

Taniuchi I, Yamashiro T. Runx/Cbfb signaling regulates postnatal development of granular convoluted tubule in the mouse submandibular gland. *Dev Dyn.* 2014 244(3):488-96.

Arakaki R, Yamada A, Kudo Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Mechanism of activation-induced cell death of T cells and regulation of FasL expression. *Crit Rev Immunol.* 2014;34(4):301-14.

Arakaki R, Eguchi H, Yamada A, Kudo Y, Iwasa A, Enkhmaa T, Hotta F, Mitamura-Aizawa S, Mitamura Y, Hayashi Y, Ishimaru N. Anti-inflammatory effects of rebamipide eyedrop administration on ocular lesions in a murine model of primary Sjögren's syndrome. *PLoS One.* 2014 9(5):e98390.

Ashrin MN, Arakaki R, Yamada A, Kondo T, Kurosawa M, Kudo Y, Watanabe M, Ichikawa T, Hayashi Y, Ishimaru N. A critical role for thymic stromal lymphopoietin in nickel-induced allergy in mice. *J Immunol.* 2014 192(9):4025-31.

Iizuka S, Ishimaru N, Kudo Y. Matrix metalloproteinases: the gene expression signatures of head and neck cancer progression. *Cancers* (Basel). 2014 6(1):396-415.

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.* 2014 44(2):561-72.

Takanobu, K., Aiso, S., Umeda, Y., Senoh, H., Saito, M., Katagiri, T., Ikawa, N., Ishikawa, h., Mine, T., Take, M., Haresaku, M., Matsumoto, M., Fukushima, S., Background data of spontaneous tumors in F344/DuCr1Cr1j rays. Sangyo Eiseigaku Zasshi. 2015(in

Japanese), in press.

Aiso, S., Take, M., Kasai, T., Senoh, H., Umeda, Y., Matsumoto, N., and Fukushima, S., Inhalation carcinogenicity of dichloromethane in rats and mice. *Inhalation Toxicology*, 2014, (26); 435-451.

Umeda, Y., Kasai, T., Saito, M., Kondo, H., Toya, T., Aiso, S., Okuda, H., Nishizawa, T. and Fukushima, S., Two-week Toxicity of Multi-walled Carbon nanotubes by whole body Inhalation Exposure in Rats, *J Toxicol Pathol.* 2013(26);131-149.

Saito, A., Sasaki, T., Kasai, T., Katagiri, T., Nishizawa, T., Noguchi, T, Aiso, S., Nagano, K., and Fukushima, S., hepatotumorigenicity of ethyl tertiary-butyl ether with 2-year inhalation exposure in F344 rats, *Arch Toxicol.* 2013(87):905-914.

2. 学会発表

山川けいこ、鈴木智、岸宗佑、中野裕子、蟹江尚平、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、NNK 誘発マウス肺腫瘍におけるミトコンドリア DNA 変異の解析、第 73 回日本癌学会学術集会、2014. 9

山川けいこ、横平政直、岸宗佑、中野裕子、蟹江尚平、竿尾光祐、今井田克己、マウス肺腫瘍における CD44v6 の発現に関する検討、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2015. 1

中野裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、ラット肺およびヒト tissue microarray における H2AX の発現、第 73 回日本癌学会学術集会、2014. 9

中野裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、竿尾光祐、今井田克己、F344 ラットの Quartz 粒子単回気管内投与による肺腫瘍発生の検討、第 31 回日本毒性病理学会総会および学術集会、2015. 1

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, “Taquann” whole body inhalation system for small scale in vivo, toxicity studies to speed up categorization, OECD Nano Categorisation WS (2014. 9, Washington D.C)

菅野 純, 高橋 祐次、高木 篤也, 広瀬 明彦, 今井田 克己, 津田 洋幸、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて、第 41 回 日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸、シンポジウム

高橋 祐次, 小川 幸男, 高木 篤也, 辻 昌貴, 森田 紘一, 岸 宗佑, 今井田 克己, 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による肺及び胸膜病変、第 41 回 日本毒性学会学術年会、2014 年 7 月、神戸、一般口演

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio, Ogawa, Mesotheliomagenesis of micrometer-sized MWCNT: findings from intraperitoneal injection and whole body inhalation studies of highly dispersed “Taquann” treated MWCNT, NanoTOX2014 (2014, 4, Antalya)

新垣理恵子、山田安希子、工藤保誠、林良夫、石丸直澄：ニッケルアレルギー発症における Thymic Stromal Lymphopoietin の重要性 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：268 2014. 4 広島

工藤保誠、常松貴明、近藤智之、黒澤実愛、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：癌細胞におけるペリオスチンのスプライシングバリエーションの発現と EMT との関連 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：273 2014. 4 広島

山田安希子、新垣理恵子、黒澤実愛、近藤智之、常松貴明、工藤保誠、林良夫、石丸直澄：シェーグレン症候群の発症における制御性 T 細胞の役割 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：274 2014. 4

広島

常松貴明、工藤保誠、近藤智之、黒澤実愛、山田安希子、新垣理恵子、石丸直澄：ユビキチン分解による複製前複合体形成因子 CDT1 の発現制御機構の解析 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：353 2014. 4 広島

近藤智之、黒澤実愛、常松貴明、山田安希子、新垣理恵子、工藤保誠、石丸直澄：自己免疫疾患モデルを用いた腫瘍免疫制御機構の解析 第 103 回日本病理学会総会 103 巻 1 号：353 2014. 4 広島

Arakaki R, Ushio A, Yamada K, Kurosawa M, Saito S, Kondo T, Tsunematsu T, Yamada A, Kudo Y, Ishimaru N: Influence of multi-wall carbon nanotubes on immune system in normal mice and MRL/lpr mice. 第 43 回日本免疫学会総会 第 43 巻：44 2014.12 京都

Kurosawa M, Yamada A, Arakaki R, Kondo T, Tsunematsu T, Kudo Y, Saito S, Ushio A, Ishimaru N: A novel role of CXCR7 in memory T cells of a murine model for Sjögren’s syndrome. 第 43 回日本免疫学会総会 第 43 巻：66 2014.12 京都

Ushio A, Arakaki R, Kurosawa M, Kondo T, Saito S, Yamada A, Arakaki R, Kudo Y, Ishimaru N: Analysis of macrophages in the pathogenesis of murine model for Sjögren’s syndrome. 第 43 回日本免疫学会総会 第 43 巻：103 2014.12 京

大西誠、笠井辰也、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治、MWCNT の微量定量法の開発とその応用：ラット全身吸入暴露での MWCNT の肺内沈着量から求めた AUC と肺毒性との関連、第 29 回発癌病理研究会、2014.09

