 (高橋および相磯)、病理組織学的評価 (免疫染色 (今井田)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG, 相磯)、免疫系機能評価 (石丸) 等を実施し、毒性学的変化の検出を試みている。今年度の研究の全身暴露投与により、13 週後、26 週後でも肺内に MWCNT が残存することが示された。今回の実験では MWCNT と腫瘍発生の因果関係までは明らかにすることはできなかったが、今後、各分担研究の継続により、MWCNT の呼吸器系への毒性評価を行っていく予定である。正常 B6 雌マウスに T-CNT を吸入暴露することによる免疫システムへの影響の検討では、吸入後 1 ヶ月では、肺組織において気管支上皮の軽度の変性及び肺胞マクロファージの集簇が見られた。またマクロファージ関連の遺伝子発現

が高濃度群で上昇していたが、M1あるいはM2マクロファージの明瞭な分化が確認できなかった。初期の変化として未熟な単球、マクロファージが集簇していたものと考えられ、今後暴露後長期での観察が必要である。リンパ組織においてもそれぞれの免疫担当細胞の割合及び細胞数に関してはT-CNT吸入暴露で影響は確認できなかったが、長期観察での影響を確認する必要がある。また、暴露後3ヶ月での末梢血内の単核球の解析では、T-CNT吸入暴露によって各免疫担当細胞分画への影響は観察されなかった。肺組織、脾臓においてT-CNT暴露1ヶ月でマクロファージ関連遺伝子(F4/80、MCP-1、CCR2、iNOS)の発現が亢進していたことから、マクロファージを中心とした自然免疫系の活性化が進んでいることが示唆された。

今後も順次、MWCNT、酸化チタンなど複数種のナノマテリアルの吸入試験を実施し、効率的にナノマテリアルの毒性評価を進めるとともに、総合的手順を整え、ヒトへの有害性評価を行う。複数の毒性評価施設への導入が促進されれば、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

## A. 研究目的

本研究の目的は、工業的に大量生産されるナノマテリアル(以下NM)の毒性評価を人で想定される現実的な暴露経路である全身暴露吸入毒性試験法を用いて実施すること、及び、吸入により惹起される病変の詳細分析により評価基準を策定することにある。

従来、粉体の吸入試験の実施は大規模施設に限られていることから、多種に及ぶNMの評価に気管内投与等の簡便法が多く用いられてきた。しかし、人が吸入することが想定されるNMの分散状態と異なること、そのために惹起される肺病変の質が異なるとの指摘があった。すなわち、NMは比表面積が極めて大きいことから容易に凝集体を形成し、そのままの検体を投与すると凝集体による毒性病変が誘発され、個々のナノ粒子の毒性を必ずしも反映しないことが指摘されてきた。

先行研究[H20-化学一般-006]において中皮腫発がん性(J Toxicol Sci. 33:105-116, 2008)の検討に用いた多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を事例対象として、凝集体/凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法(Taquann法)及び、それを空气中に一定濃度で浮遊させるカートリッジ直噴式ダスト発生装置(以下、直噴システム)を独自開発

した(J Toxicol Sci. 38:619-628, 2013)。この方式によりマウスの肺に単線維が肺胞内にまで到達し、細気管支から肺胞レベルの病変を誘発すること、凝集体はほとんど認められないこと確認した(執筆準備中)。本研究は、この新システムによる吸入試験を用いる点を特徴としている。体内動態、病理組織学的評価(光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能評価にわたり、計画的経時解析により、腫瘍性及び非腫瘍性の組織病変の同定、それらの形成に関連する病態の急性から慢性への経時変化、及びそれらに先行する機能的変化の検出を試みる点も本研究の特徴である。本研究に用いる吸入試験法は原理的に他のNMに適応が可能であり、既に酸化チタンについて検討を開始し、予備的な知見を得ている。ナノマテリアルの中で産業応用が進んでいる各種MWCNT、酸化チタンを検体とし、マウスに対して投与する(高橋)。体内動態(高橋および相磯)、病理組織学的評価(免疫染色(今井田)、8-hydroxy-2'-deoxyguanosine(8-OHdG, 相磯)、免疫系機能評価(石丸)等)を実施し、毒性学的変化の検出を試みる。

## B. 研究方法

### B-1. 検体の高分散化処理(Taquann法)

凝集体・凝固体を含まない高度に分散した検体を得るため、先行研究で開発した Taquann 法処理を行った。

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」の概念を、液相での分散と濾過に組み合わせた技術であり、濾液の乾燥時に表面張力を受けないため、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、検体を三級ブタノール (TB、融点 ; 25.69 ° C、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、金属製フィルターで濾過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態の濾液を溶媒回収型真空ポンプにより減圧し、液相を介さずに昇華させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の検体を得られる。

Taquann 法の技術開発は、MWCNT を検体として行ったが、その原理上、溶媒として使用する TB に不溶性の物質であれば適応が可能である。

#### (1) MWCNT

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。以下の各測定値は先に共同研究を行った東京都健康安全研究センターによる測定値である。

繊維径 70-170 nm (平均 100 nm)  
長さ 1-19 $\mu$ m (> 5  $\mu$ m 27.5%)  
繊維数 3.55 $\times$ 10<sup>11</sup>本/g  
形状 繭状凝集体を含む単離繊維  
化学組成 炭素純度 99.5%以上  
鉄 : 3500 ppm  
硫黄 : 470 ppm  
塩素 : 20 ppm  
フッ素 : <5 ppm  
臭素 : <40 ppm

MWCNT 原末をガラス製ビーカーで TB に混合した。氷冷化で TB をシャーベット状にして金属製スパーテルで十分に混合した後、凍結融解による分散促進を一回行った。超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz、柴田科学株式会社) に 15 分静置して分散させ、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 $\mu$ m) で濾過し大型の凝集体を

除くとともに、分散を図り、濾液を直ちに液体窒素で凍結・固化させ、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて除去し MWCNT の乾燥検体を得た。

#### (2) 酸化チタン

酸化チタンはテイカ株式会社の MT-500B (一次粒子径 35nm、ルチル型、表面処理なし) を使用した。Taquann 法による分散方法の検討の後、エアロゾルの粒径測定を行って吸入暴露条件を確立し、マウスへの吸入試験を実施した。

酸化チタン原末をメノウ乳鉢で静かに粉砕してから硼珪酸ガラス製メディウム瓶 (PYREX®、500 mL、アズワン) の中で TB に懸濁し、凍結融解による分散促進を一回行った後、超音波洗浄器 (SU-3TH、出力 40W、発信周波数 34kHz、柴田科学株式会社) による処理を 30 分間おこない、沈殿物がなくなるまで分散させた。酸化チタンの分散液 (0.05 $\mu$ g/mL) を、ダスト発生器に使用する金属製カートリッジに直接分注した。

### B-2. マウスの全身暴露吸入実験

#### (1) 動物

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウス 12 週齢を使用した。このマウスは当研究部において、MWCNT の腹腔内投与試験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

#### (2) 飼育条件

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 4 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 (商品名 : 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 $\pm$ 1°C、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、固形飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、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。



