

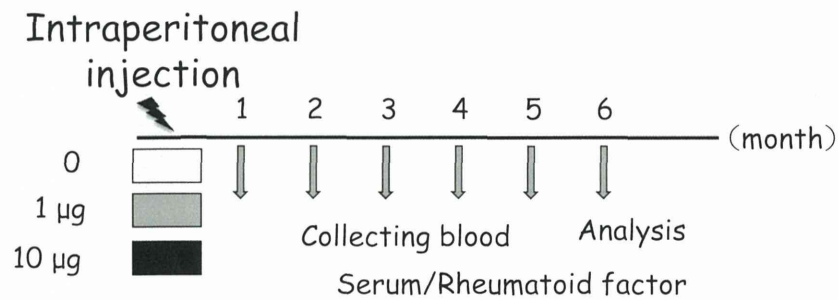
Experiment 2

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

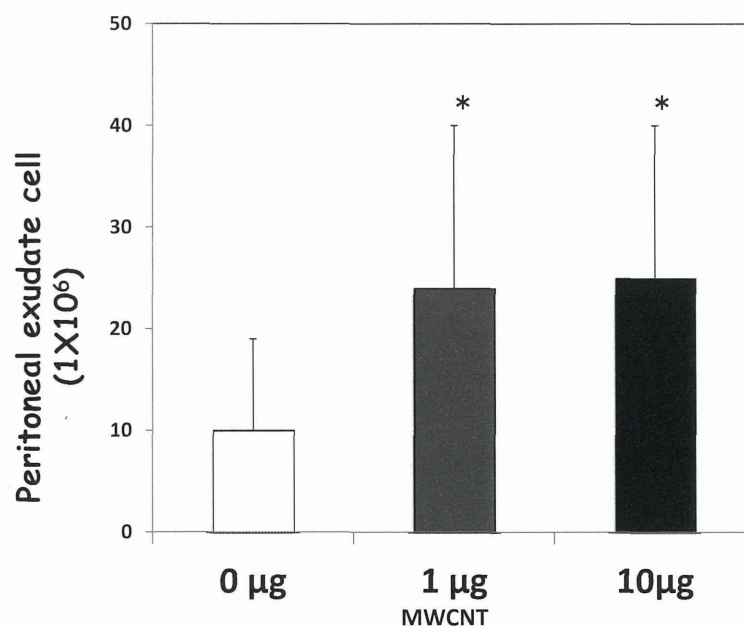
Group (n=5): 0 µg/mouse, 1 µg/mouse, 10 µg/mouse

