

たに改良を加えた NCT-16 培養液を用いて再度確認する必要があると考えられる。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 の評価は容易ではないことが示された。

E. 結論

アナターゼ二酸化チタニウム

(a10nTiO₂)を雌 SD ラットに2週投与した実験ではルチル型(r15nTiO₂)との比較において、肺組織における CCL3 の蛋白発現の差異はなさそうである。In vitro おける紫外線(UVB)照射下においてもアナターゼ型とルチル型の細胞毒性に明らかな差異はないと考えられる。これらの結果より、少なくとも強い光の当たらない条件下では生物・細胞毒性、細胞増殖作用は anTiO₂ はる TiO₂ より著明と言う所見は粒径の差異に関わらず見られないと考えられる。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Ohba T., Sagawa E., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Tsuda H., and Imaizumi Y. Enhancement of Ca²⁺ Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K⁺ Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells. J Pharmacol Exp Ther 347:145-153, 2013.
2. Xu J., Futakuchi M., Alexander D.B., Fukamachi K., Numano T., Suzui M., Shimizu H., Omori T., Kanno J., Hirose A., Tsuda H. : Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible

epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. Arch Toxicol., 88: 65-75, 2014

3. Numano T., Xu J., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander D.B., Shimizu H., Furukawa F., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Suzui M., : Comparative study of the toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro, Asian Pacific J Cancet Prev, 15(2): 929-935, 2014
4. Benbrahim-Tallaa L, Lauby-Secretan B, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Rusyn II, Fritschi L, Sergi CM, Hansen J, Le Curieux F, Bolt HM, Fukushima S, Ichihara G, Kamae K, Kumagai S, Tsuda H, Kjaerheim K, Bartell SM, Cesta MF, Chiu W, Cooper G, DeWitt JC, Friesen M, Lash LH, Steenland K, Cherrie JW. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone. Lancet Oncol. 15(9):924-5, 2014.
5. 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.

6. Xu J., Alexander DB., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Hirose A., Kanno J., Nakae D., and Tsuda H Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.*, in press, 2015.

2. 学会発表

1. 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発がんプロファイル;第41回日本毒性学会学術年会 神戸7月2日-4日
2. 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
3. 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
4. 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

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.

H. 知的財産所有権の出願・登録状況(予定も含む)

1. 特許取得
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」
分担研究報告書

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

研究分担者：小林 憲弘 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室
室長

研究協力者：久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 第三室
主任研究官

研究要旨

ナノマテリアル曝露によるヒトへの毒性を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性だけでなく、次世代への影響、すなわち生殖・発生毒性に関するデータも非常に重要である。本研究課題では、ナノマテリアル曝露によって生殖・発生毒性が発現する作用機序と、体内動態に関する知見を得ることを目的に、MWCNT を対象とした催奇形性試験を行ってきており、今年度は、昨年度実施した反復気管内投与試験よりも高用量（4 mg/kg/day）の MWCNT を妊

娠マウスに反復気管内投与することで、催奇形性を中心とした生殖・発生毒性の評価を行った。

その結果、4 mg/kg/day（反復投与）および4 mg/kg（単回投与）において、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。

以上のことから、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。

A. 研究目的

ナノマテリアル曝露によるヒトへの毒性を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性だけでなく、次世代への影響、すなわち生殖・発生毒性に関するデータも非常に重要である。

近年、ナノマテリアルの曝露による生殖・発生毒性に関する研究報告例がみられるようになった。例えば、二酸化チタン (TiO₂) ナノ粒子については、妊娠マウスへの皮下投与により、曝露後に胎児に移行して発達・機能障害を引き起こしたとの報告がある(Takeda et al., 2009; Shimizu et al., 2009)。また、カーボンナノチューブについては、単

層カーボンナノチューブ (SWCNT)、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の妊娠マウスへの腹腔内・気管内投与により胎児の奇形がみられたとの報告 (Pietroiusti et al., 2011; Fujitani et al., 2012)や、SWCNT のマウス単回経口投与により、吸収胚の有意な増加および胎仔の骨格異常がみられたとの報告(Philbrook et al., 2011)がある。一方、MWCNT を妊娠ラットに反復経口投与しても生殖・発生毒性はみられなかったとの報告もある(Lim et al., 2011)。

しかし、これらの試験結果をヒトに外挿し、ヒト健康リスク評価を行うだけの十分なデータは得られておらず、

既存の毒性試験データから無毒性量 (NOAEL) あるいは最小毒性量 (LOAEL) を求めることはできない。

そこで本研究課題では、ナノマテリアル曝露によって生殖・発生毒性が発現する作用機序と、体内動態に関する知見を得ることを目的に、MWCNT を対象とした催奇形性試験を行ってきた。

これまでに得られた知見としては、妊娠ラットおよびマウスを用いた単回尾静脈内投与試験によって、投与可能な最大量の MWCNT を妊娠 7~10 日の母動物に単回尾静脈内投与しても、胎児の奇形はみられないことが分かった。

