

トを用いて、MWCNT (MWNT-7) の発生毒性を評価してきた。これまでの結果では、妊娠 9 日のマウスに 3 mg/kg 以上の MWCNT を単回気管内投与した場合、胎児の奇形がみられたが、妊娠 6~15 日のマウスに合計 8 mg/kg (2 mg/kg/day×4 回) の MWCNT を反復気管内投与しても、胎児の奇形はみられなかった。さらに、より高用量 (16 mg/kg, 4 mg/kg/day×4 回) の MWCNT を妊娠 6~15 日のマウスに反復気管内投与した場合も、胎児の奇形はみられなかった。

妊娠マウスに MWCNT を合計 16 mg/kg (4 mg/kg×4 回) 反復気管内投与しても、胎児の奇形はみられなかったことから、感受性の強い時期に曝露を受けると低用量でも胎児への影響が発現すると考えられる。ナノマテリアルの発生毒性を、安全側に立って評価するためには、感受性の強い時期を探った上で試験を行う必要がある。

ただし、外表異常以外の発生毒性は、2 mg/kg 以上でみられている (胎児の体重減少) ことから、外表異常以外の発生毒性 (胎児の骨格・内臓異常) を検査した上で、総合的な評価を行う必要がある。

そこで、今年度は、過去に実施したマウス反復気管内投与試験で得られた胎児の骨格・内臓検査を実施し、発生毒性の無毒性量 (NOAEL) および最小毒性量 (LOAEL) を評価することを目的とした。

B. 研究方法

1. 被験物質懸濁液の調製

本研究では、被験物質として、MWNT-7 (ナノカーボンテクノロジーズ、現在は保土谷工業から提供) を用いた。

これ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 溶液中によく分散し、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。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。

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 Fig. 1 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, 0.5, 1, 2 および 4 mg/kg/day の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に合計 4 回、イソフルラン麻酔下で気管内投与した。単回投与群は、同じ 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。

各投与群とも妊娠 17 日に帝王切開し、母動物および胎児への影響を検索した。

3. 胎児内臓検査

ブアン液 (武藤化学) で固定された全母動物の胎児 (同腹児の約半数) について、頭部および腹部を Wilson 変法で、胸部を顕微解剖法で検査し、内臓異常の有無を確認した。得られた結果から内臓異常発生率を算出した。検査後、すべての標本をブアン液で保管した。

内臓異常発生率：

$$(\text{異常発現胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100$$

4. 胎児骨格検査用標本の作製および検査

99.5 vol% エチルアルコールで固定された全母動物の胎児 (内臓検査用を除いた残りの同腹児) について、Dawson 変法に準じて Alizarin red S 染色骨格透明標本を作製した。全例について、骨格異常および変異の有無、骨化状態 [頸椎体の骨化数、胸骨分節の不完全骨化および未骨化数、中手骨、前肢基節・中節・末節骨の骨化数、中足骨、後肢基節・中節・末節骨の骨化数、仙尾椎骨化数、その他の骨化遅延 (不完全骨化、未骨化) 部位] を検査した。骨格異常および変異については、各発生率を算出した。骨化状態については、数を測定するものは骨化進行度計量値として評価し、その他の骨化遅延部位は骨化進行度計数値発生率で評価した。検査後、すべての標本を 50 vol% グリセリン液で保管した。

骨格異常発生率：

$$(\text{異常発現胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100$$

骨格変異発生率：

$$(\text{変異発現胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100$$

骨化進行度計数値発生率：

$$(\text{発現胎児数} / \text{観察胎児数}) \times 100$$

5. データ処理

試験の磁気データは、コンピュータ・システム[安全性試験システム(LATOX-F/V5)]を用いて記録し、1母体当たりの平均を1標本として集計した。

6. 統計解析

0.5, 1 および 2 mg/kg/day 群の比較対照として対照群 A を、4 mg/kg/day 群の比較対照として対照群 B を用いて統計解析を行った。

骨化進行度計数値について、0.5, 1 および 2 mg/kg/day 群では、最初に Bartlett の等分散検定 (Snedecor & Cochran., 2012) を 5% の両側有意水準で実施し、ここで等分散 (非有意) の場合には Dunnett の多重比較検定 (Yoshida, 1988) を、不等分散 (有意) の場合には Steel の検定 (Steel, 1959) を行い、対照群と各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。4 mg/kg/day 群では、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、ここで等分散 (非有意) の場合には Student の t 検定を、不等分散 (有意) の場合には Aspin-Welch の t 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。

内臓異常発生率、骨格変異発生率、骨格異常発生率および骨化進行度計数値発生率について、0.5, 1 および 2 mg/kg/day 群では Steel の検定、4 mg/kg/day 群では Wilcoxon 検定を行い、対照群と各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。

C. 研究結果

1. 胎児内臓検査

内臓検査結果を Table 1 に示す。内臓異常を伴う胎児は、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) 群の内臓異常発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値

を示した。所見としては、4 mg/kg/day (反復投与) 群の腎盂拡張の発生率および 4 mg/kg (単回投与) 群の左臍動脈遺残の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。その他、胸腺頸部残留、食道位置異常、肺分葉異常、腎臓大型、副腎位置異常、尿管欠損、尿管拡張および精巣位置異常が観察された。

2. 胎児骨格検査

骨格検査結果を Table 2 (骨格異常および変異)、Table 3 (骨化遅延) および Table 4 (骨化進行度計数値) に示す。また、本試験でみられた代表的な骨格異常および変異の所見を Fig. 2 に示す。

