

図3

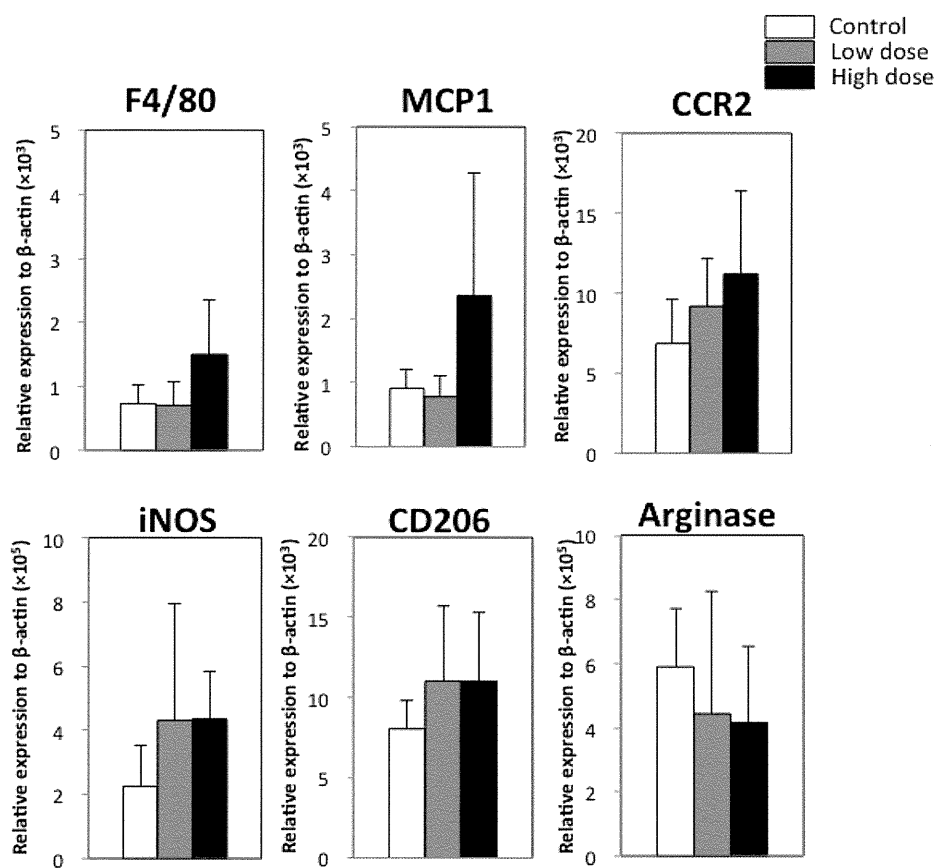


図3 肺組織におけるマクロファージ関連遺伝子の発現

図4

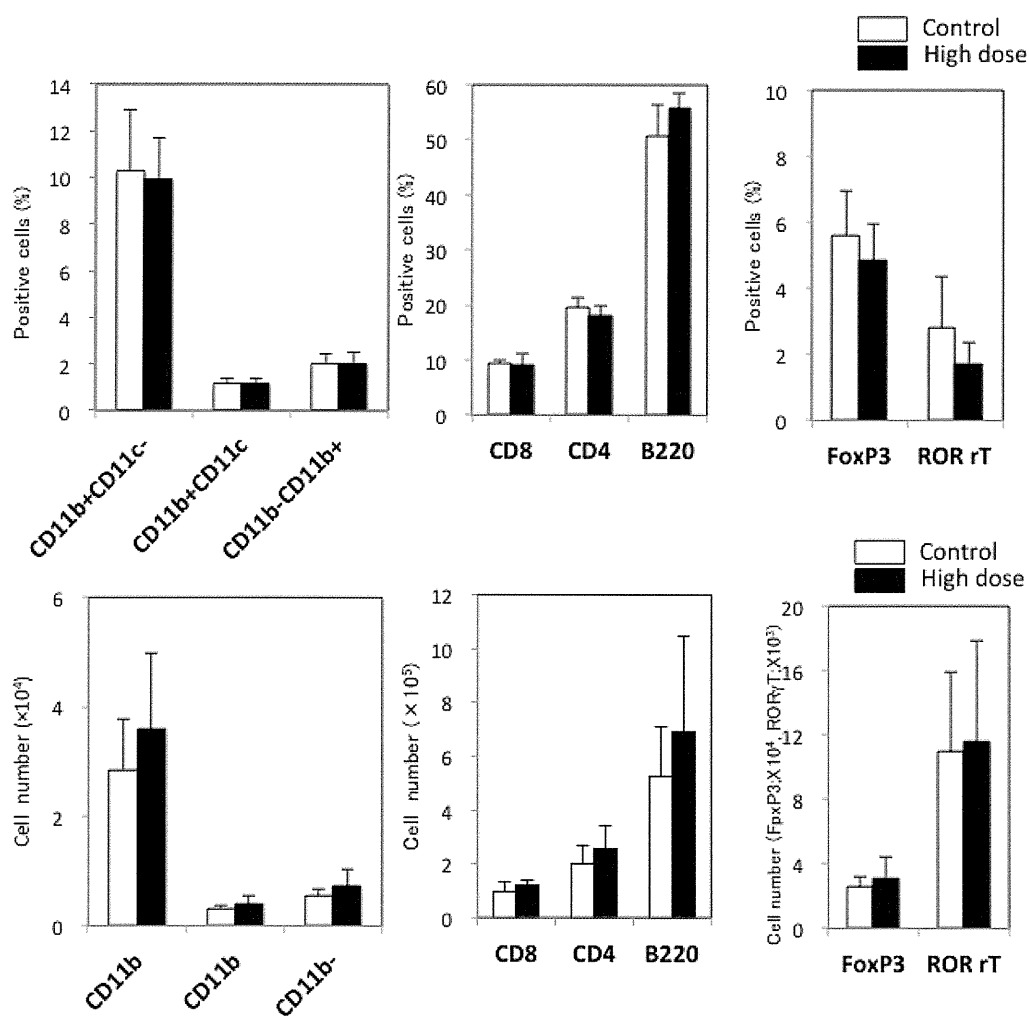


図4 T-CNT暴露による脾臓における免疫担当細胞分画への影響

図5

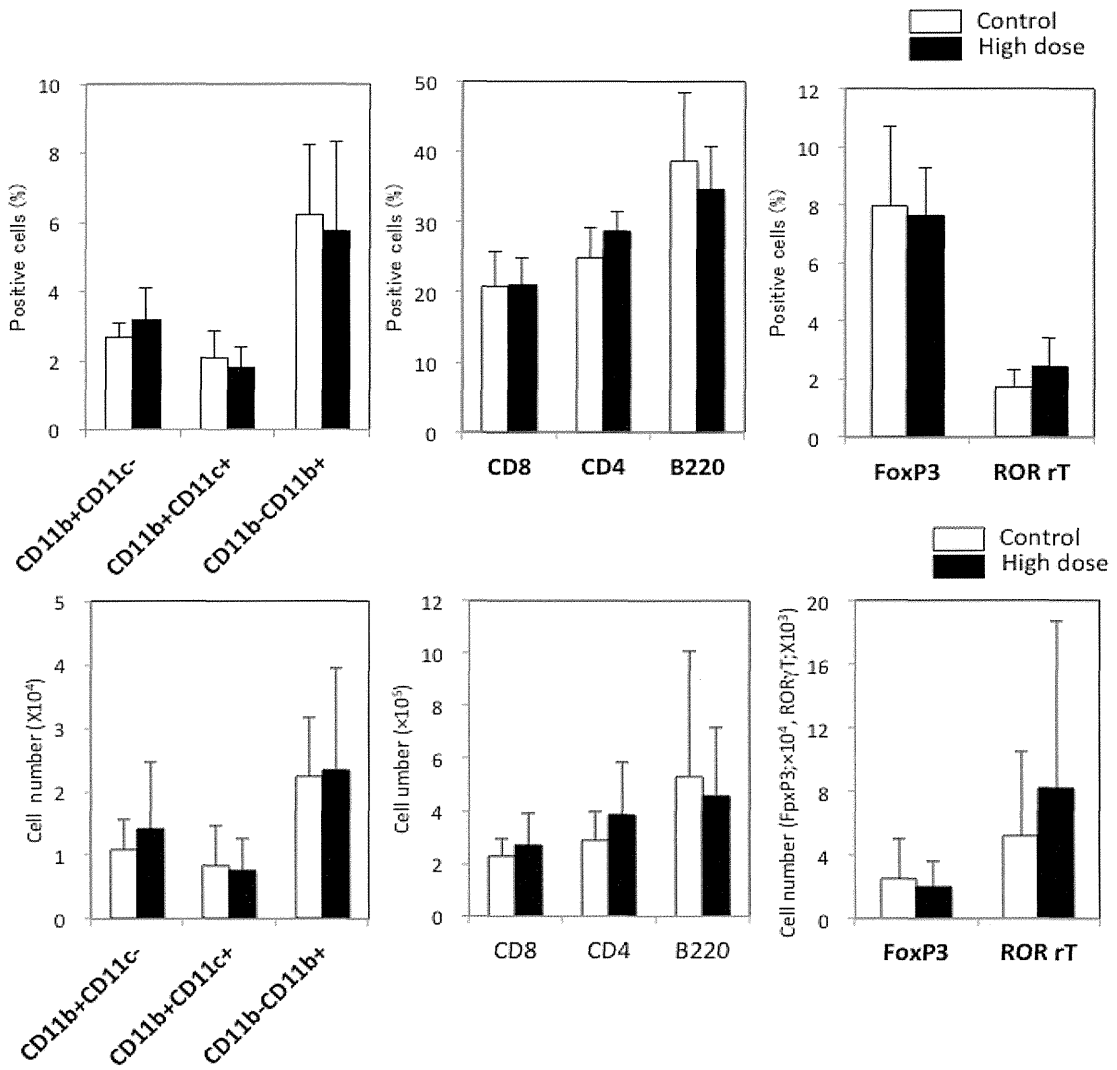


図5 T-CNT暴露によるリンパ節における免疫担当細胞分画への影響

図6

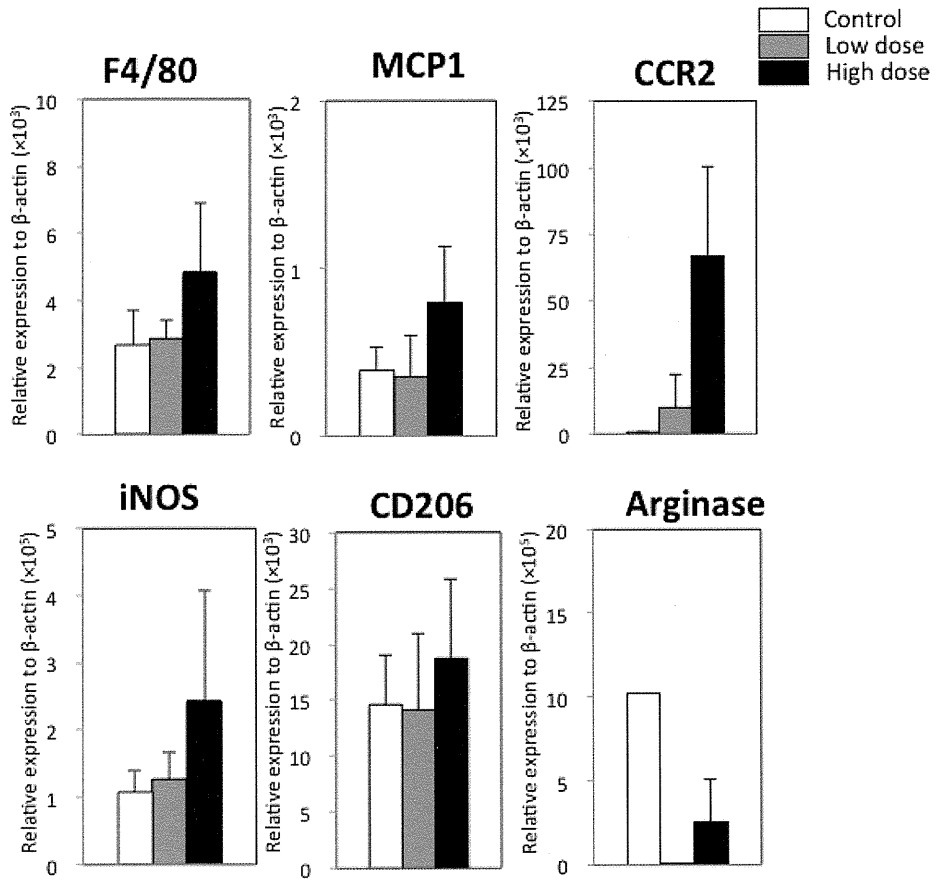


図6 T-CNT吸引暴露マウスの脾臓におけるマクロファージ関連遺伝子発現

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

「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」

研究分担者	相磯 成敏	日本バイオアッセイ研究センター	病理検査部長
研究協力者	笠井 辰也	日本バイオアッセイ研究センター	
	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	