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

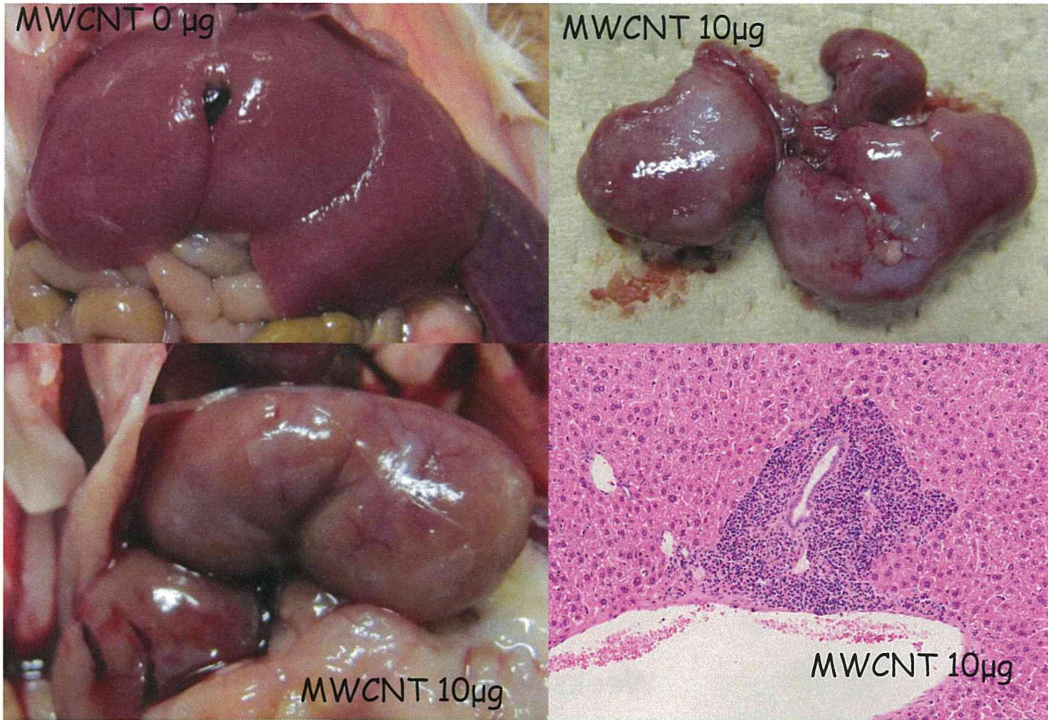
Vehicle: 0.1% Tween80/saline



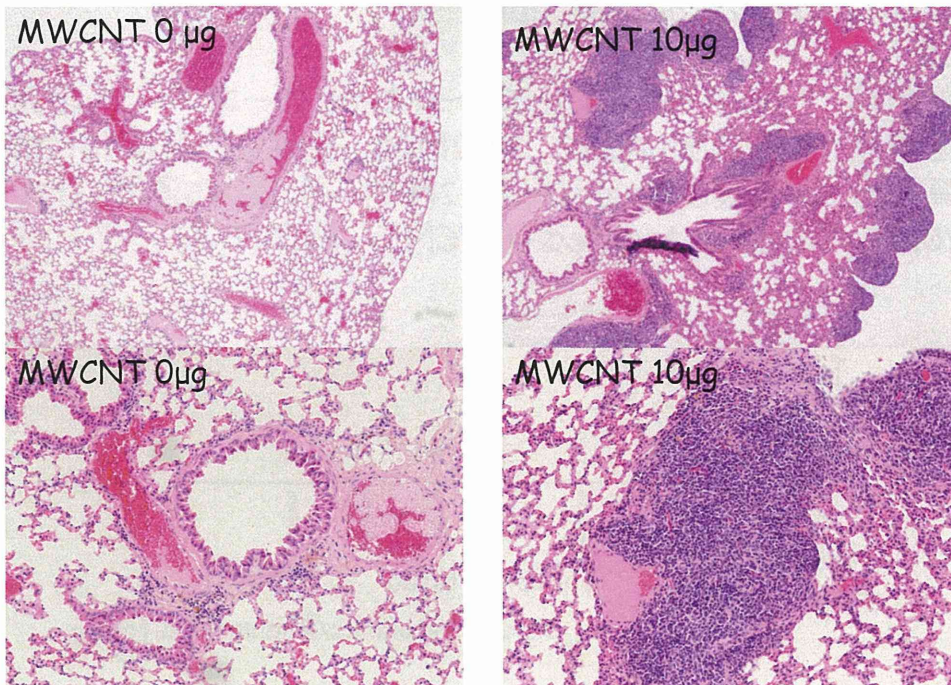
Effect of MWCNT on the number of peritoneal exudate cells in MWCNT injected MRL/lpr mouse



