

平成 28 年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：ナノマテリアル暴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：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

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

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

ナノマテリアル暴露によるヒトへの健康影響を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性に加えて、生殖・発生毒性等の遅発毒性影響を評価する必要がある。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラットを用いて、MWCNT (MWNT-7) の発生毒性を評価してきた。これまでの試験では、マウスに投与した MWCNT は、全て同じ被験物質を同じ超音波処理方法によって調製した。しかし、同一の被験物質であっても、投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なることから、それに伴い発生毒性も異なることが考えられる。

そこで今年度は、同一試料から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 懸濁液（未処理，熱処理，Taquann 処理および Taquann+熱処理）を調製し，これらを妊娠マウスに反復気管内投与して，試料の違いによる影響の差異について考察することとした。

その結果，本試験条件下では，MWCNT のいずれの調製方法（未処理，熱処理，Taquann 処理および Taquann+熱処理）においても，その 4 mg/kg 反復投与（妊娠期間を通じて 16 mg/kg）によって，母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また，熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって，胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は，特に熱処理された MWCNT の投与によって顕著に認められた。さらに，熱処理された MWCNT の投与によって，受胎率が低値傾向を示し，妊娠早期（着床または胚の発生）に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

なお，本試験の外表検査までの結果において，MWCNT の催奇形性は判断できなかったが，過去実施の試験では，未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており，当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから，今後は内臓および骨格検査を行い，内臓および骨格への影響を確認する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健康影響を総合的に評価するためには、発がん性等の慢性毒性に加えて、生殖・発生毒性等の遅発毒性影響を評価する必要がある。

ナノマテリアル曝露による生殖・発生毒性に関しては、現段階で利用可能な情報は多くはないが、以下のような研究結果が報告されている。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いないため、より詳細な検討が必要である。

我々はこれまで、妊娠マウスおよびラットを用いて、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 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 (ただし、胎児の体重増加抑制は 2 mg/kg 以上でみられた)。

以上のことから、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と考えられる。

一方、これらの試験において、マウスに投与した MWCNT は、全て同じ被験物質を同じ超音波処理方法によって調製している。同一の被験物質であっても、投与に用いる懸濁液の調製方法によって、形状や凝集状態が異なることから、それに伴い発生毒性も異なることが考えられる。

そこで今年度は、同一試料から調製方法の異なる 4 種類の MWCNT 懸濁液を調製し、これらを妊娠マウスに反復気管内投与して、試料の違いによる影響の差異について考察することとした。

B. 研究方法

1. 被験物質懸濁液の調製

マウス反復気管内投与の被験物質として、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。

本研究では、MWCNT の調製方法によって発生毒性の違いが見られるかどうかを評価するために、以下に示す種々の方法で MWCNT 懸濁液を調製した。

①未処理 MWCNT (陽性対照)

MWCNT 原末 16 mg を 4 mL の 1%-CMC (カルボキシメチルセルロース) -Na 含有 PBS (リン酸緩衝液) に添加し、超音波バスを用いて 30 分～1 時間程度分散処理を行って懸濁液を調製した。

②熱処理 MWCNT

MWCNT 原末を 250°C で 2 時間加熱してから、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

③Taquann 処理 MWCNT

MWCNT を Taquann 処理により高度に分散させた後、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

④Taquann 処理+熱処理 MWCNT

MWCNT を上記③の Taquann 処理により高度に分散させた後、さらに上記②の熱処理を行い、上記①と同様の分散処理により懸濁液を調製した。

2. マウス反復気管内投与試験

マウス反復気管内投与試験のプロトコルを図 1 に示す。

上記 4 種類の方法で調製した MWCNT 懸濁液および媒体 (1%-CMS-Na 含有 PBS) を、いずれも 4 mg/kg の用量で ICR マウスに妊娠 6, 9, 12, 15 日に合計 4 回 (合計 16 mg/kg), イソフルラン麻酔下で気管内投与した (胎児の器官形成期を通じた投与を行った)。

3. 母動物の観察

各投与群とも、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。全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。

