

研究課題名: ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名: 慢性影響を考慮した気管内投与法の確立に関する研究

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
研究分担者:	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
研究分担者:	菅野 純	日本バイオアッセイ研究センター		所長
研究協力者:	中江 大	東京農業大学	応用生物科学部	教授
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	
研究協力者:	前野 愛	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
研究協力者:	山本 行男	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
研究協力者:	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
研究協力者:	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	主任研究官
研究協力者:	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	技術専門役
研究協力者:	後藤 裕子	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	主任研究員
研究協力者:	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

研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器系を介した慢性影響に関するデータの蓄積は不十分であり、MWCNTの慢性吸入試験についてはKasaiら¹⁾の報告のみである。本研究では、2年間の吸入試験と同レベルの評価が可能なラットによる代替慢性試験法を開発することを目的とした。昨年度末から、2年間にわたり気管内投与を間欠的に行う長期試験(合計26回の投与)を実施中であり、今年度は、実験開始から半年経過後および1年経過後の経過観察について報告する。

F344雄性ラットを、対照群(C群)、低用量群(L群)、高用量群(H群)および高用量スプレー式ゾンデ群(HS群)の4群に分け、動物数はそれぞれ30、55、55および55匹とした。9週齢から、C群には0.1%Tween含有生理食塩水を、L群には0.125 mg/kg体重、H群およびHS群には0.5 mg/kg体重の用量でMWCNT-7を4週間毎に1回、気管内に投与した。投与にはHS群のみスプレー式ゾンデを用い、その他の群は経口ゾンデを用いた。投与開始から半年経過後(7回投与後)と1年経過後(13回投与後)に、病理組織学的検索および気管支肺胞洗浄液分析用に4ないし5匹、肺負荷量測定用に4ないし5匹を、それぞれ剖検した。

肺重量、BALF中の総細胞数・好中球数・リンパ球数およびBALF中の総タンパク質は、C群に比べて、各投与群で有意に増加し、用量依存的な増加、さらに経時的な増加が認められた。これらの評価項目についてH群とHS群を比較すると、1年経過後には、わずかにH群での影響が強かった。組織学的には、半年経過後、1年経過後のいずれについても、MWCNT繊維の沈着やMWCNTを貪食したマクロファージの凝集が肺実質でびまん性

に認められ、MWCNT の沈着部位に関連して、II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成が認められた。反応性過形成は、投与用量に依存して増加したが、経時的な増加は L 群のみで見られた。肺腫瘍は認められず、細気管支肺胞上皮過形成が 1 年経過後の L 群と HS 群で 1 例ずつ確認されたのみであった。胸腔内に中皮腫は観察されなかったが、中皮組織の炎症反応が半年経過後から観察され、特に、1 年経過後には多くの個体で横隔膜や心嚢膜における炎症反応が見られ、繊維の胸腔内への移行が示唆された。肺負荷量は、1 年経過時点において L 群で 250 μ g/Lung 程度、H 群および HS 群では 1500 μ g/Lung 程度であった。負荷量としては、すでに、Kasai ら¹⁾ の報告の実験終了時に近い量となり、肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで蓄積していることがわかった。

A. 研究目的

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。MWCNT はアスベストに類似する性質を持つため、慢性毒性として肺がんや胸膜中皮腫などの呼吸器系への影響が懸念されている。ナノマテリアルの毒性評価方法としては、欧米ではヒトへの曝露形態に近い吸入試験が推奨されているが、慢性吸入試験の実施には多大なコストがかかる。過去には、MWNT-7 の 2 年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺がんが発症することが Kasai らにより報告されたが¹⁾、上市される多数のナノマテリアルに慢性吸入試験を課すことは事実上不可能である。そこで、慢性影響を評価できる効率的な評価手法が求められている。

気管内投与法による慢性試験は有力な代替手法の候補の一つであるが、報告例は少ない。Suzui らは 2 週間で 8 回の MWCNT (Nikkiso) の投与を行い、その後、2 年間の観察により、肺腫瘍に加え胸腔内に中皮腫が発症することを報告した²⁾。MWCNT の肺負荷量に注目すると、吸入試験と気管内投与試験のどちらも最大で 1000 μ g/Lung を超えているが^{1),2)}、吸入試験では、2 年間にわたり次第に肺内に MWCNT が蓄積し、AUC (Area Under the Curve) は右肩上がりの

形状になるのに対し¹⁾、Suzui らの気管内投与試験では、肺負荷量が実験開始直後に最大となり、次第に減少するという右肩下がりの AUC の形状となった (図 1)^{2),3)}。ヒトのアスベスト中皮腫と同様に、ラットの胸膜中皮腫の発症にも長い時間を要すると考えられるため、両実験における胸腔内中皮腫の発症の有無は AUC の形状の違いに起因すると推測されている³⁾。なお、2019 年には Nuano らが、反復気管内投与により 1 匹あたり合計 1500 μ g の MWNT-7 を曝露した後に 2 年間経過観察する実験を行った⁴⁾。その結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生し、気管内投与により初期に投与負荷を高くすると胸膜中皮腫が発症することが明確に示された。

本研究では、2 年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法を開発することを目的とした (図 1)。4 週間に 1 度の間隔で MWNT-7 の気管内投与を実施し、右肩上がりの形状の AUC を描きながら最終的に Kasai らの結果と同程度以上の肺負荷量を達成できるように投与量を設定した。この試験で得られる結果を、Kasai らの吸入試験¹⁾ と Suzui ら²⁾ や Numano ら⁴⁾ の気管内投与試験の結果と比較することで、肺負荷量に着目した MWCNT の発がん性評価の重要性を示すことができ、また、気管内投与試験の有用性が再認識されることが期待できる (図 1)。

現在、昨年度の条件検討から設定した実験条件、すなわち、低用量群に 0.125 mg/kg 体重、高用量群に 0.5 mg/kg 体重の用量で 4 週間に 1 度、2 年間で合計 26 回の気管内投与を行う長期試験を実施中である。肺負荷量は、実験終了時に低用量群で 600 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 前後に、高用量では 2400 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 前後になることが予測される (図 2)。

今年度は、実験の経過観察を目的として、投与開始から半年経過後および 1 年経過後に少数例の剖検を行い、慢性毒性と MWCNT の肺負荷量を評価した。

B. 研究方法

i) MWCNT の調製およびキャラクタリゼーション

Taquann 処理 (53 μm メッシュ)⁵⁾した MWNT-7 を 200 $^{\circ}\text{C}$ で 2 時間処理し、0.1% Tween80 (ポリソルベート、日油) 含有生理食塩水を加え超音波浴槽で 30 分以上分散させた。低用量群の試料は 0.125 mg/mL、高用量群の試料は 0.5 mg/mL の濃度にそれぞれ調製した。

投与試料のキャラクタリゼーションとして、0.01 mg/mL の濃度で分散させた試料について、動的光散乱 (DLS) により二次粒径分布を (小林の分担報告参照)、走査電子顕微鏡 (SEM) により繊維長の分布を、それぞれ解析した。

ii) 動物飼育および投与

5 週齢の F344/DuCr1Cr1j の雄性ラットを購入し (日本チャールス・リバー)、コンベンショナル飼育室にて、床敷 (アルファドライプラス、ESP 益新) 入りのプラスチック製ケージに 3 匹ずつ収容し、基礎飼料 CE-2 (日本クレア) と、限外ろ過した水道水を自由摂

取させ、室温 24 \pm 1 $^{\circ}\text{C}$ 、湿度 50 \pm 5%、換気回数毎時 10 回 (HEPA フィルター経由)、12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