また、妊娠マウスを用いた単回気管内投与試験によって、血清、CMC-Na のどちらを MWCNT 懸濁液の媒体に用いた場合でも、妊娠 9 日の ICR マウスに 3~5 mg/kg の用量で単回気管内投与すると、生存胎児体重および胎盤重量の減少と、胎児の奇形 (外表および骨格異常) を引き起こすことが示唆された。なお、奇形がみられた胎児の胎盤への MWCNT の移行は確認されなかった。

さらに、妊娠 9 日以外に MWCNT を曝露した場合においても、発生毒性が発現するかどうかを確認するため、器官形成期 (妊娠 6~17 日) を通じたマウス反復気管内投与試験 (図 1) を実施したところ、2 mg/kg/day までの投与量では胎児の奇形はみられなかったが、2 mg/kg/day 群で雌雄の胎児重量が低値を示し、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。

上記の反復気管内投与試験では、最大で合計 (8 mg/kg) の MWCNT を気管内投与しており、これは単回気管内投与試験で胎児の奇形がみられた最小投与量 (3 mg/kg) よりも 2 倍以上多い。それにも関わらず、胎児の奇形がみられなかった原因として、1 回に投与する MWCNT の用量の差が考えられる。すなわち、反復気管内投与試験では、合計で最大 8 mg/kg/day の MWCNT を投与しているが、1 回の投与量は最大で 2 mg/kg/day であり、これは単回気管内投与で影響がみられた 3 mg/kg/day よりも 1 回あたりの用量は低い。繰り返し少量の MWCNT を投与し、結果として大量に体内に蓄積するよりも、一度に大量の MWCNT を投与する方が、投与に伴う肺の炎症反応が大きく、それに起因して胎児の奇形が引き起こされることが考えられる。

今年度は、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。

B. 研究方法

1. 被験物質懸濁液の調製

本研究では、実験動物に投与する MWCNT として、MWNT-7 (三井物産、現在は保土谷工業から提供) を用いた。MWNT-7 の概要を以下に示す。

サイズ：50–100 μm の凝集体

炭素含量：99.8 % (蛍光 X 線分析)

G/D 比：11 (ラマン分光法)

BET 比表面積：36.7 m^2/g (N_2 ガス吸着法)

昨年度までの検討によって、MWNT-7 はマウス・ラット血清および 1~2% CMC-Na PBS 溶液中によく分散することと、これらの媒体を用いた試験間で、胎児への影響に有意な差がみられなかったことから、今回は、生体由来試料ではないため用時調製を必要としない CMC-Na(1%) PBS 溶液を用いて MWCNT 懸濁液を調製した(図 2)。

2. マウス反復および単回気管内投与試験

マウス反復および単回気管内投与試験のプロトコルを図 3 に示す。反復投与群は、1% CMC-Na PBS 溶液を用いて分散させた MWCNT 懸濁液を 0 および 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日にイソフルラン麻酔下で気管内投与した。単回投与群は、同様の MWCNT 懸濁液を 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 9 日のみに反復投与と同様にイソフルラン麻酔下で気管内投与した。

3. 母動物の観察

反復および単回気管内投与試験の各投与群ともに、解剖日まで 1 日 1 回、一般状態の観察および体重測定を行った。また、妊娠 0, 3, 6, 9, 12, 15 および 17 日に給餌器を含めた餌重量を測定し、測定日間の餌重量の差から、平均 1 日摂餌量を算出した。

妊娠 17 日にイソフルラン麻酔下で腹大動脈切断により放血安楽死させた後、病理学的検査として、器官・組織の肉眼的観察(剖検)を行った。剖検では、動物の体表、自然開孔部等を観察し、腹腔、胸腔、骨盤腔および頭蓋腔内の器官・組織をはじめとする全身諸器官・組織を検査した。すべての肉眼的異常について、部位、大きさ、色調等を記録した。

また、全生存例について、肺および子宮重量(子宮内容物を含む)を測定し、解剖日の体重を基に相対重量を算出した。

妊娠 17 日に、全生存例について子宮内検査を行った。

卵巣および子宮内を検査し、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数および死亡胚・胎児数(早期死亡胚：脱落膜腫、後期死亡胚：胎盤および羊膜形成のある形態不明瞭な死亡胚、死亡胎児：浸軟胎児も含む)を記録し、着床率、胎児生存率および死亡胚・胎児率を算出した。生存胎児の胎盤については、異常の有無を肉眼的に観察した後、重量を測定し、母動物ごとの雌雄別平均胎盤重量を算出した。測定後の胎盤は、10 vol% 中性緩衝ホルマリン液で固定し、保管した。

4. 胎児の観察

妊娠 17 日の帝王切開で得られた生存胎児全例について、母動物ごとに性比を算出した。また、個体別に体重を測定し、母動物ごとの雌雄別平均胎児重量を算出した。また、全例について外表検査を行い、母動物ごとに外表異常発生率を算出した。

なお、安楽死後の胎児は、内蔵および骨格検査が可能のように、各固定液で固定した。各群の検査動物数（親）は 11～16 匹とした。

5. 統計解析

並行実施した当該被験物質の反復気管内投与試験の対照群データを用いて統計解析を行った。

体重、体重増加量、摂餌量、器官重量（絶対および相対重量）、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数（着床痕数）、胎児体重ならびに胎盤重量については、最初に等分散性の検定（F 検定）を 5%の両側有意水準で実施した。ここで等分散（非有意）の場合には Student の t 検定を行い、不等分散（有意）の場合には Aspin-Welch の t 検定を行った。いずれも対照群と投与群間の有意性を、両側 5%および 1%の有意水準で判定した。

