

学位論文

「多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の発がん性に関する実験的研究」

指導教授名 堀口 兵剛

申請者氏名 笠井 辰也

著者の宣言

本学位論文は、著者の責任において実験を遂行し、得られた真実の結果に基づいて正確に作成したものに相違ないことをここに宣言する。

要旨

研究の背景

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は、低炭素社会の実現のための工業材料として期待されているナノマテリアルの一種である。極めて微細であるため労働環境中に浮遊しやすく、呼吸とともにヒトの体内に取り込まれる危険性が懸念されている。特に、繊維状の MWCNT は、アスベストと共通する形態的特徴から吸入ばく露による肺線維症、肺がん、中皮腫、胸膜肥厚等の健康障害が危惧されている。

目 的

繊維状 MWCNT である MWNT-7 を研究材料に選択し吸入実験を行う。MWCNT エアロゾルを一定の濃度で継続的に供給できる発生ばく露装置が上市されていないことから、まず、発生装置を開発し、その性能を確認する。次いで、ヒトでの MWCNT のばく露環境を実験的に再現した環境下で、ラットに MWCNT を段階的な期間(単回から 13 週間)吸入ばく露し、その毒性を検索する。得られたデータを基にして、最大耐量を満たした 2 年間の吸入ばく露による発がん研究を実施し、MWCNT の発がん性の有無を検索する。

実験方法

- 1) 発生装置の開発：発生装置を開発・試作し、動物実験への適用性能を確認するため、数段階の濃度で 6 時間、MWCNT エアロゾルを発生し、その分散状況及び濃度制御能を検証する。最終性能確認として、雄ラットに 5 mg/m^3 の濃度で MWCNT を 6 時間ばく露し、その毒性及び MWCNT の肺内到達(沈着)の有無により吸入実験への適応性を判断する。
- 2) 2 週間吸入ばく露による毒性試験研究：雌雄ラットに $0, 0.2, 1, 5 \text{ mg/m}^3$ の濃度の MWCNT を 6 時間/日、5 日/週、2 週間ばく露し、その毒性を検索する。半数はこの時点で解剖し、残りの半数は、4 週間の回復期間を設ける。2 週間ばく露終了時での毒性並びにその回復性と遅延性の毒性影響を明らかにする。

- 3) 13 週間吸入ばく露による毒性試験研究：2 週間吸入ばく露による毒性試験研究により、13 週間のばく露濃度は、0、0.2、1、5 mg/m³ とする。MWCNT を 6 時間/日、5 日/週、13 週間ばく露し、その毒性を検索するとともに 2 年間の発がん研究の投与濃度を決定する。
- 4) 2 年間吸入ばく露による発がん研究：13 週間吸入ばく露による毒性試験研究により発がん研究のばく露濃度は 0、0.02、0.2、2 mg/m³ とする。雌雄ラットに、6 時間/日、5 日/週、2 年間 MWCNT を全身吸入ばく露し、その発がん性を検索する。

結 果

- 1) 発生装置の開発：篩を組み込んだエアロゾル発生装置を開発した。エアロゾルの発生検討において、単分散し、繊維状の MWCNT の多いばく露環境及び安定した濃度制御能を確認した。雄ラットを用いた最終性能確認試験において、ラットの肺に MWCNT は到達し、肺胞マクロファージによりそのほとんどが貪食されること、好中球浸潤を始めとする炎症反応が惹起されることが明らかになった。この結果から、本装置は実験動物を用いる長時間にわたるばく露研究に使用できると判断した。
- 2) 2 週間吸入ばく露による毒性試験研究：雌雄ともばく露濃度に相関した肺胞マクロファージの減少、肺の重量増加及び早期の肉芽腫様変化が認められた。また、MWCNT 沈着(負荷)量とばく露濃度との間に高い相関が認められた。4 週間の回復期間を経ても MWCNT は肺に保持され、2 週間ばく露終了時に観察された肉芽腫様変化が悪化した。毒性発現には、長期間の MWCNT 肺滞留性が影響することが示唆された。2 週間吸入ばく露の毒性影響について、無毒性量(NOAEI)を 0.2 mg/m³ と決定した
- 3) 13 週間吸入ばく露による毒性試験研究：雌雄とも、ばく露濃度に相関した肺の重量増加、肉芽腫様変化、肺胞壁の線維化等が認められた。病変とばく露濃度、病変と肺の MWCNT 負荷量との間に高い相関が認められた。特に、2 週間ばく露では観察されなかった肺胞壁の線維化が観察されたことから、ばく露期間の延長による毒性が確認された。13 週間吸入ばく露の毒性影響について、NOAEI は得られなかったが最小毒性量(LOAEI)を 0.2

mg/m³ とした。発がん研究におけるばく露濃度は、最大耐量を 2 mg/m³ と考え、0.02、0.2、2 mg/m³ の 3 用量に決定した。

- 4) 2 年間吸入ばく露による発がん研究：雄は 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 2 mg/m³ 群で肺の細気管支－肺胞上皮癌の有意な増加が認められ、明らかな発がん性が証明された。しかし、中皮腫の発生は認められなかった。雌雄とも肺の MWCNT は、ばく露濃度依存的に増加し、明らかな肺負荷量(本数)－発がん反応関係が認められた。MWCNT(MWNT-7)の肺がんについては、MWCNT の(1) 5 µm 以上の十分な長さ、(2) 2 年のばく露期間、(3) 10⁹ 本以上の量が必要であったと結論した。本研究は、長期吸入ばく露試験研究において、実験動物での MWCNT の発がん性を初めて証明したものとなった。

総 括

MWCNT の中でも有害性が強いとされる繊維状の MWNT-7 を研究材料に選択し、労働者にとって主要なばく露経路である経気道投与によるエアロゾル吸入ばく露法を用いて、ヒトでの健康影響、特に難治性で重篤な疾患である「がん」を引き起こす危険性を解明すべく、ラットを用いた毒性及び発がん研究を実施した。MWCNT のばく露濃度－毒性反応関係、体内負荷量－発がん反応関係を明らかにし、発がんにおける NOAEL は、0.02 mg/m³ と決定した。MWCNT(MWNT-7)の肺発癌には、5 µm 以上の繊維長、10⁹ 本以上の大量の MWCNT、2 年間という長い時間が必要と結論した。また、発がん研究の結果を基に職業性ばく露限界値の試算を行った結果、0.15 µg /m³ と求められた。これまで MWCNT のラットを用いた長期吸入ばく露による実験的発がん研究の報告はなく、本研究の結果は、労働現場でのリスク軽減の科学的根拠を与えるものと考えられ、管理濃度や許容濃度等の設定のために新規性のある重要な情報を提供できるものとする。

今後の課題

繊維状 MWCNT の肺発癌には、5 µm 以上の繊維長、10⁹ 本以上の大量の MWCNT、2 年間という長い時間が必要と結論した。そして、本論文筆者は、MWCNT のヒト職業性ばく露

限界値が未設定であることから、本発がん研究結果を基にしてこれを試算し、その値を 0.15 $\mu\text{g} / \text{m}^3$ と考えた。今後は、この試案についての国内外の有識者からの意見等を参考にして、許容濃度や管理濃度の設定に向けて更なる考察が必要と思われる。これに加え、発がんには、マクロファージを中心とする ROS 種やサイトカインネットワークの関与も示唆された。しかし、肺がんの発生機序は未だ不明であり、詳細な発がん機序の解明も今後の重要な研究課題と思われる。

目次

第1章 序論	1
第2章 MWCNT エアロゾル発生装置の開発	
2.1. 目的	4
2.2. MWCNT エアロゾル発生装置	
2.2.1. 開発のコンセプト	4
2.2.2. 発生法及び発生装置の構成	5
2.2.3. 安全対策	6
2.3. 発生装置の性能確認	
2.3.1. 被験物質、発生濃度及び吸入チャンバーのばく露環境	6
2.3.2. 発生装置の性能確認(動物未使用)	7
2.3.3. 発生装置の最終性能確認(雄ラット使用)	9
2.3.4. ラットの飼育条件	10
2.3.5. 検査方法	10
2.3.6. 統計検定及び解析	12
2.3.7. 遵守規定及びテストガイドライン等	12
2.4. 結果	
2.4.1. 発生装置の性能確認(動物未使用)結果	12
2.4.2. 発生装置の最終性能確認(雄ラット使用)結果	14
2.4.3. 発生装置の性能判定	15
2.5. 考察	16
2.6. 小括	18
図	19
表	25
写真	19,27
第3章 雌雄ラットを用いた MWCNT 2 週間吸入ばく露による毒性試験研究	
3.1. 目的	29
3.2. 試験方法	
3.2.1. 被験物質	29
3.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件	29
3.2.3. 吸入ばく露濃度の設定	30
3.2.4. 吸入ばく露方法及び MWCNT エアロゾルの評価法	30
3.2.5. 生存率、一般状態観察、体重、摂餌量、肺重量、 気管支肺胞洗浄液検査、肉眼的及び病理組織学的検査	31

3.2.6. 肺内 MWCNT の分析	31
3.2.7. 統計検定及び解析	32
3.2.8. 遵守規定及びテストガイドライン等	33
3.3. 結果	
3.3.1. ばく露環境	33
3.3.2. 生存率、一般状態観察、体重及び摂餌量	33
3.3.3. 気管支肺胞洗浄液検査	34
3.3.4. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査	34
3.3.5. 肺内 MWCNT の分析	35
3.4. 考察	36
3.5. 小括	37
図	38
表	40
写真	44
第4章 雌雄ラットを用いた MWCNT13 週間吸入ばく露による毒性試験研究	
4.1. 目的	46
4.2. 試験方法	
4.2.1. 被験物質	46
4.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件	47
4.2.3. 吸入ばく露濃度の設定及び吸入ばく露方法と MWCNT エアロゾルの評価法	47
4.2.4. 生存率、一般状態観察、体重、摂餌量、肺重量、 気管支肺胞洗浄液検査、肉眼的及び病理組織学的検査	48
4.2.5. 肺内 MWCNT の分析	48
4.2.6. 統計検定及び解析	48
4.2.7. 遵守規定及びテストガイドライン等	49
4.3. 結果	
4.3.1. ばく露環境	49
4.3.2. 生存率、一般状態観察、体重及び摂餌量	50
4.3.3. 気管支肺胞洗浄液検査	50
4.3.4. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査	50
4.3.5. 肺内 MWCNT の分析	51
4.4. 考察	51
4.5. 小括	53
図	54
表	58

写真	61
第5章 雌雄ラットを用いた2年間吸入ばく露による発がん研究	
5.1. 目的	63
5.2. 試験方法	
5.2.1. 被験物質	63
5.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件	63
5.2.3. 吸入ばく露濃度の設定及び吸入ばく露方法と MWCNTエアロゾルの評価法	64
5.2.4. 生存率、一般状態観察、体重、摂餌量、 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査	65
5.2.5. 気管支肺胞洗浄液検査	65
5.2.6. 肺内MWCNTの分析	66
5.2.7. 胸腔、腹腔及び肺内MWCNTのSEM観察	66
5.2.8. 統計検定及び解析	66
5.2.9. 遵守規定及びテストガイドライン等	67
5.3. 結果	
5.3.1. ばく露環境	67
5.3.2. 生存率、一般状態観察、体重及び摂餌量	67
5.3.3. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査	68
5.3.4. 気管支肺胞洗浄液検査	69
5.3.5. 肺内MWCNTの分析	69
5.3.6. 胸腔、腹腔及び肺内MWCNTのSEM観察	69
5.4. 考察	70
5.5. 小括	76
図	77
表	83
写真	89
第6章 総括	
6.1. 本研究の総括	94
6.2. 労働者の発がんリスク評価の試行	97
6.3. 今後の課題	99
図	101
謝辞	102
引用文献	103

略語表	112
業績目録	114

第1章 序論

近年、革新的な新素材として多くのナノマテリアルが開発され、その広範な用途が期待されている。ナノマテリアルとは、「元素等を原材料として製造された個体状の材料であって、大きさを示す三次元のうち少なくとも一つの次元が 100 nm よりも小さい粒子(nano-objects)及び構造体(nano-structured material)(内部にナノスケールの構造を持つ物体、ナノ粒子の凝集したものを含む)である」と定義されている。なお、自然界に存在するナノ粒子や、非意図的に発生する粒子は含めず、利用を目的として、研究開発においてあるいは工業的に製造される粒子を対象とするとされている¹⁾。

産業界では、カーボンナノチューブ(carbon nanotube : CNT)やナノ酸化チタンなどの製造・利用が既に進んでいる。特に日本で開発され²⁾、2000 年代初頭から工業的に大量生産³⁾が可能となった多層カーボンナノチューブ(multi-walled carbon nanotube : MWCNT)は、21 世紀の低炭素社会の実現のための工業材料として、MWCNT 使用製品の軽量化によるエネルギー効率の大幅な改善が望めることから、エネルギーデバイス材料、エレクトロニクス材料、次世代ハイブリッドカー等の分野での使用に向けた技術開発が加速している。現在では、CNT の開発はさらに進み炭素 6 員環構造(一部が 5 ないし 7 員環)のグラフェンが単層の筒状となった単層 CNT とグラフェンが同軸管状に 2 層以上複層重なり合った MWCNT が工業生産されている⁴⁾。

しかし、この一方で、MWCNT は極めて微細で軽量であるため、労働環境気中では浮遊しやすく、しかも長時間滞留すると考えられることから、呼吸を通して取り込まれる危険性とその後の健康影響が懸念されてきた^{5,6)}。MWCNT は、その形状からおおまかにストレートタイプ(繊維状型)とタングルタイプ(毛玉状型)の 2 つに分類される。繊維状型は、比較的真っ直ぐで直径 40 ~120 nm 程度のものが多く、繊維長は様々で 25 μm を超えるものも報告されている^{3,4)}。一方、毛玉状型は、直径数 nm~15 nm の細い CNT 繊維がもつれあい、数 μm ~500 μm 程度の毛玉状のものとされる⁷⁾。繊維状型の MWCNT はアスベストと共通する細長い形状、高い機械的強度を有すること、さらに、スタントン・ポットらの提唱した生体内

で耐久性があり、細くて長い繊維状物質は化学組成や結晶構造に関係なく発がん性を持つとの仮説^{8,9,10)}を根拠として、繊維状型 MWCNT の有害性を最優先に確認すべきと考えられるようになった。このような中、繊維状型 MWCNT のマウス腹腔投与¹¹⁾やラット陰嚢腔投与¹²⁾によって腹膜中皮腫の発生が相次いで報告された。これらの論文では、発がん MWCNT の形状や大きさとの関連を大きく取り上げ、これまで以上に吸入ばく露による発がん試験の実施が急務と考えられるようになった。

厚生労働省では、2008 年に毒性や発がん研究の専門家による「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会(ナノマテリアルについて)」を開催した。検討会では、労働現場での主要なばく露経路として考えられる吸入による呼吸器等への長期的な影響については、解明されていないため、国際的な連携も図りつつ、小型の実験動物を用いた長期吸入試験等の実施により有害性の情報を収集していく必要がある(2008 年 11 月 26 日)と結論した¹⁾。

現在のところ、MWCNT にばく露された労働者の疫学的研究及び臨床医学的研究は発表されておらず、MWCNT の労働者への健康影響は全く未知である。そして、MWCNT のヒトへの健康影響を基礎的に解明すべく、実験動物を用いた *in vivo* での毒性学的研究並びに微生物や哺乳類細胞を用いた *in vitro* での遺伝毒性や細胞毒性に関する研究が急速かつ広範に展開されつつある。吸入ばく露による発がん研究については、腫瘍イニシエータの methylcholanthrene を前投与したマウスに 5 mg/m³ の濃度の MWCNT(MWNT-7 保土谷化学)を 15 日間繰り返し吸入ばく露し、そのまま 17 ヶ月間飼育した結果、肺腫瘍(気管支-肺胞上皮腺腫)が発生したとの報告が米国労働安全衛生研究所/National Institute of Occupational Safety and Health (NIOSH)から発表されているのみである¹³⁾。

このように、吸入ばく露による発がん研究は切望されていたが、しかし、一方で解決しなければならぬ幾つかの課題により、吸入ばく露研究が進展していない状況にあった。大きな理由として費用、実験設備の他に、MWCNT の有する性質によるところが大きい。MWCNT はその特異な電氣的性質のため、凝集性が強く、吸入チャンバー(ラット、マウスを収容する箱)内の、ラット、マウスの肺に到達可能な MWCNT エアロゾル(空気中に一本一本、単独で

浮遊している状態が理想である)を作製するのに高い技術を必要とすること、そして、その環境を、長時間・長期間(OECD テストガイドラインに規定されるばく露時間は1日6時間、ばく露期間は2年間)維持することは不可能と考えられていたためである。

筆者らは、繊維状の MWNT-7 を研究材料として選択し、理想的な MWCNT エアロゾル環境を高い精度で再現できる発生装置の開発に取り組み、この難問を克服した。本論文では、発がん研究の実施を最終目標として、国際的な実験基準(OECD GLP)¹⁴⁾に従い、以下の計画に沿って研究を遂行した。①吸入ばく露実験用発生装置の開発並びに同装置の性能検証。動物実験への適用化については、MWCNT をラットに6時間(単回)ばく露し、肺胞への MWCNT の到達及び毒性学的検索結果により判断する。②本発生装置を用いてラット発がん研究の予備研究として位置づけられる2及び13週間吸入ばく露を順次実施し、その毒性影響について明らかにする。これらの結果を基にラットを用いた発がん研究のためのばく露濃度を決定する。③ラットを用いた2年間吸入ばく露による発がん研究を行う。発がん性の用量－発がん反応関係並びに肺沈着(肺負荷量)－発がん反応関係を明らかにする。

第2章 MWCNT エアロゾル発生装置の開発

2.1. 目的

MWCNT の吸入ばく露実験には、ラット及びマウスの肺に到達可能な MWCNT エアロゾル(空気中に一本一本、単独で浮遊している状態)の作製に高い技術を必要とすること、及びこの環境を長期間維持するのが困難であることにより、現在までラットを用いた吸入ばく露による発がん研究の報告はない。そのため、我々は2年間全身吸入ばく露による発がん研究を目的として MWCNT エアロゾル発生装置の開発・研究を推し進めた。

発生装置を試作し、目標濃度を 0.2、1 及び 5 mg/m³ に設定し各種検討を行い、性能を確認した。最終性能確認としてラットに 5 mg/m³ の濃度で MWCNT を 6 時間(単回)ばく露し、その後、最長 28 日間の観察期間を設けた実験を実施した。本装置の動物実験への適用性については、MWCNT の肺胞への到達及び毒性学的検索結果により判断した。

本章では、装置の開発コンセプト、動物を使用せず実施した性能確認及びラットを用いて行った最終性能確認を述べる。

2.2. MWCNT エアロゾル発生装置

2.2.1. 開発のコンセプト(図 2-1、写真 2-1)

既存の発生装置を使い、MWCNT のエアロゾル化を試みたが、綿埃様に凝集した粉じんを得るばかりで、吸入ばく露に適用できるレベルにはなかった。MWCNT 試料(試料)を走査電子顕微鏡(Scanning electron microscope: SEM、(株)日立ハイテクノロジーズ SU8000 形)を用いて観察を行った結果(写真 2-2)、ほとんどの MWCNT は、雲塊状に絡まりあい 100 µm 程度の大きさで存在することが確認された。実験動物の肺に到達可能な MWCNT エアロゾルを作製するためには、試料中に多くみられる凝集塊を取り除き、凝集していない MWCNT を供給できる発生装置が必要であると考えた。そこで、サイクロン構造を持つエアロゾル発生部内に試料を供給し、これに高速旋回気流を衝突させることで試料をエアロゾル化し、発生する遠心力を利用して吸入ばく露には不要な粒子の分粒を行い、最終的に篩(シーブ)で粒子径

の大きさを規定する方法(サイクロンシーブ法)による MWCNT エアロゾル発生装置を考案した。

2.2.2. 発生法及び発生装置の構成

本装置は、試料をエアロゾル化する発生部と吸入チャンバー内のエアロゾル濃度を一定に維持する濃度制御部の二つのユニットから構成される。透明アクリル板で発生装置全体を覆い、清浄空気を(図 2-1、実線内)導入し、発生装置を陽圧に維持した。この部分には、試料供給装置(ダストフィーダー：フンケンビットフィーダーF03 型、(株)粉研パウテックス)、空気及び試料の除電を行う装置であるイオナイザー((株)キーエンス)を設置した。実際にエアロゾルの発生を行う本体部分は、この中のさらに小さな箱(図 2-1、破線内)に収容し、外部へのリークを防ぐため僅かに陰圧に保持した。以下に試料供給から吸入チャンバー内エアロゾル濃度の制御に至る一連のエアロゾル発生工程を記載する。

(1) MWCNT エアロゾル発生部

試料は、ダストフィーダーから、サイクロン機能を有す円筒円錐型発生容器(写真 2-1)に供給される。容器内では、中心に対し側面から斜め方向に切られたスリット(10W×1H mm)から清浄空気が流入し、常時、高速旋回上昇気流が発生している。供給された試料はこの旋回気流により、エアロゾル化、分散される。微細な試料は上昇気流に乗り、容器上部に設置した篩(直径 200 mm、目開き径 53 μ m)に到達し、篩の目開き径以下の MWCNT が吸入チャンバーに運搬される。一方、質量のあるものは、回転しながら外延部へ移動し大きな凝集塊となり、重力沈降により底部(細い方の出口)から粗粉として排出される。この他、重力沈降の効果を高めるため容器の下方へ空気を吸引したこと、6 基のパルス性振動装置で篩の枠に振動を与え、目詰まり防止を図ったことも本装置の特徴である。