	梅田 ゆみ	日本バイオアッセイ研究センター	
	梯 アンナ	大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学	

研究要旨

来年度公表される日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）での厚生労働省受託事業による多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の発がん性試験で、ストレートタイプのMWCNTの実験動物に対する長期毒性影響が明確になる。ヒト健康障害のリスク評価には毒性プロファイルの把握とともに毒性発現メカニズムの把握が必須となるが、体内での長期間残存が懸念されるMWCNTでは沈着動態を把握した上で肺毒性発現メカニズムの解明が求められる。

JBRCが独自に開発したMWCNTエアロゾルの大規模吸入暴露装置でラットにMWCNT（MWNT-7、三井系統：保土ヶ谷化学工業）を2.0または0.2mg/m³で3、5、10、20回の全身吸入暴露（各回：6時間/日）を行い、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-hydroxy-2'-deoxyguanosine（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/m³群では回復期間を置くことで有意に減少した。MWCNT2mg/m³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。次年度は、MWCNTの暴露で8-OHdGの形成が増加する細胞の特定、細胞増殖活性等の課題に対して、近く公表されるMWCNTの発がん性試験の結果と連携させて果的に推進する。

A. 研究目的

来年度公表される日本バイオアッセイ研究センター（JBRC）での厚生労働省受託事業による多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の発がん性試験（図1）で、ストレートタイプのMWCNTの実験動物に対する長期毒性影響が明確になる。ヒト健康障害のリスク評価には毒性プロファイルの把握とともに毒性発現メカニズムの把握が必須となるが、体内での長期間残存が懸念されるMWCNTでは沈着動態を把握した上で肺毒性発現メカニズムの解明が求められる。