骨格異常を伴う胎児 (Table 2) は、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) 群の骨格異常発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。所見としては、4 mg/kg/day (反復投与) 群で肋骨の欠損および癒合ならびに胸椎弓の癒合の発生率、4 mg/kg/day (単回投与) 群で腰椎弓の癒合の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。その他、前頭骨の欠損、頭頂間骨の欠損、上顎骨の形態異常、頭頂骨の欠損、上後頭骨の欠損、指節骨の欠損、趾節骨の形態異常、肋骨の分岐および肥厚、胸骨分節の癒合および形態異常、胸椎弓の欠損、胸椎体の癒合および半椎体、胸椎の欠損および半椎、腰椎体の癒合および半椎体、腰椎の半椎、仙椎弓の欠損および癒合ならびに仙椎体の癒合および半椎体が観察された。

骨格変異を伴う胎児 (Table 2) は、4 mg/kg (単回投与) 群の骨格変異発生率が対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。所見としては、4 mg/kg (単回投与) 群で短小過剰肋骨の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。その他、頸肋、完全過剰肋骨、波状肋骨および腰椎仙椎化が観察された。

骨化遅延を伴う胎児 (Table 3) は、2 mg/kg/day 以上の群の骨化進行度計数値発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。所見としては、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) 群で胸

骨分節の二分骨化および腰椎体の不完全骨化の発生率、4 mg/kg/day (反復投与) 群で頭蓋有窓、舌骨の未骨化、上後頭骨の二分骨化および未骨化、胸椎体の未骨化ならびに恥骨の不完全骨化の発生率、4 mg/kg (単回投与) 群で舌骨の不完全骨化、胸椎体の不完全骨化および未骨化の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。また、1 および 2 mg/kg/day 群で上後頭骨の二分骨化および胸骨分節の二分骨化の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。その他、頭頂間骨の不完全骨化、鼻骨の不完全骨化、上後頭骨の不完全骨化、頸椎弓の不完全骨化、胸椎弓の不完全骨化、腰椎体の二分骨化、ダンベル状骨化および未骨化、仙椎体の不完全骨化および未骨化ならびに坐骨の不完全骨化が観察された。

骨化進行度計量値 (Table 4) としては、4 mg/kg/day (反復投与) 群の胸骨分節の未骨化数および 4 mg/kg (単回投与) 群の胸骨分節の不完全骨化数が対照群と比べて統計学的に有意な高値を示し、4 mg/kg/day (反復投与) 4 mg/kg (単回投与) 群の前肢基節、前肢末節、中足骨、後肢基節、後肢末節、頸椎体および仙尾椎数、4 mg/kg/day (反復投与) 群の中手骨数ならびに 2 mg/kg/day 群の後肢基節数が対照群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

D. 考察

内臓検査では、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) で内臓異常を伴う胎児の発生率ならびに腎盂拡張および左臍動脈遺残の発生率が有意な高値を示した。腎盂拡張は対照群においても観察された異常所見であるが、被験物質投与の影響により、その発生率が増加したものと考えられた。左臍動脈遺残の発生率の高値は、単回投与のみでの発生であり、同用量を反復投与した群において同様の変化がみられないことから、被験物質投与に関連した変化ではないと考えられた。

骨格検査では、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) で骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示した。また、同群で肋骨の欠損および癒合、胸椎弓

の癒合ならびに腰椎弓の癒合の発生率が有意な高値を示し、被験物質投与の影響と考えられた。肋骨の癒合、胸骨分節の癒合および形態異常、胸椎弓の癒合ならびに腰椎体の癒合など、いくつかの異常所見が 0.5 または 1 mg/kg/day 投与において観察されたが、いずれも用量関連性がなく、その発生率も少ないことから、被験物質投与と関連のない変化と考えられた。

骨化遅延を伴う胎児の発生率は、2 mg/kg/day 以上の投与で有意な高値を示した。上後頭骨の二分骨化および胸骨分節の二分骨化の発生率の高値については、1 および 2 mg/kg 投与においても認められており、いずれも被験物質投与による骨化遅延の影響と考えられた。

骨化進行度計量値では、4 mg/kg 投与で中手骨、前肢の基節および末節、中足骨、後肢の基節および末節、頸椎体ならびに仙尾椎の骨化数の低値、2 mg/kg 投与で後肢の基節の骨化数の低値が認められた。これらの変化は、いずれも被験物質投与に起因した胎児体重の低値に伴う発育遅延を反映したものと考えられた。過去に実施した MWCNT を用いた催奇形性試験 (小林, 2015 ; 2015) では、4 mg/kg/day (反復投与) および 4 mg/kg (単回投与) で雌雄の胎児体重が有意な低値を示し、被験物質投与による胎児の発育抑制が示唆されたが、今回の骨格検査では、1 mg/kg/day 以上と、より低用量においても被験物質投与による胎児の発育抑制が示唆された。

Fujitani et al., (2012) は、4 mg/kg 以上の単回投与において体重増加抑制、短尾、無尾、四肢減形成、肋骨の癒合、脊椎の癒合および指骨の不足が報告されている。我々が実施した一連の試験 (小林, 2015 ; 2015) では、4 mg/kg の単回投与での小肢、欠指、短尾または曲尾の発生 (母動物 2 例中の胎児 4 例)、4 mg/kg/day の反復または 4 mg/kg の単回投与での肋骨および脊椎の癒合などの既存の論文 (Fujitani et al., 2012) と同様または類似の変化に加え、より低用量からの骨化遅延が認められており、投与 (暴露) 期間の長期化 (投与回数の増加) による MWCNT の影響の増強が示唆された。

