

図10

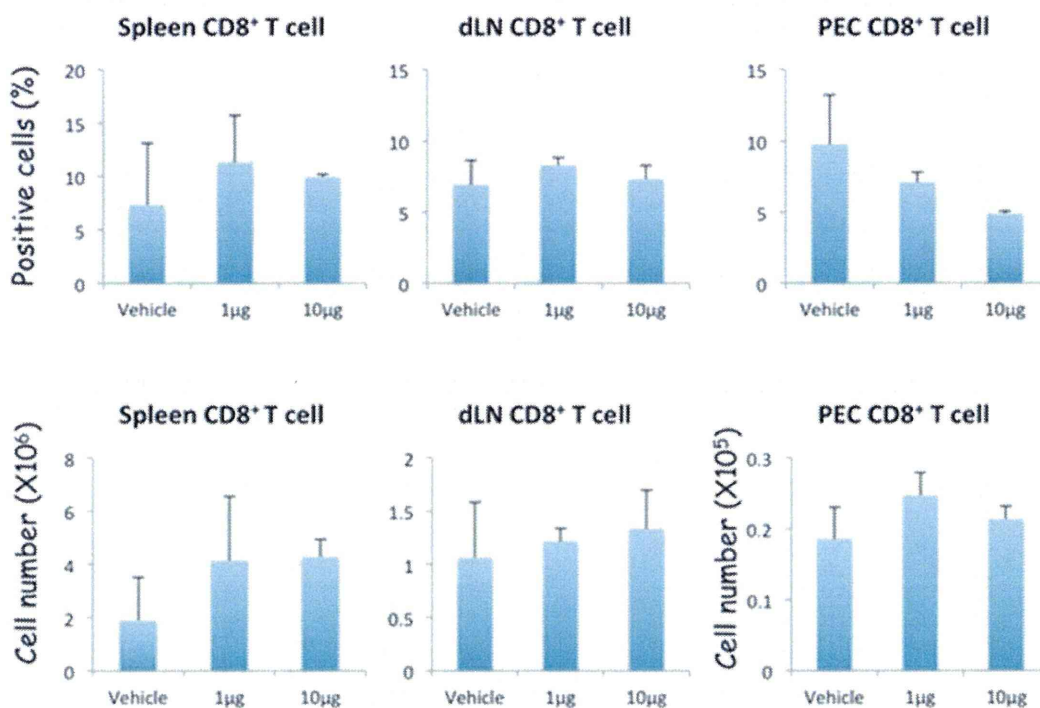


図10 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカ(CD8-APC, CD62L-FITC, CD44-PE)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析後のCD8⁺T細胞の割合と細胞数を示す。

図 11

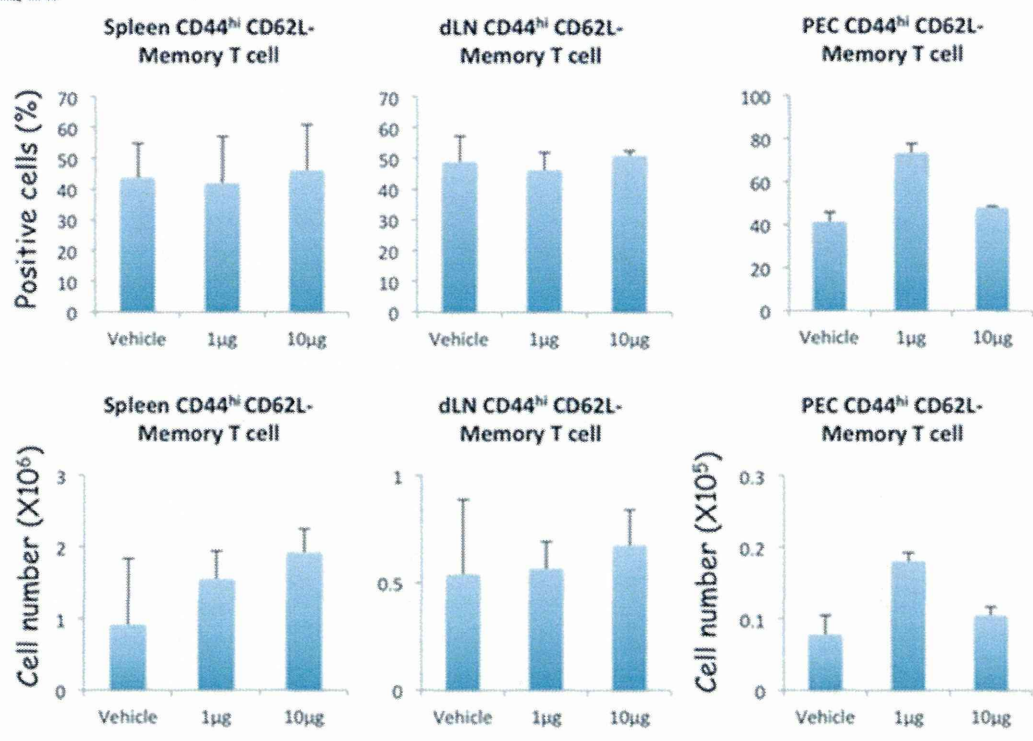


図11 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD8-APC, CD62L-FITC, CD44-PE)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析後のMemory CD8⁺T細胞の割合と細胞数を示す。

