

平成 29 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)

Ⅱ. 分担研究報告書

平成 29 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: 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
(H27-化学-指定-004)

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 客員研究員
独立行政法人労働者健康安全機構
日本バイオアッセイ研究センター 所長
研究分担者: 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長
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

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子のサイズと形状が類似するアスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系による比較的短期の試験により発がん性のハザード評価が可能であった。しかしながら、新規ナノマテリアルについては、たとえ原材料の毒性情報があったとしても、そのナノサイズによる毒性を評価し得る情報は一般的には存在せず、従って、ハザード評価や毒性発現メカニズムの想定は困難である。このような状況に於いては、毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略を適用する事で、見落としのない毒性評価を実施する必要がある。具体的には、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザード同定、メカニズム同定、及び用量作用情報の取得を行い、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う必要がある。

研究分担者らは、上記の毒性試験を実施する際のナノマテリアル特有の問題点を解決する目的で、今までの諸研究からその物性や毒性の情報が利用可能な MWNT-7 (Mitsui) をモデル物質として、高度分散法 (Taquann 法) 及び、それをエアロゾル化するカートリッジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した (Taquann 直噴全身吸入装置)。本装置により、より一般的なナノマテリアルの高分散検体を比較的容易 (従来 of 粉体吸入試験法の適用に比較して) に、マウス (ラットも原理的に可能である) に全身暴露吸入する目途が立った。

本研究では、サイズ、形状、組成が多彩で、異なった物理化学的特性を有する未検討の各種ナノマテリアル検体へ Taquann 法及び直噴全身吸入装置を適用する際の具体的な微調整法を確立し、吸入毒性が評価可能であることを示すことを目的とする。本年度は、二層カーボンナノチューブ (DWCNT、岡山大学 林靖彦先生からの寄贈) のマ

ウス全身曝露吸入実験を実施した。繊維長 1 μm 、7 μm 及び 15 μm の DWCNT 検体について製造用のシリコン基板からの剥離方法及びエアロゾル化の検討を行い、マウスに 2 時間の単回全身吸入ばく露を実施した。質量濃度は、1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNT それぞれ 0.49 mg/m^3 、0.51 mg/m^3 及び 0.57 mg/m^3 であり、エアロゾル粒子数の平均値は、76/mL、83/mL、145/mL であった。エアロゾル化の効率は 1 μm DWCNT では 68%、7 μm DWCNT では 10%、15 μm DWCNT では 5.3% であり繊維長が長いほど低下した。マウスの吸入曝露肺では、15 μm DWCNT の検体において数は少ないもののマクロファージに貪食された繊維が観察されたが、1 及び 7 μm の検体においては光学顕微鏡で検出が困難であった。

本年度の実験において、使用可能な検体量に限りがあったため単回の吸入曝露となったが、1 mg 未満の検体量であっても全身曝露吸入実験が可能であった。計算上、1 μm DWCNT においては、50 mg の検体が入手できれば、マウス 16 匹に 5 mg/m^3 の質量濃度で 2 時間/日 \times 5 日間(合計 10 時間)の全身曝露吸入実験が可能である。この曝露条件は、先行研究において何らかの生体影響を検出することが可能な条件であるため、本試験方法は少量・新規のナノマテリアル評価に有用であると考えられる。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の中皮腫誘発のポテンシャルに限っては、その粒子サイズから予測される毒性発現メカニズムにより、アスベスト及び人工的繊維状代替物の発がん性評価に用いられた腹腔内投与試験系によるハザード評価が可能であった¹⁻³⁾。しかしながら、新規ナノマテリアルの多くについては事前に毒性情報は存在せず、毒性発現メカニズムの予測も困難である。このような状況に対しては、ヒトの曝露経路に即した動

物実験によりハザード及びメカニズム同定、用量作用関係を明らかにし、ヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行う手法が有効である。ヒトがナノマテリアルに曝露される際の重要な侵入経路はそのエアロゾルの吸入である。従来、粉体の吸入曝露実験施設では、検体の特性に応じてエアロゾルを発生させる装置を新たに開発するか、大幅に改造する必要がある、時間と費用を要することが知られている。加えて、ナノマテリアルは容易に凝集する性質を有することから、ヒトが吸入可能な分散状態のエアロゾル化には、更なる技術開発や工夫が必要となることが多い。

研究分担者らは、MWCNT をモデル物質としながら、汎用性が高いシステムを目指して、高度分散法(Taquann法)及び、それをエアロゾル化するカートリッ

ジ直噴式ダスト発生装置を独自開発した(Taquann 直噴全身吸入装置)⁴⁾。本装置により多層カーボンナノチューブ MWNT-7 の場合、凝集体・凝固体をほぼ除去した高分散検体をマウスに全身暴露吸入することが可能となった。このシステムの汎用性を確認するためにより広範な物理化学的特性を示すナノマテリアルへの適用を検討するため、本分担研究では、二層カーボンナノチューブ(DWCNT)を対象に研究を進めた。

DWCNT は岡山大学 林靖彦教授が開発した高度に結晶化した炭素繊維で、直径が 1~3 nm、繊維長を均一にコントロールできることを特徴としている。繊維状物質による中皮腫発がん誘発には繊維長が極めて重要なファクターとされていることから⁵⁾、1 μm、7 μm 及び 15 μm の DWCNT を入手し実験に供した。

B. 研究方法

B-1.検体として用いた DWCNT の性状

DWCNT は、岡山大学 林靖彦教授が開発した手法により、杉田電線株式会社にて製造された製品を使用した。DWCNT は触媒となる鉄をコーティングしたシリコン基板(20 mm×20 mm)に高密度(2.8×10^{10} 本/mm²)でブラシ状に合成されている(図1)。入手した DWCNT の繊維長と入手量を以下に記載した(表1)。

(1) 1 μm DWCNT

入手量: 5.12 mg

(シリコン基板として 160 枚)

平均繊維長: 1.88 μm

最大繊維長: 2.91 μm

最小繊維長: 0.65 μm

範囲: 2.26 μm

(2) 7 μm DWCNT

入手量: 14.37 mg

(シリコン基板として 120 枚)

平均繊維長: 6.99 μm

最大繊維長: 8.90 μm

最小繊維長: 5.03 μm

範囲: 3.86 μm

(3) 15 μm DWCNT

入手量: 32.64 mg

(シリコン基板として 128 枚)

平均繊維長: データ無

最大繊維長: データ無

最小繊維長: データ無

範囲: データ無

B-2.DWCNT 検体の調製・製造用シリコン基板から剥離と分散処理

DWCNT は 20mm×20mm のシリコン基板表面に付着した状態で供給された。DWCNT は触媒となる鉄に比較的強固に付着しているため、希塩酸(20%)にて鉄を溶解して剥離した。具体的には、シリコン基板を希塩酸に浸漬して鉄を溶解した後、超純水でシリコン基板を 3 回洗浄して塩酸を除去した。塩酸は鉄の含量が低レベルにコントロールされている鉄試験用塩酸(関東化学 18078、鉄含量:最大 7ppb)を用いた。希塩酸に浸漬する時間は繊維長によって調整し、鉄が溶解し、かつ洗浄工程において DWCNT がシリコン基板から剥離しない時間として 1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNT それぞれ 1 秒、13 秒及び 30 秒とした。その後、第三級ブチルアルコール(TB)にシリコン基板を浸漬して水分を除去し、TB を 40 mL が入ったバイアルにシリコン基板を移し、超音波洗浄器(SU-3TH、出力 40W、発振周波数 34kHz、柴田科学株式会社)にて約 10 秒間処理してシリコン基板から剥離した。

TB に懸濁させた DWCNT は、破砕用の超音波装置(BIORUPTOR®UCD-250HSA、コスモバイオ)にて出力 160W、90 秒間の超音

液処理を行い分散させた。直ちに液体窒素で凍結し、溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧して TB を昇華させて除去し乾燥検体とし、各研究分担者に配布した(図 2)。

B-3.DWCNT のマウス単回全身曝露吸入実験

(1) 動物

C57BL/6NcrSLC (日本エスエルシー株式会社) 雄性マウス12週齢を使用した。このマウスは当研究部において、MWCNTを含めてナノマテリアルの吸入曝露実験に使用した実績がある。個体識別は耳パンチにより行った。

(2) 飼育条件

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1ケージ当り4匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (商品名:VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度; $25\pm 1^{\circ}\text{C}$ 、湿度; $55\pm 5\%$ 、換気回数; 約 20回/h、照明時間; 8時~20時点灯 (照明明暗サイクル12時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。

(3) 群構成

対照群、1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNT の 4 群構成とした。各群 16 匹のマウスを使用し、1 日 2 時間 (10:00~12:00) の単回吸入曝露を行った。曝露終了後に定期解剖 (曝露終

了直後、1 週及び 2 週後) を行い、肺サンプルを採取した(図 3)。

(4) ダスト発生装置

DWCNT のエアロゾル化は、既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.0 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社)⁴⁾ (図 4)。

この装置は、検体を充填する金属製カートリッジ、圧縮空気をカートリッジに噴射する噴射装置、及び、噴射した検体を気相に分散させるサブチャンバーから構成される。カートリッジ (容量: 23.5 mL、内寸: 直径 22 mm 高さ 65 mm) はステンレス製で、円筒状胴体、4 つの噴出孔を有するキャップ部及び台座部から構成される。台座の中心には圧縮空気を注入するオリフィスと内容の流出を防ぐチェックバルブが装着されている。

カートリッジへの検体の充填は、所定の濃度で TB に DWCNT を再懸濁し、各カートリッジに懸濁液 10 mL を分注して液体窒素で固化させた後、デシケーターに格納して溶媒回収型ポンプで TB を昇華除去することで達成した。

本研究では、繊維長の異なる検体の生体影響を比較することを目的としたため、繊維数を基準に曝露量を設定した。すなわち、DWCNT をカートリッジ一本当たり 33.6×10^{12} 本 (シリコン基板 3 枚分の検体) 含まれるように検体を充填した。重量換算では、カートリッジに 1 本当たり 1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNT それぞれ、51 μg 、360 μg 、510 μg である。

噴射装置は、サブチャンバー (容量:

32 L)に接続されている。噴射に伴う圧力上昇を減じるため、サブチャンバーから上方に煙突状のダクトを設け、その上部にはポリエチレン製の袋で覆ったULPAフィルターを接続した。“煙突”上部から加湿したキャリアエアを一定の流量で送り込み、噴射された検体は煙突内に逆流した検体を含め、サブチャンバー内で効果的に分散された後、希釈されつつ接続パイプを通して暴露チャンバーに導く構造とした。

噴射装置からカートリッジへの圧縮空気の供給圧力は0.4 Mpa、噴射時間は0.2秒、1カートリッジ当たり3回の噴射を行った。暴露チャンバーの総換気流量は約13 L/min(基礎換気流量;10 L/min、エアロゾルモニター用サンプリング(CPC);1.5 L/min、質量濃度測定;1.5 L/min)と設定した。

目標濃度に速やかに到達させるため、暴露開始時に2本を1分間隔で噴射した。その後は濃度を監視しつつ8分間隔で噴射し、設定濃度を維持した。2時間の吸入曝露実験において、合計17本のカートリッジを使用した。

(5) 暴露チャンバー

動物を収容し検体を暴露する暴露チャンバーは、先行研究において独自に開発したものを使用した。(共同開発柴田科学株式会社)。動物は、チャンバーの蓋から吊るしたステンレス金網製のケージに個別に収容する。マウスは最大16匹収容が可能である。暴露チャンバーはアクリル製のアウターチャンバーと柔軟な導電性樹脂で作製したインナーチャンバーの2重構造となっている。イン

ナーチャンバーは、直径550 mm、高さ550 mm、気積105.5 Lである。検体が触れるインナーチャンバーは交換可能であり、検体の変更に対応できるシステムとなっている(特許取得済)。

(6) 暴露チャンバー内のエアロゾル濃度測定

暴露チャンバー内のDWCNTの濃度のモニタリングは、相対濃度(CPM; count per minutes)と質量濃度(mg/m^3)測定を並行して行った。

相対濃度測定は、対応濃度 3×10^5 個/mL、2.5 nmの粒径が測定可能な凝縮粒子計数装置(Condensation Particle Counter; CPC、CPC3776、サンプリング流量:1.5 L/min、TSI、MN、USA)を用いた。この情報はリアルタイムに得られることからエアロゾルの濃度コントロールに使用した。

質量濃度測定は、ローボリウムサンプラー(080050-155、 $\phi 55$ mmろ紙ホルダー、柴田科学)にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター(Model T60A20、 $\phi 55$ mm、捕集効率(DOP 0.3 μm):96.4%、東京ダイレック)を装着し、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)に接続して1.5 L/minの流量で暴露時間の2時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 $1.5 \text{ L}/\text{min} \times 120 \text{ min} = 180 \text{ L}$ から 1 m^3 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤(XP26V、METTLER

TOLEDO)を使用した。

暴露チャンバー内の温度、湿度を暴露時間の2時間を通してモニタリングした。

暴露チャンバー内のエアロゾル化した粒子の形状を把握するため、サンプリングポンプ(Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学)で3 L/minの流量で5分間吸引し、エアロゾルを酸化アルミニウム製のフィルター(Anodisc 25、φ21 mm、孔径0.1 μm、ワットマン)に吸着させた。フィルターホルダーはステンレス製のオープンフェイス型(柴田科学特注品)を用いた。フィルターにオスミウムコーター(HPC-1SW、真空デバイス)で5秒間の処理を行って走査型電子顕微鏡(VE-9800、キーエンス)で観察した。

(8) 解剖

マウスは麻酔薬としてペントバルビタールナトリウム(ソムノペンチル、共立製薬株式会社)、鎮痛剤としてベトルフェール(Meiji Seika ファルマ株式会社)を腹腔内投与し、麻酔下で腋窩動脈より放血致死後に解剖した。肺は気道内のDWCNTの人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸後、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。流量は点滴調節器により適宜調節した。その後、

右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入し、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

C. 研究結果

(1) DWCNTの吸入曝露実験

DWCNTの単回全身曝露吸入実験における質量濃度は、1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNTそれぞれ、0.49 mg/m³、0.51 mg/m³、0.57 mg/m³、平均CPCカウントは76/cm³、83/cm³、145/cm³であった(図5)。

2時間の吸入曝露実験において使用した総検体量と2時間の曝露チャンバーの総換気量が1.2 m³であることから名目上の濃度は1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNTそれぞれ、0.75 mg/m³、5.08 mg/m³、10.83 mg/m³と計算される。実際に測定した濃度から、エアロゾル化効率を計算すると1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNTそれぞれ68%、10%及び5.3%であった(表2)。

走査型電子顕微鏡によるエアロゾルの形態観察では、束状になった繊維に

加えて、50 μm 程度の凝集体として観察されるものも多数みられた。これらは、100～300 nm程度の繊維径であることから、100本程度のDWCNT単繊維が束状になったエアロゾルと考えられた。一部の繊維がほぐれている状態の像も観察されたが、複数の繊維が束になった状態であり、一次粒子まで分離はされていないものと考えられた。また、単繊維が長軸方向に結合して、原末の繊維長よりも長い繊維となった粒子も観察された(図6)。

(2) マウスの肺病理組織検査

曝露終了直後の肺について、常法によりパラフィン包埋を行い、HE標本を作製して光学顕微鏡で観察を行った。

DWCNTは複屈折性を示すため、偏光顕微鏡下での観察では明るく輝いた像として観察される。15 μm DWCNTを曝露した肺では、数は少ないものの細気管支から肺胞周囲にマクロファージが貪食したDWCNTが観察された。DWCNTを貪食したマクロファージは胞体が細長く進展している様子が観察された(図7、8)。一方、急性炎症と考えられる反応は認められなかった。1及び7 μm DWCNTを曝露した肺では、光学顕微鏡的にはDWCNTを検出できなかった。

D. 考察

本年度は繊維長が1 μm 、7 μm 及び15 μm のDWCNTについて、マウスに単回全身曝露吸入実験を実施した。

肺に沈着したナノマテリアルはマクロファージによって処理されるが、繊維長によってその処理は異なると考えられており、またその後の生体反応も異なる。実際に、中皮腫瘍がんに

おいては繊維長が最も重要なファクターであることが知られている。

DWCNTは触媒となる鉄をコーティングしたシリコン基板上に垂直に合成されているため、これから剥離する方法を検討した。昨年度は、剃刀を用いてシリコン基板からそぎ落とす方法を用いたが、DWCNTの繊維が大きな束となり、分散が悪かった。本年度は、希塩酸で鉄を溶解する工程を導入することで分散性が向上した。DWCNTはシリコン基板上に極めて高密度に合成されているが、親水性は良好であり、希塩酸は速やかに浸透した。そのため、1 μm のDWCNTでは1秒程度、15 μm のDWCNTでも30秒程度の浸漬で鉄を溶解することが可能であった(これ以上の塩酸処理は、その後の超純粋による洗浄過程でDWCNTが脱落する)。

DWCNTのエアロゾル化の効率は繊維長が長いほど低下した。また、エアロゾルの形態観察では、原末のサイズよりも長い繊維が多数確認された。これは、DWCNTが長軸方向にそって自動的にずれて配列し、相互結合する性質によるものと考えられた。現在、DWCNTはシリコン基盤から一部を引き出すと相互に側面同士が結合(ファンデルワールス力によるとされる)して長繊維化することが知られており、この性質を利用して数十メートルの長繊維が製造されている。カートリッジの噴射口から圧縮空気によって放出される際に同様の現象が生じて長線維化していることが想定される。長い繊維であるほど相互に結合する確率が高くなるため長線維化する傾向が強まり、エアロゾル化の効率が低下した可能性がある。また、本実験では質量濃度で

はなく繊維数を一定にする曝露条件を設定したため、カートリッジ 1 本当りに充填する DWCNT の重量は長繊維であるほど多かったことも原因の一つとして考えられた。対策としては、カートリッジに充填する検体量を減らし、打ち込み回数を増やすことでエアロゾル化の効率を上げることが考えられる。

DWCNT を曝露した肺では、数は少ないものの細気管支から肺胞周囲にマクロファージが貪食した DWCNT が観察された。DWCNT を貪食したマクロファージは胞体が細長く進展している様子が観察された。この現象は、先行研究において MWCNT を曝露した肺でも観察されている。一方、急性炎症と考えられる反応は認められなかった。1 及び 7 μm DWCNT を曝露した肺では、DWCNT を光学顕微鏡的には検出できなかった。その理由として、単回の曝露であるため吸入された検体が少ないことと、繊維長が短く、光学的観察が困難であることが考えられた。

E. 結論

本年度の実験において、全身曝露吸入実験に使用可能であった検体量は、1 μm DWCNT、7 μm DWCNT、15 μm DWCNT それぞれ 0.9 mg、6.1 mg 及び 13 mg であった。検体量に限りがあることから単回の吸入曝露となったが、Taquann 全身曝露吸入装置では、1 mg 未満の検体量であっても全身曝露吸入実験が可能であった。計算上、1 μm DWCNT においては、50 mg の検体が入手できれば、マウス 16 匹に 5 mg/m³ の質量濃度で 2 時間/日 × 5 日間(合計 10 時間)の全身曝露吸入実験が可能である。この曝露条件は、MWCNT の先行研究において何らかの生体

影響を検出することが可能な条件であるため、本試験方法は少量・新規のナノマテリアル評価に有用であると考えられる。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、相原妃佐子氏、相田麻子氏に深く感謝する。

F. 参考文献

1. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., Induction of mesothelioma in p53^{+/-} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.
2. Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J, Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* Aug;103(8):1440-4, 2012
3. Sakamoto Y, Dai N, Hagiwara Y, Satoh K, Ohashi N, Fukamachi K, Tsuda H, Hirose A, Nishimura T, Hino O, Ogata A. Serum level of expressed in renal carcinoma (ERC)/ mesothelin in rats with mesothelial proliferative lesions induced by multi-wall carbon nanotube (MWCNT). *J Toxicol Sci.* 2010 Apr;35(2):265-70.
4. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

5. Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. J Natl Cancer Inst. 1981 Nov;67(5):965-75.

G. 研究発表

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. J Toxicol Sci. 2017;42(2):121-128

Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A

Miller E, May M, Morgan E, Smith A.

short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018,. Poster

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし



図1 DWCNT サンプルの外観

DWCNTはシリコン基板(20mm×20mm)に繊維数密度 2.8×10^{10} 本/mm²(11.2×10^{12} 本)がブラシ状に合成されている。シリコン基板には触媒となる鉄がコーティングされており、DWCNTは比較的強固に鉄に結合しているため、検体の剥離には希塩酸で鉄を溶解する必要がある。

表1 DWCNT に関する情報

	1 μm	7 μm	15 μm
Average length	1.88	6.99	NE
Max	2.91	8.90	NE
Min	0.65	5.03	NE
Number of plates	160	120	128
Total weight(mg)	5.12	14.37	32.64



図2 DWCNT 乾燥検体

Taquann 処理後の検体。左から 白 1 μm、青 7 μm、黄、15 μm、各々 34 μg、240 μg、510 μg。

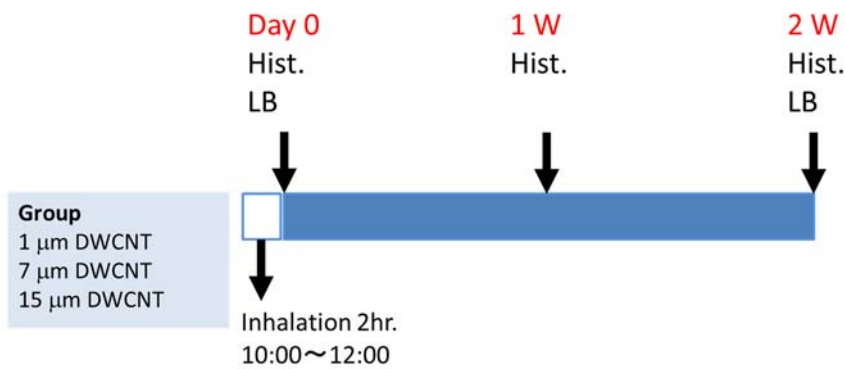


図 3 群構成と曝露及び定期解剖スケジュール

Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System Version 2.0

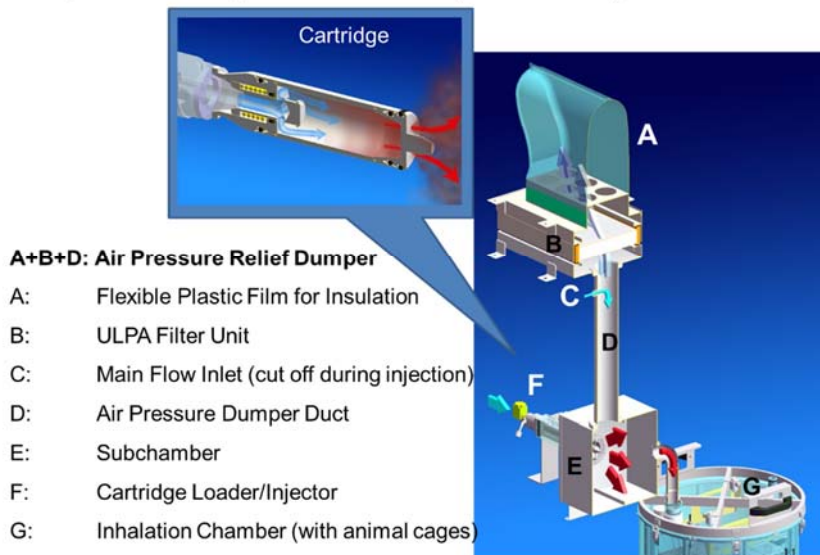


図 4 Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System version 2.0

マウスの全身曝露吸入実験には既設の Taquann 直噴全身吸入装置 Ver2.5 を使用した (共同開発 柴田科学株式会社)

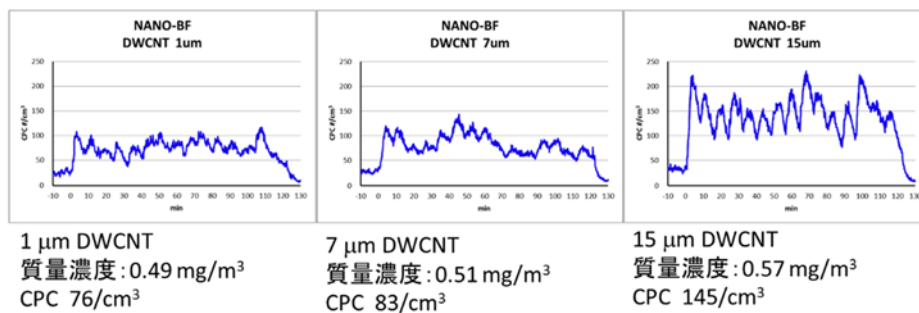


図 5. DWCNT の曝露チャンバー内のエアロゾル濃度

表 2 吸入曝露実験のまとめ

	1 μ m	7 μ m	15 μ m
チャンバー内に打ち込んだ総量	0.9 mg	6.1 mg	13 mg
2時間のばく露の総換気量	1.2 m ³	1.2 m ³	1.2 m ³
名目上の濃度	0.75 mg/m ³	5.08 mg/m ³	10.83 mg/m ³
実際の濃度	0.49 mg/m ³	0.51 mg/m ³	0.57 mg/m ³
エアロゾル化効率	68%	10%	5.3%