(2) 濃度制御部

濃度制御部の中枢には、MWCNT エアロゾル濃度測定装置として、光散乱式粒子測定装置(OPC、OPC-AP-600、柴田科学(株)、測定対象粒径：0.3 μ m 以上)を使用して、リアルタイムで空気中に含まれる MWCNT 数を計測し、1 分間あたりの個数濃度 (Counts per Minute:

CPM) 値を表示した。この他、OPC は、上下限信号により、接続した機器の運転を制御する機能を備えており、この機能を利用して、吸入チャンバー内のエアロゾル濃度を一定に維持するフィードバックシステムを構築した。エアロゾル濃度が下限値を下回った時点でダストフィーダーを運転し、上限値に達した時にダストフィーダーの運転を停止するという単純なシステムであるが、ダストフィーダーの運転条件(ギア比、回転速度)、空気量、スリット径及び角度等を最適化したことで、高精度でエアロゾル濃度を制御することが可能となった。

2.2.3. 安全対策

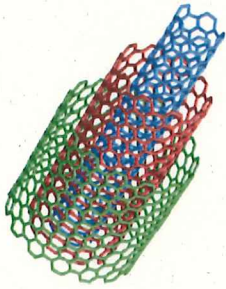
MWCNT エアロゾル発生装置を操作する作業者の安全対策を施した。上記 2.2.2.項「発生法及び発生装置の構成」でも記述したように、発生装置全体は陽圧で、MWCNT エアロゾルの発生部を陰圧に保持した(図 2-1、破線内)。発生装置内に差圧を設けることで、試料の外部飛散を防ぎ作業者へのばく露防止を実現した。なお、ブロワで供給する空気は、粒径 $0.15\ \mu\text{m}$ の粒子に対して 99.9995 %以上の粒子捕獲率を持つ ULPA フィルター((株)日本無機)により、空気を処理した。本装置及び吸入チャンバーから排出される空気についても全て ULPA フィルター処理を行い、最終的に大気中に放出した。この他、作業者へのばく露防止のため試料充填用容器を製作した。充填用容器は、上側に透明な蓋、下側にスライド式の底板を持つ開閉可能な密閉構造とし、ダストフィーダーと隙間なく接続できるように製作した。作業者は、この充填用容器をダストフィーダーに設置後、仕切り板をスライドして MWCNT を補充する。このように作業者は、容器に充填する時以外に試料と接触することがないよう対策を取った。

2.3. 発生装置の性能確認

2.3.1. 被験物質、発生濃度及び吸入チャンバーのばく露環境

(1) 被験物質

被験物質は、繊維状型の MWCNT である保土谷化学工業(株)の MWNT-7 を選択した(図)。カーボンのみの多層構造を形成し、分子式は C、CAS 登録番号は、308068-56-6 (カーボンナノチューブとして)である。製造元メーカーからは、物理化学的性状等について、かさ比重：



0.005-0.01 g/cm³、比表面積：25-30 m²/g の黒色、固体粉末状物質として公表されている¹⁵⁾。

不純物については、我々のグループで原子吸光分析法によって定量分析した結果、鉄 4400 ppm、コバルト 48 ppm、ニッケルを 17 ppm 含有すると報告している¹⁶⁾が、MWCNT 製造の最終工程で 2500 °C に昇温されることから、これらの不純物は MWCNT の最外層には付着していないと考えられている^{3, 17, 18)}。従って、これらの金属による肺への有意な有害影響はないものと推断される。また、MWCNT 試料 (MWNT-7, Lot No. 080126) は、Takaya らの方法に従い¹⁶⁾、SEM を用い、繊維長 1200 本及び繊維径 500 本計測した。繊維長の平均値は、5.7 μm、中央値は 4.8 μm、範囲は 0.9~33.4 μm で、繊維径の平均値は 90.7 nm、中央値は 88.8 nm、範囲は 36.2~154.6 nm であり、アスペクト比（繊維長と繊維径の比）は、約 63 : 1 であった(図 2-2 左 試料)。

(2) 発生濃度及び吸入チャンバー

発生濃度は、人工グラファイトの職業性ばく露限界値の 5 mg/m³¹⁹⁾、及び MWCNT を取り扱う実際の労働現場で報告されている濃度の 1 及び 0.2 mg/m³ を設定した^{6, 20, 21)}。

労働者への MWCNT の侵入経路としては、呼吸を通してのばく露が主と考えられ一部皮膚を通した経路も想定される。労働環境でのばく露状況を再現するために、MWCNT のばく露は乾式で行い、使用する吸入チャンバーは全身ばく露型が最適と考えた。今回、性能確認に使用する吸入チャンバーは、発がん研究の予備研究として、日本バイオアッセイ研究センターで使用している気積 1.24 m³ の全身ばく露型吸入チャンバーを選択した。発生時間は 6 時間(単回)、吸入チャンバー環境条件は、温度 22 ± 3 °C、湿度 50 ± 20 %、圧力 100 ± 10 Pa 及び換気流量 248 ± 5 L/min(1 時間当たり 12 回換気に相当)に設定した。

2.3.2. 発生装置の性能確認(動物未使用)

(1) 篩検討実験及び発生装置の改良

MWCNT エアロゾルを 6 時間発生させるための前段階として、本装置に直径 70 mm で、それぞれ目開き径の異なる三種類の篩(篩 A 目開き径 153 μm、篩 B 53 μm、篩 C 32 μm)を

使用して、到達最高濃度の確認及び SEM による吸入チャンバー内 MWCNT の形態観察を行った。サンプリングポイントは、ラットの呼吸域を代表する空間として吸入チャンバー中央の 1 箇所を選択し、直径 55 mm のテフロンバインダーフィルター(T60A20、東京ダイレック(株))に吸入チャンバー内 MWCNT エアロゾルを捕集して質量濃度を求めた。また、捕集した MWCNT の一部を SEM で観察した。その結果、篩 A の到達最高濃度は 7.2 mg/m^3 、篩 B では 1.5 mg/m^3 、篩 C では 0.36 mg/m^3 であった。形態観察では、篩 A を通過した MWCNT は、凝集塊がほとんどで繊維状型はごくわずかであったことから、吸入実験に適用できる水準ではないと判断した。篩 B を通過した MWCNT は、まれに凝集塊が含まれるものの単分散した繊維状が多く、吸入実験に適用できる水準であると判断した。篩 C を通過した MWCNT は、単分散した繊維状のみからなり、この段階では最も吸入実験に相応しいと思われた。

以上の結果から、 5 mg/m^3 の濃度を達成目標とし、篩 B 及び C の実験実用化を目指して装置の改良を行った。最初の改良は、篩を通過する絶対量を増やすために篩の直径を現行の 70 mm から 200 mm に見直したことである。結果、篩 C では 5 mg/m^3 の濃度は作製できなかったが、篩 B ではそれを達成した。しかし、直径 70 mm の篩での実験に比べ多くの凝集塊が観察されたため、これを沈降させる対策をとることにした。MWCNT 試料への空気の衝突速度を上げるためスリット高を 3 mm から 1 mm に変更したこと、遠心力をより得るためにスリット角度を変更して辺縁部の回転速度を上げたこと、さらに、粗粉を積極的に取り除くため下流方向に 5 mL/min で空気を吸引したことにより、凝集塊のほとんどないエアロゾルを得ることに成功した。性能確認は直径 200 mm、目開き径 $153 \mu\text{m}$ の篩 B を使用して行った。

(2) MWCNT エアロゾル濃度及び濃度制御の安定性確認

MWCNT エアロゾル濃度は、6 時間のエアロゾル発生中に発生開始 30 分後から 1 時間毎に計 6 回、フィルターを用いた質量法により測定した。濃度制御の安定性については、OPC を使用して、CPM 値を発生開始から終了後 30 分まで記録して確認した。

(3) MWCNT エアロゾルの粒度分布

OECD では、吸入研究における粒度分布の確認として、質量を基準とした空気動力学的質量中位径(mass median aerodynamic diameters : MMAD)を求める方法を推奨している。今回は力

スケードインパクトMOUDI (Micro-orifice uniform deposit cascade impactor、MOUDI-II、125-R、MSP 社)を使用して測定した。MOUDI は 13 段(50 %カットオフ径として上段から 10、5.6、3.2、1.8、1.0、0.56、0.32、0.18、0.10、0.056、0.032、0.018 及び 0.010 μm)のインパクタステージを持ち、小孔を通過し慣性衝突する MWCNT を各インパクタステージ上のアルミ箔に捕集する装置である。捕集流量は全て 10 L/min、捕集時間は、0.2 mg/m^3 では 360 min、1 mg/m^3 では 120 min、5 mg/m^3 では 30 min とし、捕集重量を測定した。50 %カットオフ径を各ステージの代表径として、総量に対する各インパクタステージの捕集率(%)を求め、累積頻度分布図を作成し MMAD 及び幾何標準偏差(geometric standard deviations : GSD)を算出した。

この他、走査型モビリティパーティクルサイザー(SMPS、Model Series 3938、TSI Inc.)を使用して、吸入チャンバー内の MWCNT を連続測定した。SMPS は、15~615 nm の範囲でサイズ毎に分級した粒子を光散乱式粒子カウンターに導入し個数を計測する装置で、1 回の測定を約 3 分間で完了する。サイズ毎の粒子径(nm)についての個数濃度(個数/ cm^3)をプロットし、個数粒度分布図を作成した。

(4) MWCNT エアロゾルの形態観察

吸入チャンバー内の MWCNT を、金コーティングしたポリカーボネートフィルター(径 47 mm、孔 0.8 μm 、Whatman(株))に捕集した後、白金(Pt)コーティングを施し SEM を用いて観察した。捕集流量は全て 5 L/min、捕集時間は 0.2 mg/m^3 では 50 min、1 mg/m^3 では 10 min、5 mg/m^3 では 2 min とした。

2.3.3. 発生装置の最終性能確認(雄ラット使用)

発生濃度は、5 mg/m^3 を設定した。17 匹の雄ラット(下述)に 5 mg/m^3 の濃度の MWCNT を 6 時間(単回)全身吸入ばく露し、上記 2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)」で記述した方法で、吸入チャンバー内の濃度測定及び濃度制御、MOUDI による MWCNT エアロゾルの粒度分布、SEM による形態観察を行い、繊維長及び繊維径を計測した。繊維長は 600 本、繊維径は 300 本計測して分布を求めた(図 2-2 中央 吸入チャンバー内)。ばく露終了後

2 時間(2 匹)、翌日(5 匹)、7 日(5 匹)、28 日(5 匹)にラットを解剖し、気管支肺胞洗浄液(bronchoalveolar lavage fluid: BALF)を用いた細胞学的及び生化学的検査、光学顕微鏡を用いた病理組織学的検査、SEM を使用した肺内 MWCNT の観察を実施した(図 2-2 右 ばく露肺内)。なお、対照群はばく露群と同じ条件で、発生装置を運転し空気のみを供給した。

2.3.4. ラットの飼育条件

4 週齢の F344/DuCrj ラット(SPF)の雄 40 匹を日本チャールス・リバー(株)(厚木)より購入し、検疫及び馴化を各 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めない動物を用い、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)²²⁾によって 2 群(対照及びばく露群、各 17 匹)に分け、6 週齢で全身吸入ばく露を行った。動物は、ステンレス製の吊り下げ型網ケージ(150W×216D×176H mm)に個別に収容し、温度 23 ± 2 °C、相対湿度 50 ± 20 %、換気回数 12 回/時間及び 12 時間点灯(8:00-20:00)/12 時間消灯(20:00-8:00)の明暗サイクルに維持管理されたクリーンルームに設置した吸入チャンバー内(気積 1.24 m³)で、6 時間(単回)ばく露を行い、最終解剖まで最長 28 日間飼育した。

動物は CRF-1 固形飼料(30 KGy-γ線滅菌飼料、オリエンタル酵母工業(株))を自由摂取させ、解剖日前日の夕方からは絶食させた。また、飲水は、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

2.3.5. 検査方法

(1) 動物管理

動物は毎日 1 回、生死状況を確認し、一般状態の詳細な観察を週に 1 回実施した。体重と摂餌量も週に 1 回測定した。

(2) 麻酔法及び気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)

解剖直前にペントバルビタール(腹腔内投与)麻酔下で安楽死させ、ただちに、左気管支を結紮し、右肺を 4 mL の生理食塩水で 2 回洗浄した。回収した BALF を使用して、細胞学的検

査(総細胞数、細胞分類(マクロファージ、リンパ球、好中球))、生化学的検査(総蛋白、アルブミン、LDH、ALP)を実施した。細胞学的検査では、BALF 中の総細胞数を自動血液検査装置(ADVIA120、Siemens Healthcare Diagnostics(株))で測定し、その後、700 rpm(55×g)で5分遠心分離(Cytospin4、Thermo Fisher Scientific(株))し、得られた細胞をメイグリュンワルドギムザ(May-Grünwald-Giemsa)で染色した。好中球数、リンパ球数、肺胞マクロファージ数は、光学顕微鏡下で合計 700 個以上計測して細胞比を求め、ADVIA120 で計測した総細胞数(1 μ L 中)及び細胞比率(各々1 μ L 中)により個数を算出した。生化学的検査では、BALF を 4 $^{\circ}$ C、1960 rpm (800×g) で 10 分間遠心分離し、自動分析装置(Hitachi 7080、(株)日立製作所)を用いて、上清液中の総蛋白(TP)、アルブミン(ALB)、乳酸脱水素酵素(LDH)、アルカリフォスファターゼ(ALP)活性を測定した。

(3) 肺重量測定、肉眼的及び病理組織学的検査

全動物について解剖時に肉眼的観察を行った。左肺の湿重量(実重量)を測定し、湿重量の搬出時体重に対する百分率(相対重量:体重比)を算出した。全動物の鼻腔、咽頭、喉頭を含むすべての気道及び肺組織を病理組織学的に検査した。光学顕微鏡観察のために、組織は 10 %中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、パラフィン包埋した。組織は 5 μ m の厚さに薄切し、ヘマトキシリン・エオジン(H&E)染色し、全動物について病理組織学的検査を実施した。また、MWCNT を高感度に検出するために、鼻腔、肺、気管支関連リンパ組織は、ケルンエヒトロート(Merck, Darmstadt, Germany)で 1 分間染色後、蒸留水で 5 分間洗浄し染色した。

(4) 肺内 MWCNT の SEM 観察

ばく露終了 2 時間後に解剖した動物の肺の一部(0.06~0.1 g)を、血液、タンパク質及び脂肪除去洗浄剤のクリーン 99(C-99、pH 値:11.8、(株)クリーンケミカル)溶液に入れ、一晚浸漬して肺を溶解した²³⁾。これを遠心処理し、残渣に硫酸を加え生体成分を完全に溶解した。溶解液を 0.2 μ m の小孔のメンブランフィルターでろ過し、フィルター上に MWCNT を回収した。観察時に繊維長は 300 本、繊維径は 200 本計測して分布を求めた。

2.3.6. 統計検定及び解析

体重、摂餌量及び肺重量のデータは、Bartlett 法により等分散の予備検定を行い、等分散の場合には一元配置分散分析を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。また、分散の等しくない場合には、各群を通して測定値を順位化して Kruskal-Wallis の順位検定を行い、群間に有意差が認められた場合には Dunnett 型の多重比較検定を行った。

BALF の細胞学的検査は Student's t-test を行い、生化学的検査は Dunnett の多重比較により平均値の検定を行った。

病理組織学所見は χ^2 検定により解析した。各検定は、5 %の有意水準で両側検定を行い、検定結果は 5 及び 1 %で有意水準の表示を行った。

2.3.7. 遵守規定及びテストガイドライン等

本研究は、OECD GLP¹⁴⁾及び吸入ばく露試験を規定する OECD 化学品テストガイドライン 412「亜急性吸入毒性試験：28 日試験」及び「ガイダンスドキュメント Number.39)」に準じて行い^{24,25)}、日本バイオアッセイ研究センターの動物実験委員会の承認を受けて実施した。また、動物は、平成 18 年 4 月 28 日付け環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」、平成 18 年 6 月 1 日付け厚生労働省大臣官房厚生科学課長通知「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」及び、平成 24 年 4 月 25 日付け中央労働災害防止協会規程第 17 号「日本バイオアッセイ研究センターにおける動物実験等に関する規程」を遵守し取り扱った(試験番号：4503)。

2.4. 結果

2.4.1. 発生装置の性能確認（動物未使用）結果

試作した乾式でのサイクロンシープ方式による発生装置を用いて、0.2、1 及び 5 mg/m³の目標濃度で 6 時間の MWCNT の発生を行った。6 時間の発生時間中に、篩の目詰まりや発生装置及び OPC 等の機器類に不具合はなく、フィードバックコントロールによる安定した

MWCNT エアロゾルの発生が確認できた。以下に結果を述べる。

(1) 濃度測定及び濃度制御の安定性確認(質量法、OPC によるリアルタイム計測)

0.2、1 及び 5 mg/m³ の設定濃度で、6 回行った濃度測定結果の平均値と標準偏差は、それぞれ 0.2 ± 0.01 、 1.00 ± 0.03 、 5.07 ± 0.10 mg/m³ であった(表 2-1)。設定濃度どおりの濃度で安定した MWCNT の発生が確認された。

OPC で測定した MWCNT エアロゾルの個数濃度-時間推移グラフ(図 2-3)を示した。定常状態に達して(発生 10 分後)からの OPC によるフィードバックコントロール下での CPM 値の平均値と標準偏差を示す。0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度でそれぞれ 11.5 ± 0.5 、 55.1 ± 1.9 、 289.0 ± 8.6 、($\times 10^3$ CPM)であり、それぞれの濃度間で公比に近い個数濃度が認められた。変動係数の最大値は 4.3 % となり、それぞれの濃度で安定した制御が確認された。これらの結果から本装置は、0.2、1 及び 5 mg/m³ の設定濃度下において、設定値どおりの濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間発生できること、また、フィードバックシステムによる変動の少ない濃度制御であったことが確認された。さらに、吸入チャンバー内 MWCNT エアロゾル濃度が設定値の 90 % に到達するまでに要する時間は、一次微分方程式で理論的に予測される時間よりも速く、速やかな濃度管理が可能であることが確認できた。また、CPM 値(個数濃度)と質量濃度(mg/m³)の間には良好な相関関係があることが明らかとなった。質量濃度/個数濃度値により K 値(個数-質量変換係数)を求めることで、OPC により測定される個数濃度データにこの K 値を乗じリアルタイムで質量変換濃度(mg/m³)として、ばく露濃度の管理が行えることが示された。

(2) 粒度分布(MOUDI 及び SMPS による測定)

MOUDI の測定結果から作成した質量粒度分布図を図 2-4A に示す。粒径は発生濃度によらず同じ分布を示した。累積頻度分布図から求めた MMAD(GSD)は、0.2 mg/m³ では 1.33 μ m(2.7)、1 mg/m³ では 1.04 μ m(3.2)、5 mg/m³ では 1.21 μ m(3.4)であった。また、0.2、1 及び 5 mg/m³ の発生濃度において、3 μ m 以下の吸入性粒子の占める割合は、累積頻度分布図からそれぞれ 80~82 % と求められ、発生した MWCNT の多くが肺に到達すると考えられた(表 2-1)。

SMPS を使用した個数粒度分布図(図 2-4B)からも、発生濃度によらず、全ての設定濃度で MWCNT 粒子は一樣な分布を示し、400 nm 付近にピークモードが認められた。また、15 nm 付近に全ての発生濃度に共通した小さなピークも認められた。SMPS による個数濃度値(個数/cm³)は、0.2、1 及び 5 mg/m³ の設定濃度に対して約 25.9、123、657.7 であり、各濃度間の比は約 5 倍で、設定濃度との良好な相関性が認められた。

(3) MWCNT エアロゾルの形態観察

ポリカーボネートフィルターに捕集した MWCNT の SEM 観察では、MWCNT はすべての濃度においてほとんどが繊維状で、凝集はせず単体で認められた。また、試料と吸入チャンバーでの MWCNT に形状的な変化はないことから、発生装置による MWCNT の破壊、破損はないと判断した。

2.4.2. 発生装置の最終性能確認 (雄ラット使用)結果

(1) 吸入チャンバー内 MWCNT エアロゾルの濃度、粒度分布及び MWCNT の形態観察

質量濃度の測定結果を表 2-2 に示す。フィルターによる濃度測定結果の平均値と標準偏差は、 4.99 ± 0.28 mg/m³ であった。K 値を用い表示した 6 時間ばく露中の質量濃度-時間推移グラフを図 2-5 に示した。定常状態に達して(発生 30 分後)からの変換質量濃度の平均値と標準偏差は、 4.99 ± 0.12 mg/m³、変動係数は 2.4 % であり、フィルターで計測した結果と変わらず(表 2-2)、安定した濃度制御が確認できた。

MOUDI の測定結果から求めた MMAD(GSD)は、1.44 μ m(2.3)となり、3 μ m 以下の吸入性粒子の占める割合は、81 %と求められた(表 2-2)。

ばく露中の MWCNT を捕集観察した SEM 像では、分散良好で凝集していない単独の MWCNT が多く観察された(図 2-5)。繊維長の平均値は、5.7 μ m、中央値は 4.8 μ m、範囲は 0.7~22.9 μ m で 5 μ m 以上は 47.7 %を占めた。繊維径の平均値は 130.5 nm、中央値は 91.8 nm、範囲は 30.2~1389.9 nm で 100 nm 未満は 63.7 %と求められた(図 2-2 中央)。繊維長は、ばく露に供した試料と平均値、中央値とも一致した。繊維径は平均で若干大きくなったものの、中央値には差がなく、発生装置を介しても MWCNT の形状に変化はなかった。