片桐卓、高信健司、妹尾英樹、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治、N,N-ジメチルアセトアミドの 104 週間吸入暴露によるラットとマウスの肝臓における発がん性、第 31 回日本毒性病理学会総会及

び学術集会、2015.01

妹尾英樹、高信健司、片桐卓、梅田ゆみ、相磯成敏、福島昭治、3-アミノフェノールの経口投与によるラットとマウスに対する発がん性評価、第31回日本毒性病理学会総会及び学術集会、2015.01

3. 書籍

なし

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得

特許出願：柴田眞利、菅野純、生田達也、鶴田祐吾、小川幸男、高橋祐次、「吸入暴露試験装置」、特願 2012-148848 (2012.7. 2)

特許出願：菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012 - 158343 (2012.7.17)

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

Ⅱ. 分担研究報告書

平成26年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究
- 全身暴露吸入による毒性評価研究-
分担研究報告

分担研究課題

「ナノマテリアル吸入暴露による病理組織学的評価（免疫組織化学）」

研究分担者 今井田 克己 香川大学医学部医学科腫瘍病理学 教授

研究協力者 岸 宗佑 香川大学医学部医学科腫瘍病理学
横平 政直 香川大学医学部医学科腫瘍病理学
山川 けいこ 香川大学医学部医学科腫瘍病理学
中野 裕子 香川大学医学部医学科腫瘍病理学

研究要旨

本研究では、「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」として、全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価を行う。前年度まで行っていた「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-全身暴露吸入による肺を主標的とした毒性評価研究-」に継続して、ヒトが吸入暴露を受ける低濃度域を想定した全身吸入暴露毒性と気管内投与による長期・発がん性試験について3か年計画で実施する。前年度までの研究により、針状の multi wall carbon nanotubes (MWCNT) (MWNT-7、三井系統：保土ヶ谷化学工業)を分散処理 (Taquann法処理) する方法を確立することができた。Taquann 法処理により分散処理した MWCNT (T-CNT) を研究対象とし、雄性 C57BL/6J マウスおよび p53+/- knock out C57BL/6J マウスを用いた動物実験を行った。本分担研究においては、全身吸入暴露試験におけるMWCNTの肺内分布の病理組織学的解析、およびMWCNTの気管内投与による肺病変の発現程度や病理組織学的な検討を行ってきた。

マウスへの全身暴露投与方法については、前年度までの研究により、分担研究者である国立医薬品食品衛生研究所で確実にを行うことができるようになっており、超低用量の T-CNT 投与も可能となった。平成25年度に行った全身暴露投与による予備実験で得られた肺組織を用いて、本年度、免疫組織化学的な評価も終えることができた。

平成26年度以降は、国立医薬品食品衛生研究所での全身暴露投与による長期実験を計画しており、実験は現在も継続中である。分担研究としては、全身曝露長期実験終了後の肺について病理組織学的検討を行う予定である。本長期実験は継続中であるが、今回、これまでに得られた肺組織を用いて、免疫染色を含めた病理組織学的検索の方法について予備的な検討を行った。

2mg/m³ T-CNT の全身暴露投与を行い、13週後に摘出した肺を用いて、病理組織学的検討を行った。免疫染色による評価では、CD68抗体陽性を示す活性型マクロファージがT-CNTを貪食している所見が認められた。終末気管支近傍の比較的小径な気管支上皮では clara cell 10 (CC10) 抗体陽性を示すクララ細胞に相当する細胞がsurfactant protein C (SP-C)抗体陽性を示す2型肺胞上皮よりも比較的多く存在し、クララ細胞にT-CNTが刺入している像も見られた。2mg/m³ T-CNT の全身暴露投与を行い、26週後の肺では carcinoma in adenoma が認められた。この病変において、adenoma 成分ではSP-C抗体が強陽性を示す一方で、carcinoma 成分ではSPC抗体は弱陽性であった。CC10抗体は、adenoma成分、carcinoma成分のいずれにおいても陰性であった。

今回の予備実験のより、腫瘍の組織学的評価および免疫染色の有用性が確認できた。今後、分担研究者と連携し、針状 MWCNT による肺組織への有害性に関する評価を継続する予定である。

A. 研究目的

粒子状物質のヒトへの暴露は吸入による経気道経路が主な暴露経路である。粒子の形状、長さ、太さ、粒子表面の物理化学的性状、金属不純物等がその毒性発現に関与するとされている。さらに、単粒子/繊維に分散したものと大きな凝集塊を形成したものでは、肺への到達深度が異なり、その毒性発現も異なる。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の呼吸器毒性についても、暴露されるカーボンナノチューブ (CNT) のサイズや凝集程度によって異なると予想される。製品として販売されているMWCNT 原末には、単繊維に分散したものから大きな凝集塊まで様々なサイズのもが含まれており、先行研究の「平成20-22年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業、ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する研究 (福島班)」では、MWCNT原末の気管内投与によるラットへの毒性影響を調べて、一定の成果を得た。ヒトが吸入暴露した際には、大きな凝集塊は上部気道で捕捉されて除去されるため、肺には分散したMWCNTが到達するという低濃度域での暴露が予想される。平成23-25年度今井田班における研究 (高橋研究員ら) において、MWCNT-Bulk を臨界点乾燥により分散処理し、単繊維に分散した繊維を効率的に取り出す方法 (Taquan法処理) の開発に成功した。これにより、Taquan法処理-MWCNT (T-CNT) を用いた全身曝露吸入実験が進行中である。ヒトが吸入暴露した場合のモデルとして国立医薬品食品衛生研究所での分担研究として行われている全身吸入曝露試験により得られた肺組織の病理組織学的な評価を当分担研究で担当する予定である。本長期実験は継続中であるが、今回、これまでに得られた肺組織を用いて、免疫染色を含めた病理組織学的検索の方法について予備的な検討を行った。

B. 研究方法

① T-CNT の全身曝露投与試験 (2mg/m³) 5 回曝露投与後、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+/- knock out C57BL/6J マウスへの T-CNT 全身曝露実験で得られた肺組織の病理組織学的な評価を行った。

2mg/m³ T-CNT の全身曝露投与を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。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 システムディスクバリーを用いた。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。

② T-CNT の全身曝露投与試験 (2mg/m³) 5 回曝露投与後、26週後の肺組織評価

①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+/- knock out C57BL/6J マウスへの T-CNT 全身曝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/m³ T-CNT の全身曝露投与を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、①と同様である。

C. 研究結果

① T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 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 (図1、2、3)。

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 (図3)。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 (図4、5、6)。

② T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 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 (図7)。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 (図8)。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 (図9)。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 (図10)。

D. 結論

本分担研究では、先行研究で全身暴露投与条件およびその方法を確立することができ、長期毒性試験へと引き継ぐことができた。

本年は、その予備実験として、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を行った。

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+/- 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。