このため、JBRCが独自に開発したMWCNTエアロゾルの大規模吸入暴露装置（図2、3）を利用することで厚生労働省受託事業によるMWCNTの発がん性試験と同じ実験環境条件下で、ラットを用いたMWCNTの肺毒性のメカニズムの研究を企画した。暴露濃度は発がん性試験で用いた2.0または0.2mg/m³とし、今年度の分担研究の目的は、MWCNT沈着量の動態解析と、8-OHdG発現を指標とした酸化ストレスについて経時的に解析とした。

B. 研究方法

MWCNTのラットへの全身吸入暴露には、JBRCが厚生労働省受託事業による多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の発がん性試験先行研究に向けて開発した大型吸入暴露装置を利用した。この吸入暴露装置は吸入チャンバー内のMWCNT濃度を高精度で制御し、かつ安定して長期間連続運転ができる性能を保有することが検証されている¹⁾（図2、3）。

MWCNTの肺内沈着量の定量には、JBRCの大西等が開発した生体組織内MWCNTの微量定量法²⁾（図5）を用いた。この微量定量法は従来、不可能とされていたMWCNTの微量定量を、MWCNTと特異的に吸着・脱着する特性を持つマーカーを利用することにより可能としたものである。肺組織の8-OHdG形成の定量は、JBRCで採材した肺組織を、大阪市立大学（大学院医学研究科分子病理）でhigh-performance liquid chromatography（HPLC）を用いて行った。

次年度以降は、肺組織中で8-OHdGの形成が増加した細胞の種類を免疫組織化学的に特定するとともに、細胞増殖活性の病理組織学的検索及び、吸入経路から生体内に侵入したMWCNTの体内動態に関する電子顕微鏡による検索を行うことで、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を解明する。電子顕微鏡による検索には、JBRCと酒井電子顕微鏡応用研究所で共同開発を進めている病理組織検査で所見がみられた部位を電子顕微鏡でダイレクト観察する方法によって研究を進める。

また、本分担研究では、来年度に厚生労働省から公表される予定の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。

実験デザイン

図4に示した実験デザインは、MWCNTを全身吸入暴露させたラットの肺における細胞増殖活性、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と、8-OHdG発現の経時推移を調べること

を目的とした二つの実験からなりたっている。これら二つの実験で合計155匹の雄ラットを用いた。

細胞増殖活性、病理組織学的検査及びMWCNT沈着量の動態解析を調べることを目的とした実験は、対照群 (0 mg/m^3) 1群、MWCNT暴露群2群 (0.2 および 2 mg/m^3) 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(図4)。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 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

(図4)。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。

B-1 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)3)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±2°C、湿度：55±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～-15×10Pa、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(W)×216(D)×176(H) mm/匹)

飼料は、CRF-1固型（オリエンタル酵母工業(株)、30kGy- γ 線照射滅菌飼料）を自由摂取させる。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る。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、全動物について曝露開始前に1回、曝露開始後は週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。

B-2 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（図2）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 mg/m³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 mg/m³）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55 mm Φ 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/m³)を算出する。0.2 mg/m³、2 mg/m³群ともに20 L/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。0.2 mg/m³群は30 L/minの流量で180分間、2mg/m³群は30 L/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、空気動力学的質量中位径(MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter)及び幾何標準偏差(σ g; 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0.8 μ mのポアサイズのポリカーボネートフィルター(47 mm Φ 、Whatman社)に吸入チャンバー内空気を捕集した。0.2 mg/m³群は5 L/minの流量で30分間、2mg/m³群は5 L/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。

B-3 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。

B-4 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。

B-5 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を作製した。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・エオジン染色標本を作製した。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。

B-6 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。

B-7 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。

B-8 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.*, 1986³⁾に従ってHPLCで測定した。

【倫理面への配慮】本分担研究は「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4月28日環境省告示第88号、最終改正平成25年8月30日環境省告示第84号)、「厚生労働省の所管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日厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知)および「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」(平成24年4月25日規程第17号、最終改正平成25年3月28日規程第12号)を遵守して行われた。また、当該動物実験は日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会で審査による承認を得た(承認番号 0093)。

C. 研究結果

C-1 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（図8、9）、8-OHdG発現の経時推移を調べることを目的とした実験（図10、11）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/m³暴露・回復群の搬出時体重に対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（図9附記）。

C-2 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/m³暴露群、2mg/m³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（表2）から、0.2mg/m³暴露群、2mg/m³暴露群とも、粒子の空気動力学的質量中位径は1~2μm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2μm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（図6、7）。また、2000倍に拡大した像で0.2mg/m³暴露群と2mg/m³暴露群を比較すると（図7上、図8上）、2mg/m³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。

C-3 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。

C-4 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を図12に、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図13に示した。8-OHdG形成の経時推移を調べることを目的とした図13の実験では0mg/m³（対照群）と2mg/m³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（図12）で、実重量で増加が示されたのは2mg/m³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/m³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（図13）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/m³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の脾臓重量を図14に、胸腺重量を表15に示した。