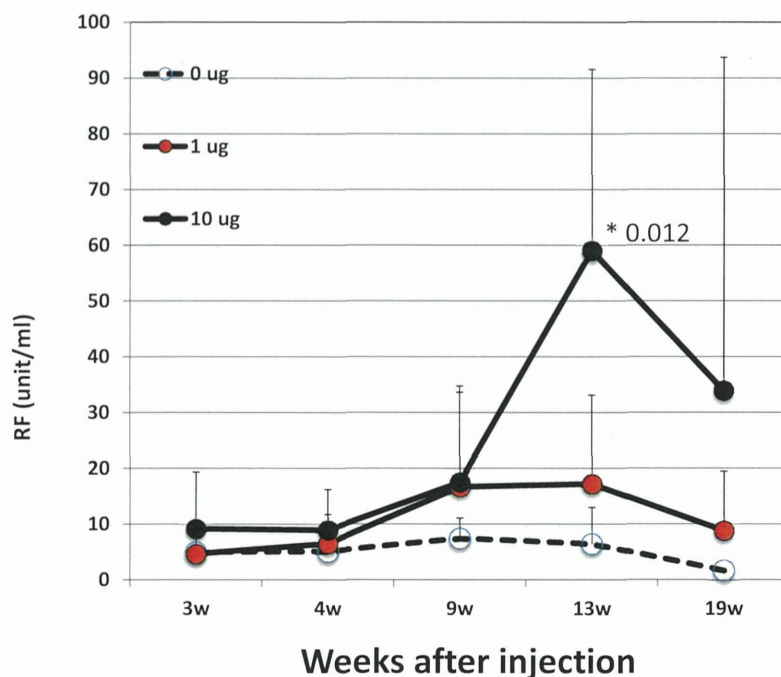
Liver lesions in MRL/lpr mice



Pulmonary lesions in MRL/lpr mice



Effect of MWCNT injection on FR levels in MRL/lpr mice



Experimental Plan

Mice : ♀ C57BL/6 or MRL/lpr

Group

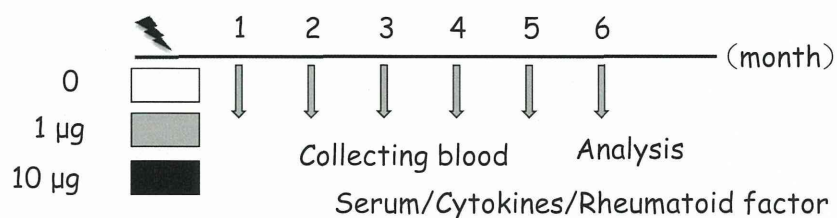
(1) 対照群: フィルターを通したエア (キャリアーエア) を吸入

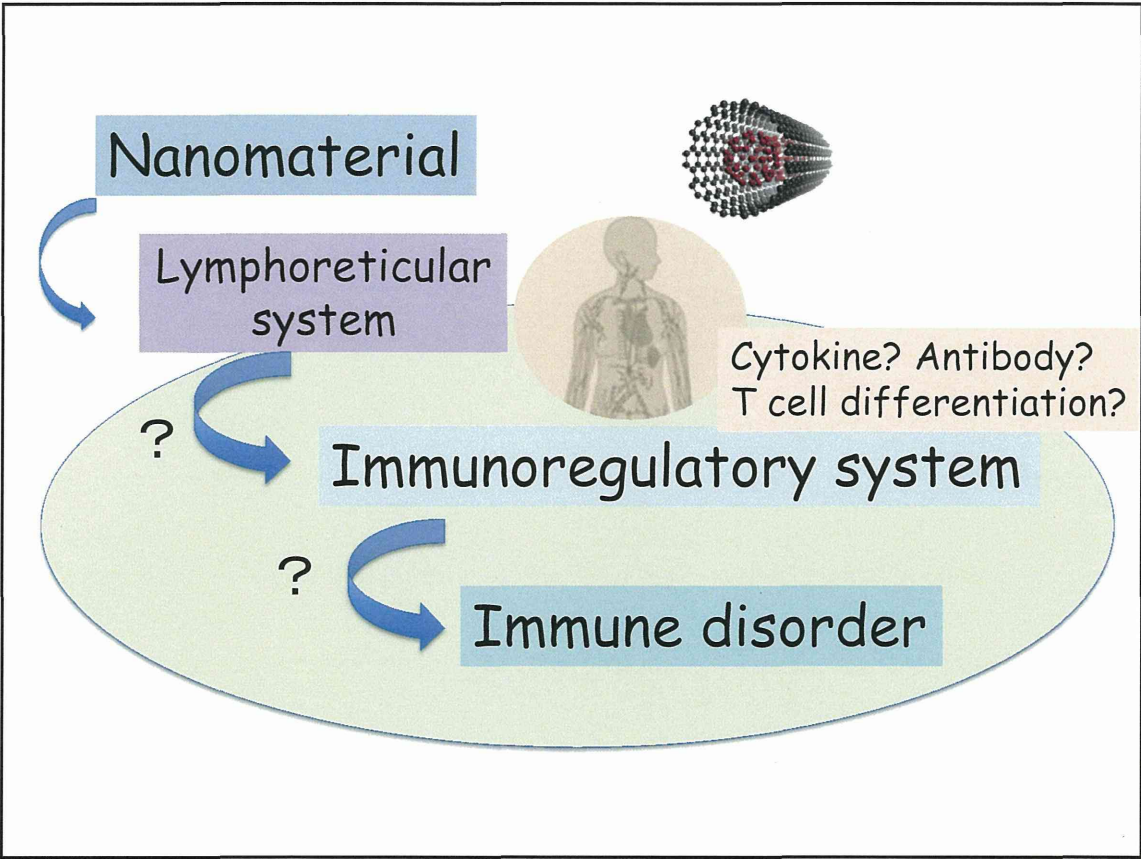
(2) 低用量: 目標濃度 1mg/m³、1日2時間 週1回 × 5週間 (計10時間)