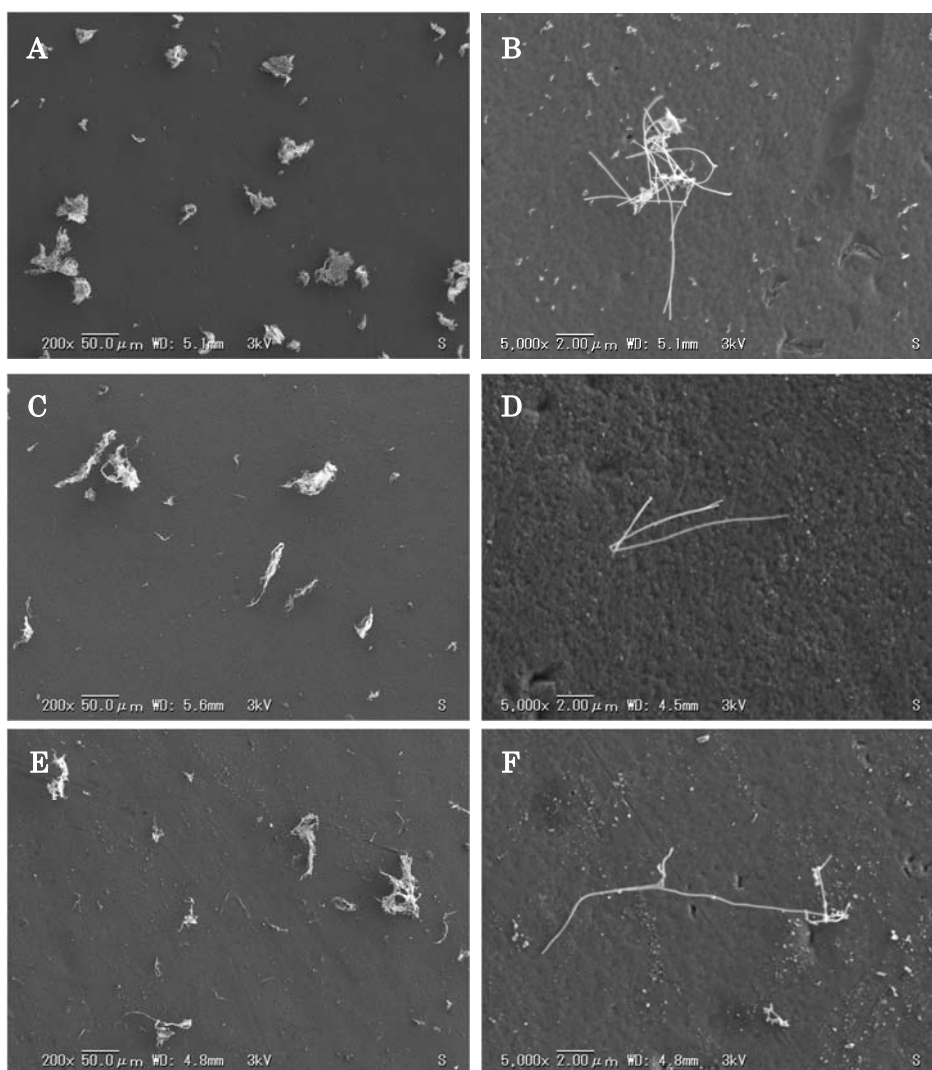


図 6 DWCNT のエアロゾルの走査型顕微鏡による形態

A, B: 1 μ m DWCNT、C,D: 7 μ m DWCNT、E,F: 15 μ m DWCNT

A, C, E は 200 倍、B, D, F は 5000 倍の倍率

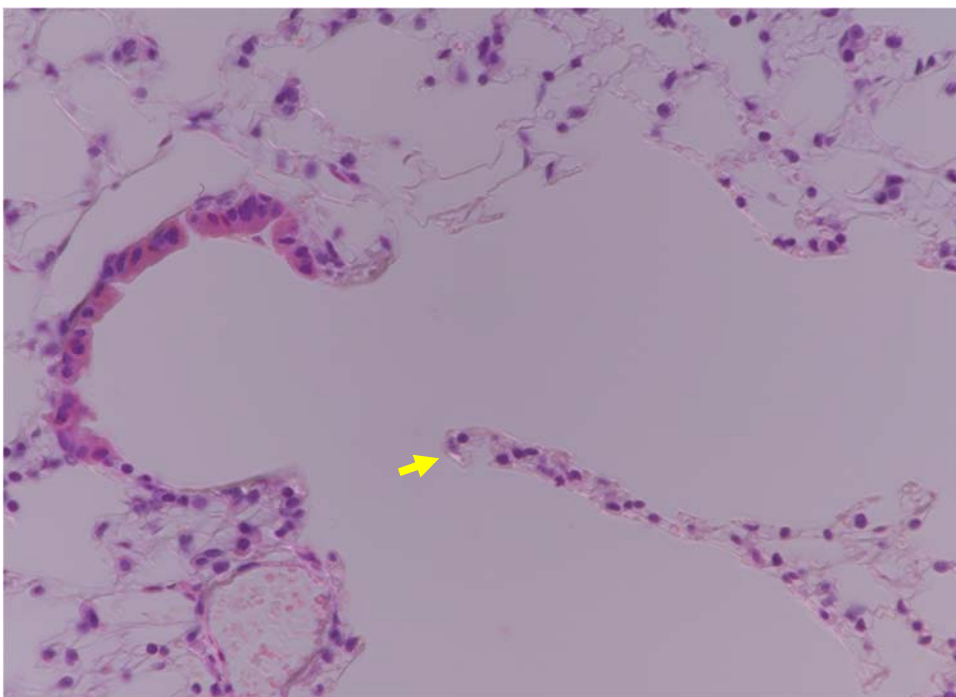
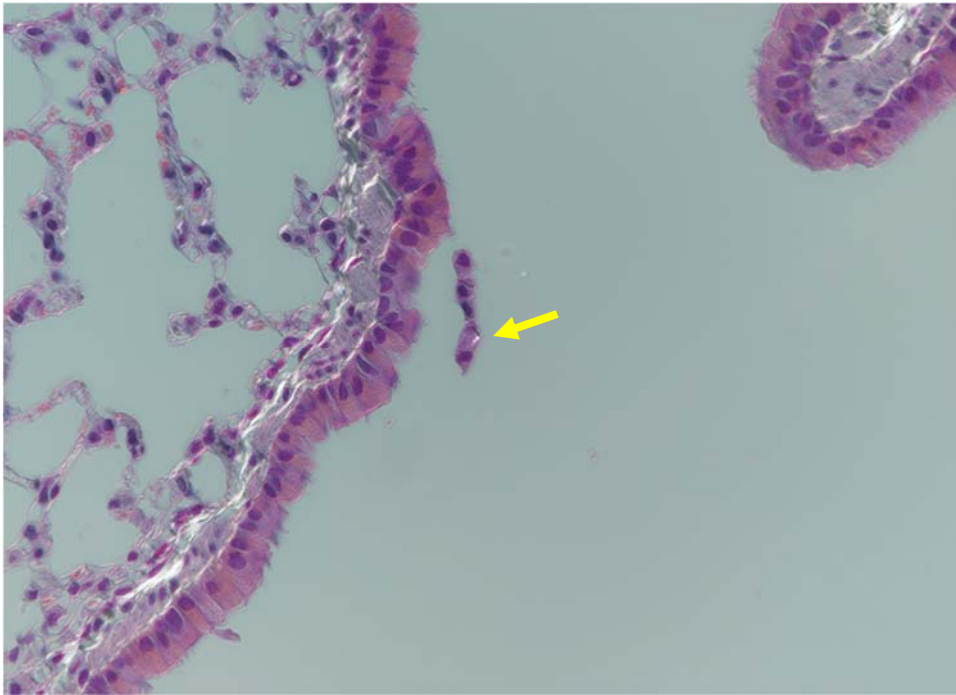


図 7 15 μ mDWCNT 吸入暴露肺の組織像(細気管支周辺)

DWCNT は複屈折性を示し、偏光顕微鏡下での観察において明るく輝いた像として観察される。

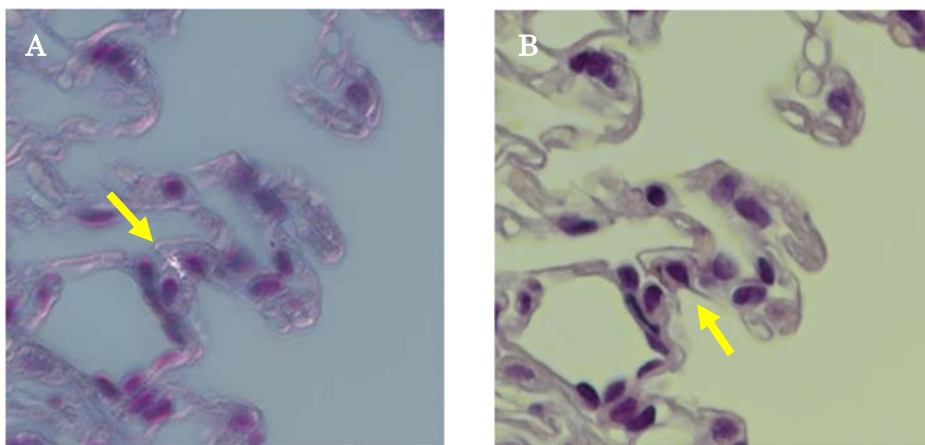


図 8 15 μ mDWCNT 吸入暴露肺の組織像 (肺胞)

DWCNT を貪食したマクロファージ。胞体が伸展している様子が観察された。A:偏光顕微鏡像、
B:通常光源による観察像

平成 29 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：ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

研究協力者：徐 結苟 名古屋市立大学特任教授・安徽省医科大学免疫学教室教授

David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

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 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古屋市立大学大学院医学研究
科博士課程院生

Ahmed Maher Mahmoud El-Gazzar 名古屋市立大学大学院医学研究科研
究生

研究要旨

目的:我々が開発したナノマテリアルの経気管肺内噴霧投与(TIPS法)による簡易 *in vivo* 毒性評価法を用いて、1) 無コーティング・アナターゼ型二酸化チタン(球状・直径 6nm) (an) とコーティング・ルチル型二酸化チタン(長球形・直径 10-20 μ m) (ru)、およびチタン酸カリウム ($K_2O \cdot 8TiO_2$) (線維状・平均長 6.0 μ m、直径 305 nm) (POT) の肺と胸膜における炎症と障害作用、細胞増殖刺激作用の解析を行った。方法: F344 系雌ラットを用い検体を 500 μ g/mL 濃度にて 0.5%PF68 分散剤添加生食 (PF68 saline) に懸濁して、15 日間に 8 回投与し (計 1 mg/ラット)、最終投与 6 時間および 4 週後さらに 52 週後に屠殺した。投与物質は予め Taquann 法にてエアロゾル分散後に tert-ブチルアルコール (TBA) に溶解し氷結保存した。これを使用直前に凍結乾燥させて PF68 saline に懸濁して使用した。麻酔下に脱血致死させて、胸腔洗浄液 (PLF) と細胞ペレットを採取し、右肺より肺胞洗浄液 (BALF)、および肺組織を採取して、炎症サイトカイン値、炎症の状態、肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖について解析した。左肺は凍結保存し CCL 種について RT-PCR と ELISA 解析をした。対照は無処置および PF68 saline 群とした。結果:肺では 6h ではすべての群に M ϕ を含む肺胞内炎症がみられ、4 w では持続する異物炎症に加え POT 群に肺胞上皮と胸膜中皮の PCNA ラベル値、肺組織の CCL 種の高値がみられた。PLF 上清には *in vitro* でのヒト肺がんと悪性中皮腫細胞に対する増殖刺激、BALF には細胞障害に起因する ALP と LDH の高値が見られた。また PLF 細胞ペレットには全ての投与群で投与検体が観察された。以上から、POT では肺胞と胸腔炎症、肺胞細胞と胸膜中皮増殖刺激がより強く持続することが判った。結論: an、ru および POT は肺胞に多数の M ϕ を見る異物炎症を誘導し、POT では 4 w でも粒子 TiO₂ よりも顕著であったことから、POT について発がん性を視野に入れた長期実験を実施中である。52 週では肺 M ϕ 数は減衰するものの溶媒軍より高値であった。一方、

PLF のタンパク量、臓側胸膜中皮の PCNA は 3w (投与終了 1 w) より増加した。さらに、長さの異なる二層カーボンナノチューブ(1.5、7.0、15micro-m の DWCNT)について投与終了 4 週を経過中である。

A. 研究目的

二酸化チタニウム (TiO₂) 粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、ナノサイズを含む TiO₂ 粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示すことから Group 2B (動物において発がん性を示す十分な証拠がある) と評価している。鉱物として製錬された TiO₂ 粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、光触媒活性の強いアナターゼ型 (an) は主として外壁塗料や白色色素として、ルチル型 (ru) は化粧品等に用いられている。我々はこれまでに、ラットにおいて非コーティング ru には肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ru を貪食した Mφ の産生するラジカルおよび分泌される炎症性タンパク (CCL3) による細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた (Xu, Carcinogenesis, 2010) 。一方、an の有害性影響について、光・UV 照射下での知見は乏しい。このために皮膚塗布と肺内 TIPS 投与にて実施してきた有害性研究においては、an (非コーティング、直径 25nm) ru (非コーティング、直径 20nm) について明らかな差異は観察されなかった (Numano, Asian Pacific J Cancer Prevention, 2014) 。最近の研究において、繊維状のカーボンナノチューブにはアスベストと似た発がん性を示すものがあることが分かってきた (Kasai, Particle and

Fibre Tox, 2015 ; Suzui, Cancer Sci, 2014) 。その機序について、繊維状の形状が発がんに関与するかについては未だ明らかではない。

本研究では、プラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなどに広く用いられている線維状の TiO₂ であるチタン酸カリウム

(K₂O・8TiO₂) (POT) について、球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO₂ (AMT-100) (an) および直径 10-20μm 類球形ルチル型 TiO₂ (ru) との肺と胸腔における障害作用について比較検討し、炎症反応の状態と持続性を明らかにし、52 週屠殺を実施し、長期試験における発がんリスクの可能性を検討した。104 週試験は進行中である。

さらに、懸案となっている多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の長さ と起炎症並びに発がんとの相関関係について、検体を入手できたので実感を開始した。

B. 研究方法

3 種の TiO₂ は日本化粧品工業会より提供された (広瀬明彦主任研究者より提供)。10 週齢 F344 雄ラットを用い、500μg/ml の濃度 に無コーティングの an (直径 6nm、AMT-100)、ru (直径 10-20μm) および POT (当研究室による計測にて平均長 6.0 μm、直径 305 nm) について、Taquann 法にてエアロソル分散後 t-ブチルアルコールに溶解氷結し (高橋祐次博士、Taquahashi, J Toxicol Sci., 2013)、使用直前

に凍結乾燥させて粉体とした生食中に 0.05% non-ionic, biocompatible amphiphilic block copolymers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PF68) を加えた分散媒体に懸濁して 0.5mL (125 μ g/ラット) を 15 日間に合計 8 回肺内噴霧 (TIPS) 投与した (計 1 mg/ラット)。最終投与の 6 時間後 (6h) および 4 週間後 (4w) に以下の検索を行った (各群 8 匹)。イソフルラン麻酔下に大動脈より採血によって致死させた後に開腹し、腹膜経由で胸腔中に 10ml の RPMI 1640 培養液を注入洗浄後に取り出し、胸腔洗浄液 (PLF) を得た。左肺は経気管的に採取した気管支肺胞洗浄液 (BALF) について炎症性細胞とくに M ϕ の検体貪食の状態と組織障害マーカー (ALP、LDH) の解析を行った。さらに左肺の一部は 4%パラホルムアルデヒド注入による固定をして病理標本とした。BALF を採取しない右肺は凍結保存し CCL 種の RT-PCR および ELISA 解析に用いた。また臓側胸膜中皮の軽度過形成が、POT 投与群と MWCNT 投与群にて少数発生した。

さらに、長さの異なる DWCNT は (1.5、7.0、15micro-m) は POT の場合と同じプロトコルにて、各群 14~16 匹として 1 匹あたりの投与量は 21×10^{12} 本/ラットとなるように調整して投与した。現在 2 週の投与開始より 6 週を経過中である。陽性対照として MWCNT-7 を 1mg/ラット

(15micro-m の DWCNT の投与量 1mg/ラットに合わせた) 5 月 21 日に 8 週の間屠殺を予定している。

対照群は無処置と PF68 含有生理食塩水のみを投与した群とした。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った。

C. 研究結果

1) 組織標本による肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖の解析：無処置と生食対照群より明らかな炎症細胞浸潤の増強が見られた。6h では肺胞中に検体貪食 M ϕ と好中球が主として見られたが、4w では線維化肉芽が多く散見され、肉芽中には検体を貪食した M ϕ および好中球、リンパ球を主とする炎症細胞が見られた。肺胞上皮と臓側胸膜中皮の PCNA ラベル率は POT において PF68 生食対照群 (以下対照群) より増加した。

2) 凍結肺における炎症性 CCL サイトカイン種の解析：肺組織における CCL 種の RT-PCR 解析では、POT が 6h と 4w において有意の増加を示した。

3) BALF の解析：4w において ALP 活性は対照より増加し、さらに POT においてより高値であった。LDH では an と POT において増加した。LDH 活性も an と POT において増加した。

4) PLF と PLF 細胞ペレットの解析：胸腔洗浄液より得た M ϕ の初代培養のコンディショナル培養液において、ヒト中皮腫細胞 (Met5A) に対する増殖活性には有意の増加が見られた。PLF 細胞ペレットでは 6h において M ϕ と好中球が大多数を占め、4w でリンパ球の割合が増加した。また 6h と 4w のいずれにも偏光顕微鏡で視認される投与検体が検出された。

4) 52 週投与群では、肺 Mφ 数は減衰するものの溶媒軍より高値であった。一方、PLF のタンパク量、臓側胸膜中皮の PCNA は 3w (投与終了 1 w) より有意に増加した。

D. 考察

すでにラットにおいて吸入暴露試験法によって肺発がん性が明らかにされている無コーティング ru (WHO/IARC Group 2B) について、我々の開発したナノ粒子の TIPS 投与による短期毒性リスク評価法を用いて、Mφ の分泌する CCL3 を介する発がん促進作用を見出した (Xu et al., *Carcinogenesis*, 2010)。また、ru を表皮剥離した皮膚に塗布しても障害作用は見られなかった (Xu et al., *Food Chem Toxicol.* 2011 および Sagawa et al., *J Toxicol Sciences*, 2012)。さらに、直径 25nm の an と直径 20nm の ru についても同様の *in vitro* および *in vivo* 試験で比較したが差異はなかった (Numano *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014)。

以上の知見に基づき、光触媒活性がより顕著で、生物毒性がより強力である小さいサイズの 6nm の an と、長球形の ru、および線維状で Mφ に対するストレスがより顕著と考えられている POT を肺内に投与して 2 週後の急性毒性、4 週を経た亜急性毒性について検討した。その結果、検体の肺から胸腔への移動は 6h でも検出され、炎症は 6h と 4 w とも POT にやや強く、肺胞内における CD68 染色で認識される Mφ の数は、POT で有意の増加を見た。また 6w でも炎症の程度は持続して観察された。PLF における Mφ の分泌する CCL 種によると考えられる肺がん細胞

と中皮腫細胞に対する増殖活性の観察等から、肺と胸膜組織への遷延性の炎症は繊維性の POT でより強く誘導されること、さらに高容量群の 52 週経過の POT と MWCNT の PCNA が有意に高く、また両群に胸膜中皮の過形成が発生してことから発がんリスクについて丁寧に検証する必要があると考えられた。

長さの異なる DWCNT については、今までの報告で 0.7micro-m の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかったこと (Muller, 2009) から、104 週の結果が待たれる。

E. 結論。

すべての検体において肺から胸腔への移動がみられ、Mφ の数は、肺から胸腔の炎症象は POT により顕著で、さらに肺がん細胞、中皮腫細胞の増殖活性は POT に強く見られた。以上から POT は発癌性について検索を進める必要がある。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 in press.

- 2) Magaki M, Ishii H, Yamasaki A, Kitai Y, Kametani S, Nakai R, Alexander DB, Tsuda H, Ohnishi T A high-fat diet increases the incidence of mammary cancer in c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats, J Toxicol Pathol 2017; 30: 145–152
- 3) Alexander D., Iigo M., Abdelgied M., Ozeki K., Tanida S., Joh T., Takahashi S., Tsuda H. Bovine lactoferrin and Crohn's disease: a case study, Biochemistry and Cell Biology, 95(1): 133-141, 2017.

2. 学会発表

津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬明彦、菅野純 気管内噴霧投与方法による各種のMWCNTの毒性と発がん性試験結果の比較, 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜

Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜

Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokle and Hiroyuki Tsuda Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

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 29 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」
分担研究報告書

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。昨年度は、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した。外表検査までの結果においては、MWCNT の催奇形性は判断できなかったが、内臓および骨格検査において変化が認められる可能性があることから、今年度は、上記の試験で得られた試料を用いて母動物の肺の病理検査および胎児の内臓および骨格検査を行い、影響について比較した。

その結果、MWCNT の妊娠マウスへの 4 mg/kg 反復投与によって、胎児に腎盂拡張、肋骨の癒合、胸椎弓の癒合および腰椎弓の癒合等の異常所見の発生率が増加した。異常所見の発生頻度については、MWCNT の処理方法により異なり、Taquann 処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも軽度であり、熱処理群および Taquann 処理+熱処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも若干強い影響がみられた。また、骨化遅延部位の発生頻度についても、同様に、Taquann 処理群は熱処理群および Taquann 処理+熱処理群よりも軽度であった。

今年度の検討によって、MWCNT の反復気管内投与による母動物および胎児への影響は、分散液の調製方法（分散状態）によって差が見られることが、内臓・骨格検査からも確認された。MWCNT 原末および Taquann 処理 MWCNT のいずれも、熱処理試料を投与した群の方が、媒体投与群との有意差がみられる項目が多かったことから、熱処理によって分散性が向上したことにより、胎児への影響が増大したものと考えられる。また、今回検査した項目のうち、骨格異常（骨化遅延）において有意差がみられる項目が最も多かったことから、発生毒性の中では骨格異常（骨化遅延）が最も鋭敏な指標であると考えられた。

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 (Pietrojusti 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。昨年度は、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した。外表検査までの結果においては、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、今年度は、上記の試験で得られた試料を用いて母動物の肺の病理検査および胎児の内臓および骨格検査を行い、影響について比較した。

B. 研究方法

1. 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。

下記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)。

マウス反復気管内投与試験の詳細については、昨年度の分担研究報告書(小林, 2017)に示している。

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. 母動物の病理組織学的検査

各群、3例の肺について、病理組織学的検査を実施した。常法に従ってパラフィン包埋し、薄切後、ヘマトキシリン・エオジン (H.E.) 染色を行った。鏡検では、病変の種類および程度を含む各所見を記録した。

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、胸部を西村の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: (異常発現胎児数 / 観察胎児数) × 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: (異常発現胎児数 / 観察胎児数) × 100

骨格変異発生率: (変異発現胎児数 / 観察胎児数) × 100

骨化進行度計数値発生率: (発現胎児数 / 観察胎児数) × 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

骨化進行度計量値については、最初に Bartlett の等分散検定 (Snedecor&Cochran, 1989) 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。

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は、Steel の検定を行い、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。

病理組織学的検査所見については、統計解析を実施しなかった。

C. 研究結果

1 母動物の病理組織学的検査

被験物質 1、被験物質 2、被験物質 3 および陽性対照群の全例で、マクロファージお

および肺胞内の被験物質沈着，肺胞内マクロファージの増加，肺胞内/肺胞壁の炎症細胞浸潤，血管周囲/細気管支周囲の炎症細胞浸潤，肺胞上皮の過形成が認められ，被験物質 1，被験物質 3 および陽性対照群の全例ならびに被験物質 2 群の 2 例で肺胞マクロファージの変性/壊死が認められた。

対照群においても，肺胞内マクロファージの増加が全例（軽度 2 例，中等度 1 例），肺胞内/肺胞壁および血管周囲/細気管支周囲の炎症細胞浸潤が各 1 例（軽度）に認められた。

2 胎児の検査結果

2.1 内臓検査

内臓検査結果を表 1 に示す。

未処理 MWCNT，熱処理 MWCNT および Taquann+熱処理 MWCNT 投与群において，内臓異常を伴う胎児の発生率が高値傾向を示した。

主な所見として，腎盂拡張および口蓋ひだ形態異常であり，上記 3 群において有意な高値あるいは高値傾向を示した。

その他，胸腺頸部残留，左臍動脈遺残，左総頸動脈起始異常，脳室拡張，鼻中隔欠損，鼻腔拡大，大動脈弓離断，腕頭動脈伸長，鎖骨下動脈起始異常，肝臓形態異常，腎臓位置異常，腎臓小型，精巣位置異常，口蓋裂および臍動脈位置異常が観察されたが，これらの内臓異常所見は，媒体投与群においても認められる所見または少数例に認められた所見であり，被験物質投与に起因した変化とは判断しなかった。

2.2 骨格検査

2.2.1 骨化異常

骨格検査結果（骨化異常）を表 2 に示す。

対照群と各 MWCNT 投与群との間で骨格異常を伴う胎児の発生率に統計学的に有意な差は認められなかった。所見として，肋

骨の癒合および胸椎弓の癒合が，腰椎弓の癒合が複数例に観察された。

その他，肋骨の欠損，肋骨の分岐，肋骨の分離，頸椎弓の欠損，頸椎弓の癒合，胸椎弓の欠損，胸椎弓の形態異常，腰椎弓の形態異常，腰椎体の癒合，腰椎の欠損，仙椎の欠損および尾椎の欠損が MWCNT 投与群の少数例に散見された。なお，腰椎の欠損は媒体対照群においても 1 例に認められたが，これらの骨格異常所見のいずれにも，MWCNT 物質投与群で有意な発生率の高値は認められなかった。

2.2.2 骨化変異

骨格検査結果（骨化変異）を表 3 に示す。

対照群と各 MWCNT 投与群との間で骨格変異を伴う胎児の発生率に統計学的に有意な差は認められなかった。所見としては，完全過剰肋骨の発生率が対照群と比べて統計学的に有意な高値あるいは高値傾向を示した。

その他，頸肋，短小過剰肋骨，波状肋骨および腰椎仙椎化が観察されたが，その発生率から，いずれも被験物質投与に起因した変化とは判断しなかった。

2.2.3 骨化遅延

骨格検査結果（骨化遅延）を表 4 に示す。

全ての MWCNT 投与群で骨化遅延を伴う胎児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。所見としては，上後頭骨の二分骨化および胸椎体の未骨化の発生率，頭蓋有窓，舌骨の未骨化，頸椎弓の不完全骨化，胸椎体の不完全骨化および腰椎体の不完全骨化の発生率，不完全骨化の発生率，上後頭骨の不完全骨化の発生率，鼻骨の不完全骨化および上後頭骨の未骨化の発生率，腰椎弓の不完全骨化および仙椎体の未骨化の発生率が有意な高値または高値傾向を示した。