E. 結論

これまでの一連の試験により、MWCNTの母動物に対する一般毒性学的な無毒性量（NOAEL）は、0.5 mg/kg/day（妊娠期間を通じて2 mg/kg）以上の反復投与によって、肺重量の増加が認められたことから0.5 mg/kg/day未満、母動物の生殖能に対するNOAELは、4 mg/kg/day（妊娠期間を通じて16 mg/kg）の反復投与においても異常は認められなかったことから4 mg/kg/day、胎児の発生および発育に対するNOAELは、1 mg/kg（妊娠期間を通じて4 mg/kg）の反復投与において、上後頭骨および胸骨分節の二分骨化の発生率増加による胎児の発育抑制が認められたことから0.5 mg/kg/day〔最小毒性量（LOAEL）：1 mg/kg/day〕と判断された。

今回の検討によって、これまでの試験で認められた骨格異常および骨格変異よりも低用量から骨化遅延が認められることが明らかとなった。

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, Afroz 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).
- Pietrojusti 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 alters gene expression related to brain development in the mouse. *Particle and Fibre Toxicology*, **6**: 20 (2009).
- Snedecor GW, Cochran WG: *Statistical Methods*. 8th ed. Iowa State University Press; 1989.
- Steel RGD. A multiple comparison rank sum test: Treatments versus control. *Biometric* 1959; **15**: 560–72.
- 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).
- Yoshida M: Exact probabilities associated with Tukey's and Dunnett's multiple comparisons procedures in imbalanced one-way ANOVA *J Japanese Soc Comp Statist* 1988; **1**: 111–22.
- 小林憲弘：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。平成25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，2014。
- 小林憲弘：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。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，2015。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

小林憲弘, 田中翔, 竹原広, 納屋聖人, 久保田領志, 五十嵐良明, 広瀬明彦: マウス単回・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42回日本毒性学会学術年会 (2015.6.30 石川県金沢市).

Norihiro Kobayashi, Sho Tanaka, Makoto Ema, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Evaluation of developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. Society for Risk Analysis 2015 Annual Meeting (2015.12.7 Arlington, VA, USA).

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

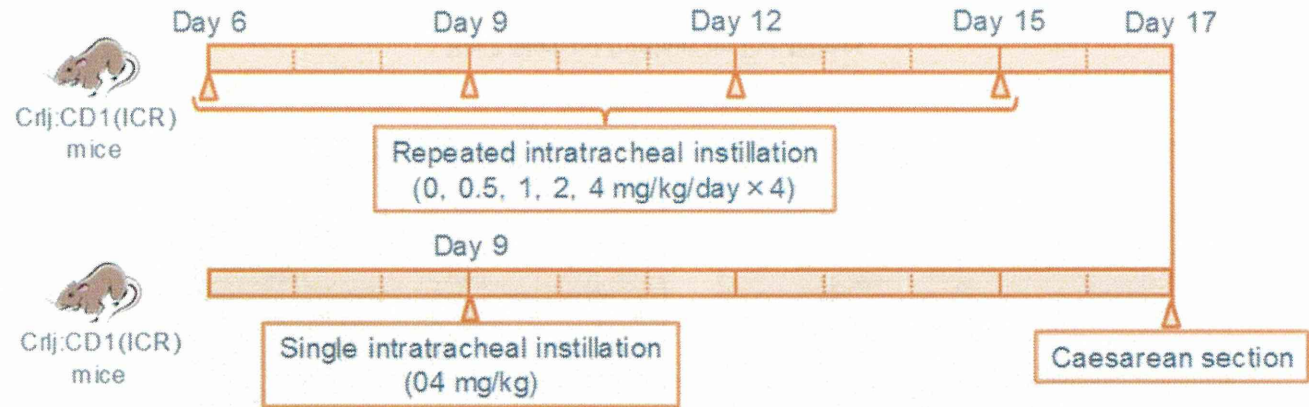


Fig.1 Experimental design

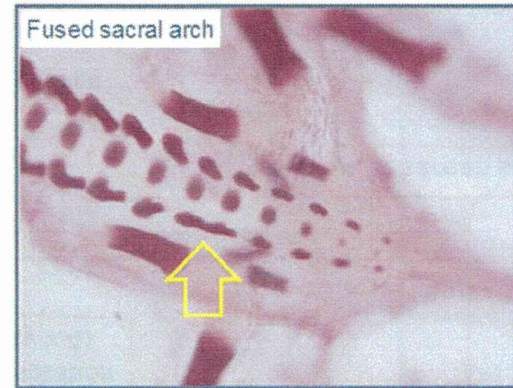
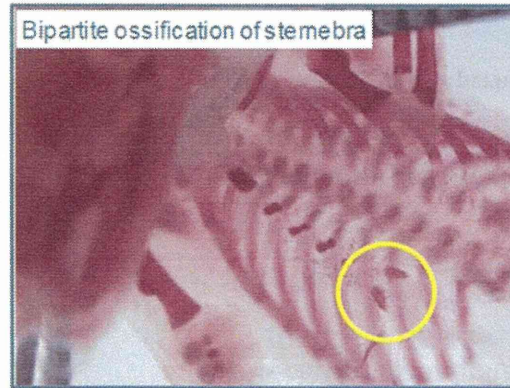
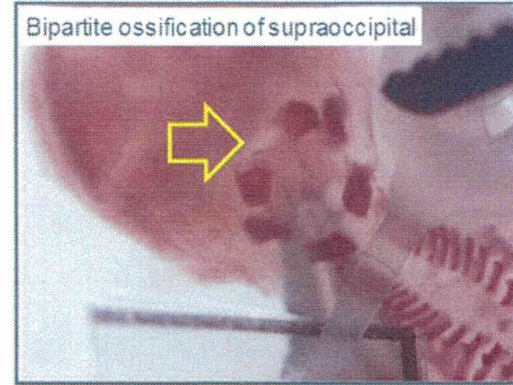
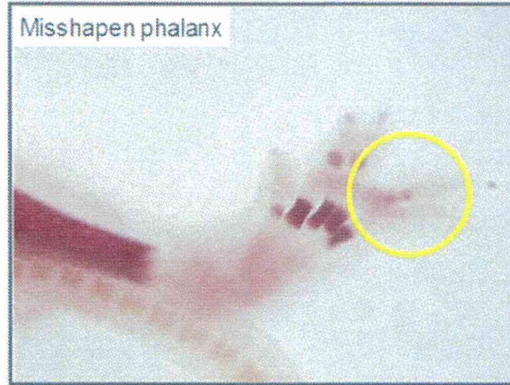