(3) 高用量: 目標濃度 2mg/m³、1日2時間 週1回 × 5週間 (計10時間)

MWCNT: Taquan-treated MWCNT (MCNT-7)

Inhalation





多層カーボンナノチューブの吸入暴露 による毒性メカニズムの研究

日本バイオアッセイ研究センター
相磯成敏

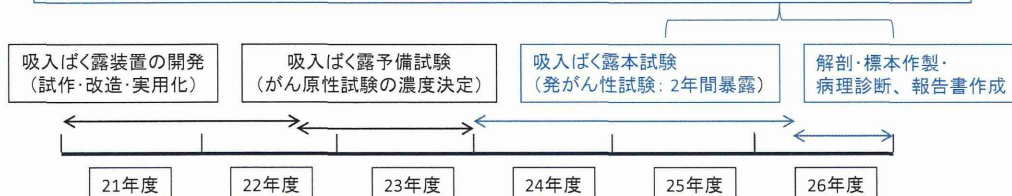
2014.10.08

【研究背景】

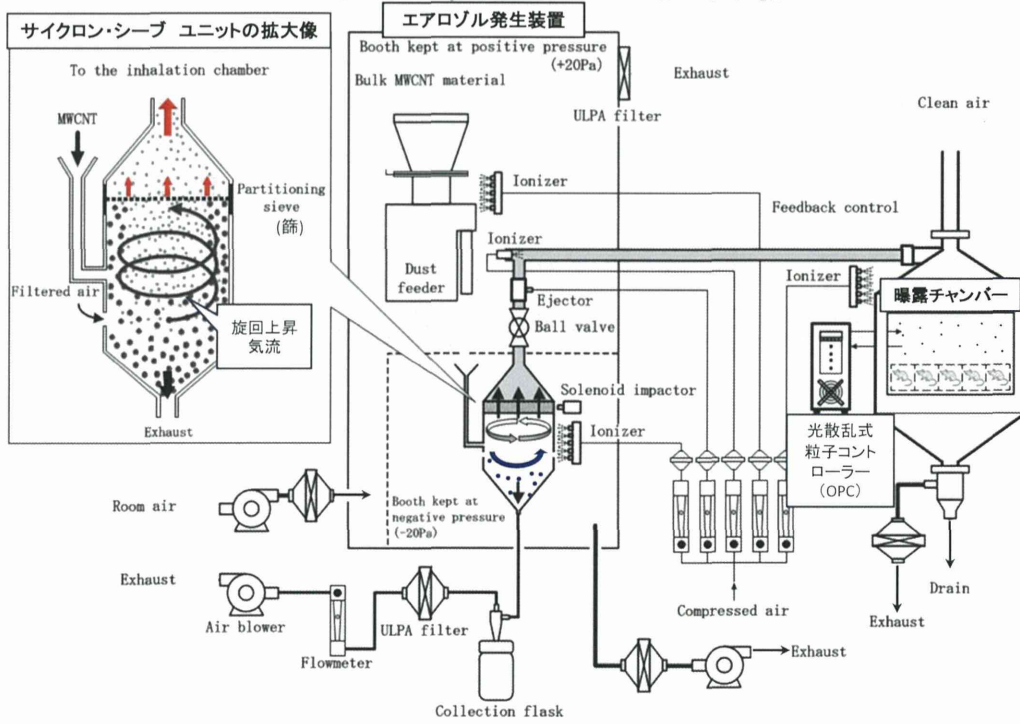
ナノマテリアルの有害性等調査事業(厚労省)