その他、前頭骨の不完全骨化、上顎骨の不完全骨化、下顎骨の不完全骨化、顎間骨の不完全骨化、胸骨分節の二分骨化、胸椎弓の不完全骨化、腰椎弓の未骨化、腰椎体のダンベル状骨化、腰椎体の未骨化、坐骨の不完全骨化および未骨化、恥骨の不完全骨化および未骨化が MWCNT 投与群で散見された。

骨化進行度計量値としては、Taquann 処理 MWCNT 投与群を除く MWCNT 投与群で、胸骨分節の未骨化数および不完全骨化数が、対照群と比べ統計学的に有意な高値または高値傾向、中手骨、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の骨化数が有意な低値または低値傾向を示した。

Taquann 処理 MWCNT 投与群では、胸骨分節の不完全骨化数が高値傾向、前肢基節、中足骨、後肢基節および頸椎体の骨化数が有意な低値または低値傾向を示した。

D. 考察

1 母動物の病理組織学的検査

全ての MWCNT 投与群では、投与に起因する変化として、マクロファージおよび肺胞内の被験物質沈着が認められた。さらに、共通して、肺胞内マクロファージの増加、肺胞マクロファージの変性/壊死、肺胞内/肺胞壁の炎症細胞浸潤、血管周囲/細気管支周囲の炎症細胞浸潤、肺胞上皮の過形成が認められた。これらの所見の程度は、MWCNT の処理方法により異なり、Taquann 処理群が他の MWCNT 処理群と比べやや軽度で、熱処理群、Taquann 処理+熱処理群および陽性対照群については同程度であった。

昨年度の試験試験（小林，2017）において、Taquann 処理群では母動物の肺重量が高値を示すものの、他の MWCNT 処理群と比較すると若干軽く、肺における炎症性の変化が他の群よりも軽微であったこととの関

連性が考えられた。なお、対照群においても肺胞内マクロファージの増加および肺胞内/肺胞壁および血管周囲/細気管支周囲の炎症細胞浸潤が認められていることから、媒体の投与によっても若干の炎症反応が発生することが確認された。

2 胎児への影響

2.1 内臓検査

内臓検査では、未処理 MWCNT 投与群で腎盂拡張の発生率が有意な高値を示した。昨年度まで実施した試験（小林，2016，2017）において、4 mg/kg の MWCNT を妊娠 6，9，12 および 15 日に気管内投与した群で、腎盂拡張の有意な発生率の高値が認められており、腎盂拡張は MWCNT 投与に起因して発生率が増加した変化と考えられた。今回用いた熱処理 MWCNT および Taquann 処理+熱処理 MWCNT 投与群においても、有意差は認められないものの高値傾向が示されたことから、投与に起因した変化と考えられた。口蓋ヒダ形態異常の発生率が、被験熱処理 MWCNT 群で有意な高値を、Taquann 処理+熱処理 MWCNT 投与群および未処理 MWCNT 投与群で高値傾向を示した。未処理 MWCNT 投与群においても、熱処理 MWCNT 投与群と同程度の発生率を示したことから、口蓋ヒダ形態異常は MWCNT 投与に起因して発生率が増加したと考えられた。Taquann 処理 MWCNT 投与群で認められた内臓異常所見は、対照群と同程度の発生または単発的な発生であり、被験物質投与の影響は認められなかった。

2.2 骨格検査

骨格検査では、骨格異常所見に有意な発生率の高値は認められなかったが、昨年度まで実施した試験（小林，2016，2017）において MWCNT の反復投与群で高頻度に認められた異常所見（肋骨の癒合，胸椎弓の

癒合、腰椎弓の癒合)が、全ての MWCNT 投与群で認められ、MWCNT 投与との関連性が示唆された。その他にも、骨格異常所見として欠損または癒合を示す部位がいくつか認められたが、1~2 例に散見される程度の発生であるため、MWCNT 投与の影響とは判断できなかった。骨格変異所見として、完全過剰肋骨の発生率が陽性対照群で有意な高値を示した。昨年度まで実施した試験(小林, 2016, 2017)においても有意な変化ではないものの MWCNT の反復投与群で複数例に観察されていることから、完全過剰肋骨についても MWCNT 投与に起因して発生率が増加した変化と考えられた。骨化遅延を伴う胎児の発生率が全ての MWCNT 投与群で高値を示した。上後頭骨の二分骨化および胸椎体の未骨化については、すべての群で高値または高値傾向を示したことから、MWCNT 投与に関連した骨化遅延影響が示唆された。また、複数の部位で未骨化または不完全骨化が認められ、骨化進行度計量値においても、胸骨分節の未骨化数または不完全骨化数の高値に加え、複数の部位で骨化数の低値が認められた。これらの群では、胎児体重の有意な低値が認められていることから、骨化数の低値は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変化と考えられた。

以上のことから、MWCNT は妊娠マウスに 4 mg/kg を反復投与することで、胎児に腎盂拡張、肋骨の癒合、胸椎弓の癒合および腰椎弓の癒合等の異常所見の発生率を増加させ、催奇形性を有すると考えられた。異常所見の発生頻度については、MWCNT の処理方法により異なり、Taquann 処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも軽度であり、熱処理群および Taquann 処理+熱処理群は未処理 MWCNT 投与群よりも若干強い影響がみられた。また、骨化遅延部位の発生頻度についても、同様に、Taquann 処理群は熱処理

群および Taquann 処理+熱処理群よりも軽度であった。

E. 結論

今年度の検討によって、MWCNT の反復気管内投与による母動物および胎児への影響は、分散液の調製方法(分散状態)によって差が見られることが、内臓・骨格検査からも確認された(表 5)。

MWCNT 原末および Taquann 処理 MWCNT のいずれも、熱処理試料を投与した群の方が、媒体投与群との有意差がみられる項目が多かったことから、熱処理によって分散性が向上したことにより、胎児への影響が増大したものと考えられる。

また、今回検査した項目のうち、骨格異常(骨化遅延)において有意差がみられる項目が最も多かったことから、発生毒性の中では骨格異常(骨化遅延)が最も鋭敏な指標であると考えられた。

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。

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

Norihiko Kobayashi, Hiroto Izumi, Yasuo Morimoto: A review of toxicity studies of carbon nanotubes. *Journal of Occupational Health*, 59(5), 394–407 (2017).

2. 学会発表

Norihiko Kobayashi, Ryota Tanaka, Yoshiaki Ikarashi, Akihiko Hirose: Developmental toxicity assessment of four different preparations of multi-wall carbon nanotubes in mice after repeated intratracheal instillation. 57th Annual Meeting of the Society of Toxicology (SOT 2018) (2018.3.14 San Antonio, TX, 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

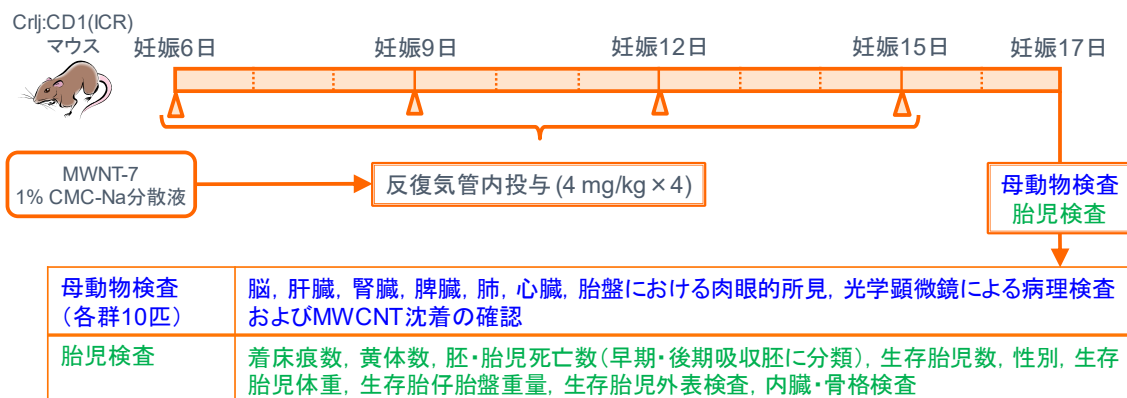


図1. 試験プロトコル

表1. 胎児の内臓検査の結果

	媒体	未処理 MWCNT	熱処理 MWCNT	Taquann 処理	Taquann + 熱処理
検査母動物数	12	13	8	12	12
検査胎児数	72	77	46	81	73
内臓異常胎児の母動物数 (%)	8 (67%)	12 (92%)	8 (100%)	9 (75%)	11 (92%)
内臓異常胎児数 (%)	15 (20%)	46 (59%)	23 (49%)	15 (19%)	30 (45%)
腎盂拡張	2 (2.2%)	27 (34%)	10 (21%)	3 (3.6%)	12 (18%)
口蓋ひだ形態異常	1 (1.4%)	9 (13%)	9 (20%)	0	5 (8.2%)

表2. 胎児の骨格検査の結果 (骨化異常)

	媒体	未処理 MWCNT	熱処理 MWCNT	Taquann 処理	Taquann + 熱処理
検査母動物数	12	13	8	12	12
検査胎児数	77	83	51	83	80
骨格異常胎児の母動物数 (%)	1 (8.3%)	5 (39%)	4 (50%)	2 (17%)	4 (33%)
骨格異常胎児数 (%)	1 (1.0%)	17 (22%)	20 (39%)	10 (11%)	17 (24%)
肋骨の癒合	0	17 (22%)	8 (15%)	1 (1.2%)	6 (9.7%)
胸椎弓の融合	0	12 (15%)	10 (20%)	1 (1.2%)	7 (11%)
腰椎弓の癒合	0	1 (1.3%)	7 (14%)	9 (10%)	7 (10%)

表3. 胎児の骨格検査の結果（骨化変異）

	媒体	未処理 MWCNT	熱処理 MWCNT	Taquann 処理	Taquann + 熱処理
検査母動物数	12	13	8	12	12
検査胎児数	77	83	51	83	80
骨格変異胎児の母動物数 (%)	9 (75%)	4 (50%)	9 (75%)	8 (67%)	12 (92%)
骨格変異胎児数 (%)	19 (24%)	13 (27%)	21 (26%)	21 (29%)	42 (51%)
完全過剰肋骨	3 (3.6%)	21 (24%)	4 (7.9%)	8 (9.1%)	9 (13%)

表4. 胎児の骨格検査の結果（骨化遅延）

	媒体	未処理 MWCNT	熱処理 MWCNT	Taquann 処理	Taquann + 熱処理
検査母動物数	12	13	8	12	12
検査胎児数	77	83	51	83	80
骨格遅延胎児数 (%)	11 (15%)	65 (79%)	50 (99%)	39 (45%)	64 (80%)
舌骨の不完全骨化	2 (3.3%)	2 (1.9%)	11 (21%)	3 (3.9%)	7 (8.4%)
舌骨の未骨化	1 (1.7%)	41 (50%)	22 (45%)	5 (5.7%)	17 (24%)
上後頭骨の二分骨化	5 (6.3%)	23 (25%)	33 (64%)	12 (13%)	18 (22%)
上後頭骨の不完全骨化	0	19 (25%)	5 (10%)	0	4 (6.7%)
頸椎弓の不完全骨化	0	17 (22%)	8 (16%)	1 (1.0%)	7 (11%)
胸椎体の不完全骨化	0	19 (25%)	18 (36%)	4 (4.6%)	8 (10%)
胸椎体の未骨化	2 (2.1%)	59 (71%)	48 (94%)	27 (30%)	42 (53%)
腰椎弓の不完全骨化	0	9 (12%)	11 (23%)	4 (4.2%)	10 (16%)

表5. 発生毒性試験結果のまとめ

	未処理	熱処理	Taquann処理	Taquann +熱処理
サイズ	-	小さい	さらに小さい	さらに小さい
分散性	-	高い	低い	高い
母体体重	低値傾向	有意な低値	有意差なし	低値傾向
胎児体重	有意な低値	有意な低値	有意差なし	有意な低値
胎児生存率	有意差なし	低値傾向	有意差なし	有意差なし
外表異常	有意差なし	有意差なし	有意差なし	有意差なし
内臓異常	有意差あり	有意差あり	有意差なし	有意差なし
骨格異常	有意差あり	有意差あり	有意差あり	有意差あり

平成29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慢性及び遅発毒性評価法の開発に関する研究」

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—

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： 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所毒性部
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、カーボンナノチューブ（CNT）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。昨年度までの研究でマウス肺を標的とする *in vivo-in vitro* 法を用いた小核試験法を確立し、CNT の遺伝毒性に関する予備試験を少数動物で実施した結果、CNT は陽性と判定された。今年度は同手法を用いて動物数を増やした本試験を実施した。各群 5 匹の雄性 C57BL/6NcrSlc マウス（投与／暴露開始時 12 週齢）に CNT を目標質量濃度 2.0 mg/m³ の濃度で 2 時間／日、5 日間全身吸入暴露した。陰性対照群には空気を同様に暴露した。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate（EMS）を 25 mg/kg の用量で 5 日間腹腔内投与した。最終暴露／投与後 5 日目に肺細胞を採取し、37℃、5% CO₂ 下で 48 時間培養し、小核をもつ細胞の誘発率を調べた。その結果、CNT 暴露群及び EMS 投与群では、陰性対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では EMS 投与群と比較して小核を有する細胞の出現頻度は約 1.6 倍の高値を示した。以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下においてマウス肺小核試験陽性と判定された。

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、その中のカーボンナノチューブ（CNT）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 CNT 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、CNT が DNA のセンサーに应用されているが、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、CNT 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 CNT 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、CNT は青石綿と同様に p53 ヘテロ欠損マウス腹腔内投与モデルにおいて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 CNT 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。

CNT 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 CNT 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。

本研究では、CNT 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た。この試験系の特徴は *in vivo* で暴露したマウスの肺を摘出後、肺細胞を培養する *in vivo-in vitro* 法であり、*in vitro* で細胞分裂を惹起させることにより、小核を含む分裂細胞を効率よく得ることができる。昨年度までの研究から、モデル化合物であるブレオマイシンと EMS を用いた試験によりマウスを用いる肺小核試験空気を同様に暴露した。暴露チャンバー内

系の技術基盤を整備した。CNT によって誘導される遺伝毒性評価の予備試験として、この解析手法を用いて、CNT をマウスに全身吸入暴露させ、CNT の肺小核誘発性を検討した。その結果、小核誘発の有意な増加が認められたことから、本年度はより多くのマウスを用いて CNT をマウスに全身吸入暴露させる本試験を行い、CNT の肺小核誘発性を詳細に検討した。

B. 研究方法

(1) 被検物質

CNT 検体は MWNT-7 (三井物産、Lot No. 060125-01k) を用いた。Taquann 法処理*により凝集体・凝固体を除去した高分散検体 (T-CNT) を得、被検物質とした。Ethyl methanesulfonate (EMS, Sigma-Aldrich Corporation, lot#: BCBQ0451V) を陽性対照に使用した。また、空気を全身吸入暴露の陰性対照とした。

*Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. J Toxicol Sci. 2013;38(4):619-28.

(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) マウスを購入して試験に用いた。各群 5 匹とし、陰性対照群、陽性対照群および CNT 暴露群の合計 15 匹を使用した。馴化期間は動物入荷後 1 週間とし、12 週齢の動物を試験に使用した。

(3) 投与

① CNT: Taquann 直噴全身曝露吸入システム (ver. 2.0、柴田科学株式会社) を用い、2 時間/日、5 日間連続の全身吸入暴露を行った。対照群には HEPA フィルターを通したの MWCNT エアロゾル濃度のモニタリングは、

相対濃度測定 (CPM; count per minutes) と質量濃度測定 (mg/m³) を並行して行った。相対濃度測定は、凝縮粒子計数装置 (Condensation Particle Counter ; CPC、CPC3776、サンプリング流量 : 1.5 L/min、TSI、東京ダイレック株式会社) を用いた。CPC の前段には希釈装置 (Dilution controller、柴田科学) を接続し、サンプルを 15 倍希釈して測定した。質量濃度測定は、ローポリウムサンプラー (080050-155、φ55 mm ろ紙ホルダー、柴田科学) にフッ素樹脂処理ガラス繊維フィルター (Model T60A20、φ55mm、捕集効率 (DOP 0.3 μm) : 96.4%、東京ダイレック株式会社) を装着し、サンプリングポンプ (Asbestos sampling pump AIP-105、柴田科学株式会社) に接続して 1.5 L/min の流量で暴露時間の 2 時間を通してエアロゾルを吸引しフィルターに検体を捕集した。ろ過捕集後のフィルターの重量から予め秤量したフィルターの重量を差し引いた値を検体の重量とし、吸引空気量 1.5 L/min × 120min=180 L から 1 m³ 当りの質量濃度を算出した。フィルターの秤量にはマイクロ天秤 (XP26V、METTLER TOLEDO) を使用した。5 回の質量濃度の平均は 2.8 mg/m³、相対濃度は 1,773/cm³ であった。

② EMS : 生理食塩液 (日本薬局方、株式会社大塚製薬工場) に溶解して、2.5 mg/mL 投与液を調製し、25 mg/kg の投与用量で投与した。

(4) 細胞分離培養および標本作製

最終暴露・投与日の 5 日後、Lindberg らの方法を参考に下記の方法で Clara 細胞及び AT-II 細胞分画を分離、識別した。

- i. マウスを麻酔下で放血して安楽死させた。
- ii. PBS (-) で気管・肺内を洗浄した後、0.25% の「動物実験の適正な実施に関する規定」、

トリプシン液で肺内を満たした。

- 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. 牛胎仔血清 (FBS) と 250 μg/mL DNase を含む液を加えて、37°C 温浴中で 10 分間処理した。
- v. セルストレーナー (孔径 100 μm) でろ過した後、1500 × g、10 分間遠心分離して肺細胞 (沈査) を回収した。
- vi. Percoll の密度勾配 (密度 : 1.089 及び 1.040) により遠心分離 (2000 × g、常温、25 分間) 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、1% クエン酸ナトリウム液で低張処理し、酢酸-エタノール (1:3) 固定液で細胞を固定してスライド標本を作製した。

(5) 標本染色および標本観察

- i. 上記で作製したスライド標本をアクリジン オ レ ン ジ (AO) -4',6-Diamidino-2-phenylindole (DAPI) 混合液で染色して、蛍光顕微鏡下 (U 励起) で観察した。
- ii. 肺細胞 2000 個/匹を数え、小核をもつ細胞の誘発率を算出した。
- iii. 円形から楕円形の比較的大きな細胞を測定対象細胞とした。

(6) 統計学的解析、試験結果の評価

肺細胞における小核誘発頻度について、陰性対照群と CNT 暴露群あるいは陰性対照群と 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。

(倫理面への配慮)

動物を用いた実験は、所属機関におけるわが国における「動物の保護及び管理に

関する法律」、「実験動物の飼育及び保管等に関する基準」ならびに厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に準拠して行った。加えて、試験実施機関による動物実験に関する倫理委員会の承認を得るなど、実験動物に対する動物愛護を配慮の上で実施した。

C. 研究結果および考察

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

CNT 暴露群において陰性対照群と比較して、小核をもつ肺細胞の有意で明らかな高値が認められ、CNT は Taquann 法による吸入暴露により肺における小核を有意に誘発することが確認された。陽性対照として使用した EMS 投与群でも陰性対照群と比較して、小核をもつ肺細胞の有意な高値が認められた。CNT 暴露群の小核誘発頻度は、EMS 投与群と比較して約 1.6 倍の高値を示したことから CNT は比較的強い肺小核誘発物質であると考えられた。

D. 結論

CNT による *in vivo* における遺伝毒性を評価するために、マウスを用いる肺小核試験を実施した。

雄性 C57BL/6NcrSlc マウス（暴露／投与開始時 12 週齢）に、Taquann 法を用いて CNT を 2 mg/m^3 の濃度で 2 時間／日、5 日間全身吸入暴露した。陰性対照群には空気を同様に暴露した。また、陽性対照物質として ethyl methanesulfonate (EMS) の 25 mg/kg を 5 日間腹腔内投与した。最終暴露／投与後 5 日目に肺細胞を採取し、 37°C 、 $5\% \text{ CO}_2$ 下で 48 時間培養した。培養後、細胞を固定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、CNT 暴露群及び EMS 投与群で

は、陰性対照群と比較して小核誘発の有意な増加が認められ、CNT 暴露群では EMS 投与群と比較して小核を有する細胞の出現頻度は約 1.6 倍の高値を示した。

以上の結果から、CNT は *in vivo-in vitro* 法を用いた本試験条件下で、マウス肺小核試験陽性と判定された。

E. 健康危機情報

特になし

F. 研究発表

1. 論文発表

なし

2. 学会発表

Takasawa H, Hamada S, Taquahashi Y, Horibata K, Nakagawa M, Honma M, *In vivo* genotoxicity assessment of multi-wall carbon nanotubes using *in vivo* / *in vitro* lung micronucleus assay in mice, The Environmental Mutagenesis and Genomics Society 48th Annual Meeting, North Carolina (2017.9)

高沢博修, 志賀野美幸, 高橋祐次, 田中亜矢子, 中館記代子, 堀端克良, 安永勝昭, 中川宗洋, 濱田修一, 本間正充, *In vivo-in vitro* マウス肺小核試験を用いたカーボンナノチューブの *in vivo* 遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会第46回大会, 東京 (2017.11)

堀端克良, 鶴飼明子, 小縣昭夫, 中江大, 安藤弘, 久保喜一, 長澤明道, 湯澤勝廣, 本間正充, F344 *gpt* delta ratsを用いた多層カーボンナノチューブ単回気管内投与による *in vivo* 遺伝毒性評価, 日本環境変異原学会第46回大会, 東京 (2017.11)

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table1: 小核試驗結果

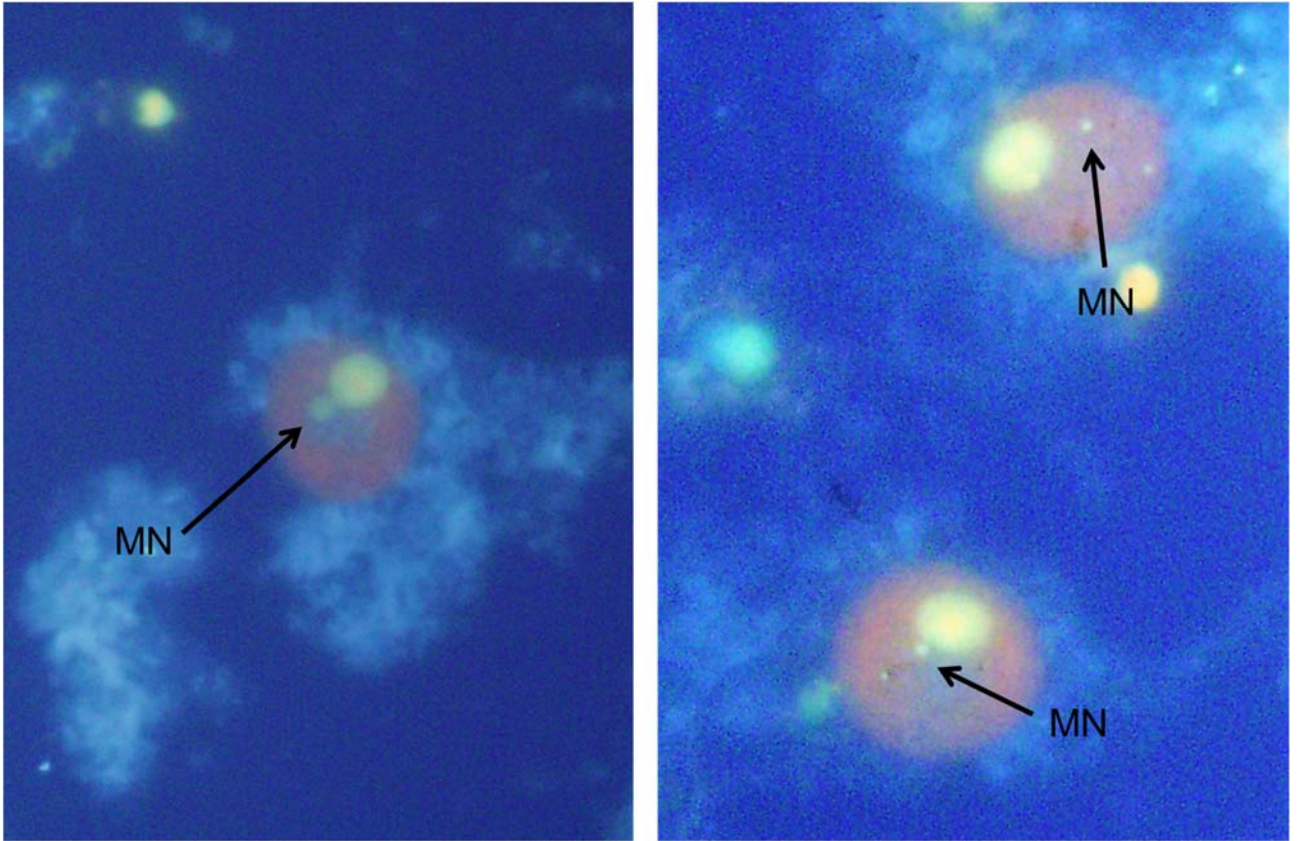
Treatment group	Dose Level Route Frequency	Animal number	Number of cells scored	Number of micronucleated (MN) cells	Incidence of MN cells (%)
Air	0 mg/m ³	10101	2000	8	0.40
	Inhalation ^{a)} 5 days ^{b)}	10102	2000	5	0.25
		10103	2000	6	0.30
		10104	2000	11	0.55
		10105	2000	9	0.45
Total / Mean ± S.D.			10000	39	0.390 ± 0.119
CNT	2 mg/m ³	10201	2000	31	1.55
	Inhalation ^{a)} 5 days ^{b)}	10202	2000	20	1.00
		10203	2000	24	1.20
		10204	2000	18	0.90
		10205	2000	40	2.00
Total / Mean ± S.D.			10000	133 ##	1.330 ± 0.449
EMS	25 mg/kg	10301	2000	19	0.95
	i.p. 5 days	10302	2000	18	0.90
		10303	2000	18	0.90
		10304	2000	12	0.60
		10305	2000	15	0.75
Total / Mean ± S.D.			10000	82 ##	0.820 ± 0.144