### (3) 群構成

#### MWCNT

対照群、低用量群（目標濃度 1 mg/m<sup>3</sup>）、高用量群（目標濃度 2 mg/m<sup>3</sup>）の 3 群構成とした。各群 16 匹のマウスを使用し、1 日 2 時間（10：00～12：00）の週 1 回の吸入暴露を 5 週間反復し、合計 10 時間の暴露を行った。この動物は全例を「ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究（徳島大学大学院ヘルスバイオサイエンス研究部 教授 石丸直澄分担研究者）」に供した。

#### 酸化チタン

対照群、酸化チタン群の 2 群構成とした。酸化チタン群の目標濃度は 2 mg/m<sup>3</sup>とした。各群 12 匹のマウスを使用し、2 時間（10：00～12：00）の単回吸入暴露を行った（表 2）。暴露した動物は、吸入暴露終了直後、3 日後、7 日後に解剖を行い、肺の病理組織標本を作製して観察を行った。マウスはペントバルビタールナトリウム（ソムノペンチル；共立製薬株式会社）を腹腔内投与し、麻酔下で腋窩動脈より出血致死後に解剖した。肺は気道内の MWCNT 等の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸前に気管を喉頭軟骨部で結紮して肺の虚脱を防止し、腹大動脈及び腹大静脈を切断して解放後、右心室に翼状針（21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社）を刺入して生理食塩水（大塚生食注、大塚製薬工場）を約 40cm 水柱の静水圧（流量は点滴調節器により適宜調節）により注入し血液を除去した。回路を切り替えて 4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液（和光純薬工業、組織固定用、用時調製）を同静水圧にて約 3 分灌流して固定した後、同組成固定液に全肺を浸漬した。

### (4) カートリッジ直噴式ダスト発生装置 (Taquann 直噴全身吸入装置)

全身暴露吸入は、先行研究で開発した装置を使用した（共同開発 柴田科学株式会社）。基本的構造は同じであるがサブチャンバー形状が異なる 2 つのタイプ（Ver2.0、Ver2.5）があり、MWCNT には Ver2.0、酸化チタンには Ver2.5 を使用した。この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、

圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジ（容量：23.5 mL、内寸：直径 22 mm、高さ 65 mm）はステンレス製で、円筒状胴体、4 つの噴出孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバルブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、Taquann 分散処理を施した検体を所定の濃度（0.025 mg/mL、又は 0.05 mg/mL）で TB に再懸濁し、各カートリッジに懸濁液 10 mL を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TB を昇華除去することで達成した。MWCNT の低用量群用に 0.25 mg/カートリッジ、高用量群用に 0.5 mg/カートリッジを用意した。

噴射装置は、サブチャンバー（容量：32 L）に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆った ULPA フィルターを接続した。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続バイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は 0.4 Mpa、噴射時間は 0.2 秒、1 カートリッジ当たり 5 回の噴射を実験者が手動で実施した。暴露チャンバーの総換気流量は約 13 L/min（基礎換気流量；10 L/min、相対濃度測定；1.5 L/min、質量濃度測定；1.5 L/min）と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、暴露開始時に 2 本を 1 分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ約 6 分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。なお、対照群は、検体を充填しないカートリッジを使用して同じスケジュールで圧縮空気のみを噴射した。

### (5) 暴露チャンバー

動物を収容し検体を暴露する暴露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを使用した。（共同開発 柴田科学株式会社）。動物は、

チャンバーの蓋から吊るしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大 16 匹収容が可能である。暴露チャンバーはアクリル製の OUTER チャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製した INNER チャンバーの 2 重構造となっている。INNER チャンバーは、直径 550 mm、高さ 550 mm、気積 105.5 L である。検体が触れる INNER チャンバーは交換可能であり、検体の変更に容易に対応できるシステムとなっている（特許出願済）。

#### (6) 暴露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

暴露チャンバー内の MWCNT の濃度のモニタリングは、相対濃度 (CPM; count per minutes) と質量濃度 ( $\text{mg}/\text{m}^3$ ) 測定を並行して行った。相対濃度測定は、対応濃度  $3 \times 10^5$  個/mL、2.5 nm の粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量: 1.5 L/min、TSI、東京ダイレック株式会社) を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー (080050-155、 $\phi$  55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (Model T60A20、 $\phi$  55mm、捕集効率 (DOP 0.3 $\mu\text{m}$ ): 96.4%、東京ダイレック株式会社) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社) に接続して 1.5 L/min の流量で暴露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量  $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120\text{min} = 180 \text{ L}$  から  $1 \text{ m}^3$  当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。暴露チャンバー内の温度、湿度を暴露時間の 2 時間を通してモニタリングした。

#### (7) 暴露チャンバー内のエアロゾル形状測定

暴露チャンバー内のエアロゾル化した粒子の形状を把握するため、エアロゾルを酸化アルミニウム製のフィルター (Anodisc 25、 $\phi$  21 mm、孔径

0.1 $\mu\text{m}$ 、ワットマン) に吸着させて採取し走査型電子顕微鏡で観察した。暴露チャンバー内のエアロゾルをサンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社) で 5 L/min の流量で 3 分間吸引した。フィルターホルダーはステンレス製のオープンフェイス型 (柴田科学特注品) を用いた。エアロゾルを吸着させたフィルターはオスミウムコーター (HPC-1SW、真空デバイス) で 5 秒間の処理を行って走査型電子顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で観察した。

#### (8) 暴露チャンバー内のエアロゾルの空気力学的質量中央値測定

酸化チタンに関しては、空気力学的質量中央値 (Mass Median Aerodynamic Diameter; MMAD) を測定するため、MOUDI (Micro-Orifice Uniform-Deposit Impactor, Model125 Nano MOUDI, KANOMAX, 分級サイズ ( $\mu\text{m}$ ); 10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.18、0.10、0.056、0.032、0.018、0.01) を使用して測定した。サンプリングは 10 L/min の流量で暴露時間を通して行った。各分級ステージには専用のアルミ箔にシリコンオイルを塗布したものを装着し検体を回収した。アルミ箔は、シリコンオイル塗布後、測定に使用する前に 50°C のインキュベーター内で 3 日以上留置しシリコンオイルに含まれる溶媒を除去した。捕集後のアルミ箔の重量から予め秤量したアルミ箔の重量を差し引いた値を検体の重量とし計算により MMAD を求めた。

#### B-3. 肺内の MWCNT 沈着量測定

先行研究で実施した p53<sup>+/-</sup>マウスの全身暴露吸入実験 (平均暴露濃度 2.5  $\text{mg}/\text{m}^3$ 、1 日 2 時間、週 1 回  $\times$  5 週間、合計 10 時間吸入暴露) から得られた肺サンプルを対象にして MWCNT 沈着量を測定した。

肺溶解液は 5w/v% 水酸化カリウム (和光純薬工業株式会社、試薬特級) に、0.1w/v% SDS (和光純薬工業株式会社、試薬特級) 0.1 w/v% EDTA  $\cdot$  2Na (同仁化学研究所、試験研究用)、2w/v% アスコルビン酸ナトリウム (和光純薬工業株式会社、試薬特級) を加えた組成である。各試薬は MilliQ 水に混合後、80°C で加熱して完全に溶解した。

EDTA・2Na は生体由来の金属イオン除去、アスコルビン酸ナトリウムは水酸化鉄 (II) が酸化により不溶性の水酸化鉄 (III) に変化してすることを防止する目的で添加した。