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（図15）。

C-5 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。

C-6 MWCNTの肺中濃度の定量

右肺組織内のMWCNTの定量結果を図16に示した。暴露終了時に解剖した動物で0.2mg/m³群、2mg/m³群とも暴露回数と関連した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/m³群の沈着量は0.2mg/m³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/m³群、2mg/m³群とも暴露回数と関連したMWCNTの沈着量の増加が認められた。但し、2mg/m³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。

B-7 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。

B-8 肺組織の8-OHdG形成の測定

8-OHdG形成の定量結果を図17に示した。2mg/m³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. 考察及び結論

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0.2mg/m³で3、5、10、20回の全身吸入曝露（各回：6時間/日）を行い、曝露終了後と初回曝露後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-hydroxy-2'-deoxyguanosine (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/m³群では回復期間を置くことで有意に減少した。MWCNT2mg/m³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。

次年度は、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果的に推進する。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。

【引用文献】

- 1) Kasai, T., Umeda, Y., Ohnishi, M., Kondo, H., Takeuchi, T., Aiso, S., Nishizawa, T., Matsumoto, M., and Fukushima, S., Thirteen-week study of toxicity of fiber-like multi-walled carbon nanotubes with whole-body inhalation exposure in rats, *Nanotoxicology*, 2014, 28 (2);169-178.
- 2) Ohnishi, M., Yajima, h., kasai, t., Umeda, Y., Yamamoto, M., Yamamoto, S., Okuda, K., Suzuki, M., Nishizawa, T., and Fukushima, S., Novel method using hybrid markers: development of approach for pulmonary measurement of multi-wall carbon nanotubes. *Journal of occupational Medicine and Toxicology*, 2013, 8;30
- 3) Kasai, H., Crain, P. F., Kuchino, Y., Nishimura, S., Ootsuyama, A. and Tanooka, H., Formation of 8-hydroxyguanine moiety in cellular DNA by agents producing oxygen radicals and evidence for its

repair., Carcinogenesis, 1986, (7);184
9-1851.

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

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.

4) 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

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：ラット全身吸入曝露での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週間吸入曝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

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

複層カーボンナノチューブのラットを用いた吸入によるがん原性試験

被験物質 : MWNT-7
 投与経路 : 吸入全身暴露
 暴露濃度 : 0、0.02、0.2、2mg/m³
 暴露期間 : 6時間/日、5日/週、104週
 動物 : F344/DuCrIjラット、雌雄各200匹
 ガイドライン : OECD化学品テストガイドライン451
 G L P : 対応

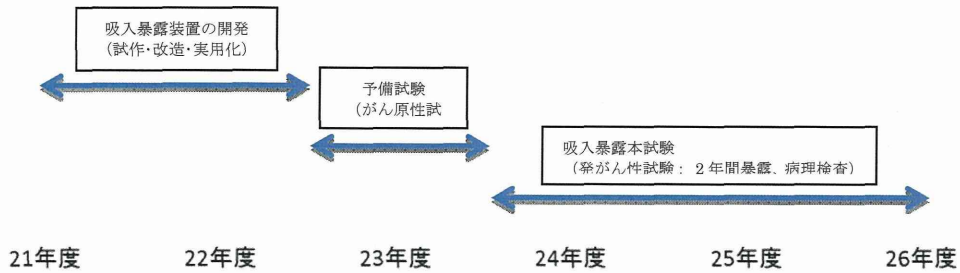


図1 研究背景：厚生労働省によるナノマテリアルの有害性等調査事業

(日本バイオアッセイ研究センター受託、H. 21年度～H26年度)