CNT: Carbon nanotubes, EMS: Ethyl methanesulfonate

^{a)} Whole body inhalation

^{b)} For 2 h/day for 5 consecutive days

p<0.01 (Kastenbaum and Bowman's method)



CNT (Whole-body inhaled at 2 mg/m³/day for 5 days)

Fig. 1 Microscopic observation in the mouse lung micronucleus assay

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 主任研究官

研究要旨

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の毒性と慢性炎症との関連が注目されている。長さや径の異なる各種 MWCNT や針状チタン酸カリウムが、マクロファージからの炎症性サイトカイン $\text{TNF}\alpha$ 産生を誘導する機構について検討を行った。MWCNT-WL、-WS、-T、-SD1、および針状チタン酸カリウム曝露による $\text{TNF}\alpha$ mRNA 発現および分泌は、IL-1 受容体アンタゴニストの共存あるいは IKK-2 阻害剤処理によりほぼ完全に抑制された。したがって、各種ナノマテリアル刺激により分泌された IL-1 β が、細胞膜の IL-1 受容体・NF κ B 活性化を介して $\text{TNF}\alpha$ 産生を促進するオートクライン機構が明らかになった。一方、二層カーボンナノチューブ DWCNT については、貪食作用と NLRP3 インフラマソームを介して IL-1 β 産生を促進したが、 $\text{TNF}\alpha$ 産生の促進は認められなかった。

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。体内に入ったナノマテリアルは、マクロファージ等の貪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貪食系細胞内でのインフラマソーム活性化を介した炎症誘導機構を明らかにし、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、長さや径の異なるさまざまな針状の多層カーボンナノチューブについて、マクロファージに曝露すると、NLR pyrin domain containing 3 (NLRP3) インフラマソームの活性化を介して炎症性サイトカイン IL-1 β を強力に産生することを明らかにしている。昨年度は、炎症性サイトカイン $\text{TNF}\alpha$ 産生も促進すること、いずれの MWCNT の場合にも、貪食と NLRP3

インフラマソームを介する応答であることを明らかにした。今年度は、(1)各種 MWCNT による $\text{TNF}\alpha$ 産生のメカニズムを明らかにすること、(2)二層カーボンナノチューブ (DWCNT) の IL-1 β および $\text{TNF}\alpha$ 産生に対する影響の解明を目的とする。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

本研究で用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) は以下の通りである。MWCNT-WL (長さ 0.5-10 μ m、径 85-200 nm) および 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) は戸田工業 (株) より入手した。MWCNT-SD1 (平均長 4.51 μ m、径 150 nm) は昭和電工より提供された。DWCNT (長さ 5、10、15 μ m、径 1-3 nm) は岡山大学林靖彦教授が合成し本研究班分担研究者高橋によ

り調製され提供された。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。

2. MWCNT ならびに DWCNT 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 シリンジ通過を行い分散した。DWCNT は等重量に相当する Tween 20 を 2% 溶液(PBS)として添加し、一晚放置後、PBS で希釈後、バス型超音波発生装置で 10 分間処理を繰り返し、最終 DWCNT 濃度を 0.25mg/mL、Tween 20 を 0.025% とした。

3. 細胞からの IL-1 β ・TNF α 分泌測定

ヒト単球由来 THP-1 細胞は 24well プレートに播種し、0.3 μ M 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、分散したナノチューブ類あるいは対照となる溶剤を無血清培地に添加し 6 時間培養した。最終 Tween 濃度は 0.001% 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。定量的リアルタイム RT-PCR は TaqMan one-step RT-PCR Master Mix Reagent Kit (Applied Biosystems) と ABI Prism 7300 を用いて行った。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 TNF α 産生促進の機構

昨年度の研究において、MWCNT-WL、-WS、-T および-SD1 暴露により TNF α が産生されること、さらにこの応答は NLRP3 ノックダウンおよび caspase-1 阻害により抑制され、IL-1 β 分泌と

同様に NLRP3 インフラマソームを介することを明らかにした。本年度はそのメカニズムの解明を試みた。

THP-1 マクロファージに 100~3000 pg/mL の IL-1 β を 6 時間曝露すると、濃度に依存した TNF α 分泌促進が認められた。IL-1 β (3000pg/mL) による TNF α 分泌は、IL-1 受容体アンタゴニスト (100ng/mL) の共存によって完全に抑制された。IL-1 β 暴露により TNF α mRNA レベルも上昇したが、IL-1 受容体アンタゴニストの共存ならびに I- κ B キナーゼ阻害剤である ML120B 処理により完全に抑制された。したがって、この細胞系では、培地の IL-1 β が IL-1 受容体、引き続き NF- κ B 活性化を介して TNF α 産生を促進する応答を観察できることが判明した。

細胞に MWCNT-SD1 (10 μ g/mL) を暴露すると TNF α 分泌ならびに TNF α mRNA 発現が顕著に促進されるが、この促進についても、IL-1 受容体アンタゴニスト、ならびに IKK-2 阻害剤の ML120B 処理によりほぼ完全に抑制されることが判明した (表 1)。したがって MWCNT-SD1 刺激により分泌された IL-1 β の autocrine 作用により、NF- κ B 活性化を介して TNF α 産生が促進される機序が推察される。同様に MWCNT-WL、-WS、および-T、ならびにチタン酸カリウム曝露による TNF α 産生促進についても、IL-1 受容体アンタゴニストの共存によりほぼ完全に抑制されることを確認した (表 2)。

2. DWCNT による IL-1 β 産生促進

三種類の二層ナノチューブ DWCNT (長さ 5、10、15 μ m) について、THP-1 マクロファージに 5~40 μ g/mL の濃度で曝露し、培地へのサイトカイン分泌への影響を調べた。いずれの DWCNT も IL-1 β 産生を促進したが、その産生量は MWCNT-SD1 に比較し、DWCNT-15 μ m で約 1/5、DWCNT-1 μ m では 1/20~1/5、DWCNT-7.5 μ m では約 1/20~1/50 程度であった。一方、TNF α 産生は全く促進せず、DWCNT 高濃度ではむしろコントロール細胞より分泌が低下する傾向が認

められた。

各種 DWCNT による IL-1 β 産生は、細胞をサイトカラシン D 処理することにより、また細胞の NLRP3 をノックダウンすることにより、あるいは NLRP3 活性化を抑制することが知られる 1mM の KCl を培地に添加するとほぼ完全に阻害された。したがって、貪食作用ならびに NLRP3 インフラマソームを介する応答であることが明らかになった。

D. 考察

昨年度までの研究により、多様な長さ・径を有する様々な MWCNT やチタン酸カリウムを細胞に暴露すると、TNF α 産生が協力的に促進されること、その促進作用には、IL-1 β 産生の場合と同様に、MWCNT の貪食が必要であり、NLRP3 インフラマソームが関与することを明らかにした。本年度は、その機構について、さらなる解析を行った。

TNF α は転写・翻訳産物がそのまま細胞外に分泌される。TLR 刺激が NF- κ B 活性化・転写誘導を介して TNF α 産生を促進する経路が知られている。また NF- κ B 活性化と TNF α 産生は、IL-1 β による IL-1 受容体刺激などによっても誘導される。本研究で用いた THP-1 マクロファージにおいては、培地中の IL-1 β により IL-1 受容体および NF- κ B 活性化を介する TNF α 転写・分泌促進の応答を観察できることを確認した。各種 MWCNT の TNF α 産生応答についても、IL-1 受容体アン

タゴニストならびに NF- κ B 活性化阻害により顕著に抑制された。したがって、各種 MWCNT が直接 NF- κ B を活性化するよりはむしろ、各種 MWCNT が貪食され NLRP3 インフラマソーム活性化を介して分泌される IL-1 β が、細胞膜の IL-1 受容体を活性化するオートクライン機構により、TNF α 産生が促進される機序であることが強く示唆される。

一方、三種の長さの DWCNT についても、THP-1 マクロファージに暴露すると IL-1 β 産生が促進され、貪食と NLRP3 に依存した作用であることが判明した。最長の DWCNT-15 μ m が最強の IL-1 β 産生促進を示したが、TNF α 産生は全く認められなかった。ナノチューブの分散には Tween20 を用いたが、MWCNT に比較し DWCNT の分散は著しく困難であった。ナノチューブ単位重量あたりの表面積の違いが生理活性に影響する可能性もあり、分散方法の再検討が必要と思われる。

E. 結論

様々な長さ・径をもつ MWCNT やチタン酸カリウムによるマクロファージからの TNF α 産生について、分泌された IL-1 β のオートクラインによる機構を明らかにした。DWCNT も長さに応じ NLRP3 を介する IL-1 β 産生作用を示した。

F. 研究発表

該当なし

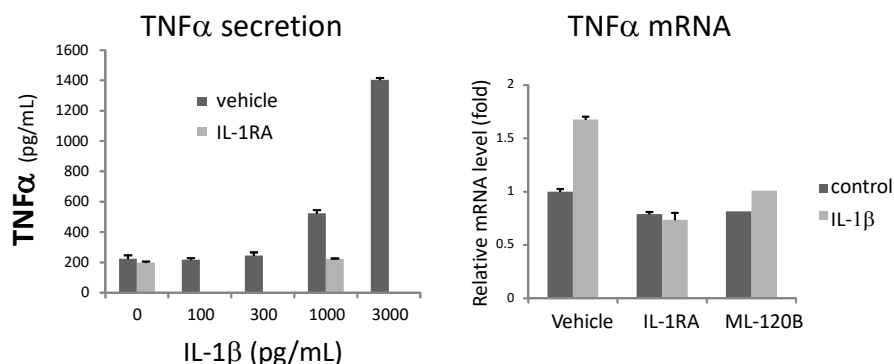


図1. IL-1β刺激によるTNFα mRNA発現・分泌促進のIL-1受容体アンタゴニスト(IL-1RA)およびIKK-2阻害剤(ML-120B)による抑制

表1. MWCNT-SD1暴露によるTNFα mRNA発現・TNFα分泌促進へのIL-1受容体アンタゴニストおよびIKK-1阻害剤の影響

	Vehicle	IL-1RA	ML-120B
TNFα mRNA (increased levels)	5.00 ± 0.11	0.53 ± 0.04	0.26 ± 0.14
TNFα secretion (pg/mL)	1970 ± 263	140 ± 21	24 ± 30

表2. 各種MWCNTによるTNFα産生に対するIL-1受容体アンタゴニストの影響

	MWCNT-SD1	MWCNT-WL	MWCNT-WS	MWCNT-T	針状チタン酸カリウム
Length	Ave: 4.51 μm	0.5-10 μm	0.5-2 μm	数10~数100μm	10-20μm
Diameter	(150 nm)	85-200 nm	40-70 nm	20-100 nm	300-600 nm
TNFα secretion	++++	++	++	+++	+++
+ IL-1RA	90-100% Inhibition	80% Inhibition	100% Inhibition	100% Inhibition	95% Inhibition

平成 29 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

分担研究課題名：ナノマテリアルの感染性免疫系への影響に関する研究

研究分担者： 渡辺 渡 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 明石 敏 九州保健福祉大学薬学部 教授

研究協力者： 吉田裕樹 九州保健福祉大学薬学部 講師

研究協力者： 宮内亜宜 九州保健福祉大学薬学部 助教

研究要旨

長さの異なる 3 種類の二層カーボンナノチューブ (DWNTs) 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。DWNTs および MWNT-7 (陽性対照) を懸濁して複数回経鼻曝露 (感染 5,3,1 日前) 後、RSV をマウスに感染させた。DWNTs 曝露マウスの感染 5 日後では、肺炎マーカー CCL5 レベルの上昇や肺病理組織像から肺炎が増悪化していることが確認され、特に最も短い DWCNT-1 では MWNT-7 と比較しても顕著であった。感染 1 日後において、DWNTs 曝露で肺組織での炎症亢進が見られ、特に DWCNT-1 の高用量曝露では肺胞マクロファージなどでの貪食も確認された。また、DWCNT-1 高用量曝露では感染初期での TNF- α 産生抑制も見られ、DWNTs では MWNT-7 とは異なった免疫応答への影響が示唆された。

A. 研究目的

二層カーボンナノチューブ (DWNTs) は、単層カーボンナノチューブの持つ高導電性や柔軟性と多層カーボンナノチューブの持つ電氣的・熱的安定性の両方の長所を併せもつナノデバイス材料として、その用途が拡大しつつある。一方

で、多層カーボンナノチューブで指摘されているような物理的特性ゆえの健康影響への危惧も解消されておらず、DWNTs の生物学的な安全性の評価は重要な課題になっている。

本研究では、これまでナノマテリアルの免疫系への影響、その中でも感染性免疫系への影響を respiratory syncytial virus

(RSV) 感染マウスモデルを用いて評価を行ってきている。そして、前年度までにMWNT-7やチタン酸カリウムの肺炎増悪化や感染初期での免疫応答への影響について報告した。

今年度は、3種類の長さが異なるDWNTsを対象にRSウイルス感染による肺炎形成への増悪化現象や感染初期からの免疫応答影響について、MWNT-7と比較しながら検討を実施した。

B. 方法

RSV マウス感染実験

DWCNT-1 (長さ 1 μm)、DWCNT-7 (長さ 7 μm)、DWCNT-15 (長さ 15 μm) および高度分散化 MWNT-7 (Taquan サンプル) を実験に用いた。これらの試料について、秤量後に超音波破碎機や 27G シリンジを用いて懸濁しながら段階的に希釈し、最終的に 0.02~0.1% Tween 20-phosphate buffered saline (PBS) に懸濁・希釈した。ウイルス感染 5、3、1 日前に試料を 100 μL ずつ 0.025~0.125 mg/kg になるように BALB/c マウス (雌性、6 週齢) に麻酔下 (ketamine 40 $\mu\text{g/g}$, xylazine 6 $\mu\text{g/g}$, 筋注) で経鼻投与した。なお、対照にはサンプル懸濁調製時の溶媒を投与した。曝露後、RSV A2 株 5×10^5 PFU を麻酔下で経鼻感染させた。RSV 感染 1 および 5 日後に麻酔下でマウス気道にカテーテル経由で冷 PBS 0.8 mL を注入し、肺胞洗浄液 (BALF) を取得した。BALF は使用時まで -80°C に保

管した。BALF 中から取得した細胞については、塗抹標本を作製し、ライトギムザ染色を実施した。肺は中性ホルマリンを気道より注入し、結索後に摘出しホルマリン固定を行った。

BALF 中のサイトカイン・ケモカインの定量

CCL5 (RANTES)の定量は R&D Systems 社製の Quantikine ELISA キットを用いた。TNF- α の定量は、Ready-Set-Go ELISA キット (eBioscience 製) を用いた。なお添付のプロトコールに準じて実験を実施した。

肺組織の病理組織学的解析

標本作成は (株) バイオ病理研究所に委託し、評価は HE 染色下で実施した。

(倫理面への配慮)

動物実験は九州保健福祉大学動物実験に関する規則に従って、安全面および倫理面に配慮して適正に実施した。

C. 研究結果

(1) 感染 5 日後の評価結果

RSV感染による肺炎の代表的なマーカーであるケモカインCCL5のBALF中のレベルを測定した。ウイルス非感染マウスでは検出限界以下であったのに対して、感染マウスでは何れもCCL5レベルは上昇していた。そして、DWNTs 0.025 mg/kg曝露マウスでは、対照に対して上昇傾向が認められ、特にDWCNT-1で高値を示した。これらのマウスの肺の

病理組織学的所見では、程度の差はあるがDWNTs曝露により血管周囲へのリンパ球の浸潤や肺胞壁の腫張が認められた。さらに肺5葉についてそれぞれ炎症の程度を5段階で評価した。その結果、肺炎亢進の程度は、概ねDWCNT-1 > DWCNT-7 \approx MWNT-7 > DWCNT-15となった。特に、DWCNT-1は肺胞マクロファージなどでの貪食も確認された。

(2) 感染1日後の評価結果

RSウイルス感染5日後での評価結果を受けて、最も影響が見られたDWCNT-1と影響が弱かったDWCNT-15について、用量を0.125 mg/kg に上げて感染初期の影響を検討した。感染初期のBALF中の炎症性マーカーTNF- α レベルは、非感染マウスにおいて全て検出限界以下であった。これに対してRSウイルス感染マウスではDWCNT-1 0.025 mg/kgでは上昇傾向にあったが、0.125 mg/kgではむしろ強い抑制傾向が認められた。一方、DWCNT-15およびMWNT-7曝露群ではそのような抑制は見られなかった。DWCNT-1曝露マウスのBALF中の浸出細胞では、DWCNT-1の貪食が認められた。RSV感染マウスの肺の病理組織学的所見では、DWNTsとMWNT-7曝露により、動脈周囲への炎症性細胞の浸潤や上皮細胞の腫大などが見られた。また、炎症のスコアはDWNT-1の高用量で最も高い結果となった。

D. 考察

RSV感染後1および5日後の結果から、DWNTs曝露ではRSウイルス感染により肺組織での炎症が亢進し肺炎の増悪化が確認された。中でもDWCNT-1は、その小ささからか肺胞マクロファージなどの細胞における貪食が顕著であったが、確認されたDWNT-1は何れも凝集した数十 μ m程度の長さをもつ繊維塊様であった。DWNTsは0.02~0.1% Tween 20-PBSで容易に分散はせず、線維長が長いほどその傾向が強く、この凝集し易い物性による二次的な形状の大きさが病態への影響を反映していることが示唆された。DWCNT-1とおよびDWCNT-15の高用量での暴露では、RSV感染の有無にかかわらず感染1日後において肉芽の形成が見られており、感染回復期(14日後頃)まで影響が残っている可能性も高く、より長期に亘った影響評価の必要性が高まった。

DWCNT-1はMWNT-7と異なり試験を通じて細胞での貪食像が多く見出され、さらにTNF- α の産生抑制活性をもつ可能性が強く示唆されている。今後MWNT-7と比較しながらサイトカイン誘導能の相違についても検討していく必要があると思われる。

E. 結論

1. DWNTs曝露によりRSウイルス感染マウスの肺炎は増悪化し、中でもDWCNT-1でその効果が高かった。

2. DWNTsはウイルス感染初期から炎症の誘導が見られ、肺胞マクロファージなどでの貪食の程度や免疫応答がMWNT-7と異なることが示された。
3. DWNTsの高用量曝露では早い段階から肉芽の形成が観察され、肺炎回復期への強い影響も示唆された。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1.論文発表

Watanabe, W., Hirose, A., Takeshita, T., Hashiguchi, S., Sakata, K., Konno, K., Miyauchi, A., Akashi, T., Yoshida, H., Sugita, C., Kurokawa, M. Perinatal exposure to tetrabromobisphenol A (TBBPA), a brominated flame retardant, exacerbated the pneumonia in respiratory syncytial virus (RSV)-infected offspring mice. *J. Toxicol. Sci.* (2017) 42, 789-795.

渡辺 渡、宮内亜宜. RS ウイルス感染マウスモデルでの感染初期応答の重要性. *BIO Clinica* (2018) 33, 245-250.

2. 学会発表

Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Aki Miyauchi, Hiroki Yoshida, Masahiko Kurokawa, Wataru Watanabe. Effects of potassium titanate on the pneumonia in respiratory syncytial virus-infected mice. EuroTox 2017, P-05-03-09 Slovak National Theatre, Bratislava, 20170912

Wataru Watanabe, Seiko Hashiguchi, Toshi Akashi, Akihiko Hirose, Hiroki Yoshida, Aki Miyauchi, Chihiro Sugita, Masahiko Kurokawa. Effects of multi-walled carbon nanotubes on primary immunity responding to respiratory syncytial virus infection in mice. EuroTox 2017, P-05-03-10 Slovak National Theatre, Bratislava, 20170912

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

なし

3. その他

平成 29 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

分担研究課題名：ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響評価研究

研究分担者：石丸 直澄	徳島大学大学院医歯薬学研究部 教授
研究協力者：新垣理恵子	徳島大学大学院医歯薬学研究部 准教授
研究協力者：牛尾 綾	徳島大学大学院医歯薬学研究部 助教
研究協力者：大塚 邦紘	徳島大学大学院医歯薬学研究部 大学院生

研究要旨

ナノマテリアルの免疫システムへの慢性的な影響に関しては詳しく知られていない。本研究では、Taquann 処理されたナノマテリアルの長期における免疫システム全体への慢性的な影響を観察することによって、ナノマテリアルの免疫制御システムへの影響を評価した。前年度までに PEC 中のマクロファージは Ti 投与では M1 へ、T-CNT 投与では M2 へ分化シフトが見られた。今回の実験では、クロドロン酸リポソームの処理によりマクロファージが機能不全に陥っている状況でのナノマテリアル曝露が免疫系にどのような影響を及ぼすのかを検討したところ、T-CNT 投与群でマクロファージからの TNF- α が産生亢進されている可能性が示された。クロドロン酸投与によって、抑制性サイトカインが産生される可能性が示唆された。また、MRL/lpr マウスへの T-CNT あるいは Ti の腹腔内投与での比較では、PEC 中のマクロファージの細胞数、フェノタイプが大きく異なっていた。血清中のサイトカイン・ケモカインの分泌濃度は Ti 投与によって MIG の分泌が亢進していた。さらに、正常 B6 マウスへの長さの異なる 2 層化 CNT 投与では、DWCNT の曝露によって、スカベンジャー受容体を介した生体反応が作動する可能性が示された。

A. 研究目的

ナノマテリアルの曝露による免疫系への影響に関しては、カーボンナノチューブの吸引による肺胞マクロファージの活性化を検討した研究がよく知られている。さら

に、カーボンナノチューブの吸入曝露により、T細胞のマイトージェンに対する反応性が低下し、NK活性に関してもカーボンナノチューブ曝露により抑制されることが報告されている。ナノマテリアルの曝露による慢性的な免

疫システムへの詳細な影響に関しては不明のままである。本研究では、ナノマテリアルの投与による免疫システムへの影響を観察することにより、ナノマテリアルの免疫制御システム全体に対する効果を評価することを目的としている。

今年度は3つの実験を実施した。まず、クロドロン酸リポソームとナノマテリアル暴露を組み合わせて、生体内でマクロファージが機能不全に陥った状態での変化を検討した。次に、自己免疫疾患モデルを用い、T-CNTとTi腹腔内投与による両者の比較検討を実施した。最後に、繊維長の異なる2層化カーボンナノチューブを正常マウスに腹腔内投与することによる免疫反応を検討した。

B. 方法

マウス

8週齢の雌 C57BL/6 (B6) マウス (各群 5 匹) を用い、以下の 6 群にて実験を進めた。①リポソーム投与 (Lipo) 群、②クロドロン酸—リポソーム (Clo) 投与群、③T-CNT 及びリポソーム (T-CNT+Lipo) 投与群、④T-CNT 及びクロドロン酸—リポソーム (T-CNT+Clo) 投与群、⑤Ti 及びリポソーム (Ti+Lipo) 投与群、⑥Ti 及びクロドロン酸—リポソーム (Ti+Clo) 投与群。クロドロン酸—リポソームあるいはリポソームは T-CNT あるいは Ti 投与の 2 日前、2 日後、6、10、14、18、22 日後に投与された。T-CNT、Ti を投与 24 日後に解析した。

雌 MRL/*lpr* マウス (8 週齢) は日本クレアより購入した。T-CNT 及び Ti (10 μ g) を腹腔内に投与し、3 カ月後に屠殺、解析を行った。各群 5 匹を使用した。

雌 B6 マウス (9 週齢) を用い、DWCNT (78 本) の 1 μ m 投与群 (6 匹)、7 μ m 投与群 (5 匹)、15 μ m 投与群 (5 匹) 及び対照群 (5 匹) を準備した。腹腔投与から 5 週後に屠殺、解析を実施した。

マウスを用いた動物実験に関しては、実験動物に関する取り扱いについて使用する動物の苦痛の軽減や安楽死の方法などを中心として徳島大学実験動物委員会において定められている倫理面に配慮した実験動物運営規定に基づき、厳格な審査を経た上で実施されている。また、ナノマテリアルの暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

MWCNT、チタン酸カリウム、DWCNT

多層化カーボンナノチューブは MWCNT-7 (保土ヶ谷化学) を用い、国立食品衛生研究所・高橋主任研究官により Taquann 処理された MWCNT (T-CNT) を供与された。Taquann 処理されたチタン酸カリウム (Ti)、DWCNT (1 μ m、7 μ m、15 μ m) に関しても国立食品衛生研究所・高橋主任研究官より供与された。溶媒として 0.1% Tween80/生理食塩水が用いられ、いずれも腹腔内に注射された。

フローサイトメトリー解析

ナノマテリアル投与マウスの脾臓、腸間膜リンパ節、腹腔内滲出細胞から単核球を採取し、蛍光色素標識された各種リンパ球表面マーカー (Ly5.2、CD19、CD11b、F4/80、CD206、CD192、CD36、CD204、CD4、CD8、CD44、CD25) に対する抗体にて染色後、解析装置 (FACSCant BD Biosciences) にてそれらの発現を経時的に検討した。

免疫細胞の採取

腹腔滲出細胞の解析マウスの腹腔内を 5ml の PBS で洗浄し、採取した滲出細胞を用いて、フローサイトメトリー解析を行った。腸間膜リンパ節は、ホモジナイズ後、洗浄、ろ過によってリンパ節細胞を採取した。脾臓に関しては、ホモジナイズ、ろ過、洗浄後、塩化アンモニウム水溶液 (0.83%) にて溶血、洗浄、ろ過によって脾細胞を採取した。

量化的 RT-PCR 法

肺組織の一部を RNeasy 小管に浸漬し、冷蔵保存した。後日、通法に従い、全 RNA を抽出後、逆転写反応により cDNA を得た。下記のプライマーセットを用いて、PCR 反応によって各遺伝子 mRNA を定量化した。転写レベルは 7300 Real-Time PCR System (Applied Biosystems) を用いた。

IL-1 β : forward, 5'-

ATGGCAACTGTTCTGAACTCAACT-3', and

reverse, 5'-

CAGGACAGGTATAGATTCTTTCTTT-3';

IFN- γ : forward,

5'-AGCGGCTGACTGAACTCAGATTGTAG-3',

and reverse,

5'-GTCACAGTTTTTCAGCTGTATAGGG-3';

TNF- α : forward,

5'-CCTCCTGGCCAACGGCATG-3' and reverse,

5'-GCAGGGGCTCTTGACGGCAG-3'; IL-12:

forward, 5'-TGGGAGTACCCTGACTCCTG-3' and

reverse, 5'-AGGAACGCACCTTTCTGGTT-3';

IL-10: forward,

5'-GCTCTTACTGACTGGCATGAG-3', and reverse,

5'-CGCAGCTCTAGGAGCATGTG-3'; TGF- β 1:

forward, 5'-GACCGCAACAACGCCATCTAT-3',

and reverse, 5'-GGCGTATCAGTGGGGGTCAG-3';

β -actin, forward,

5'-GTGGGCGCTCTAGGCACCA-3', and

reverse,

5'-CGGTTGGCCTTAGGGTTCAGGGGG-3'

.