(2) 一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査結果

6 時間のばく露中、ラットに異常所見は観察されなかった。また、ばく露終了から最長で 28 日後の観察でも異常は認められなかった。体重及び摂餌量についても特記すべき変化は認められず、対照群との間に統計学的な有意差はみられなかった。

BALF 検査の結果(図 2-6)、好中球がばく露終了 2 時間後からばく露後 7 日まで、対照群のそれぞれと比較して有意に高かった。また、総蛋白、アルブミン、LDH 及び ALP は、ばく露後 28 日まで対照群より有意に増加した。BALF 中には、MWCNT を貪食した肺胞マクロファージが認められた。

解剖時の肉眼的観察では、特記すべき変化は観察されず、肺重量測定でも変化は認められなかったが、肺胞中の MWCNT は、そのほとんどが肺胞マクロファージに貪食された状態で観察された(写真 2-3A)。また、一部非貪食の MWCNT も観察された。後述の SEM 観察でも MWCNT の肺到達が確認された。また、軽度ではあるものの MWCNT を貪食した肺胞マクロファージの集簇を特徴とする肉芽腫様変化が、ばく露後 28 日に認められた(表 2-3、写真 2-3B)。

(3) 肺内 MWCNT の SEM 観察

ばく露終了 2 時間後にラットの肺を溶解し採取した MWCNT を SEM で観察した結果、その繊維長の平均値は、8.1 μm 、中央値は 6.8 μm 、範囲は 0.7~36.5 μm で 5 μm 以上は 66.7 %、繊維径の平均値は 100.3 nm、中央値は 88.1 nm、範囲は 42.4~505.1 nm で 100 nm 未満は 68.8 %と求められた(図 2-2 右 ばく露肺内)。繊維長は、ばく露に用いた試料及び吸入チャンバーから採取した MWCNT よりも平均及び中央値ともやや長いという結果であった。繊維径は、元試料及び吸入チャンバー採取分とほぼ一致した(図 2-2)。

2.4.3. 発生装置の性能判定

BALF 検査、病理組織学的検査、肺を溶解して行った SEM 観察によって、MWCNT は肺胞にまで到達したことが明らかになり、本発生装置はラットを用いた MWCNT の吸入ばく露

研究に使用できると判断した。

2.5. 考察

MWCNT の吸入ばく露実験を行うために、MWCNT エアロゾル発生装置の開発に取り組み、サイクロンシープ方式による乾式での発生装置を作製した。本発生装置で発生させた MWCNT エアロゾルは、0.2 から 5 mg/m³ の濃度において、エアロゾルの粒子径に差がなく分布も一様であり、また、6 時間にわたる安定した濃度の維持が確認された。発生初期における MWCNT 試料の多量供給によって、理論値より速く定常状態の MWCNT エアロゾル濃度に到達することも明らかになり、フィードバックシステムの濃度維持以外での有用性も示された。

全身吸入ばく露研究では、職場のばく露環境を実験的に再現することが重要な課題である。実際に MWCNT を製造・加工する事業場における作業環境中の気中濃度と粒子特性について報告した論文は幾つかあり、鷹屋ら⁶⁾は、MWCNT 製造工場から採気された MWCNT エアロゾルの質量濃度は、全粉じんとして 2.39 mg/m³ で、1~3 μm の吸入性粉じんは、0.39 mg/m³ であったと報告している。また、Han ら²⁰⁾は、毛玉状の MWCNT を製造している韓国の研究施設で作業環境測定を行い、MWCNT エアロゾル濃度は全粉じんとして 0.21~0.43 mg/m³ であり、製造装置付近の気中で採取された粒子は、凝集した繊維からなる直径 100~300 μm の塊状であったと報告した。Lee ら²⁶⁾は、MWCNT 製造に従事している労働者の呼吸部位での濃度が 0.106 mg/m³ であったこと、MWCNT 製造装置を開口した時に凝集塊が観察されたことを報告している。本装置で発生させた MWCNT エアロゾルは、分離した単独の繊維状型の MWCNT が多く、吸入チャンバー内ではこれらはよく分散し、再凝集していないことが観察された。

発生装置で発生した MWCNT は、その粒径や粒度分布において、吸入ばく露試験研究に敵愾なレベルにあるかということも発生濃度と同様に重要な課題である。Ma-Hock ら²⁷⁾と McKinney ら²⁸⁾は、我々とは異なる発生原理に基づいて MWCNT の乾式ばく露装置を開発している。Ma-Hock ら²⁷⁾は、回転ブラシとサイクロンを組み合わせた装置を開発し、既に

0.1、0.5 及び 2.5 mg/m³ の濃度で毛玉状の MWCNT をラットに 1 日 6 時間で 13 週間の吸入ばく露試験研究を行い、毒性を報告している。一方、McKinney ら²⁸⁾は、箱共鳴法に基づいた音波振動による MWCNT エアロゾル化法を開発し、マウス用の全身吸入ばく露チャンバーに 11 mg/m³ の濃度の繊維状型の MWCNT エアロゾルを 6 時間発生させた。Ma-Hock ら²⁷⁾ 及び McKinney ら²⁸⁾は、MWCNT エアロゾルの MMAD(GSD)について、前者は 0.7~2.0 µm(2.1~3.6)、後者は 1.5 µm(1.7)と報告した。我々の装置で発生した MWCNT エアロゾルは、ばく露濃度や動物の有無によらず MMAD は、1.04~1.33 µm、GSD は、2.7~3.4 であった。上記の McKinney らの使用した MWCNT と我々の使用した MWCNT は、同じメーカーによって生産されたロット違いの同製品(MWNT-7)であることから、MWCNT エアロゾルの分散状態について、我々の実験結果と彼らの結果を直接比較することが可能である。我々の MMAD は、McKinney らの結果より若干小さく、分散の程度を示す GSD はやや大きい。総合的に判断して、両者はほぼ同じと考えられることから、我々の技術は、国際的な評価に耐えられる水準にあると思われた。また、SEM 観察で、ばく露に用いた試料と吸入チャンバーから得られた MWCNT の繊維長及び繊維径が一致したことから、試料そのものに発生装置を介した影響はなく、形状に変化はないことも確認できた。

吸入チャンバーで測定された 3 µm 以下の吸入性 MWCNT エアロゾルの占める割合は、全体の 80 %程度と求められ、発生した MWCNT の多くが肺胞に到達すると考えられた。実際に、肺胞に MWCNT は到達し、その多くが肺胞マクロファージに貪食されていることが明らかとなった。本研究と同様に 5 mg/m³ の濃度で 6 時間(単回)の MWCNT のばく露を行った Ohnishi ら²⁹⁾の定量的な MWCNT の分析結果からは、ばく露翌日の肺沈着(負荷)量は、ばく露直後と比較して半減することが明らかとなった。ラットでは気管から気管支部分に沈着した MWCNT は、繊毛-粘液運動により 1.9 mm/min の速さで上方に運搬されると報告³⁰⁾されており、ばく露翌日には、この部分に沈着した MWCNT は、ほぼ完全にクリアランスされるものと考えられる。さらに、Ohnishi ら²⁹⁾は、その後の MWCNT のクリアランスは緩やかとなり、ばく露後 28 日の肺負荷率は、ばく露翌日を基準とした時の 80%程度であると報告した。本研究でも MWCNT は気管支から肺胞にいたる肺の様々な場所に沈着するものと考え

えられるが、ばく露後 28 日経過でも、肺胞に多くの MWCNT が観察されている。MWCNT は肺胞マクロファージに貪食されても消化されることなく、長期間肺に滞留することが示された。単回ばく露により観察された肺の持続的炎症や肉芽腫様変化は、この滞留性と深く関係すると考えられた。

MWCNT の毒性を明らかにするためには、その定量的な用量－反応関係を把握することが必須であり、ばく露濃度－肺負荷量関係の把握は不可欠である。また、高濃度短時間ばく露では、見逃されがちな遅延性の毒性慢性影響についても低濃度の長期間ばく露により明らかにすることが必要である。

2.6. 小括

MWCNT エアロゾル発生装置の開発に取り組み、サイクロンシープ方式による乾式での発生装置を作製した。発生装置で発生させた MWCNT エアロゾルは、0.2 から 5 mg/m³ の濃度において、粒子径に差がなく一様な分散を示し、濃度についても高い精度で制御が行えることが明らかとなった。また、MWCNT エアロゾルの MMAD(GSD)は、これまでに報告されている研究結果と同等かそれ以上と考えられること、また、吸入チャンバーでは、単分散した繊維状型の MWCNT が多く存在し、再凝集しないことも確認できた。

発生装置の最終性能確認として行った雄ラットを用いた全身吸入ばく露実験では、MWCNT エアロゾルの分布、MWCNT の繊維長及び繊維径とも、動物を使用せずに行った性能確認試験と変化はなかった。また、MWCNT はラットの肺胞に到達し、肺胞マクロファージに貪食されるものの生物学的な修飾や分解を受けることなく存在すること、好中球浸潤を始めとする炎症反応が惹起されること、MWCNT のクリアランスは遅く、肺に長く滞留することも確認され、毒性発現臓器は主に肺であることが示された。この結果から、本発生装置は実験動物を用いる吸入ばく露研究に使用できると判断した。本発生装置を用いて行った試験研究について、第 3 章で 2 週間の吸入ばく露研究、第 4 章で 13 週間の吸入ばく露研究、第 5 章で発がん研究の結果を報告する。



写真 2-1 MWCNT エアロゾル発生装置

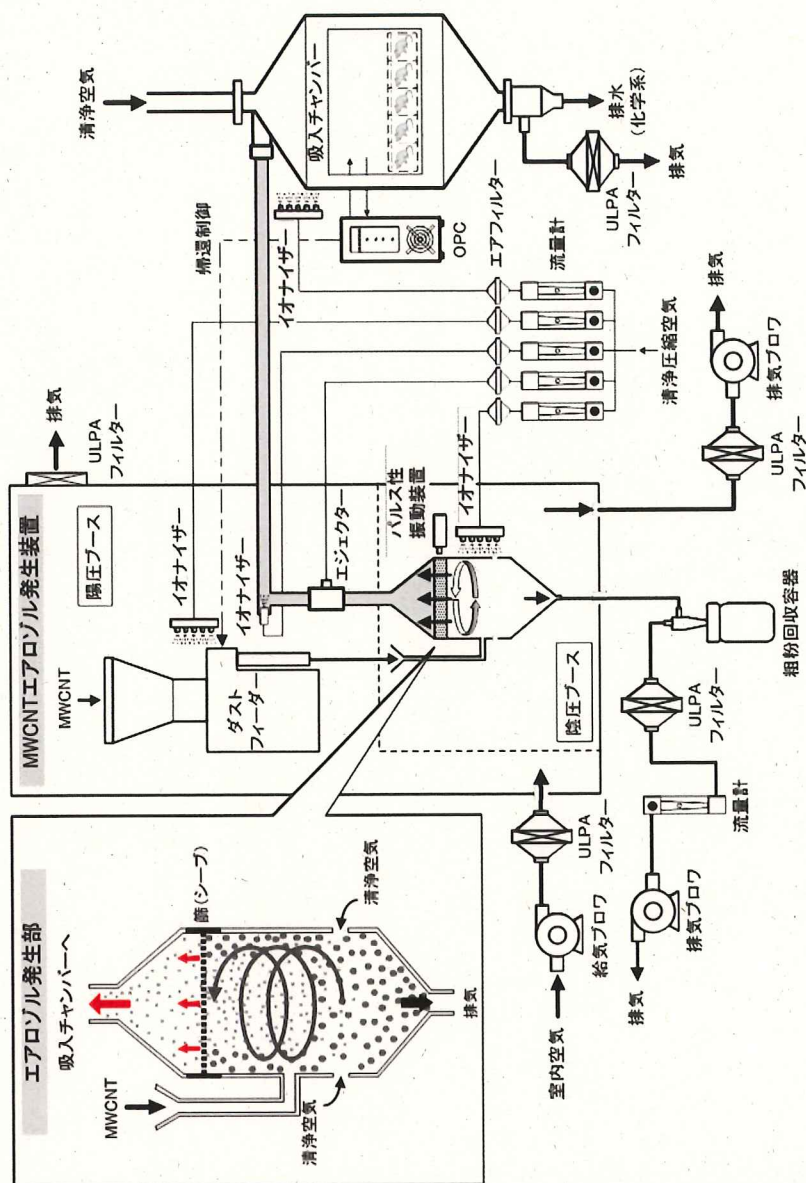
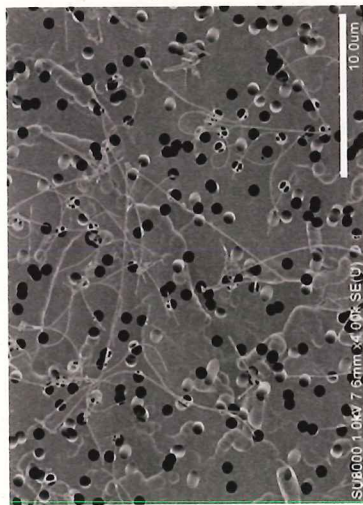
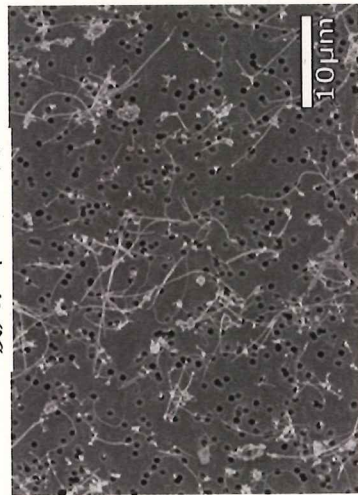


図 2-1 サイクロンシープ方式による全身ばく露システム

試料



吸入チャンバー内



5 mg/m³ばく露肺内

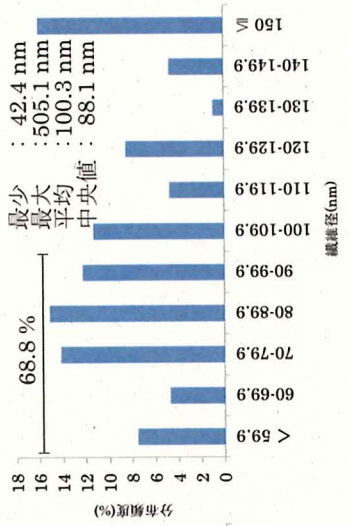
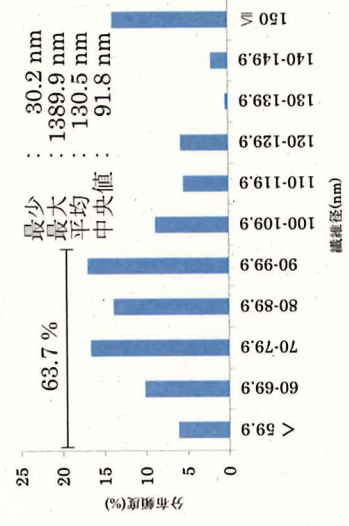
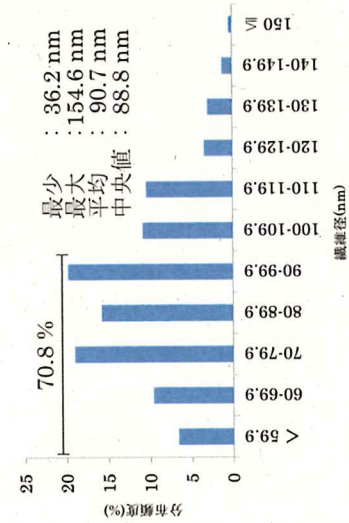
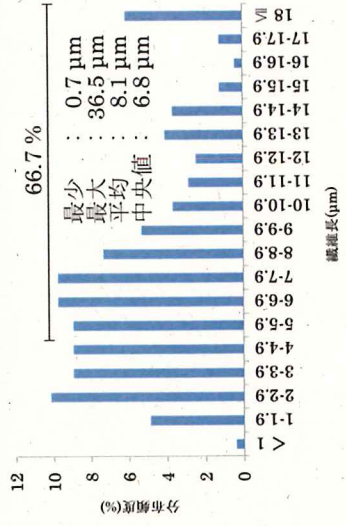
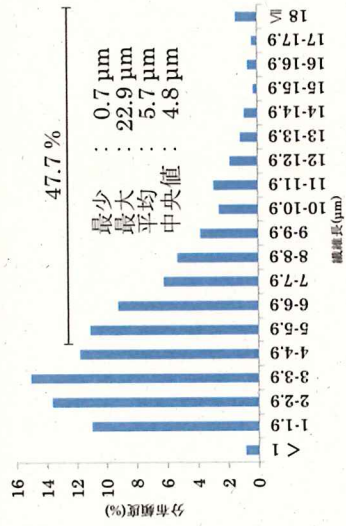
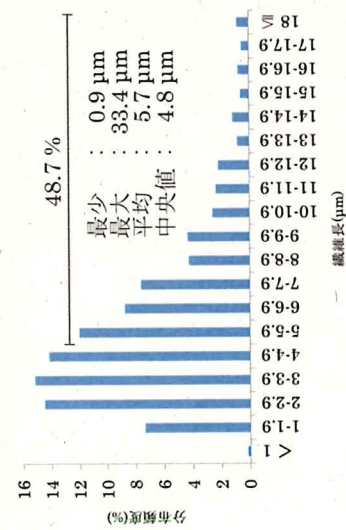
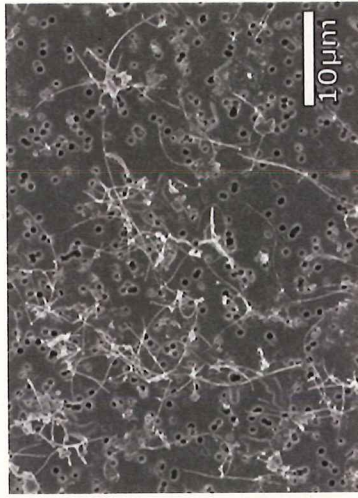