肺サンプル (気管及び左右主気管支を除く全肺約 200 mg) をマイクロチューブ (Protein LoBind、2 mL、エッペンドルフ) に入れ、加温した肺溶解液を 1.8 mL 添加した。可能な限り酸素を除去するため、デシケーター内で肺の脱気を行った後、窒素ガス雰囲気中でマイクロチューブを密栓した。マイクロチューブを 80°C に設定したインキュベーター内で 24 時間静置して肺を溶解した。目視観察により肺溶解液が澄明であることを確認後、高速微量冷却遠心機 (MX-205、TOMY) で 25°C、20,000×g、60 分の条件で遠心分離を行い、沈渣を回収した。沈渣に 1.5 mL の 70% エタノール (和光純薬工業) を添加し、ボルテックスを用いて溶解して再び 20,000×g、25°C、60 分の条件で遠心分離して沈渣を回収した。マイクロチューブをインキュベーター内で 50°C の条件で加熱しエタノールを除去後、0.1w/v% TritonX (ICN) 100µL に沈渣を分散し MWCNT 懸濁液とした。

アルミナフィルター (Anodisc、孔径 0.02µm、φ12mm、ワットマン) をロート型ガラス濾過器 (51G-1、三商) に載せ、ピペッティングにより十分に分散させた MWCNT 懸濁液 1µL をアルミナフィルター上に滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製 SEM 観察台 (S-GA、φ15×5 mm、日新 EM) にカーボンシール (φ12 mm、日新 EM) で固定した。オスミウムコーター (HPC-1 SW 型、真空デバイス) により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡 (VE-9800、KEYENCE) で 2,500 倍、加速電圧 2~2.8 kV の条件で観察した。観察はフィルターの直径に沿って行った。MWCNT の繊維長と数の計測を ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>) を用いて行った。

肺に含まれる MWCNT 繊維の本数 ( $C_t$ ) は、MWCNT 懸濁液の調製量 (100 µL、 $V$ )、1 µL の MWCNT 懸濁液がフィルターに展開した面積 ( $S_t$ )、計測した繊維数 ( $C$ )、繊維数を計測した視野の面積 ( $S_c$ ) を基に以下の式で計算した。

$$C_t = C \times \frac{S_t}{S_c} \times V$$

計測した 1 視野当たりの面積は、1,818/µm<sup>2</sup> (49.23×36.92 µm)、1 サンプル当たり 500 本以上の繊維数又は 30 以上の視野を観察した。なお、視野の辺縁に存在し、全長が確認できない繊維については計測対象から除外した。

#### B-4. T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m<sup>3</sup>) 5 回暴露投与後、13 週後の肺組織評価

分担研究者である国立医薬品食品衛生研究所毒性部で行われた、p53<sup>-/-</sup> knock out C57BL/6J マウスへの T-CNT 全身暴露試験で得られた肺組織の病理組織学的な評価を行った。

2mg/m<sup>3</sup> T-CNT の全身暴露投与を 1 回/週で行い、5 回投与後、13 週目に剖検を行った。倫理面への配慮として、過度の疼痛を与えることなく麻酔下に解剖を行い、病理組織学的な評価を行った。

病理組織学的評価は HE 染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡を用いて行った。極小の針状構造物である T-CNT は通常の光学顕微鏡では観察しにくく、その存在がと捉えにくいいため、偏光顕微鏡 (オリンパス BX53-33p-DPH2, DP21, U-POT) による観察も合わせて行った。

さらに、surfactant protein C (SP-C)、clara cell 10 (CC10)、CD68 による免疫染色を行い、HE 染色標本の組織構築と免疫組織学的特性について比較検討した。免疫染色では、ベンタナ HX システムディスカバリーを用いた。抗原賦活は、全ての抗体において 100°C の熱処理を 30 分間で行った。Buffer は RiboCC Buffer を用いた。一次抗体の反応条件は以下のとおりである。CC-10 (JBC1868954, Millopore) : 2000 倍希釈、室温 12 時間。SP-C (sc-13979, santa cruz biotechnology) : 50 倍希釈、37°C 1 時間。CD68 (ab125212, abcam) : 200 倍希釈、室温 12 時間。二次抗体反応条件はいずれも 30 分で行った。その後、LSAB 法を行い、発色は DAB マップキットを用いた。

#### B-5. T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m<sup>3</sup>) 5 回暴露投与後、26 週後の肺組織評価

B-4 と同様に、分担研究者である国立医薬品食品

衛生研究所で行われた p53<sup>+/-</sup> knock out C57BL/6J マウスへの T-CNT 全身暴露実験で得られた肺組織について病理組織学的な評価を行った。

2mg/m<sup>3</sup> T-CNT の全身暴露投与を 1 回/週で行い、5 回投与後、26 週目に剖検を行った。倫理面への配慮として、過度の疼痛を与えることなく麻酔下に解剖を行い、病理組織学的な評価を行った。

病理組織学的評価は HE 染色標本を作成し、通常の光学顕微鏡と偏光顕微鏡（オリンパス BX53-33p-DPH2, DP21, U-POT）による観察を合わせて行った。さらに、SP-C, CC-10, CD68 抗体を用いた免疫組織染色を行った。免疫染色で用いた機材や抗体情報は、B-4. と同様である。

#### B-6. 免疫制御系に関する評価

2 ヶ月齢の C57BL/6 (雌) を用い、各群 10 匹ずつで多層化カーボンナノチューブを吸入暴露装置（国立医薬品食品衛生研究所）により吸入を実施し、吸入終了 0、3、5、7、9 ヶ月で末梢血を採取する。吸入後、2 ヶ月、6 ヶ月、12 ヶ月で適切に屠殺後解析を行う。マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

#### MWCNT

多層化カーボンナノチューブは MWCNT-7（保土ヶ谷化学）を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) を用いた。対象群はフィルターを通したキャリアーエア吸入とした。低濃度群は 1 mg/m<sup>3</sup>、1 日 2 時間（週 1 回×5）の計 10 時間吸入した。高濃度群は 2 mg/m<sup>3</sup>、1 日 2 時間（週 1 回×5）の計 10 時間の吸入とする。

#### フローサイトメトリー解析

吸入マウスの末梢血を尾静脈から 50 μl 採取し、ヘパリン含有 PBS に懸濁後、0.83% 塩化アンモニウム水溶液にて溶血、洗浄、遠心後、蛍光色素標

識された各種リンパ球表面マーカー（CD4、CD8、CD19、CD11b、CD11c、F4/80、CD206、CD44、CD62L）に対する抗体にて染色、0.5%-PFA-PBS で固定後に、解析装置（FACSCant BD Biosciences）にてそれらの発現を検討した。また、頸部リンパ節、脾臓に関しても単核球を採取後、染色し解析を行った。

#### 病理組織解析

全身臓器を 10% 中性緩衝ホルマリンに浸漬、パラフィン包埋後、4 μm に薄切した標本をヘマトキシリン・エオジン溶液で染色した。

#### 免疫蛍光染色法

肺組織の凍結切片を用いて、蛍光標識した F4/80、CD206、CD11c に対する抗体で免疫蛍光染色を行った。解析は共焦点顕微鏡（Carl Zeiss, Jena, Germany）を用いた。