呼吸器系への MWCNT の毒性評価には、気管内投与による検討ではなく、ヒトへの暴露条件に類似した全身暴露による検討がより重要と考えられる。今後も分担研究者との連携により、針状 MWCNT による肺組織への有害性評価を行う予定である。

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

2. 学会発表

山川けいこ、鈴木智、岸宗佑、中野裕子、蟹江尚平、横平政直、竿尾光祐、今井田克己、NNK誘発マウス肺腫瘍におけるミトコンドリアDNA変異の解析、第73回日本癌学会学術集会、2014.9

山川けいこ、横平政直、岸宗佑、中野裕子、蟹江尚平、竿尾光祐、今井田克己、マウス肺腫瘍におけるCD44v6の発現に関する検討、第31回日本毒性病理学会総会および学術集会、2015.1

中野裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、塩岡忠夫、竿尾光祐、今井田克己、ラット肺およびヒトtissue microarrayにおけるH2AXの発現、第73回日本癌学会学術集会、2014.9

中野裕子、横平政直、山川けいこ、岸宗佑、蟹江尚平、竿尾光祐、今井田克己、F344 ラットの Quartz 粒子単回気管内投与による肺腫瘍発生の検討、第31回日本毒性病理学会総会および学術集会、2015.1

G. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

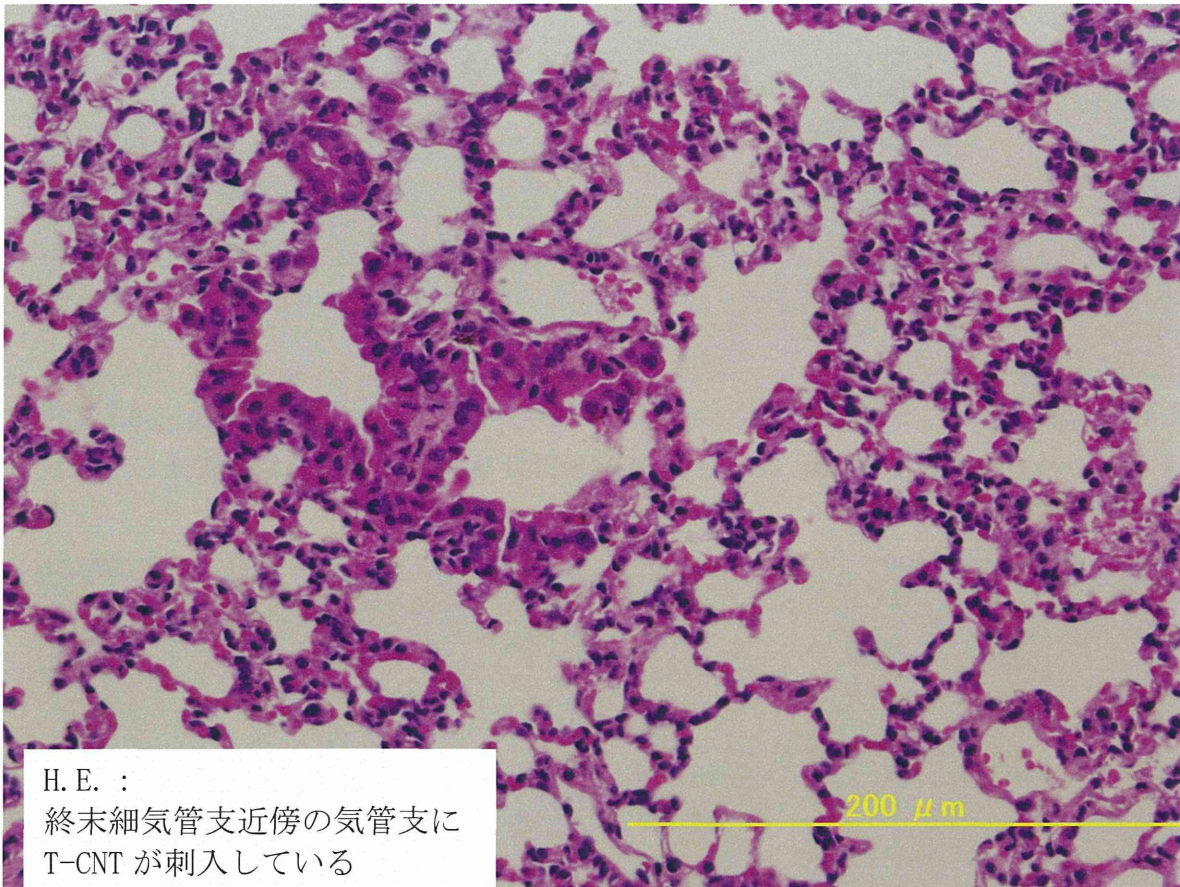


図1 T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 5回暴露投与後、13週の肺組織評価

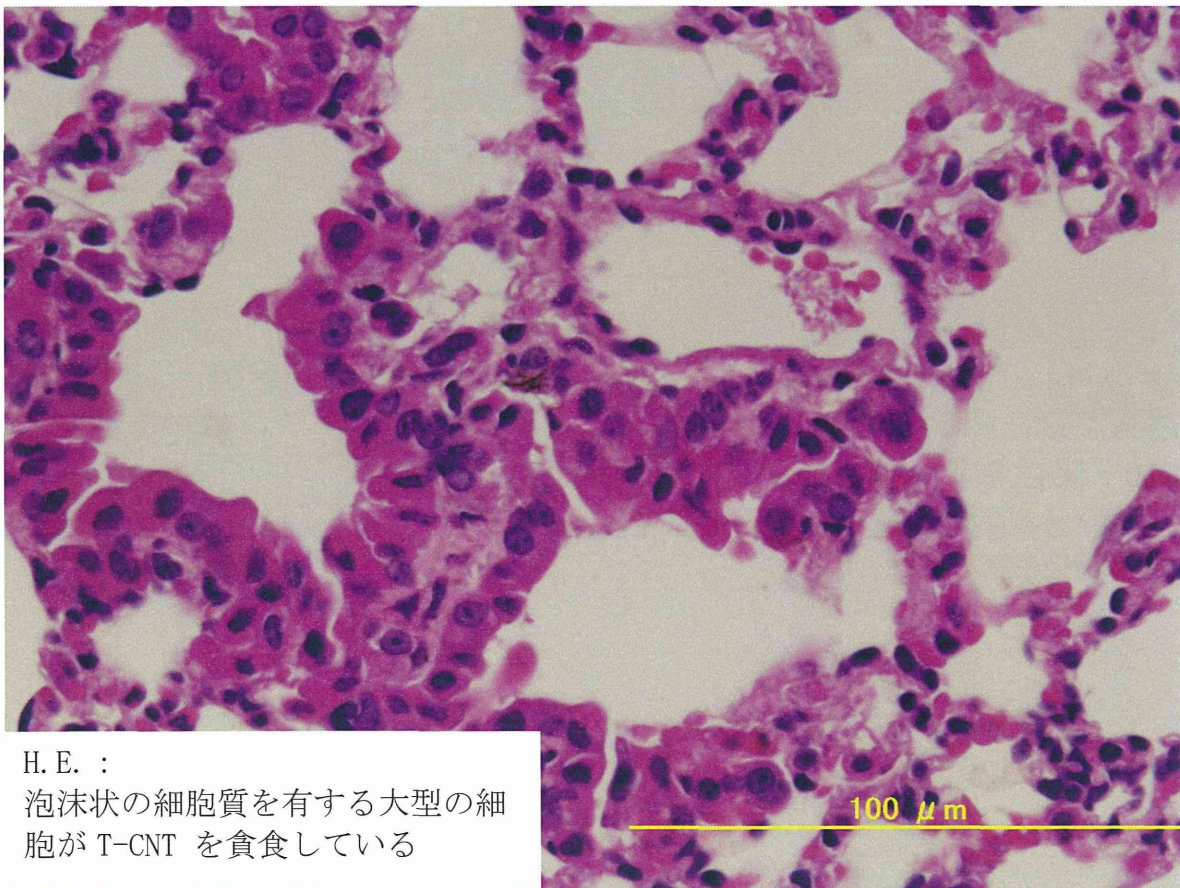


図2 T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 5回暴露投与後、13週の肺組織評価

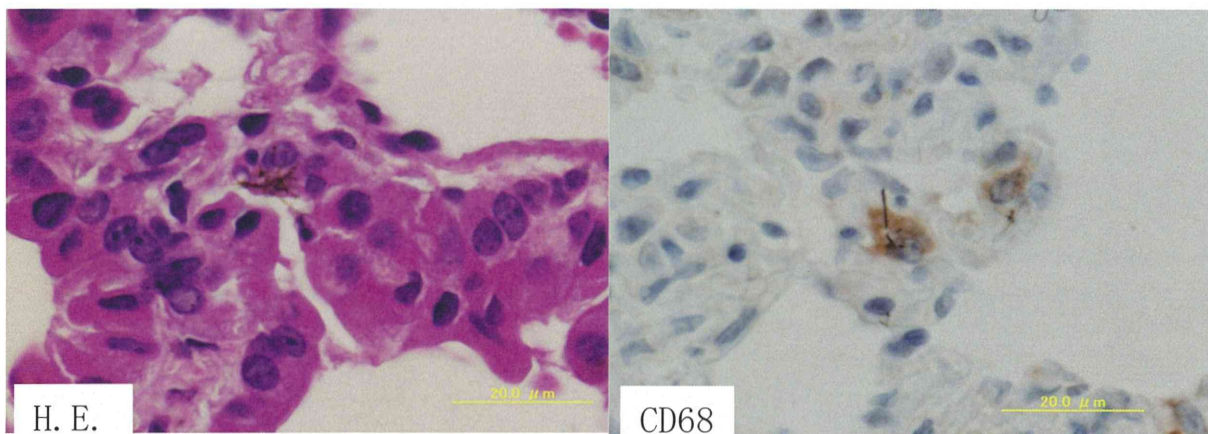
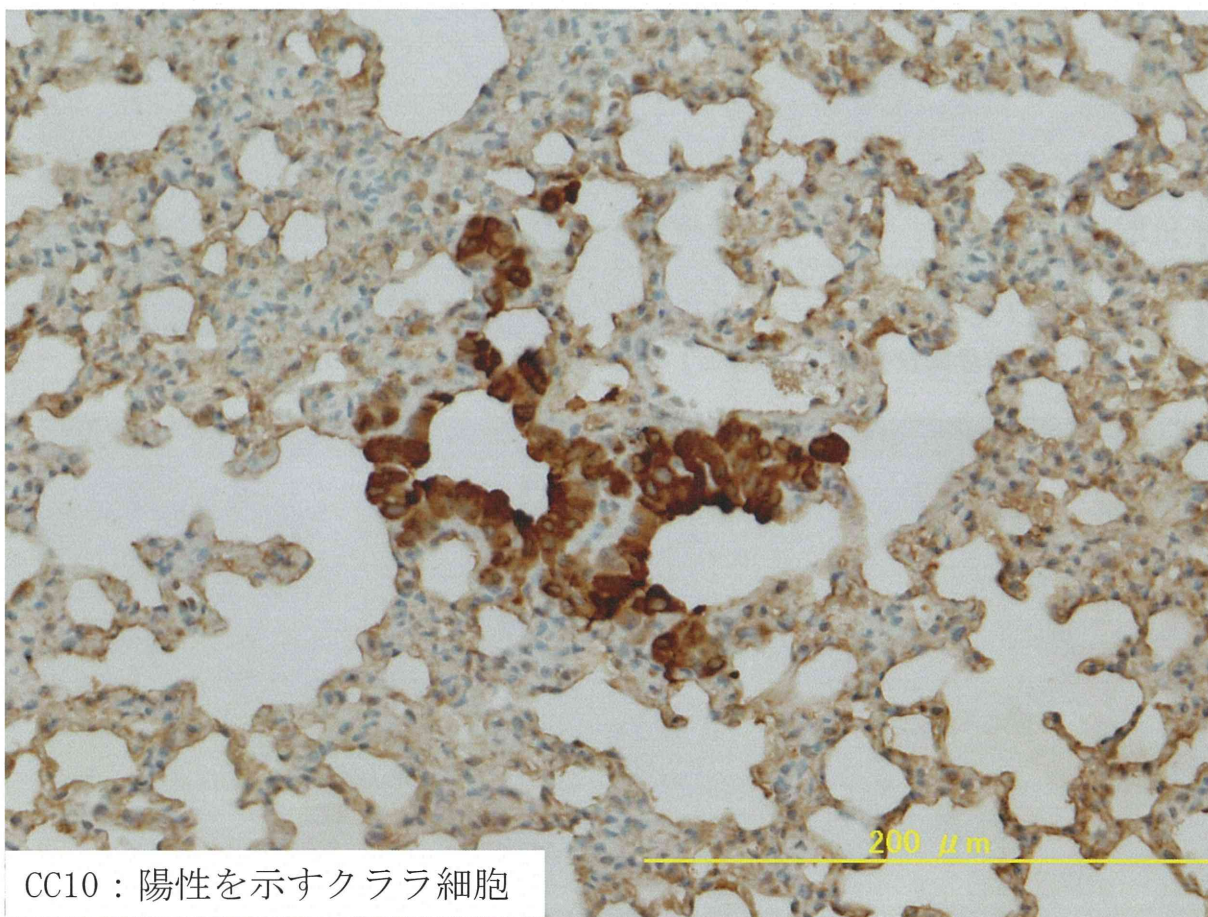


