

201428019A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

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

平成 26 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 広瀬 明彦

国立医薬品食品衛生研究所

平成 27 年 (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)

平成26年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 広瀬 明彦

平成27年(2015年)3月

目 次

I. 総括研究報告書	1
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	
広瀬 明彦	2
II. 研究分担報告書	16
1. ナノマテリアルの慢性影響指標の開発に関する研究	
菅野 純	17
2. 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	
津田 洋幸	36
3. 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	
小林 憲弘	41
4. カーボンナノチューブの遺伝毒性評価に関する研究	
本間 正充	57
5. 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	
最上 知子	64
6. ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究	
渡辺 渡	68
7. 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	72
8. 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	
宮澤 薫一	93
9. 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	
広瀬 明彦	99
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	109
IV. 研究成果の刊行物・別冊	113

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)

I. 総括研究報告書

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）  
総括研究報告書

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

研究代表者： 広瀬 明彦 国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室長

## 研究要旨

ナノマテリアルの曝露により懸念される健康影響について、国際的に先導されてきた研究支援のもとに有害性情報の収集が行われているが、未だ適切な健康リスク評価手法開発に資する基盤的知見が十分に集積したとは言えない。特に、新たな物理化学的特性に基づくナノマテリアルの体内残留性に伴う慢性影響や遅発毒性、さらには免疫機能や胎児への影響に関する研究は、最も懸念すべきであるにもかかわらず、それほど多くは報告されていない。本研究では、(Ⅲ)急性毒性試験等では捉えられない慢性および遅発的影響に対する評価手法確立に資する知見を取得することを目的とし、①発がん性を含む慢性影響、②免疫システムへの影響、③次世代への発達に関する影響に焦点を当てた研究体制を取っている。26年度は①慢性影響評価のための検討として、高度分散処理(Taquann法)したMWCNTによる野生型マウスにおける中皮腫の基本的な発症メカニズムはp53+/-マウスと違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。また、MWCNT気管内反復投与による体腔膜中皮組織への作用発現に対して、抗酸化ストレス作用のあるphenyl N-tert-butyl nitronの併用暴露では明確な影響を示さなかった。より小さいサイズのルチル型(15nm)とアナターゼ型(6nm)nTiO<sub>2</sub>について、in vivoの2週間経気管肺内投与実験による肺への影響とin vitro系のA549細胞に対する影響細胞毒作用を比較したが差異は認められなかった。さらに、in vivo肺小核試験の確立とサイズと毒性の関連性を詳細に検討する材料としてのC<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>二成分ナノウィスカーのキャラクタリゼーションを行った。②免疫システムに対する検討としては、MRL/lprマウスの自己免疫病変へのMWCNT腹腔内投与による影響は、腎臓、肺での炎症性病変を悪化させる傾向が示された。感染性への影響検討におけるMWNT-7曝露によるRSウイルス感染性肺炎の増悪化現象は、免疫染色やMIP-1 $\alpha$ の産生影響などから、ウイルス感染初期にMWNT-7の周囲に強い炎症誘導が生じた結果として影響の持続化に繋がったと考えられた。さらにTHP-1マクロファージを用いたin vitro解析により、MWCNTによるNLRP3活性化にはリソソーム酵素cathepsin Bの活性およびリソソーム内の酸性環境が必要であることが示された。③次世代への影響としては、MWCNTの妊娠マウス反復気管内投与による無毒性量(NOEL)は1 mg/kg/dayであり、最小毒性量(LOEL)は、本研究結果からは2 mg/kg/dayと評価できると考えられた。6種のサイズの異なるMWCNTのマウスへの腹腔内投与による胎仔への影響は、特定の長さの分布(>2 $\mu$ m、<20 $\mu$ m程度)を持つ製品で強い傾向が認められ、母体の炎症性反応が関係していると考えられた。今後は、これらのin vivoにおける知見を基にしたin vitro系での解析結果を活用しながら、トリガーとなる分子機構、毒性発現メカニズムに関する知見をさらに集積し、既存ガイドライン試験法の改良や新たなスクリーニング手法開発に向けたより技術的な取得することを目指して研究する必要があると考えられた。

## 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

津田 洋幸 名古屋市立大学大学 特任教授

小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所  
生活衛生化学部 第3室長

本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部 部長

宮澤 薫一 (独)物質・材料研究機構先端  
的共通技術部門先端材料  
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

最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所  
代謝生化学部 部長

渡辺 渡 九州保健福祉大学大学院・医  
療薬学研究科・微生物学 教  
授

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・医療創  
生科学部門・分子口腔医学講  
座・口腔分子病態学 教授