Fig.2 Skeletal findings on live fetuses

Table 1. Visceral findings on live fetuses

	Control-A	Control-B	0.5 mg/kg/day	1 mg/kg/day	2 mg/kg/day	4 mg/kg/day	4 mg/kg ^{a)}
No. of dams	11	16	11	9	11	11	12
No. of fetuses examined	68	94	65	59	64	54	64
No. of fetuses with anomalies (%)	9 (13.3)	6 (6.0)	3 (4.1)	5 (8.0)	4 (5.9)	14 (24.2)*	14 (20.0)*
thymic remnant in the neck	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.8)	0 (0)
persistent left umbilical artery	7 (10.2)	3 (2.8)	3 (4.1)	5 (8.0)	4 (5.9)	2 (3.6)	11 (15.5)*
malpositioned esophagus	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)
abnormal lung lobation	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)
dilated renal pelvis	1 (1.3)	3 (3.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	9 (15.9)*	2 (3.1)
enlarged kidney	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.7)
malpositioned adrenal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.8)	0 (0)
absent ureter	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)
dilated ureter	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.7)
malpositioned testis	1 (1.8)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.7)

Control-A: control group for 0.5, 1 and 2 mg/kg/day groups

Control-B: control group for 4 mg/kg/day group

a) Single administration

Significantly different from control-B group * $P \leq 0.05$ (Wilcoxon's test)

Table 2. Skeletal findings on live fetuses (Malformation and variation)

	Control-A	Control-B	0.5 mg/kg/day	1 mg/kg/day	2 mg/kg/day	4 mg/kg/day	4 mg/kg ^{a)}
No. of dams	11	16	11	9	11	11	12
No. of fetuses examined	71	105	72	63	66	59	70
No. of fetuses with skeletal malformation (%)	2 (2.8)	1 (0.9)	3 (4.2)	2 (3.4)	0 (0)	12 (24.9)*	19 (29.8)*
SKULL							
absent frontal	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
absent interparietal	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
misshapen maxilla	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
absent parietal	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
absent supraoccipital	0 (0)	1 (0.9)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
FORELIMB							
absent phalanx	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4.2)
HINDLIMB							
misshapen phalanx	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
RIB							
absent rib	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (14.8)*	0 (0)
branched rib	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.5)	1 (1.4)
fused rib	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	8 (18.6)*	4 (5.4)
thickened rib	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.5)	0 (0)
STERNEBRA							
fused sternebra	0 (0)	0 (0)	1 (1.1)	2 (3.4)	0 (0)	1 (1.8)	0 (0)
misshapen sternebra	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	1 (1.6)	0 (0)	1 (2.3)	0 (0)

VERTEBRA							
absent thoracic arch	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (5.7)	0 (0)
fused thoracic arch	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	9 (20.5)*	4 (5.4)
fused thoracic centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.1)	1 (1.4)
hemicentric thoracic centrum	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
absent thoracic vertebra	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.5)	0 (0)
thoracic hemivertebra	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.8)	0 (0)
fused lumbar arch	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.1)	13 (21.4)**
fused lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.8)
hemicentric lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4.7)
lumbar hemivertebra	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)
absent sacral arch	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.2)
fused sacral arch	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)
fused sacral centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.2)
hemicentric sacral centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (3.1)
No. of fetuses with skeletal variations (%)	4 (5.4)	23 (22.0)	17 (24.2)	4 (6.7)	7 (11.0)	21 (38.5)	4 (5.4)*
RIB							
cervical rib	0 (0)	2 (1.9)	2 (3.3)	1 (1.9)	1 (1.8)	1 (2.3)	0 (0)
full supernumerary rib	0 (0)	5 (4.6)	1 (1.5)	0 (0)	0 (0)	6 (13.0)	0 (0)
short supernumerary rib	4 (5.4)	18 (17.3)	14 (19.3)	3 (4.8)	5 (7.9)	15 (25.5)	1 (1.2)*
wavy rib	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4.2)
VERTEBRA							
sacralization of lumbar vertebra	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.3)	0 (0)	0 (0)

Control-A: control group for 0.5, 1 and 2 mg/kg/day groups

Control-B: control group for 4 mg/kg/day group

a) Single administration

Significantly different from control-B group * $P \leq 0.05$, ** $P \leq 0.01$ (Wilcoxon's test)

Table 3. Skeletal findings on live fetuses (Incomplete ossification)