図 3 T-CNT の全身暴露投与試験 ($2\text{mg}/\text{m}^3$) 5 回暴露投与後、13 週の肺組織評価：CD68 抗体による免疫染色標本との対比



CC10 : 陽性を示すクララ細胞

図 4 T-CNT の全身暴露投与試験 ($2\text{mg}/\text{m}^3$) 5 回暴露投与後、13 週の肺組織評価：CC-10 抗体による免疫染色標本

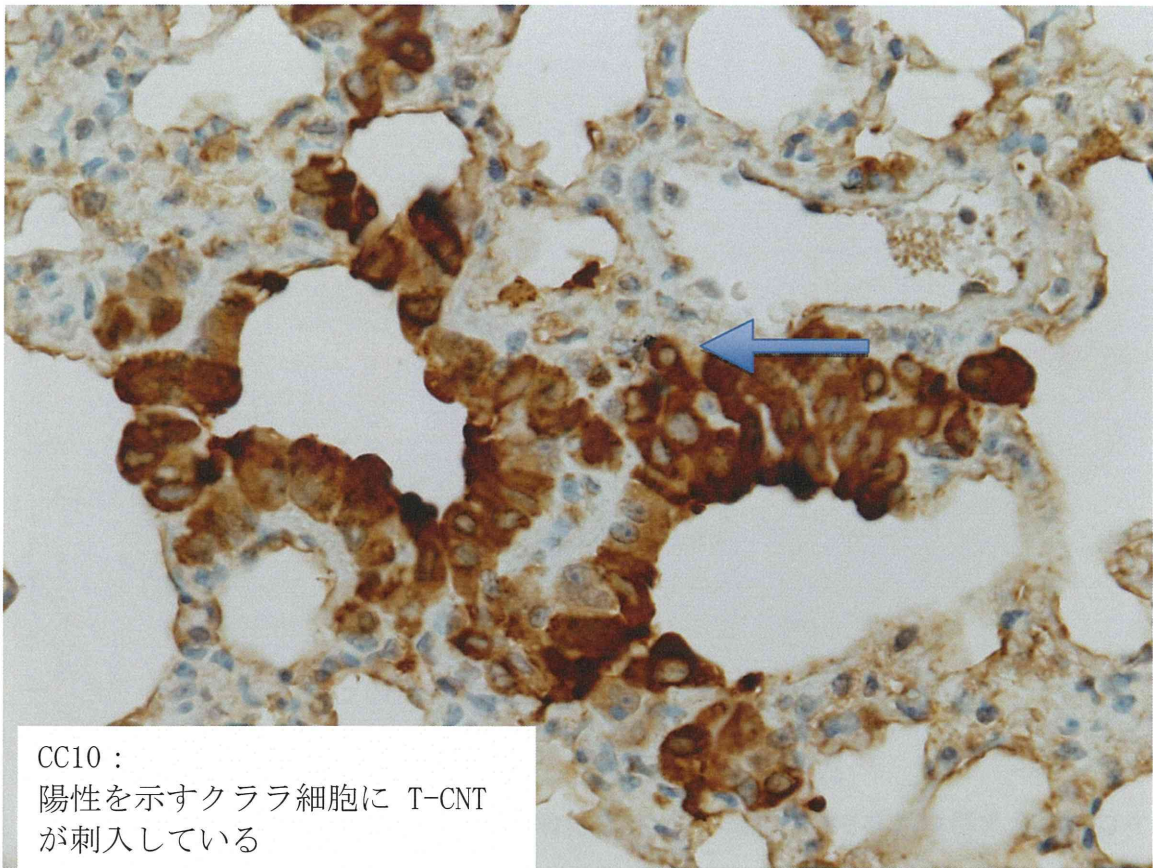


図 5 T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 5 回暴露投与後、13 週の肺組織評価 : CC-10 抗体による免疫染色標本 : クララ細胞に T-CNT が刺入している