## 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

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所  
毒性部 室長

徐 結苟 名古屋市立大学大学 特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学大学  
特任教授

沼野 琢旬 名古屋市立大学 津田特任教授  
研究室研究員

William T. 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

久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所  
生活衛生化学部 主任研究官

堀端 克良 国立医薬品食品衛生研究所  
変異遺伝部 主任研究官

濱田 修一 株式会社L S Iメディエン  
ス 技術・学術顧問

高沢 博修 株式会社L S Iメディエン  
ス 主任研究員

中川 宗洋 株式会社L S Iメディエン  
ス 主任研究員

曾我 慶介 国立医薬品食品衛生研究所  
生化学部 研究員

吉田 裕樹 九州保健福祉大学薬学部  
講師

明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教  
授

山田 耕一 徳島大学大学院ヘルスバイ  
オサイエンス研究部大学院  
生

新垣理恵子 徳島大学大学院ヘルスバイ  
オサイエンス研究部助教

若原 孝次 (独)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)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)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

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 薬事環境科学部長
平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所 総合評価研究室 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

## A. 研究目的

近年、一般消費者向けにも使用されている新素材としての産業用ナノマテリアルは、期待されている物理化学特性が新たなものであるが故に、ヒト健康に未知の影響もたらす可能性が指摘されているが、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。本問題は、2004年頃から国内外共に注目が高まり、国際機関として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、加盟国によるスポンサーシッププログラムにおいて有害性情報の収集が行なわれている。現在はそれらの情報を取り纏めたドキュメントが公開される段階に来ている。一方で、欧州では既に化学物質や食品添加物の登録システム等では、規制化の方向にあり、本格的な施行の前に科学的議論の成熟が待たれるところである。他方、我々はナノマテリアルによる生体影響の研究に着手した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研究を進めてきた。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。また、一旦体内に入ったナノマテリアルは全身に再分布することや、発がんプロモーション作用を考慮に入れた毒性評価法が重要であることも指摘してきた。さらに、我々はMWCNT投与により催奇形性ポテンシャルがあることを平成23年度までの研究で明らかにした。その他、最近の知見としては、ナノマテリアルはアレルギー反応などの免疫機能を修飾するという報告も増えてきているところである。本研究では、初期的なスクリーニング評価としての(Ⅲ)急性毒性試験では捉えられない慢性および遅発的影響に焦点を当てて研究を進めている。

## B. 研究方法

H26年度は、前年度までの知見を元に、以下の慢性影響、免疫システム、次世代への影響について引き続き研究を進めた。

① 慢性影響評価のための検討：先行研究で、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）がp53+/-マウス腹腔内投与モデルにおいて用量依存的に中皮腫を誘発すること、検体の分散状況が毒性強度に大きく寄与することを示した。H26年度は、H25年度に引き続き野生型マウスにおける中皮腫誘発能の確認実験を行った（菅野）。また、WMCNTの気管内反復投与による呼吸器系及び体腔膜中皮組織における作用発現に対するphenyl N-tert-butyl nitron (PBN)の影響について病理組織学的な検討を行った。確認実験として経気管投与用に用いた試料による腹腔内投与実験も行った（広瀬）。

MWCNTを吸入曝露させ、肺における遺伝毒性誘発の有無を確認するため、ラット肺を用いる小核試験法の確立を試みた。雄性CrI:CD(SD)ラットにブレオマイシンを1または3 mg/kgの用量で1回気管内投与し、投与後72時間後に肺細胞を採取した。媒体対照として注射用水をブレオマイシンと同様に投与して肺細胞を採取した。ニトロブルーテトラゾリウム（NBT）陽性の細胞をClara細胞、NBT陰性の細胞をAT-II細胞として識別し、それぞれ2000個あたりの小核出現頻度を算出した。（本間）

また、サイズと関連性をより詳細に検討する材料として長いタイプのナノウィスカー（NW）の作成を目的に、NWの成長制御法に関する構造解析を進めている。これまでの研究で、C<sub>60</sub>ナノウィスカー（C<sub>60</sub>NW）に、C<sub>70</sub>分子を固溶させることによってC<sub>60</sub>NWの機械的強度を増大させることが可能であるが判明している。今年度は、手振り混合を用いた強制

混合液-液界面析出法によりC<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>二成分NWを合成し、C<sub>60</sub>母相中へのC<sub>70</sub>の固溶限やナノウィスカーのサイズや生成核数に及ぼす溶液体積の関数の解析を行った。（宮澤）