7 週齢の時点で、対照群 (C 群) 30 匹、低用量群 (L 群) 55 匹、高用量群 (H 群) 55 匹および高用量スプレーゾンデ群 (HS 群) 55 匹の 4 群に分けた (図 3)。1 週間に一度、体重を測定した。

9 週齢から、イソフルラン吸入麻酔下で、C 群、L 群および H 群については経口ゾンデ (夏目製作所) を、HS 群についてはスプレー式ゾンデ (PennCentury) をそれぞれ用いて、1 mL/kg 体重の投与量で 4 週間に 1 度の頻度で反復気管内投与を行った。MWCNT の投与用量は、L 群で 0.125 mg/kg 体重、H 群および HS 群で 0.5 mg/kg 体重となる (図 3)。

iii) 剖検

半年経過後 (7 回投与後)、また、1 年経過後 (13 回投与後) に、各群 5 匹を病理組織観察および気管支肺胞洗浄液 (BALF) 回収用に、別の 5 匹を MWCNT の肺負荷量測定用に、それぞれ解剖した (図 3)。ただし、C 群については肺負荷量測定は行わず、各時期に 5 匹ずつ剖検した。

各群 5 匹については、主要臓器を 10% 中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。ただし、肺は右葉については PBS を注入して BALF を回収した後に、左葉については湿重量を測定した後に、それぞれホルマリン溶液を注入して固定した。BALF は遠心分離し、沈殿は白血球数の計数に、上清は総タンパク質量の測定に用いた。

一方、MWCNT 投与群の肺負荷量測定用の 5 匹については、各葉を切り離し、ホルマリン溶液に浸漬してからおよそ 1 か月後に解析

に用いた。

iv) 病理組織学的解析

固定した臓器から、定法により HE 染色標本を作製し、光学顕微鏡による病理組織検索を行った。II 型肺胞上皮細胞の反応性過形成を定量化するため、抗 TTF-1 抗体（アブカム；ab72876）で染色した各群 3 例の左葉の 10 枚の肺胞領域の画像に関して、ImageJ により視野あたり ($23444 \mu\text{m}^2$) の DAB 陽性細胞核を計数した。

v) BALF の分析

BALF の沈殿を 2% の BSA 含有 PBS で再懸濁し、チュルク液で染色後に総細胞数の計測を行った。また、再懸濁液から自動遠心塗抹装置によって塗抹標本を作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、白血球を分類・計数し、各種の白血球の個数を算出した。

BALF の上清の総タンパク質量は、2-D Quant Kit (GE ヘルスケア) により測定した。

vi) 肺負荷量の測定

肺内の MWCNT の測定は、Ohnishi らの蛍光マーカーを用いて検出する手法 (大西法) に従った^{6),7)}。肺組織をアルカリ溶液で溶解し、十分に分散させ、残存する肺組織を酸で溶解した後、MWCNT にベンゾ-ジ-ペリレン (B[ghi]P) を吸着させた。フィルターで MWCNT 繊維を捕捉してから、アセトニトリル溶液に B[ghi]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

<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) 投与試料の性状

DLS による二次粒子径は、平均 720.2 nm であった (図 4; 詳細は小林の分担報告書に掲載)。いっぽう、SEM による、繊維長の分布は、2841 本の繊維を観察した結果、平均 $6.03 \pm 3.9 \mu\text{m}$ であった (図 4)。いずれの結果も、既報の同様の実験結果と類似するものであった。

ii) 体重および解剖動物数

実験開始時、平均 206.5 g だった体重は 1 年後には 400 g 前後まで増加した。1 年後の C 群、L 群、H 群および HS 群の平均体重は、それぞれ、 $406.5 \pm 24 \text{ g}$ 、 $398.9 \pm 24 \text{ g}$ 、 $391.0 \pm 22 \text{ g}$ および $391.7 \pm 21 \text{ g}$ であり、C 群に対し、H 群、HS 群の体重は有意に低下していた。

1 年経過時点で、合計 70 例を解剖した (表 1)。半年経過後および 1 年経過後の計画解剖では合計 65 匹を、死亡あるいは人道的エンドポイント (瀕死解剖) により 5 例を途中解剖した。半年後と 1 年後の計画解剖の合計数は 70 例の予定であったが、途中解剖動物で肺負荷量の測定を代用できることから、定期解剖の数は 65 匹に変更した。途中解剖の動物に、肺腫瘍及び中皮腫は認められなかった (表 1)。

iii) BALF の生化学および細胞学的解析

BALF 上清の総タンパク質量は、C 群に対し、各投与群で有意に上昇し、また、半年経過後に比べて 1 年経過後のほうが高値であった (図 5)。

BALF の沈殿の総細胞数や、好中球数・リンパ球数・マクロファージ数等の各分画についても、C 群に対して投与群で有意な増加を認め、用量依存적および時間依存적の増加が見られた (図 5)。

iv) 病理組織学的解析

肺の左葉の湿重量は、半年経過後・1 年経過後、どちらについても、C 群に対して有意に増加しており、特に、L 群よりも H 群および HS 群での増加が顕著であった (図 6)。また、投与群に関しては、半年経過後よりも 1 年経過後のほうが重量が大きかった。

肉眼的に、投与群の肺は MWCNT の沈着により黒色を呈し、投与用量と解剖時期に応じて色味は強かった (図 7)。ただし、経口ゾンデを用いた L 群および H 群については、MWCNT の沈着が尾側に偏ることが多く、頭側先端部の沈着が極端に少ない個体も認められた (図 8)。また、群によらず、右葉の中葉では沈着量が比較的少なかった (図 7, 8)。HS 群においては、すべての動物に気管分岐部の付近に複数個の黒色班が認められた (図 7; 矢印)。これは昨年度報告したように、スプレー式ゾンデの先端が位置する気管粘膜部位で局所的に沈着した MWCNT と考えられる。

組織学的には、1 年経過後までに、肺腫瘍・中皮腫は確認されず、肺実質における非腫瘍性の増殖性病変と中皮組織における炎症反応が主な所見であった (表 2)。

各投与群において、肺実質にびまん性に

MWCNT 繊維を貪食したマクロファージの凝集および線維化を伴う肉芽腫様の炎症反応が認められた (図 9)。また、MWCNT 繊維の沈着に関連した部位に反応性の II 型肺胞上皮細胞の過形成が見られた。抗 TTF-1 抗体による免疫染色により増生の程度を群間および経時的に比較したところ、用量依存적陽性核の増加を認めた (図 10)。いっぽう、経時的な増加は L 群のみで認められ、HS 群ではむしろ半年経過後よりも 1 年経過後のほうが有意に陽性核数が少なかった。

細気管支肺胞上皮過形成は、半年経過後には、C 群で自然発生性の 1 例を除き、認められなかったのに対し、1 年経過後には、MWCNT 投与に関連するとみられる過形成が、L 群に 1 例、HS 群に 1 例の合計 2 例認められた (表 2)。組織学的には、HS 群の 1 例は (図 11)、やや細胞の異形性が見られ、周囲への圧排がわずかにみられるものの、肺胞構造をある程度保った状態で間質をほとんど伴わないため、過形成と診断された。増生した細胞の核は TTF-1 陽性であった。

いっぽう、胸腔内の中皮組織の反応は、半年経過時点で観察された (表 2)。H 群に 3 例、HS 群に 2 例、横隔膜の線維化を伴う炎症反応が観察され、1 例については中皮細胞の過形成も認められた (図 12)。1 年経過後には、多くの個体の横隔膜の中皮組織における炎症反応および中皮細胞の肥大や過形成が観察された (表 2、図 13)。また、臓側胸膜 (図 14) と心嚢膜においても炎症反応が見られた (図 15)。

v) MWCNT の肺負荷量

肺内の MWCNT 量は、L 群ではほぼ予想どおりであったのに対し、H 群および HS 群で

は、予測よりもやや蓄積量が多かった（図16）。H群とHS群で顕著な差異はなかった。半年経過後には、L群、H群およびHS群で、それぞれ 147 ± 20 、 764 ± 160 および $687 \pm 160 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。いっぽう、1年経過後は、L群、H群およびHS群で、それぞれ 244 ± 33 、 1364 ± 270 および $1436 \pm 100 \mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。