3. データ処理

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、処理した。胎児に関する成績（性比、胎児体重、胎盤重量および外表異常発生率）については、1母体当たりの平均を1標本として集計した。各測定値および集計値の平均±標準偏差を算出した。なお、不妊動物から得られたすべてのデータは、集計から除外した。

4. 統計解析

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 Bartlett の等分散検定 (Snedecor & Cochran., 2012) 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 Dunnett の多重比較検定 (Yoshida, 1988) を行い、不等分散（有意）の場合には Steel の検定 (Steel, 1959) を行った。いずれも陰性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。

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、Steel の検定を行い、陰性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。

受胎率については、 χ^2 検定を行い、陰性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。

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。

C. 研究結果

1 母動物の検査結果

1.1 一般状態

媒体投与群で妊娠12日の投与後に1例、熱処理 MWCNT 投与群で妊娠15日の投与後に1例が死亡した。

妊娠期間を通じて、いずれの投与群も一般状態に異常は認められなかった。

1.2 体重

母動物の体重推移を図2に示す。

熱処理 MWCNT 投与群で妊娠8～17日の体重が、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群で妊娠7日の体重が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群で妊娠6～16および0～17日の体重増加量が、MWCNT 原末投与群で妊娠6～16日の体重増加量が有意な低値を示した。

1.3 摂餌量

全ての MWCNT 投与群で、妊娠6～12日の平均1日摂餌量が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群では、妊娠12～17日の平均1日摂餌量が有意な低値を示した。

1.4 器官重量

すべての MWCNT 投与群で、肺の絶対および相対重量が陰性対照群と比べて統計学的に有意な高値を示した。また、熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、妊娠子宮の絶対および相対重量が有

意な低値を示した。

1.5 受胎能

交尾成立した雌のうち、媒体投与群、熱処理 MWCNT 投与群、Taquann 処理 MWCNT 投与群、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、それぞれ 2/15, 8/19, 3/15, 2/15 および 2/15 例に不妊が認められ、受胎率はそれぞれ 86.7, 57.9, 80.0, 86.7 および 86.7% であった。各 MWCNT 投与群の受胎率に陰性対照群との間で統計学的な有意差は認められなかったが、熱処理 MWCNT 投与群で受胎率の低値傾向が認められた。

2 胎児の検査結果

2.1 帝王切開

熱処理 MWCNT 投与群では、媒体投与群と比べて統計学的な有意差は認められないものの、早期死亡胚率の上昇に伴う死亡胚・胎児率の高値傾向および胎児生存率の低値傾向が認められた。なお、死亡胚・胎児率の高値傾向は Taquann+熱処理 MWCNT 投与群においても認められたが、その変化は熱処理 MWCNT 群に比べて僅かであった。

胎盤観察では、いずれの動物にも異常所見は認められなかった。妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、着床率および胎盤重量に、各 MWCNT 投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

熱処理 MWCNT 投与群、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で、雌雄の胎児体重が媒体投与群と比べて統計学的に有意な低値を示した。

性比に、各 MWCNT 投与群と陰性対照群との間に統計学的な有意差は認められな

かった。

2.2 外表検査

外表異常を伴う胎児の発生率ならびに各異常の発現率に、各 MWCNT 投与群と媒体投与群との間に統計学的な有意差は認められなかった。

外表異常を伴う胎児は、熱処理 MWCNT および未処理 MWCNT 投与群で、それぞれ 2 (2.5%) および 1 (0.6%) 例であった。所見としては、熱処理 MWCNT 投与群で屈曲尾および短尾が各 1 例、未処理 MWCNT 投与群で無尾および鎖肛が同一の 1 例に認められた。

D. 考察

1 母動物への影響

妊娠 12 日の投与後に陰性対照群の 1 例、妊娠 15 日の投与後に熱処理 MWCNT 投与群の 1 例が死亡した。死亡動物では肺の赤色斑点または赤色化が認められ、投与時に呼吸障害が発生した可能性が疑われたが、死因は不明であった。