F344系雌ラットを用いて、経気管肺内噴霧投与方法にてAMT-100（アナターゼ型、平均一次粒子径6nm）とMT-150A（ルチル型、平均一次粒子径15nm）を2週間に8回投与（2mg/ラット）後に、8-OHdG等の生化学的解析と病理・電顕検査を行った。また、in vitro試験として無処置雌ラットの肺より得た初代Mφ（PAM）培養液（10%MEM）にAMT-100、MT-150Aを加えた培養上清のヒトA549肺細胞、CCD34間質細胞に対する作用をUVB照射（1000 mW/cm<sup>2</sup>, peak at 312 nm, 2 min）の有無による差異を検討した。（津田）

②免疫システムに対する検討： ナノマテリアルの長期暴露による全身免疫系への影響を検討するために、自己免疫疾患モデルマウスであるMRL/lprマウスにTaquann処理したMWCNTを腹腔内投与後、6ヶ月にて全身臓器を病理学的に解析した。また、腹腔滲出細胞、脾臓及びリンパ節における免疫担当細胞のMWCNT暴露による影響を検討した。特に、マクロファージの分化、活性化、機能変化について詳細に解析した。さらに、自己免疫病変、血清自己抗体に関しても免疫学的手法により検討を加えた。（石丸）

感染性免疫系への影響に関する研究に関しては、高度分散化MWNT-7（Taquannサンプル）について、respiratory syncytial virus (RSV)感染マ



ウスモデルを用いて感染病態を指標に影響評価を行った。MWNT-7 を複数回曝露（感染 5,3,1 日前）後、RSV をマウスに感染させた。感染 5,14 日後の肺組織について、病理組織標本を作製した。特に、感染 5 日後の標本は、抗 RSV 抗体を用いて免疫染色も実施した。また、感染 1 日後の肺胞洗浄液（BALF）中の MIP-1 $\alpha$  レベルを ELISA で測定した。（渡辺）

*in vitro* 試験件による検討では、ナノチューブ類による NLRP3 活性化へのリソソームの関与については、THP-1 マクロファージを cathepsin B 阻害剤あるいはリソソーム酸性化を阻害する bafilomycin A1 で 30 分前処理し、引き続き MWCNT-M, -SD1、HTCFNW-L に 6 時間曝露し、培地への IL-1 $\beta$  放出を測定し検討した。また細胞のリソソームを Lysotracker Red で蛍光染色し、フローサイトメトリーにより細胞の蛍光強度を測定し、リソソームへの MWCNT 曝露の影響を評価した。（最上）

③次世代への影響： ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、昨年度実施したマウス反復気管内投与試験と同様の試験プロトコルで、より高用量（4 mg/kg/day）の試験を行うことで、過去に実施した単回気管内投与試験と同様に胎児の奇形がみられるかどうかを検証した。また、対照群として、4 mg/kg の単回投与群を設定し、過去に実施した単回気管内投与（3~5 mg/kg）と比べて再現性のある結果が得られるかどうかについても併せて検証した。（小林）

また、6 種のサイズの異なる多層カーボンナノチューブのマウスへの腹腔内投与による死胚の誘発性を比較することで、胎仔への影響を検討した。用いた多層カ

ーボンナノチューブは、W 社製の WS および WL の 2 品、M 社製の M、N 社製の N、S 社製の SD-1、T 社製の T を用いた。投与直前と投与 2 時間後の直腸体温の変化を測定すると共に、投与 2 時間後に、採血を行い、血球検査とインターロイキン-6（IL-6）および単球走化性因子（MCP-1）を測定した。（広瀬）

<倫理面への配慮>

実験動物を用いる実験では、「動物の愛護及び管理に関する法律」等の精神に則り、該当研究所でそれぞれ定められている実験動物取り扱いに関する倫理規定等の規則に準拠した対応がとられている。

### C. 研究結果

①慢性影響評価のための検討： 独自の方法で高度に分散性を高めた MWCNT（T-CNT） 10  $\mu$ g/動物の単回腹腔内投与により、中皮腫が誘発されることを確認した。陽性対照の Crocidolite 30  $\mu$ g/動物に、同一期間中に中皮腫の誘発は認められなかった。肝では、漿膜が線維化し肥厚している像が観察された。この変化は、Crocidolite 及び p53 $\pm$ マウスには認められない病変であった。

経気管投与用に用いた試料による腹腔内投与実験では、中皮腫の発現が 0.25mg/kg で 4/20 (P<0.05, vs 対照群)、PBN 併用群で 3/20 に認められ、MWCNT の中皮腫誘発性に対する PBN の作用は明らかでなかった。経気管投与実験では、投与期間及び投与後飼育期間を通して、途中死亡・瀕死例の発現、臨床症状または体重増加経過に MWCNT 投与に関連した異常は認められなかったが、組織学