着床率、胎児生存率、死亡胚・胎児率、性比および外表異常発生率については、Wilcoxon 検定を行い、対照群と投与群間の有意性を、両側 5%および 1%の有意水準で判定した。

一般状態所見および剖検所見については、有意差検定を行わなかった。

なお、単回気管内投与試験において

は、併行実施した反復気管内投与試験の対照群データを用いて統計解析を行った。

C. 研究結果

1 母動物の検査結果

1.1 一般状態

対照群では、妊娠 12 日の投与後に 1 例が死亡したが、他の生存動物では異常所見は認められなかった。

反復投与群では、妊娠 12 日の投与後に、1 例が死亡した。生存動物については、投与群の 2 例で妊娠 9 または 12 日の投与後に呼吸不整が認められた。

単回投与群では、妊娠 9 日の投与後に 1 例が死亡した。生存動物については、妊娠期間を通じて、一般状態に変化は認められなかった。

1.2 体重

母動物の体重推移を表 1 に示す。

反復投与群では、初回の投与翌日の妊娠 7 日から解剖日の妊娠 17 日までの体重が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

単回投与群では、投与翌日の妊娠 10 日から解剖日の妊娠 17 日までの体重が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

1.3 摂餌量

反復投与群では、妊娠 6～17 日の平均 1 日摂餌量が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

単回投与群では、妊娠 9～12 日の平

均 1 日摂餌量が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

1.4 剖検所見

反復投与群の死亡動物では、4 mg/kg/day 群で肺の赤色化または気管内の泡沫状白色内容物が、対照群で肺の赤色斑点が認められた。生存動物では、4 mg/kg/day 群で肺の黒色化または黒色斑点ならびに卵巣の嚢胞がそれぞれ 11, 5 および 2 例、対照群で肝臓の白色斑点または腎臓の嚢胞がそれぞれ 4 および 1 例に認められた。

単回投与群の死亡動物では、脾臓の腫大、肺の黒色斑点および肝臓の淡色化が認められた。生存動物では、肺の黒色化または黒色斑点ならびに腎臓の嚢胞がそれぞれ 10, 6 および 1 例に認められた。

1.5 器官重量

剖検日の肺重量および妊娠子宮重量を表 2 に示す。

反復投与と単回投与群のいずれについても、肺重量および妊娠子宮重量の絶対値と相対値が、対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。

2 胎児の検査結果

2.1 帝王切開

帝王切開成績を表 3 に示す。

反復投与群では、生存胎児数および雌雄の胎盤重量が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。また、死亡胚・胎児率が高値傾向を示した。胎盤観察では、癒着胎盤が対照群および 4 mg/kg/day 群で各 1 例に認められ

た。

単回投与群では、雌雄の胎盤重量が対照群と比べて統計学的に有意な低値を示し、死亡胚・胎児率が高値傾向を示した。また、胎盤観察では、癒着胎盤が 2 例に認められた。

妊娠黄体数、着床数、着床率および胎児生存率には、対照群といずれの投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

また、反復投与群と単回投与群のいずれにおいても、雌雄の胎児体重および性比が、対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

2.2 外表検査

生存胎児の外表検査結果を表 4 に示す。

対照群において、外表異常を伴う胎児が 2 例 (1.0%) みられた。所見としては、眼瞼開存、外脳および短吻が認められ、外脳および短吻は同一腹での発生であった。

反復投与群では、外表異常は認められなかった。

単回投与群では、外表異常を伴う胎児が 4 例 (5.1%) みられた。所見としては、小肢、欠指、曲尾および短尾が認められ、小肢、欠指および短尾は同一腹での発生であった (図 4)。外表異常を伴う胎児の発生率ならびに各異常の発生率に、対照群と投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

D. 考察

1 母動物への影響

妊娠 12 日の投与後に、対照群および反復投与 (4 mg/kg/day) 群の各 1 例が死亡した。反復投与群の死亡例では、肺の赤色化および気管内に泡沫状の白色内容物がみられたため、投与による肺水腫が疑われた。対照群の死亡例では、肺の赤色斑点がみられたが、死因は不明であった。

単回投与 (4 mg/kg) 群においては、妊娠 9 日の投与後に 1 例が死亡した。この動物では肺に黒色斑点が認められ、被験物質投与に起因した変化と考えられたが、死因は不明であった。また、同動物で脾臓の腫大および肝臓の淡色化がみられたが、生存例ではみられていないことから、被験物質投与による変化とは考えなかった。

一般状態の変化としては、反復投与 (4 mg/kg/day) 群で妊娠 9 および 12 日の投与後に呼吸不整が認められ、この変化は被験物質投与による肺胞内の状態悪化に伴う反応と考えられた。また、反復投与群の妊娠 7~17 日の体重が低値を示した。妊娠 6~17 日の平均 1 日摂餌量が低値を示したことから、被験物質投与による摂餌量減少を伴った体重増加抑制であることが示唆された。体重および体重増加量での変化は、妊娠子宮重量を差し引いた体重補正值においても低値を示したことから、被験物質投与の影響と考えられた。