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 : 吸入全身曝露
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



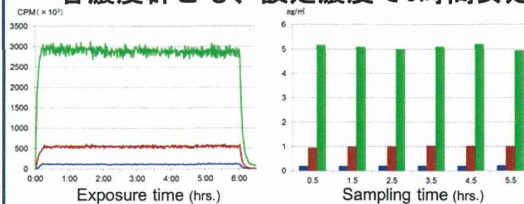
エアロゾル発生装置と全身曝露システム



吸入曝露装置の性能確認(単回曝露)

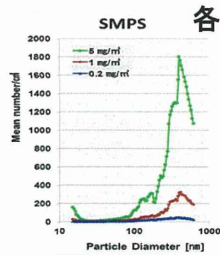
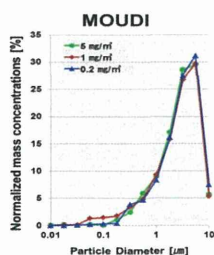
MWCNT concentrations in the inhalation chamber

各濃度群とも、設定濃度で6時間安定した曝露



Target conc.	Number conc. by the OPC MEAN ± SD (CPM)	Mass conc. MEAN ± SD (mg/m ³)	Calibrated Mass Conc. MEAN ± SD (mg/m ³)
5 mg/m ³	2,882,000 ± 87,900	5.07 ± 0.10	5.07 ± 0.15
1 mg/m ³	551,400 ± 20,400	1.00 ± 0.03	0.97 ± 0.04
0.2 mg/m ³	115,200 ± 5000	0.20 ± 0.01	0.20 ± 0.01

Size distributions



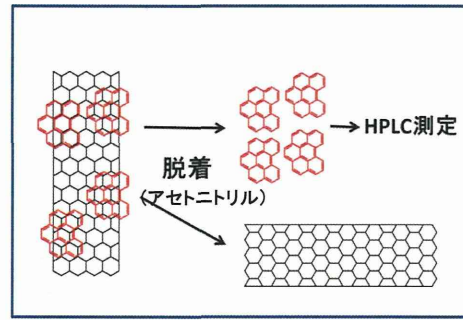
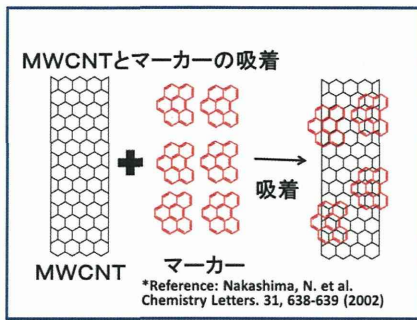
各濃度とも、同じMWCNTエアロゾルの粒度分布を示す

Target conc.	MMAD (μm)	GSD
5 mg/m ³	1.21	3.39
1 mg/m ³	1.04	3.20
0.2 mg/m ³	1.33	2.70

Target conc.	Mean #/cm ³
5 mg/m ³	657
1 mg/m ³	123
0.2 mg/m ³	26

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

MWCNTの微量定量法の原理と検出限界

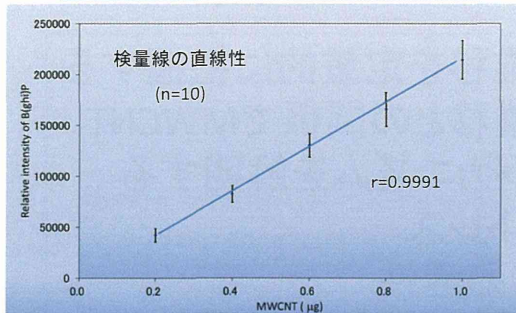


マーカ－: bezo[ghi]perylene (B(ghi)P)