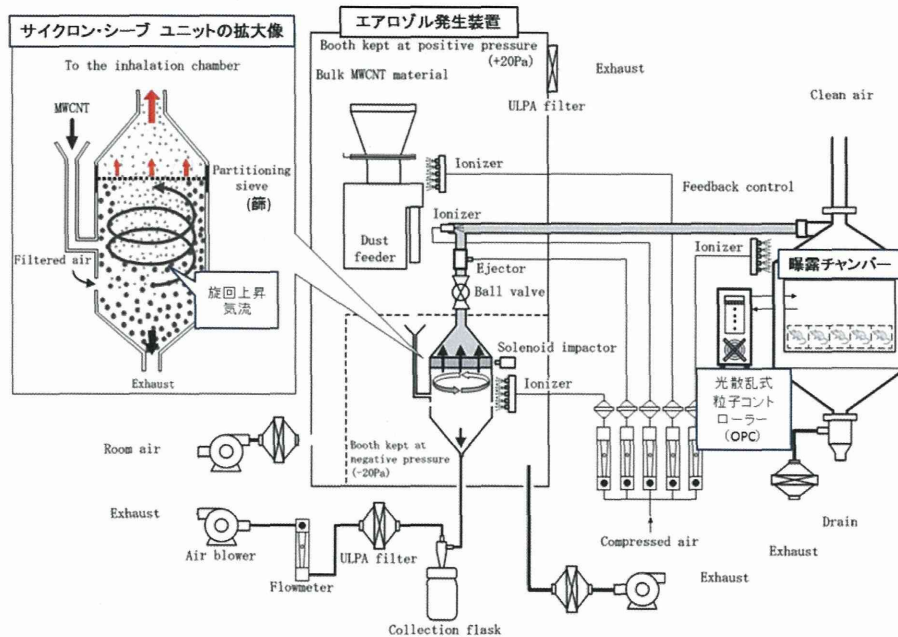
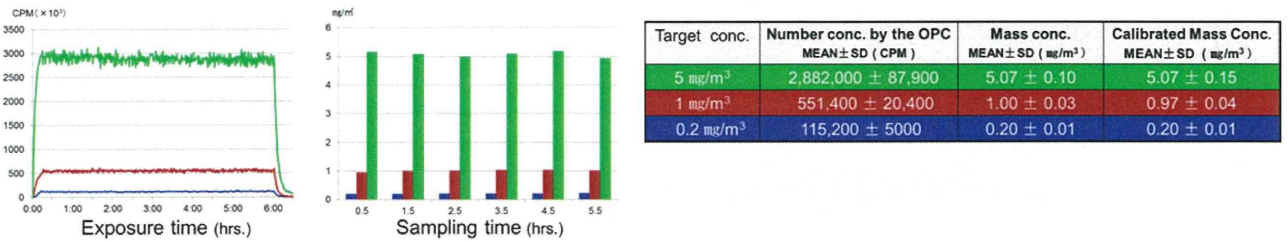
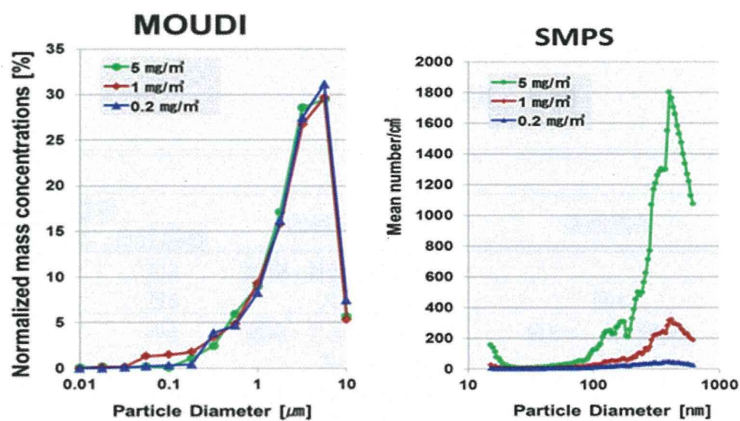


図2 エアロゾル発生装置と全身曝露システム

MWCNT concentrations in the inhalation chamber



各濃度群とも、設定濃度で6時間安定した暴露が可能



各濃度とも、同じMWCNTエアロゾルの粒度分布を示す

Target conc.	MMAD (μm)	GSD	Target conc.	Mean #/cm ³
5 mg/m ³	1.21	3.39	5 mg/m ³	657
1 mg/m ³	1.04	3.20	1 mg/m ³	123
0.2 mg/m ³	1.33	2.70	0.2 mg/m ³	26

T. Kasai et al. *Nanotoxicology*, 28(2);169-178, 2014

図3 吸入暴露装置の性能確認 (単回暴露、吸入チャンバー内のMWCNT濃度)