図 2-2 MWCNT 繊維長、繊維径

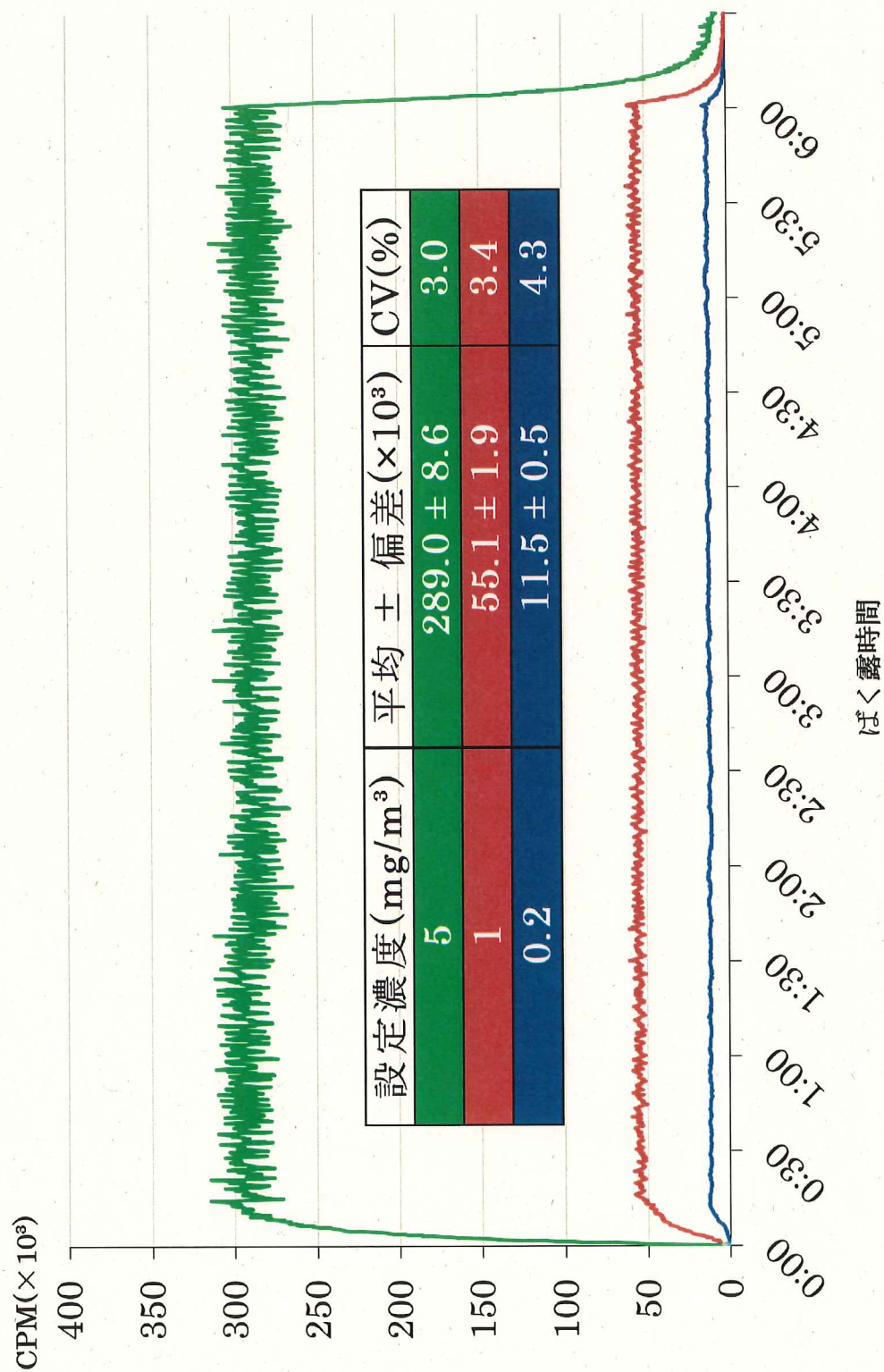


図 2-3 個数濃度 - 時間推移グラフ

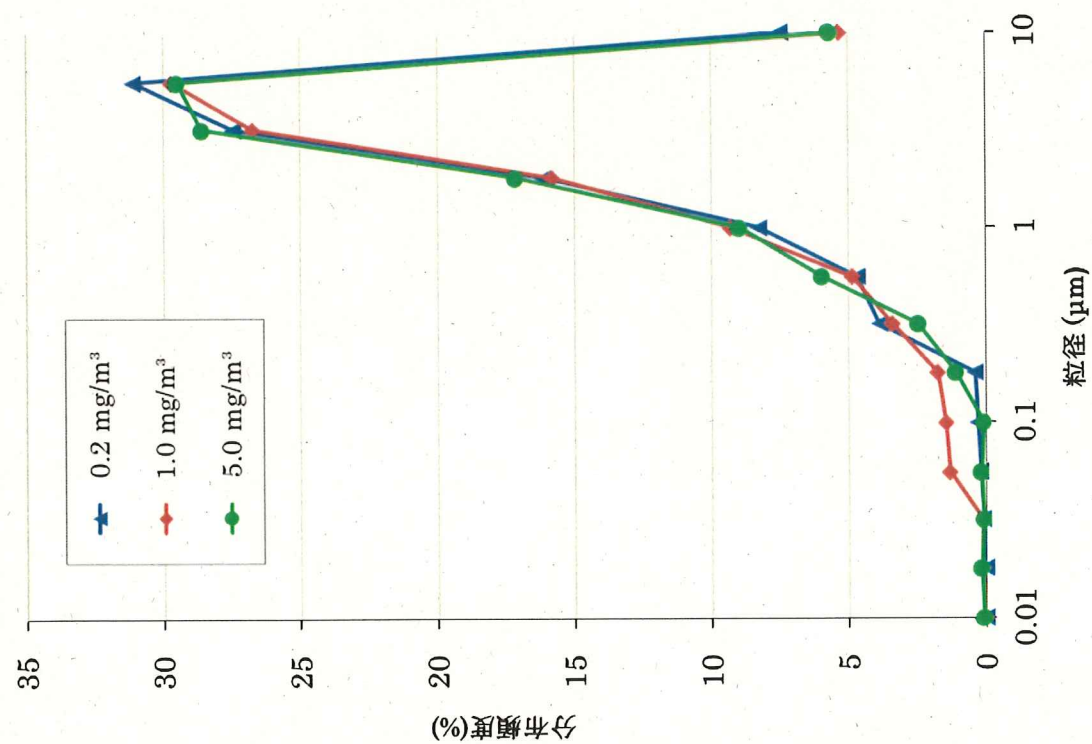


图 2-4A 質量粒度分布図

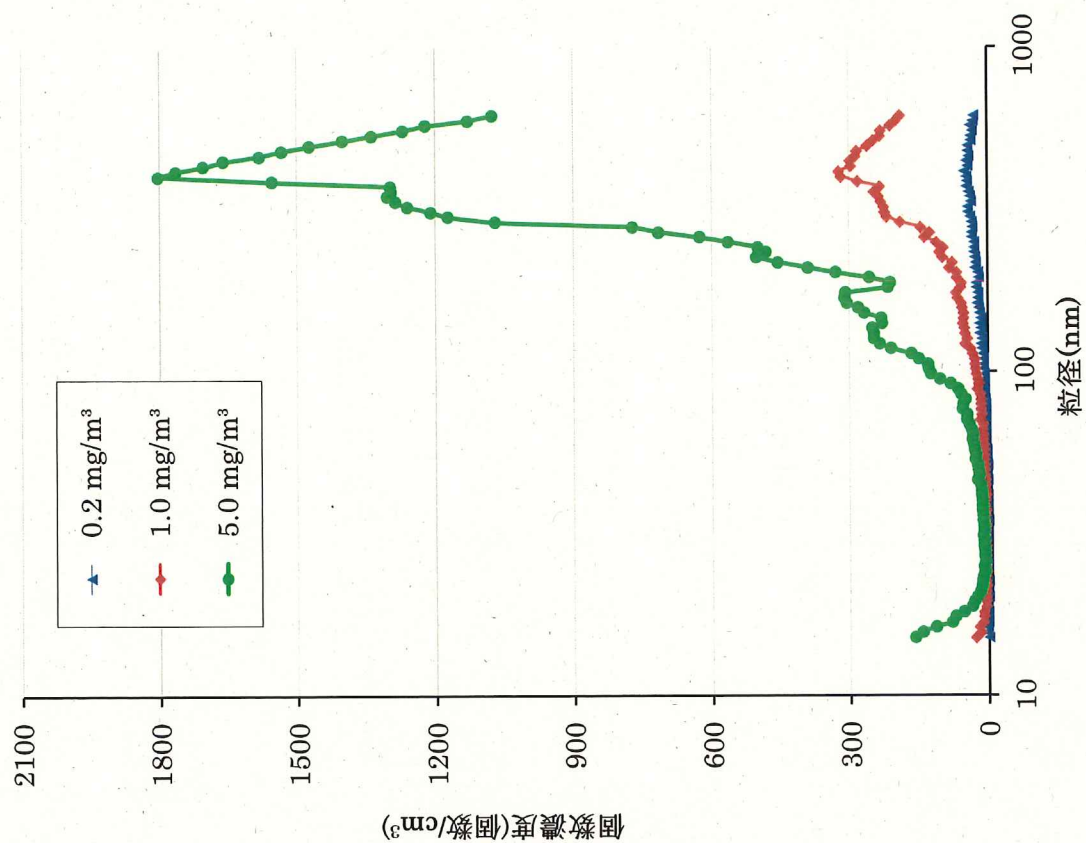


图 2-4B 個数粒度分布図

K値(個数・質量変換係数)を用いた質量濃度・時間推移

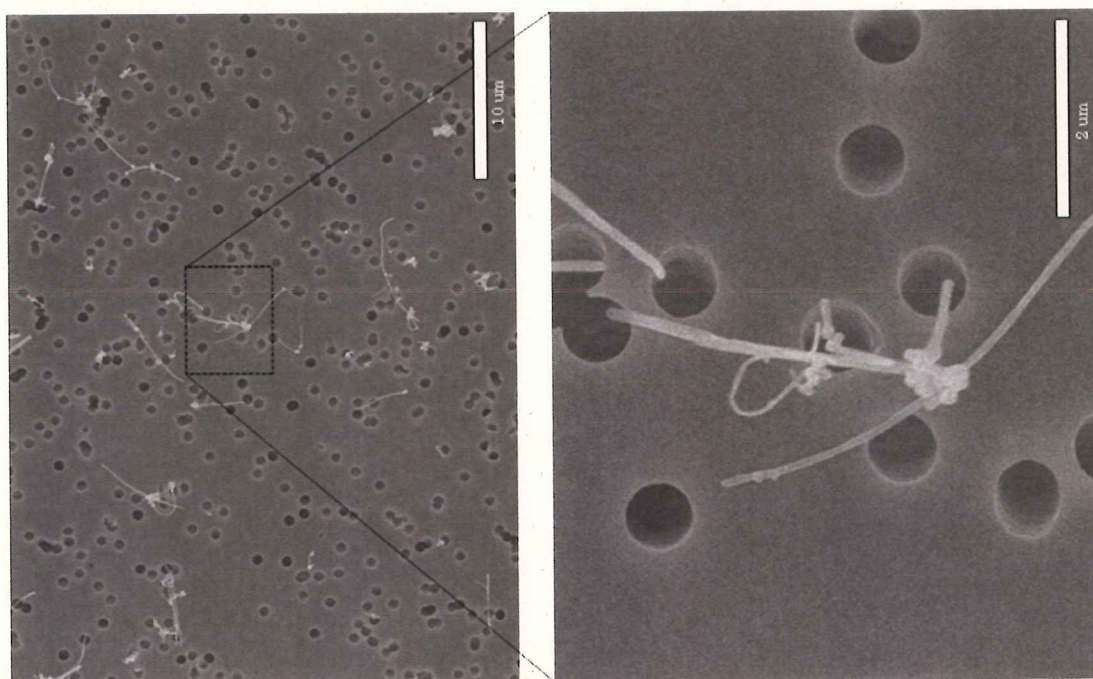
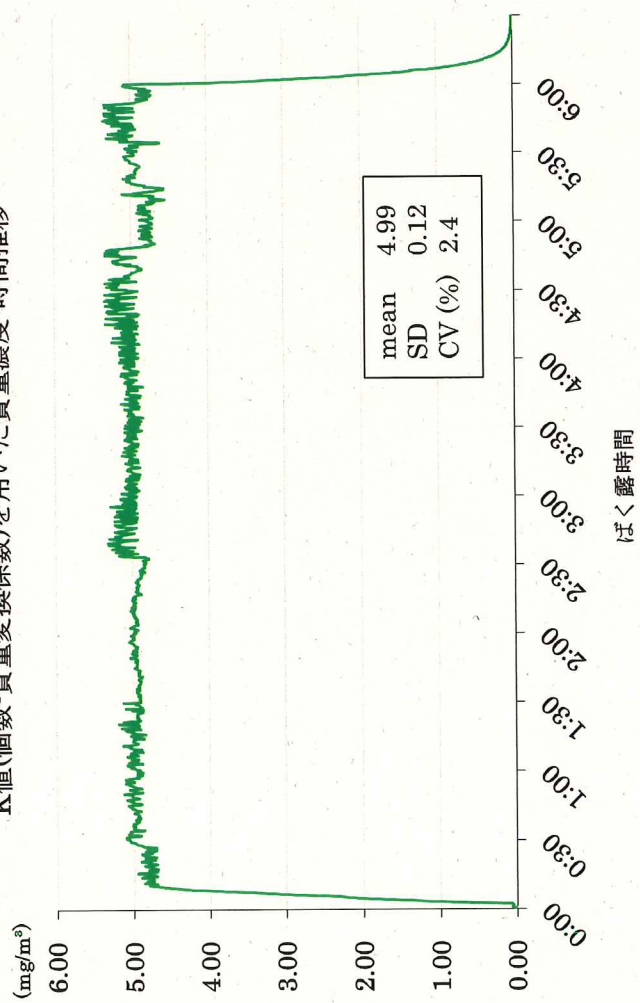
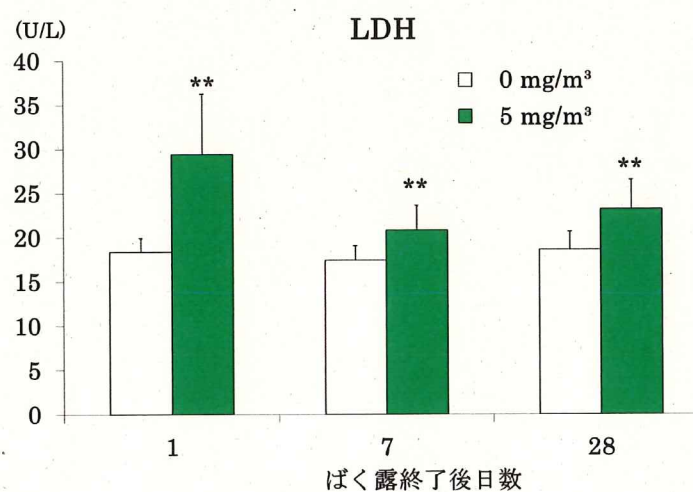
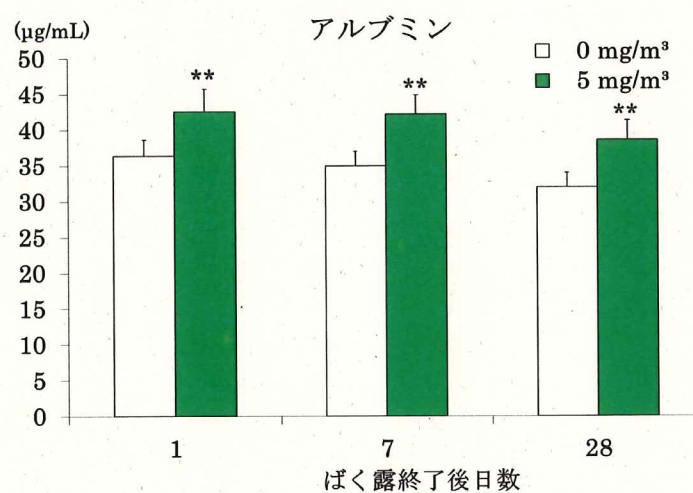
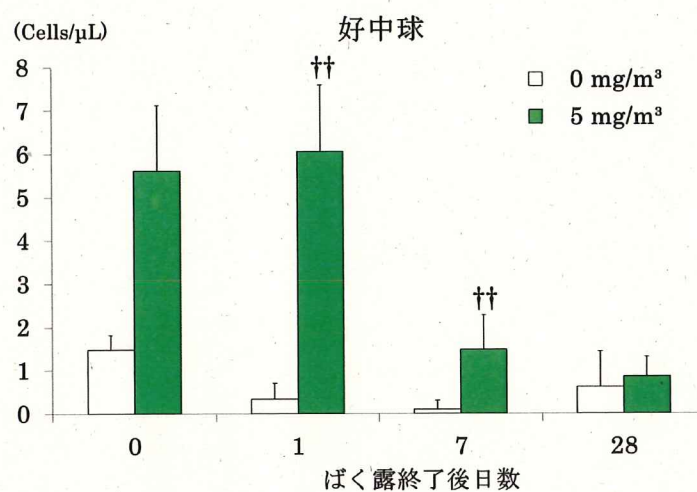


図 2-5 ラットを使用した最終性能確認結果



有意差; †: $p \leq 0.05$ ††: $p \leq 0.01$ student's t 検定
 有意差; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

図 2-6 BALF の細胞学的及び生化学的検査

表 2-1 質量濃度測定結果(動物未使用)

設定濃度(mg/m ³)	0.2	1	5
質量濃度(mg/m ³)(平均 ± 偏差)フィルター捕集	0.20 ± 0.01	1.00 ± 0.03	5.07 ± 0.10
MOUDI、MMAD (μm)/GSD	1.33/2.70	1.04/3.20	1.21/3.39
3 μm 以下のエアロゾルの占める割合(%)	80	82	80
SMPS、平均個数濃度(個数/cm ³)	25.87 ± 6.91	123.0 0 ± 15.96	657.6 8 ± 101.57

表 2-2 質量濃度測定結果(ラットを使用した最終性能確認)

設定濃度(mg/m ³)	5
質量濃度(mg/m ³)(平均 ± 偏差)フィルター捕集	4.99 ± 0.28
K 値を用いた質量変換濃度(mg/m ³)	4.99 ± 0.12
MOUDI、MMAD (μm)/GSD	1.44/2.27
3 μm 以下のエアロゾルの占める割合(%)	81

表 2-3 MWCNT の肺への沈着及び肉芽腫様変化

設定濃度(mg/m ³)	0				5			
ばく露終了後日数	0	1	1	28	0	1	1	28
検査動物数	2	5	5	5	2	5	5	5
MWCNT の沈着								
細気管支腔	0	0	0	0	2	5	5	5
肺胞腔	0	0	0	0	2	5	5	5
肺胞壁	0	0	0	0	2	5	5	5
気管支関連リンパ組織(BALT)	0	0	0	0	0	1	4	5
肉芽腫様変化	0	0	0	0	0	0	0	1

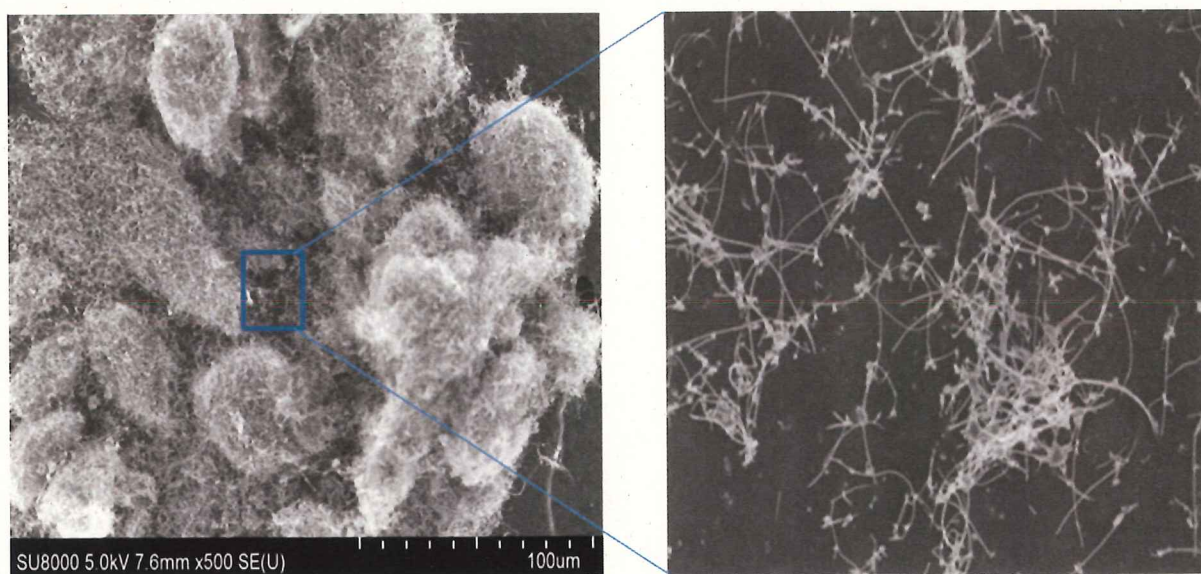


写真 2-2 SEM による試料観察

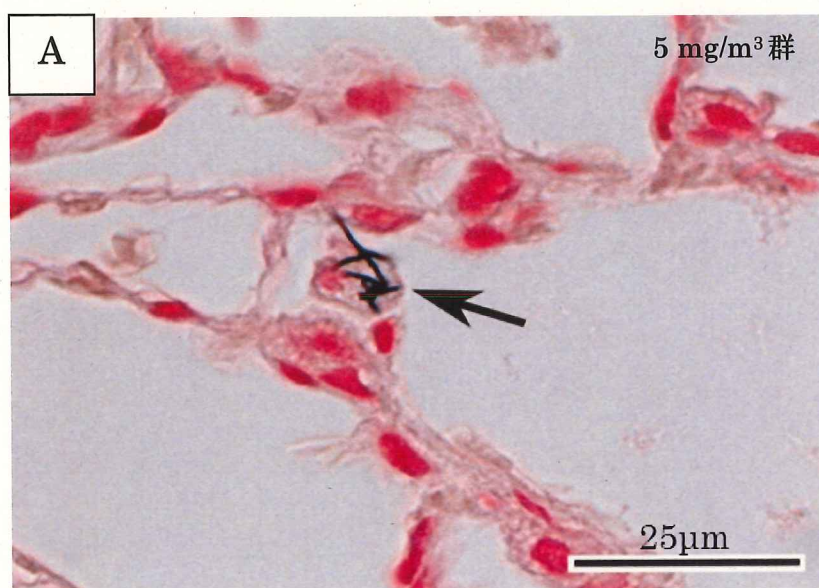


写真 2-3A 肺胞マクロファージによる MWCNT の食食
ばく露 28 日後 ケルンエヒロート染色

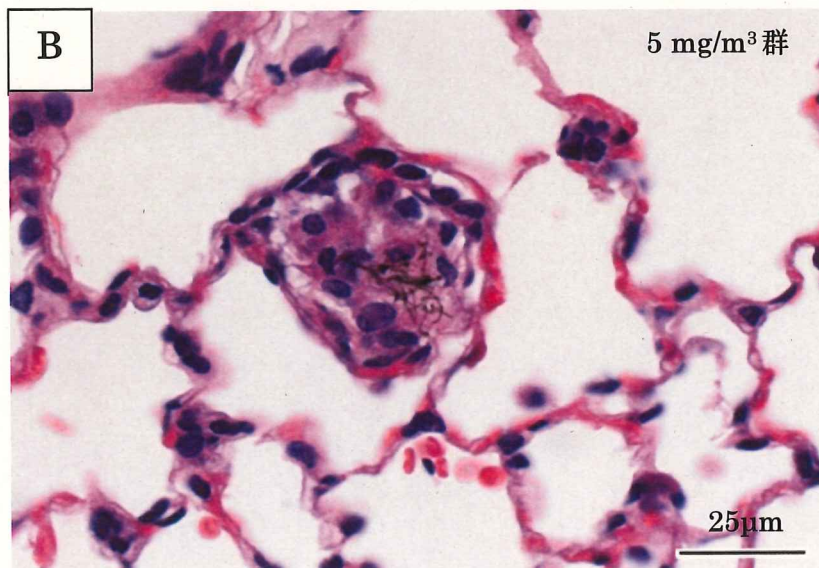


写真 2-3B MWCNT を食食した肺胞マクロファージの集簇を
特徴とする肉芽腫様変化

ばく露 28 日後 H&E 染色

第3章 雌雄ラットを用いた MWCNT 2 週間吸入ばく露による毒性試験研究

3.1. 目的

前章では、MWCNT エアロゾル発生装置の開発に取り組み、サイクロンシープ方式による乾式での発生装置を作製した。最終性能判定のために雄ラットに 5 mg/m^3 の濃度で MWCNT を 6 時間(単回)吸入ばく露した後、最長で 28 日間観察した結果、MWCNT はラットの肺胞に到達し、肺胞マクロファージに貪食されるものの生物学的な修飾や分解を受けることなく、28 日後まで存在すること、また、好中球浸潤を始めとする炎症反応が惹起されること、そして、28 日後に肺の肉芽腫様変化が認められたことを記述した。