熱処理 MWCNT 投与群では、妊娠 8~17 日の体重ならびに妊娠 6~16 および 0~17 日の体重増加量が低値を示した。なお、妊娠 0~17 日の体重増加量は、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。また、同群では妊娠 6~17 日の平均 1 日摂餌量が低値を示していることから、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。平均 1 日摂餌量の低値は、他の MWCNT 投与群でも妊娠 6~12 日に認められ、Taquann+熱処理 MWCNT 投与群では妊娠 7 日の体重が低値、陽性対照群では妊娠 6~16 日の体重増加量が低値を示したことから、その影響は熱処

理 MWCNT 投与群に比べて弱いものの、いずれも被験物質投与による影響と考えられた。

熱処理および未処理 MWCNT 投与群で認められた妊娠子宮重量の有意な低値は、これらの投与群の胎児体重が有意な低値を示していることを反映した変化と考えられた。また、熱処理 MWCNT および Taquann+熱処理 MWCNT 投与群では、有意差はないものの陰性対照群に比べて早期死亡胚率が高値傾向を示し、加えて熱処理 MWCNT 投与群では受胎率が他の投与群に比べて明らかな低値傾向を示した。早期死亡胚率の高値傾向は、受精卵の着床後、妊娠状態を維持できずに発生が止まった（胚が吸収された）母動物の増加を示しており、Taquann 処理のみの MWCNT 投与では同様の変化はみられないことから、熱処理された MWCNT が母動物に何らかの影響を及ぼした可能性が考えられた。また、受胎率の低値傾向がみられたが、マウスの場合、受精卵の着床は受精後 6 日目とされており、当該試験では着床予定日である妊娠 6 日に初回投与を行っていることから、熱処理された MWCNT が直接的または間接的に着床を阻害した可能性も考えられたが、その機序は不明であった。

一般状態、妊娠黄体数、着床数、生存胎児数、死亡胚・胎児数、着床率、胎盤重量および胎盤観察において、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

熱処理 MWCNT、Taquann+熱処理 MWCNT および未処理 MWCNT 投与群の雌雄の胎児体重が有意な低値を示した。熱処理 MWCNT および Taquann+熱処理 MWCNT

投与群では死亡胚・胎児率の高値傾向または生存胎児率の低値傾向が認められていることから、被験物質投与による胎児の発育抑制が示唆された。

外表検査では、熱処理 MWCNT 投与群で屈曲尾および短尾、未処理 MWCNT 投与群で無尾および鎖肛が認められた。MWCNT を用いた過去実施の催奇形性試験または既存の報告 (Fujitani et al., 2012) において、短尾または曲尾等の尾の変化が認められており、当該試験での尾の変化も同様または同時期の発生過程における変化と考えられた。ただし、いずれも単発性の発生であり、同様の変化が過去実施の試験の媒体対照群でもみられていることから、被験物質投与と関連のない変化の可能性も考えられた。

過去実施の試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認する必要があると考えられる。

E. 結論

今回の検討によって、本試験条件下では、MWCNT のいずれの調製方法（未処理、熱処理、Taquann 処理および Taquann+熱処理）においても、その 4 mg/kg 反復投与（妊娠期間を通じて 16 mg/kg）によって、母動物に対する体重増加抑制または摂餌量減少が認められた。また、熱処理あるいは Taquann+熱処理された MWCNT の投与によって、胎児に発育抑制が認められた。本試験で認められた母動物および胎児に対する影響は、特に熱処理された MWCNT の

投与によって顕著に認められた。さらに、熱処理された MWCNT の投与によって、受胎率が低値傾向を示し、妊娠早期（着床または胚の発生）に何らかの影響を及ぼす可能性が示唆された。

なお、本試験の外表検査までの結果において、MWCNT の催奇形性は判断できなかったが、過去実施の試験では、未処理 MWCNT の 4 mg/kg 投与で内臓異常および骨格異常を伴う胎児の発生率が有意な高値を示しており、当該試験の内臓および骨格検査においても同様の変化が生じる可能性が考えられたことから、今後は内臓および骨格検査を行い、内臓および骨格への影響を確認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).
- 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 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。