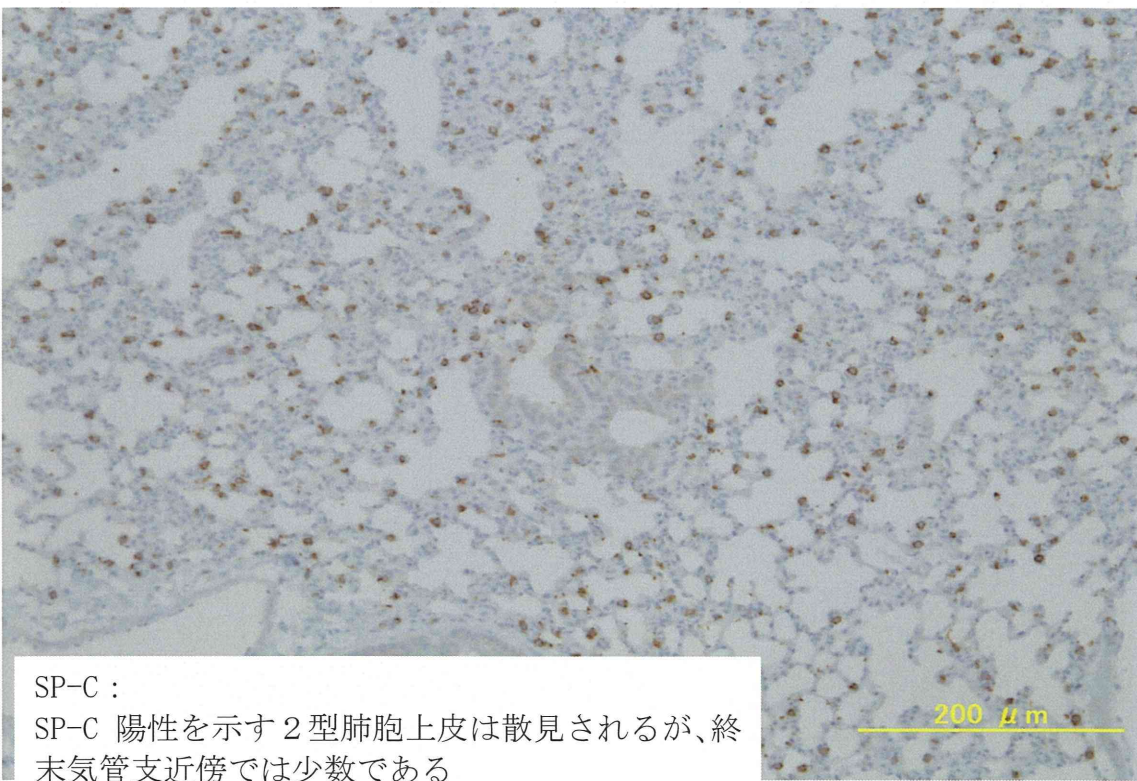
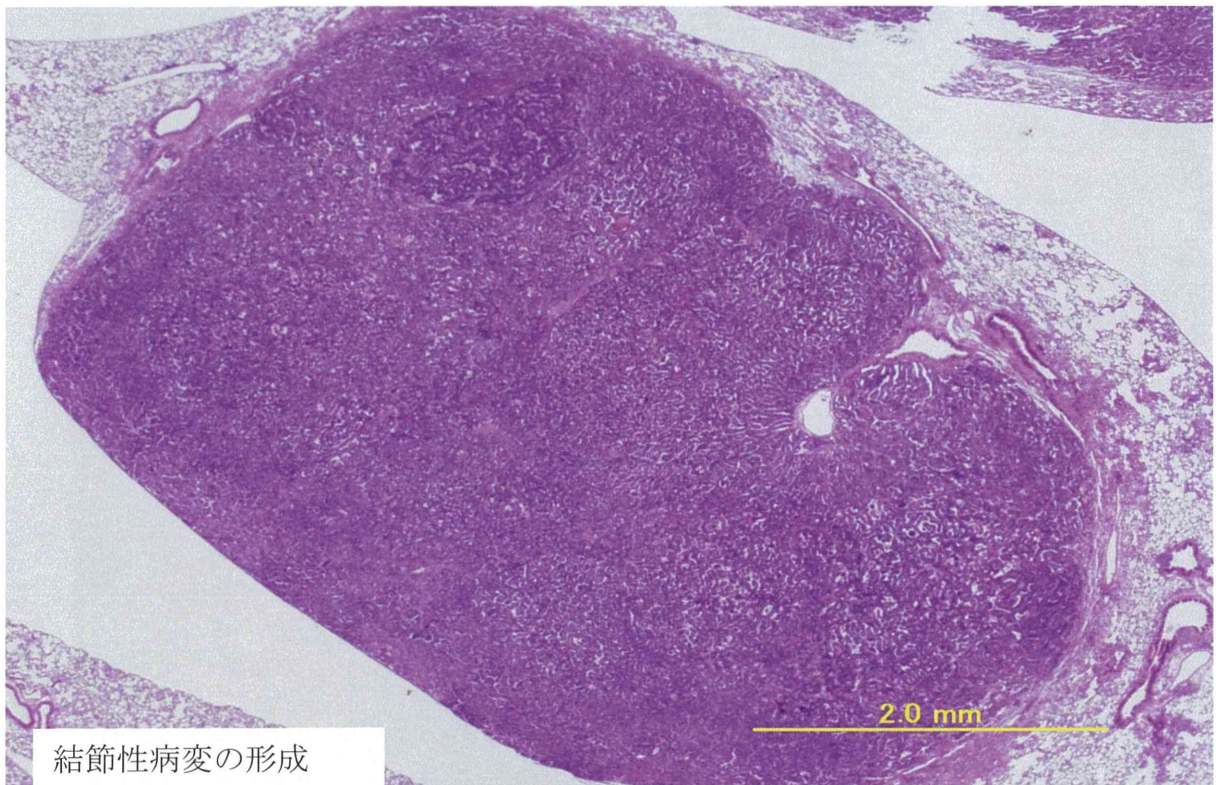


図 6 T-CNT の全身暴露投与試験 (2mg/m³) 5 回暴露投与後、13 週の肺組織評価 : SP-C 抗体による免疫染色標本 : 2 型肺胞上皮細胞の局在