図12

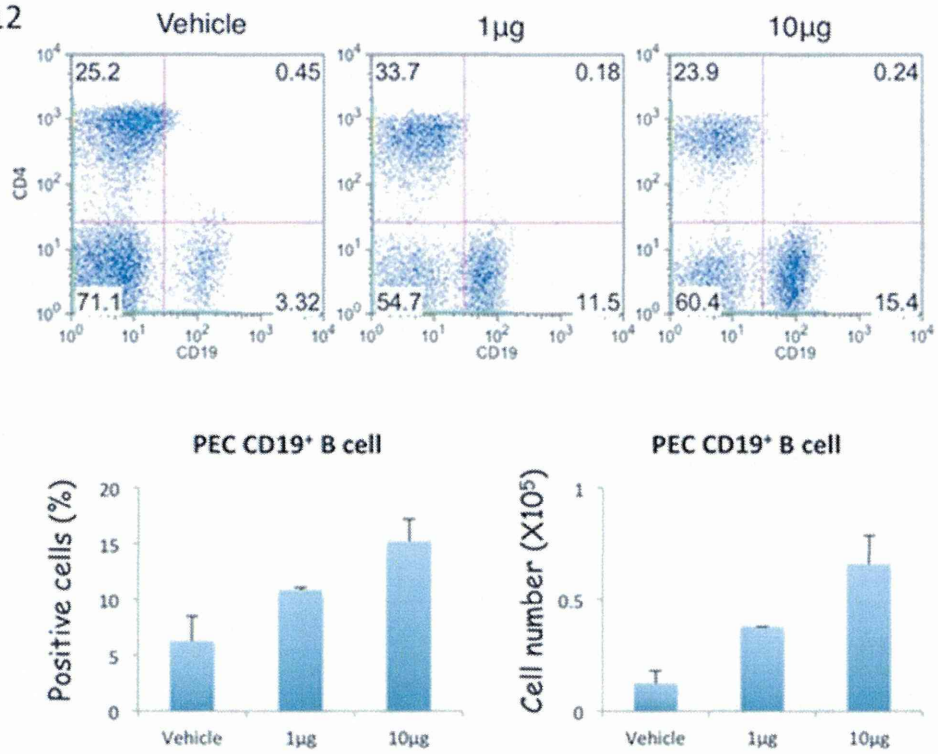


図12 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD4-PE-Cy7, CD19-APC-Cy7)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析した。

図13

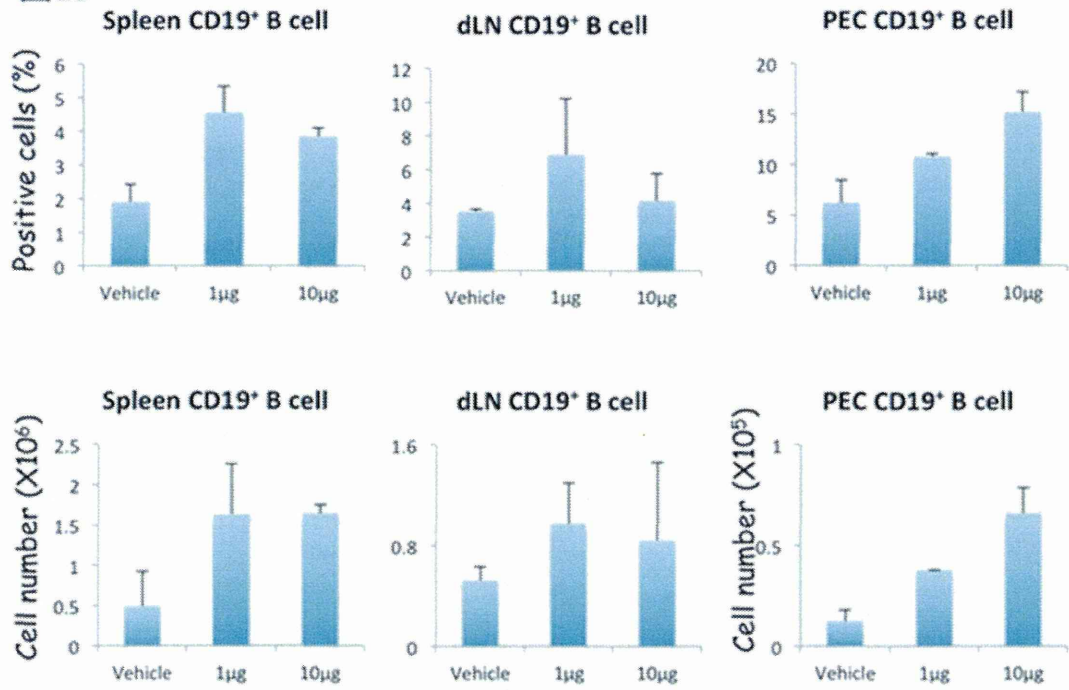


図13 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の脾臓、腸管間リンパ節、腹腔内渗出細胞から細胞を回収しリンパ球表面マーカー(CD4-PE-Cy7, CD19-APC-Cy7)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析後のCD19⁺T細胞の割合と細胞数を示す。