#### 定量化 RT-PCR 法

肺、脾臓からトライゾールを用いて通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

TGF-beta ; F-GACCGCAAC AACGCCATCTAT,

R-GGCGTATCA GTGGGGGTCAG,

F4/80; F-CTTTGG CTATGGGCTTCCAGTC, R-GCA

AGGAGGACAGAGTTTATCGTG,

TNF; F-CCTCCTGGCCAACGG CATG,

R-GCAGGGGCTCTTGAC GGCAG, Col3A; F-AACGGAGCT

CCTGGCCCAT, R-CCATCACTG CCCCAGCACC

#### B-7. 細胞増殖活性、病理組織学的検査及び MWCNT 沈着量の動態解析

対照群 (0 mg/m<sup>3</sup>) 1 群、MWCNT 暴露群 2 群 (0.2 および 2 mg/m<sup>3</sup>) の 3 群構成で、暴露を 3 回、5 回、10 回、20 回行い暴露翌日に解剖を行った群と、最後の暴露の後に回復期間を設定した回復群（暴露期間と観察期間の合計は 90 日）を設けた。各群の動物数は 5 匹とし、合計 105 匹の動物を用いた。この実験では、右肺を MWCNT の肺中濃度の測定に、左肺を病理組織学的検査と細胞増殖活性を

調べる目的に供した。群分けでは、導入動物 108 匹の中から一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い 105 匹を選別した。病理学的検査として、全動物について肉眼的に観察を行うとともに、各解剖期の動物について肺の湿重量（実重量）を測定し、肺の湿重量の搬出時体重に対する百分率（体重比）を算出した。また、免疫応答についての検索に備えて、胸腺と脾臓の重量測定と採材を行った。

8-OHdG 形成の経時的な解析を目的とした実験では、対照群 1 群と暴露群 1 群（ $2 \text{ mg/m}^3$ ）の 2 群を設定した。3 回、5 回、10 回及び 20 回の暴露翌日に解剖する群と 20 回暴露の後に回復期間を設定した回復群（初回暴露から通算して 3 ヶ月間観察）を設けた。各群の供試動物数は 5 匹とし合計 50 匹の動物を用いた。群分けでは、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い導入動物 52 匹の中から 50 匹を選別した。病理学的検査として、全動物について肉眼的に観察を行うとともに、各解剖期の動物について肺の湿重量（実重量）を測定し、肺の湿重量の搬出時体重に対する百分率（体重比）を算出した。

#### 動物の飼育管理

生後 4 週齢の雄性 F344/DuCr1Cr1j ラット（清浄度：SPF、体重幅：45g~70g、日本チャールス・リバー（株）厚木飼育センター）を購入、日本バイオアッセイ研究センターのバリアー施設内に導入、動物導入日を含む 6 日間の検疫を行い、検疫終了後、動物を吸入チャンバーに移動して 7 日間の馴化を行った。群分けは馴化の後に行い、群分けでの各群への割り当ては、一般状態及び体重の推移に異常を認めない動物から体重の中央値に近い動物を選別し、体重の重い順より各群に 1 匹ずつ割り当て、二巡目からは各群の動物の体重の合計を比較して、小さい群より順に体重の重い動物を割り当てることにより、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法（適正層別方式）により実施した。動物は実験期間を通して吸入試験室内に設置した吸入チャンバー内で動物を飼育した。

吸入チャンバー内の環境条件及びケージの規格を以下に示した。

温度： $23 \pm 2^\circ\text{C}$ 、湿度： $55 \pm 10\%$ 、換気回数：飼育中 10 回/時、暴露中 10 回/時、明暗サイクル：12 時間点灯（8:00~20:00）/12 時間消灯（20:00~8:00）、吸入チャンバー内圧力； $0 \sim -15 \times 10 \text{ Pa}$ 、ケージへの動物の収容方法：単飼、ケージの材質・形状・寸法等：ステンレス製 5 連網ケージ  $150 \text{ (W)} \times 216 \text{ (D)} \times 176 \text{ (H)} \text{ mm}$ /匹)

飼料は、CRF-1 固形（オリエンタル酵母工業（株）、 $30 \text{ kGy}$ - $\gamma$  線照射滅菌飼料）を自由摂取させた。飼料中の栄養成分と夾雑物については、製造元から分析データを入手し、保管した。

飲水は、全飼育期間を通して、市水（神奈川県秦野市水道局供給）をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水ノズルから自由摂取させた。飲水の水質については、試験施設として 3 ヶ月ごとに実施している水質検査（（財）食品薬品安全センター秦野研究所に依頼）で、建築物衛生法施行規則第 4 条に基づく水質基準に適合していることを確認し、その記録を保管した。

動物の生死及び瀕死の確認は、毎日 1 回以上行い、一般状態の詳細観察を少なくとも週 1 回行った。体重は、全動物について暴露開始前に 1 回、暴露開始後は週 1 回以上測定した。また、計画屠殺日に搬出時体重（飼育室から搬出前の体重）を測定して臓器重量の体重比算出に用いた。

#### MWCNT の吸入暴露

日本バイオアッセイ研究センターで開発・製作した空気による乾式篩わけ分級機構を組み込んだ MWCNT エアロゾルの大規模吸入暴露装置を使用して、供試動物を収容した吸入チャンバー内に、設定濃度に調整した MWCNT を含む空気を送り込み、動物に全身暴露させた。暴露は、ヒトでの MWCNT に暴露リスクが高いと想定される労働環境での作業時間に合わせた 1 日あたり 6 時間の全身暴露を 1 回とし、3 回、5 回、10 回または 20 回の暴露を行った。また、暴露期間が 2 週間以上となる 10 回及び 20 回の暴露は、土曜日及び日曜日を除く週 5 回暴露とした。暴露濃度の  $2 \text{ mg/m}^3$  は、JBRC で実施したがん原性試験の最高濃度に合わせて選択、対照群（ $0 \text{ mg/m}^3$ ）は清浄空気による換気のみとした。MWCNT エアロゾルの濃度調整は、OPC

(Optical particle controller、OPC-AP-600、柴田科学(株))で監視し、その上下限信号により微粒子発生装置のフィーダー(フンケンビットフィーダーF0型、(株)紛研パウテック)の運転を帰還制御することでMWCNTの吸入チャンバーへの供給量を調節して吸入チャンバー内濃度の定常性を維持した。

#### 吸入チャンバー内のMWCNT濃度の測定

2週間に1回以上の頻度で投与開始30分後から投与中に3回、チャンバー内のMWCNTを55mmΦのテフロンバインダーフィルター((株)東京ダイレック)に捕集した。捕集前後のフィルター重量の差(捕集量)を捕集空気量で除し、チャンバー内濃度(mg/m<sup>3</sup>)を算出する。0.2mg/m<sup>3</sup>、2mg/m<sup>3</sup>群ともに20L/minの流量で5分間サンプリングを行った。