D. 考察

間欠気管内投与で連続吸入曝露に類似した肺負荷を与える実験系の開発という目標について、1年経過時点の評価では、おおむね予想通りに達成できたと考えられる。まず、MWCNT投与直後には体重が減少し、次第に回復することを繰り返すものの（データは未掲載）、顕著な体重抑制は起こらず、また、1年経過時点までに、のべ2080匹を超える動物に投与を実施しているが、投与による事故死（表1参照）の確率は極めて低い（0.14%）。また、半年経過後と1年経過後を比較すると、各項目で、投与用量と投与回数（解剖時期）に応じた毒性の増強が認められている。特に、肺負荷量について、予想通り、Kasaiら¹⁾やSuzuiら²⁾の報告と比較可能なレベルに蓄積していることが確認できたことが重要である。1年経過時点で肺腫瘍は認められないが、これはMWCNTに限らず、粒子状物質・繊維状物質によるラット肺発がんの既報と比較すれば妥当なものと考えられる。

H群とHS群の結果を比較すると、いくつかの差異が見られた。まず、肉眼的にはスプレー式ゾンデのほうが均一にMWCNTが沈着しやすいことが明らかだった。昨年度の単回投与や3回投与よりも反復回数が多い分、

両器具による差異が顕著になったと考えられる。頭尾軸に沿った負荷の偏りが腫瘍発生率に影響するか、2年経過後に、注意深く評価する必要がある。スプレー式ゾンデは投与時に気管にMWCNTを含有する巨大な肉芽組織を形成することが分かっており、反復投与による気管の狭窄等の可能性も否定できないため、こちらも2年経過後の評価が重要である。また、1年経過後の5匹程度の観察結果では、横隔膜や臓側胸膜における炎症反応は、両群で顕著な違いは見られなかったものの、HS群で、心嚢膜での反応性が特に強い個体が見られた。経口ゾンデとスプレー式ゾンデで上記のように繊維の沈着様式に違いがあることから、胸腔への繊維の移行についても（ルートは不明だが）、量や部位に差異がある可能性は否定できない。中皮腫の発症の有無を含め、2年経過後の中皮組織の反応性が両群で異なるかどうかも重要な点である。

また、H群・HS群の肺負荷量は、L群よりも個体間のバラツキが大きく、一回の投与にかかる負荷量が重い場合にはクリアランスの個体差が生じやすいのかもしれない。1年経過後のいくつかの評価項目でH群のほうがHS群よりも影響が強いデータが得られているが、これも、1年経過後に剖検した5匹の肺負荷量のバラツキに起因する可能性もある（ただし、肺負荷量を測定した個体では他の項目を評価できていないため、肺負荷量の大小と毒性との具体的な関係は不明である）。

E. 結論

ラットへのMWNT-7の4週間に1度の気管内反復投与実験を実施し、半年および

1年後に経過観察した結果、繊維の沈着に関連した慢性的な炎症反応やII型肺胞上皮細胞の反応性過形成が全個体に観察され、これらの毒性の程度は、用量や投与回数に応じて強くなった。また、1年経過後時点で肺腫瘍は観察されず、2例で細気管支肺胞上皮過形成が認められるのみであった。MWCNTの肺負荷量は、1年経過時点において低用量の投与で250 μ g/Lung程度、高用量の投与で1500 μ g/Lung程度となり、肺腫瘍の発症が期待されるレベルまで沈着していた。なお、1年経過時点で、胸腔内中皮腫は発症していないが、横隔膜の肥厚や中皮細胞の過形成等の組織学的所見から、MWCNT繊維の胸腔内への移行が示唆された。

(謝辞)

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、津田洋幸先生、沼野琢旬先生、また、技術的支援をしていただいた、生嶋清美氏、長谷川悠子氏、湯澤勝廣氏、長澤明道氏、久保喜一氏、安藤弘氏、田中和良氏、海銚藤文氏、矢野範男氏に深く感謝する。

F. 参考文献等

- 1) 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.
- 2) 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.
- 3) Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto. *J Occup Health.* 2018 Jan 25;60(1):10-30.
- 4) MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. *Cancer Sci.* 2019 Aug;110(8):2485-2492.
- 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) Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. *J Occup Med Toxicol.* 2013 Oct 25;8(1):30.
- 7) Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai

T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. J Occup Med Toxicol. 2016 Sep 15;11:44.

G. 研究発表

(学会発表)

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、久保 喜一、安藤 弘、海鋒 藤文、田中 和良、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江大. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験の生体内分布と呼吸器毒性における投与器具の比較. 第 46 回日本毒性学会学術年会 2019.6.27 (徳島)

Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Onuki A, Hasegawa Y, Yuzawa K, Kubo Y, Nagasawa A, Ohnishi M, Goto Y, Suzuki T, Inomata A, Moriyasu T, Hirose A, Nakae D. Clearance of multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation: a comparison of different instillation devices. 55th Congress of the European Societies of Toxicology (EUROTOX 2019) 2019.9.10 (Helsinki, Finland)

坂本義光、広瀬明彦、中江大 Time course of histopathology and the status of involved humoral factors during the carcinogenesis of MWCNT in rats. 第 78 回日本癌学会学術総会 2019.9.28 (京都)

北條 幹、坂本 義光、山本 行男、前野 愛、多田 幸恵、長谷川 悠子、湯澤 勝廣、長澤 明道、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. MWCNT 誘発性のラット腹膜中皮腫発症過程における炎症および免疫関連因子に着目した病理組織学的解析. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会. 2020.2.14 (東京)

坂本 義光、北條 幹、前野 愛、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、広瀬 明彦、中江 大. 多層カーボンナノチューブを反復気管内投与したラットにおける肺神経内分泌細胞 (PNEC) の増生. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14 (東京)

前野 愛、坂本 義光、北條 幹、湯澤 勝廣、長谷川 悠子、長澤 明道、大貫 文、鈴木 俊也、猪又 明子、守安 貴子、後藤 裕子、大西 誠、小林 憲弘、広瀬 明彦、中江 大. 異なる投与器具を用いた多層カーボンナノチューブ (MWCNT) のラット気管内投与試験における肺毒性と肺負荷量の比較. 第 36 回日本毒性病理学会学術集会 2020.2.14 (東京)

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)

別添 5

表 1. 実験開始 1 年後までに解剖した動物数

群	動物数	実験開始後 (週)	解剖種別	備考
L 群	1	12	死亡	投与直後に窒息死
H 群	1	16	死亡	投与直後に窒息死
C 群	5	26	計画解剖	
L 群	10	26	計画解剖	
H 群	10	26	計画解剖	
HS 群	9	26	計画解剖	
L 群	1	38	瀕死解剖	骨肉腫、寛骨 (肺・胸腔内転移)
H 群	1	40	死亡	投与直後に窒息死
H 群	1	44	死亡	不明
C 群	5	52	計画解剖	
L 群	8	52	計画解剖	
H 群	8	52	計画解剖	
HS 群	10	52	計画解剖	
合計	70			