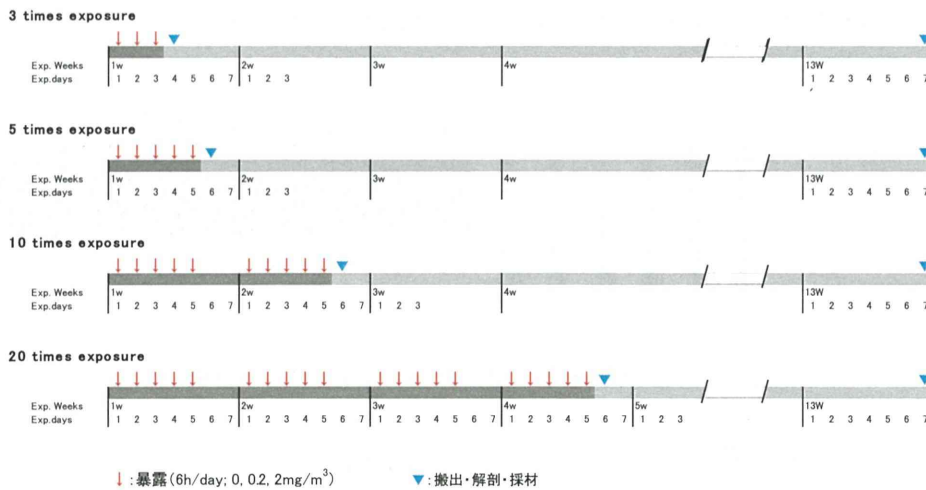
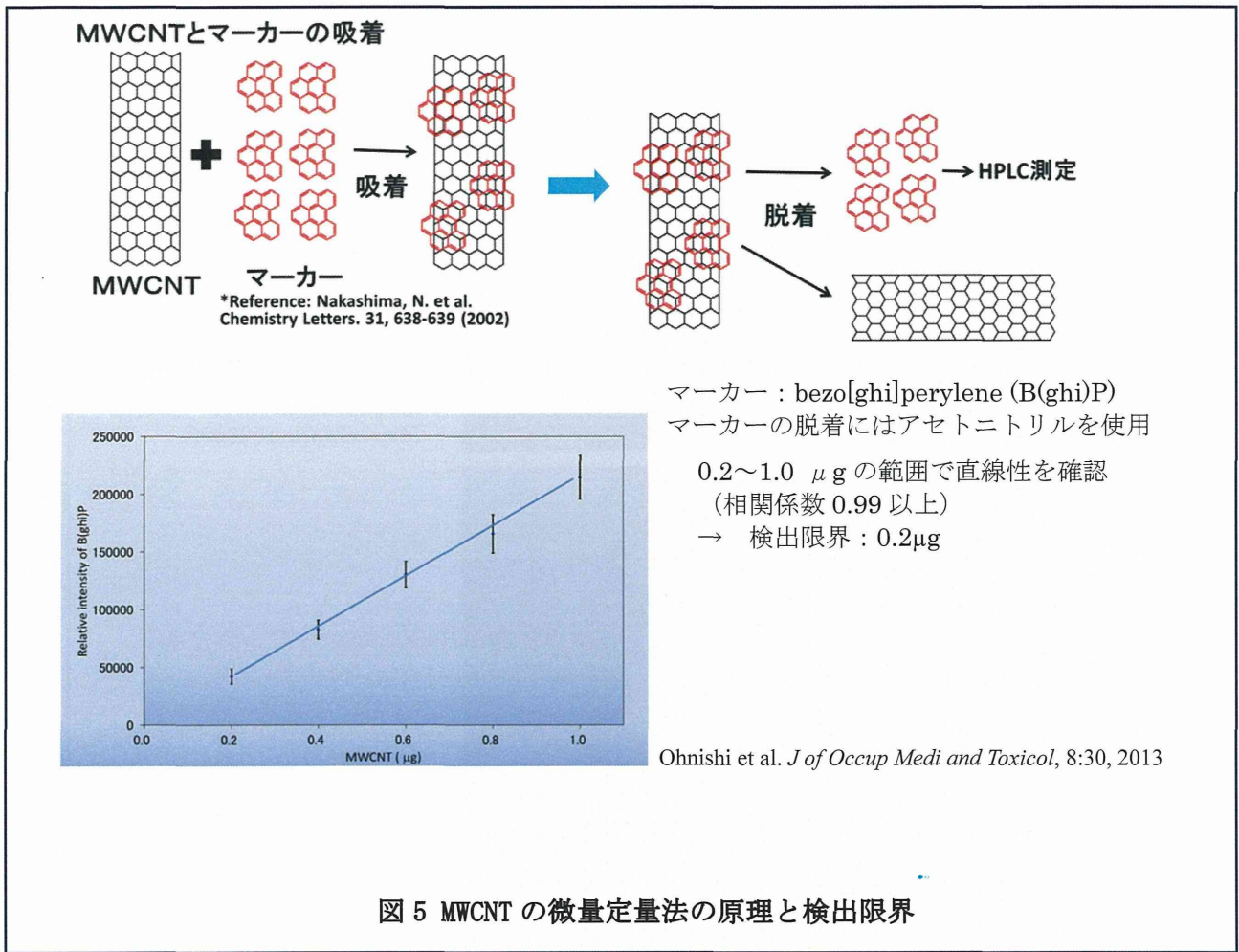


図4 実験デザイン

暴露濃度	暴露回数	主要目的	解剖・採材	
			暴露翌日	初回暴露後3ヶ月
0 mg/m ³ (対照群)	3回	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³	6時間/日 × 3日	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	5回	細胞増殖活性・病理	5匹	—
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³	6時間/日 × 5日	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	10回	細胞増殖活性・病理	5匹	—
		酸化ストレス	5匹	—
0.2 mg/m ³	(6時間/日 × 5日/週) × 2週	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	—
0 mg/m ³ (対照群)	20回	細胞増殖活性・病理	5匹	—
		酸化ストレス	5匹	5匹
0.2 mg/m ³	(6時間/日 × 5日/週) × 4週	細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	—	—
2 mg/m ³		細胞増殖活性・病理	5匹	5匹
		酸化ストレス	5匹	5匹