本章では、MWCNT の 2 週間ばく露毒性影響を検討することを目的として、雌雄のラットに MWCNT を 0、0.2、1 及び 5 mg/m^3 の濃度で、6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)ばく露した。半数は 2 週間のばく露終了翌日に解剖し、半数は、ばく露終了から 4 週間の回復期間を設け解剖した。肺を中心とした毒性学的検索を行った結果を記述する。

3.2. 試験方法

3.2.1. 被験物質

本研究で使用した MWCNT は、第 2 章 2.3.1. 項「被験物質、発生濃度及び吸入チャンバーのばく露環境(1)被験物質」で記述した MWNT-7 (Lot No. 080126) である。

3.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件

4 週齢の雌雄 F344/DuCrj ラット(SPF)48 匹を、日本チャールス・リバー(株)(厚木)より購入した。検疫・馴化をそれぞれ 1 週間実施した後、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物を用い、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)²²⁾ によって 4 群(各群 10 匹)に群分けし、6 週齢から全身ばく露を行った。動物は、ステンレス製の吊り下げ型網ケージ(150W×216D×176H mm)に個別に収容し、温度 $23 \pm 2 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、相対湿度 $50 \pm 10 \%$ 、換気回数 15~17 回/時間及び 12 時間点灯(8:00-20:00)/12 時間消灯(20:00-8:00)の明暗サイクルに

維持管理されたクリーンルームに設置した吸入チャンバー内で飼育した。吸入チャンバーは、温度 22 ± 2 °C、相対湿度 50 ± 20 %、換気回数 12 回/時間の環境条件で運転し、ばく露及び観察期間の吸入チャンバーは、温度 $22.1 \sim 22.6$ °C、相対湿度 $54.6 \sim 57.0$ %、換気回数 12.0 回/時間で維持された。

動物は、CRF-1 固形飼料(30 KGy-γ線滅菌飼料、オリエンタル酵母工業(株))を全期間自由摂取させた。なお、定期解剖日前日の夕方からは絶食させた。また、飲水は、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

3.2.3. 吸入ばく露濃度の設定

発生濃度としては、人工グラファイトの職業性ばく露限界値の 5 mg/m^3 ¹⁹⁾ を最高濃度とし、中間濃度及び最低濃度は、MWCNT を取り扱う実際の労働現場で測定された濃度の 1 及び 0.2 mg/m^3 を設定した^{6, 20, 21)}。

3.2.4. 吸入ばく露方法及び MWCNT エアロゾルの評価法(濃度、粒度分布及び形態)

第 2 章 2.2.項「MWCNT エアロゾル発生装置」に記述したサイクロンシープ方式による発生装置を使用して、MWCNT エアロゾルを作製した。これを 1.24 m^3 のステンレス製全身ばく露型吸入チャンバーに収容した F344 ラットに、6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)全身ばく露した。また、第 2 章 2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)」で記述した方法で、ばく露中の濃度制御を確認し、フィルターを用いた質量濃度の測定を 1 日に 3 回(1、3 及び 5 時間目)行った。粒度分布の評価及び形態の評価についても同方法で行った。なお、対照群はばく露群と同じ条件で、発生装置を運転し空気のみを供給した。

3.2.5. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)

検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査

表記の測定方法は、第2章 2.3.5.項「検査方法」に記述した内容と同様である。ただし、麻酔法は、ペントバルビタール麻酔からイソフルランガス麻酔に変更し、麻酔下で腹大動脈を切断し、速やかに放血し、安楽死させた。この他、肺組織では線維化の指標となるコラーゲンを検出するため、シリウスレッド染色を追加した。ピクリン酸に溶かしたシリウスレッドで2時間染色し、塩酸(0.01 N)で1時間洗浄後、マイヤーのヘマトキシリンで2分間の対比染色を行った。

3.2.6. 肺内 MWCNT の分析

本法は、多環芳香族炭化水素(PAH)が MWCNT に容易に吸脱着する特性を持つことに着目して、MWCNT を間接的に定量する方法で、高速液体クロマトグラフィー(HPLC)を使用して、分析できることが最大の特徴である²⁹⁾。PAH の中でも取扱いが比較的容易で、毒性の低い benzo[ghi]perylene(B(ghi)P)をマーカーとして選択し以下の手順で MWCNT の定量を行った。

(1) 標準試料の調製及び HPLC の分析条件

- 1) 10 mg の MWCNT を pH 7.4-0.1 % Tween 80 含有リン酸バッファ(9.6 %)緩衝液(以下、TPB 液) 40 mL に溶解し、冷却しながら超音波(タイテック株式会社)を 20 分間照射して MWCNT 分散溶液を作製する(250 µg/mL 濃度)。この溶液を TPB 液で希釈して、2 µg/mL の濃度の MWCNT 標準用原液を調製する。0.4、0.8、1.2 及び 1.6 µg/mL MWCNT 濃度となるよう、標準用原液を C99 で希釈して、全量 1 mL の標準試料溶液を作製する。これを以下の手順で分析試料に調製する。
- 2) 遠心分離(12000 rpm、10 分間)し、上澄み液を除去する。
- 3) 沈殿に TPB 液 1 mL を加え、攪拌し遠心する。
- 4) 上澄みを除去し濃硫酸 100 µL を加え、攪拌する。
- 5) 1 mL の TPB 液を添加し超音波(1 分)で分散する。

- 6) マーカーB(ghi)P(濃度は 0.125 $\mu\text{g/mL}$ のアセトニトリル溶液)50 μL を加えて 15 分間攪拌し、MWCNT に B(ghi)P を吸着させる。
- 7) セルロースフィルター(Whatman 製 0.8 μm 小孔)でろ過する。
- 8) フィルター上の MWCNT を直径 8 mm の打ち抜きポンチでくり抜き、1 mL のアセトニトリルで 10 秒間超音波抽出する。
- 9) 溶液を Millex R -HV 100 フィルター(MILLIPORE 製 0.45 μm 小孔)でろ過し、ろ液を HPLC オートサンプラー用チューブに入れ MWCNT から吸脱着した B(ghi)P を HPLC(ウォータース UPLC 蛍光検出器)で測定する。
- 10) HPLC の分析条件
機 器 : Acquity UPLC system (Waters, Milford, MA, U.S.A.)
カ ラ ム : Acquity BEH(Waters 1.7 μm C18 100 \times 2.1 mm I.D.)
移 動 相 : アセトニトリル:メタノール:蒸留水=75:20:5
流 量 : 0.5 mL、温度:40 $^{\circ}\text{C}$
検 出 器 : FLR 蛍光検出器 (Waters)
励起波長 : 294 nm、蛍光波長 : 410 nm、試料注入量 : 5 μL

(2) 分析用肺の調整

肺は重量を測定後、10 %中性リン酸緩衝ホルマリン溶液に分析時(1 週間以上)まで浸漬した。分析時には、生体成分(線維、蛋白等)を Kohyama らの方法²³⁾で除去し、分析用試料を得た後、上記(1) 2)以降の手順で、MWCNT を定量した。

3.2.7. 統計検定及び解析

体重、摂餌量、肺重量、BALF 検査、病理組織学所見の統計検定と解析法は、第 2 章 2.3.6. 項「統計検定及び解析」に記述した内容で行った。ただし、BALF 検査の細胞学的検査も Dnnnet の多重比較検定を行った。

3.2.8. 遵守規定及びテストガイドライン等

本研究は、第2章2.3.7.項「遵守規定及びテストガイドライン等」で記述した、指針及び基準、法令を遵守し吸入ばく露実験を実施した(試験番号：0773)。

3.3. 結果

3.3.1. ばく露環境(濃度制御及び粒度分布)

0.2、1及び5 mg/m³に設定した吸入チャンバーから1日に3回(10回ばく露で合計30回)サンプリングしたフィルターを用いた濃度測定結果は、それぞれ0.21 ± 0.02、1.07 ± 0.12、5.09 ± 0.35 mg/m³(平均値 ± 標準偏差)であった。設定濃度に近い濃度で安定したMWCNTの発生が行われたことを確認した。エアロゾルの粒度分布については、累積頻度分布図から求めたMMAD(GSD)は、0.2 mg/m³群は1.3 µm (2.7)、1 mg/m³群は1.2 µm (3.4)、5 mg/m³群は1.4 µm (2.4)であった。濃度間でMMAD(GSD)はほぼ同じであったことから、エアロゾル環境は各ばく露群で差がないことが確認できた。また、3 µm以下の吸入性粒子の占める割合は、それぞれ78~82 %と求められ、発生したMWCNTの多くが肺に到達すると考えられた。SEM観察結果でも各ばく露群に差はみられず、各群とも単離した繊維状のMWCNTがほとんどであった。

3.3.2. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重及び摂餌量

2週間ばく露終了時及びばく露後4週間の回復期間終了時とも、MWCNTばく露群及び対照群に死亡はみられず、臨床症状に変化のみられた動物もなかった。2週間のばく露期間終了時の体重が雌雄ともばく露群では対照群より若干低く、雄の1mg/m³を除き有意な体重の低値が示された。雄のばく露群では対照群の93~97 %、雌では全て対照群の94%であった(表3-1)。また、ばく露終了4週間後の回復期間終了時においても、雌雄のばく露群の体重が対照群よりわずかに低かったものの統計学的有意差は認められなかった。雄のばく露群では対照群の95~98 %、雌では対照群の95~96 %であった(表3-1)。摂餌量においては、対照群との間に有意な差はなかった。

3.3.3. 気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)(図 3-1)

2 週間ばく露終了時において、ばく露濃度に相関した肺胞マクロファージ数の減少が認められた。これに対し、好中球数は 1 及び 5 mg/m³ 群で増加し、リンパ球数は 5 mg/m³ で増加した。また、肺胞マクロファージでは、1 個の細胞中に核が多数存在する多核マクロファージが認められ、2 週間ばく露終了時の 1 及び 5 mg/m³ 群の雌雄で増加した(図 3-2)。さらに、細胞障害性を示す逸脱酵素の ALP、また、肺血管透過性の指標となる総蛋白とアルブミン濃度が 1 及び 5 mg/m³ 群で上昇した。

回復期間終了時では、2 週間ばく露終了時と同様、ばく露群での肺胞マクロファージの低値は継続する傾向にあった。好中球数とリンパ球数は 2 週間ばく露終了時より減少したものの、対照群に比較して高値であった。多核マクロファージの増加は、回復期間終了時でも 1 (雌のみ)及び 5 mg/m³ 群の雌雄に継続して認められた(図 3-2、写真 3-1)。2 週間ばく露終了時より値は低下したものの、ALP、総蛋白、アルブミン濃度が 1 及び 5 mg/m³ 群で上昇した。以上、肺では、4 週間の回復期間を経ても炎症反応の持続が観察された。

3.3.4. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査

5 mg/m³ 群の雌雄の肺の重量増加が認められた。雌雄とも体重比重量は 2 週間ばく露終了時に対照群の 1.15 倍であった(表 3-1)。回復期間終了時では、肺重量に対照群と 5 mg/m³ 群の間に統計学的有意差はなかった(表 3-1)。

2 週間ばく露終了時の各ばく露群の肺(気管支、肺胞腔内及び肺胞壁)で MWCNT の沈着がみられた(表 3-2)。ほとんどの MWCNT は肺胞マクロファージ内に観察されたが(写真 3-2)、一部の MWCNT は、貪食されていない状態(単体)で肺に存在した。肺胞マクロファージ中には、MWCNT が、2 週間ばく露終了時及び回復期間終了時の各ばく露群で認められた。MWCNT を貪食した肺胞マクロファージは、大きさ、形状、細胞質の染色の濃淡は多様であり、細胞の変形及び膨化が認められた。MWCNT 貪食肺胞マクロファージに共通する形態学的特徴は、多くの空胞を持つ小腔が細胞質に充満していることで、一部の肺胞マクロファージには、MWCNT を貪食した状態で細胞質が消失したものや細胞死したものも認められ、

MWCNT の肺胞マクロファージに対する細胞障害性が明らかになった(写真 3-2)。

光学顕微鏡観察下での定性的な比較ではあるが、気管支及び肺胞腔内の MWCNT 沈着は、5 mg/m³ 群が最も多かった。回復期終了時でも各ばく露群で、肺に MWCNT が継続して観察された。

MWCNT の沈着は、また、2 週間ばく露終了時の 1 及び 5 mg/m³ 群の肺関連リンパ節と気管周囲リンパ節にも認められた。ただし、1 mg/m³ 群では発生数は少数で少量であった。回復期間終了時には、上記リンパ節への MWCNT 沈着は、1 及び 5 mg/m³ 群で継続して観察された。特に、1 mg/m³ 群では、同部の沈着は、2 週間ばく露終了時よりも回復期間時の方で顕著に増加した。

2 週間ばく露終了時において、肺の肉芽腫様変化が雌雄の 5 mg/m³ 群に認められ、この発生率は回復期終了時の観察でさらに増加した(表 3-3)。肉芽腫様変化は、わずかなコラーゲン線維で囲まれた MWCNT を貪食した肺胞マクロファージの集合体として特徴づけられた(写真 3-3)。また、回復期間終了時の 5 mg/m³ 群では、肉芽腫様変化の内部やその周囲に多核巨細胞が出現し、肉芽腫様変化の数とサイズは増加した。多核巨細胞の核は、細胞質内の外側に局在する傾向にあった。その他、鼻腔や鼻咽頭で杯細胞の過形成が 2 週間ばく露終了時にみられたが、回復期終了時には観察されなかった。

3.3.5. 肺内 MWCNT の分析

各ばく露群の各解剖期に実施した肺 1g 当りの MWCNT の沈着(負荷)量を表 3-4 に示す。

結果から、ばく露濃度と MWCNT の負荷量に良好な対応が認められた。また、4 週間の回復期間を経ても 2 週間ばく露終了時の約 80 %の MWCNT が肺に残存した。

3.4. 考察

全身ばく露システムを用いて雌雄の F344 ラットに 0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)ばく露した。半数はこの時点で解剖し、残りの半数は、4 週間の回復期間を設け、肺毒性を検索した。各ばく露群の肺に MWCNT は沈着した。ほとんどの MWCNT が肺胞マクロファージに貪食され、4 週間の回復期間を経ても多く(80 %)の MWCNT が肺内に滞留することが判明した。また、肺胞では、わずかなコラーゲン線維を伴った肉芽腫様変化が認められ、その発生は 4 週間の回復期間を経ても増加した。細胞障害性を示す逸脱酵素の ALP、並びに肺血管透過性の増大の指標となる総蛋白及びアルブミン濃度値が 1 及び 5 mg/m³ 群では、2 週間ばく露終了時で対照群よりも高値となった。これらの変化は、4 週間の回復期間を経ても対照群よりも高値であり、2 週間ばく露終了後も持続的な炎症反応が示された。肺胞マクロファージの毒性が認められ、数の減少、変性及び多核マクロファージの増加が観察された。この他、2 週間ばく露終了時には観察されなかった多核巨細胞が回復期間終了時に新たに認められるようになった。これらの回復期間を経てもみられる毒性には、MWCNT の長い肺内滞留性が関係するものと考えられた。

気管周囲のリンパ節の MWCNT 沈着の発生率が回復期間終了時に増加し、肺胞領域からの気管周囲のリンパ節への MWCNT の移行が認められた。肺胞に沈着した MWCNT の多くは肺に滞留するが、一部はリンパ流路によるクリアランス機構によって排泄されるものと考えられる。肺では、動脈周囲、静脈周囲及び気管支周囲のリンパ管からなる肺深部排泄経路及び肺の分節や分葉の表面を通る胸膜排泄経路の二つのクリアランス系が知られているが、これらのリンパ管を経由するクリアランス機構は長時間を要するとされている^{31, 32)}。BALF 検査及び病理組織学的検査から肺に取り込まれた MWCNT は長期間滞留することが示されたが、肺の MWCNT 分析の結果から、肺に到達した MWCNT は、ばく露終了 4 週間を経過してもその 80 %は肺内に滞留することが明らかとなった。この結果は、Ohnishi ら²⁹⁾の報告(第 2 章に記述)の単回ばく露 1 日後を基準とした 28 日後の肺内の MWCNT の滞留割合(80 %)とも一致した。

MWCNT の 2 週間吸入ばく露による毒性は、1 mg/m³ 以上の群で認められ、0.2 mg/m³ 群

では、肺重量、BALF 検査及び病理組織学的検査で変化はみられなかった。従って、MWCNT の 2 週間吸入ばく露による無毒性量は 0.2 mg/m^3 であると考えられた。

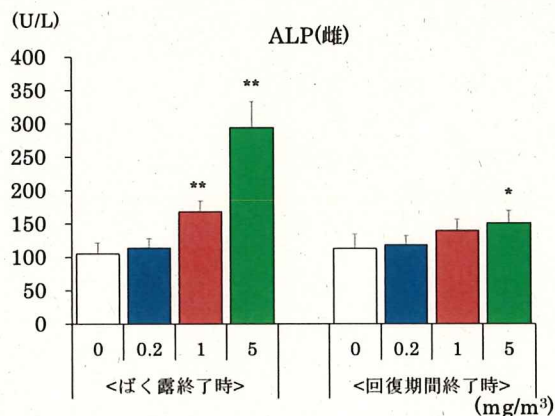
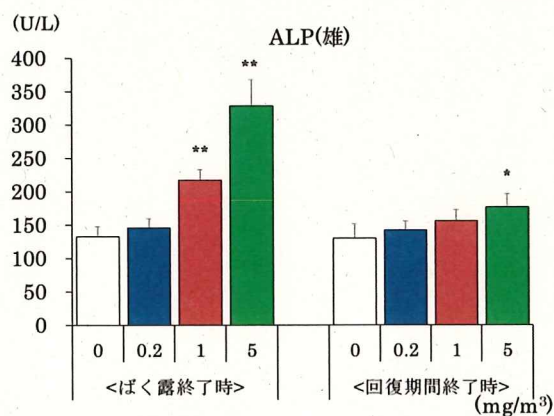
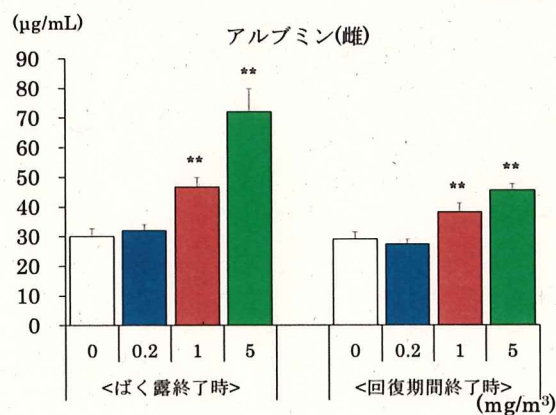
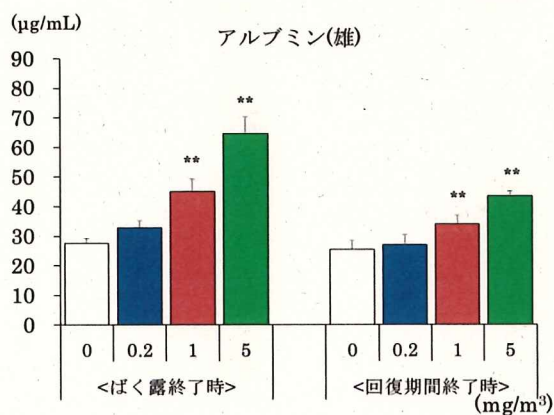
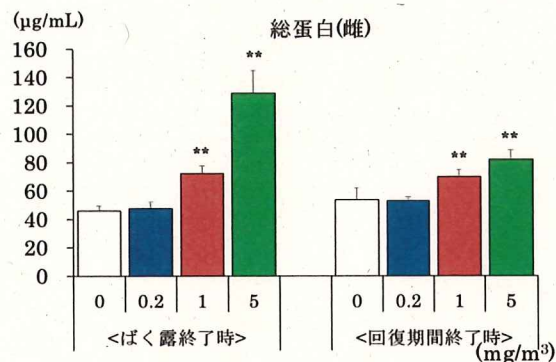
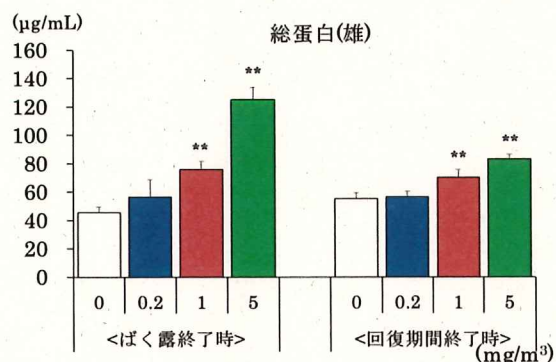
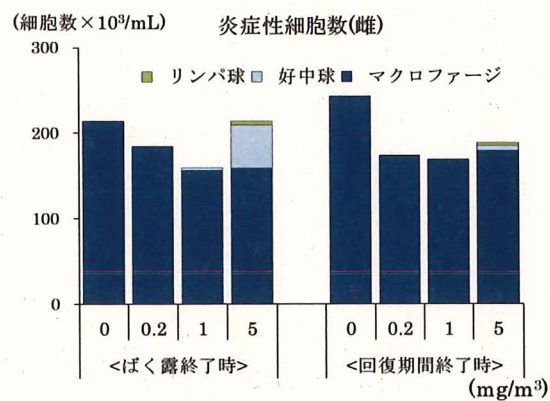
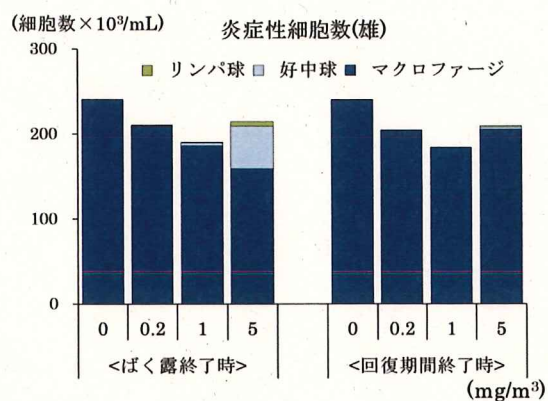
MWCNT の連続ばく露により、肺負荷量は増加すると予測されることから、今回の 2 週間ばく露では、無毒性量と結論した 0.2 mg/m^3 以下の濃度でも、長期間のばく露を行った場合には、肺毒性が検出される可能性が示された。