無し

3. その他

無し

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27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，2016。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Norihiro Kobayashi, Sho Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of various sizes of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation to initiate grouping and read across. Society for Risk Analysis 2016 Annual Meeting (2016.12.12 San Diego, CA, 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

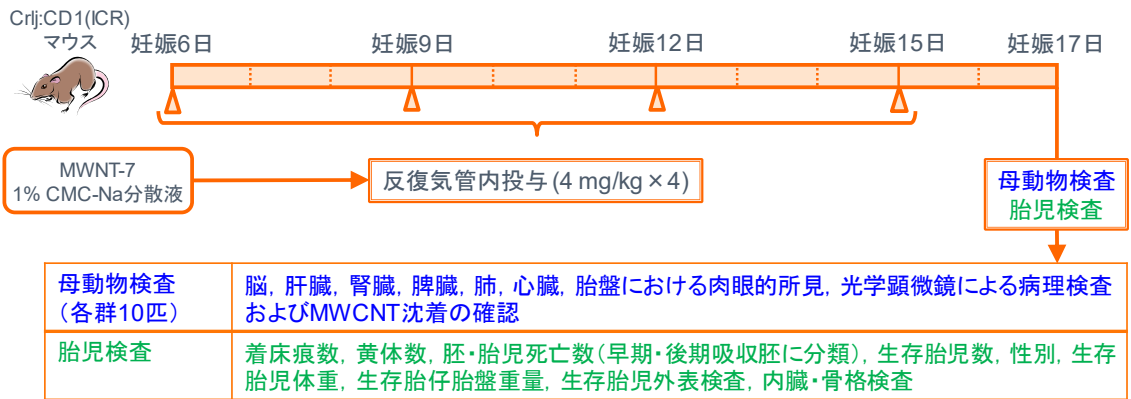


図1. 試験プロトコル

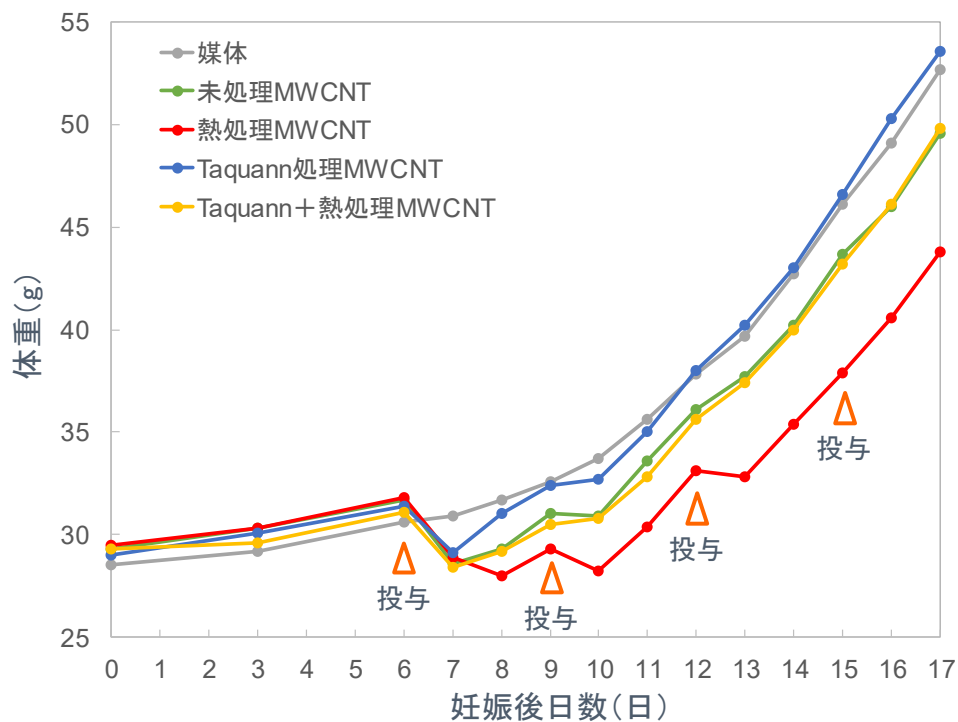


図2. 母動物の体重推移