図14

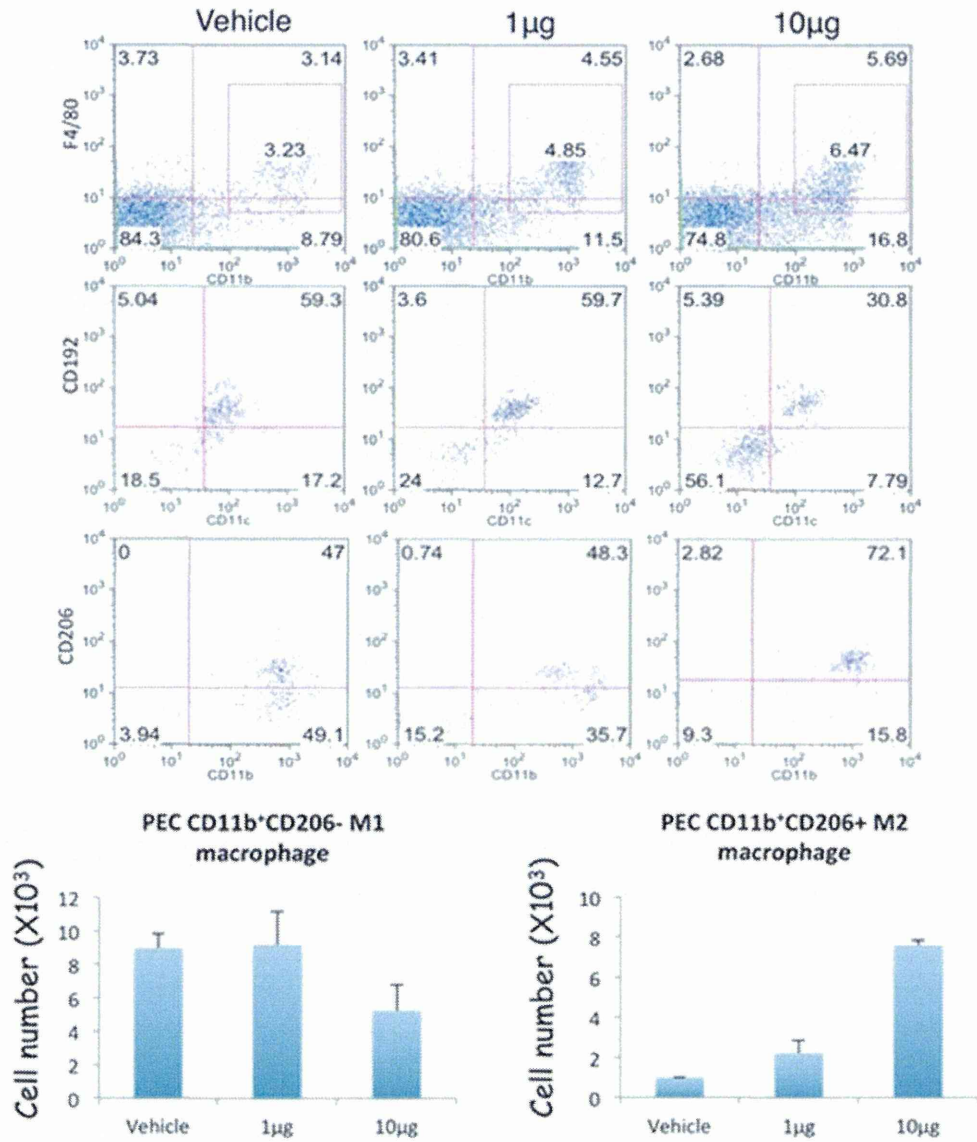


図14 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の腹腔内滲出細胞から細胞を回収しマクロファージ表面マーカー(CD11b-PE-Cy7, F4/80-APC-Cy7, CD192-APC, CD11c-PE, CD206-FITC)に対する抗体にて染色後フローサイトメーターにて解析した。M1マクロファージおよびM2マクロファージの割合と細胞数を示す。

図15

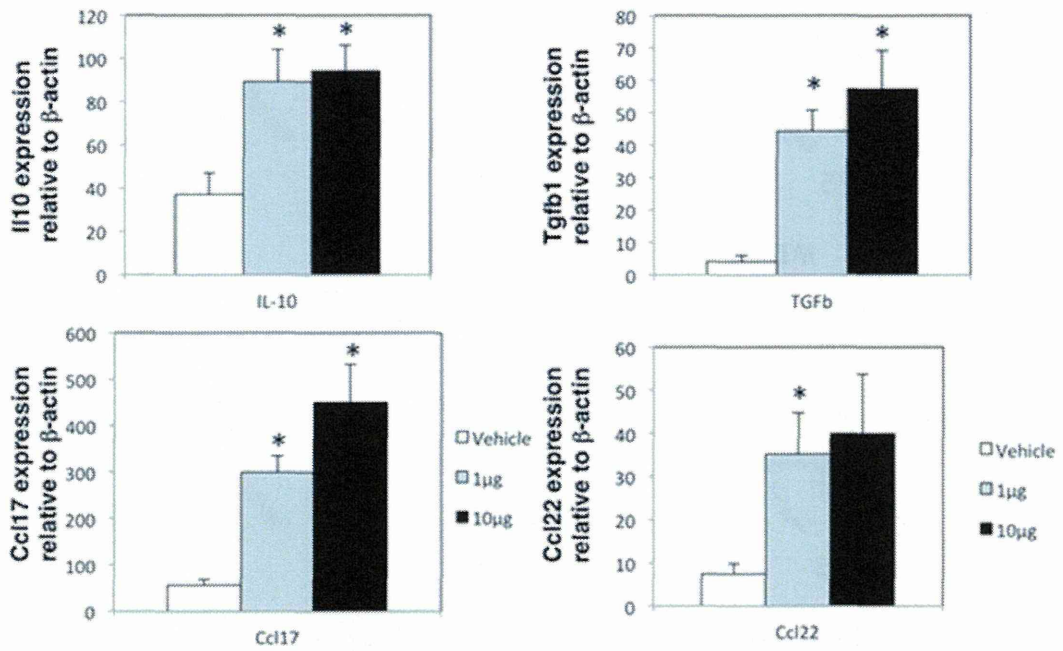


図15 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の腹腔内渗出細胞からRNA抽出キットを用いて全RNAを抽出後、逆転写反応によりcDNAを得た。PCR反応によって各遺伝子mRNAを定量化した。