マルチプレックス解析

腹腔洗浄液を遠心後、上澄みを採取し、解析まで -80°C にて保存した。各サンプルから 5 μ L を用いて解析を Mouse cytokine 20-plex アッセイキット (Biorad) マニュアルに従って実施する。解析項目は、IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6,

IL-10, IL-12 (p40/p70), IL-13, IL-17, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, KC, MIG, MCP-1, MIP-1 α , TNF- α , VEGF, FGF basic である。

C. 研究結果

クロドロン酸リポソーム投与によるマクロファージ除去実験

正常 B6 雌マウス (8 週齢) を用い 6 群の処理を行い、T-CNT あるいは Ti 腹腔内投与から 24 日目に屠殺、解析を実施した (図 1 A)。24 日間で T-CNT+Clo 群において 5 匹中 2 匹が死亡した (図 1 B)。24 日後の体重に関しては、T-CNT+Clo 群 (3 匹) にて他の群に比較して低い傾向にあった (図 1 C)。24 日時点での腹腔内の肉眼写真を示す。それぞれの群で、特に目立った所見は観察されなかった (図 1 D)。

腹腔内の臓器および腹膜を病理組織学的に検討したところ、T-CNT+Lipo 群では、腹膜、肝臓被膜などにマクロファージなどの炎症性細胞浸潤が観察された (図 2 A)。T-CNT+Clo 群では腹膜炎の所見は乏しく、細胞質に泡沫を含有するマクロファージが散見され、核の消失し細胞死に陥った細胞も認められた (図 2 A)。Ti+Lipo 群では T-CNT+Lipo 群ほどの炎症性細胞浸潤は見受けられなかったが軽度の細胞浸潤が観察された (図 2 A)。Ti+Clo 群では、T-CNT+Clo 群で見られたマクロファージの細胞死はわずかであった (図 2 A)。

T-CNT+Clo 群で 1 匹の肺組織が全体に壊死に陥っていた (図 2 B)。正常な肺胞構造は不明瞭であり、出血、壊死像が観察された (図 2 B)。同一マウスの対側肺は正常構造を示していた。肺塞栓などの虚血性変化と考える。

腹腔内滲出細胞 (PEC) 中のマクロファージ分画を SSC/FSC、Ly5.2+, CD3/CD19 にてゲート後、CD11b/F4/80 さらに CD206/CD192 にて展開した (図 3 A)。細胞の集積像から、Clo 群、T-CNT+Clo 群、Ti+Clo 群にて明らかにマクロファージ分画の細胞数が減少していた

(図3A)。PEC中のF4/80⁺CD11b⁺マクロファージ数を検討すると、T-CNT+Lipo群が最も多く、Ti+Lipo群、Lipo群と続く(図3B)。Clo群、T-CNT+Clo群、Ti+Clo群にてマクロファージ数が極端にしていることが分かり、クロドロン酸リポソームによるマクロファージの除去効果が確認された。脾臓では、Ti+Clo群でマクロファージ数の減少が見られた(図3B)。

腹膜組織の各種サイトカインmRNAを定量RT-PCRにて解析すると、TNF- α はT-CNT+Lipo群で高値を示した(図3C)。IL-6はClo群、T-CNT+Clo群で対照群に比較して高い発現であった(図3C)。IL-10はClo群が対照群より有意に高かった(図3C)。TGF- β はClo群、Ti+Clo群で有意に上昇していた(図3C)。

MRL/lprマウスへのT-CNTおよびTiの腹腔内投与実験

自己免疫疾患のモデルであるMRL/lprマウスへのT-CNT及びTaquan処理Tiを腹腔内に投与することによって、腹腔内での炎症に関して検討を加えた。8週齢雌マウスに腹腔内投与後20週齢(3カ月後)にて解析した(図4A)。投与後1カ月、2カ月、3カ月での体重はT-CNTあるいはTi投与群と対照群で差は認められなかった(図4B)。解析時の腹腔内の肉眼所見では、T-CNT投与群では腹腔臓器(脾臓、肝臓)の表面の白濁が確認されたが、対照群あるいはTi投与群では腹腔臓器表面の白濁は観察されなかった(図4B)。

PEC中のマクロファージをF4/80にて検討すると(図5A)、T-CNT投与群のマクロファージの細胞数はTi投与群よりも有意に多いことが分かった(図5B)。さらに、CD192(M1マーカー)及びCD206(M2マーカー)の発現を比較すると、CD206はそれぞれの群で大きな差は認められなかったが、T-CNT投与群のCD192の発現が強いことが判明した(図5B)。

脾臓あるいは腸間膜リンパ節においてT-CNT投与群及びTi投与群で対照群に比較してマクロファージ数が増加傾向にあり(図5C、D)、CD192、CD206の発現に関しては有意な差は認められなかった(図5C、D)。また、腹腔洗浄液中のサイトカイン、ケモカイン類をマルチプレックス解析にて検討すると、検出できた中で、MIGあるいはKCの濃度がTi投与群で上昇していた(図5E)。

2層化カーボンナノチューブ(DWCNT)の腹腔内投与実験

長さの異なる2層化カーボンナノチューブ(1、7、15 μ m:本数:78本)を正常雌B6マウス(9週齢)に腹腔内投与し、5週後に解析した(図6A)。0から5週目までの体重に影響は認められなかった(図6B)。腹腔内の肉眼的所見として、15 μ m投与群の中に肝臓の表面あるいは腹膜表層に黒色の集積物が観察された(図6C)。腹腔内の洗浄液を遠心後、15 μ m投与群では黒色の沈殿物が肉眼的に観察された(図6C)。さらに、組織学的に検討したところ、腹膜表層部に黒色線維の集積物周囲に多核異物巨細胞の出現を伴う肉芽が確認された(図6D)。PEC中のF4/80⁺CD11b⁺マクロファージは割合、細胞数共に対照群に比較して大きな変化は認められなかった(図6E)。また、腹腔内マクロファージのM1(CD192)あるいはM2(CD206)マーカーを検討すると、DWCNT投与群と対照群で有意な変化は見られなかったが、1 μ m投与群でCD206の発現が高い傾向にあった(図6E)。加えて、スカベンジャー受容体に関して検討したところ、7 μ m投与群でCD36の発現が有意に上昇していた(図6E)。

脾臓におけるF4/80⁺CD11b⁺マクロファージの割合、細胞数ともに1 μ m投与群で有意に増加していた(図7A)。CD192あるいはCD206のM1/M2マーカーに変化はなかった(図7A)。スカベンジャー受容体(CD204、CD36)に有

意な差は見られなかったが、CD36の発現はDWCNT投与で増加する傾向にあった(図7A)。一方で、脾臓におけるT細胞分画(CD4⁺, 活性化CD4⁺, 制御性T, CD8⁺)、B細胞に関してはDWCNT投与による変化は観察されなかった。

D. 考察

昨年度までに、B6マウスへのT-CNT及びTiの腹腔内投与後1年の解析ではT-CNT投与では強い腹膜炎が持続する一方で、Ti投与ではT-CNT投与ほどの炎症病変は観察されなかった。今年度は、クロドロン酸ーリポソームを用いて、マクロファージが機能不全あるいは細胞数が減少した状態で、ナノマテリアルを暴露された場合の腹腔内での短期での炎症状態を検討した。また、自己免疫疾患のモデルであるMRL/lprマウスへのT-CNTあるいはTi投与による腹腔内の炎症状態を比較検討した。加えて、2層化カーボンナノチューブの正常B6マウスへの腹腔内投与における腹腔マクロファージの動態に関して検討を加えた。

クロドロン酸ーリポソームの腹腔内投与により、腹腔内のマクロファージ数は減少した状態が確認され、T-CNTの暴露で誘導される炎症性細胞浸潤は軽減され、マクロファージの変性あるいは細胞死の所見が病理組織学的に確認された。T-CNT暴露による腹腔内の炎症はマクロファージが中心であり、マクロファージから産生されるサイトカインmRNAも抑制されていた。Ti投与ではT-CNT投与ほどの炎症は誘導されないことが昨年度にも観察されていたが、今年度の実験でも、PEC中のマクロファージ数はT-CNT投与よりも少なかった。Ti投与とT-CNT投与を比較して、マクロファージを機能不全にした場合はIL-10やTGF-βの抑制性サイトカインmRNAの発現が腹膜組織で異なっていた。また、クロドロン酸ーリポソーム投与にT-CNT暴露では5匹中2匹が実験期間中に死亡した。残った3匹に

関しても他の実験群と体重の軽減が認められた。また、3匹の内、1匹の片側肺において広範な虚血性変化が認められ、肺塞栓を起こした可能性が考えられた。マクロファージが機能不全に陥っている状態で、T-CNTが血中に混入し、塞栓症を引き起こした可能性は否定できないが、今後再現性を確認する必要がある。

MRL/lprへのT-CNTあるいはTi投与では、これまで観察されたT-CNT投与による腹腔の白濁化が再現された。Ti投与では腹腔臓器表面の変化は観察されなかった。さらに、腹腔マクロファージ数についてもTiよりもT-CNT暴露で細胞数が増加していた。さらに、M1マクロファージへのシフトもT-CNT暴露で顕著に見られた。加えて、両者では暴露後産生されるケモカインやサイトカインの種類も異なっている可能性が示された。したがって、T-CNTとTiでは暴露後の免疫反応が異なっている可能性が考えられた。

2層化カーボンナノチューブの腹腔内投与実験では、多層化CNTほどの変化は見られず、線維長の長い15μm投与群では腹膜や肝臓表面に集積し、異物巨細胞の出現を伴う変化が観察された。腹腔内マクロファージも大きく変化がなく、スカベンジャー受容体の発現が上昇していたことから、DWCNTの暴露によって、スカベンジャー受容体を介した生体反応が作動する可能性があり、繊維長によってもその反応は異なっていることが判明した。

E. 結論

- 1.マクロファージが機能不全の状態でのナノマテリアルの暴露はマクロファージを起点とした生体防御反応に大きな影響を及ぼす可能性が示された。
- 2.免疫状態が偏ったモデル(自己免疫疾患モデル)へのナノマテリアルの暴露では、カーボンナノチューブとチタンといった材料の

性質、形状の違いでその免疫反応が大きく異なることがわかった。

- 3.2層化カーボンナノチューブはMWCNTに比較して腹腔内での暴露反応は低いものと考えられ、DWCNTの処理反応にはスカベンジャー受容体が関与していることが示された。
4. ナノマテリアルの生体内での暴露はその性状、形態によってマクロファージを主体とした自然免疫反応が大きく影響を受けることが示された。

F.健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

- (1) Qi G, Liu J, Mi S, Tsunematsu T, Jin S Shao W, Liu T, Ishimaru N, Tang B, Kudo Y. Aurora Kinase Inhibitors in Head and neck cancer. *Curr Top Med Chem*. 2018 in press
- (2) Aota K, Kani, Yamanoi T, Nakashiro K, Ishimaru N, Azuma M. Distinct regulation of CXCL10 production by chemokines in human salivary gland ductal and acinar cells. *Inflammation*. 2018 in press
- (3) Tada H, Fujiwara N, Tsunematsu T, Tada Y, Arakaki R, Tamaki N, Ishimaru N, Kudo Y. Preventive effects of mouthguard use while sleeping on recurrent aphthous stomatitis: Preliminary interventional study. *Clin Exp Dent Res*. 2017 3:198-203
- (4) Utajjaratrasmi P, Vaeteewoottacharn K, Tsunematsu T, Jamjantra P, Wongkham S, Pairojkul C, Khuntikeo N, Ishimaru N, Sirivatanauksorn Y, Pongpaibul A, Thuwajit C, Kudo Y. The microRNA-15a-PAI-2 axis in cholangiocarcinoma-associated fibroblasts promotes migration of cancer cells. *Mol Cancer*. 2018 17:10
- (5) Kurosawa M, Arakaki R, Yamada A, Tsunematsu

T, Kudo Y, Sprent J, Ishimaru N. NF- κ B2 controls migratory activity of memory T cells by regulating expression of CXCR4 in a mouse model of Sjögren's syndrome. *Arthritis Rheum*. (2017) 69(11):2193-2202.

(6) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Role of Fas and RANKL signaling in peripheral immune tolerance. *J Clin Cell Immunol*. (2017) 8(4):1000512

(7) Kozai M, Kubo Y, Katakai T, Kondo H, Kiyonari H, Schaeuble K, Luther SA, Ishimaru N, Ohigashi I, Takahama Y. Essential role of CCL21 in establishment of central self-tolerance in T cells. *J Exp Med*. (2017) 214:1925-1935.

(8) Izawa T, Arakaki R, Ishimaru N. Crosstalk between Cytokine RANKL and AhR Signaling in Osteoclasts Controls Bone Homeostasis. *J Cytokine Biol*. (2017) 2:1-5

(9) Yoshio Hayashi, Naozumi Ishimaru. Autoimmunity: Aging Mouse Model for Autoimmune Diseases. *Handbook of Immunosenescence* 1-11, 2017

(10) 石丸直澄 口腔免疫とその異常 *CLINICAL CALCIUM* 27(10):21-26, 2017

2. 学会発表

(1) 新垣理恵子、山田耕一、齋藤雅子、大塚邦紘、山田安希子、常松貴明、工藤保誠、菅野純、石丸直澄、多層化カーボンナノチューブ長期暴露による免疫システムへの慢性毒性 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(2) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N: A unique macrophage subset of the target organ in a murine model of Sjögren's syndrome 第106回日本病理学会総会 2018年4月28日 東京

(3) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A, Kurosawa M, Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R, Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a mouse model for Sjögren's syndrome.

第 106 回日本病理学会総会 2018 年 4 月 28 日
東京

(4) 石丸直澄 環境因子により自己反応性獲得機構の解明～自己免疫疾患の新たな病因論～
第 59 回歯科基礎医学会日本学術会議シンポジ
本免疫学会総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

(6) Ushio A, Arakaki R, Yamada A, Otsuka K,
Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Ishimaru N :
A unique macrophage subset of the target organ
in a murine model of Sjögren's syndrome 第 46
回日本免疫学会総会 2017 年 12 月 13 日 仙台

ウム 2018 年 9 月 18 日 松本

(5) Otsuka K, Yamada A, Saito M, Ushio A,
Kujiraoka S, Tsunematsu T, Kudo Y, Arakaki R,
Ishimaru N: Analysis of follicular helper T cells in a
mouse model for Sjögren's Syndrome. 第 46 回日

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

なし

3. その他

なし

図1

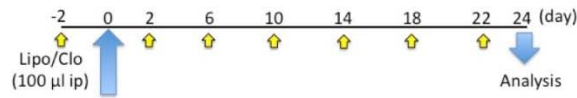
A Experimental schedule

Mice : ♀ C57BL/6 (8 weeks of age)

Group (n=5):

- ① Liposome (Lipo)
- ② Clodronic acid-Liposome (Clo)
- ③ T-CNT (10 µg) + Lipo
- ④ T-CNT + Clo
- ⑤ Ti (10 µg) + Lipo
- ⑥ Ti + Clo

T-CNT and Ti: Taquann-treated MWCNT (MWCNT-7, length: $5.7 \pm 3.7 \mu\text{m}$, diameter: $74 \pm 28 \text{ nm}$) and Ti was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.



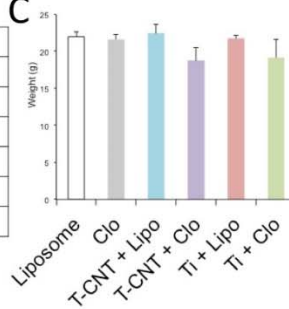
T-CNT (10µg)/Ti (10µg) ip

クロドロン酸/リポソーム + T-CNT/TiO₂投与による影響

B

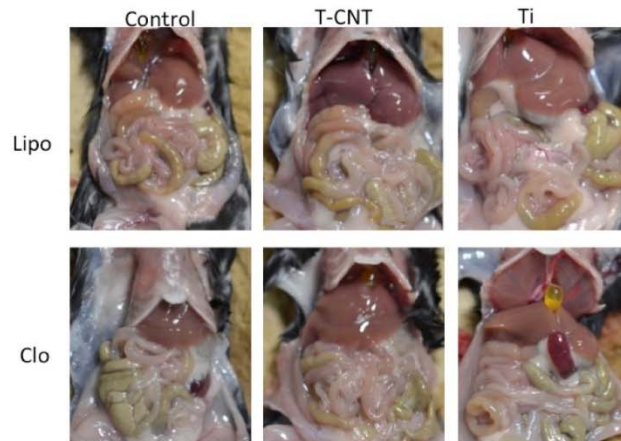
Administration	Dead/Total
Lipo	0/5
Clo	0/5
T-CNT+Lipo	0/5
T-CNT+Clo	2/5
Ti+Lipo	0/5
Ti+Clo	0/5

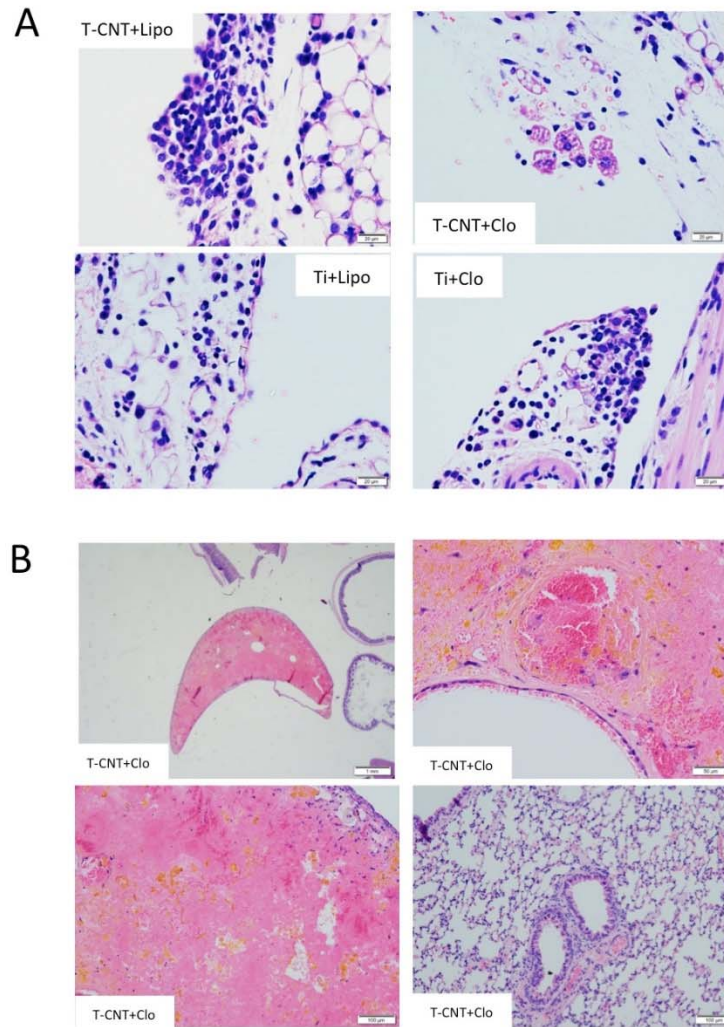
C

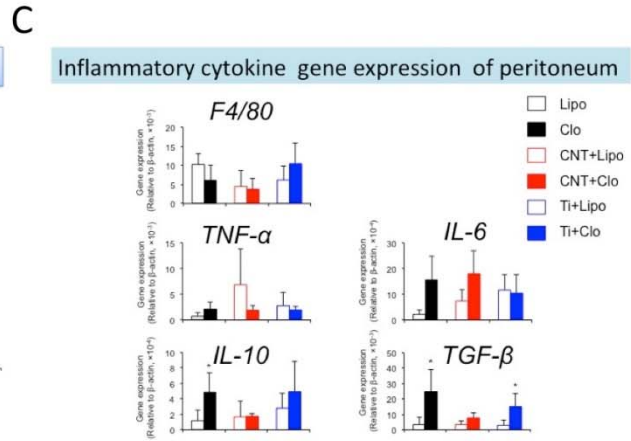
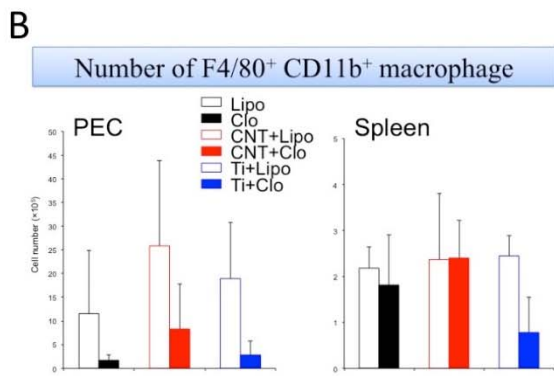
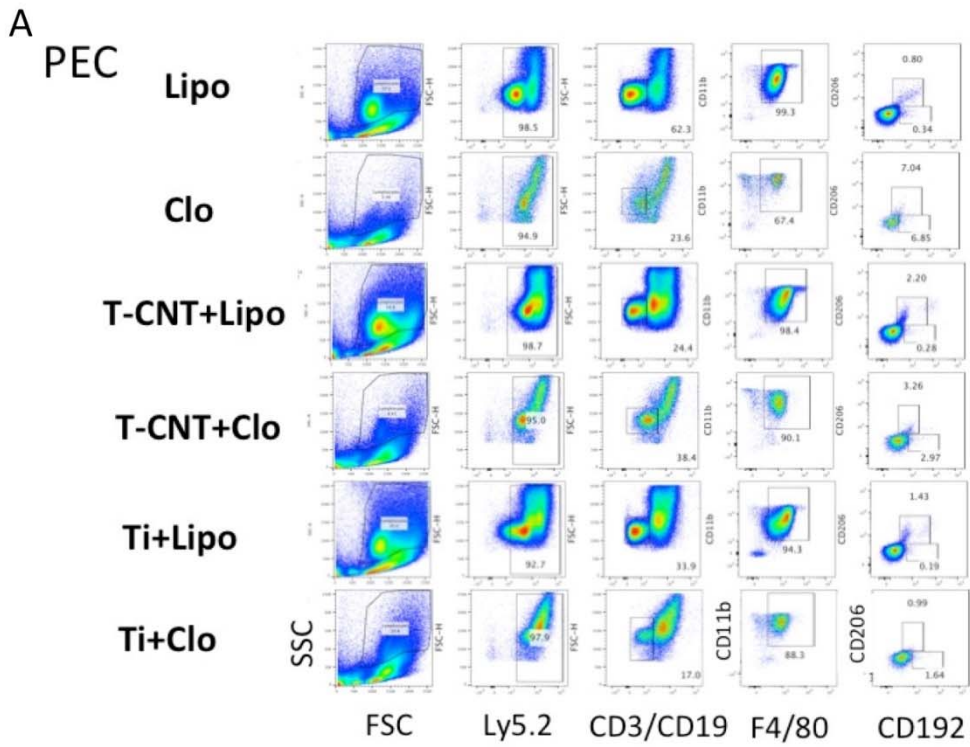


D

クロドロン酸 + T-CNT/Ti投与 (腹腔肉眼)

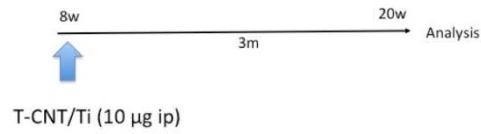




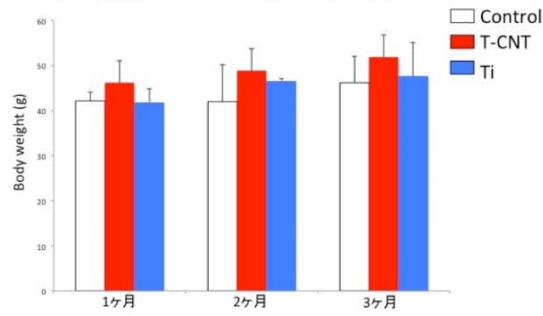


A Experimental schedule

Mice : ♀ MRL/lpr (8 weeks of age)
 Group (n=10): 0 μg/mouse, 10 μg/mouse
 MWCNT: Taquann-treated MWCNT (MWCNT-7, length; 5.7±3.7 μm, diameter; 74±28 nm) and Ti was provided from Dr. Taquahashi and Dr. Kanno.
 Vehicle: 0.1% Tween80 /saline



B T-CNT/Ti投与による体重変化



C

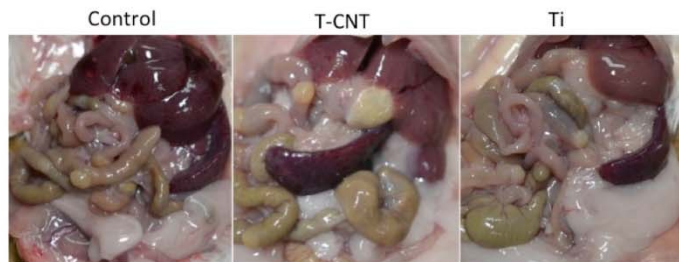
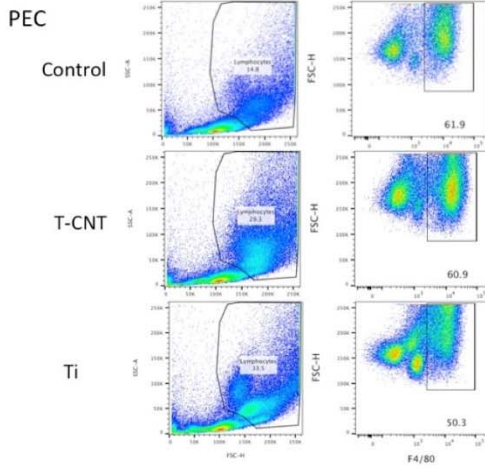