#### 吸入チャンバー内のMWCNTの粒子径分布の測定

投与期間中に1回以上、MOUDI(Micro-orifice uniform deposit cascade impactor、MSP社)を使用して、吸入チャンバー内の粒子径を測定した。吸入チャンバー内のMWCNTをMSP社製純正アルミホイル(シリコンオイルを塗布)に捕集し、各ステージの捕集重量を測定した。0.2mg/m<sup>3</sup>群は30L/minの流量で180分間、2mg/m<sup>3</sup>群は30L/min、18分間サンプリングを行った。測定後、確率対数によるグラフを作成し、空気動学的質量中位径(MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter)及び幾何標準偏差(σg; geometric standard deviation)を求めた。

#### 吸入チャンバー内のMWCNTの形態観察

投与期間中に1回以上、吸入チャンバー内MWCNTの形態観察を行うために、予め、金蒸着を施した0.8μmのポアサイズのポリカーボネートフィルター(47mmΦ、Whatman社)に吸入チャンバー内空気を捕集した。0.2mg/m<sup>3</sup>群は5L/minの流量で30分間、2mg/m<sup>3</sup>群は5L/minで3分間、それぞれサンプリングを行った。捕集したMWCNTは、電界放出形走査電子顕微鏡(SEM、Scanning electron microscope(株)日立ハイテクノロジーズSU8000形)を用いて観察した。

#### 解剖時の肉眼観察

全ての動物について解剖時に肉眼による観察をおこなった。

#### 臓器重量の測定

肺、脾臓及び胸腺の重量を測定した。

肺重量の測定:細胞増殖活性、病理組織学的検査及びMWCNT沈着量調べることを目的とした実験と8-OHdG形成の経時的な解析を目的としたの各解剖期の動物について、肺の湿重量(実重量)を測定した。また、搬出時体重に対する百分率(体重比)を算出した。

胸腺重量と脾重量の測定:免疫応答についての検索に備えるため、細胞増殖活性及びMWCNT沈着量の動態解析を調べることを目的とした実験で、各解剖期の動物について、胸腺と脾臓の湿重量(実重量)を測定した。湿重量の搬出時体重に対する百分率(体重比)を算出した。

#### 肺の病理組織学的検査

左肺は10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液を気管支より注入し肺を広げた状態で固定し、右肺は直接10%中性リン酸緩衝ホルマリン溶液に浸漬固定して保存した。細胞増殖活性の検索を目的として、左肺の病理組織標本作製した。また、光学顕微鏡による検査を目的として、ヘマトキシリン・エオジン染色標本作製した。これらについては、本年度に作製した標本を用いて来年度、詳細な検索を予定している。

#### MWCNTの肺中濃度の定量

以下の手順で右肺後葉のMWCNT濃度を測定した。但し、肺組織中のMWCNT濃度測定は、MWCNT暴露群だけとした。

F344ラットにMWCNT(MWNT-7、保土谷化学工業(株))をサイクロン・シーブによる乾式法で全身暴露した。その右肺の下葉を10%中性リン酸緩衝ホルマリン液で処理後、Clean99-K200Rにより肺を溶解し、0.1%Tween80と9.6%PBSのTween混合溶液で洗浄後、濃硫酸により残渣を分解した。その試料

に Tween 混合溶液を加え、マーカー溶液 (Benzo[ghi]Perilene) を添加し 15 分間攪拌した。その溶液をフィルターろ過し、残渣の MWCNT から吸着したマーカーをアセトニトリルで抽出し、そのろ液を HPLC で測定した。

#### 肺組織の細胞増殖活性の測定

定期解剖時に生存している動物をイソフルラン麻酔下で開腹、腹大動脈を切断、放血死させてから解剖し、肺を摘出後、肺重量を測定した。

左肺の一部を 10% 中性リン酸緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋、薄切した標本を抗 Ki67 抗体を用いて免疫組織化学的に細胞増殖活性を検索する組織標本を作製した。

#### 肺組織の 8-OHdG 形成の測定

肺組織の 8-OHdG 形成は、JBRC で採材、凍結保存した肺組織を大阪市立大学で測定した。JBRC での肺組織の採材は、定期解剖時に生存している動物をイソフルラン麻酔下で開腹、腹大動脈を切断、放血死させてから解剖し、肺を摘出後、肺重量を測定した。重量を測定した肺の一部を、液体窒素を用いて瞬間冷凍し、大阪市立大学までの移送を含め、8-OHdG 形成測定まで冷凍保存した。測定には肺組織 500mg を用い、Kasai, H. *et al.*, 1986 に従って HPLC で測定した。

#### 【倫理面への配慮】

動物の取扱いについては、動物の愛護及び管理に関する法律 (昭和 48 年法律第 105 号、平成 17 年法律第 68 号一部改正)、実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準 (平成 18 年環境省告示第 88 号)、厚生労働省の所轄する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針 (平成 18 年 6 月 1 日付厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)、動物実験の適正な実施に向けたガイドライン (平成 19 年 6 月 1 日日本学術会議)、国立医薬品食品衛生研究所動物実験委員会が定める国立医薬品食品衛生研究所・動物実験の適正な実施に関する規程 (平成 19 年 4 月 1 日) を遵守した。

### C. 研究結果

#### C-1. 検体の高分散化処理 (Taquann 法)

##### (1) MWCNT

MWCNT は先行研究と同様に良好な分散検体が得られた。注意点として、良好な分散状態エアロゾルを得るために、吸湿していない TB を用いる必要がある。TB は吸湿性が高く、開封後長時間経った TB を用いた場合に良好な分散状態のエアロゾルが得られなかった。同様の理由で、カートリッジに充填した検体懸濁液を液体窒素で凍結後にデシケーターに格納する際には、カートリッジに霜が付着することを防止するため、予めデシケーター内の空気を窒素で置換してから移動を行った。

##### (2) 酸化チタン

酸化チタンは、超音波処理により容易に TB に分散した。肉眼的観察では Taquann 処理した検体の原末に比較して嵩高く、走査型顕微鏡像では原末に比較して微細な粒子が多数観察された。

#### C-2. マウスの全身暴露吸入実験

##### (1) MWCNT

5 回の吸入暴露の平均質量濃度は、低用量群  $1.42 \pm 0.3 \text{ mg/m}^3$ 、高用量群  $3.1 \pm 0.9 \text{ mg/m}^3$  であり、目標濃度に対して低用量群、高用量群共に約 1.5 倍の値であった。CPC の値は低用量群  $798 \pm 92 \text{ 個/mL}$ 、高用量群  $1,815 \pm 172 \text{ 個/mL}$  であった。

##### (2) 酸化チタン

酸化チタンの質量濃度は、 $2.3 \sim 3.3 \text{ mg/m}^3$ 、CPC の値は  $1.1 \times 10^5 \sim 1.2 \times 10^5 \text{ 個/mL}$ 、MMAD は  $648 \sim 761 \text{ nm}$  であった。走査型顕微鏡観察によるエアロゾルの粒子径は  $1 \cdot \mu\text{m}$  程度であった。酸化チタンを吸入させたマウスの肺では、肺胞レベルに酸化チタンの粒子が到達していることを確認した。

#### C-3. 肺内の MWCNT 沈着量測定

先行研究により Taquann 処理した MWCNT は有効数字一桁の精度で  $3 \times 10^6 \text{ 本}/\mu\text{g}$  の繊維数、平均長  $8 \mu\text{m}$  であることを明らかにしている。1 日 2 時間、