的に、MWCNT の各投与群及び PBN 併用群で心嚢膜、胸膜（臓側及び横隔膜胸腔面）、腹膜に単発的に中皮腫や中皮細胞肥大・過形成が認められた。さらに投与に関連して細気管支-肺泡領域及び肺泡領域で過形成が有意に認められたが、壁側胸膜や肺実質における腫瘍の発現は認められなかった。しかし、PBN 併用は、MWCNT 投与によるこれらの病変の発現に明らかな影響を示さなかった。

ラット肺を用いる小核試験法の確立において、初回実験では、ブレオマイシンの 1 mg/kg 投与群で小核をもつ AT-II 細胞及び Clara 細胞の有意な増加がみられたが、個体ごとの小核誘発率には個体差が見られた。2 回目実験ではブレオマイシンの 3 mg/kg 投与群で、小核をもつ AT-II 細胞及び Clara 細胞の有意な増加がみられ、いずれの個体でも明らかな高値を示した。以上の結果から、本試験条件下においてブレオマイシンの 1 mg/kg の投与用量では反応性に個体差が生じたが、3 mg/kg を投与することによって、いずれの個体でも明らかな陽性反応が得られた。

C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub> の二成分ナノウィスカー（C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>NW）の合成検討において、手振り混合を用いた強制混合液-液界面析出法により C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub> 二成分 NW を合成し、C<sub>60</sub> 母相中への C<sub>70</sub> の固溶限として 12.4 mass% を求めた。また、C<sub>60</sub>NW と細胞との相互作用を研究するのに適した長さの C<sub>60</sub>NW の合成を強制混合液-液界面析出法によって行い、C<sub>60</sub>NW の長さと同径が溶液体積の関数となることを発見した。さらに、C<sub>60</sub>NW の生成核数が溶液体積の平方根に逆比例して変化することを見出

した。

AMT-100 および MT-150A の 14 日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索：剖検時の所見では両投与群の肺には肉眼的差異はなかった。病理組織学的検査中である。両者の *in vitro* 毒性比較ではルチル型アナターゼ型の間に差異は無かった。

②免疫システムに対する検討：MRL/lpr マウスへの MWCNT の腹腔内投与により持続的な腹膜炎が観察され、肝臓の被膜での線維化が認められた。加えて、MWCNT の腹腔内投与によって PEC でのマクロファージは M1 への分化が確認され、ケモカイン、サイトカインの産生は MWCNT の腹腔内投与により亢進していた。また、MRL/lpr マウスの腎臓、肺の自己免疫病変は MWCNT 暴露で、増悪することが判明した。一方、リウマチ因子は MWCNT 暴露後 3 ヶ月で有意に上昇していた。さらに、MWCNT の腹腔内投与により脾臓において CD4T 細胞、B 細胞数に影響があった。

感染性免疫系への検討に関しては、感染 5 日後の肺病理組織像で、RS ウイルス肺炎の増悪化が用量に依存して認められた。抗 RSV 抗体を利用した免疫染色法により、MWNT-7 の周囲ではウイルス抗原の発現が少ないことが判明した。さらに MWNT-7 曝露マウスでは、感染 1 日後の肺泡洗浄液中の MIP-1 $\alpha$  レベルの低下が顕著であった。一方、感染 14 日後の回復期における比較検討では、非曝露群では炎症が終息しているのに対して、曝露群では MWNT-7 の凝集塊とリンパ球の浸潤が見られた。

*in vitro* 試験系による MWCNT-M、

-SD2 ならび HTCFNW-L が誘導する THP-1 マクロファージからの IL-1 $\beta$  産生は、リソソーム酵素 cathepsin B を阻害するとほぼ完全に阻害された。また、リソソーム内の酸性環境維持を妨害する bafilomycin A1 処理により、MWCNT-M による IL-1 $\beta$  産生は約 60% 低下し、cathepsin B の活性が必要であることが示された。また、細胞のリソソームを Lysotracker で蛍光染色し、フローサイトメトリー分析を行うと、MWCNT 曝露により蛍光強度の減少が認められ、リソソームの減少が示唆された。

③次世代への影響： ナノマテリアルの催奇形性に関する検討において、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) では、統計学的に有意な母動物への影響 (体重増加抑制) と胎児への影響 (胎児体重および胎盤重量の低下) がみられた。これらはいずれも被験物質投与による胎児の発育抑制によるものと考えられた。胎児の奇形については、外表検査の結果のみからは統計学的有意な差はみられず、被験物質投与による催奇形性は明確ではなかったが、生殖・発生毒性として総合的なエンドポイントで考えると、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) は発現する用量であると評価できる。なお、昨年度に実施したマウス反復気管内投与試験においても、2 mg/kg/day 群で母動物の体重増加抑制と胎児体重の低値がみられた。

6 種類の MWCNT を母動物に腹腔内投与した実験で、各群とも、卵巣の黄体数および総着床数は変化がなかったが、N および M 群 (2 $\mu$ m を越えて、20 $\mu$ m 程度までの長さ) で、早期死胚数が有意に増