表 2. 病理組織検索結果

	半年経過後				1年経過後			
	C群	L群	H群	HS群	C群	L群	H群	HS群
II型肺胞上皮細胞 反応性過形成	0/5	5/5	5/5	5/5	0/5	4/4	4/4	5/5
気管支肺胞上皮過形成								
MWCNT誘発性	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/6	0/5	1/5
自然発生性	0/5	1/5	0/5	0/5	1/5	0/5	0/5	0/5
中皮組織の肥厚(炎症)								
臓側胸膜	0/5	0/5	0/5	0/5	0/5	1/4	3/4	2/5
横隔膜	0/5	0/5	3/5	2/5	0/5	4/4	2/4	3/5
心嚢膜	0/5	0/5	1/5	1/5	0/5	3/9	5/9	6/10

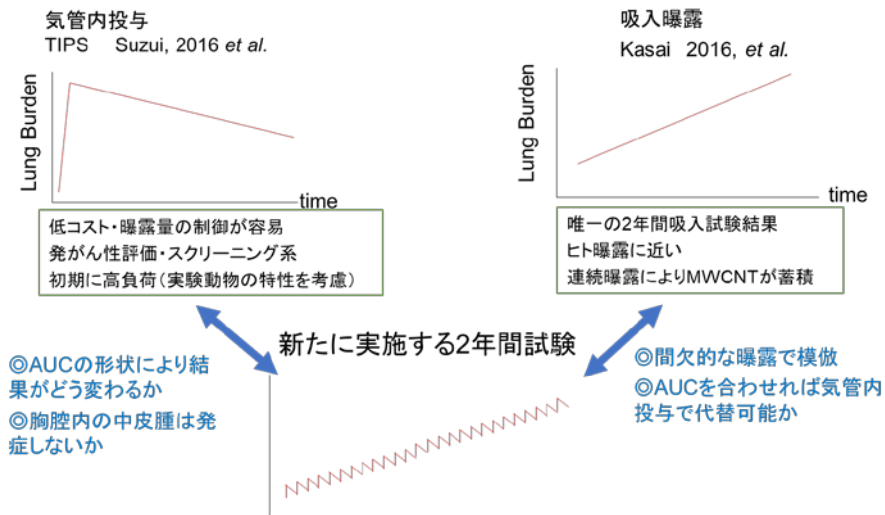


図 1. 既報のMWCNT慢性毒性評価と本研究の肺負荷量と研究の意義

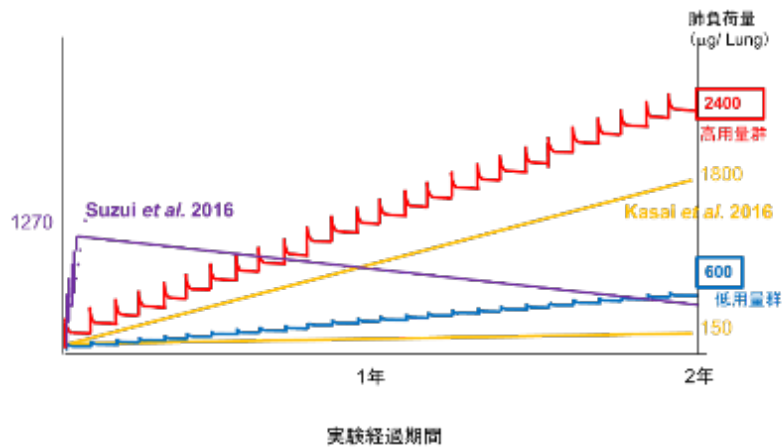


図 2. MWCNTの肺負荷量の経時変化の予測および既報との比較 実験概要

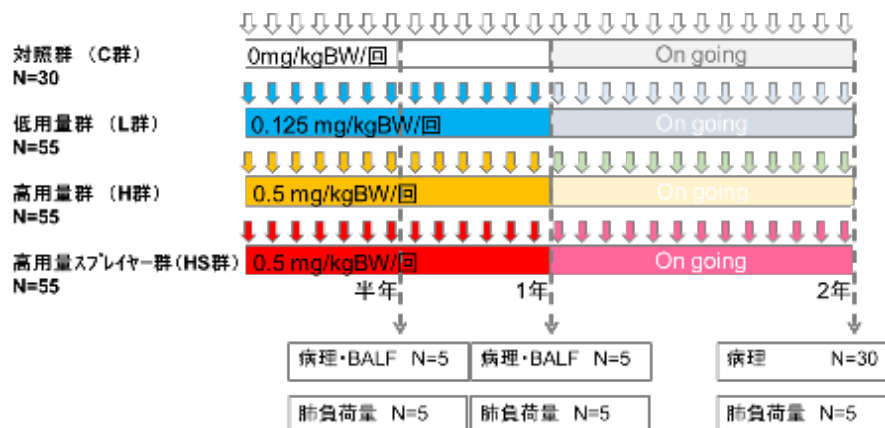


図 3. 実験概要

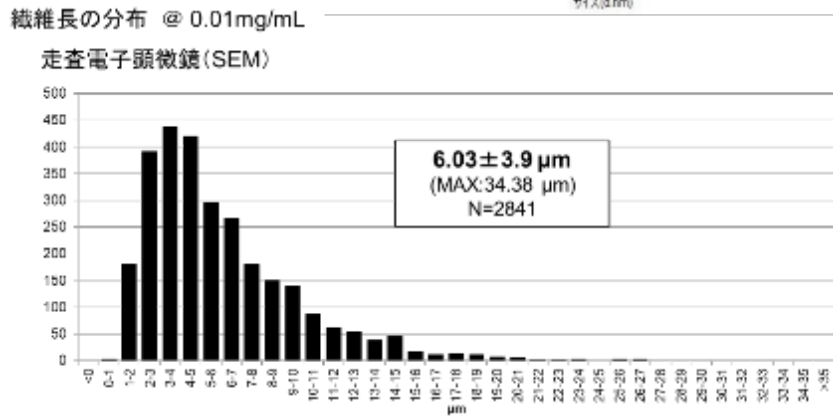
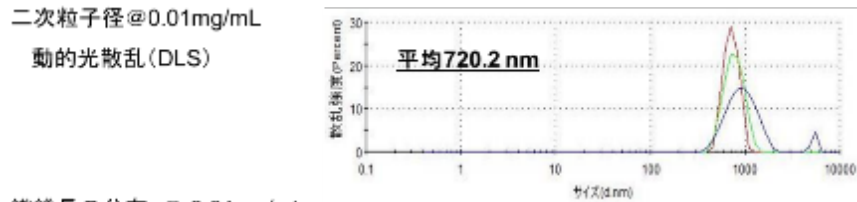


図 4. MWCNT (MWNT-7) 投与試料の性状

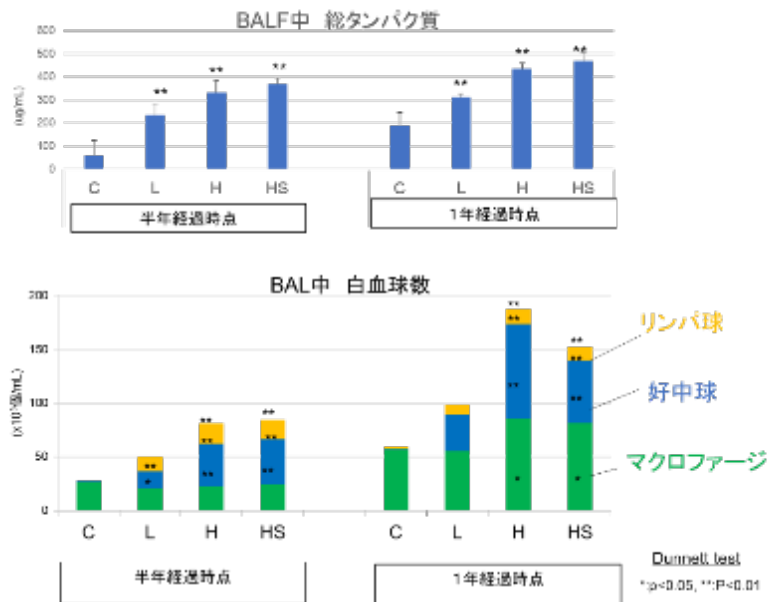


図 5. BALF の生化学的解析および細胞診断 (N=5)