	Control-A	Control-B	0.5 mg/kg/day	1 mg/kg/day	2 mg/kg/day	4 mg/kg/day	4 mg/kg/day ^{a)}
No. of dams	11	16	11	9	11	11	12
No. of fetuses examined	71	105	72	63	66	59	70
No. of fetuses with incomplete ossification (%)	14 (20.0)	53 (50.2)	36 (50.4)	33 (53.8)	47 (74.2)*	57 (96.7)##	66 (95.3)##
craniofenestria	6 (9.1)	0 (0)	2 (3.6)	0 (0)	4 (9.1)	5 (13.6)#	4 (5.2)
incomplete ossification of hyoid	1 (1.8)	9 (8.2)	2 (2.7)	1 (1.9)	0 (0)	6 (10.8)	17 (26.7)#
unossified hyoid	0 (0)	6 (5.0)	3 (5.2)	2 (3.7)	0 (0)	33 (58.0)##	8 (11.1)
incomplete ossification of interparietal	6 (9.1)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	5 (10.5)	5 (7.6)	2 (2.8)
incomplete ossification of nasal	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (9.1)	0 (0)
bipartite ossification of supraoccipital	2 (3.1)	12 (11.8)	19 (25.4)	14 (23.4)*	27 (42.9)*	32 (50.5)##	20 (28.9)
incomplete ossification of supraoccipital	9 (13.0)	16 (15.3)	13 (19.2)	7 (10.6)	15 (23.7)	19 (30.8)	15 (24.3)
unossified supraoccipital	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	4 (12.1)#	0 (0)
bipartite ossification of sternebra	3 (3.9)	18 (16.4)	18 (26.5)	17 (27.8)*	19 (29.3)*	34 (54.3)##	32 (47.2)##
incomplete ossification of cervical arch	0 (0)	0 (0)	1 (1.5)	1 (1.4)	0 (0)	3 (10.6)	1 (1.4)
incomplete ossification of thoracic arch	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (6.1)	0 (0)
incomplete ossification of thoracic centrum	0 (0)	7 (6.4)	5 (7.8)	3 (5.0)	1 (1.5)	9 (17.8)	14 (22.8)#
unossified thoracic centrum	6 (8.9)	25 (23.0)	16 (23.4)	13 (19.6)	10 (16.1)	52 (88.2)##	63 (91.1)##
bipartite ossification of lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	2 (2.8)
dumbbell ossification of lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)
incomplete ossification of lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (1.4)	0 (0)	5 (10.2)#	18 (25.7)##
unossified lumbar centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (4.7)
incomplete ossification of sacral centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	1 (4.5)	1 (1.7)
unossified sacral centrum	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (7.6)	0 (0)
incomplete ossification of ischium	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	3 (10.6)	0 (0)
incomplete ossification of pubis	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	0 (0)	6 (15.1)#	0 (0)

Control-A: control group for 0.5, 1 and 2 mg/kg/day groups

Control-B: control group for 4 mg/kg/day group

a) Single administration

Significantly different from control-B group # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ (Wilcoxon's test)

Table 4. Skeletal findings on live fetuses (Ossification)

	Control-A	Control-B	0.5 mg/kg/day	1 mg/kg/day	2 mg/kg/day	4 mg/kg/day	4 mg/kg/day ^{a)}
No. of dams	11	16	11	9	11	11	12
No. of fetuses examined	71	105	72	63	66	59	70
unossified sternebra	0.1± 0.2	0.1± 0.2	0.3± 0.5	0.3± 0.3	0.2± 0.3	1.5± 1.8\$	0.6± 0.7
incomplete ossification of sternebra	1.4± 0.8	1.1± 0.5	1.1± 0.7	1.2± 0.4	1.5± 0.9	1.4± 0.7	2.0± 0.7##
metacarpal	7.8± 0.6	7.4± 0.7	7.6± 0.8	7.7± 0.4	7.5± 0.7	5.9± 1.3\$\$	6.6± 1.2
fore proximal phalanx	5.9± 2.4	3.0± 2.4	4.6± 3.2	4.5± 2.1	3.6± 2.9	0.1± 0.3\$\$	0.4± 0.7\$\$
fore middle phalanx	0.1± 0.2	0.0± 0.2	0.2± 0.4	0.1± 0.1	0.1± 0.2	0	0
fore distal phalanx	9.0± 3.0	9.0± 2.1	8.8± 2.8	9.6± 0.7	8.3± 3.1	3.3± 3.2##	4.9± 3.9\$\$
metatarsal	9.5± 0.8	9.1± 0.8	9.3± 1.0	9.4± 0.5	9.2± 0.8	6.9± 2.0\$\$	8.0± 0.7##
hind proximal phalanx	5.3± 2.9	1.6± 1.9	3.7± 3.4	3.6± 2.7	1.8± 2.3*	0.1± 0.4\$\$	0.1± 0.3\$\$
hind middle phalanx	0	0	0	0	0	0	0
hind distal phalanx	8.8± 3.0	8.3± 3.5	8.1± 3.7	9.0± 1.2	7.8± 3.3	1.7± 2.6##	3.8± 3.9##
cervical vertebral centrum	2.2± 1.6	1.4± 2.0	1.3± 1.9	1.6± 2.2	0.9± 1.6	0\$	0\$
sacrococcygeal vertebra	8.4± 0.4	8.1± 0.8	8.6± 1.2	8.7± 0.9	8.4± 0.7	6.4± 1.4\$\$	7.1± 1.0##

Control-A: control group for 0.5, 1 and 2 mg/kg/day groups (Mean±S.D.)

Control-B: control group for 4 mg/kg/day group

a) Single administration

Values in parentheses express number of fetuses examined.