加し、結果として生存胎仔数が有意に減少していた。同様の傾向は、N および M と同様の長さを持つ WL および SD-1 群で見られたが、有意差は認められなかった。後期死胚におよび生存胎仔の平均重量にはどの群にも変化は見られなかった。一方、母動物については、投与後 2 時間の直腸体温が、WL、N、M、および SD-1 投与群で有意に低下した。母体血中の IL-6 および MCP-1 濃度は、N および M 群で有意に上昇していた。次いで WL および SD-1 群、また WS および T 群の順に上昇する傾向が見られたが、有意差はなかった。

#### D. 考察

高度に分散処理 (Taquann 法) した T-CNT (10 $\mu$ g/animal) を p53 $^{+/-}$ マウスに単回腹腔内に投与することにより、単離 MWCNT 繊維が重量当たりで、分散処理する前の 20 倍濃縮されていることを示唆した。25 年度から、同じ用量の Taquann 処理 MWCNT を野生型にマウスに投与することでも、中皮腫の発生を確認し、26 年度の解析では、中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53 $^{+/-}$ マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。本研究で投与した繊維数は、T-CNT は約  $3 \times 10^7$  本/動物、Crocitolite は約  $9 \times 10^7$  本/動物であり、Crocitolite が約 3 倍多いことから、重量においても、繊維数においても MWCNT は Crocitolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられた。繊維の長さとその分布、表面活性の違いなど、中皮腫誘発能の差の原因については更なる検討が必要である。

ラット中皮腫発現には、繊維を貪食した大食細胞による炎症反応と酸化ストレスの関与が提唱されている。PBNは活性酸素捕捉などにより、酸化ストレスによる毒性・発がん性を抑制する事が知られている。今回、経気管反復投与により摂取された多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器系及び体腔膜中皮組織における作用発現に対して、PBNの併用は、発現頻度や程度に明らかな影響を示さなかったことより、繊維サイズが長いCNTによる発がんメカニズムには、酸化ストレスやそれによるシグナル異常と異なる要因が関与する可能性が示唆された。

本年度の検討によりラットを用いる気管内投与による肺小核試験の基礎的な手技を確立できた。これにより肺小核試験によるナノ物質の遺伝毒性評価への応用が期待できる。また、本試験条件下で陽性対照物質としてブレオマイシンを使用する場合は、3 mg/kgの投与用量を設定するのが妥当と考えられた。

C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>の二成分ナノウィスカー(C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>NW)の合成検討において、固溶限が求められたことにより、C<sub>60</sub>NWのヤング率はC<sub>70</sub>の添加量を変えることによって連続的に変化させることが可能である。これはFNWのヤング率が、C<sub>70</sub>の添加によって分子間結合力に基づく領域から金属結合並に高い値まで変化することを意味しており、C<sub>70</sub>の添加によりフラーレン分子が部分的にポリマー化することを示唆した。さらに、C<sub>60</sub>NWの生成核数が溶液体積の平方根に逆比例して変化することは、フラーレン結晶核の発生が、C<sub>60</sub>良溶媒飽和溶液とC<sub>60</sub>貧溶媒間に

形成される液-液界面での不均一核発生によって支配されていることを示した。

14日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索および、*in vitro*発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索において、直径20nmのルチル型酸化チタンruTiO<sub>2</sub>(無コーティング)についてMφの分泌するCCL3を介するが発がん促進作用を見出している。今回光触媒活性がより顕著と想定されるより小さいサイズのルチル型とアナターゼ型nTiO<sub>2</sub>についてその作用の強さを比較したが差異は確認できず、2週投与実験では生体内ではUV励起がによる差異はなさそうである。肺がんA549細胞に対する毒作用もアナターゼとルチル型に差異はなはなかったが、*in vitro*での紫外線の照射は細胞に対する直接に作用があるので、*viability*の良い培養液で確認する必要がある。

免疫系への影響の検討では、腹腔内投与により腹膜、腹腔内臓器の被膜での炎症反応が持続し、慢性腹膜炎の状態であった。高濃度のMWCNT投与群では肝被膜での線維化、胆嚢上皮の過形成などの病理所見が観察された。腹腔滲出細胞の解析では、MWCNT投与の影響が、サイトカイン、ケモカイン産生亢進、M2マクロファージ分化促進に関与していた。MRL/lprマウスの自己免疫病変へのMWCNT投与による影響は、肝臓では変化がなかったが、腎臓、肺での炎症性病変を悪化させる傾向にあった。自己免疫病態へのMWCNTの長期暴露がどの時点で影響しているのかはまだ不明な点が多く、今後更なる検討が必要と考える。