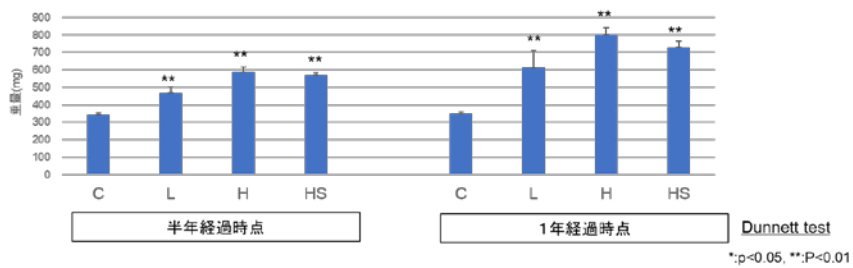


図 6. 肺の湿重量 (左葉) (N=5)

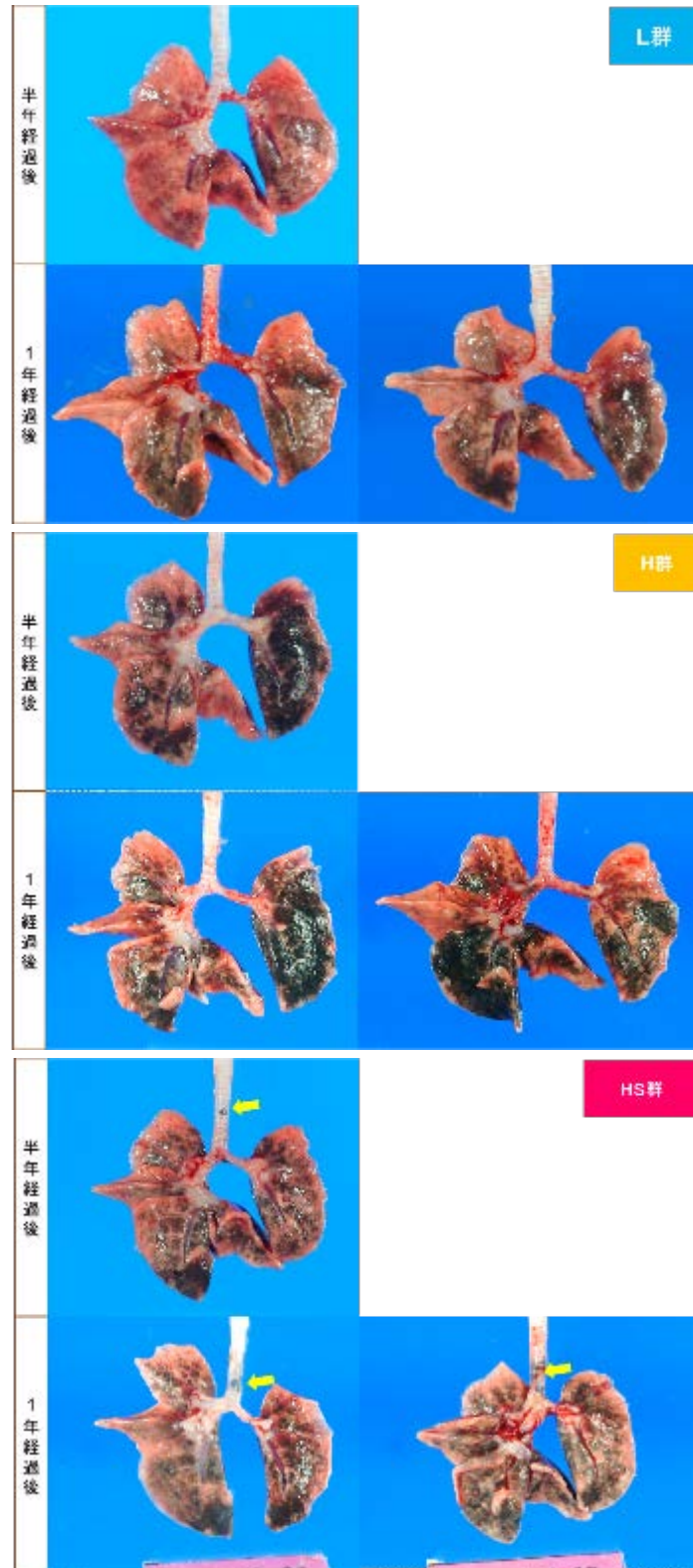


図 7. 肺の肉眼所見
矢印は HS 群の気管にのみ認められた黒色斑

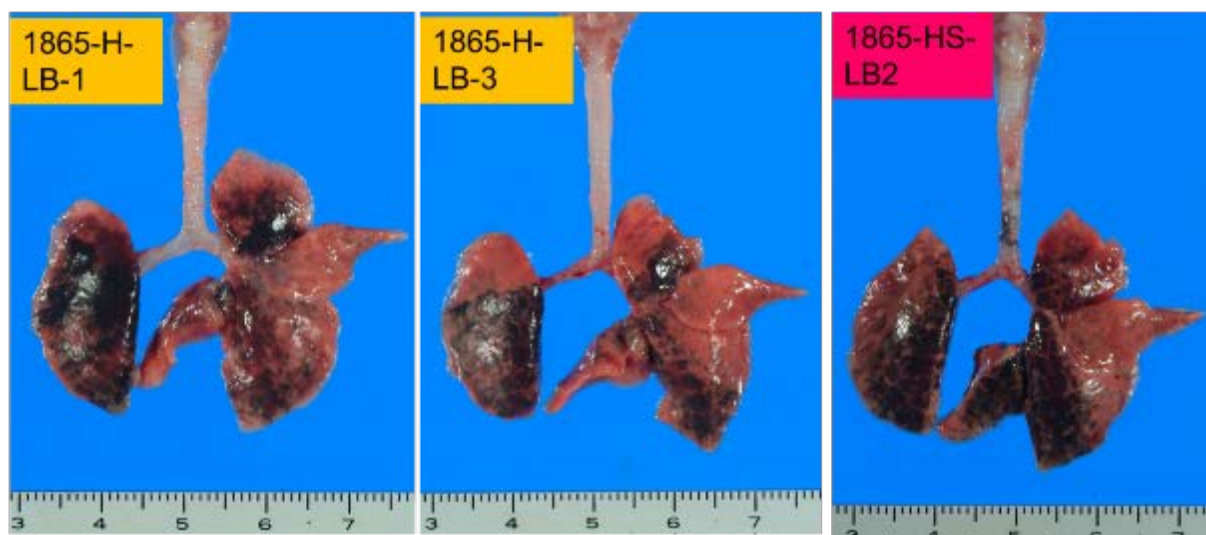


図 8. 経口ゾンデとスプレー式ゾンデの MWCNT の沈着パターンの比較
H 群（経口ゾンデ）では、沈着する領域が尾側に偏る個体が見られた（中央写真）