0.2~1.0 μg の範囲で直線性を確認(相関係数0.99以上)

→ 検出限界: 0.2 μg

Ohnishi et al. *J of Occup Medi and Toxicol*, 8:30, 2013



【研究の背景】

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
(厚労省、ナノマテリアルの有害性等調査事業)

発がん性の結果が公表されると

リスク評価上の課題となるのは

- ・ 全身での体内動態
- ・ 免疫制御システムへの影響
- ・ 暴露評価
- ・ 肺毒性のメカニズム

MWCNT: 生体組織内での耐久性が強い
→ 体内に長期間残存

↓
標的臓器でのMWCNT沈着量の推移の把握が必要

- ・ 肺でのMWCNT沈着量を経時的に測定

↓
毒性発現をMWCNT沈着量の推移との関係で考える

↓
肺での毒性発現メカニズムの研究

- ・ 酸化ストレス: 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)を測定
- ↓
- ・ 細胞増殖活性の増加: 肺組織中のDNA合成細胞を検索 (BrdU)

【研究の目的】

- MWCNTエアロゾルの大規模吸入暴露装置
- 肺内MWCNTの微量定量法
(いずれも日本バイオアッセイ研究センターで開発)



- MWCNT沈着量の推移を定量的に把握する
- MWCNT沈着量の推移との関係でMWCNTによる肺毒性発現メカニズムを解明する
 - 肺の酸化ストレス
 - 肺の細胞増殖活性

【研究方法】

- 発がん性試験の最高濃度 $2\text{mg}/\text{m}^3$ でMWCNTをラットに最長4週間暴露し、最長で90日経過観察
 - MWCNTの肺中濃度(沈着量)の推移を肺組織中のMWCNTの微量定量法を利用して調べる
 - 肺組織の細胞増殖活性の推移の推移を調べる
 - 肺組織の酸化ストレスの推移を調べる

検体、動物

検体

多層カーボンナノチューブ

(Multi-walled carbon nanotube: MWCNT)

ロット番号: 071223 製造元: 保土谷化学(株)

動物

動物種・系統、性: F344/DuCrIjラット、雄

導入予定匹数: 160匹

導入時週齢: 生後4週齢

投与開始時週齢: 生後6週齢

飼育環境等

吸入チャンバー内環境

- 温度 23±2°C
- 湿度 30～70%
- 明暗サイクル12時間点灯(8:00～20:00)/
12時間消灯(20:00～8:00)
- 換気回数 飼育中12回/時、曝露中5～6回/時
- 圧力 0～-15×10Pa

飼料、飲水

- 飼料: CRF-1固型(30kGy-γ線照射滅菌飼料、
オリエンタル酵母工業(株)、自由摂取)
- 飲水: 市水(フィルターろ過、紫外線照射)、自由摂取

肺組織中MWCNT量および細胞増殖活性測定

群名称	暴露回数 (曝露期間*)	暴露後解剖群	暴露回復群 (全観察期間90日)
対照群 0.2 mg/m ³ 群 2 mg/m ³ 群	3回 (3日)	各群 5匹 (計15匹)	各群 5匹 (計15匹)
対照群 0.2 mg/m ³ 群 2 mg/m ³ 群	5回 (1週間)	各群 5匹 (計15匹)	— 5匹 5匹
対照群 0.2 mg/m ³ 群 2 mg/m ³ 群	10回 (2週間)	各群 5匹 (計15匹)	— 5匹 5匹
対照群 0.2 mg/m ³ 群 2 mg/m ³ 群	20回 (4週間)	各群 5匹 (計15匹)	— 5匹 5匹