感染性への影響検討におけるMWNT-7曝露の肺炎の増悪化現象は、感

染 14 日後の回復期においても確認され、このマテリアルの影響が一過性でないことが判明した。免疫染色や MIP-1 $\alpha$  の産生影響などから、ウイルス感染初期に MWNT-7 の周囲に強い炎症誘導が生じ、結果として影響の持続化に繋がったと考えられる。今後、抗 MIP-1 $\alpha$  抗体等により免疫染色を行い、ケモカイン産生細胞の局在化を検討していきたい。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が明らかにできると考えている。

昨年度の THP-1 マクロファージを用いた *in vitro* 試験検討結果において、MWCNT や HTC FNW はマクロファージに曝露すると、針状の形状と長さに応じ、NLRP3 を介して炎症性サイトカイン IL-18 を産生することを明らかにした。今年度は NLRP3 活性化に至るメカニズムを解析し、リソソーム酵素 cathepsin B の活性ならびに活性化に必要なリソソーム内の酸性環境が必要であること、MWCNT 曝露によりリソソームが減少することを明らかにした。MWCNT 類が NLRP3 を活性化する過程には、リソソーム破壊ならびにリソソーム酵素が重要な役割を持つことが示されたことから、ナノマテリアルの形状とリソソーム破壊の関係を明らかにすることが、炎症の慢性化遷延化の予測につながると考えられる。

催奇形性に関する検討において、MWCNT の単回気管内投与試験では、MWCNT の妊娠マウス反復気管内投与による無毒性量 (NOAEL) は 1 mg/kg/day であり、最小毒性量 (LOAEL) は、本研究結果からは 2 mg/kg/day と評価できる。2 mg/kg/day あるいはそれ以

上の用量において、外表検査までの結果からは MWCNT の明らかな催奇形性は認められなかったが、母動物の体重増加抑制と胎児の体重の低下がみられており、これらはいずれも毒性学的に意義のある変化と言える。なお、現時点では胎児の内臓および骨格検査を行っていないが、本研究において母動物および胎児への毒性がみられなかった 1 mg/kg/day 以下の用量においても、内臓あるいは骨格異常が発生している可能性が否定できないため、今後はこれらの検査を実施し、MWCNT の生殖・発生毒性に関するより詳細な評価を行う必要があると考えられる。

6 種のサイズの異なる MWCNT のマウスへの腹腔内投与による死胚の誘発性を比較することで、胎仔への影響を検討した結果、多層カーボンナノチューブの胎仔への影響は、ある程度の長さ (2 $\mu$ m を越えて、20 $\mu$ m 程度までの長さ) の製品に偏って見られ、その強さは、母体の炎症性変化 (白血球数、特に好中球数の増加、脾臓の腫大、IL-6 および MCP-1 の上昇) や投与後 2 時間のショック様状態 (体温低下や活動性低下) と関連していると考えられた。

今後は、これらの *in vivo* における知見を基に *in vitro* 系への展開も活用しながら、曝露・観察期間の及ぼす影響も考慮しつつ、分子生物学的解析技術を用いた病理解析やトリガーとなる分子機構などの毒性発現メカニズムに関する知見をさらに集積し、既存ガイドライン試験法の改良や新たなスクリーニング手法開発に向けたより技術的な基盤情報を取得するこ

とを目指して研究する必要があると考えられた。

## E. 結論

26年度は①慢性影響評価のための検討として、高度分散処理 (Taquann 法) した MWCNT による野生型マウスにおける中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53<sup>+/+</sup>マウスと違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。また、WMCNT 気管内反復投与による体腔膜中皮組織への作用発現に対して、抗酸化ストレス作用のある phenyl N-tert-butyl nitron の併用暴露では明確な影響を示さなかった。より小さいサイズのルチル型 (15nm) とアナターゼ型 (6nm) nTiO<sub>2</sub> について、in vivo の 2 週間経気管肺内投与実験による肺への影響と in vitro 系の A549 細胞に対する影響細胞毒作用を比較したが差異は認められなかった。さらに、in vivo 肺小核試験の確立とサイズと毒性の関連性を詳細に検討する材料としての C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub> 二成分ナノウィスカーのキャラクタリゼーションを行った。②免疫システムに対する検討としては、MRL/lpr マウスの自己免疫病変への MWCNT 腹腔内投与による影響は、腎臓、肺での炎症性病変を悪化させる傾向が示された。感染性への影響検討における MWNT-7 曝露による RS ウイルス感染性肺炎の増悪化現象は、免疫染色や MIP-1 $\alpha$  の産生影響などから、ウイルス感染初期に MWNT-7 の周囲に強い炎症誘導が生じた結果として影響の持続化に繋がったと考えられた。さらに THP-1 マクロファージを用いた in vitro 解析により、MWCNT による NLRP3 活