Significantly different from control-A group * $P \leq 0.05$ (Dunnett's multiple comparison test)

Significantly different from control-B group # $P \leq 0.05$, ## $P \leq 0.01$ (Student's test)

Significantly different from control-B group \$ $P \leq 0.05$, \$\$ $P \leq 0.01$ (Aspin-Welch's test)

平成27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慢性及び遅発毒性評価法の開発に関する研究

分担研究課題：ナノマテリアルの遺伝毒性評価に関する研究
—マウスを用いる肺小核試験の基礎検討試験—

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
研究協力者： 濱田 修一 株式会社L S I メディエンス
研究協力者： 高沢 博修 株式会社L S I メディエンス
研究協力者： 中川 宗洋 株式会社L S I メディエンス

研究要旨

ナノ物質の中でも、多層カーボンナノチューブ（MWCNT）はその物理化学的性状がアスベストに類似しているため、吸入による肺組織での発がん性が懸念されている。本研究では、MWCNTを吸入曝露させ、in vivoでのナノ遺伝毒性の評価法を開発するため、マウス肺を用いる小核試験法の確立を試みている。今年度は、ブレオマイシン及びEMSを投与して、in vivo-in vitro法による基礎検討試験を行った。雄性C57BL/6NcrSlcマウス（投与時12週齢）にブレオマイシンを50または25 mg/kgの用量で1回静脈内投与し、EMSは200 mg/kgの用量で1回経口投与した。投与後8日目に肺細胞を採取した後、37℃、5% CO₂下で48時間培養した。培養後、細胞を回収してスライド標本を作製し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。その結果、bleomycin及びEMS投与群では媒体対照（生理食塩液）群と比較して肺小核誘発の有意な増加が認められたが、各個体における計測細胞数は予定した2000個に満たなかった。安定的に肺小核試験を実施するためには、計測細胞数を増やすための更なる検討が必要と考えられた。

キーワード：ナノマテリアル、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 μm 以下でかつ長さ 20 μm 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 70-110nm、長さ 1-4 μm) を気管内注入し、肺組織のコメットアッセイ、酸化的 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的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、マウスを用いる肺小

核試験系の開発を試みている。モデル化合物として、ブレオマイシンと EMS を用いた。

B. 研究方法

(1) 被検物質

ブレオマイシン (5 mg/バイアル, 日本化薬株式会社) 1 本当たり、注射用水を 1 mL 加えて溶解し (5 mg/mL)、計 6 本使用した。Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation) 0.5 g をポリプロピレン製チューブに秤量して室温保存していたものに、生理食塩液を加えて、超音波処理により溶解し、最終液量を 25 mL とした (20 mg/mL)。

(2) 動物

日本エスエルシー株式会社より 11 週齢の雄性 C57BL/6NcrSlc (SPF) マウスを 10 匹購入して試験に用いた。検疫期間は動物入荷後 5 日間とし、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。いずれの動物でも一般状態の異常が認められず、自然な体重増加が認められたことを確認し、9 匹を試験に使用した。

(3) 投与

① ブレオマイシン：静脈内投与、50 mg/kg または 25 mg/kg

② EMS：経口投与、200 mg/kg

媒体対照群は静脈内投与を行った。いずれも投与回数は 1 回とした。静脈内投与は、1 mL のディスポーザブルシリンジ及び 27G の注射針を用いて、尾静脈から投与した。

経口投与はマウス用胃ゾンデを装着した 1 mL のディスポーザブルシリンジを用いて強制経口投与した。いずれも 10 mL/kg とし、投与前に測定する体重に基づいて投与液量を算出した。静脈内投与の投与速度は 1 mL/min を目安とした。

群構成は以下の通りとした。

処理群	投与用量 (mg/kg)	投与経路	動物数
媒体対照 (生食)	0	iv	3
Bleomycin	50	iv	1
in	25 *	iv	2
EMS	200	po	3

(4) 細胞分離および培養

投与後、72 時間後に 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. マウス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・放血して安楽死させた。
- ii. PBS(-)溶液で、気管・肺内を満たした後、0.25% トリプシン溶液で置換した。
- iii. 両肺を 50 mL 遠沈管に入れて、37° C 温浴中で 30 分間処理した後、気管及び目視できる気管支を除去して肺組織を細切した。
- iv. 肺組織を 50 mL のデイスボ遠沈管に回収し、牛胎仔血清(FBS)と 250 μ g/mL DNase を含む液を加えて、37° C 温浴中で 10 分間処理した。
- v. ガーゼでろ過した後、1500 \times g、10 分間遠心分離して肺細胞(沈渣)を回収した。
- vi. Percoll の密度勾配(密度 1.089 と 1.040)により遠心分離(2000 \times g, 25 分間、20° C)して、回収した細胞集団を Waymouth 培地で 37° C、48 時間培養した。
- vii. 培養後、3% 酢酸添加エタノール固定液で細胞を回収し、スライドガラスに滴下してスライド標本作製した。

(5) 標本作製(標本染色)及び標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本を DAPI 染色液(10 μ g/mL)で染色して、蛍光顕微鏡下(U 励起)で観察した。
- ii. 肺細胞を数え、小核をもつ細胞の割合を算出した。
- iii. また、AT-II 細胞及び Clara 細胞の識別を試みたが、明確な識別はできなかった。

(6) 統計学的解析、試験結果の評価

肺細胞集団における小核誘発頻度について、媒体対照群とブレオマイシン投与群及び媒体対照群と EMS 投与群との間で、Kastenbaum と Bowman の方法により有意差検定を行った。

評価対象である Clara 細胞及び AT-II 細胞を含む肺細胞集団中にブレオマイシンまたは EMS 投与により媒体対照動物と比較して明らかな小核誘発がみられることにより、適切な試験法を確立できたと判断することとした。