週 1 回を 5 回反復した際の平均暴露濃度は 2.5 mg/m<sup>3</sup>であった。MWCNT の肺沈着量は、暴露終了直後では 4.2 µg/動物 (N=3) であった。暴露後 13 週では 1.7 µg/動物 (N=3)、26 週では 1.3 µg/動物 (N=3)、52 週では 1.2 µg/動物 (N=1) であった。52 週の値を漸近線として計算すると、半減期は約 13 週であった。肺に沈着した繊維長の分布は暴露直後から 52 週後まで変化が見られなかった。

#### C-4. T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m<sup>3</sup>) 5 回暴露投与後、13 週後の肺組織評価

HE 染色標本の光学顕微鏡観察下でも、T-CNT を確認可能であった。しかし、偏光顕微鏡を用いることで、より詳細な観察を行うことができた。T-CNT 全身暴露後 13 週では肺に腫瘍性変化は見られなかったが、終末気管支もしくは終末気管支近傍の気管支細胞に T-CNT が刺入していることが観察された。

免疫染色による評価では、CD68 抗体陽性のマクロファージが T-CNT を貪食している像が認められた。終末気管支近傍の気管支上皮では CC-10 抗体陽性を示すクララ細胞に相当する細胞が SP-C (surfactant protein C) 抗体陽性を示す 2 型肺胞上皮よりも多く存在し、クララ細胞に T-CNT が刺入している像も見られた。

#### C-5. T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m<sup>3</sup>) 5 回暴露投与後、26 週後の肺組織評価

T-CNT 全身暴露後 26 週の肺では、carcinoma in adenoma が認められた。この carcinoma in adenoma では、adenoma 成分では SP-C 抗体が強陽性を示す一方で、carcinoma 成分では弱陽性であった。CC-10 抗体は、adenoma 成分、carcinoma 成分いずれにおいても陰性であった。CD68 陽性マクロファージに相当する細胞が、腫瘍結節の周囲に多数認められ、その部に T-CNT が観察された。

#### C-6. 免疫制御系に関する評価

吸引暴露後 1 ヶ月での肺での変化

T-CNT の最終暴露後 1 ヶ月で、マウスを解析すると、それぞれの群で体重の変化への影響は観察されなかった。肺組織の病理組織学的検討では、高濃度暴露群で気管支粘膜表層部での上皮の変性及びマクロファージの集簇像、肉芽腫様の変化、肺胞マクロファージの集簇像などが認められた。低濃度暴露群、対象群では大きな変化は認められなかった。

肺組織での免疫蛍光染色では、高濃度暴露群の肺胞マクロファージが集簇している部分では F4/80 陽性 CD206 陰性マクロファージが大部分を占め、F4/80 陽性 CD206 陽性マクロファージがわずかに認められた。低濃度暴露群、対象群では肺胞内の F4/80 陽性 CD206 陰性マクロファージが散在性に見られた。さらに、T-CNT 高濃度暴露群で、F4/80 と CD11c の二重染色により、F4/80 陽性 CD11c 陰性のマクロファージが多く見られ、F4/80 陽性 CD11c 陽性のマクロファージはわずかであったことから、T-CNT 吸入暴露により肺胞腔内に集簇しているマクロファージは M1 あるいは M2 への分化の見られない細胞が主であることが判明した。

T-CNT 暴露による肺組織でのマクロファージ関連遺伝子の変化を検討すると、T-CNT の高濃度吸入暴露により F4/80、MCP-1 mRNA 発現の亢進、CCR2 の mRNA 発現の上昇傾向が観察された。iNOS、CD206、arginase の mRNA 発現に関しては、T-CNT 暴露による変化は観察されなかった。

吸入暴露後 1 ヶ月でのリンパ組織の変化

T-CNT 吸入暴露後 1 ヶ月経過した時点での脾臓及び頸部リンパ節における免疫担当細胞分画をフローサイトメーターで解析したところ、マクロファージ分画 (全マクロファージ; CD11b 陽性、M1 マクロファージ; CD11b 陽性 CD11c 陽性) では対象群と暴露群で割合及び細胞数に差は見られなかった。樹状細胞 (CD11b 陰性 CD11c 陽性) に関しても暴露による影響は認められなかった。また、CD8 陽性 T 細胞、CD4 陽性 T 細胞、B220 陽性 B 細胞に関しても対象群と暴露群とで割合、細胞数ともに有意な差は観察されなかった。さらに、Foxp3 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞に関しても、割合及び細胞数で両者に差は見られなかった。加えて、



ROR $\gamma$ t 陽性 CD4 陽性 Th1 細胞の割合、細胞数ともに暴露による影響は見られなかった。

頸部リンパ節でのマクロファージ、樹状細胞、CD4 陽性 T 細胞、CD8 陽性 T 細胞、B220 陽性 B 細胞、Foxp3 陽性 CD4 陽性制御性 T 細胞、ROR $\gamma$ t 陽性 CD4 陽性 Th17 細胞に関して、割合及び細胞数に T-CNT 暴露の影響は観察されなかった。

なお、T-CNT 暴露群は低濃度暴露群で脱毛が見られたため実験群から除外したため、対象群と高濃度暴露群の解析結果を示す。脱毛の原因は不明である。

脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子発現を検討すると、高濃度群で F4/80、MCP-1、CCR2、iNOS の発現の亢進が見られた。CD206 の mRNA 発現には暴露による影響はなく、arginase の mRNA 発現は吸入暴露群で減少することが判明した。

#### 暴露後 3 ヶ月での末梢免疫細胞への影響

最終吸入後 3 ヶ月での各群の末梢血を採取し、単核球を分離後、フローサイトメーターで T 細胞分画、単球分画に関して、各種抗体を用いて検討したところ、吸入暴露によってそれぞれの免疫細胞分画の割合に変化は認められなかった。B 細胞分画では対象群の B 細胞の割合が通常より低い値を示していたことから、実験手法のエラーが考えられる。

#### C-7 細胞増殖活性、病理組織学的検査及び MWCNT 沈着量の動態解析

##### 動物の飼育管理

生死観察や一般状態の観察で、死亡及び異常所見を認めた動物は無かった。体重への影響では、細胞増殖活性、病理組織学的検査及び MWCNT 沈着量の経時的推移を調べることを目的とした実験、8-OHdG 発現の経時推移を調べることを目的とした実験ともに、順調な体重増加を示し、MWCNT の吸入暴露による体重への影響は認められなかった。

なお、細胞増殖活性、病理組織学的検査及び MWCNT 沈着量の経時的推移を調べることを目的とした実験で 0.2mg/m<sup>3</sup> 暴露・回復群の搬出時体重に对照群との比較で統計学的に有意な低値（危険率 5%

水準）が示されたが、暴露濃度との対応が見られなかった。

##### MWCNT の吸入暴露

暴露期間を通して設定通りの暴露を行うことができた。

##### 吸入チャンバー内の MWCNT 濃度の測定

吸入チャンバー内の MWCNT 濃度の実測値（表 1）から、0.2mg/m<sup>3</sup> 暴露群、2mg/m<sup>3</sup> 暴露群とも設定濃度に対して極めて高い精度の暴露を行うことができた。