性化にはリソソーム酵素 cathepsin B の活性およびリソソーム内の酸性環境が必要であることが示された。③次世代への影響としては、MWCNT の妊娠マウス反復気管内投与による無毒性量 (NOAEL) は 1 mg/kg/day であり、最小毒性量 (LOAEL) は、本研究結果からは 2 mg/kg/day と評価できると考えられた。6 種のサイズの異なる MWCNT のマウスへの腹腔内投与による胎仔への影響は、特定の長さの分布 (>2 $\mu$ m、<20 $\mu$ m 程度) を持つ製品で強い傾向が認められ、母体の炎症性反応が関係していると考えられた。今後は、これらの知見を基にして、毒性発現メカニズムに関する知見をさらに集積し、既存ガイドライン試験法の改良等に向けたより技術的な取得することを目指して研究する必要があると考えられた。

## F. 健康危機情報

該当無し

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

- Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Sci.* 105:763-9. (2014)
- Cui H, Wu W, Okuhira K, Miyazawa K, Hattori T, Sai K, Naito M, Suzuki K, Nishimura T, Sakamoto Y, Ogata A, Maeno T, Inomata A, Nakae D,

- Hirose A, Nishimaki-Mogami T. High-temperature calcined fullerene nanowhiskers as well as long needle-like multi-wall carbon nanotubes have abilities to induce NLRP3-mediated IL-1beta secretion. *Biochem Biophys Res Commun*, 452 : 593-599. (2014)
- Fujitani T, Hojo M, Inomata A, Ogata A, Hirose A, Nishimura T, Nakae D. Teratogenicity of asbestos in mice. *J Toxicol Sci.* 39: 363-370. (2014)
- Grosse Y1, Loomis D1, Guyton KZ1, Lauby-Secretan B1, El Ghissassi F1, Bouvard V1, Benbrahim-Tallaa L1, Guha N1, Scoccianti C1, Mattock H1, Straif K1;International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group.Kane AB, Debia M, Dion C, Møller P, Savolainen K, Canu IG, Jaurand MC, Comba P, Fubini B, Kobayashi N, Morimoto Y, Tsuda H, Yu IJ, Vermeulen R, Bugge MD, Bateson TF, Kuempel ED, Morgan DL, Pinkerton KE, Sargent LM, Stayner L. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* ;15:1427-1428, 2014.
- Hashiguchi, S., Yoshida, H., Akashi, T., Komemoto, K., Ueda, T., Ikarashi, Y., Miyauchi, A., Konno, K., Yamanaka, S., Hirose, A., Kurokawa, M., Watanabe, W. Titanium dioxide nanoparticles exacerbate pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected mice. *Environ. Toxicol. Pharmacol.* (2015) 39, 879-886.
- Doi:10.1016/j.etap.2015.02.017
- T. Konno, T. Wakahara and K. Miyazawa, "Synthesis and structural analysis of C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub> two-component fullerene nanowhiskers", *J. Cryst. Growth* **416** (2015) 41-46.
- K. Miyazawa, C. Hirata and T. Wakahara, "Influence of the solution volume on the growth of C<sub>60</sub> nanowhiskers", *J. Cryst. Growth* **405**(2014)68-72.
- K. Miyazawa, "Synthesis of fullerene nanowhiskers using the liquid-liquid interfacial precipitation method and their mechanical, electrical and superconducting properties", *Sci. Technol. Adv. Mater.* **16** (2015) 013502 .
- 宮澤薫一, "液-液界面析出法(LLIP法)によるフラーレンのナノウィスカー・ナノチューブ・ナノシートの合成", *Journal of the Society of Inorganic Materials, Japan* **22**(2015) 92-98.
2. 学会発表
- 菅野 純、高橋 祐次、森田 紘一、辻 昌貴、高木 篤也、小川 幸男、広瀬明彦、ナノマテリアルの有害性評価・特に慢性毒性について、フォーラム 2014 : 衛生薬学・環境トキシコロジー、2014年9月、つくば
- 坂本義光、小縣昭夫、北条 幹、山本行男、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41回日本毒性学会学術年会 2014年7月、神戸

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<sup>+/</sup>-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, “Taquann” Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015.3.25) San Diego, USA, poster

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、広瀬明彦、Toxicological considerations for particulate matter as foreignbody carcinogen. 第 73 回日本癌学会学術総会(2014.9.26) 横浜、シンポジウム

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Nanotoxicology - its chronic aspects: Taquann-Direct Injection whole body inhalation system. 国際材料研究学会連合・アジア国際会議 2014 (IUMRS-ICA2014) (2014.8.25)福岡、シンポジウム