C. 研究結果および考察

(1) 一般状態

一般状態観察の結果を Table 1 に示す。ブレオマイシンを 50 mg/kg の用量で投与した 1 例で、投与直後に軽度な自発運動の低下がみられ、その後回復したが、投与後 3 日以降も軽度な自発運動の低下及び呼吸不整、歩行異常あるいは被毛状態の異常がみられた。その他の動物は実験期間を通じて一般状態に異常はみられなかった。

(2) 体重変化

体重変化を Table 2 に示す。投与前及び解剖前に測定した体重について、媒体対照群ではいずれも同等に推移し、平均体重は

同じであった。これに対してブレオマイシン及び EMS 投与群では、1 例は同等であつ

たが、その他の動物では減少し、1例は顕著に減少した。また、平均体重も両群ともに投与前と比較して解剖前に減少した。

(3) 肺小核の出現頻度

小核をもつ肺細胞の出現頻度の結果を Table 3 に、顕微鏡写真を Fig. 1 に示す。

いずれの個体でも 2000 個の評価対象肺細胞を数える予定であったが、形態学的に AT-II あるいは Clara 細胞と思われる評価対象肺細胞は 2000 個未満であった。これはマウスから回収可能な評価対象肺細胞の絶対数が少ないことによることが一つの原因と考えられた。一方、試験施設で実施したマウス肺小核試験では十分な数の評価対象肺細胞が採取されたことから、細胞分離、細胞培養を経て回収されるまでに、死滅などにより評価対象肺細胞が消失している可能性が考えられた。

ブレオマイシン及び EMS 投与群では、媒体対照群と比較して小核をもつ細胞数は有意な高値を示した。しかしながら、計測できた細胞数が予定計測数の 2000 個に満たなかったことから、肺小核試験を正しく評価する試験法として確立するためには測定対象細胞数を増やすための検討が必要と考えられた。なお、本試験では細胞培養前に細胞生存率は測定しなかった。

作製した肺細胞スライド標本では細胞分裂像が認められることから (Fig. 1 A)、in vitro 系での細胞培養期間中にも、肺細胞がある頻度で分裂していたことが示唆されたが、確認できた細胞分裂像の出現頻度は極僅かであった (数値は未表示)。なお、標本観察の結果、AT-II 及び Clara 細胞を明確に識別することはできなかったが、これらの細胞とは形態学的に明らかに異なる細胞が多数混在していることが確認された (Fig. 1 B~D)。

ブレオマイシン及び EMS 投与群では肺小核

誘発の有意な増加が確認されたが、評価対象肺細胞が少ないことは安定的に肺小核試験を実施する際の支障となる可能性がある

り、その要因として動物種、投与条件 (回数、細胞回収までの期間)、細胞培養条件 (期間等) 等が影響していることが考えられ、これらについてさらに検討が必要と考えられた。

(4) 特記事項

ブレオマイシン投与群の動物番号 10201 は、50 mg/kg の投与用量で投与を行ったが、他の 2 匹の動物は半量の 25 mg/kg を投与した。この理由として、動物番号 10201 の投与直後から予想していなかった毒性症状 (軽度な自発運動の低下) が確認されたことによる。通常の毒性試験であればこの症状のみで用量を低下させるものではないが、ICR マウスでは 100 mg/kg の用量を静脈内投与することにより肺線維症モデルを作製しており、通常一般状態には異常は確認されない。本試験ではこの情報が 50 mg/kg の設定根拠にもなっていたが、本試験の結果からブレオマイシンに対するマウスの感受性に系統差があることが示唆された。その後 10201 の動物は、症状が悪化し、体重も顕著に減少していることから、本試験で使用した系統のマウスを用いて同様の実験を行う場合は 50 mg/kg の投与用量は妥当ではないと考えられた。

D. 結論

マウスを用いる肺小核試験の標準的実験法を確立するために、ブレオマイシン及び EMS を投与して、in vivo-in vitro 法による基礎検討試験を行った。雄性 C57BL/6NcrSlc マウス (投与時 12 週齢) にブレオマイシンを 50 または 25 mg/kg の用量で 1 回静脈内投与し、EMS は 200 mg/kg の用量で 1 回経口投与した。投与後 8 日目

に肺細胞を採取した後、37℃、5% CO₂ 下で48時間培養した。培養後、細胞を回収してスライド標本を作製し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。その結果、ブレオマイシン及びEMS投与群では、媒体対照（生理食塩液）群と比較して、肺小核誘発の有意な増加が認められた。しかしながら、各個体における計測細胞数は予定した2000個に満たなかった。安定的に肺小核試験を実施するためには、計測細胞数を増やすための更なる検討が必要と考えられた。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M; Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes and Environment* 37, 6 (2015).

2. 学会発表

Honma M : Trend and Progress of OECD Genotoxicity Testing Guidelines. 39th Annual Meeting of Environmental Mutagen Society in India 2015年5月 インパール・インド

本間正充 : OECDテストガイドラインの変更点. JEMS・MMS研究会 第66回定例会 2015年6月 那須

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1. Clinical signs

Treatment group	Dose Level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Day1		Day2	Day3	Day4	Day5	Day6	Day7	Day8 Before sampling
			Pre-dose	Post-dose							
Physiological saline	0	10101	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	i.v.	10102	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Once	10103	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Bleomycin	50/25 *	10201	-	Di(1)	-	-	Di(1) Ir	Di(1) Ir	At Ag Di(1) Ir	At Di(1)	At Di(1)
	i.v.	10202	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Once	10203	-	-	-	-	-	-	-	-	-
EMS	200	10301	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	p.o.	10302	-	-	-	-	-	-	-	-	-
	Once	10303	-	-	-	-	-	-	-	-	-

* The animal (No. 10201) was administered at 50 mg/kg, and other two mice were dosed at 25 mg/kg in this group.