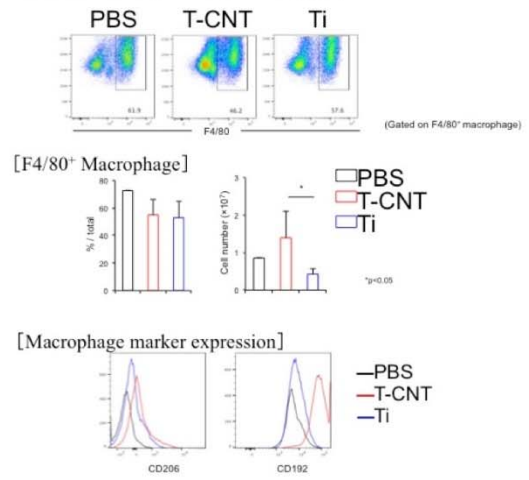
図5

A



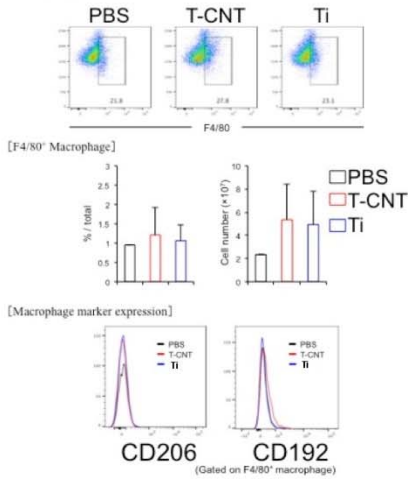
B

PEC中のマクロファージ分画

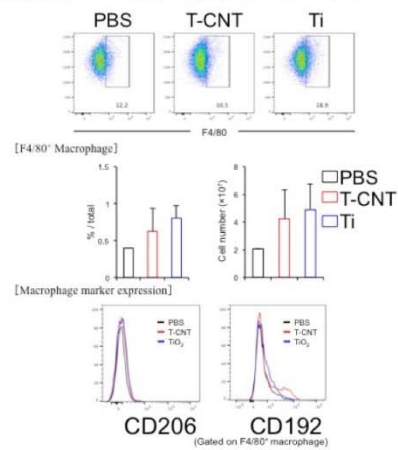


C

脾臓におけるマクロファージ分画

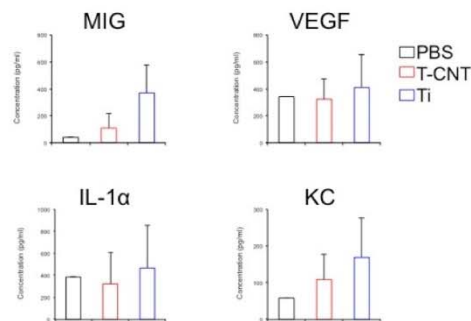


D 腸間膜リンパ節におけるマクロファージ分画



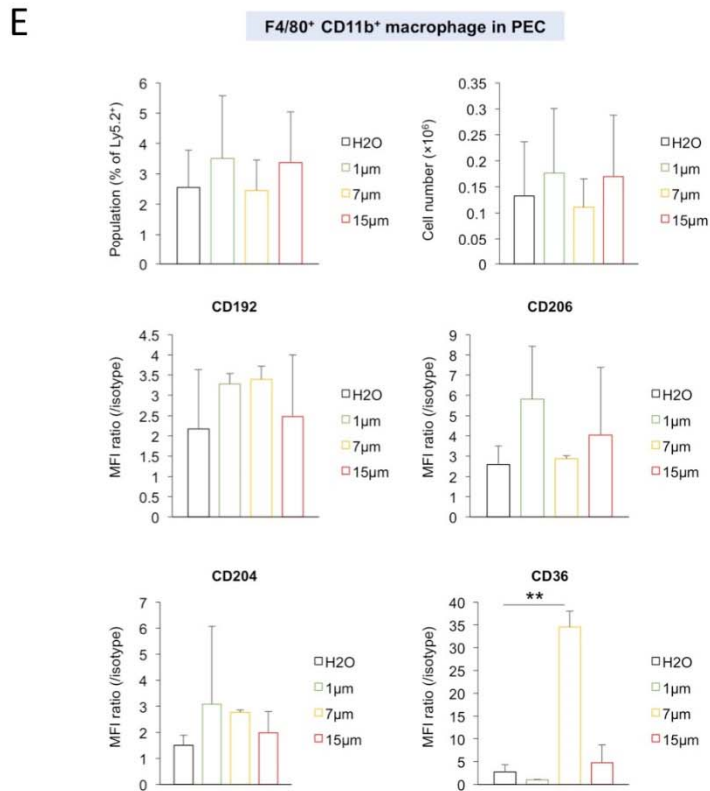
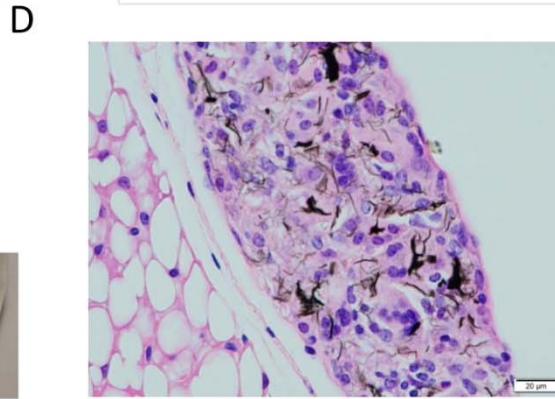
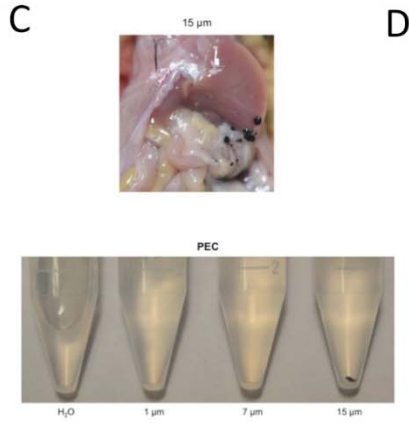
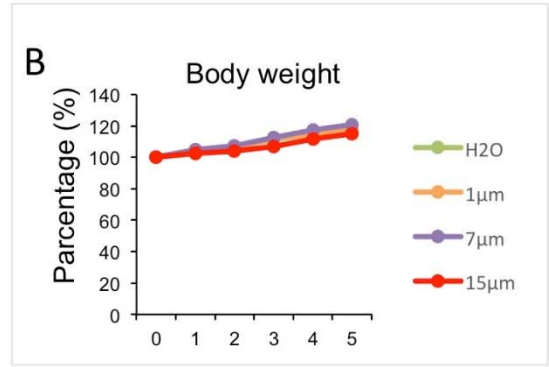
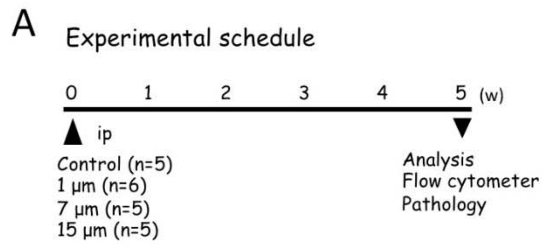
E

Level of cytokine, chemokine and growth factor

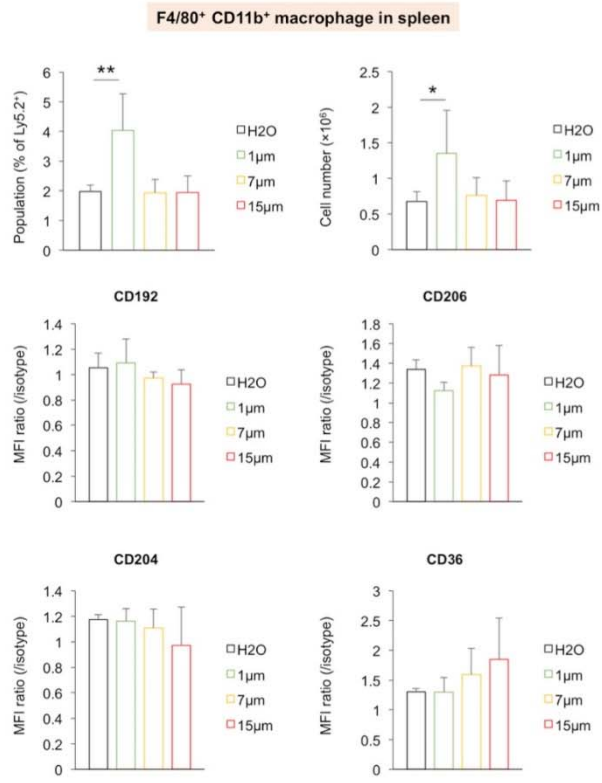


Monokine induced by gamma interferon (MIG/CXCL9)
 活性化T細胞やB細胞を誘引する。
 Keratinocyte chemoattractant (KC/CXCL1)
 好中球を誘引する。また、メモリーT細胞の遊走にも寄与する

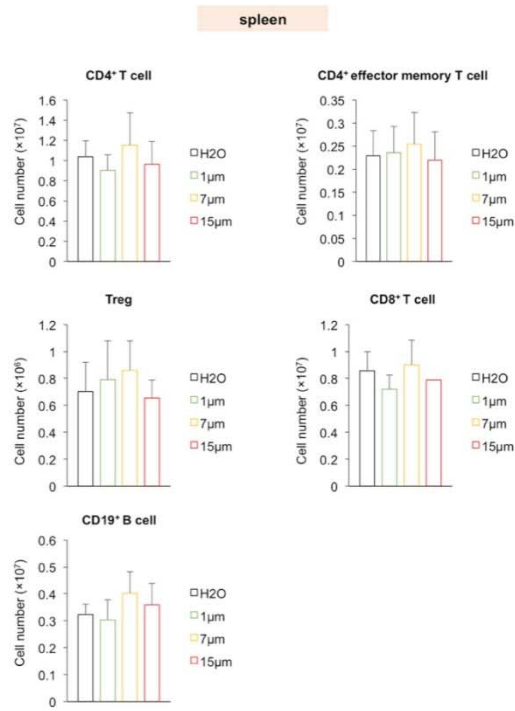
6



A



B



平成 29 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及び発生毒性評価手法の開発に関する研究
および国際動向調査

研究分担者:	北條 幹	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	主任研究員
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:	坂本 義光	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	長谷川 悠子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	村上 詩歩	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	山本 行男	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	前野 愛	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	清水 本武	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
	大貫 文	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
	鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	研究科長
	猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	参事研究員
	小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生科学部	室長
	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	室長
	中江 大	東京農業大学	応用生物科学部	教授
	山口 治子	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究助手
	牛田 和夫	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員
	鈴木 洋	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員

研究要旨

ナノマテリアルの健康影響については、その特有の物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、*in vivo* 試験を元にした毒性の評価手法の検討が依然として重要である。特に、慢性影響や生殖・発生毒性に関するデータの蓄積は未だ不十分である。

昨年度まで、1 mg/kg 体重で MWNT-7 を単回投与したラットを用い腹膜中皮腫の発症過程を組織学的な経時変化や慢性炎症に関与する分子の発現変化に注目して調べてきた。今年度は、その血清試料を用いプロテオーム解析により中皮腫の初期段階において量の変動するタンパク質を探索し、複数の酸化ストレス関連分子など 13 個のタンパク質を見出した。特に Apolipoprotein A-VI が腹腔洗浄液中で経時的に減少しており、中皮腫の早期検出マーカーとなり得る可能性が示された。

また、ヒトで最も懸念される呼吸器の慢性毒性に関しては、これまで、ラット気管内投与による長期試験を行ってきた。MWNT-7 に粉碎処理を行った g-MWCNT を 4 週間に 1 回、合計 12 回、4 群の F344 ラットに投与し（総投与量：0, 0.05, 0.26, 1.2 mg/rat）、投与 96 週後に剖検した。また、MWNT-7, SD-1 および SD-2 をそれぞれ 0.5 mg/kg 体重

で単回投与し、終生飼育する実験も実施した。今年度は、両者の実験について、呼吸器および中皮組織について病理組織学的に解析した。いずれの実験においても MWCNT の投与による腫瘍性病変の発症や自然発生腫瘍の発現率の上昇は見られなかったが、投与群の少数例に、胸腔や体腔における中皮腫の発生をみた。また、投与群の肺にのみで特徴的な扁平上皮化生の初期像が観察された。

最後に、MWCNT の投与前処理が、マウス発生毒性およびラット腹膜中皮腫の誘発性に影響を及ぼすかどうかを調べた。MWCNT に 250℃2 時間の熱処理あるいは Taquann 法による分散処理を施し、4 mg/kg 体重の用量で妊娠マウスに 3 回（妊娠 6, 9, 12 日目）の反復気管内投与を行ったところ、胎児重量が未処理の MWCNT で対照群に比べて有意に減少し、熱処理された MWCNT では、さらに低値を示した。Taquann 処理群ではわずかに減少するものの対照群の数値と比べて有意差は無かった。母体の肺について肺胞洗浄液の生化学的・細胞学的分析あるいは肺実質の分子生物学的な分析により調べたところ、肺の炎症は熱処理群、未処理群、Taquann 処理群の順に強く、胎児毒性と一致することがわかった。一方、熱処理、Taquann 処理あるいは両者の組み合わせによって前処理を施した MWCNT を用いて 1 mg/kg 体重でラットに腹腔単回投与し、中皮腫発症率を観察したが、これら前処理による差は見られなかった。

国際動向調査では、OECD 吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 がナノマテリアル評価に適応した改定が承認され、さらにナノマテリアル作業会合では EU が行っている OECD テストガイドラインの改訂や新規の作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて 6 つの新規プロジェクトが提案された。

これらの結果は、MWCNT の投与前の分散状態、繊維長および投与量について *in vivo* の毒性評価手法の確立・改良のための基礎データとなり、また、MWCNT による中皮腫や肺がん発現のメカニズムの解明に寄与することが期待される。現実には全てのナノマテリアルで慢性吸入曝露試験を行うのは不可能であることを考慮すると、解明されたメカニズムに基づいて、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、*in vitro* 評価系試験法などから慢性影響を評価できるガイダンスなどを OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが必要であると考えられた。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルの健康影響については、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手法が未だ確立していない状況である。

これまで、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腹腔投与の実験で明らかにしてきたが¹⁾、MWCNT によるラッ

ト腹膜中皮腫発症のメカニズムは不明な点が多く、更なる長期試験のデータが必要である。昨年度までに中皮腫発症過程の経時変化を病理組織学的また生化学的に解析してきたが、タンパク質の網羅解析を実施途中であった。

一方で、ヒトで最も懸念されるばく露部位は呼吸器であることから、現在、*in vivo* の毒性試験の多くは、呼吸器を対象として行われている。慢性毒性を評価する 2 年間の吸入発がん性試験²⁾には多大なコストが

かかるため、日本では特に気管内投与により 2 年間の慢性試験を代替する手法が提案されているが、未だ報告例は少ない³⁾。

また、ナノマテリアルの投与実験においては、例えば同じ種の MWCNT であっても投与時の物理状態、特に分散の状態によって結果が左右されることが示唆されている。本研究班では、投与する MWCNT の前処理、例えば熱処理や Taquann 法による分散処理が発生毒性の結果に影響することがわかってきた (小林ら)。MWCNT の発生毒性や催奇形性については、世界的にも毒性試験のデータが限られているため⁴⁾、発生毒性そのものの再現性について確認する必要がある。さらに、腹腔投与による中皮腫誘発性も、MWCNT の投与前処理により影響を受ける可能性がある。

そこで、本研究では、i) ラット腹膜中皮腫の発症メカニズムに関与する、あるいは早期検出マーカーになり得る分子の網羅的探索を行うとともに、ii) ラット気管内投与による MWCNT の呼吸器系および体腔中皮への慢性影響を調べるため、12 回投与後の 2 年間飼育および単回投与後の終生飼育という 2 つの長期試験を実施した。さらに、熱処理あるいは Taquann 処理が、MWCNT の iii) マウス発生毒性および iv) ラット腹膜中皮腫の誘発性に影響を及ぼすかどうかについて検討した。また、慢性毒性を評価できる試験系の開発等に関する国際動向を把握するために、OECD 等で行われているプロジェクト等に関する動向調査を行うことも目的としている

B. 研究方法

i) MWCNT 誘発性の中皮腫の発症初期に発現

変動する分子マーカーの探索

MWNT-7 を 2% CMC-Na 溶液に懸濁分散させ、1 mg/kg 体重の用量で F344 雄性ラット (8 週齢) の腹腔内に単回投与した。投与 8, 16, 24, 32 週間後にそれぞれ 10 匹程度ずつ、対照群 (2% CMC-Na 溶液投与) とともに、剖検した。投与 24 から 32 週後に中皮腫の初期像が多く個体で認められたため、中皮腫の発症初期の試料として 32 週後のラットの血清をプロテオーム解析に用いた。アルブミンと IgG を分離除去した後、蛍光色素 (Cy2, Cy3, Cy5) で標識したタンパク質を、蛍光ディフアレンスゲル二次元電気泳動システム (Ettan DIGE system; GE ヘルスケア) により分離展開し、スポットの検出および発現変動の有意差検定を行った。発現変動した候補タンパク質について、銀染色後のゲルからスポットを切り出し、トリプシン消化後、LC/MS/MS 法にて分析し、同定した。Apolipoprotein A-IV の血清あるいは腹腔洗浄液中の濃度測定には、ELISA キット (CUSABIO, CSB-EL001916RA) を用いた。

ii) MWCNT の経気管噴霧投与によるラット呼吸器の慢性毒性

以下 2 つのプロトコールで投与実験を行い、主要臓器および腫瘤を摘出し、常法により組織標本を作製し、病理組織学的検査を実施した。

(12 回反復投与)

MWCNT は、MWNT-7 を用い、分散性を高めるため、ショ糖および Tween80 (それぞれ終濃度 0.5%) を加え自動乳鉢を用い混和し、脱イオン水で、MWCNT 250 mg/L の懸濁液を調製して投与試料とした (Ground-MWCNT ;

g-MWCNT). 気管内噴霧投与は, スプレー式
ゾンデ (PennCentury) を用い, 0.01, 0.05,
0.25 mg/kg 体重の用量の g-MWCNT または
0.5% ショ糖・Tween80 水溶液 (対照群) を
4 週間に 1 回, 合計 12 回, F344 雄性ラット
(10 週齢) 各群 18 匹に対して行った. な
お, 12 回のラットあたりの合計投与量の平
均値は, それぞれ 0.05, 0.26, 1.2 mg/rat
であった. 途中死亡, 瀕死屠殺および実験
開始後 96 週目の計画殺により全動物を解
剖した.

(単回投与)

3 種の MWCNT: MWNT-7 (平均長, 5.48 μ m,
径, 66.8 nm); SD-1 (平均長, 4.51 μ m,
径, 177 nm); SD-2 (長さ 3 μ m, 径 10-15
nm(提供企業データ)) を, それぞれ 2%
CMC-Na 溶液に懸濁分散させ, 0.5 mg/kg 体
重で 10 週齢の F344 雄性ラット各群 15 匹に,
スプレー式ゾンデを用いて単回投与した.
動物はいずれも投与後, 終生飼育した.

免疫染色には, メソテリン (IBL,
C-ERC/mesothelin, 28001), サイトケラチ
ン (MerkMillipore, AE1/AE3, MAB3412),
GST-P (MBL, N-311), PCNA (DAKO, PC10, 0879)
の一次抗体をそれぞれ用い, 二次抗体とし
ては EnVision 検出システム (DAKO; デュア
ルリンク HRP) を使用した.

iii) 投与試料の前処理が MWCNT のマウ ス発生毒性に与える影響

投与試料として, 未処理, 250°C・2 時間
の熱処理あるいは吸入ばく露試験用の分散
処理 (Taquann 処理⁵⁾) を施した MWCNT
(MWNT-7) を, それぞれ 1% CMC-Na/PBS に
懸濁させた 3 種類を用意した. これらを 22G
の注射針を加工した器具を用いて ICR 系の

妊娠マウスに 1 回当たり 4 mg/kg 体重で 3
回 (妊娠 6, 9, 12 日目) 気管内投与した.
妊娠 15 日目に解剖し, 胎児毒性を検査する
とともに, 母体の肺の病理組織学的を行っ
た. また, 母体の肺胞洗浄液 (BALF) 中の
白血球細胞の分析は, 多項目自動血球計数
装置 (KX-21NV, シスメックス) およびメイ
グリンワルドギムザ染色標本の観察によ
り行い, BALF 上清は, 総タンパク質量 (2-D
Quant kit; GE ヘルスケア) および LDH 活
性 (LDH Cytotoxicity Detection kit, タ
カラバイオ) の分析に供した. さらに, 肺
実質における 42 個の遺伝子発現をリアル
タイム PCR (RT2 Profiler PCR Array (キ
アゲン)) によって分析した.

iv) 投与試料の前処理が MWCNT の発がん性 に与える影響

MWNT-7 に対し, 熱処理あるいは Taquann
処理⁵⁾を施し, 0.1% Tween80 に懸濁分散さ
せ, 以下の用量で 7 群の 10 週齢の F344 雄
性ラット各群 20 匹に, 腹腔単回投与した:
①Taquann 処理 MWCNT, 1mg/kg 体重 (高濃
度), ②Taquann 処理 MWCNT, 0.05mg/kg 体
重 (低濃度), ③熱処理後-Taquann 処理
MWCNT, 1mg/kg 体重 (高濃度), ④熱処理後
-Taquann 処理 MWCNT, 0.05mg/kg 体重 (低
濃度), ⑤未処理 MWCNT, 1mg/kg 体重, ⑥熱
処理 MWCNT, 1mg/kg 体重, ⑦対照.

これらの途中死亡例および瀕死屠殺例に
ついて, 病理組織学的解析を行った.

v) 国際動向調査

H29 年度に開催されたナノマテリアル毒性
評価手法に関する OECD の工業用ナノマテ
リアル作業グループ会合や, 専門家による

メール会議やドラフトのコメント対応をと
おして OECD や EU の国際動向を調査した。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺
伝子解析および疫学研究は行っていない。
動物飼育及び動物実験は東京都健康安全研
究センター動物実験実施規程に基づいて、
動物実験委員会の事前審査および承認を受
け、その管理のもと実施された。

C. 研究結果

i) MWCNT 誘発性の中皮腫の発症初期に発現 変動する分子マーカーの探索

総検出スポット 2399 個のうち、対照群と
比較して、1.5 倍以上の有意な発現変動を
示したスポットが 396 個 ($P < 0.05$) 認めら
れた (表 1)。そのうち、LC/MS/MS で同定さ
れた 13 個のタンパク質には、
Ceruleoplasmin, Glutathion peroxidase 3,
Haptoglobin など、酸化ストレス応答に関
係するものが多く含まれていた (表 2)。

このうち、今回我々は MWCNT 投与群で低
値を示す Apolipoprotein A-IV に注目した。
プロテオーム解析のバリデーションとして、
本実験に使用した投与 32 週後の対照群 10
匹と投与群 13 匹の血清について、ELISA
による測定を実施したところ、低値の傾向
があるものの、有意な減少は認められな
かった。しかし、iii) の実験で得られた瀕死
個体の血清試料においては有意な減少が見
られた (図 1)。さらに、投与 8, 16, 24 お
よび 32 週間後のそれぞれの腹腔洗浄液に
含まれる Apolipoprotein A-IV タンパク質
の濃度を測定した結果、変動幅は小さいが、
経時的に減少する傾向が見られた (図 2)。

ii) MWCNT の経気管噴霧投与によるラット 呼吸器の慢性毒性

懸濁液中の g-MWCNT 繊維サイズ分布は、
平均長 $2 \mu\text{m}$ 、平均径 75nm で、 $5 \mu\text{m}$ 以上
の長さの繊維の占める割合が、きわめて少
なかった (図 3)。g-MWCNT を 12 回反復投与
した全動物の呼吸器系の増殖性病変を組織
学的に評価した (表 3)。いずれの濃度条件
においても、肺の腫瘍性病変の発現は見ら
れなかったが、肺胞上皮の過形成と扁平上
皮化生とみられる増殖性の変化が、 0.26mg
/rat および 1.2mg/rat の 2 群で見られ、
後者では、統計学的有意差を認めた。一方、
中皮に対する反応性として、 0.05 および
 0.26mg/rat の各群で 1 例ずつの中皮腫 (胸
腔内; 腹腔内)、 1.2mg/rat 群で、1 例の過
形成 (肺の臓側胸膜)、2 例の中皮腫 (心囊
膜および腹腔内) が見られたが、いずれも
統計学的有意差の無い少数例であった (表
3)。また、陰嚢腔での中皮腫は見られな
かった。

MWNT-7, SD-1 および SD-2 のそれぞれを
単回投与し、終生飼育した実験では、投与
後 156 週で実験を終了し、増殖性病変に関
して病理組織学的に評価した (表 4)。肺の
過形成、腺腫、肺がんが、対照群を含む全
群で見られたが、群間で統計学的有意差は
認められなかった。ただし、扁平上皮化生様
の増殖性病変は、投与群のみで観察された。
中皮腫は、対照群を含む全群で認められ、
群間で発生率に統計学的有意差は無かった。
しかし、対照群および SD-2 群では、中皮腫
は陰嚢腔のみで見られたのに対し、MWNT-7
および SD-1 投与群では腹腔あるいは心囊
膜に発生した (図 4)。

さらに、各実験の投与群のみで認められた扁平上皮化生の初期像とみられる増殖性病変について、免疫組織化学染色を行なった(図5)。扁平上皮病変で陽性となるGST-Pとサイトケラチンに加え、増殖性の指標であるPCNAが陽性であった。また、興味深いことに、中皮細胞のマーカーとして知られるメソテリンに陽性であった。一方、反応性の過形成については、全て陰性であった(図5)。

iii) 投与試料の前処理が MWCNT のマウス発生毒性に与える影響

母体の体重増加の抑制は、全投与群で見られたが、特に熱処理群で顕著であった(図6)。胎児重量が、対照群に対して、未処理、熱処理群で有意に減少しており、熱処理ではより低値だった。Taquann 処理群でもやや減少したが有意差は認められなかった(表5)。