単回投与 (4 mg/kg) 群においても、妊娠 10~17 日の体重が低値を示し、妊娠 9~12 日の平均 1 日摂餌量が低値を示したことから、被験物質投与によ

る摂餌量減少を伴った体重増加抑制が示唆された。単回投与群においては、妊娠子宮重量を差し引いた体重補正值が対照群とほぼ同等の値を示しており、胎児体重が低値を示したことから、被験物質投与による胎児の発育抑制に伴う二次的な変化と考えられた。摂餌量の低値については、投与日からの変化であったことから、被験物質投与により一時的に動物の状態が悪化したことによるものと考えられた。

剖検では、反復投与群の全例で肺の黒色化または黒色斑点が認められた。また、同群で肺重量が有意に増加した。これらの変化は被験物質投与に起因したものと考えられ、被験物質が気管内に適切に投与されたことを示すものと考えられた。同群で卵巣の嚢胞が 2 例にみられたが、自然発生性の変化と考えられた。単回投与群においても肺の黒色化または黒色斑点がみられ、同群の肺重量が有意に増加した。これらの変化は被験物質投与に起因したものと考えられ、被験物質が気管内に適切に投与されたことを示すものと考えられた。その他、同群でみられた腎臓の嚢胞については、単発性の発生であったことから、自然発生性の変化と考えられた。その他の所見として、肝臓の白色斑点および腎臓の嚢胞がみられたが、対照群のみの発生であったため、自然発生性の変化と判断した。

帝王切開時の検査では、反復投与群および単回投与群において妊娠子宮重量、生存胎児数、胎児体重および胎盤重量が低値を示し、死亡胚・胎児率

が高値傾向を示したことから、被験物質投与による胎児の発育抑制が示唆された。胎盤観察で、癒着胎盤がみられたが、単発性の発生であり、対照群でもみられたことから、自然発生性の変化と考えられた。

妊娠黄体数、着床数、死亡胚・胎児数、着床率および胎児生存率において、被験物質投与に関連した変化は認められなかった。

2 胎児への影響

MWCNT の反復気管内投与（4 mg/kg/day）および単回気管内投与（4 mg/kg）によって、雌雄の胎児体重、生存胎児数および胎盤重量の低値ならびに死亡胚・胎児率の高値傾向がみられたことから、MWCNT の 4 mg/kg/day の反復投与および 4 mg/kg の単回投与によって胎児の発育抑制が起こることが示唆された。

また、反復投与、単回投与いずれの投与群においても性比（雄胎児の割合）が低値を示し、死亡胚・胎児率に高値傾向がみられたものの、対照群と比較して有意な差はなかったことから選択的に雄胎児の死亡が増加したとは考えにくく、受精時（投与前）での偶発的な性比の偏りに起因した変化と考えられ、その毒性学的意義は乏しいと判断した。

外表検査においては、対照群において、眼瞼開存、外脳および短吻が観察されたが、これらは対照群のみの発生であったことから、自然発生性の変化あるいは母動物に対する投与時のストレス等による変化と考えられた。反

復投与群では全ての胎児に外表異常はみられなかった。単回投与群では、小肢、欠指、短尾が同一腹の胎児 3/11 例に、曲尾が別の母動物の胎児 1/3 例に観察された。同じ被験物質を用いた昨年度実施の反復気管内投与試験においても、1 mg/kg/day 投与群で短尾が、媒体対照群で裂手および巻尾が観察された。これらは既存の報告 (Fujitani et al., 2012) で有意に発生した四肢の減形成（少指および短肢）および短尾と同様あるいは同時期の発生過程における変化と考えられた。ただし、昨年度実施の試験でみられた裂手については、その異常が指間部の分離過剰によるもの、隣接する指間の癒合による見かけ上のもの、あるいはその他の要因によるものなのかは、骨格検査を行っておらず、外表検査までの結果からは判断できなかった。なお、本試験および昨年度実施の反復気管内投与試験が麻酔下での投与であったのに対し、既存の報告 (Fujitani et al., 2012) では無麻酔下での投与であったことから、母動物に対する投与時のストレスは当該試験よりも大きかったと考えられた。これらのことから、本試験でみられた外表異常は既存の報告でみられたものと形態学的発生段階において同時期の変化と考えられたが、いずれも単発性あるいは同一腹の少数例での発生であり、同様の変化が昨年度実施の試験の媒体対照群でもみられ、本試験の反復投与群ではみられていないことを考慮すると、母動物に対する投与時のストレス等による異常発生の可能性も考えられた。しかし、

いずれの所見も被験物質投与との関連を否定するに足るデータはなく、その発生機序は不明であった。なお、Fujitani et al. (2012)の報告では4 mg/kg 投与群で骨格検査において脊椎の癒合または不整等が高頻度にみられていることから、本試験における胎児の骨格に対しても同様の異常が発生している可能性が考えられた。