*:6時間/日、5日/週で暴露 (total:105 匹)
 暴露濃度2 mg/m³は、がん原性試験の最高濃度とした

肺の酸化ストレス活性測定

群名称	暴露回数 (曝露期間*)	暴露後解剖群	暴露後観察群 (全観察期間90日)
対照群 2 mg/m ³ 群	3回 (3日)	各群 5匹 (計10匹)	
対照群 2 mg/m ³ 群	5回 (1週間)	各群 5匹 (計10匹)	
対照群 2 mg/m ³ 群	10回 (2週間)	各群 5匹 (計10匹)	
対照群 2 mg/m ³ 群	20回 (4週間)	各群 5匹 (計10匹)	各群 5匹 (計10匹)

*:6時間/日、5日/週暴露 (total:50 匹)
 暴露濃度2 mg/m³は、がん原性試験の最高濃度とした

各種検索

- 細胞増殖活性の検索
 - 左肺を抗BrdU抗体で免疫組織染色
- 肺中MWCNT量を測定
 - 右肺を大西法で測定
- 酸化ストレスの検索
 - 肺の8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG)を測定
肺重量測定後、液体窒素で8-OHdG測定まで凍結保存

吸入チャンバー内のMWCNT濃度と粒径分布

MWCNTの濃度測定

- チャンバー内のMWCNTを捕集、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^3)を算出

吸入チャンバー内の粒子径分布

- MWCNTを捕集して、MOUDI (Micro-orifice uniform deposit cascade impactor、MSP社)による重量測定



確率対数によるグラフから空気動学的質量中位径 (MMAD; Mass Median Aerodynamic Diameter) 及び幾何標準偏差 (σ ; geometric standard deviation) を求める

吸入チャンバー内のMWCNTの形態観察

- 吸入チャンバー内のMWCNTを捕集



SEM(SU8000)で観察

TEM(JEM-1400)で観察(必要に応じて)

【3年全体の研究計画概要及び本年度の研究計画】

平成26年度

MWCNTをラットに1日6時間、3回、5回、10回、20回暴露し、それぞれ定められた回数の暴露終了日に解剖・採材をおこなう。また、各群の最終暴露後に回復群を設け、暴露から通算して3ヶ月後に最終解剖・採材を行う。但し、酸化ストレスの測定では2 mg/m³、20回暴露群だけに回復群を設ける。

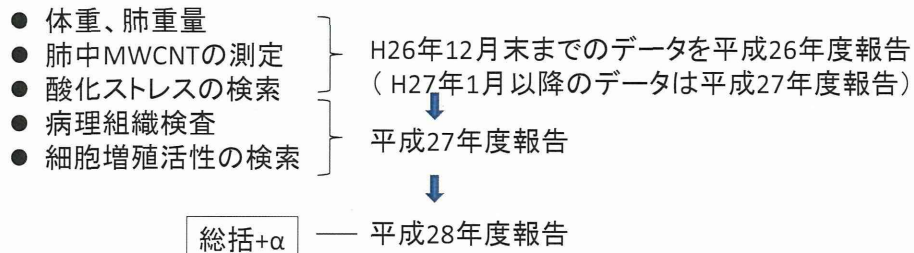
平成26年度報告は、平成26年12月末までに解剖・採材したものについて、MWCNTの肺内沈着量と酸化ストレスの研究結果を予定している。

平成27年度

MWCNT沈着量の測定と酸化ストレスの測定結果で平成27年1月以降に解剖・採材したものは平成27年度報告を予定している。肺における細胞増殖活性の測定結果についても平成27年度報告を予定している。

平成28年度

平成28年度は分担研究の総括及び必要に応じた追加研究を行う。



【予想される成果】

MWCNTのリスク評価で重要な課題となる吸入暴露したラットの肺での経時的な沈着量を明らかにすることにより、暴露評価に役立つ成果が得られる

- 肺内に吸入されたMWCNTの肺内での沈着と排泄の動態を定量的に把握できる
- 肺でのMWCNT沈着量の推移を勘案した毒性メカニズムが明らかになる

【試験ガイドラインと動物福祉】

参考とする試験ガイドライン

- OECD化学品テストガイドライン412
(亜急性吸入毒性:28日試験 2009年9月7日採択)

動物福祉

- 「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)
- 「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)
- 日本バイオアッセイ研究センター動物実験委員会による審査・承認