##### 吸入チャンバー内の MWCNT の粒子径分布の測定

吸入チャンバー内の MWCNT の粒子径分布の実測値から、0.2mg/m<sup>3</sup> 暴露群、2mg/m<sup>3</sup> 暴露群とも、粒子の空気動学的質量中位径は 1~2 $\mu$ m であり、吸入された粒子状物質が肺胞まで到達するとされている粒子径 2 $\mu$ m 以下の粒子を暴露することができた。

##### 吸入チャンバー内の MWCNT の形態観察

暴露した MWCNT のエアロゾルを吸入チャンバー内で捕集したフィルターを走査型電子顕微鏡で観察した結果、MWCNT は良く分散した状態で動物に暴露されたことが示された。また、2000 倍に拡大した像で 0.2mg/m<sup>3</sup> 暴露群と 2mg/m<sup>3</sup> 暴露群を比較すると、2mg/m<sup>3</sup> 暴露群の方が捕集された MWCNT の多く認められ、暴露濃度との対応が認められた。

##### 解剖時の肉眼観察

解剖時の肉眼観察で、異常を認めた動物は無かった。

##### 臓器重量の測定

###### 肺重量の測定：

細胞増殖活性、病理組織学的検査及び MWCNT 沈着量の経時的推移を調べることを目的とした実験での肺重量と、8-OHdG 形成の経時推移を調べることを目的とした実験での肺重量を測定した。8-OHdG 形成の経時推移を調べることを目的とした実験では 0mg/m<sup>3</sup>（对照群）と 2mg/m<sup>3</sup> 群の二群構成となっている。

細胞増殖活性、病理組織学的検査及びMWCNT沈着量の経時的推移を調べることを目的とした実験で、実重量で増加が示されたのは2mg/m<sup>3</sup>群の10回暴露群（左肺）と20回暴露群（右肺、左肺）だけで、MWCNT暴露による肺重量の増加は明確ではなかった。一方、比重量では2mg/m<sup>3</sup>群の3回暴露群、10回暴露群、20回暴露群及び回復群でいずれも左右両肺で統計学的に有意な増加（危険率1%水準）が示された。これら比重量の増加は、実重量での有意差が示されない程度の、比較的軽微な重量増加であった。

8-OHdG形成の経時推移を調べることを目的とした実験で実重量の増加が5回暴露群（左肺）、10回暴露群（右肺、左肺）、20回暴露群（右肺、左肺）で認められたが、回復群では実重量の増加は示されなかった。一方、比重量では2mg/m<sup>3</sup>群の5回暴露群（右肺、左肺）、10回暴露群（右肺）、20回暴露群（右肺、左肺）及び回復群（左肺）で統計学的に有意な増加が示された。これら肺重量の増加は、実重量、比重量とも左右の肺で一貫して有意な重量が示されない程度の比較的軽微な重量増加であった。

#### 胸腺重量と脾重量の測定：

細胞増殖活性、病理組織学的検査及びMWCNT沈着量の経時的推移を調べることを目的とした実験では脾臓重量と胸腺重量にはMWCNT暴露の影響を認めなかった。動物の成長に伴う胸腺の退縮現象として、胸腺に実重量と比重量の経時的な減少が認められた。

#### 肺の病理組織学的検査

本年度に作製した標本を用いて来年度、検索を予定している。

#### MWCNTの肺中濃度の定量

右肺組織内のMWCNTの定量結果において、暴露終了時に解剖した動物で0.2mg/m<sup>3</sup>群、2mg/m<sup>3</sup>群とも暴露回数と相関したMWCNTの沈着量の増加が認められた。

暴露濃度との関係では、右肺当たりのMWCNT沈着量、肺1g当たりのMWCNT沈着量ともに、2mg/m<sup>3</sup>群の沈着量は0.2mg/m<sup>3</sup>群と比べて、公比10より

も大きく、概ね20倍以上の開きが見られた。

また、回復期間を置いて解剖した動物にも、暴露終了時に解剖した動物よりもやや少ない傾向があるものの0.2mg/m<sup>3</sup>群、2mg/m<sup>3</sup>群とも暴露回数と相関したMWCNTの沈着量の増加が認められた。但し、2mg/m<sup>3</sup>で20回の暴露後、回復期間を置いた群では、20回の暴露終了時に解剖した群よりも沈着量の有意な減少が認められた。

#### 肺組織の細胞増殖活性の測定

本年度に作製した標本を用いて来年度、検索を予定している。

#### 肺組織の8-OHdG形成の測定

8-OHdG形成の定量結果において、2mg/m<sup>3</sup>群での8-OHdG形成は対照群と比較して有意ではないが、3回から20回まで暴露回数に応じたわずかな増加が認められた。回復群ではMWCNTの暴露による8-OHdG形成の増加は対照群のレベル以下となった。

なお、20回暴露後に採材した群に統計学的な有意差が示されたが、対照群の値が下がったため生じた偶発的な変化と判断した。

## D. 結論

H26年度は、①野生型マウスを用いたTaquann直噴システムによるMWCNT（MWNT-7、三井物産）と酸化チタンの吸入実験、②先行研究[H23-化学一般-005]においてMWCNTを暴露したp53<sup>+/+</sup>マウスの肺組織沈着量の測定を実施した。

MWCNTの吸入実験では、目標濃度に対して、実際の暴露濃度が1.5倍程度高い値を示した。この原因は、吸入試験中の濃度をモニターしているCPCが、実際の値よりも低値で推移したことが原因と考えられる。本研究で使用しているCPC（Model3776, TSI）は対応濃度3×10<sup>5</sup>個/mLであるため、MWCNTの吸入暴露実験における濃度（2×10<sup>3</sup>個/mL）では十分に対応できる性能である。しかしながらMWCNTは繊維状であるため、CPCが粒子を検出するセル内で粒子が重なり粒子数が過小評価される可能性が考えられる。CPCの前段に希釈装置を接続することにより、その影響が抑制されることを確認しており、今後の改良を検

討中である。

酸化チタンの吸入実験では、比較的容易に Taquann 法を適応することが可能であった。本研究で得られた酸化チタンの MMAD (761 nm) は、酸化チタン専用に設計と工夫がされた装置による実験で報告されている値と同様である。走査型顕微鏡観察によるエアロゾルの粒子径は  $1 \cdot \mu\text{m}$  程度のものが多数観察され、その多くが二次粒子としてエアロゾル化しているものと考えられた。実際に吸入暴露を行ったマウスの肺に酸化チタン粒子が肺胞レベルに到達していることが確認できた。本研究では  $2 \text{ mg/m}^3$  を目標濃度としたが、その際の CPC 値は約  $1 \times 10^5$  個/mL であり、CPC の対応濃度  $3 \times 10^5$  個/mL に近い値であることから、安定した濃度測定のためには CPC の前段に希釈機を設置することが必要と考えられた。

MWCNT の肺負荷量測定において、暴露の終了直後では  $4.2 \mu\text{g}$ /動物、吸入後 52 週では約  $1 \mu\text{g}$ /動物が残存していた。この値を漸近線として計算すると、半減期が約 13 週であった。肺に沈着した繊維長の分布は吸入直後から 52 週後まで変化が見られなかったことから、肺からの除去に際して MWCNT の長さによる選択が認められないという結果となった。胸腔内へ移行した MWCNT の長さの分布については、今後の検討が必要である。