以上のことから、MWCNTの4 mg/kg/day 反復気管内投与（妊娠期間を通じて24 mg/kg）および4 mg/kg 単回気管内投与によって、胎児に対する発育抑制を引き起こすことが分かった。しかし、本試験における外表検査により得られた結果からは、MWCNTの4 mg/kg/day 反復気管内投与あるいは4 mg/kg 単回気管内投与による催奇形性は明確ではなかった。

E. 結論

今年度を実施した反復気管内投与および単回気管内投与では、4 mg/kg/day（反復投与）および4 mg/kg（単回投与）において、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、母動物および胎児の両方に毒性影響がみられていることから、生殖・発生毒性というエンド

ポイントで考えると、毒性の発現する用量であると評価できる。

昨年度に実施したマウス反復気管内投与試験においては、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、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。

以上のことから、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、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明確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ていない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。そのため、今後はこれらの検査を行い、MWCNTの生殖・発生毒性に関するより詳細な評価を行った上でNOAEL あるいは LOAEL を判断する必要があると考えられる。

F. 引用文献

Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A: Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. *The Journal of Toxicological Sciences*,

- 37, 81–89 (2012).
- Lim J, Kim S, Shin I, Park N, Moon C, Kang S, Kim S, Park S, Kim J: Maternal exposure to multi-wall carbon nanotubes does not induce embryo-fetal developmental toxicity in rats. *Birth Defects Research (Part B)*, **92**, 69–76 (2011).
- Philbrook NA, Walker VK, Afrooz ARMN, Saleh NB, Winn LM: Investigating the effects of functionalized carbon nanotubes on reproduction and development in *Drosophila melanogaster* and CD-1 mice. *Reproductive Toxicology*, **32**, 442–448 (2011).
- alters gene expression related to brain development in the mouse. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 20 (2009).
- Takeda K, Suzuki K, Ishihara A, Kubo-Irie M, Fujimoto R, Tabata M, Oshio S, Nihei Y, Ihara T, Sugamata M: Nanoparticle transferred from pregnant mice to their offspring can damage the genital and cranial nerve systems. *Journal of Health Science*, **55**, 95–102 (2009).
- Pietroiusti A, Massimiani M, Fenoglio I, Colonna M, Valentini F, Palleschi G, Camaioni A, Magrini A, Siracusa G, Bergamaschi A, Sgambato A, Campagnolo L: Low doses of pristine and oxidized single-wall carbon nanotubes affect mammalian embryonic development. *ACS NANO*, **5**, 4624–4633 (2011).
- Shimizu M, Tainaka H, Oba T, Mizuo K, Umezawa M, Takeda K: Maternal exposure to nanoparticulate titanium dioxide during the prenatal period
- 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).