投与前の試料液は、肉眼的には熱処理、未処理、Taquann 処理の順に分散状態が良かった。特に Taquann の試料は一部凝集しているように見えた。しかし、母体の肺組織を観察すると、逆に、Taquann 投与群で MWCNT が実質全体に細かい粒子として分散していたのに対し、熱処理群では MWCNT が細気管支から肺胞管付近で凝集して肉芽腫の形成を伴い、比較的強い炎症巣が多く、MWCNT が肺実質の深部まで到達していない像も見られた(図7)。未処理の肺実質はその中間程度の状態であった。BALF 中の白血球数は、全投与群で増加していた。好中球および好酸球の数は熱処理群で最も多く、Taquann 群は対照群と同程度だった(図8)。BALF 中の総タンパク質量および LDH 活性も

全投与群で上昇していたが、Taquann 群での上昇の程度は比較的弱かった(図9)。さらに、肺組織における IL-6 や CCL2 等のサイトカイン・ケモカインの遺伝子発現は、全投与群で増強し、特に熱処理群で顕著であった(図10)。

iv) 投与試料の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

投与後 63 週までに、1 mg/kg 体重の投与用量の 4 群で (①, ③, ⑤, ⑥)、死亡または瀕死により剖検を実施し、全個体(有効例数)で中皮腫の発症を確認した(表6)。一方、低濃度の 2 群では (②, ④)、投与 89 週現在、一部の個体で中皮腫による腫瘍死を認めている(表6, 図11)。①, ③, ⑤, ⑥の 4 群間で生存曲線の形状に有意な差は認められなかった(図11)。対照群 (⑦) でも 2 例の死亡が見られたが、中皮腫以外の自然発生の病変によるものであった。

1 mg/kg 体重の投与用量の 4 群で、肉眼的に、腹膜の肥厚・癒着、肝臓の変形、さらに腹腔内にび漫性に広がった大小の結節状の腫瘍および肥厚した被膜状の中皮腫が認められた(図12)。組織学的には、ヒトで分類される上皮型、肉腫型および二相型と一致する中皮腫の像が、各投与群で観察された。いずれの群間で比較しても、中皮腫の性状に関して顕著な差は見られなかった。

v) 国際動向調査

H29年4月に開催された OECD WNT テストガイドライン・プログラムのナショナル・コーディネーター作業部会では、ナノマテリアル評価に適応させるために吸入試験法のガイドライン

TG412 と TG413(28 日間と 90 日間の吸入毒性試験)の改定が議題となった。本ガイドラインの改訂には、これまでの当研究班からの専門家も参加した 2 年間に及ぶ専門家会議による議論を踏まえたものになっており、表現上の修正を行うことで了承された。また、この作業に加えて吸入試験法のガイダンス(GD39)の改定作業も進められている。H29 年 5 月に開催された第 17 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、日本は BIAC と共同で、ナノマテリアルの短期間暴露による in vivo 試験(短期吸入暴露と、気管内投与)の評価に関する文書作成を提案し、新規プロジェクトとして開始することが本作業会合で条件付きで承認された。その他、物化性状を基にした評価フレームワークの開発や、AOP の開発プロジェクト、EU と OECD が合同で昨年末に行ったレギュレーションに関連する Pro SAFE ワークショップのとり纏め状況などの進捗状況が報告された。しかしこの日本の提案は、H30 年 2 月に開催された第 18 回 OECD ナノマテリアル作業会合では、現在改定が進められている吸入試験法のガイダンス(GD39)の改定作業とのタイミングを調整するため延期することとなった。一方この作業会合では、EU が行っている OECD ガイドラインの改訂や新規ガイドラインの作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて以下の新規プロジェクトが提案された。

- ・ Determination of solubility and dissolution rate of nanomaterials in water and relevant synthetic biologically media
- ・ Identification and quantification of the surface chemistry and coatings on

- nano- and microscale materials
- ・ New TG on Determination of the Dustiness of Manufactured Nanomaterials
- ・ Applicability of the TG 442D in vitro skin sensitisation for nanomaterials
- ・ Aquatic (Environmental) Transformation of Nanomaterials
- ・ TG on toxicokinetics or Amendments to OECD TG 417 to accommodate nanomaterials
- ・ Biopersistent/ Biodurable manufactured nanomaterials

D. 考察

i) MWCNT 誘発性の中皮腫の発症初期に発現変動する分子マーカーの探索

MWCNT の毒性として、酸化ストレスと慢性炎症が重要だと考えられている。昨年度までの MWCNT の腹腔単回投与後の経時観察から、少なくとも 32 週間にわたって炎症反応が持続し、腹膜周囲で CINC-1 や MCP-1 等の分泌が亢進することを示した。今年度のプロテオーム解析からは、腹腔内単回投与 32 週後において、血清中で酸化ストレス応答の関連タンパク質の量の変動していることが明らかになった。このうち、Apolipoprotein A-IV は、腹膜周囲で経時的に濃度が減少し、瀕死個体では血清中でも低値を示すことがわかった。Apolipoprotein A-IV は、脂質の輸送体として肝臓や腸管で合成され血清内に多く存在するタンパク質であるが、近年、抗炎症作用や抗酸化ストレス作用を持つことが示唆されている。マウスの実験的潰瘍性大腸

炎を抑制し得ることや⁶⁾、膵臓がん⁷⁾および卵巣がん⁸⁾の患者の血清で有意な低値を示すことも報告されている。今回、我々が示したのはラットの腹腔洗浄液や血清における測定結果ではあるが、Apolipoprotein A-IV が中皮腫の早期検出マーカーとなる可能性を示唆するものである。

今後、このタンパク質がラット組織液中および血清中で減少する原因や中皮腫組織での発現について解析し、また、他の酸化ストレス関連タンパク質とともに、中皮腫細胞に与える作用を *in vitro* で調べる予定である。

ii) MWCNT の経気管噴霧投与によるラット呼吸器の慢性毒性

今回、いずれの実験においても、MWCNT の気管内投与によって誘発、あるいは発現率が上昇する腫瘍性病変は認められなかった。g-MWCNT の 12 回投与実験の最高濃度群では、合計 1.2 mg/rat の総負荷量であり、肺がんや中皮腫が認められた Suzui ら³⁾ の MWCNT (Nikkiso) の気管内投与実験の総負荷量、1 mg/rat、に匹敵する量であった。MWCNT の発がん性に関してはアスベスト同様に一定以上の繊維長の存在が要因と考えられており (4~10 μ m)、本実験で用いた g-MWCNT の発がん性が低かったのは、長い繊維の占める割合が極めて少なかったためと推測できる。一方、単回投与の実験では長い繊維も高い割合で含む未処理の MWNT-7 と SD-1 を投与したが、投与量は 0.1 mg/rat であり、Suzui ら³⁾ の 10 分の 1 程度と低いため、腫瘍性病変の発現率に変動を与えなかったと思われる。今回の結果は、気管内投与による MWCNT の発がん性評価における

投与用量と繊維長の条件を議論するうえで有用なデータとなる。

一方、本研究では、明らかな自然発生と思われる陰嚢腔での中皮腫を除くと、投与群においてのみ体腔での中皮腫が合計 8 例認められており、長期間体内に滞留した MWCNT の中皮組織に対する影響があった可能性も考えられる。例えば、心嚢膜で認められた中皮腫の 1 例では、周辺の間質にかなりの量の MWCNT の沈着が見られた。Suzui ら³⁾ の気管内投与実験でも体腔内で中皮腫が発生しており、本結果はこれを再現し、MWCNT の繊維が血管・リンパ管などの何らかの経路で遠隔的に中皮組織に作用する可能性を示唆するものである。なお、SD-2 は、腹腔投与の系で中皮腫を発症しなかったが (平成 24 年度報告)、今回の投与実験においても、自然発生とみられる陰嚢腔における 1 例を除き、中皮組織の増殖性病変は見られていない。

また、今回、MWCNT の気管内投与によって誘発される増殖性病変として、扁平上皮化生の初期像とみられる病巣があった。これは Suzui ら³⁾ の実験や 2 年間の吸入ばく露試験²⁾ でも報告されていない病変であり、今回のように長い繊維が少ない、あるいは投与用量が少ないという比較的負荷の弱い条件下のみで発現するものなのかもしれない。今回、いずれのプロトコールでも扁平上皮がんは観察されておらず、この扁平上皮化生が前がん病変であることを積極的に示す証拠はない。しかし、PCNA 陽性であるのに加え、メソテリンの発現が特徴的であり、ヒトの肺の腺がん⁹⁾ や卵巣がん¹⁰⁾ 等でメソテリン陽性となる症例があることを考慮すると、興味深い病変である。今後、

ラットの扁平上皮がんやその前がん病変におけるメソテリン発現を検討するべきである。

iii) 投与試料の前処理が MWCNT のマウス発生毒性に与える影響

本研究班において小林は、MWCNT の気管内投与による発生毒性が、投与前の熱処理により増強され、一方、Taquann 処理で大きく減弱することを示している。我々も、同様の実験条件下の予備実験で、母体の体重増加の抑制、胎児の体重減少、骨格異常の点で、再現性のある結果を得ている。本研究では、3 回投与の後、妊娠 15 日目に剖検し、母体の肺毒性を中心に、前処理の異なる MWCNT の毒性を比較検討した。各種の分析結果から、熱処理された MWCNT は、おそらく肺で凝集しやすく、強い肺炎症を起こすことが示唆された。肺の炎症は、熱処理、未処理、Taquann 処理の順に強く、胎児の毒性の強さがそれに対応していることが示された。

これらと、小林らの詳細な胎児の検査結果と合わせて考えると、これまで本研究班で示してきた MWCNT のマウス気管内投与による発生毒性は、MWCNT の胎盤・胎児への直接的な作用よりも、母体の肺炎症による二次的な作用によるものであった可能性が高い。そのメカニズムは未だ不明であるが、肺内で上昇した炎症性サイトカインや白血球などがメッセンジャーとなり、胎盤に作用するのかもしれない。一方で、これまでの組織観察において、胎盤組織中に MWCNT の分布を認めていないものの、直接的な作用の可能性も排除できない。より多数の標本を観察し、再確認する必要がある。

また、今回の結果は、MWCNT の投与実験で投与前の物理的状态が非常に重要であることを再認識させるものである。Taquann 法により処理された MWCNT は 1% CMC-Na 溶液に再分散させた際、目視で凝集体が多いにもかかわらず、投与後の肺実質内で肉芽腫を作らず、細かく分散していた。これは吸入試験の結果と一致しており⁸⁾、Taquann 法による高分散処理は気管内投与の系でも有効であることが示された。熱処理がどのように分散状態等へ影響したのかは不明である。

iv) 投与試料の前処理が MWCNT の発がん性に与える影響

上記のとおり、MWCNT のマウス発生毒性は、熱処理や Taquann 処理などの前処理により結果が異なることがわかったが、MWCNT のラット腹膜中皮腫誘発性に関しては、毒性が変化しなかった。これは、MWCNT による炎症反応の種類の違いによるものと思われる。すなわち、マウス発生毒性が、器官発生期の数日間における母体の急性炎症反応を反映するものであるのに対し、中皮腫発症は、腹腔内に滞留した MWCNT による慢性炎症に起因するという違いである。本実験においては、前処理の違いによる投与直後の分散状態にかかわらず、中皮腫発症に必要な繊維長の長い単繊維が、十分に腹膜に供給され、作用したと推測される。

v) 国際動向調査

ナノマテリアルの評価手法の国際的な標準化を目指して、OECD テストガイドラインやガイダンスの改定活動が本格化しており、EU を中心に様々なプロジェクトが立ち上がりつつある。本研究班で検討している

慢性影響評価に関する成果についても、OECD のガイドランス等に取り入れられるように、本研究で確立した吸入試験法や気管内投与手法を生かして、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro 評価系試験法から慢性影響を評価できることを示すデータを積み上げて OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが必要であると考えられえた。

E. 結論

MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫のモデルにおいて、酸化ストレスに関連する複数の分子が発症の初期に発現変動することが示された。

12 回あるいは単回の気管内投与により、MWCNT のラット呼吸器系および体腔の中皮組織に対する慢性毒性と自然発生病変の発現に与える影響を調べたが、著明な変化は無かった。これは有効な繊維長の MWCNT の肺への負荷量が低かったことが原因とみられる。しかしながら、投与群のみで胸腔内あるいは腹腔内で中皮腫が複数例認められており、投与が影響を与えた可能性もある。また、増殖性病変として、扁平上皮化生の初期像が MWCNT 投与群のみで観察された。

MWCNT の投与前処理は、気管内投与によるマウス発生毒性の結果に影響を及ぼした。マウス発生毒性が母体の肺炎症の程度に依存していることも示唆された。一方で、投与前処理はラット腹膜中皮腫の誘発性には影響を及ぼさなかった。

国際動向調査では、OECD 吸入試験法のガイドライン TG412 と TG413 がナノマテリアル評価に適応して改定が承認され、さらに WPMN では EU が行っている OECD ガイドライ

ンの改訂や新規ガイドラインの作成作業を促進するプロジェクト活動を受けて 6 つの新規プロジェクトが提案された。しかし、現実に全てのナノマテリアルで慢性吸入曝露試験を行うのは不可能であることを考慮すると、今後は、より短期の吸入曝露や気管内曝露試験法、in vitro 評価系試験法などから慢性影響を評価できるガイドランスなどを OECD 等に提案できるような実証研究を行っていくことが必要であると考えられえた。

F. 参考文献

- 1) Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, Hirose A, Nishimura T, Ohashi N, Ogata A. *J Toxicol Sci.* 2009 Feb;34(1):65-76.
- 2) Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. *Part Fibre Toxicol.* 2016 Oct13;13(1):53.
- 3) Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H. *Cancer Sci.* 2016 Jul;107(7):924-35.

- 4) Teratogenicity of multi-wall carbon nanotube (MWCNT) in ICR mice. Fujitani T, Ohyama K, Hirose A, Nishimura T, Nakae D, Ogata A. *J Toxicol Sci.* 2012 Feb;37(1):81-9.
- 5) Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.
- 6) Apolipoprotein A-IV inhibits experimental colitis. Vowinkel T, Mori M, Kriegelstein CF, Russell J, Saijo F, Bharwani S, Turnage RH, Davidson WS, Tso P, Granger DN, Kalogeris TJ. *J Clin Invest.* 2004 Jul;114(2):260-9.
- 7) Large-scale clinical validation of biomarkers for pancreatic cancer using a mass spectrometry-based proteomics approach. Park J, Lee E, Park KJ, Park HD, Kim JW, Woo HI, Lee KH, Lee KT, Lee JK, Park JO, Park YS, Heo JS, Choi SH, Choi DW, Jang KT, Lee SY. *Oncotarget.* 2017 Jun 27;8(26):42761-42771.
- 8) Discovery of serum biomarkers of ovarian cancer using complementary proteomic profiling strategies. Timms JF, Arslan-Low E, Kabir M, Worthington J, Camuzeaux S, Sinclair J, Szaub J, Afrough B, Podust VN, Fourkala EO, Cubizolles M, Kronenberg F, Fung ET, Gentry-Maharaj A, Menon U, Jacobs I. *Proteomics Clin Appl.* 2014 Dec;8(11-12):982-93.
- 9) Mesothelin overexpression is a marker of tumor aggressiveness and is associated

- with reduced recurrence-free and overall survival in early-stage lung adenocarcinoma. Kachala SS, Bograd AJ, Villena-Vargas J, Suzuki K, Servais EL, Kadota K, Chou J, Sima CS, Vertes E, Rusch VW, Travis WD, Sadelain M, Adusumilli PS. *Clin Cancer Res.* 2014 Feb 15;20(4):1020-8.
- 10) Humoral immune response to mesothelin in mesothelioma and ovarian cancer patients. Ho M, Hassan R, Zhang J, Wang QC, Onda M, Bera T, Pastan I. *Clin Cancer Res.* 2005 May 15;11(10):3814-20.

G. 研究発表

(論文発表)

なし

(学会発表)

坂本義光, 広瀬明彦, 中江 大 : 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の経気管投与ラットに見られた肺胞過形成病変の免疫組織学的性状, 第 76 回日本癌学会学術総会, 横浜 (2017 年 9 月 28 日~30 日)

北條幹, 坂本義光, 山本行男, 村上詩歩, 長谷川悠子, 前野愛, 五十嵐海, 湯澤勝廣, 生嶋清美, 多田幸恵, 清水本武, 長澤明道, 久保喜一, 安藤弘, 海鋒藤文, 田中和良, 矢野範男, 鈴木俊也, 猪又明子, 守安貴子, 広瀬明彦, 中江大 : ラットにおける多層カーボンナノチューブおよびクリソタイル誘発中皮腫の病理学的性状の比較, 第 34 回日本毒性病理学会学術集会, 那覇 (2018 年 1 月 25 日~26 日)

坂本義光，北條幹，鈴木俊也，猪又明子，
広瀬明彦，中江大：多層カーボンナノチ
ューブの経気管反復投与によりラット肺
に誘発された増殖性病変の免疫組織学的
解析，第34回日本毒性病理学会学術集会，
那覇（2018年1月25日～26日）

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. 2D-DIGE解析結果

	総検出数	有意差あり (student's T)	Ratioが [†] 1.5以上		有意差あり かつ Ratio1.5以上
			増加(>=1.5)	減少(<=-1.5)	
スポット数	2399	435 (P<0.05)	33	256	396 (P<0.05)

投与後32週の血清を用いた解析. 対照群, MWCNT投与群をそれぞれ6個体で比較

表2. LC/MS/MSによる同定結果

No.	Name	Entry ID	Ratio
1	α -1 inhibitor 3	D4AA52	1.31 ↓
2	Ceruloplasmin	G3V7K3	1.42 ↑
3	Polymeric Ig receptor	F1M7H2	2.61 ↑
4	Afamin	P36953	1.43 ↓
5	Hemopexin	P20059	1.33 ↑
6	Murinoglobulin 2 Fragment	D4A6E3	1.55 ↓
7	α -1 antiproteinase	P17475	1.41 ↑
8	Haptoglobin	P06866	1.44 ↑
9	α -1 macroglobulin	Q63041	1.35 ↑
10	Apolipoprotein E	P02650	1.68 ↑
11	Clusterin	G3V836	1.4 ↑
12	Glutathion peroxidase3	P23764	1.26 ↓
13	Apolipoprotein A-IV	P02651	1.31 ↓

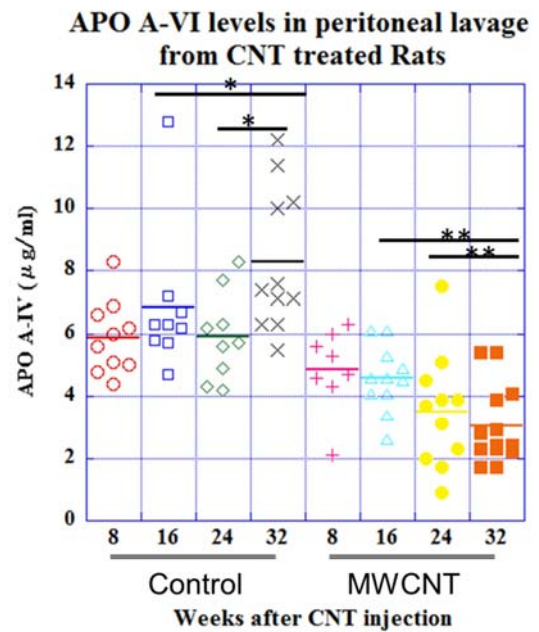
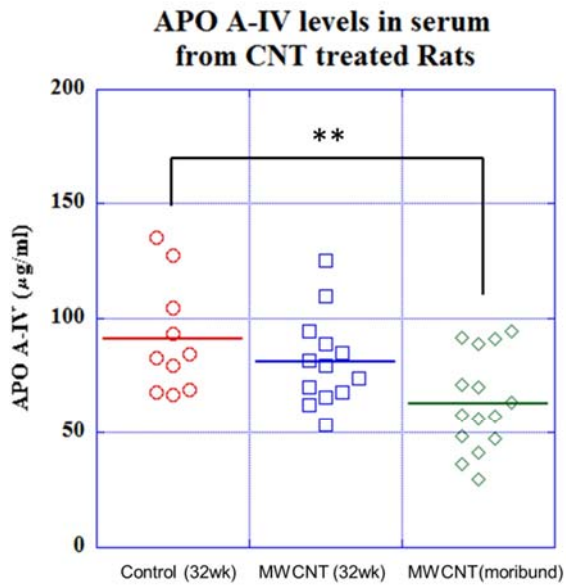


表 3. g-MWCNT の 12 回の気管内投与による腫瘍発生例数

群	例数	肺			中皮				
		過形成	腺腫	腺癌	過形成	(心嚢)	(胸腔)	(腹腔)	(陰嚢腔)
Control	18	0	0	0	0	0	0	0	0
0.05 mg/rat	16	0	0	0	0	0	1(6)	0	0
0.26 mg/rat	17	1 (6)	0	0	0	0	0	1(6)	0
1.2 mg/rat	17	4 (23)*	0	0	1 (6)	1 (6)	0	1(6)	0

カッコ内は発生率 (%) *P<0.05

図 1. 血清中の APO A-IV 濃度
 投与 32 週後の計画解剖例 (赤と青) と同等の投与
 条件の実験 (iii) における瀕死解剖例 (緑)
 色付きのバーは平均値.
 (** P<0.01 Student' s T-test)

図 2. 腹腔洗浄液中の APO A-IV 濃度
 投与 32 週後の計画解剖. 10ml の PBS で洗浄・回収.
 色付きのバーは平均値.
 (* P<0.05, ** P<0.01 Student' s T-test)

表 4. MWCNT の単回気管内投与による腫瘍発生例数

群	例数	肺			中皮				
		過形成	腺腫	腺癌	過形成	(心嚢)	(胸腔)	(腹腔)	(陰嚢腔)
Control	15	3 (20)	1 (7)	1 (7)	0	0	0	0	1 (7)
MWNT-7	16	6 (38)	1 (6)	0	0	0	0	1 (6)	0
SD-1	15	4 (27)	1 (7)	0	0	1 (7)	0	2 (8)	1 (7)
SD-2	15	4 (27)	2(13)	1 (7)	0	0	0	0	1 (7)

カッコ内は発生率 (%)

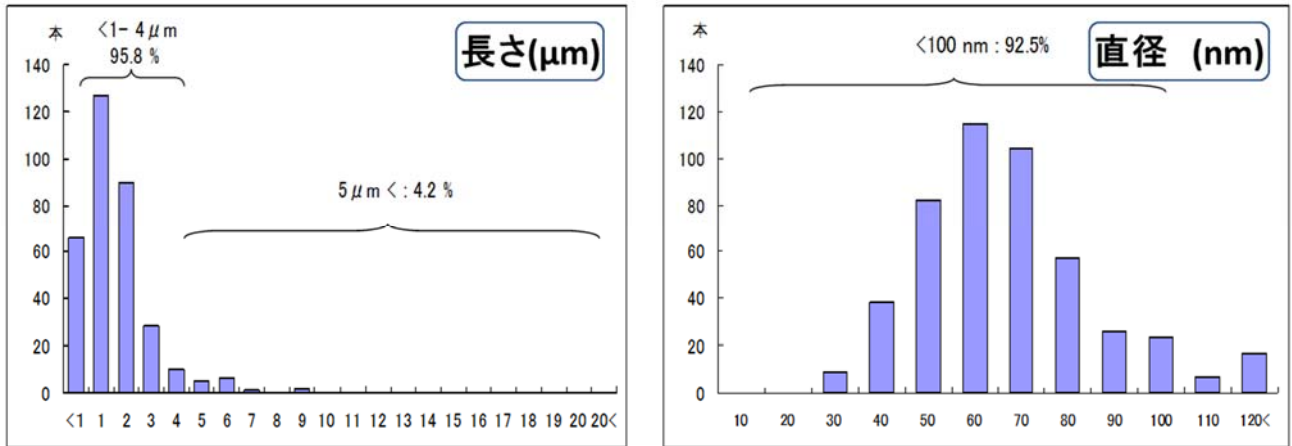


図3. 12回反復気管内投与に用いたg-MWCNTの繊維長と直径

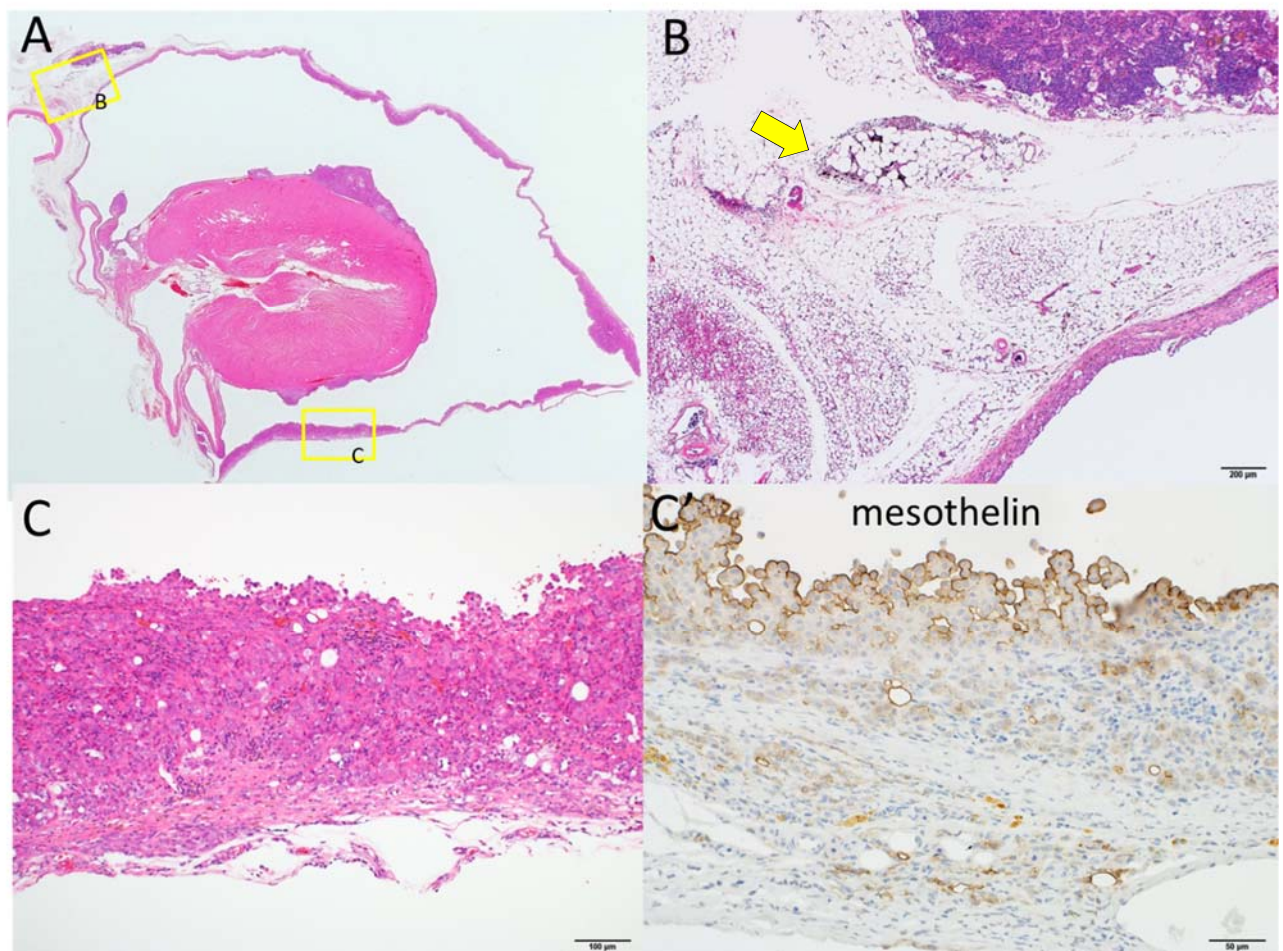


図4. 終生飼育中に心嚢膜に発生した中皮腫の1例 (SD-1単回気管内投与)