3.5. 小括

全身吸入ばく露システムを用いて雌雄の F344 ラットに 0.2 、 1 及び 5 mg/m^3 の濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)ばく露した。半数はこの時点で解剖し、残りの半数は 4 週間の回復期間を設け、肺毒性を検索した。

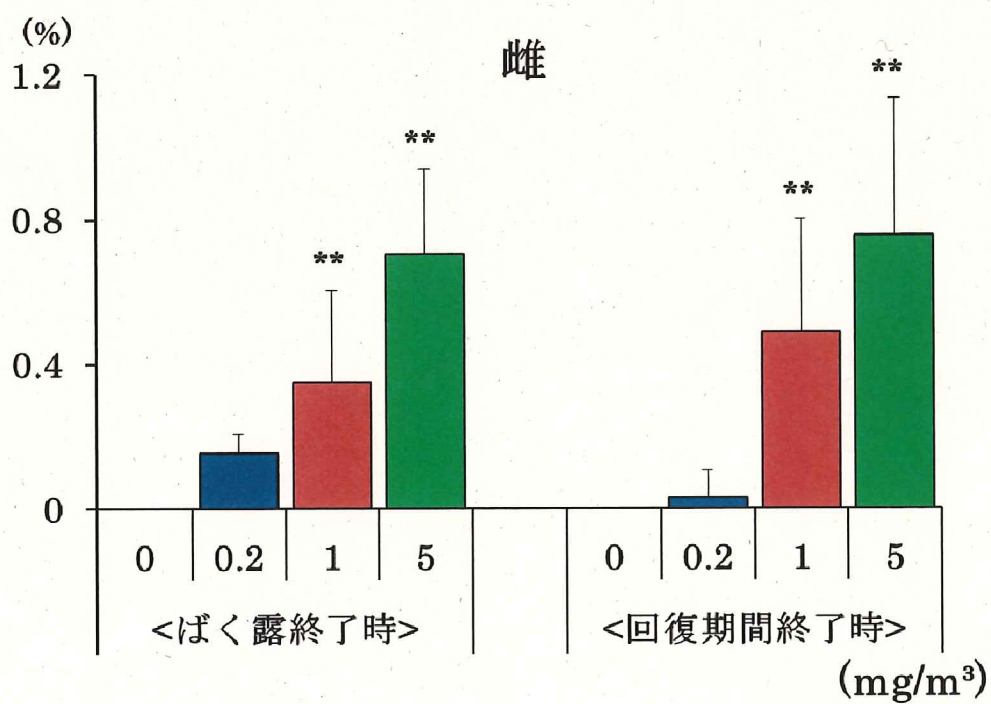
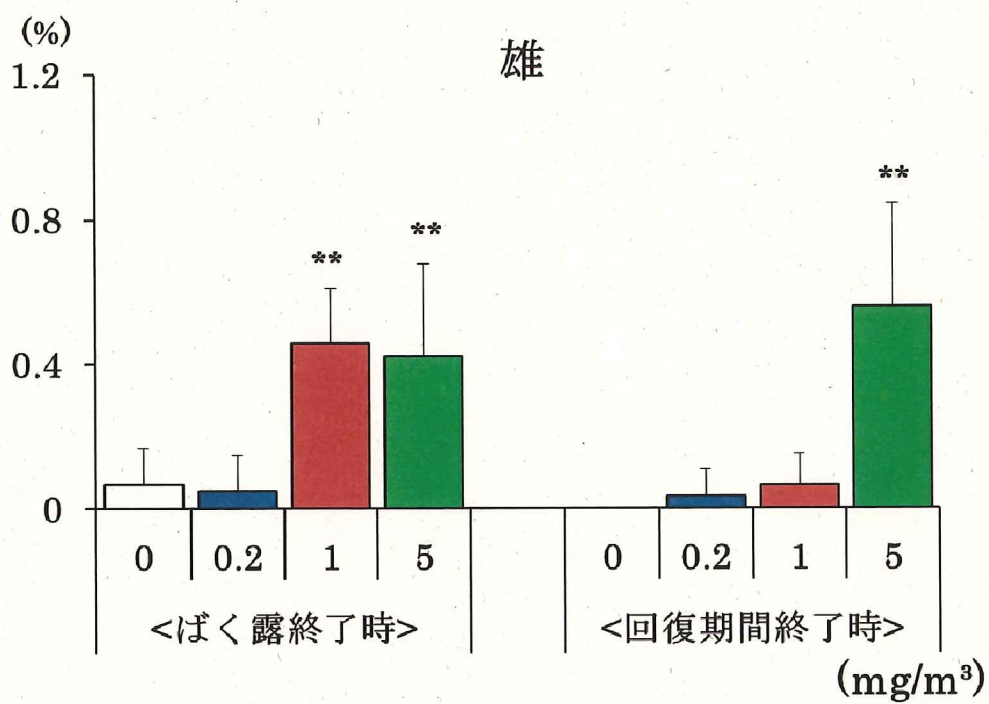
雌雄ともばく露濃度に相関した肺の重量増加と早期の肉芽腫様変化が認められた。また、MWCNT 負荷量とばく露濃度との間に高い相関が認められた。4 週間の回復期間を経ても多くの MWCNT が肺に保持され、2 週間ばく露終了時に観察された肉芽腫様変化が悪化した。毒性発現には、長期間の MWCNT 肺滞留性が影響することが示唆された。

MWCNT の毒性は、 1 mg/m^3 以上のばく露群で認められ、 0.2 mg/m^3 群では、病理組織学的検査及び BALF 検査で変化はみられなかった。従って、本研究における MWCNT の無毒性量は 0.2 mg/m^3 であると考えた。



有意差: *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

図 3-1 BALF の細胞学的及び生化学的検査



有意差: *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

図 3-2 BALF の多核マクロファージ比

表 3-1 体重と肺重量

設定濃度 (mg/m ³)	0	0.2	1	5
<雄>				
ばく露終了時				
検査動物数	5	5	5	5
体重 (g)	180 ± 9	171 ± 9 *	174 ± 9	168 ± 6 **
		(95 %)	(97 %)	(93 %)
体重比肺重量 (%)	0.192 ± 0.019	0.201 ± 0.004	0.206 ± 0.010	0.220 ± 0.011 **
回復期間終了時				
検査動物数	5	5	5	5
体重 (g)	255 ± 8	251 ± 10	249 ± 15	241 ± 14
		(98 %)	(98 %)	(95 %)
体重比肺重量 (%)	0.159 ± 0.011	0.169 ± 0.018	0.174 ± 0.009	0.181 ± 0.011
<雌>				
ばく露終了時				
検査動物数	5	5	5	5
体重 (g)	123 ± 4	116 ± 5 **	116 ± 4 **	116 ± 5 **
		(94 %)	(94 %)	(94 %)
体重比肺重量 (%)	0.235 ± 0.018	0.244 ± 0.029	0.231 ± 0.015	0.270 ± 0.023
回復期間終了時				
検査動物数	5	5	5	5
体重 (g)	155 ± 9	147 ± 5	149 ± 6	147 ± 5
		(95 %)	(96 %)	(95 %)
体重比肺重量 (%)	0.213 ± 0.012	0.214 ± 0.003	0.223 ± 0.017	0.223 ± 0.015

平均値±標準偏差

有意差; *: p<0.05、 **: p<0.01 Dunnett's検定
括弧内の数値は対照群 (100%) と比較した体重

表 3-2 鼻腔、肺及びリンパ節への MWCNT 沈着

設定濃度 (mg/m ³)	ばく露終了時				回復期間終了時			
	0	0.2	1	5	0	0.2	1	5
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
<雄>								
鼻腔								
呼吸上皮	0	0	1	4	0	0	0	5
肺								
気管支腔	0	3	5	5	0	2	5	5
肺胞腔	0	5	5	5	0	5	5	5
肺胞壁	0	0	5	5	0	2	5	5
気管支関連リンパ組織	0	0	0	5	0	0	5	5
気管周囲リンパ節	0	0	0	1	0	0	1	5
<雌>								
鼻腔								
呼吸上皮	0	0	2	5	0	0	0	5
肺								
気管支腔	0	4	5	5	0	2	5	5
肺胞腔	0	5	5	5	0	5	5	5
肺胞壁	0	1	5	5	0	2	5	5
気管支関連リンパ組織	0	0	2	5	0	0	5	5
気管周囲リンパ節	0	0	0	3	0	0	1	5

数値は当該病変を持っていた動物数を示す。

表 3-3 呼吸器系にみられた病理組織学的検査結果

設定濃度 (mg/m ³)	ばく露終了時				回復期間終了時			
	0	0.2	1	5	0	0.2	1	5
検査動物数	5	5	5	5	5	5	5	5
<雄>								
鼻腔								
杯細胞過形成	0	0	3	5	0	0	0	1
鼻咽頭								
杯細胞過形成	0	0	2	5	0	0	0	0
肺								
肉芽腫様変化	0	0	0	1	0	0	0	4
<雌>								
鼻腔								
杯細胞過形成	0	0	1	5	0	0	0	0
鼻咽頭								
杯細胞過形成	0	0	0	5	0	0	0	0
肺								
肉芽腫様変化	0	0	0	2	0	0	0	5

数値は当該病変を持っていた動物数を示す。

表 3-4 肺内 MWCNT の分析結果

設定濃度 (mg/m ³)	雄(μg/肺 1g)		雌(μg/肺 1g)	
	ばく露終了時	回復期間終了時	ばく露終了時	回復期間終了時
0.2	2.30 ± 0.4	1.97 ± 0.2	2.17 ± 0.4	2.17 ± 0.4
1	9.87 ± 1.2	7.90 ± 1.0	8.67 ± 2.3	7.00 ± 0.7
5	43.7 ± 9.3	34.7 ± 3.1	32.5 ± 9.7	28.8 ± 2.6

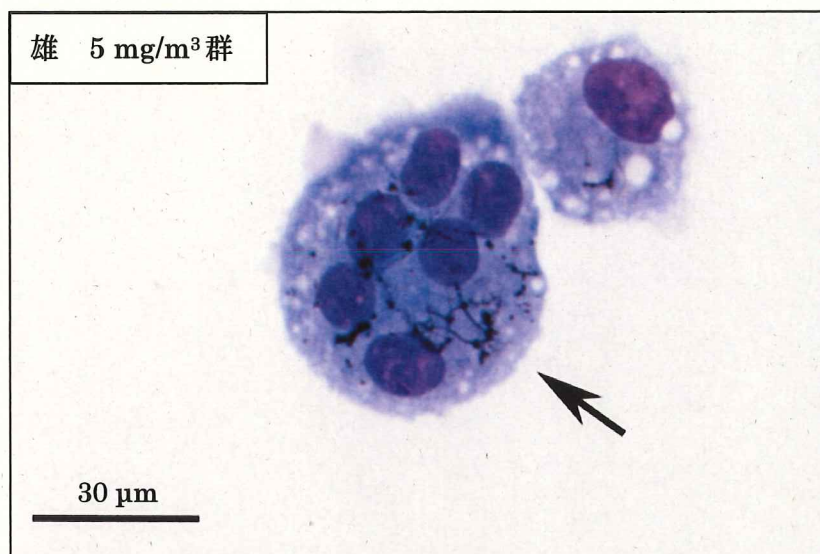


写真 3-1 BALF にみられたマクロファージ
多核細胞内の MWCNT
4 週間回復期間終了時 メイグリュンワルドギムザ染色

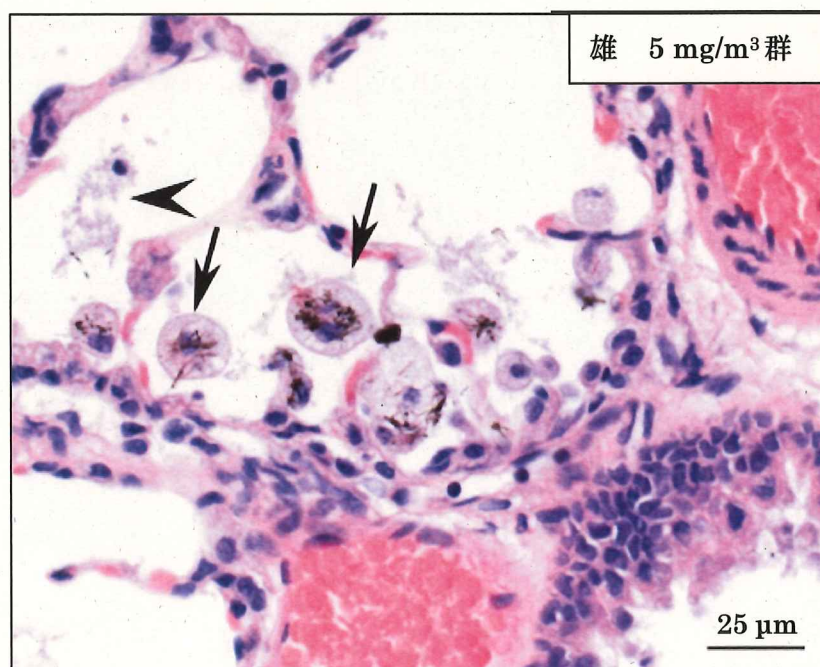


写真 3-2 肺胞腔内にみられた MWCNT と肺胞マクロファージ
MWCNT を食食したマクロファージの空胞化(矢印)や
崩壊(矢頭)
2 週間ばく露終了時 H&E 染色

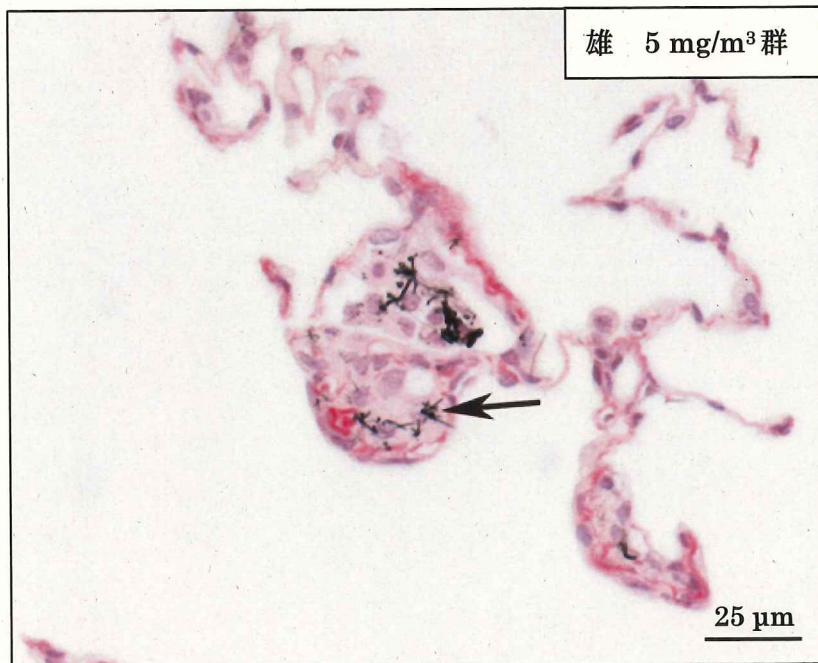


写真 3-3 肉芽腫様変化と MWCNT を食食した肺胞マクロファージの集簇
マクロファージ周囲にコラーゲン線維（赤色）が
みられ、早期の肉芽腫を形成

4 週間回復期間終了時 シリウスレッド染色

第4章 雌雄ラットを用いた MWCNT 13 週間吸入ばく露による毒性試験研究

4.1. 目的

前章では、雌雄の F344 ラットに 0、0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)ばく露して、半数はこの時点で解剖し、半数は 4 週間の回復期間を設けそれぞれ毒性を検討した。2 週間ばく露終了時では、雌雄ともばく露濃度に対応した肺胞マクロファージの細胞障害性、肺の重量増加及び早期の肉芽腫様変化が認められた。また、MWCNT 肺負荷量とばく露濃度との間に高い相関が認められた。4 週間の回復期間を経ても MWCNT は肺に保持され、2 週間ばく露終了時に観察された肉芽腫様変化が悪化した。この研究から、MWCNT の長期間の肺滞留性が肺毒性に関与することが示唆された。

本研究では、ばく露期間の長期化による肺毒性、特に発がん研究でのばく露濃度を決定する目的で、2 週間研究と同じ 0、0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度で 6 時間/日、5 日/週、13 週間(3 ヶ月)の MWCNT の吸入ばく露を行った。

4.2. 試験方法

4.2.1. 被験物質

本研究では、二つのロットの MWCNT(Lot No. 0712230 及び Lot No. 080126)を使用した。13 週間のばく露期間の 1~12 週間は Lot No. 080126 を使用し、最終の 1 週間は Lot No. 0712230 を使用した。Lot No. 0712230 の純度は 99.6 % (wt/wt)、Lot No. 080126 の純度は 99.8 % (wt/wt)、また、いずれのロットも表面積は 24~28 m²/g、かさ比重は 0.005~0.01 g/cm³ とメーカーから発表されている¹⁵⁾。我々が実際に測定した MWCNT の繊維長と繊維径は、Lot No. 0712230 では平均は 5.2 µm と 83.8 nm で 5 µm より長いものは 45.1 %であった。Lot No. 080126 の平均は 5.7 µm と 90.7 nm で 5 µm より長いものは 48.7 %を占めた。両者に目立った違いがないことから、ロットが異なることによる実験動物への影響はないと結論した。

4.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件

4 週齢の雌雄 F344/DuCrj ラット(SPF)それぞれ 50 匹を、日本チャールス・リバー(株)(厚木)より購入した。検疫・馴化をそれぞれ 1 週間実施した後、群間の体重の偏りを小さくする群分け方法(適正層別方式)²²⁾によって、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物を 4 群(各群 10 匹)に群分けし、6 週齢から全身吸入ばく露を開始した。動物は、ステンレス製の吊り下げ型網ケージ(150W×216D×176H mm)に個別に収容し、温度 23 ± 2 °C、相対湿度 50 ± 10 %、換気回数 15~17 回/時間及び 12 時間点灯(8:00-20:00)/12 時間消灯(20:00-8:00)の明暗サイクルに維持管理されたクリーンルームに設置した吸入チャンバー内で飼育した。各ばく露群の吸入チャンバーは、温度 21.6~21.8 °C、湿度 52.7~53.3 %、換気流量 249~252 L/min (12 回相当の換気流量: 248 L/min)で 13 週間、運転維持した(表 4-1)。

動物は、CRF-1 固形飼料(30 KGy- γ 線滅菌飼料、オリエンタル酵母工業(株))を全期間自由摂取させた。なお、定期解剖日前日の夕方からは絶食させた。また、飲水は、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

4.2.3. 吸入ばく露濃度の設定及び吸入ばく露方法と MWCNT エアロゾルの評価法(濃度、粒度分布及び形態)

本研究の発生濃度は、ばく露期間の長期化による毒性を 2 週間吸入ばく露と比較するために 2 週間吸入ばく露研究と同様、0、0.2、1 及び 5 mg/m³を設定した。なお、対照群はばく露群と同じ条件で、発生装置を運転し空気のみを供給した。

ばく露は、第 2 章 2.2.項「MWCNT エアロゾル発生装置」に記述したサイクロンシープ方式によって MWCNT エアロゾルを作製し、気積 1.24 m³のステンレス製全身ばく露型吸入チャンバーに収容した雌雄 F344 ラットに、6 時間/日、5 日/週、13 週間、全身ばく露した。

濃度測定は、テフロンバイダーフィルターを用いた質量濃度の測定を 1 日に 3 回(1、3 及び 5 時間目)行った。また、MWCNT の個数濃度(個数/m³)と質量濃度(mg/m³)の間には良好な相関関係があることから、第 2 章 2.4.1.項「発生装置の性能確認結果(動物未使用)(1)濃度測

定及び濃度制御の安定性確認(質量法、OPC によるリアルタイム計測)」で記述した方法で 2 週間毎に K 値を求め、この値を用いてばく露中の濃度を質量変換濃度としてリアルタイムで表示した(図 4-1、表 4-1)。

粒度分布の評価は、第 2 章 2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)(3)MWCNT エアロゾルの粒度分布」で記述した質量を基準とした方法でばく露 1、6 及び 13 週目に行い(表 4-1)、形態観察の評価は、第 2 章 2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)(4)MWCNT エアロゾルの形態観察」で記述した方法によりばく露 1、6 及び 13 週目に SEM を用いて観察し、繊維長について 600 本、繊維径は 300 本を計測した。これらの結果は図 4-2 に示した。

4.2.4. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査

表記の測定方法は、第 3 章 3.2.5.項「生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査」に記述した内容と同様である。ただし、肺の重量については、右肺は BALF 検査を行うことから、左肺を測定した。また、肺組織では線維化の指標となるコラーゲンをより高感度に検出するため、シリウスレッド染色からマッソントリクローム染色に変更した。マッソントリクローム染色法は、鉄ヘマトキシリンで核を黒染色し、ボンソー・キシリジン、酸フクシン、アゾフロキシンの細胞質を赤色、アニリン青でコラーゲン線維(膠原線維)を青色に染色する方法である。

4.2.5. 肺内 MWCNT の分析

第 3 章 3.2.6.項「肺内 MWCNT の分析」に記述した方法で雌雄ラット(各群 10 匹)の MWCNT の定量を行った。

4.2.6. 統計検定と解析

体重、摂餌量、肺重量、BALF 検査、病理組織学所見の統計検定と解析法は、第 2 章 2.3.6.