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

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

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

無し

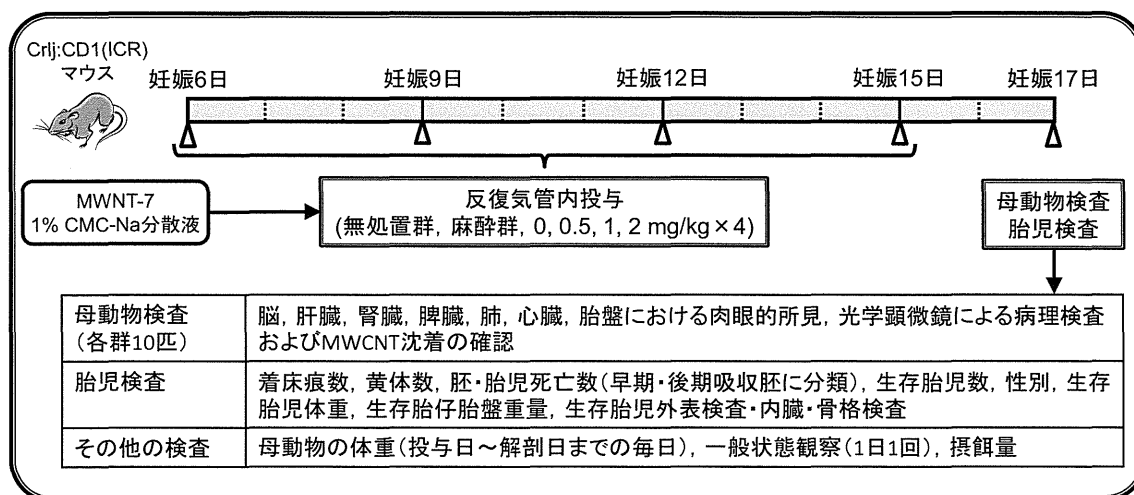


図1. 昨年度に実施したマウス反復気管内投与試験のプロトコル

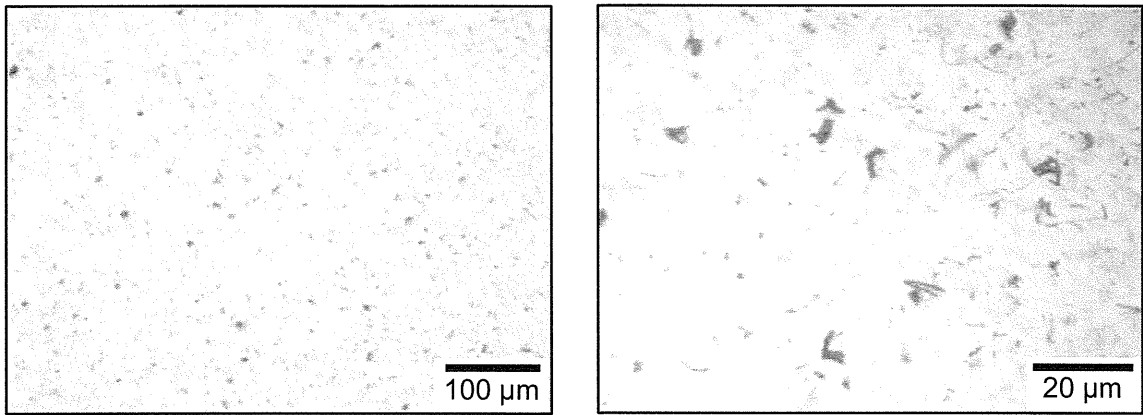


図2. MWCNT懸濁液の光学顕微鏡写真

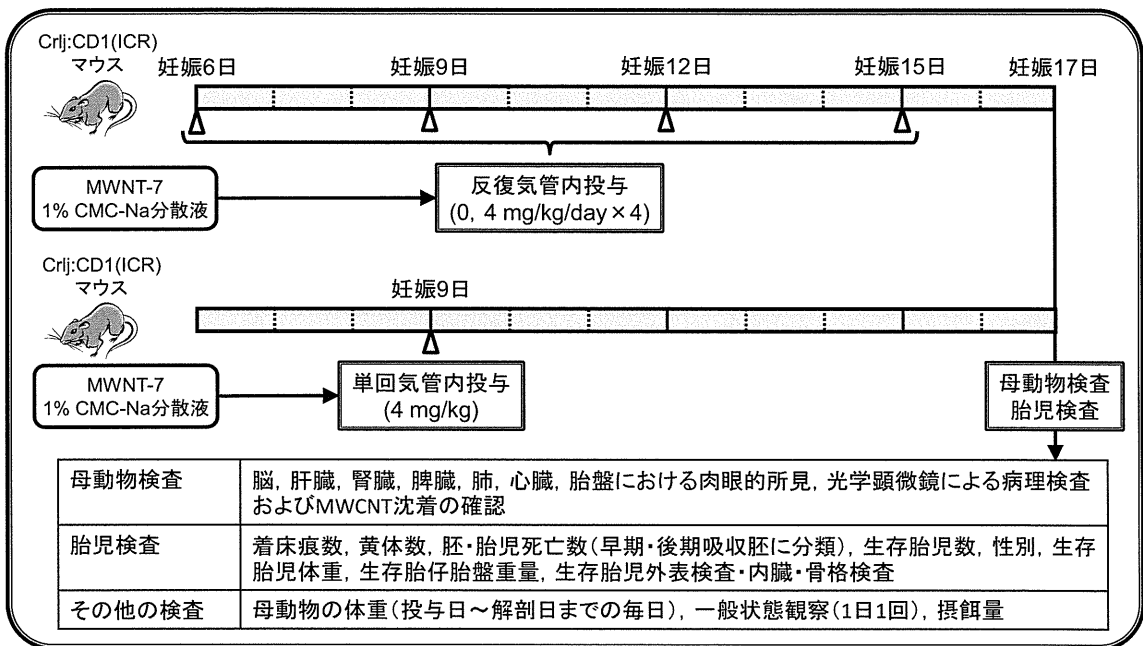


図3. マウス反復および単回気管内投与試験のプロトコル

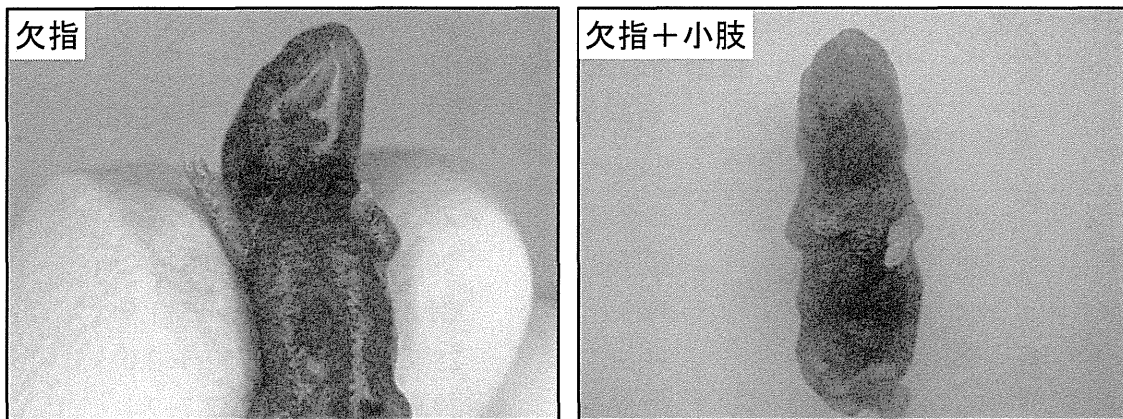


図4. マウス単回気管内投与試験における胎児の外表異常

表1. 母動物の体重推移^{a)} (単位: g)