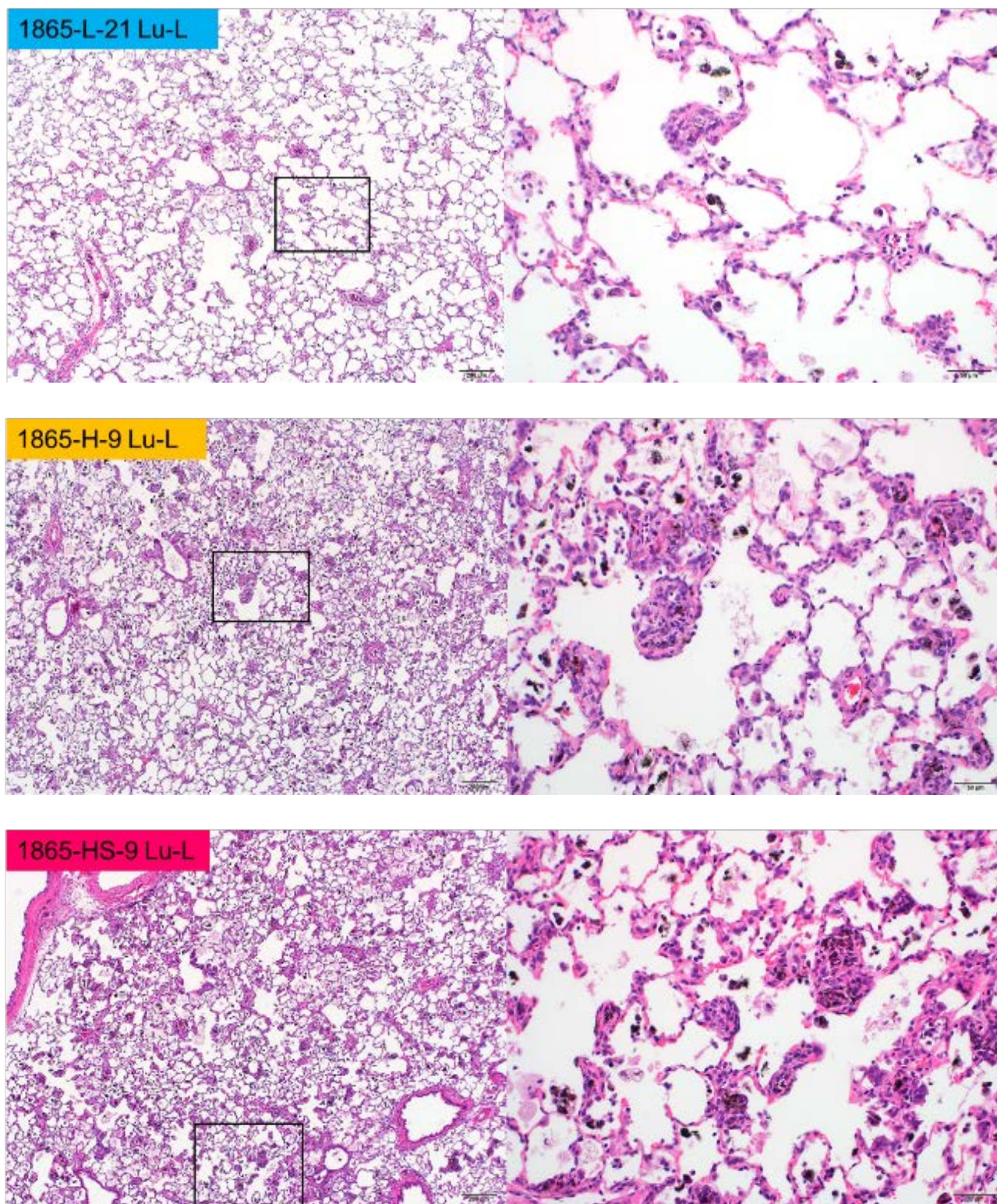


図 9. 肺実質の病理組織像 (HE 染色)
1 年経過時点の代表的な像。上から、L 群、H 群、HS 群

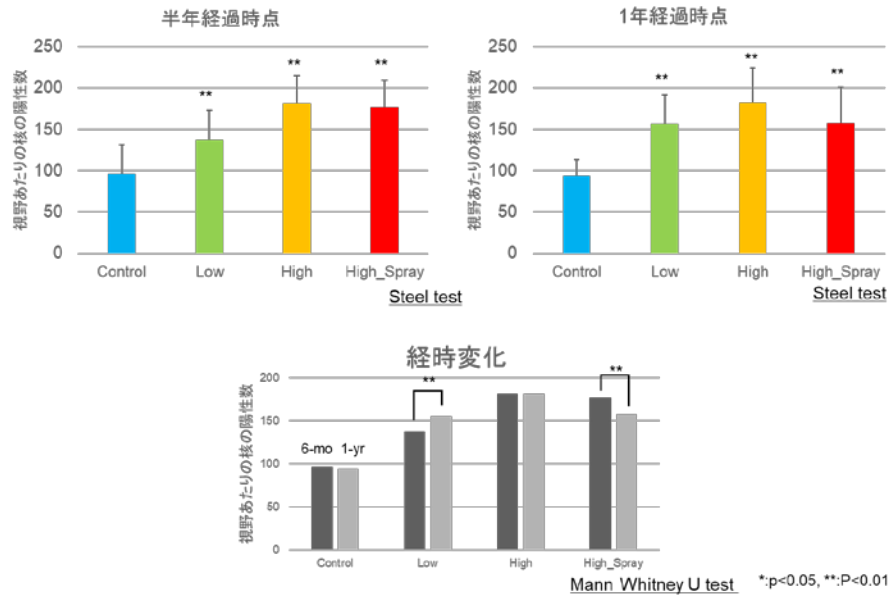


図 10. 抗 TTF-1 抗体の免疫染色による反応性 II 型上皮過形成の定量化

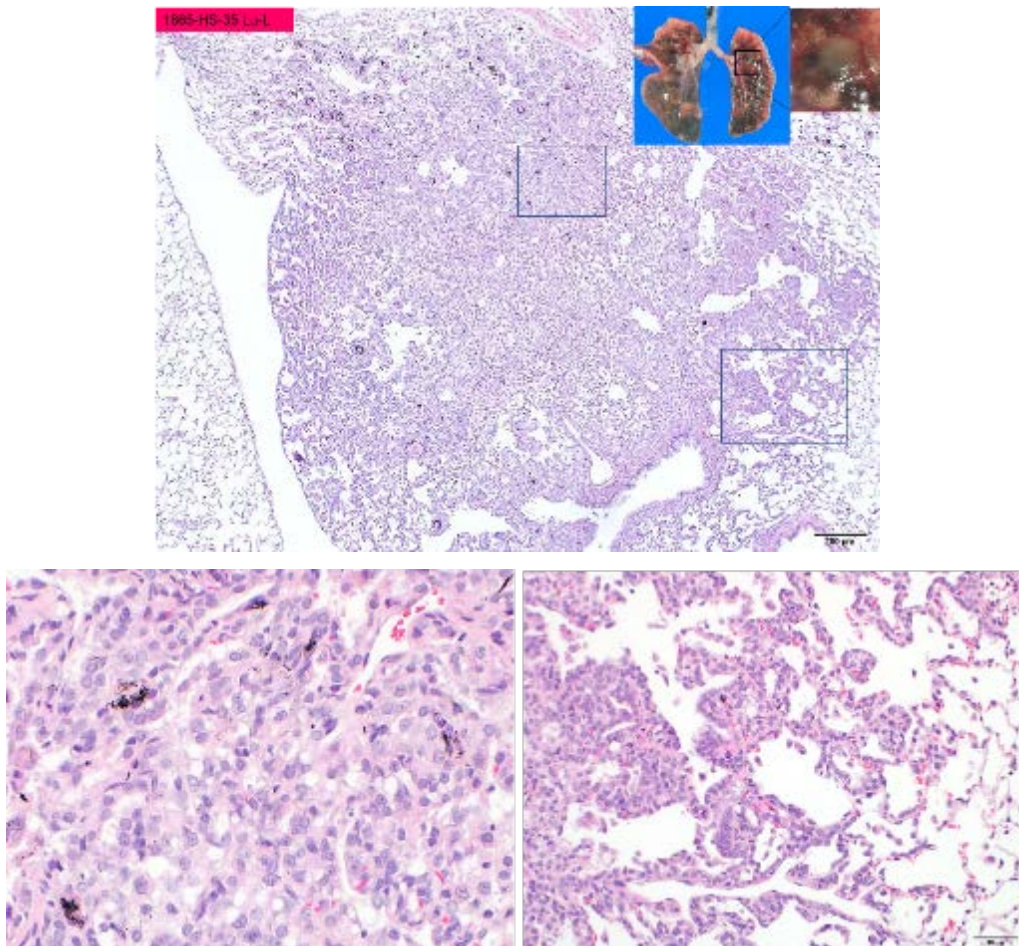


図 11. 気管支肺胞上皮過形成の病理組織像 (HE 染色 ; HS 群)