項「統計検定及び解析」及び第3章3.2.7.項「統計検定及び解析」に記述した内容で行った。

4.2.7. 遵守規定及びテストガイドライン等

本研究は、OECD 化学品テストガイドライン 413「亜慢性吸入毒性：90 日試験（2009.9.7 採択）」に準じて行い³³⁾、第2章2.3.7.項「遵守規定及びテストガイドライン等」で記述した、指針、基準及び法令を遵守し動物を取り扱った(試験番号：0780)。

4.3. 結果

4.3.1. ばく露環境(濃度制御及び粒度分布)

0.2、1 及び 5 mg/m³ に設定した吸入チャンバーから 1 日に 3 回、13 週間(62 回)のばく露期間中に、186 回、フィルターにサンプリングした濃度測定結果は、それぞれ 0.20 ± 0.01 、 1.01 ± 0.11 、 5.01 ± 0.15 mg/m³(平均値 \pm 標準偏差)であった(表 4-1)。ほぼ設定濃度の MWCNT の発生が確認された。一方、K 値を使用した変換質量濃度の濃度測定結果は、それぞれ 0.20 ± 0.02 、 1.01 ± 0.11 、 5.02 ± 0.25 mg/m³(平均値 \pm 標準偏差)であり(表 4-1)、フィルターを使用した質量濃度測定結果と違いがなかったことから、本法は、効率的で有効な計測法であることが証明された。

エアロゾルの分散性の指標である MMAD(GSD)は、0.2 mg/m³ 群では $1.4 \sim 1.5 \mu\text{m}$ (2.6~3.0)、1 mg/m³ 群では $1.4 \sim 1.5 \mu\text{m}$ (2.6~2.9)、5 mg/m³ 群では $1.5 \sim 1.6 \mu\text{m}$ (2.3~1.6)であった。濃度間及びサンプリング時期で MMAD(GSD)に差はみられなかったことから、エアロゾル環境は各ばく露群で同一であったことが確認された(表 4-1)。同様に、SEM を使用した観察では、MWCNT は単離した繊維状の形状であることが確認され、形状観察においてもばく露群間に差はみられなかった。各吸入チャンバーの MWCNT の繊維長(600 本計測)の平均値は、0.2 mg/m³ 群では $5.83 \mu\text{m}$ 、1 mg/m³ 群では $6.19 \mu\text{m}$ 、5 mg/m³ 群では $6.53 \mu\text{m}$ であり、また、繊維径(300 本計測)の平均値は、0.2 mg/m³ 群では 96.4 nm 、1 mg/m³ 群では 98.0 nm 、5 mg/m³ 群では 94.1 nm であった(図 4-2)。

4.3.2. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重及び摂餌量

13 週間のばく露期間中、対照群及びばく露群に死亡はみられず、一般状態に変化はみられなかった。また、全飼育期間を通して、対照群及びばく露群の雌雄とも体重は順調に増加し、摂餌量にも対照群との差はなかった。

4.3.3. 気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査) (図 4-3)

1 mg/m³ 以上の群で、ばく露濃度に相関してリンパ球及び好中球を主とする細胞数の増加が認められた。特に 5 mg/m³ 群で顕著であった。しかし、肺胞マクロファージ数は対照群と同程度であった。また、細胞障害性を示す逸脱酵素の LDH、Ⅱ型肺胞上皮の障害性の指標となる ALP(雌は 1 mg/m³ 以上の群)、肺血管透過性の指標となる総蛋白濃度が各ばく露群で上昇した。

4.3.4. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査

1 mg/m³ 以上の群の雌雄で肺の重量増加が認められた(表 4-1)。対照群と比較して体重は 1 mg/m³ 群の雌雄でそれぞれ約 1.2 倍、5 mg/m³ 群の雌雄でそれぞれ約 1.3 倍であった。解剖時の肉眼観察において、最高濃度の 5 mg/m³ 群(雄: 10 匹/10 匹、雌: 9 匹/10 匹)に、肺の白色斑及び黒色調変化が認められた。

MWCNT の肺毒性に関連する病理組織学的所見としては、各ばく露群の鼻腔から肺に至る呼吸器及び肺の縦隔リンパ節(肺関連リンパ節)に MWCNT の沈着が認められた。鼻腔、咽喉及び気管支では、粘膜上皮や粘膜固有層内に MWCNT は沈着していた。各ばく露群の肺内の気管支、肺胞腔及び肺胞壁で観察された MWCNT のほとんどが、肺胞マクロファージに貪食されていた。肺胞マクロファージは、雌雄とも 1 mg/m³ 以上の群で、腫大あるいは小型化し、細胞サイズの多様化が認められた。5 mg/m³ 群では、肺胞マクロファージの大小不同がより顕著となった。変性マクロファージは、細胞質の濃染または淡染化が特徴で、核は縮小し、空胞は拡大した。これに加え、MWCNT を取り込んだ多核巨細胞も観察され、10 核以上の核を有する細胞も散見された。

肉芽腫様変化がばく露濃度に対応して(0.2 mg/m³群では雄の1匹、1 mg/m³群では雄8匹、雌4匹、5 mg/m³群では雌雄の全動物)認められた(表4-2)。肉芽腫様変化は、MWCNTを貪食した肺胞マクロファージの集合体であり、その周辺をコラーゲン線維で被覆された像を特徴とした。主に細気管支終末付近の肺胞に認められ、MWCNTを貪食した肺胞マクロファージ数個の小集簇から気道を狭窄する大きな病変まで観察された。これに加え、肉芽腫様変化の内部やその周囲には、多核巨細胞が認められた。核が細胞質内の外側に偏在し、馬蹄型を示す傾向が観察された(写真4-1A)。さらに、肺胞壁の限局性線維化が、1 mg/m³以上の群の雌雄(1 mg/m³群の雌：9匹/10匹、他は全匹)に認められた。この変化は肉芽腫様変化と共にみられる傾向にあり、肺胞壁の肥厚として観察された。また、マッソントリクローム染色により、コラーゲン線維の増加が肉芽腫様変化及び肥厚した肺胞壁に観察された(写真4-1B)。肺胸膜では、5 mg/m³群の雌雄の少数例に壁側胸膜に炎症細胞の浸潤が観察され、MWCNTの沈着が確認された(写真4-1C,D)。

4.3.5. 肺内 MWCNT の分析

各ばく露群について実施した肺内 MWCNT の分析結果を図4-4及び表4-3に示す。ばく露濃度と MWCNT の沈着に良好な相関が認められた。

4.4. 考察

全身ばく露システムを使用して MWCNT エアロゾルを 0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度で 13 週間、雌雄のラットに乾式でばく露した。MWCNT は、ラットの鼻腔から肺にかけて沈着した。肺内ではそのほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。

肺では炎症が起こり、肉芽腫様変化及び肺胞壁の限局性線維化が認められた。第2章で記述した6時間(単回)のばく露、第3章で記述した2週間ばく露においても、MWCNT の多くが肺胞マクロファージに貪食されていたが、今回の13週間ばく露研究でも同様であった。6時間(単回)のばく露では、28日経過して肉芽腫様変化が認められ、2週間ばく露においては、肺胞マクロファージの変性及び肉芽腫様変化が認められた。本研究でも肺胞マクロファージ

の変性及び肉芽腫様変化が濃度依存的に認められており、肉芽腫様変化については、MWCNTを貪食した肺胞マクロファージの集合体であると判断した。肺胞マクロファージの細胞数は、2週間ばく露では濃度に対応して減少したが、本研究では細胞数に変化はなく、ばく露期間の違いによる影響が認められた。また、肺胞壁の限局性線維化は、肉芽腫様変化と共にみられる傾向にあった。肺の肉芽腫様変化は、ラット気管内投与³⁴⁾、マウス咽頭内吸引³⁵⁾、ラット鼻部ばく露^{27,36)}及びマウス全身吸入ばく露¹⁸⁾においても観察され、MWCNTの気道を介した投与による同様の毒性影響が既に報告されている。また、興味深いことに、MWNT-7を使用した Aiso ら³⁴⁾や Porter ら^{18,35)}の研究では、動物種、投与方法、投与期間が異なっても、共通して肺胞壁の線維化が認められている。彼らは、肺での MWCNT の長期間の滞留性が線維化の発現と関係すると考察している。

BALF 検査において肺の炎症が確認された。細胞障害性を示す生化学パラメータの動向、炎症細胞の出現頻度はばく露濃度と良く相関していた。本研究のばく露吸入チャンバーからサンプリングした MWCNT の平均繊維長は、6.2 μm であった。繊維長がアスベストに限らず肺癌及び中皮腫の発生と密接に関連すると提唱した、いわゆるスタントン・ポットの仮説^{8,9,10)}を検証する意味でも MWCNT の発がん実験の必要性が高まった。本研究では、肺胸膜において細胞浸潤が認められ、MWCNT も確認されていることから、発がん研究を実施した場合、胸膜の中皮腫の発生に注視する必要がある。

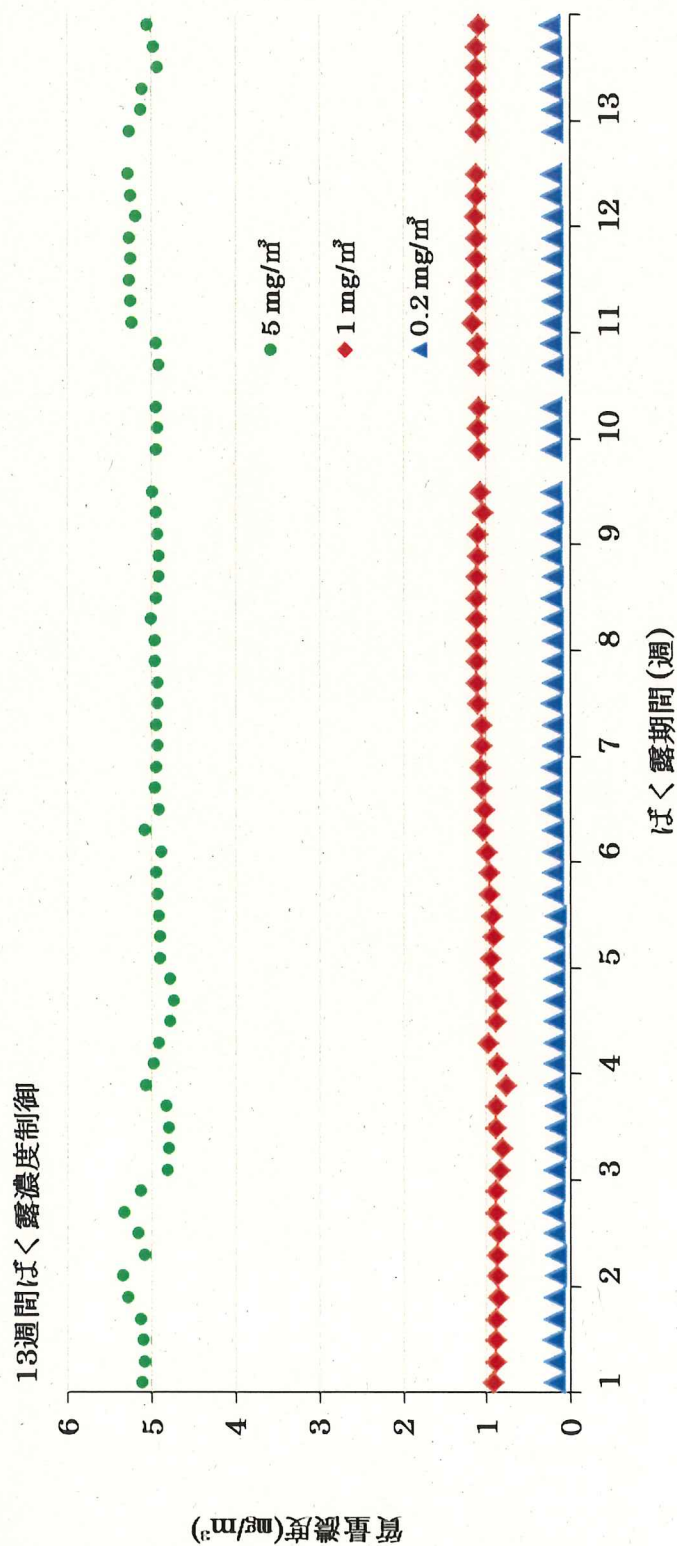
以上、0.2、1 及び 5 mg/m^3 の濃度で MWCNT を 6 時間/日、5 日/週、13 週間吸入ばく露した結果、肺の重量増加が雌雄の 1 mg/m^3 以上の群にみられた。BALF 検査により、雌雄の 0.2 mg/m^3 以上のばく露群で肺毒性が確認され、病理組織学的検査で、雄は 0.2 mg/m^3 以上、雌は 1 mg/m^3 のばく露群で肉芽腫様変化が認められた。さらに肺胞壁の限局性線維化が、雌雄の 1 mg/m^3 以上の群で認められた。本試験では最低濃度 0.2 mg/m^3 で毒性が認められたため、無毒性量(NOEL)は求められず、最小毒性量(LOEL)は 0.2 mg/m^3 であった。

本研究結果から、2 年間の発がん研究のばく露濃度を考えた場合、線維化が 1 mg/m^3 以上の群で観察されることから、最高濃度としては 1 mg/m^3 以上の濃度が望ましい。2 年にわたる MWCNT の吸入ばく露により、腫瘍の発生以外の有害な作用により動物の正常な寿命を短

縮せず、軽微な毒性兆候を引き起こし、対照群と比較して体重増加抑制が 10 % 以内である濃度、すなわち、MTD 基準^{37,38)}を満足すると濃度として、5 mg/m³は高すぎると考え、1~5 mg/m³の間の 2 mg/m³が妥当と判断した。また、本研究で実施した 0.2 mg/m³の濃度をばく露濃度を選択した場合、13 週間と 2 年間でばく露期間の違いによる毒性や肺に蓄積する MWCNT の量の比較が容易に行える利点があることから 0.2 mg/m³の濃度は中間ばく露濃度として有益であると考えた。発がん研究では、発がん性が検出できなかった場合でも最低濃度群で NOAEL が決定できたならば、慢性毒性研究として社会貢献度が大きいと考えられていることから、最低ばく露濃度は、本研究の最低ばく露濃度の 1/10 の 0.02 mg/m³を設定した。以上、発がん研究のばく露濃度は、最高濃度を 2 mg/m³として、以下公比 10 で、0.2、0.02 mg/m³とした。

4.5. 小括

全身ばく露システムを用いて雌雄の F344 ラットに 0、0.2、1 及び 5 mg/m³の濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間/日、5 日/週、13 週間ばく露した。各 MWCNT ばく露群で鼻から肺に至る呼吸器に MWCNT は沈着し、肺では肺胞マクロファージに貪食されているものがほとんどであった。MWCNT の肺胞マクロファージに対する濃度依存的な変性及び濃度依存的な肺内負荷が明らかとなった。病理組織学的観察では、肺胞壁の肉芽腫様変化及び限局性の線維化が認められた。本研究における MWCNT の NOAEL は求められず、0.2 mg/m³を LOAEL と考えた。本研究から、今回以上の長期間のばく露実験を行った場合、MWCNT は肺に継続的に負荷し続け、肺ではばく露期間を通して炎症反応が継続して引き起こされる可能性が強く示唆される。従って、肺胞への影響は 13 週間ばく露より憎悪される可能性が高い。従って、OECD テストガイドラインに則した 2 年間(104 週)の吸入ばく露による発がん研究が不可欠であると考えた。ばく露濃度は、最高濃度を 2 mg/m³、中間濃度は 0.2 mg/m³、最低濃度は 0.02 mg/m³に決定した。発がん研究については、次の第 5 章で述べる。



設定濃度	K値を用いた質量濃度	フィルターによる質量濃度
5	5.01±0.15	5.02±0.19
1	1.01±0.09	1.01±0.07
0.2	0.20±0.01	0.20±0.01

単位: (mg/m³)

個数-質量変換係数=1.76×10⁻⁶×CPM

図 4-1 吸入チャンバー内濃度

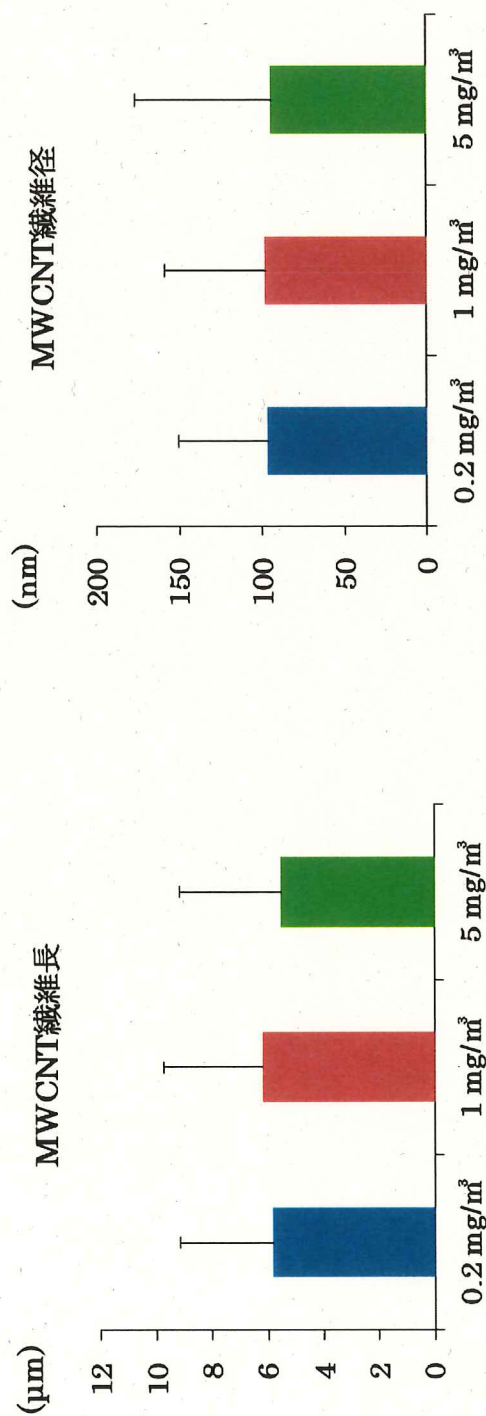
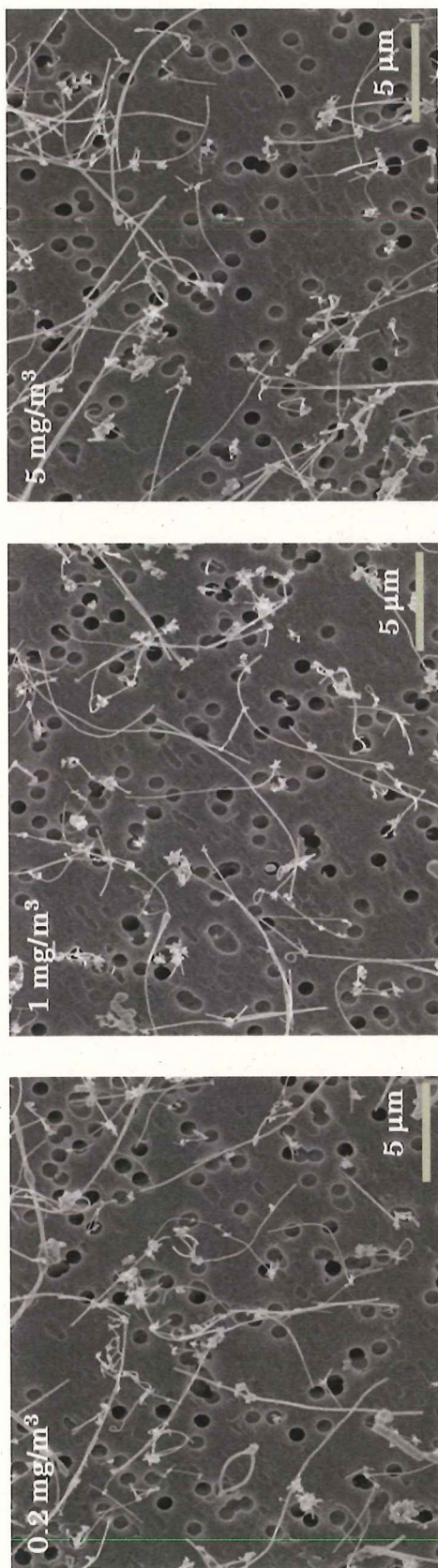
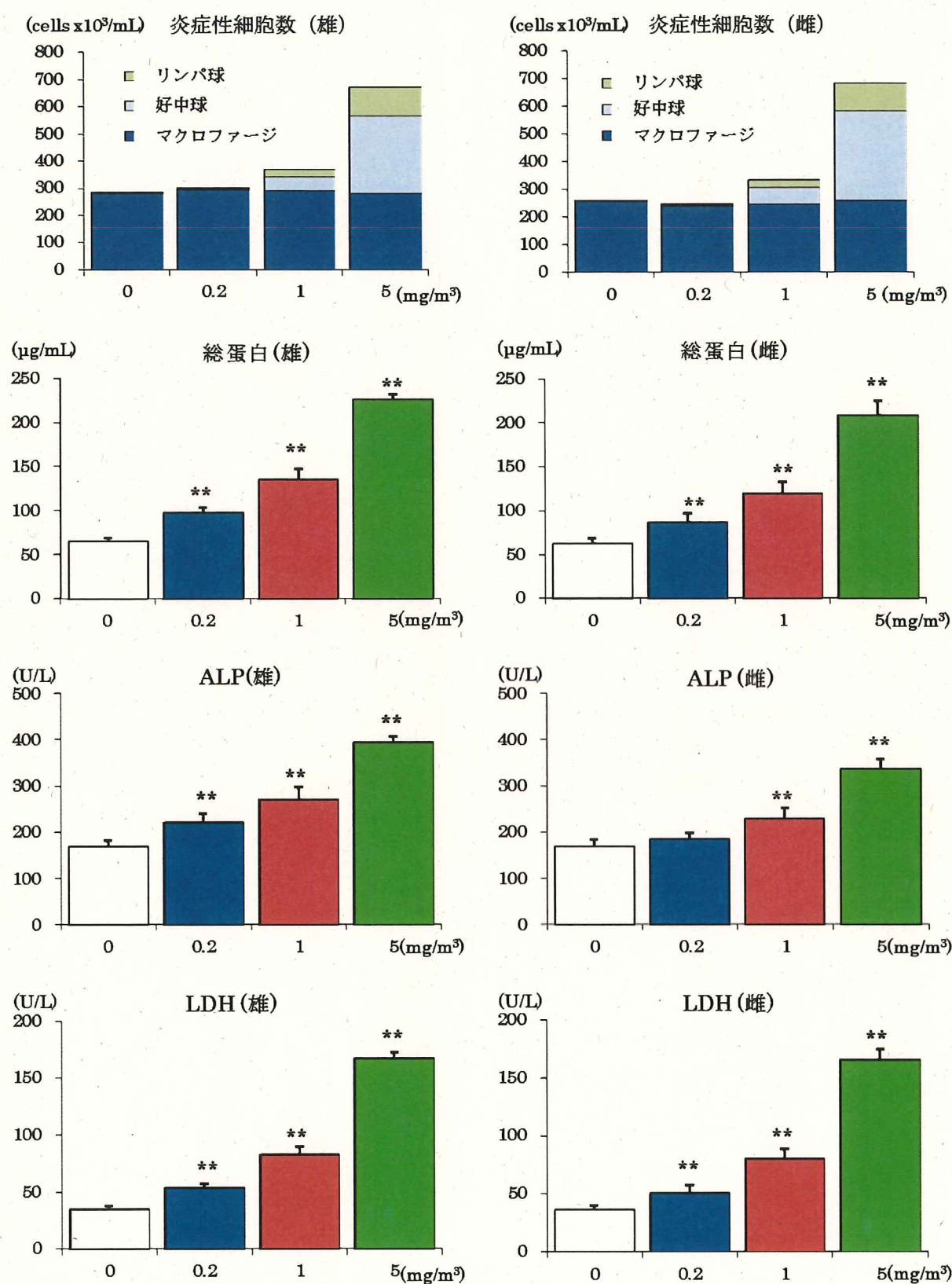