図16

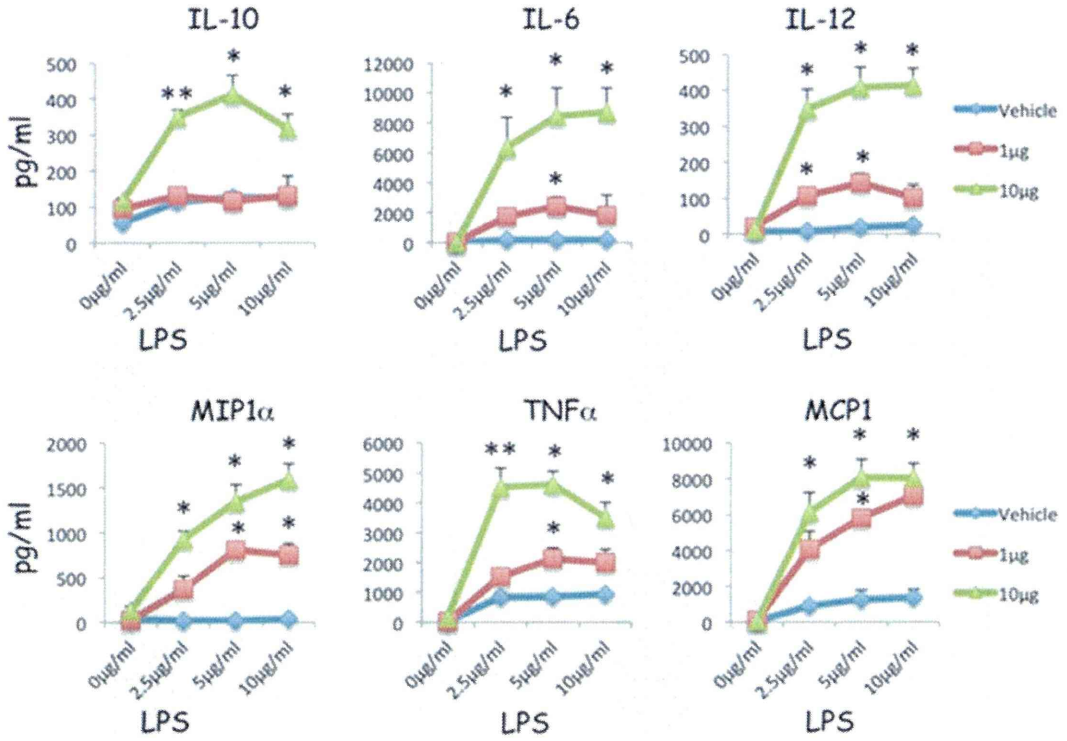


図16 MWCNT投与マウス(MRL/lpr)の腹腔内滲出細胞をLipopolysaccharide(LPS; 0-10μg/ml)添加で24時間培養後、培養上清中のサイトカイン・ケモカインに関してマルチプレックスキットにて定量解析した。MWCNT投与により、IL-10、IL-6、IL-12、MIP1α、TNFα、MCP1の産生が有意に亢進することが明らかとなった。

図17

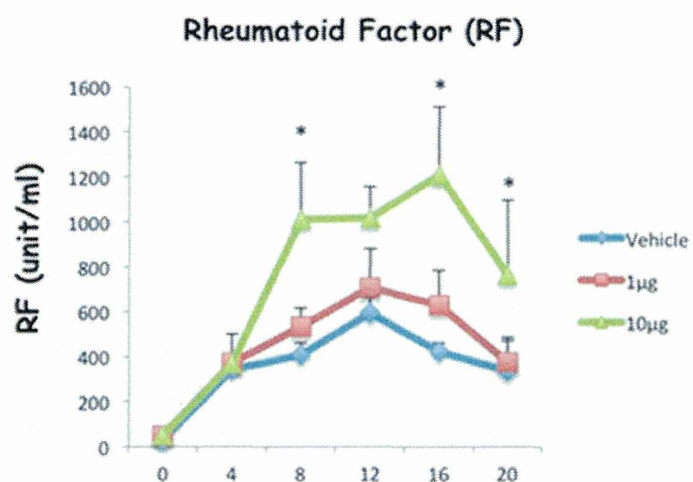


図17 血清を用いて、リウマチ因子(RF)をELISA法にて定量化した。MWCNT投与後2ヶ月以降での血清中のリウマチ因子の有意な上昇が認められた。

図18

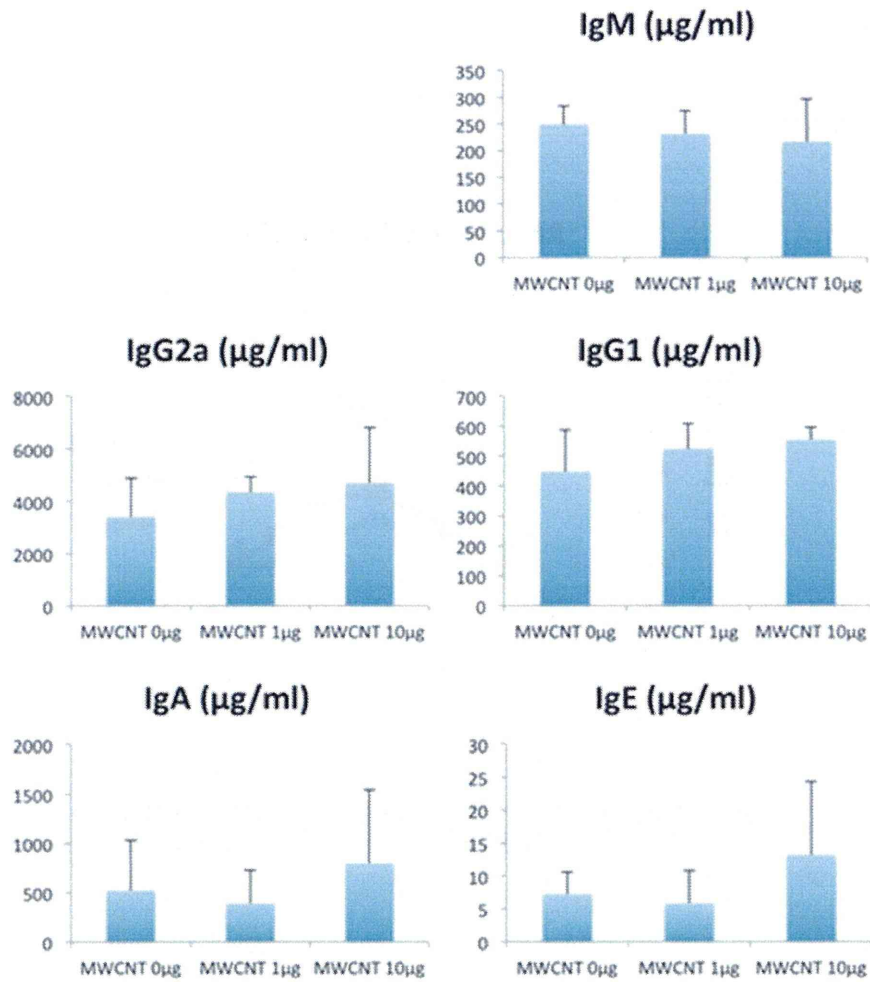


図18 血清を用いて、イムノグロブリン抗体 (IgM, IgG2a, IgG1, IgA, IgE) を ELISA法にて定量化した。MWCNT投与による抗体量の変化は認められなかった。

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

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名：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