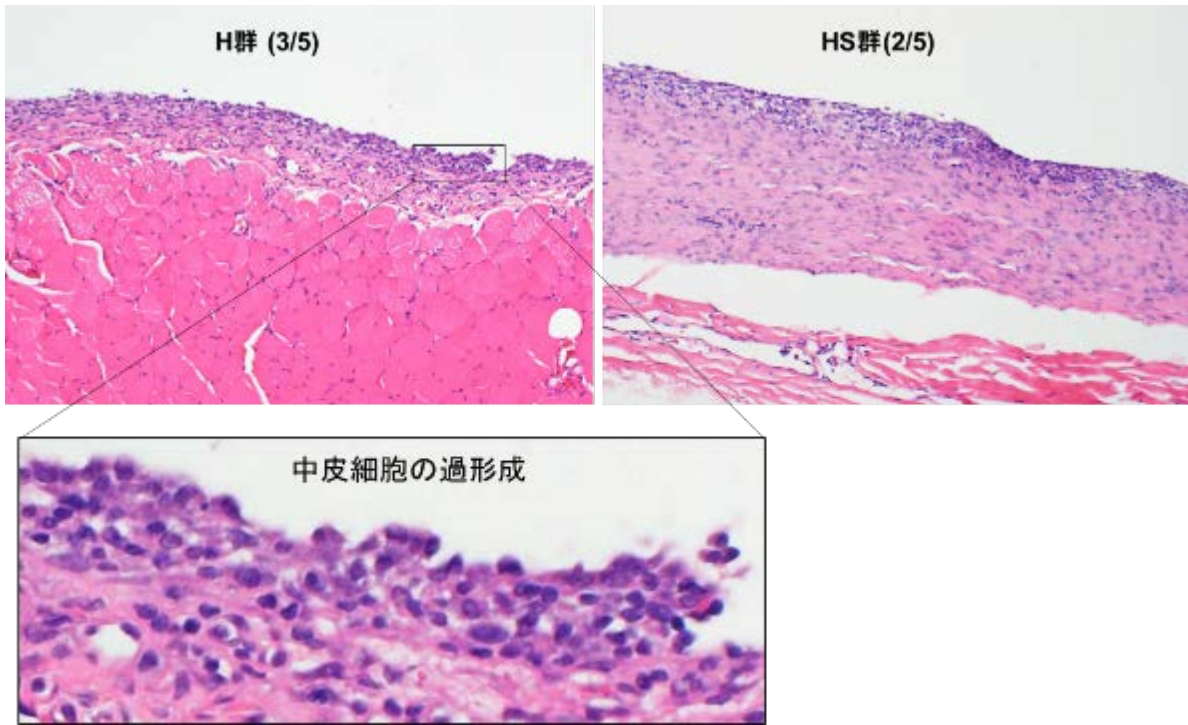


図 12. 横隔膜の炎症像および過形成像 (HE 染色 ; 半年経過後)

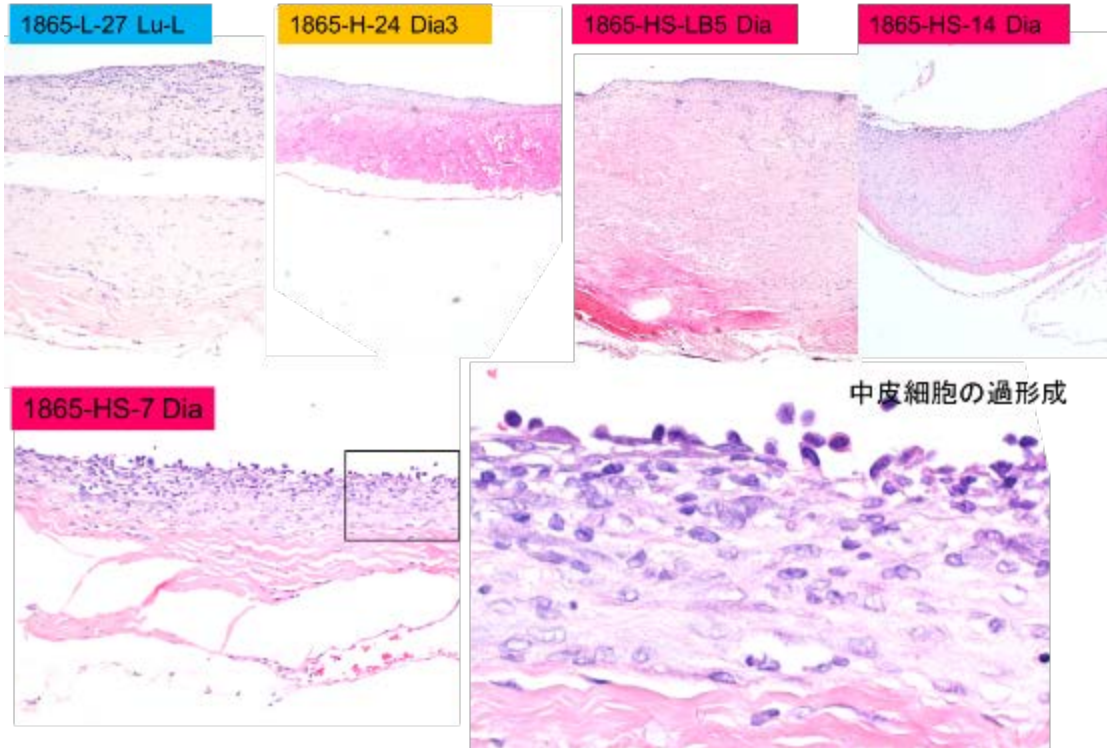


図 13. 横隔膜の炎症像および過形成像 (HE 染色 ; 1 年経過後)