結節性病変の形成

図7 T-CNTの全身暴露投与試験(2mg/m³) 5回暴露投与後、26週後の肺組織評価

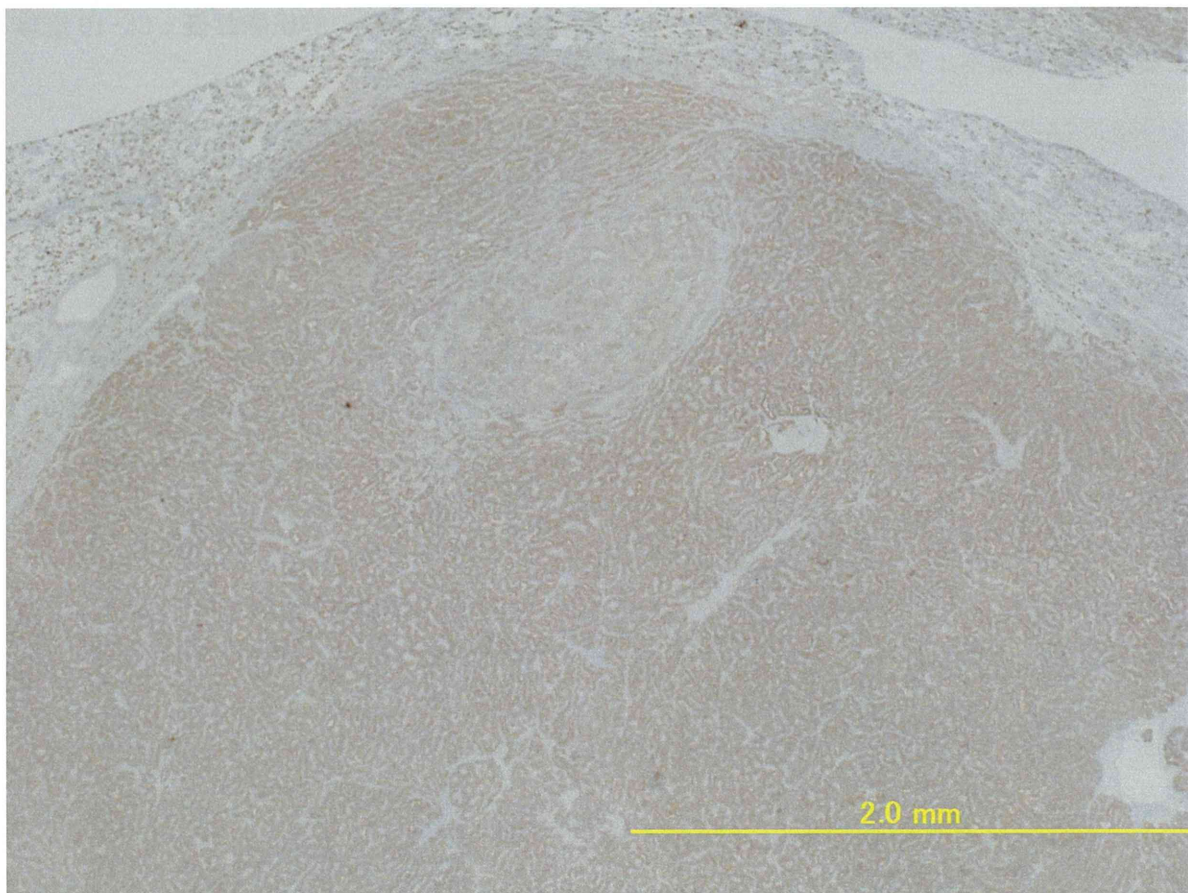


図8 T-CNTの全身暴露投与試験(2mg/m³) 5回暴露投与後、26週後の肺組織評価：
SPC抗体による検討

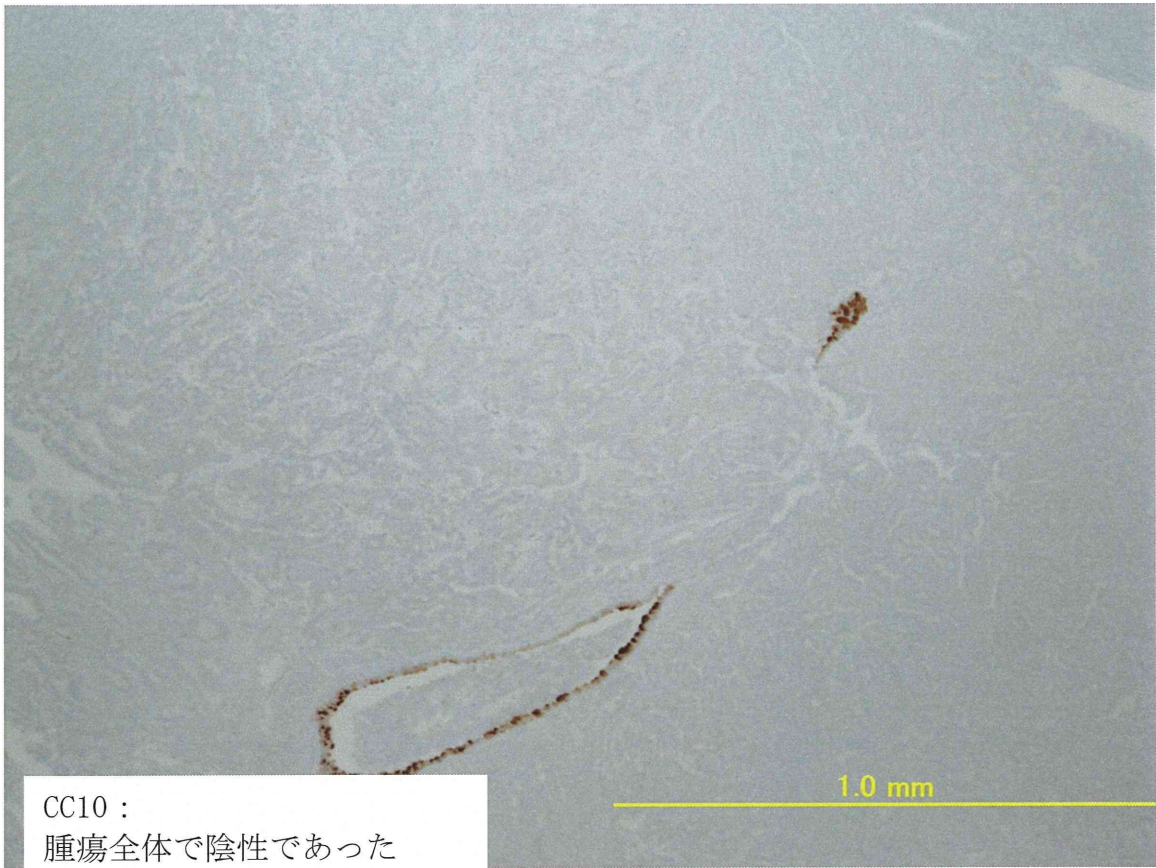


図9 T-CNTの全身暴露投与試験(2mg/m³) 5回暴露投与後、26週の肺組織評価：CC10抗体による検討

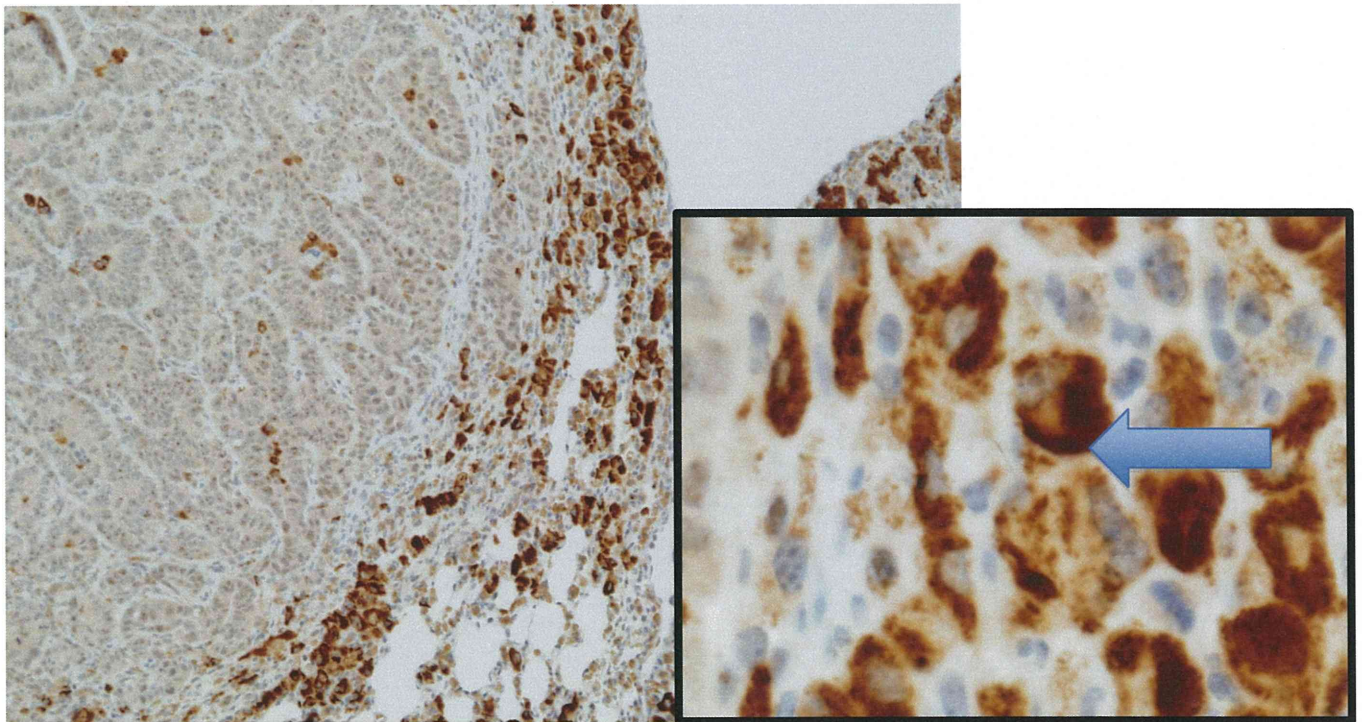


図10 T-CNTの全身暴露投与試験(2mg/m³) 5回暴露投与後、26週の肺組織評価：CD68抗体による検討(腫瘍結節の周囲にT-CNTが観察される)