本研究で開発した Taquann 法及び Taquann 直噴全身暴露吸入システムは、吸入試験に必要な検体量が少ないことから、量産化に至る前の新規ナノ材料についての吸入試験の実施が可能である。MWCNT を例にすると、低用量群 ( $1 \text{ mg/m}^3$ )、高用量群 ( $2 \text{ mg/m}^3$ ) の構成で各群 48 匹に 10 時間の吸入試験を行うために必要な Taquann 処理検体量は約 300 mg である (Taquann 法の収率が 5% であるため MWCNT 原末としては 6 g 必要)。この条件で、高用量群では肺に  $4 \mu\text{g}$ /動物の負荷がなされる。

また、予備実験としての、13 週および 26 週の全身暴露投与実験による肺組織評価の検討では、13 週および 26 週のいずれも、肺組織内の多数の T-CNT をについて、通常の光学顕微鏡で観察が可能であった。さらに偏光顕微鏡を併用することでより詳細な観察が可能となることが明らかになった。さらに、腫瘍発生については、今回用いた

p53<sup>+/-</sup> knock out C57BL/6J マウスは、非処置群でも肺腫瘍発生が見られており、この腫瘍発生の原因が T-CNT によるものかについては、現在のところ不明である。

今後の実験では、T-CNT が肺発癌に与える影響および promotion 作用の有無など、総合的な影響評価が重要と考えている。

以上より、全身暴露投与により、13 週後、26 週後でも肺内に MWCNT が残存することが示された。今回の実験では MWCNT と腫瘍発生の因果関係までは明らかにすることはできなかったが、今後、各分担研究の継続により、MWCNT の呼吸器系への毒性評価を行っていく予定である。正常 B6 雌マウスに T-CNT を吸入暴露することによる免疫システムへの影響の検討では、吸入後 1 ヶ月では、肺組織において気管支上皮の軽度の変性及び肺胞マクロファージの集簇が見られた。またマクロファージ関連の遺伝子発現が高濃度群で上昇していたが、M1 あるいは M2 マクロファージの明瞭な分化が確認できなかった。初期の変化として未熟な単球、マクロファージが集簇していたものと考えられ、今後暴露後長期での観察が必要である。

リンパ組織においてもそれぞれの免疫担当細胞の割合及び細胞数に関しては T-CNT 吸入暴露で影響は確認できなかったが、長期観察での影響を確認する必要がある。また、暴露後 3 ヶ月での末梢血内の単核球の解析では、T-CNT 吸入暴露によって各免疫担当細胞分画への影響は観察されなかった。

肺組織、脾臓において T-CNT 暴露 1 ヶ月でマクロファージ関連遺伝子 (F4/80、MCP-1、CCR2、iNOS) の発現が亢進していたことから、マクロファージを中心とした自然免疫系の活性化が進んでいることが示唆された。今後、吸入暴露後 6 ヶ月、12 ヶ月での免疫システム全体への影響を観察する予定である。

また、MWCNT エアロゾルの大規模吸入暴露装置を利用してラットに MWCNT (MWNT-7、三井系統：保土ヶ谷化学工業) を  $2.0$  または  $0.2 \text{ mg/m}^3$  で 3、5、10、20 回の全身吸入暴露 (各回：6 時間/日) を行った研究では、暴露終了後と初回暴露後 90 日の肺組織について MWCNT の沈着量と酸化ストレス

の指標として 8-OHdG 形成を経時的に解析した。その結果、肺組織内の MWCNT 沈着量が暴露回数とともに増加し、2.0mg/m<sup>3</sup> 群では回復期間を置くことで有意に減少した。MWCNT2mg/m<sup>3</sup> の 3 回暴露から穏やかな肺重量の増加が認められたことから、MWCNT の暴露で生じる弱い肺毒性が 8-OHdG 形成の微増と関係する可能性が示唆された。

本研究では順次、MWCNT, 酸化チタンなど複数種の新ナノ材料の吸入試験を実施し、効率的に新ナノ材料の毒性評価を進めるとともに、総合的手順を整え、ヒトへの有害性評価を行う。複数の毒性評価施設への導入が促進されれば、新ナノ材料の吸入毒性評価の迅速化・効率化に貢献することが期待される。

これまで、新ナノ材料の吸入暴露に関しては肺の変化が報告されてきたが、免疫システム全体への影響に関してはほとんど知られていなかった。本研究では、均一な吸入暴露を可能とした Taqaunn 法による処理により、肺組織に一定量が暴露できるようになった。また、吸入装置に関しても、研究協力者の開発した自動吸入装置を用いることにより、従来のスプレー式の噴霧暴露と比較して、実験精度が高くなっているものと考えられる。

今後、検体を暴露したマウスの経時的な組織沈着量の推移を明らかにし、病変との関係を明らかにする計画である。また、MWCNT の暴露で 8-OHdG の形成が増加する細胞の免疫組織化学的手法による特定や細胞増殖活性、電子顕微鏡を用いた体内動態の研究等の課題に対して、近く公表される MWCNT の発がん性試験の結果と連携させて効果的に推進する。さらに、MWCNT 投与がおよぼす免疫系への影響も考慮し、今後、各分担研究とさらなる連携を行って全身暴露吸入による肺組織への毒性評価研究を進めていく予定である。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Nakano Y, Yokohira M, Hashimoto N, Yamakawa K, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Saoo K, Imaida K. Rat strain differences in levels and effects of chronic inflammation due to intratracheal instillation of quartz on lung tumorigenesis induced by DHPN. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66(8):391-401, 2014.

Yokohira M, Yamakawa K, Nakano Y, Numano T, Furukawa F, Kishi S, Ninomiya F, Kanie S, Hitotsumachi H, Saoo K, Imaida K. Immunohistochemical characteristics of surfactant proteins-A, -B, -C and -D in inflammatory and tumorigenic lung lesions of F344 rats. *J. Toxicol. Pathol.*, 27(3-4):175-182, 2014.

Yokohira M, Kishi S, Yamakawa K, Nakano Y, Ninomiya F, Kinouch S, Tanizawa J, Saoo K, Imaida K. Napsin A is possibly useful marker to predict the tumorigenic potential of lung bronchiolo-alveolar hyperplasia in F344 rats. *Exp. Toxicol. Pathol.*, 66:117-123, 2014

Kishi S, Yokohira M, Yamakawa K, Saoo K, Imaida K. Significance of the progesterone receptor and epidermal growth factor receptor, but not the estrogen receptor, in chemically induced lung carcinogenesis in female A/J mice. *Oncol. Lett.*, 8(6):2379-2386, 2014

Iwasa A, Arakaki R, Honma N, Ushio A, Yamada A, Kondo T, Kurosawa E, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Tanaka E, Yoshimura N, Harada N, Hayashi Y, Ishimaru N. Aromatase controls Sjögren's syndrome-like lesions through monocyte chemotactic protein-1 in target organ and adipose tissue-associated macrophages. *Am J Pathol.* 2014 185(1):151-61.

Islam MN, Itoh S, Yanagita T, Sumiyoshi K, Hayano S, Kuremoto KI, Kurosaka H, Honjo T, Kawanabe N, Kamioka H, Sakai T, Ishimaru N,