分担研究者：最上 知子 国立医薬品食品衛生研究所 生化学部 部長

研究要旨

NLRP3 インフラマソームは様々な慢性炎症病態に関与することが明らかにされている。本研究では、長さや径の異なる各種多層カーボンナノチューブ (MWCNT) について、マクロファージにおける NLRP3 インフラマソームを介する炎症性サイトカイン IL-1 β 産生促進能を評価した。MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 はいずれも強力な IL-1 β 産生を促進し、これらの MWCNT による IL-1 β 産生には、NLRP3 と caspase-1 を含むインフラマソーム、ならびにリソソーム酵素 cathepsin B が関与することを明らかにした。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルとして用いられる多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は、アスベストと似た形状を持ち、ヒトへの健康影響が懸念されている。暴露され体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の食食系細胞が異物として処理にあたる。炎症は免疫応答を誘導して病原体などの異物を排除する生体防御反応である。本研究ではナノマテリアルの食食系細胞内での挙動を追跡し、インフラマソーム活性化を介した炎症の慢性化機構を明らかにし、慢性影響の評価につなげることを目的とする。

これまでの研究において、針状の多層カーボンナノチューブ MWCNT-M および MWCNT-SD1 ならびに類似針状形状の焼結フラーレンナノウイスキー L (HTCFNW-L) をマクロファージに暴露すると、炎症性サイトカイン IL-1 β の産生が亢進すること、その過程には NLR pyrin

domain containing 3 (NLRP3)インフラマソーム活性化を介すること等を明らかにしている。NLRP3 は様々な慢性炎症疾患に関与することが最近明らかにされており、また IL-1 β は免疫細胞の活性化や炎症応答の誘導などの多彩な役割を有している。MWCNT が排除されずに細胞組織に滞れば、炎症が慢性化することが懸念される。

今年度は長さや径が様々な MWCNT を対象に、インフラマソーム活性化の活性とその機構を解析した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究では以下の多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を使用した。MWCNT-WL (長さ 0.5-10 μ m、径 85-200 nm) ならびに MWCNT-WS (長さ 0.5-2 μ m、径 40-70 nm) は和光純薬工業 (株) より、MWCNT-T (長さ数 10-数 100 μ m、径 70-150 nm) は T 社

より入手した。MWCNT-SD1 (平均長 4.51 μm , 径 150 nm) は S 社より、MWCNT-M (平均長 3.3 μm , 径 40-50 nm) は三井物産より提供された。

サイトカイン測定にはミリポア社の MILLIPLEX™ MAP アッセイキットを用いた。Stealth™ Select RNAi (NLRP3) および Stealth RNAi negative control は Invitrogen 社から購入した。

2. MWCNT の分散

MWCNT-SD1、-WL、-WS、および-T は 0.5% Tween 20 を含む PBS に 5 mg/mL の濃度で懸濁し、1~5 分間バス型超音波発生装置での処理、ピペッティング、25G シリンジを通過し分散した。

3. マクロファージ系細胞からの IL-1 β 放出の測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μM PMA と 10%FCS を含む RPM1 培地中で 72 時間培養してマクロファージ様に分化し、さらに PMA を除いた培地中で 24 時間培養したのちに、分散 MWCNT あるいは対照となる溶剤を培地に添加し 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.002% とした。培養上清を回収後、MILLIPLEX™ MAP アッセイを用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

4. RNA 抽出および定量的リアルタイム RT-PCR

細胞から RNA は RNeasy Mini Kit を用いて抽出し DNase 処理を行った。TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems) と ABI Prism 7300 を用いて定量的リアルタイム RT-PCR を行った。発現量データは 18S rRNA の量で補正した。

C. 研究結果

1. 各種 MWCNT による IL-1 β 産生の促進

MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 を 3、6、10 $\mu\text{g/mL}$ の濃度で THP-1 マクロファージに暴露すると、濃度依存的な IL-1 β 放出促進が認められた。MWCNT-SD1 が最も強い効果を示し、-T も SD1 にほぼ匹敵する効果を示した。MWCNT-WL および-WS の効果はやや減弱したが、今回用いた MWCNT はいずれも IL-1 β 産生を促進することが判明した。

MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 (10 $\mu\text{g/mL}$) による IL-1 β の放出は、cytochalacin D (0.2 μM) 前処理により食食を阻害するとほぼ完全に消失した。したがって、各 MWCNT は細胞に食食されて IL-1 β 放出活性を発揮することが判明した。

2. 各種 MWCNT による NLRP3 インフラマソームを介する IL-1 β 産生促進

これまでの研究において、MWCNT-M、-SD1 および HTC FNW-L による IL-1 β 産生には、Nod 様受容体の一つ NLRP3 インフラマソームが関与することを明らかにしている。引き続き MWCNT-WL、-WS および-T による IL-1 β 分泌においても NLRP3 が関与するかどうか、特異的 siRNA を用いて NLRP3 をノックダウンし検証した。NLRP3 siRNA (#2) 処理により細胞内の NLRP3 mRNA の発現量は negative control siRNA (GC high) の 20% にまで低下した。このとき MWCNT-SD-1 (10 $\mu\text{g/mL}$) による IL-1 β 分泌は対象の 10% にまで、MWCNT-WL、-WS および-T (10 $\mu\text{g/mL}$) による IL-1 β は対象の 8%、7% および 6% にまで低下した。したがって、これらの

MWCNT が引き起こす IL-1 β 分泌には NLRP3 が関与することが示された。

IL-1 β は、インフラマソームがシグナルを受けると caspase-1 が自己切断され、活性型の caspase-1 が IL-1 β 前駆体を切断して産生されることが知られている。Caspase-1 特異的阻害剤の z-YVAD-FMK(10 μ M)で細胞を前処理したところ、MWCNT-SD-1、-WL、-WS および-T (10 μ g/mL) による IL-1 β は対象の 4%、3%、3%および 1%にまで低下した。したがって、各 MWCNT による IL-1 β 分泌には caspase-1 が関与することが判明した。