A 心嚢膜および心臓の組織像 (弱拡大), B 周辺組織におけるMWCNTの沈着 (矢印), C 中皮腫, C' 中皮腫部位におけるmesothelinの免疫組織化学染色

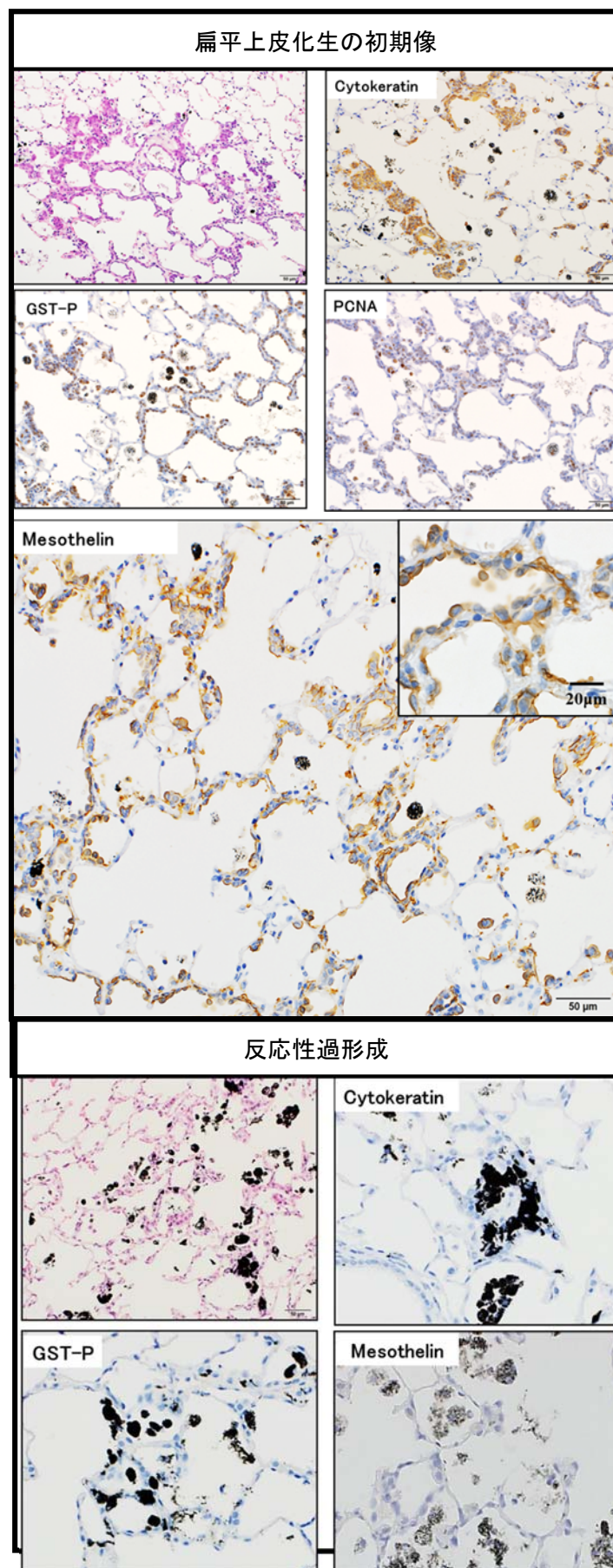


図5. 扁平上皮化生の初期像と反応性過形成の免疫組織学的性状
いずれも 1.2 mg/rat 群の個体

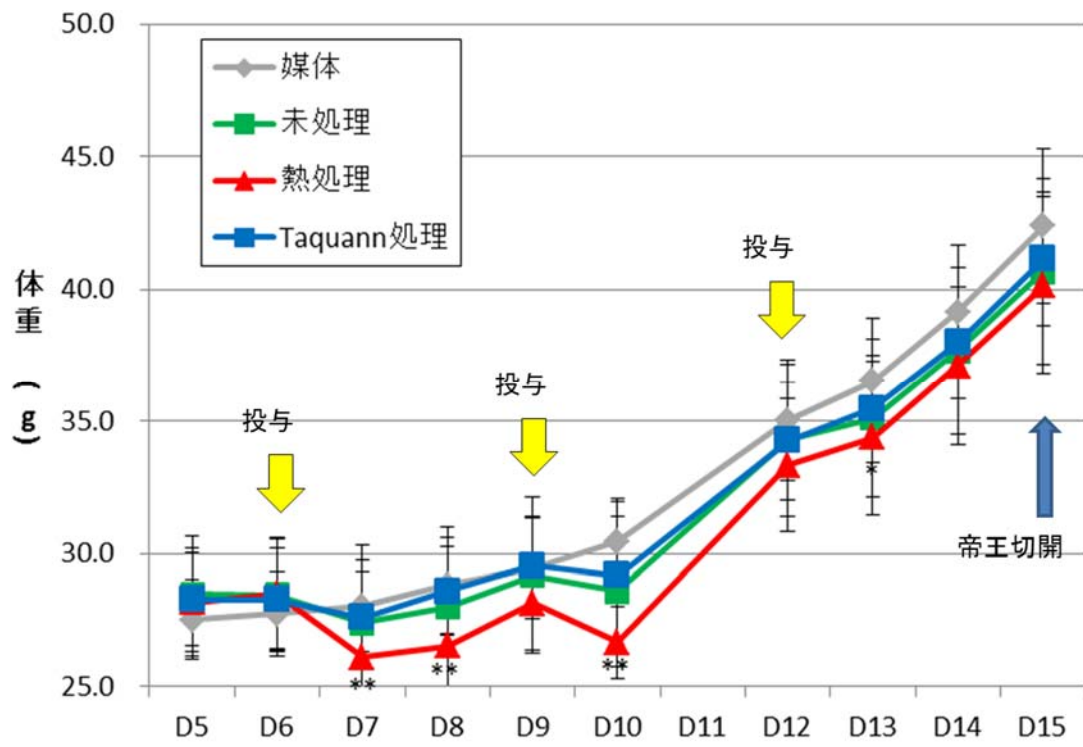


図 6. 母体体重の推移 (妊娠後日数 (D))

*P<0.05, **P<0.01

表 5 胎児検査結果（妊娠 15 日目の帝王切開）

	対照	未処理MWCNT	熱処理MWCNT	Taquann MWCNT
母体数	14	13	13	13
総胎児数(生存胎児)	172	158	171	162
黄体数	12.60 ± 1.70	13.00 ± 1.80	12.69 ± 1.90	13.47 ± 1.80
着床数	11.87 ± 1.55	11.79 ± 2.19	11.75 ± 1.81	11.80 ± 1.37
後期死胚	0	0.07 ± 0.27	0.13 ± 0.50	0
早期吸収胚	0.40 ± 0.51	0.43 ± 0.65	0.13 ± 0.34	0.27 ± 0.46
死胚合計	0.40 ± 0.51	0.50 ± 0.91	0.25 ± 0.84	0.27 ± 0.46
生存胎児数	11.5 ± 1.68	11.3 ± 2.46	11.5 ± 2.03	11.5 ± 1.51
胎児重量	0.47 ± 0.07	0.41 ± 0.06 *	0.39 ± 0.06 **	0.43 ± 0.04
胎盤重量	0.104 ± 0.011	0.094 ± 0.016	0.094 ± 0.014	0.096 ± 0.012

* P<0.05, **P<0.01

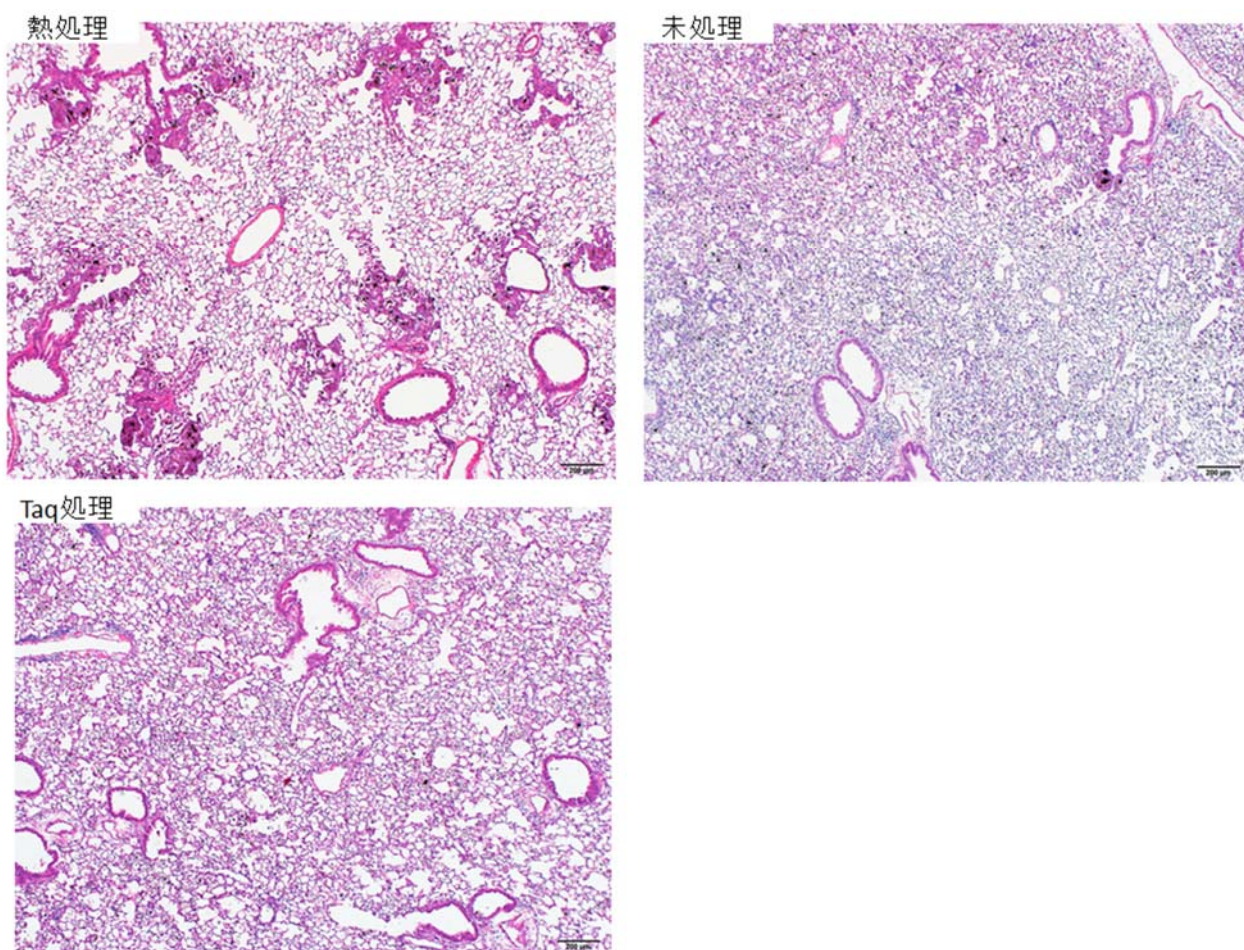


図 7. 母体の肺実質の組織（HE 染色）

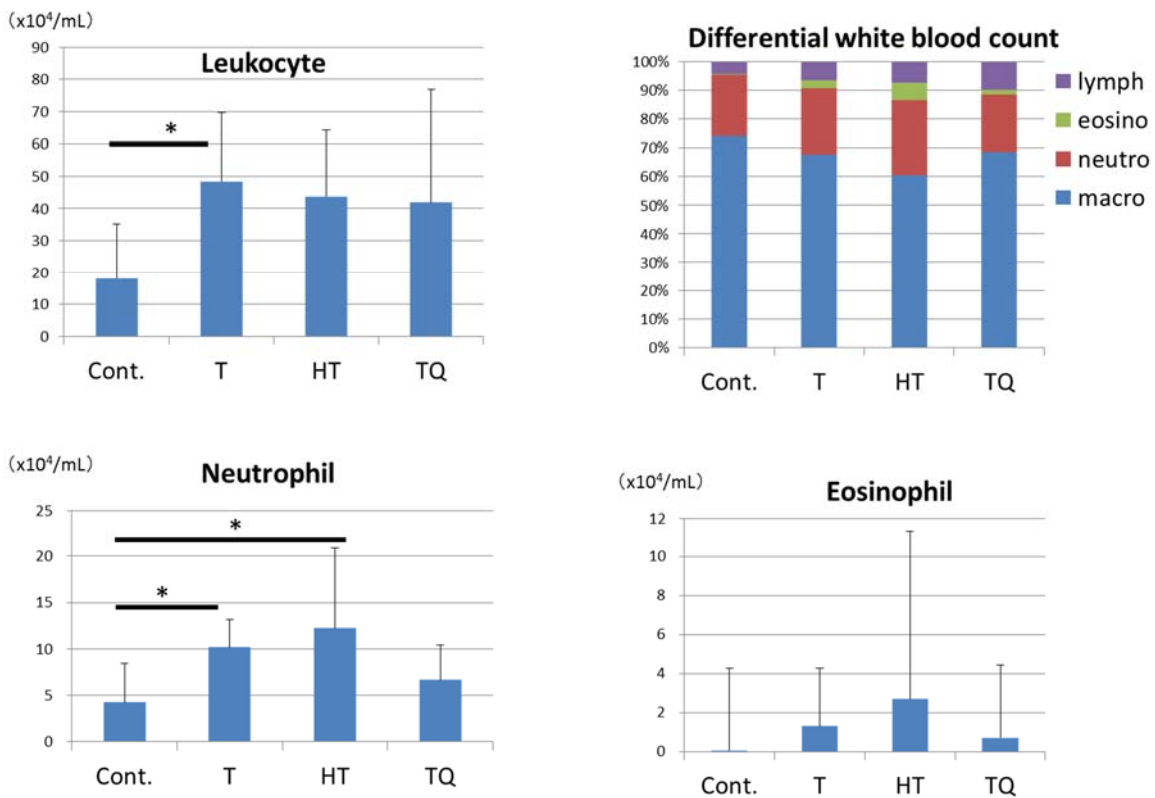


図8. 母体のBALF中の白血球数

T: 未処理, HT: 熱処理, TQ: Taquann 処理, *P<0.05

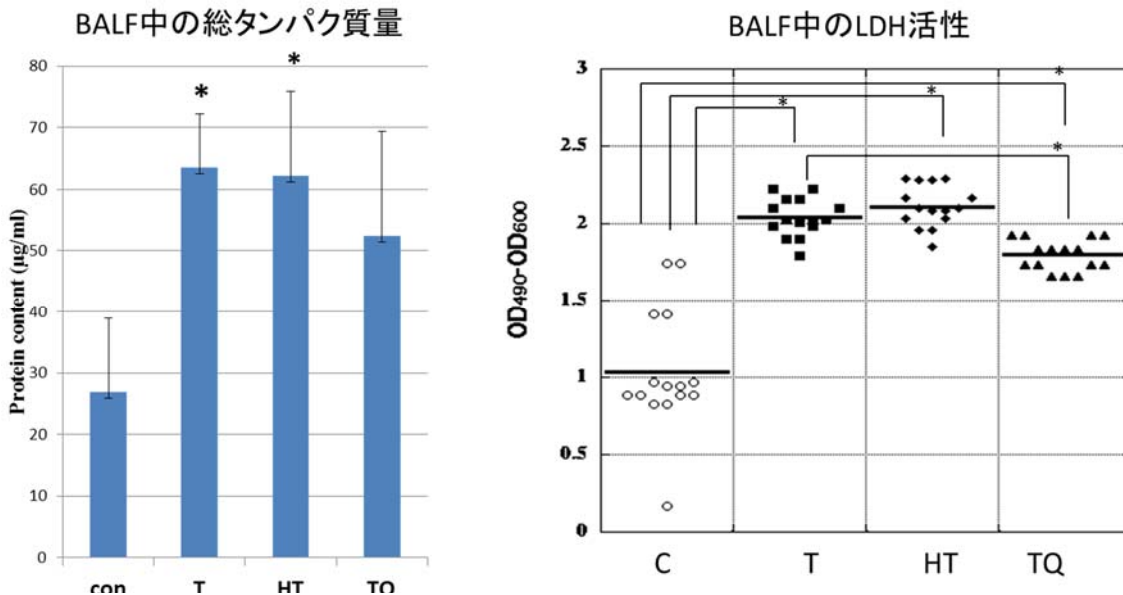


図9. 母体のBALF中の総タンパク質量とLDH活性

T: 未処理, HT: 熱処理, TQ: Taquann 処理 *P<0.05

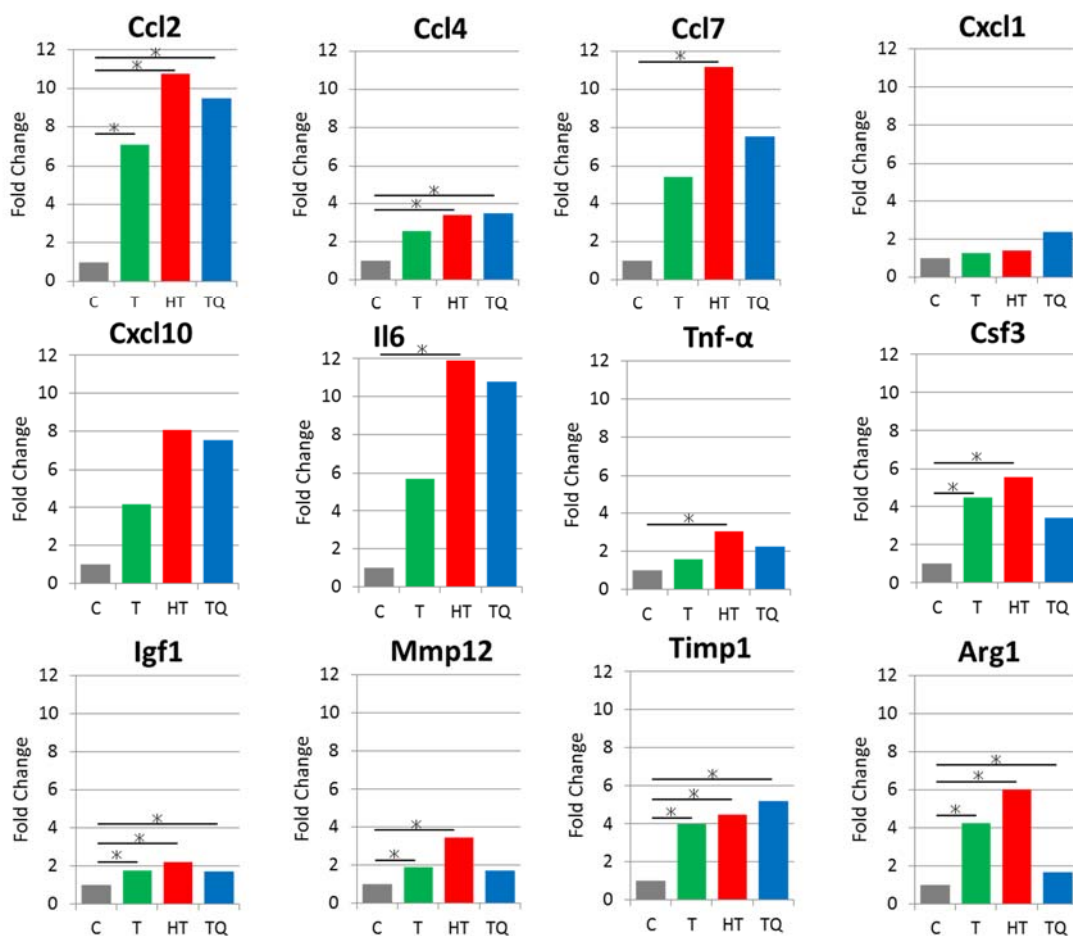


図 10. 母体の肺実質における遺伝子発現の変化（2倍以上の発現上昇が見られた遺伝子）

リアルタイム PCR の結果。対照群を 1 とした時の相対値，T：未処理，HT：熱処理，TQ：Taquann 処理
*P<0.05

表 6. 中皮腫の発症率（投与後 89 週時点）

群	投与用量 (mg/kg 体重)	有効数	解剖 例数	解剖時期 (週)	中皮腫 (頻度%)	中皮腫 以外	
①	TQ高	1	20	20	31-53	20 (100)	0
②	TQ低	0.05	20	6	69-	4 (20)	2
③	HT-TQ高	1	17	17	26-56	17 (100)	0
④	HT-TQ低	0.05	20	5	63-	5 (25)	0
⑤	T	1	19	19	14-59	19 (100)	0
⑥	HT	1	18	18	26-63	18 (100)	0
⑦	Cont	0	20	2	64-	0	2

T：未処理，HT：熱処理，TQ：Taquann 処理，HT-TQ：熱処理後に Taquann 処理

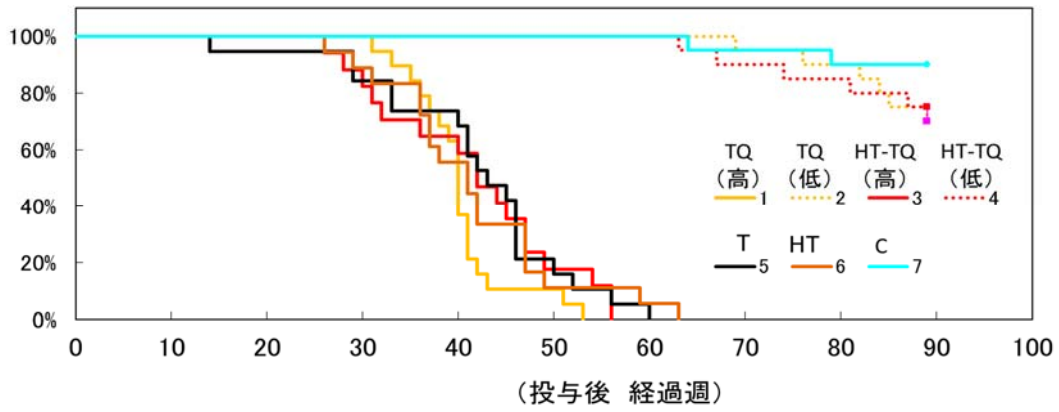


図 11. 投与 89 週後における生存曲線 (①, ③, ⑤, ⑥の間に有意差無し)

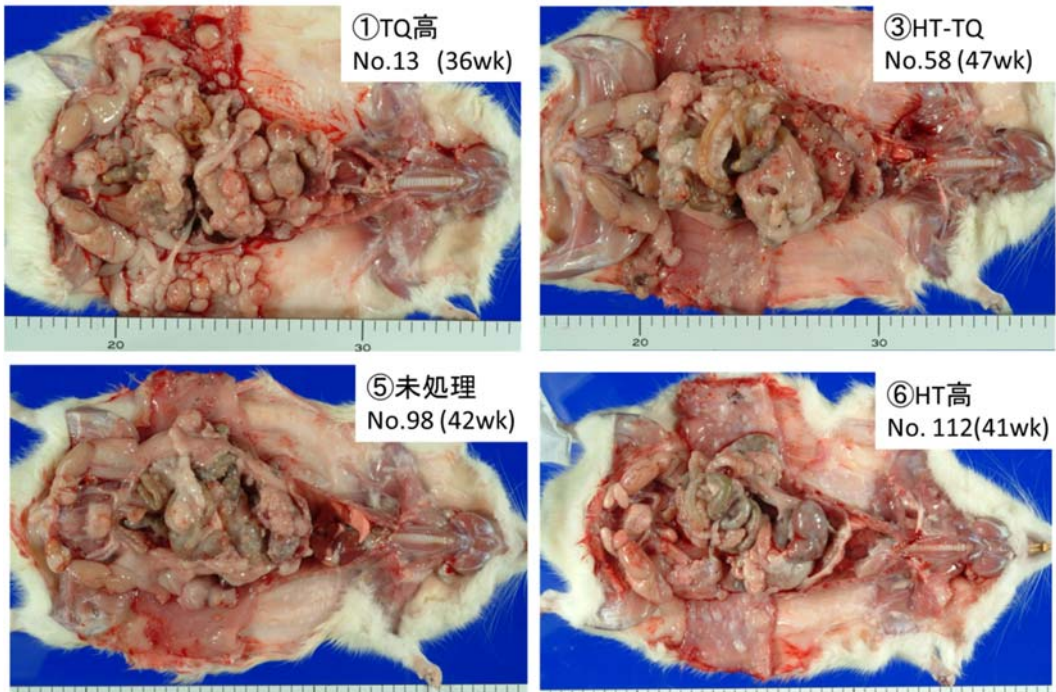


図 12. 瀕死解剖時の肉眼所見