平成26年度厚生労働科学研究費補助金 化学物質リスク研究事業
ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法に関する総合研究
・ 全身暴露吸入による毒性評価研究 - (H26-化学一般-003)
分担研究報告

分担研究課題 「ナノマテリアルの吸入暴露実験及び組織負荷量の研究」

研究分担者 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター 毒性部室長
研究協力者 小川幸男 同 毒性部
研究協力者 高木篤也 同 毒性部 室長
研究協力者 菅野 純 同 毒性部 部長

研究要旨

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による毒性試験（以下、吸入試験）を実施し、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たことから、多種に及ぶナノマテリアル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、人が吸入すると想定されるナノマテリアルの分散状態と異なり、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。そこで、当研究部では先行研究 [H23-化学一般-005] において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、それをエアロゾル化し全身暴露吸入試験を容易に実施可能とするカートリッジ直噴式ダスト発生装置からなる Taquann 直噴全身暴露吸入システムを独自開発した。この装置で MWCNT を吸入暴露したマウスの肺に凝集体・凝固体は観察されず、単繊維が肺胞内に到達して細気管支から肺胞レベルの瀰漫性の病変を誘発すること、及び、線維の一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。本システムが採用する方式は原理的に、多種のナノマテリアルに適応が可能であり、かつ、少ない検体量での実施が可能である。本研究は、このシステムを用いて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、ナノセルロースを検体とし、マウス (野生型、p53^{+/-}、MRL/lp) に対し吸入試験を実施し、体内動態、病理組織 (光顕、電顕、免疫染色)、免疫系機能を経時に解析し、急性から慢性へのこれらの病態の遷移とその機構を明らかにする。

本分担研究では、上記ナノマテリアルの吸入暴露条件を確立し実際に動物に暴露を行って長期観察と定期解剖を行い各研究分担者に生体試料を供給するとともに、並行して経時的な組織負荷量を測定する。H26 年度は、①野生型マウスを用いた MWCNT (MWNT-7、三井物産) 及び酸化チタン (MT-500B、テイカ) の吸入試験、②先行研究 [H23-化学一般-005] で MWCNT を吸入させた p53^{+/-}マウスの肺組織負荷量の測定を実施した。①の MWCNT については、対照群、低用量群 (1 mg/m³)、高用量群 (2 mg/m³) の 3 群の構成で 1 日 2 時間、合計 10 時間の吸入試験を行い免疫系の影響評価実験に

供した。酸化チタンについては、一次粒子径が 35 nm の検体を用いて吸入条件の検討を行い、質量濃度 2 mg/m^3 以上、空気動学的中央粒子径 (MMAD) 761 nm を達成した。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。②の p53+/-マウスの肺負荷量は、平均暴露濃度 $2.5 \text{ mg/m}^3 \times 10$ 時間吸入の終了直後では $4.2 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、吸入後 52 週では $1.2 \text{ }\mu\text{g/動物}$ 、半減期は約 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いことを明らかにした。

本研究により、人体にとって重要であると想定される全身暴露吸入経路をマウスに対し実施することで、事前に毒性情報の存在しない新規のナノマテリアルについての、遺漏のない吸入毒性評価が可能になると期待される。用量作用関係の詳細な検討が可能となり、規制決定に必要な基礎的かつ定量的な情報が得られると期待される。本システムは汎用性が高いため多種の検体に短時間のうちに適応することが可能である。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、その普及を目指す。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による毒性試験（以下、吸入試験）を実施すること、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、多種に及ぶナノマテリアル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、人が吸入すると想定されるナノマテリアル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。

ナノマテリアルの全身暴露吸入実験において問題となるのが、検体の凝集である。人が現実的に暴露される環境下では、凝集体は先に落下し、肺に到達するのは高度に分散されたものであることが想定される。多層カーボンナノチューブ (MWCNT) では、製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。この凝集成分が気道

末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集体によるこのような影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある (図 1)。

そこで、当研究部では先行研究 [H23-化学一般-005] において 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、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を用いた Taquann 直噴全身吸入暴露システムを独自開発した。このシステムで吸入暴露したマウスの肺に凝集体・凝固体は観察されず、単繊維が肺胞内に到達して細気管支から肺胞レベルの瀰漫性病変を誘発すること、一部は胸腔に達し、壁側胸膜面に中皮腫発癌を示唆する顕微鏡的病変を誘発することを確認した。本シス

テムは原理的に他のナノマテリアルに適応可能であり、かつ、少ない検体量で吸入試験の実施が可能である。

本研究はこのシステムによる吸入試験を用いる点を特徴としている。具体的には、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、ナノセルロースを検体とし、マウス（野生型、p53+/-、MRL/lp）を使用し、体内動態、病理組織学的評価（光顕、電顕、免疫染色）、免疫系機能評価等を経時に実施し、病理変化、そ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。

本分担研究では、上記ナノマテリアルの吸入暴露条件を確立し実際に動物に暴露を行って長期観察と定期解剖を行い各研究分担者に生体試料を供給するとともに経時的な組織負荷量を測定する。

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¹⁾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が得られる (図2)。

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²³⁾。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm)
長さ	1-19 μm (>5 μm 27.5%)
繊維数	3.55×10^{11} 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 μm) 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 µg/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±1℃、湿度；55±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/m³）、高用量群（目標濃度 2 mg/m³）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（表1）。

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/m³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放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）¹⁾。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（図3）。

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、希釈されつつ接続パ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り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（mg/m³）測定を並行して

行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 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、φ55 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、φ55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 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 $1.5 \text{ L/min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 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、φ21 mm、孔径0.1 μm、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 NanoMOUDI、KANOMAX、分級サイズ(μm) ; 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+/-マウスの全身暴露吸入実験 (平均暴露濃度 2.5 mg/m^3 、1日2時間、週1回×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・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) 100 µLに沈渣を分散しMWCNT懸濁液とした (図4)。

アルミナフィルター (Anodisc、孔径0.02 µm、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1 µL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 µm² (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。

【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