またアスベスト様の針状化合物は細胞に貪食されるとエンドソーム・リソソーム膜を破壊し、リソソーム酵素カテプシン B の漏出が NLRP3 インフラマソーム活性化を導く可能性が示唆されている。そこでカテプシン B 阻害剤である CA-074Me(10 μ M)の影響を検討したところ、MWCNT-SD-1、-WL、-WS および-T (10 μ g/mL) による IL-1 β を対象の 30%、15%、40%および 40%にまで低下させることが判明した。

D. 考察

昨年度までの研究において、各種多層カーボンナノチューブ MWCNT および高温焼結フラーレンナノウィスカー-HTCFNW をマクロファージに暴露すると、針状の形状と長さに依存して炎症性サイトカイン IL-1 β 、IL-6 および IL-1 α の放出を促進することを明らかにした。さらにこれらのナノチューブ類は細胞に貪食された後、Nod 様受容体 NLRP3 を含むインフラマソームを活性化することを、NLRP3 の siRNA によるノックダウンおよび caspase-1 阻害剤

を用いて明らかにしている (表 1)。今年度は多様な長さや径を有する様々な MWCNT について、IL-1 β 産生能を明らかにし、インフラマソーム活性化の関与と機序を解析した。

インフラマソームは IL-1 β 産生シグナルの受容・伝達を担うタンパク質と IL-1 β 前駆体切断を担うカスパーゼ 1 前駆体の複合体である。本研究により、各 MWCNT が誘導する IL-1 β 産生促進には NLRP3 インフラマソームとその構成成分であるカスパーゼ 1 の活性が必要であることが示された。

NLRP3 は病原毒素やアスベスト等の外来性因子、コレステロール微細結晶や細胞外 ATP などの内因性の因子により活性化され、IL-1 β および IL-18 の産生を促進し、炎症応答の中心として様々な病態に関与することが明らかになっている。内外の多様なシグナルを NLRP3 が認識して活性化される機構は明らかではないが、異物貪食に伴うリソソームの破壊によるカテプシンの細胞質への放出の関与が示唆されている。本研究により、リソソーム酵素カテプシン B の阻害剤が効果的に IL-1 β 産生を抑制することが示されたことから、針状の形状を持ち数 μ m 長の MWCNT は細胞により貪食された後にもリソソーム内で分解されず、リソソームの破壊を引き起こした可能性が推定される。

NLRP3 が誘導する炎症応答は慢性炎症疾患と深く関与することが明らかにされている。炎症は免疫応答を誘導して病原体を排除する生体防御反応であるが、排除に失敗し炎症が慢性化すると、多様な疾患の要因となる可能性がある。本研究において、針状で一定の長さの MWCNT は NLRP3 の活

性を介して炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を促進する機構が明らかにされた。したがってこれらの MWCNT が炎症病態を誘導する可能性が示唆される。

E. 結論

様々な長さ・径をもつ MWCNT が NLRP3 を含むインフラマソームを活性化して炎症性サイトカイン IL-1 β 産生を促進する能力を持つことを明らかにした。また MWCNT の熱処理や Taquann 法での分散は、マクロファージからの IL-1 β 産生促進能に顕著に影響しないことが判明した。

E. 健康危機情報

特になし










F. 研究発表

なし

G. 知的所有権の取得状況

該当なし

表1. 各種MWCNTによるインフラマソーム活性化

	MWCNT-M	MWCNT-N	MWCNT-SD1	MWCNT-SD2	MWCNT-WL	MWCNT-WS	MWCNT-T	HTCFNW-L	HTCFNW-S
									
Length	Ave: 3.3 μm	Ave: 3.5 μm	Ave: 4.51 μm	(3 μm)	0.5-10 μm	0.5-2 μm	約10~ 約100 μm	7.6 ± 4.5 μm	1.8 ± 0.8 μm
Diameter	50-80 nm	50-80 nm	(150 nm)	(10-15 nm)	85-200 nm	40-70 nm	20-100 nm	586 nm	365 nm
inflammation									
IL-1β secretion	+++*	+/-	+++*	+	++	++	+++(+)	+++*	+
Phagocytosis	Cytochalasin D (inhibitor)	Inhibition*	Inhibition		Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition*	Inhibition*
	FACS	○*	○*	×*				○*	○*
Lysosomal cathepsin B	CA-074Me (Inhibitor)	Inhibition	90-70% Inhibition		85% Inhibition	60% Inhibition	60% Inhibition	40% Inhibition	
inflammasomes									
NLRP3	siRNA knockdown	Inhibition*	Inhibition		Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition*	
caspase-1	zYVAD-fmk (inhibitor)	Inhibition*	Inhibition		Inhibition	Inhibition	Inhibition	Inhibition*	

 今年度の成果

* Cui et al., *Biochem Biophys Res Commun* 2014; 452 : 593-9

研究課題名：ナノマテリアル曝露による慢性及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの慢性影響および生殖発生毒性評価系に関する研究

研究分担者：	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	部長
研究協力者：	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		特任教授
	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
	小野 敦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	室長
	平田 睦子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	高橋 美加	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	松本 真理子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	加藤 日奈	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	川村 智子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	小林 克己	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	松島 裕子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	山口 治子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	五十嵐智女	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	江馬 眞	国立医薬品食品衛生研究所		客員研究員

研究要旨

本研究では、ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性及び遅発毒性に関わる研究の一環として、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与および気管内投与による発がん性と、催奇形性について解析を行っている。27年度は、MWCNTの腹腔内投与によるラット中皮腫誘発過程の経時的な腹腔洗浄液のサイトカインレベルの測定および、3種のMWCNTの単回噴霧投与による終生飼育実験の経過観察を行った。また、MWCNT気管内投与における催奇性において投与するMWCNTの加熱処理に対する影響を検討した。その結果、MWCNT腹腔内投与後8から32週目の腹腔内洗浄液のサイトカイン濃度において、急性炎症反応と別にサイトカインを介した持続的な反応が起こっていることが示され、3種のMWCNTによる単回経気管噴霧投与では、各MWCNT群で胸腔内及び腹腔内に単発的な腫瘍結節の発現を肉眼的に確認した。また、MWCNTによる催奇形性はMWCNTを加熱処理(250℃、2時間)することでその作用が弱まることが新たに示された。MWCNTの単回気管内投与の終生観察研究で得られた肉眼所見の病理組織学的検討と、MWCNTの加熱処理による発生異常のメカニズムを解析する必要があることが示された。