総計 155匹

附記

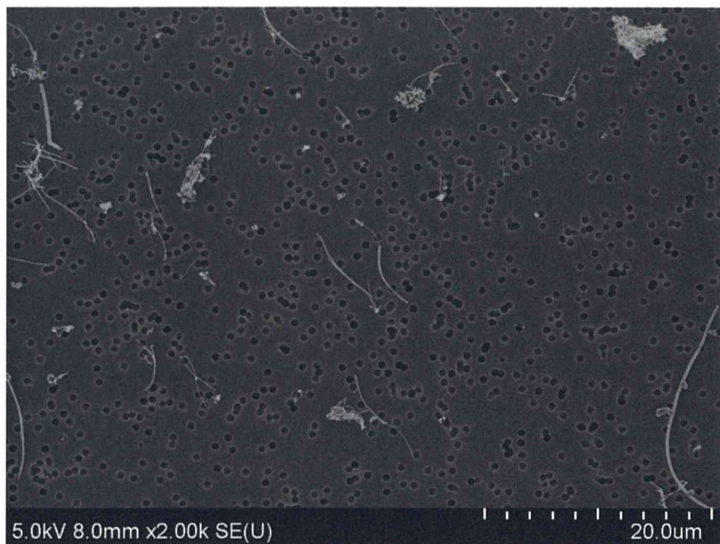


設定濃度	吸入チャンバー内実測値 (mg/m^3)			
	3回暴露	5回暴露	10回暴露	20回暴露
0.2 mg/m^3				
Average	0.21	0.20	0.20	0.20
SD	0.01	0.01	0.01	0.01
2 mg/m^3				
Average	2.00	2.01	2.01	2.02
SD	0.10	0.08	0.06	0.05

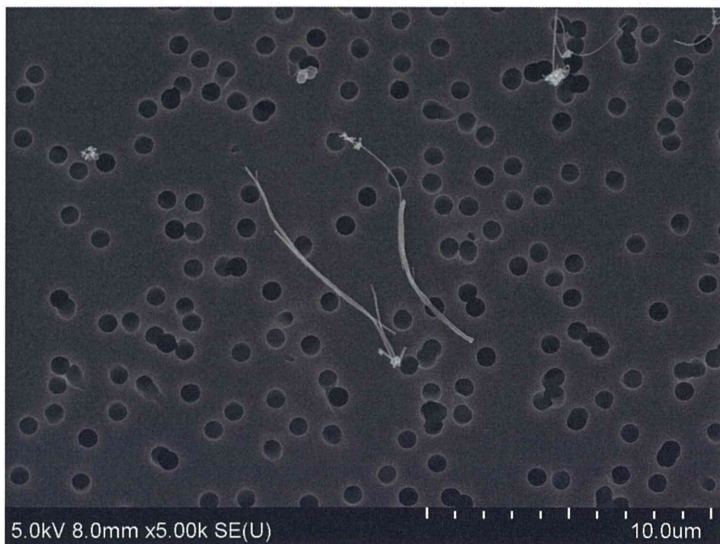
表 1. 吸入曝露チャンバー内の MWCNT 濃度

吸入チャンバー内MWCNTの粒子径	
0.2 mg/m^3	
空気力学的質量中位径 (MMAD)	1.52 μm
幾何標準偏差 (GFSD)	2.42
2 mg/m^3	
空気力学的質量中位径 (MMAD)	1.99 μm
幾何標準偏差 (GFSD)	2.42

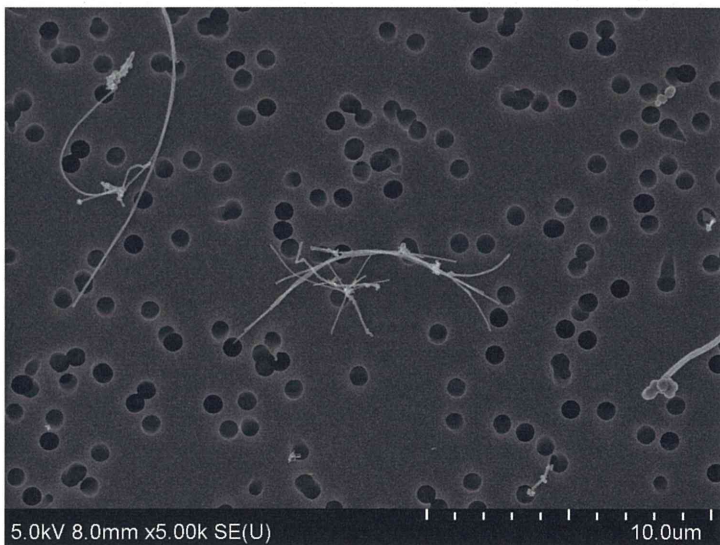
表 2. 吸入曝露チャンバー内 MWCNT の粒子径



InstructName=SU8000
AcceleratingVoltage=5000 Volt
Magnification=2000
MicronMarker=20000



InstructName=SU8000
AcceleratingVoltage=5000 Volt
Magnification=5000
MicronMarker=10000



InstructName=SU8000
AcceleratingVoltage=5000 Volt
Magnification=5000
MicronMarker=10000

図 6. 0.2mg/m³ 暴露群のエアロゾル中の MWCNT の形状
(走査電子顕微鏡観察像)