妊娠日数	投与群	対照群	反復投与群	単回投与群
	投与量	0 mg/kg	4 mg/kg	4 mg/kg
0日		28.8±1.1	28.7±1.5	29.0±1.5
3日		29.7±1.4	29.8±1.9	29.8±2.2
6日		31.3±1.2	31.5±1.9	31.3±1.9
7日		31.5±1.4	28.5±2.4*	32.3±2.0
8日		32.3±1.2	29.0±3.0*	32.7±2.1
9日		33.0±1.3	30.8±2.8*	33.4±2.0
10日		33.9±1.3	30.6±3.1*	30.8±2.2*
11日		36.0±1.6	33.0±3.1*	31.4±2.6*
12日		38.4±1.7	35.1±3.1*	34.3±3.0*
13日		40.2±2.1	36.0±3.3*	36.8±3.1*
14日		42.5±2.2	38.2±3.3*	39.1±3.5*
15日		45.9±2.3	40.6±3.6*	41.8±3.9*
16日		49.1±2.6	42.6±3.6*	45.2±4.6*
17日		52.2±3.0	45.6±4.2*	48.4±5.1*
17日 ^{b)}		34.8±1.8	33.2±2.1*	34.5±2.0

a) 平均±S.D.を表示, b) 体重－妊娠子宮重量

*:対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表2. 帝王切開時における臓器重量^{a)}

妊娠日数	投与群	対照群	反復投与群	単回投与群
	投与量	0 mg/kg	4 mg/kg	4 mg/kg
肺重量 (g)		0.24±0.02	0.38±0.05*	0.31±0.03*
肺重量 (%)		0.46±0.03	0.84±0.13*	0.64±0.10*
子宮重量 (g)		17.43±1.85	12.20±3.23*	13.97±3.96*
子宮重量 (%)		33.31±2.19	26.52±5.88*	28.37±6.06*

a) 平均±S.D.を表示

*:対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表3. 帝王切開時の検査結果

検査項目	投与群 投与量	対照群 0 mg/kg	反復投与群 4 mg/kg	単回投与群 4 mg/kg
検査母動物数		16	11	12
黄体数	合計	213	147	159
	平均±S.D.	13.3±1.4	13.4±1.9	13.3±2.6
着床痕数	合計 (%)	211 (99.2)	138 (94.7)	152 (94.7)
	平均±S.D.	13.2±1.3	12.5±1.6	12.7±2.9
子宮内死亡	合計 (%)	12 (5.7)	25 (17.2)	18 (12.9)
	平均±S.D.	0.8±0.9	2.3±3.2	1.5±1.4
早期吸収胚	合計 (%)	9 (4.2)	11 (8.1)	9 (5.2)
	平均±S.D.	0.6±0.7	1.0±1.2	0.8±1.1
後期吸収胚	合計 (%)	2 (1.0)	13 (8.4)	8 (7.2)
	平均±S.D.	0.1±0.3	1.2±3.0	0.7±0.9
死亡胎児	合計 (%)	1 (0.4)	1 (0.6)	1 (0.5)
	平均±S.D.	0.1±0.3	0.1±0.3	0.1±0.3
生存胎児数	合計 (%)	199 (94.3)	113 (82.8)	134 (87.1)
	平均±S.D.	12.4±1.5	10.3±3.0*	11.2±3.0
性比 (雄%)	平均±S.D.	59.4±11.9	41.2±13.5*	48.4±14.9*
雄体重 (g)	平均±S.D.	0.98±0.07	0.76±0.11*	0.83±0.12*
雌体重 (g)	平均±S.D.	0.94±0.08	0.72±0.13*	0.79±0.13*
雄胎盤重量(g)	平均±S.D.	0.11±0.01	0.10±0.02*	0.09±0.02*
雌胎盤重量(g)	平均±S.D.	0.10±0.01	0.09±0.01*	0.09±0.02*

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

表4. 帝王切開時の検査結果

検査項目	投与群	対照群	反復投与群	単回投与群
	投与量	0 mg/kg	4 mg/kg	4 mg/kg
検査胎児数		199	113	134
外表異常	合計 (%)	2 (1.0)	0	4 (5.1)
眼瞼開裂	合計 (%)	1 (0.5)	0	0
外脳症	合計 (%)	1 (0.5)	0	0
曲尾	合計 (%)	0	0	1 (2.8)
欠指 (前足)	合計 (%)	0	0	3 (2.3)
短肢	合計 (%)	0	0	1 (0.8)
短尾	合計 (%)	0	0	1 (0.8)
短吻	合計 (%)	1 (0.5)	0	0

*: 対照群との統計学的有意差あり (p<0.05)

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」

カーボンナノチューブの遺伝毒性評価に関する研究

研究分担者： 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部 部長
研究協力者： 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
研究協力者： 濱田 修一 株式会社LSIメディエンス 技術・学術顧問
研究協力者： 高沢 博修 株式会社LSIメディエンス 主任研究員
研究協力者： 中川 宗洋 株式会社LSIメディエンス 主任研究員