A. 研究目的

新素材として一般消費者向けにも使用されている産業用ナノマテリアルについては、物理化学特性が従来の粒子とは異なることから、未知のヒト健康影響がもたらされる可能性と共に、既存の毒性試験法がその評価に適切かどうかについて問題視されている。これまで、およそ10年近くにわたりOECDや各国がこの問題に取り組んできており、ナノマテリアルの特性に配慮した毒性試験用サンプル分散法や、試験ガイドラインの改訂の必要性が示されつつあるものの、ナノマテリアル特有の多様な物理特性に応じた体系的な評価アプローチが見いだせずにいる状況である。一方、我々は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、*in vivo* 試験研究を中心に進めており、形状的にアスベストに類似した多層型カーボンナノチューブ(MWCNT)が中皮腫誘発性を持つことを明らかにしてきた。さらにこれまでの研究で、*in vivo* 影響を解析することにより、効率的な*in vitro* 試験系の改良や評価に有効なマーカー探索のための知見が集積しつつあり、未知の物質の評価手法の確立には、*in vivo* から*in vitro* 系への研究展開が重要であることを示してきた。本研究では、ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性及び遅発毒性に関わるメカニズム解析研究を目的として、MWCNTの腹腔内投与および気管内投与による発がん性と、催奇形性について解析を行っている。

B. 研究方法

MWCNTによるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

26年度は、MWCNTの腹腔内投与により誘発されるラット腹腔内中皮腫について、そ

の発現前から発現までの病理組織学および免疫学的な性状を継時的に計測した。F344/DuCr1Cr1j, 雄ラットを用い、MWNT-7を2%CMC溶液に懸濁分散させ、1mg/kg体重の用量で腹腔内単回投与した。8・16・24・32週間目後に各々10匹から15匹を解剖し、病理学的検索と、腹腔洗浄液のサイトカイン類(IL-1 β ・4・6・8・10・12, MCP-1, TNF- α , IFN- γ)およびメソテリンの濃度測定を行った。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管噴霧単回投与及び投与後終生飼育実験

MWCNTをF344, 雄ラットに経気管単回噴霧投与及びさらに投与後終生飼育実験を行い、投与後長期間に亘って体内に滞留するMWCNTの呼吸器系及び体腔中皮への影響、また加齢に伴って発現する腫瘍性及び非腫瘍性病変発現に対する影響について病理組織学的に観察した。F344/DuCr1Cr1j, 雄ラット, 10週齢を用い、MWCNTは、3種のMWCNT; {MWNT-7: 平均長, 6.65 μ m, 径, 66.8nm; SD-1: 平均長, 4.51 μ m, 径, 177nm; SD-2: 長さ3 μ m, 径10-15nm(提供企業データ)}を用いた。各MWCNTは2%CMC溶液に懸濁分散させ、0.25mg/kg体重の用量で経気管噴霧単回投与した。動物はいずれも投与後終生飼育し、途中死亡例及び瀕死屠殺例について、解剖および肉眼的所見観察を行った。

MWCNT気管内投与による発生毒性の熱処理による影響

妊娠9日目のICR(IGS)マウス(Cr1:CD1)に非加熱処理したMWCNT-7と

250°Cで2時間加熱処理 MWCNT-7 を2% CMC-Na 水溶液に懸濁して、4mg/kg の用量で単回気管内投与を行った。母動物については、気管内投与前と2時間後の体温を測定すると共に、投与後2時間および妊娠18日目の血液検査を行った。生殖パラメータや外表異常などの発生毒性指標の検査は、妊娠18日目に行った。

C. 研究結果

MWCNT によるラット中皮腫誘発過程の経時的観察

投与8週間後では肝臓や脾臓などの臓側腹膜にMWCNTを含む肉芽腫の形成が認められ、16週間後では中皮細胞増生を伴う腹膜肥厚が一部で観察され、24および32週間後では中皮腫が散見された。血性腹水の貯留は認めなかった。腹腔洗浄液において、IL-6は経時的に減少したが、IL-8およびMCP-1は観察期間を通じて有意に高値を示し、経時的な変化が明らかでなかった(図1)。また、腹腔洗浄液内のメソテリン濃度は、各週齢で投与群と比較して有意に高値を示したが経時変化の傾向は明らかでなかった(図2)。

ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の経気管噴霧単回投与及び投与後終生飼育実験

投与後136週(146週齢)を経過し、各群の途中解剖動物は、対照群:13/15, M群:11/15, SD-1群:14/15, SD-2群:15/15であった。投与後104週までの体重及び生存率には、対照群と各投与群間で顕著な差はなかった。解剖時の肉眼的観察では、各投与群で、縦隔リンパ節及び肺表面にMWCNT

の沈着と思われる黒色点が認められ、摂取されたMWCNTは投与後130週を経過しても、体内に滞留し続けるものと考えられた。また投与群にのみ見られた所見では、胸腔内及び腹腔内に中皮腫を思わせる腫瘍結節の発現が見られたが、いずれも各MWCNT群で単発的な発現であった(表1)。対照群と共通した変化としては、単核細胞白血病と思われる脾腫、精巣間細胞腫、下垂体腫瘍及び乳腺部皮下腫瘍などが認められた。

MWCNT 気管内投与による発生毒性の熱処理による影響

MWCNTの気管内投与後2時間後には、加熱処理の有無にかかわらず、母動物の体温の有意な低下が認められたが、白血球数等への影響は認められなかった(表2)。胎児への影響については、以前の報告と同様に4mg/kgの非加熱処理MWCNT-7の投与により妊娠18日目の胎児の体重減少、外表異常および骨格異常の増加が観察された。しかし、加熱処理したMWCNT-7を4mg/kg投与した時の胎児体重は、対照群に比べて減少傾向はあるものの有意な変化では無かった。一方、外表異常と骨格異常は1例ずつしか認められずほぼ対照群と同レベルとなっていた(表3)。