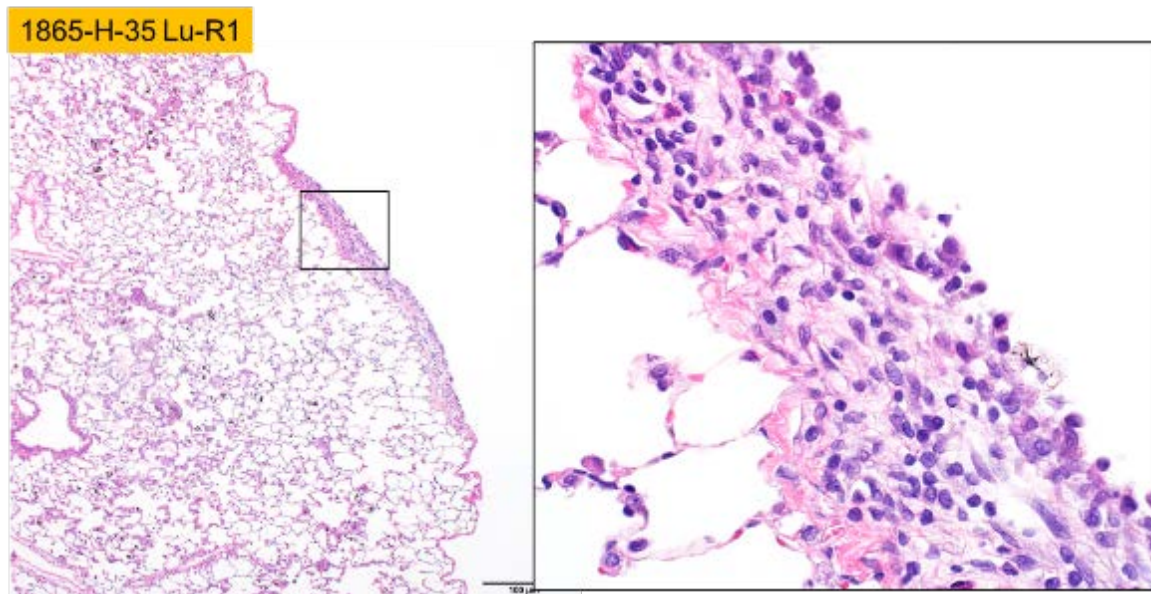


図 14. 臓側胸膜の肥厚 (HE 染色 ; 1 年経過後)

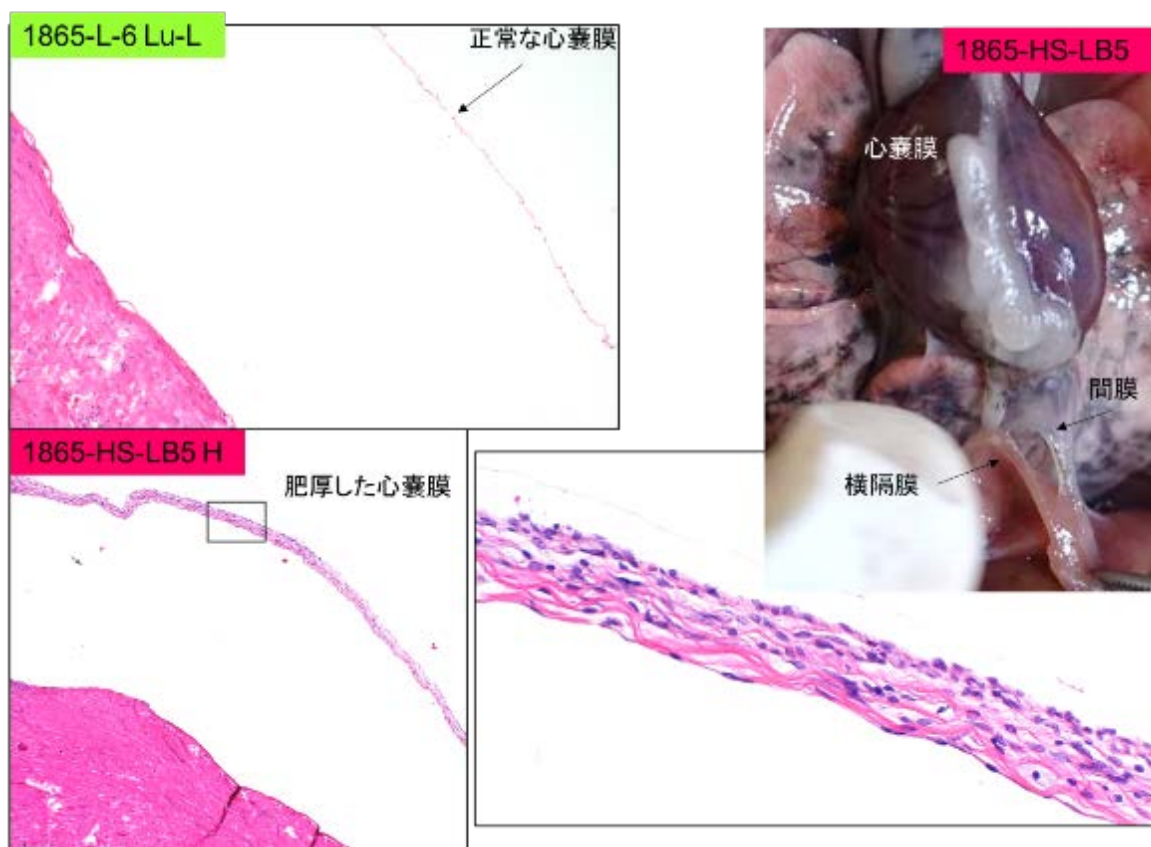


図 15. 心嚢膜の肥厚 (HE 染色 ; 1 年経過後)

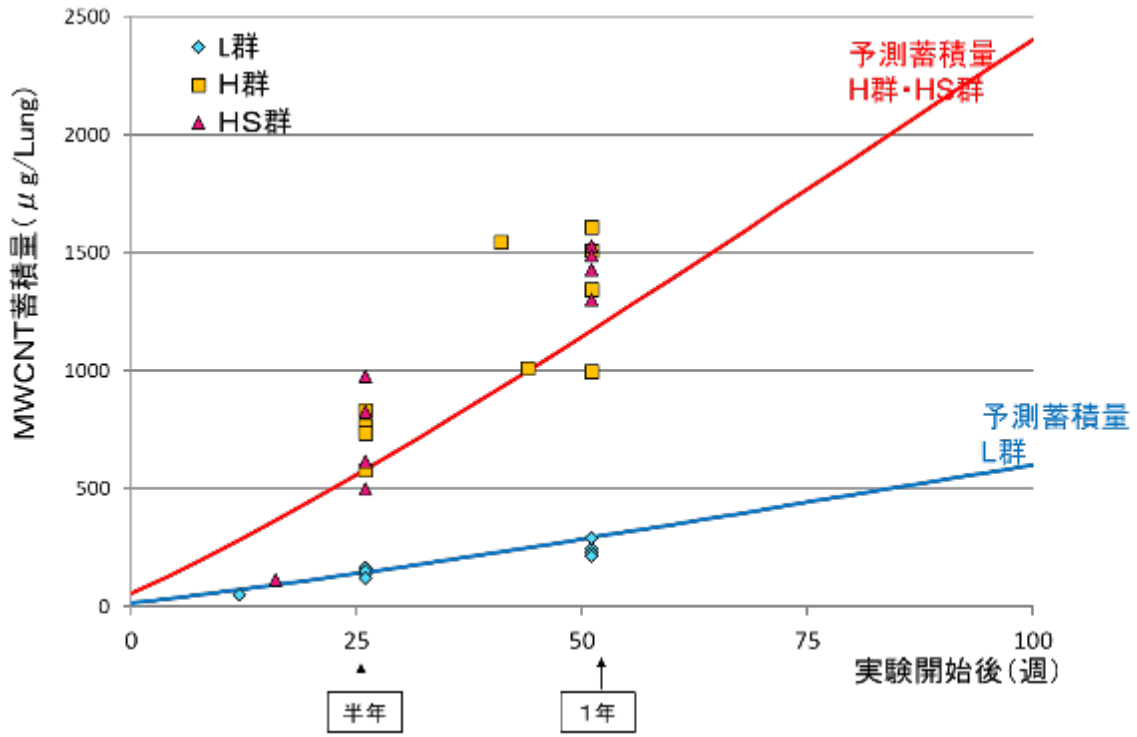


図 16. MWCNT の肺負荷量 (N=5)