研究要旨

カーボンナノチューブを吸入曝露させ、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 Cr1:CD(SD)ラット(投与時8週齢, 3匹/群)にブレオマイシンを1または3 mg/kgの用量(投与液量0.1 mL/匹)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。その結果、1 mg/kgの用量では有意な小核細胞の出現がみられた。この用量では、小核の誘発に個体差が認められたが、3 mg/kgの用量ではいずれの個体でも明らかな小核誘発が認められた。本検討試験により、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に応用できる可能性が示唆された。

キーワード:カーボンナノチューブ、小核試験、遺伝毒性、発がん性

A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中の多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プラスの電荷を持つMWCNTはマイナスの電荷を持つDNAと結合しやすいという性質を応用し、MWCNTがDNAのセンサーに応用されているが、これは、CNTがDNAと作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示

唆している。

また、MWCNTが酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進し、線維症はMWCNTが肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因と考えられている。その他、MWCNTは青石綿と同様にp53^{+/+}のトランスジェニックマウスに中皮腫を生じさせることが明らかになっている。このようにMWCNTは、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNAや分裂装置と直接結合

することで発がん性を示すと考えられている。

太くて長い MWCNT は、青石綿の物理的形狀と似ていることから毒性の類似性が指摘されている。いくつかの研究グループは、動物実験において腹腔内投与させた MWCNT は、青石綿と同様に中皮腫を高頻度に誘発させることを報告している。その結果は、石綿繊維の径が $0.25\ \mu\text{m}$ 以下でかつ長さ $20\ \mu\text{m}$ 以上の形状で発癌性が強いという“スタントン・ポットの仮説”とほぼ一致している。MWCNT の遺伝毒性に関しては、Kato らが野生型 ICR マウスに MWCNT (幅 $70\text{--}110\text{nm}$ 、長さ $1\text{--}4\ \mu\text{m}$) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化 DNA 付加体の定量、そして一酸化窒素合成酵素の免疫組織化学的解析を行ったところ、すべて陽性の結果が得られた。よって MWCNT の遺伝毒性は、過剰な炎症反応による酸化ストレスが主な原因であるとされている。

しかしながら、他の遺伝毒性エンドポイントでの MWCNT の評価はほとんど検討されておらず、上記で観察された遺伝毒性と発がん性との関係は不明である。これは、ナノ物質の標的臓器である肺での遺伝毒性試験マーカーがほとんど開発されてこなかったことが原因である。

そこで本研究では、MWCNT の *in vivo* 遺伝毒性評価のために、げっ歯類動物を用いた肺小核試験系の開発を試みた。モデル化合物として、ブレオマイシンを用いた。

B. 研究方法

(1) 被検物質

Bleomycin (ブレオマイシン塩酸塩製剤;ブレオ注射用 $5\ \text{mg}$, 日本化薬株式会社;ロット# 730520) を用いた。ブレオマイシン $5\ \text{mg}$ (バイアル) 1 本に対して、注射用水 $1.5\ \text{mL}$ (初回実験) または $0.5\ \text{mL}$ (2 回目実験) を加えて溶解させて溶液を調整した。紫外線カットした蛍光灯下で投与当日に調製を行った。

(2) 動物

日本チャールス・リバー株式会社より購入した雄性 CrI:CD (SD) ラットを用いた。動物入荷後 5 日間を検疫期間とし、動物入荷時及び検疫終了時に体重を測定した。1 日 1 回一般状態を観察し、検疫期間中には馴化も行った。投与には 8 週齢の雄性ラットを用い、3 匹/群とした。

(3) 投与

ブレオマイシン溶液を 1 回気管内投与した。De Boeck らの方法では、ブレオマイシンの $1.0\ \text{U/kg}$ を 1 回気管内投与した際、72 時間後に AT-II 細胞 (Alveolar Type II cells) において有意な小核誘発が報告された。この報告に基づき、本検討試験の初回実験ではブレオマイシンの $1\ \text{U/kg}$ に相当すると考えられた $1\ \text{mg/kg}$ を 1 回気管内投与した。しかしながら、初回実験ではブレオマイシンを投与した動物 3 匹のうち、2 例で小核の誘発率が比較的 low 値を示したため、2 回目実験では初回実験の 3 倍量の $3\ \text{mg/kg}$ を 1 回気管内投与した。投与液量は De Boeck らの方法では $2\ \text{mL/kg}$ を設定していたが、過剰液量であるという情報もあったため、いずれの実験でも $0.1\ \text{mL/匹}$ (約 $0.3\ \text{mL/kg}$ 相当) を投与した。

(4) 細胞分離

投与後 72 時間後に動物をと殺し、Lindberg らの方法を参考に下記の方法で Clara 細胞及び AT-II 細胞を分離、識別した。

- i. ラットをチオペンタールナトリウム (ラボナール, 田辺三菱製薬株式会社) 麻酔下で開腹し、腹大動脈を切断・放血してから全肺を摘出した。
- ii. 生理食塩液 (局方, 株式会社大塚製薬工場) で気管・肺内を 4~5 回洗浄した。
- iii. 0.25% トリプシン溶液 [使用予定の溶液 A (4.9.4.1 項参照) の代わりに使用した) を肺内に注入した後、 $50\ \text{mL}$ のディスプレイ管に入れて 37°C 、30 分間恒温槽内で処理