EMS: Ethyl methanesulfonate

- No abnormality

Di: Decrease in locomotor activity, Ir: Irregular respiration, At: Abnormal faeces, Ag: Abnormal posture

Once: (1) Slight

Table 2. Body weight changes

Treatment group	Dose Level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Body weight (g)	
			Before dosing (Day 1)	Before sampling (Day 8)
Physiological saline	0	10101	25.2	25.4
	i.v.	10102	25.8	25.2
	Once	10103	27.1	27.5
		Mean ± S.D.	26.03 ± 0.97	26.03 ± 1.27
Bleomycin	50/25 *	10201	24.7	17.7
	i.v.	10202	25.0	24.9
	Once	10203	24.3	21.2
		Mean ± S.D.	24.67 ± 0.35	21.27 ± 3.60
EMS	200	10301	24.9	23.7
	p.o.	10302	24.6	22.9
	Once	10303	24.2	23.5
		Mean ± S.D.	24.57 ± 0.35	23.37 ± 0.42

EMS: Ethyl methanesulfonate

* The animal (No. 10201) was administered at 50 mg/kg, and other two mice were dosed at 25 mg/kg in this group.

Table 3 Results of the lung micronucleus assay in mice

Treatment group	Dose Level (mg/kg) Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Physiological saline	0	10101	1263	0	0.00
	iv.	10102	1591	1	0.06
	Once	10103	1687	1	0.06
	Total / Mean \pm S.D.		4541	2	0.041 \pm 0.035
Bleomycin	50/25*	10201	905	5	0.55
	iv.	10202	1622	7	0.43
	Once	10203	1477	4	0.27
	Total / Mean \pm S.D.		4004	16 ⁼⁼⁼	0.418 \pm 0.141
EMS	200	10301	1228	4	0.33
	p.o.	10302	1475	5	0.34
	Once	10303	1539	5	0.32
	Total / Mean \pm S.D.		4242	14 ⁼⁼⁼	0.330 \pm 0.008

EMS: Ethyl methanesulfonate

* The animal (No. 10201) was administered at 50 mg/kg, and other two mice were dosed at 25 mg/kg in this group.

=== $p < 0.01$ (Kastenbaum and Bowman's method)

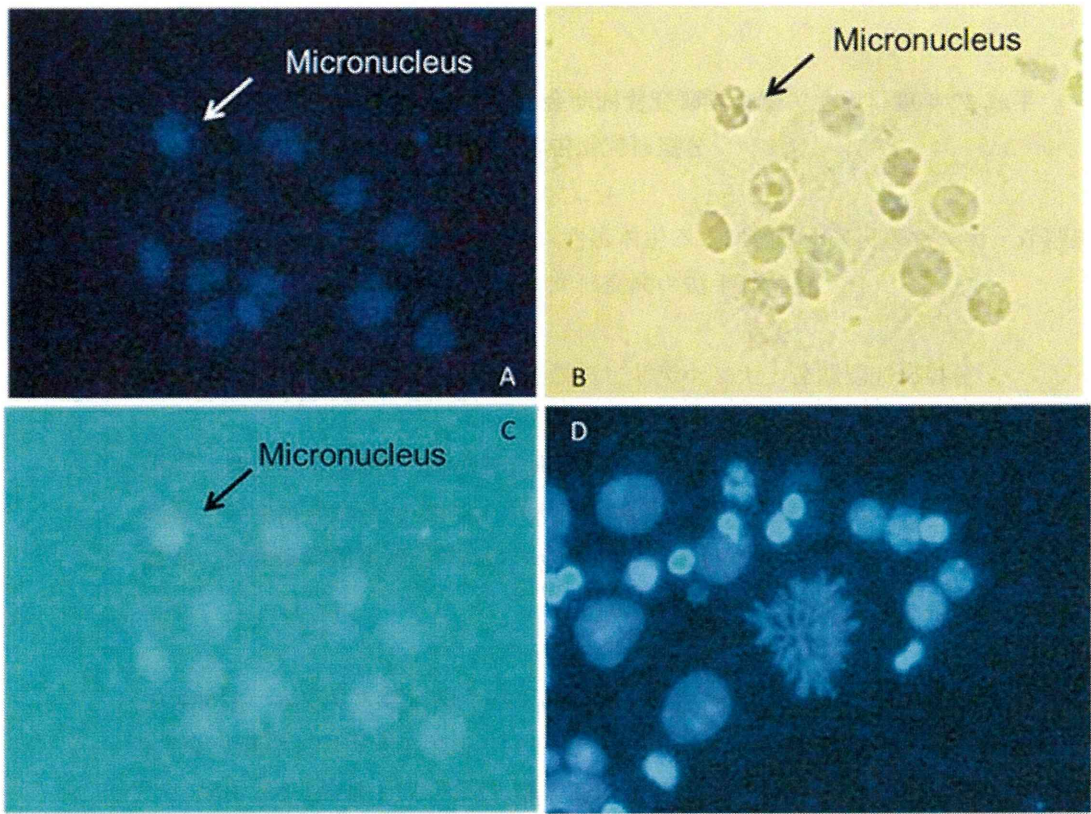


Fig. 1 Microscopic observation of mouse lung cells collected 48 h post-incubation