菅野 純、評価と管理の分界に関する考察、平成 26 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム(2014. 5.24)東京

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. 7th International Nanotoxicology Congress (2014.4.24) Antalya, Turkey, invited

酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸 (2014) カーボンナノチューブの中皮腫瘍がんプロファイル; 第 41 回日本毒性学会学術年会 神戸7月2日—4日

Suzui M., Sato K., Isoda Y., Numano T., Futakuchi M., Fukamachi K., Xu J., Tsuda H., (2014) Carcinogenic profile of carbon nanotubes on the rat lung 第73回日本癌学会総会 横浜 9月25-27日

酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第 31 回日本毒性病理学会総会 東京 1月29日-30日

津田洋幸、徐結旬、Alexander D.B.,酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチューブの発がん標的性組織; 第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日。

小林憲弘, 田中亮太, 竹原広, 納屋聖人, 久保田領志, 五十嵐良明, 広瀬明彦: マウス反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの催奇形性の評価. 第41回日本毒性学会学術年会 (2014.7.2 兵庫県神戸市).

Norihiro Kobayashi, Reiji Kubota, Ryota Tanaka, Hiroshi Takehara, Masato Naya, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Evaluation of teratogenicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th Annual Meeting of the Society



- of Toxicology (SOT 2015) (2015.3.26 San Diego, CA, USA).
- M. Honma: Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines, 2014 National Workshop on Non-clinical Safety Evaluation and Quality Management 2014年11月 上海・中国
- 米本敬司、橋口誠子、吉田裕樹、上田智之、明石敏、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のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜、ポスター P2-022
- 上田智之、橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、米本敬司、紺野克彦、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子曝露のRSウイルス肺炎への影響、第62回日本ウイルス学会学術集会、2014.11.11, 横浜、ポスターP2-023
- 橋口誠子、吉田裕樹、明石 敏、広瀬明彦、黒川昌彦、渡辺 渡 二酸化チタンナノ粒子の曝露はRSウイルス感染病態を悪化させる 日本薬学会第135年会、2015.3.27, 神戸、口頭 27D-pm18
- Seiko Hashiguchi, Hiroki Yoshida, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe, Effects of titanium dioxide nanoparticles on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. EUROTOX2014 (2014.9, Edinburgh)
- 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 京都
- D. Matsuura, T. Konno, T. Wakahara, K. Miyazawa, T. Kizuka, "Young's modulus of C<sub>60</sub>/C<sub>70</sub> alloy nanowhiskers", 2014 Tsukuba Nanotechnology Symposium (TNS'14) , July 25-26, 2014, University of Tsukuba, Tsukuba, Japan.
- 宮澤薫一, 平田千佳, 若原孝次, "C<sub>60</sub> ナノウイスカーの成長に及ぼす溶液体積の影響", 日本物理学会講演概要集 69[2]第 4 分冊, 2014 年 9 月 7-10 日, 中部大学, pp.621-621.
- K. Miyazawa, C. Hirata and T. Wakahara, "Controlled growth of C<sub>60</sub> fullerene nanowhiskers", 3rd MOVE Symposium, University of the Philippines Baguio, October 22-24, 2014, Philippines.
- K. Miyazawa, "Growth of fullerene nanowhiskers by LLIP method", Program & Abstract, pp.73-73, Collaborative Conference on Crystal Growth 3CG 2014, November 4-7, 2014, Phuket, Thailand.
- K. Miyazawa, C. Hirata, T. Wakahara, "Controlled growth of C<sub>60</sub> fullerene nanowhiskers", Abstracts of Fifteenth International Symposium on Biomimetic Materials Processing (BMMP-15), Nagoya University, Nagoya, 2015 年 1 月 23 日～ 26 日, P.23.
- 宮澤薫一, "強制混合 LLIP 法におけるフラーレンナノウイスカー結晶核の生成に関する考察", 日本物理学会講演概要集第 70 巻第 1 号 (第 70 回年次大会) , 早稲田大学, 2015 年 3 月 21 日～24 日, P.1896.
- 今野俊生, 若原孝次, 宮澤薫一, "C<sub>60</sub>-C<sub>70</sub>2 成分ナノウイスカーの合成と構造解析 (3)", 日本物理学会講演概要集第 70 巻第 1 号 (第 70 回年次大会) , 早稲田大学早稲田キャンパス, 2015 年 3 月 21 日～24 日, P.1895.
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)**
1. 特許取得 (出願中) (該当なし)
  2. 実用新案登録 (該当なし)
  3. その他 (該当なし)

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)

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）  
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 室長

### 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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /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  $\mu\text{g}$ /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 から H26 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  $\mu\text{g}$ /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