D. 考察

腹腔内投与におけるサイトカインの解析では、投与後短期間に増加するもの長期間にわたって持続するものが認められ、急性炎症反応と別にサイトカインを介した持続的な反応が起こっていることが明らかになった。今後、より詳細な解析を実施し、中皮腫発症とこれらの物質の関係性を経時的

に記載する必要があることが示された。

終生観察試験は、まだ最終観察は終了していないので、結論は下せないが、腹腔内投与のように高頻度で中皮腫が発生する様な状況でないことが示された。今後、肺内に長期間滞留・沈着した MWCNT 繊維の分布状態とその周囲の組織の反応、肺以外の臓器における MWCNT 繊維の沈着及び作用、肉眼的に観察された胸腔及び腹腔内病変の性状及び自然発生による腫瘍性／非腫瘍性病変の発現への影響について、病理組織学的観察が必要である。

MWCNT を妊娠動物に腹腔内投与したときは、母動物に体温低下が認められたが、気管内投与では白血球数に有意な変化は認められなかった。これは、気管内投与による炎症性安全性予測評価部性の変化はの変化が白血球数に影響するほど強いものではないことを示している。しかし、MWCNT-7 の気管内投与でも催奇性は観察されているので、そのメカニズムは白血球数の変化を引き起こす炎症性反応との関連性が少ないものと考えられた。一方、今回 MWCNT-7 を投与前に加熱処理（250℃、2 時間）するとその催奇形性能が減弱することが示された。これは、加熱処理により引き起こされた何らかの MWCNT の変化が、催奇形性に関連していることを示唆した。しかし、光顕レベルでは形状等にそれほど大きな違いは認められなかったが、僅かに細かい粒子が少なくなっているように感じられた（図 3）。今後より詳細な分析を検討する必要があると考えられた。

E. 結論

MWCNT-7 の腹腔内投与によるラット中皮腫誘発過程の経時的な腹腔洗浄液のサイトカインレベルの測定において、急性炎症反応と別にサイトカインを介した持続的な反応が起こっていることが示された。また、3 種の MWCNT-7 の単回噴霧投与終生飼育実験の経過観察を行った結果、各 MWCNT 群で胸腔内及び腹腔内に単発的な腫瘍結節の発現を肉眼的に確認した。また、MWCNT による催奇形性は MWCNT を加熱処理（250℃、2 時間）することでその作用が弱まることが新たに示された。

F. 健康危機情報

該当無し

G. 研究発表

(論文発表)

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, Nakae D, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci.* 106:825-32 2015.

Fujitani T, Inomata A, Ogata A, Sakamoto Y, Hirose A, Nishimura T, Ikeda R and Nakae D. Comparison of fetal toxicity of various multi-wall carbon nanotubes in mice. *Toxicology Reports*, (2015) 2, 1404-1408.

(学会発表)

Hirose A, Taquahashi Y, Takagi A, Ogawa Y,

- Kanno J. Characterization of mesothelioma induction by i.p injection of the MWCNT dispersed with the Taquann method. International Congress on Safety of Engineered Nanoparticles and Nanotechnologies (SENN2015). (2015.4, ヘルシンキ, フィンランド)
- Hirose A, Sakamoto Y, Ogata A, Yuzawa K, Kubo, Ando H, Nagasawa A, Nishimura T, Inomata A, and Nakae D. Chronic toxicity by repeated intratracheal administration of MWCNT in rat. The 7th International Symposium on Nanotechnology, Occupational and Environmental Health. (2015.10. リンポボ州, 南アフリカ)
- Kobayashi N, Kubota R, Tanaka R, Takehara H, Naya M, Ikarashi Y, Hirose A: 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).
- 津田 洋幸, 徐 結苟, 酒々井 真澄, 二口 充, 深町 勝巳, 広瀬 明彦, 菅野 純(2015) 多種のカーボンナノチューブの短・中期安全性評価手法の提案. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 菅野 純, 高橋 祐次, 高木 篤也, 小川 幸男, 広瀬 明彦, 石丸 真澄, 今井田 克己 (2015) Taquann 直噴全身暴露吸入によるナノマテリアル有害性評価. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 藤谷 知子, 猪又 明子, 小縣 昭夫, 安藤 弘, 久保 喜一, 中江 大, 広瀬 明彦, 西村 哲治, 池田 玲子(2015) マウスにおける多層カーボンナノチューブの胎仔毒性の製品間差. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 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 (2015) 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 (2015.7 金沢).
- 坂本 義光, 小縣 昭夫, 北條 幹, 湯沢 勝廣, 安藤 弘, 久保 喜一, 長澤 明道, 高橋 博, 広瀬 明彦, 井上 義之, 橋爪 直樹, 猪又 明子, 中江 大(2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitrone (PBN)の影響. 第42回日本毒性学会学術年会 (2015.7 金沢).
- 坂本 義光, 広瀬 明彦, 中江 大(2015) 多層カーボンナノチューブによるラット中皮及び肺増殖性病変誘発に対する phenyl N-tert-butyl nitrone (PBN)の影響. 第74回日本癌学会学術総会 (2015.10 名古屋).
- H. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)**
1. 特許取得 (該当なし)
 2. 実用新案登録 (該当なし)
 3. その他 (該当なし)

表 1. 経気管噴霧単回投与及び投与後終生飼育実験における解剖所見

(腫瘍性病変のみ)

	Control	SD-2	SD-1	MWNT-7
使用動物数	15	15	15	15
観察例数	12	12	11	9
白血病	3	4	3	6
大 脳	2	0	1	0
肺	0	2	1	1
胸腔内結節	0	1	2	1
肝	0	1	0	0
腹腔内結節	0	1	3	1
皮膚／皮下	3	3	3	1
内分泌系				
下垂体	2	3	1	0
甲状腺	1	1	0	0
上皮小体	1	0	0	0
副 腎	0	0	0	0
生殖器				
精 巢	9	9	7	6
包皮腺	1	0	0	0