図 4-2 吸入チャンバー内 MWCNT の SEM による観察



有意差: *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

図 4-3 BALF の細胞学的及び生化学的検査

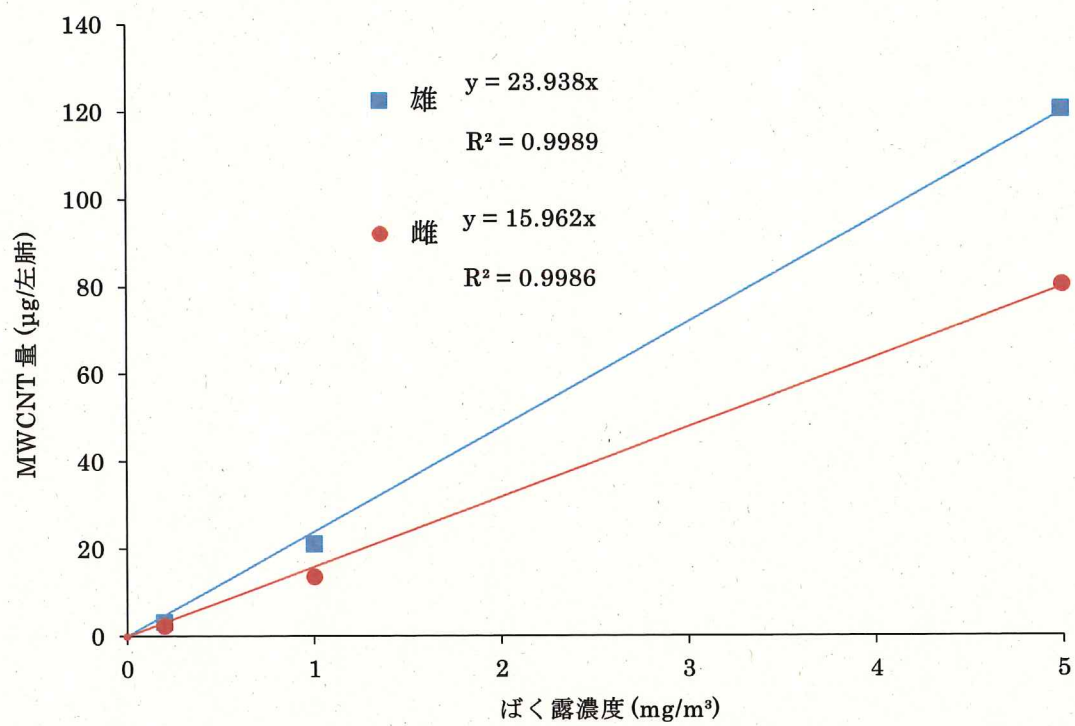


図 4-4 MWCNT 肺負荷量

表 4-1 吸入チャンバー環境、体重及び肺重量

設定濃度 (mg/m ³)	0	0.2	1	5
チャンバー温度 (°C)	21.6 ± 0.3	21.8 ± 0.4	21.7 ± 0.4	21.7 ± 0.4
チャンバー湿度 (%)	53.3 ± 1.4	52.7 ± 1.6	52.9 ± 1.7	52.8 ± 1.9
チャンバー換気流量 (L/min)	249.4 ± 2.0	249.5 ± 2.5	249.2 ± 2.5	251.8 ± 2.3
質量濃度 (mg/m ³) ^a	-	0.20 ± 0.02	1.01 ± 0.11	5.02 ± 0.25
K値を用いた変換質量濃度 (mg/m ³) ^b	-	0.20 ± 0.01	1.01 ± 0.11	5.01 ± 0.15
MMAD (GSD): 1 週 ^c	-	1.5 µm (2.7)	1.5 µm (2.6)	1.5 µm (2.3)
MMAD (GSD): 6 週	-	1.4 µm (3.0)	1.5 µm (2.7)	1.6 µm (2.5)
MMAD (GSD): 13 週	-	1.5 µm (2.6)	1.4 µm (2.9)	1.5 µm (3.0)
雄 体重 ばく露終了時 (g)	304 ± 19	291 ± 15	307 ± 25	287 ± 11
雌 体重 ばく露終了時 (g)	170 ± 12	173 ± 12	170 ± 9	174 ± 11
雄 左肺重量 解剖時 (g)	0.432 ± 0.027	0.447 ± 0.033	0.514 ± 0.076 **	0.556 ± 0.038 **
雌 左肺重量 解剖時 (g)	0.315 ± 0.012	0.333 ± 0.017	0.374 ± 0.084 **	0.418 ± 0.041 **

平均 ± 偏差

a: テフロンバインダーフィルターによる質量濃度測定

b: OPCにより計測した吸入チャンバー内個数濃度値とフィルターによる質量濃度から求めた係数(K値)により計算して求めた質量濃度

c: MMAD: 空気動学的質量中位径, GSD: 幾何標準偏差

有意差; *: p ≤ 0.05 **: p ≤ 0.01 Dunnett's 検定

表 4-2 病理組織学的検査結果

設定濃度 (mg/m ³)	雄				雌			
	0	0.2	1	5	0	0.2	1	5
検査動物数	10	10	10	10	10	10	10	10
組織所見								
鼻腔								
杯細胞過形成	0	0	10 **	10 **	0	0	10 **	10 **
エオジン好性変化：嗅上皮	1	2	10 **	10 **	1	1	10 **	10 **
エオジン好性変化：呼吸上皮	1	2	10 **	10 **	0	0	10 **	10 **
鼻咽頭								
杯細胞過形成	0	1	10 **	10 **	0	0	10 **	10 **
肺								
肉芽腫性変化	0	1	8 **	10 **	0	0	4	10 **
限局性線維化	0	0	10 **	10 **	0	0	9 **	10 **
臓側胸膜								
炎症性細胞浸潤	0	0	0	1	0	0	0	1
MWCNTの沈着								
鼻腔, 呼吸上皮	0	1	7 **	10 **	0	4	7 **	10 **
喉頭, 上皮	0	3	4	5 *	0	2	3	6 *
気管, 上皮	0	8 **	10 **	10 **	0	6 *	7 **	7 **
肺								
細気管支腔	0	10 **	10 **	10 **	0	10 **	10 **	10 **
肺胞腔	0	10 **	10 **	10 **	0	10 **	10 **	10 **
肺胞壁	0	4	10 **	10 **	0	3	10 **	10 **
肺気管支関連リンパ組織	0	7 **	10 **	10 **	0	5 *	8 **	8 **
縦隔リンパ節	0	3	10 **	9 **	0	3	6 *	10 **

数値は病変を示した動物数

有意差; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ カイ二乗検定

表 4-3 肺内 MWCNT の分析結果

設定濃度(mg/m ³)	雄(μg/左肺)	雌(μg/左肺)
0.2	3.2 ± 1.2	2.30 ± 0.2
1	21.2 ± 1.3	13.7 ± 2.2
5	120.3 ± 17.3	80.3 ± 13.7

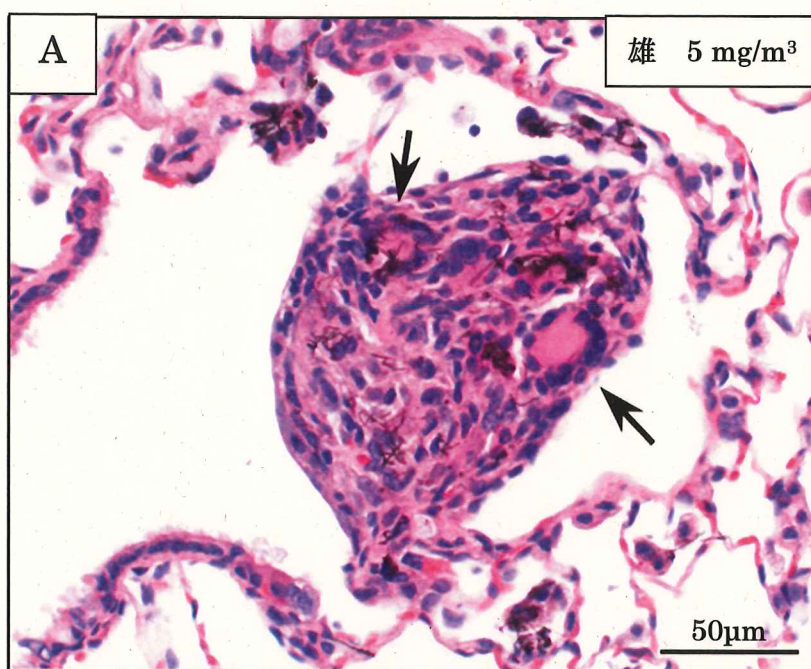


写真 4-1A MWCNT 食食マクロファージとラングハンス型類似巨細胞
から成る肉芽腫様変化
H&E 染色

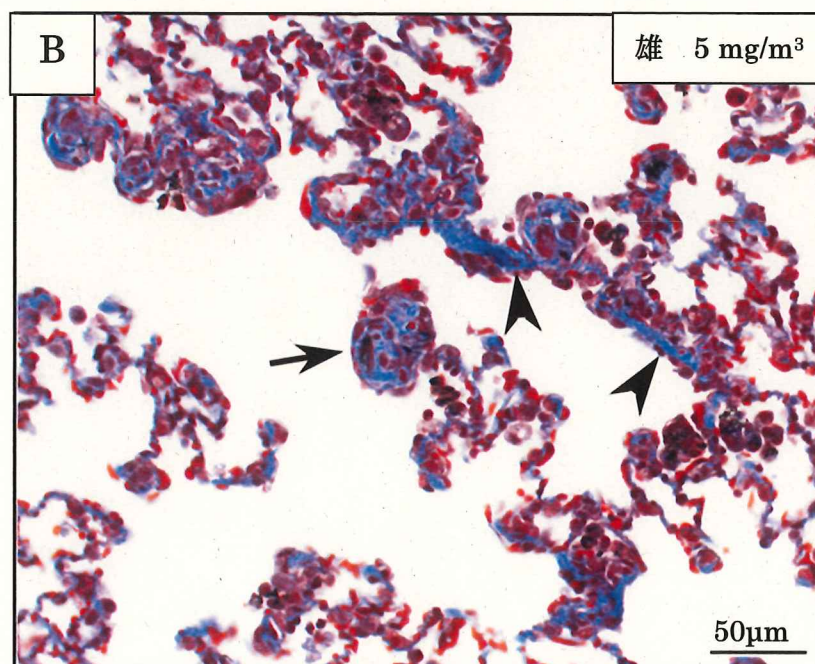


写真 4-1B 肉芽腫様変化(矢印)と肺胞管(矢頭)のコラーゲン線維増生(青色)
マッソントリクローム染色

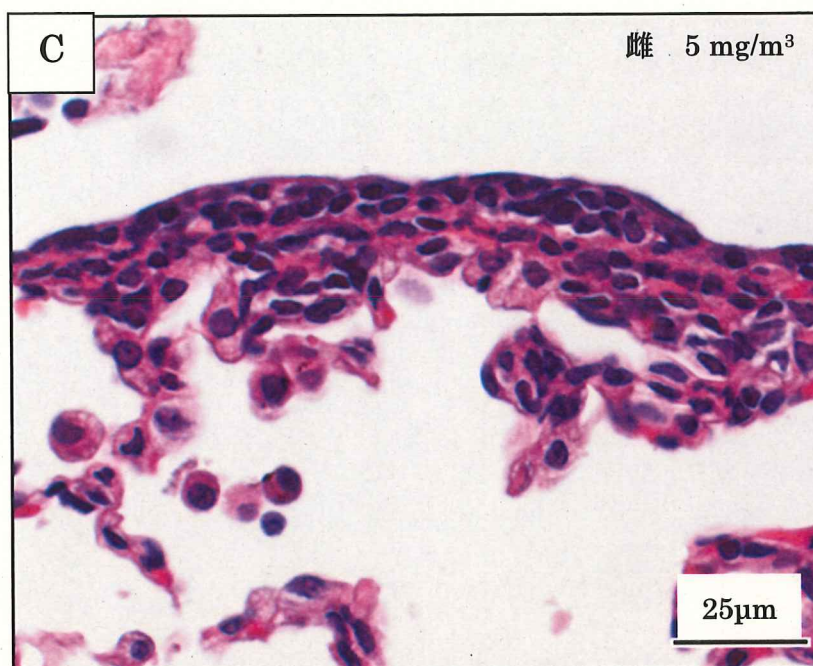


写真 4-1C 肺胸膜及び肺胸膜下領域における炎症性細胞浸潤
H&E 染色

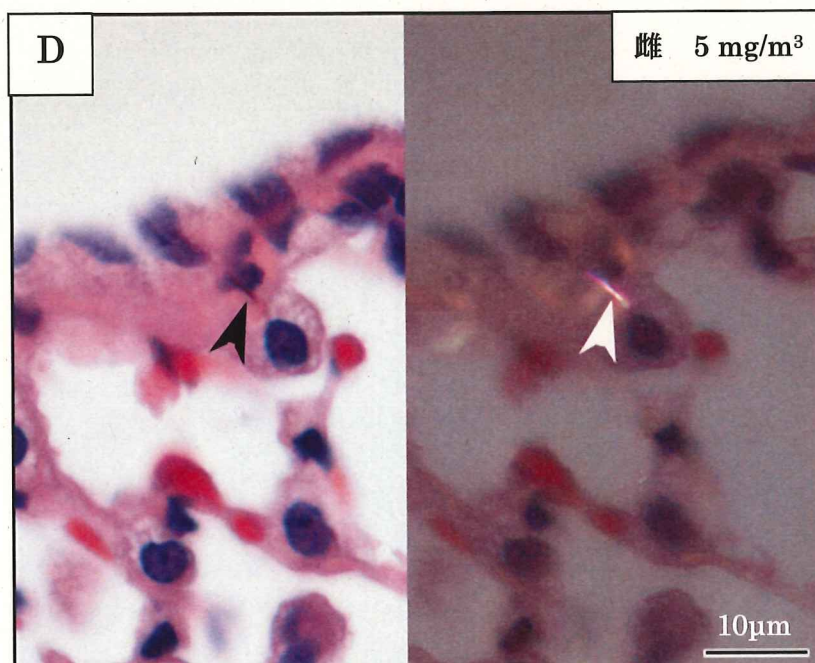


写真 4-1D 肺胸膜下領域にみられる MWCNT の沈着
H&E 染色
左側：明視野観察像、右側：偏光照射観察像

第5章 雌雄ラットを用いた2年間吸入ばく露による発がん研究

5.1. 目的

前章では、繊維状の MWCNT の亜慢性毒性を把握する目的及び発がん研究のばく露濃度を決定する目的で、ラットの雌雄に 0、0.2、1 及び 5 mg/m³ の濃度で 6 時間/日、5 日/週、13 週間(3 ヶ月)、MWCNT を吸入ばく露した結果、各ばく露群の鼻から肺に至る呼吸器に MWCNT は沈着し、肺ではほとんどが肺胞マクロファージに貪食されていた。ばく露濃度に相関した肺の重量増加、肉芽腫様変化、肺胞壁の線維化等が認められ、病変と肺の MWCNT 負荷量との間に高い相関が認められたと記述した。

この結果から、発がん研究のばく露濃度は、雌雄ともに 0、0.02、0.2 及び 2 mg/m³ と決定した。実験動物を用いた吸入ばく露による発がん研究の報告はこれまでなく、我が国においては許容濃度の勧告もなされていない。本章の研究目的は、雌雄ラットを用い、MTD(最大耐量)基準を満たした2年間(104週)の MWCNT 吸入ばく露による発がん研究を実施し、用量-発がん反応関係を明らかにすること、並びにヒトの発がんリスク評価に利用できるデータを提供することである。

5.2. 試験方法

5.2.1. 被験物質

本研究では、二つのロットの MWNT-7(Lot No. 0712230 及び Lot No. 080126)を使用した。2 年間(104 週)のばく露期間のうち、1~88 週間は Lot No. 080126 を使用し、それ以降の週は Lot No. 0712230 を使用した。繊維長と繊維径については、第4章 4.2.1.項「被験物質」で記述した通りである。

5.2.2. 使用動物及びばく露・飼育条件

4 週齢の雌雄 F344/DuCrj ラット(SPF)を日本チャールス・リバー(株)(厚木)より購入し、検疫・馴化をそれぞれ 1 週間実施した雌雄各 200 匹のラットを、群間の体重の偏りを小さくす

る群分け方法(適正層別方式)²²⁾によって、発育順調で一般状態に異常を認めなかった動物を4群(各群50匹)に群分けし、6週齢から全身吸入ばく露を開始した。動物は、ステンレス製の吊り下げ型網ケージ(150W×216D×176H mm)に個別に収容し、温度 23 ± 2 °C、相対湿度 50 ± 20 %、換気回数15~17回/時間及び12時間点灯(8:00-20:00)/12時間消灯(20:00-8:00)の明暗サイクルに維持管理されたクリーンルームに設置した吸入チャンバー内で飼育した。各ばく露群の吸入チャンバーは、温度22.9~23.0 °C、湿度52.7~53.8 %、換気流量1668~1671 L/min (10回相当の換気流量:1668 L/min)で104週間、運転維持した(表5-1)。各ばく露群の動物は、CRF-1固形飼料(30 KGy-γ線滅菌飼料、オリエンタル酵母工業(株))を全期間自由摂取させた。なお、定期解剖日前日の夕方からは絶食させた。また、飲水は、市水(神奈川県秦野市水道局供給)をフィルターろ過した後、紫外線照射し、自動給水装置により自由摂取させた。

5.2.3. 吸入ばく露濃度の設定及び吸入ばく露方法とMWCNTエアロゾルの評価法(濃度、粒度分布及び形態)

本研究のばく露濃度は、13週間吸入ばく露研究の結果から0、0.02、0.2及び2 mg/m³を設定した。最高ばく露濃度の2 mg/m³は、2年にわたるMWCNTの吸入ばく露により、腫瘍の発生以外の有害な作用により動物の正常な寿命を短縮せず、軽微な毒性兆候を引き起こし、対照群と比較して体重増加抑制が10 %以内である濃度、すなわち、MTD基準^{37,38)}を満足すると考え、設定した。中間濃度は、ばく露期間の違いによる毒性発現の差を比較するために13週間のばく露研究で設定した0.2 mg/m³を選択し、最低濃度には0.02 mg/m³を設定した。なお、対照群には、ばく露群と同じ条件で発生装置を運転し空気のみを供給した。

ばく露は、第2章2.2.項「MWCNTエアロゾル発生装置」に記述したサイクロンシープ方式によってMWCNTエアロゾルを作製し、気積10 m³のステンレス製全身ばく露型吸入チャンバーに収容した雌雄F344ラットに、6時間/日、5日/週、104週間、全身ばく露(祝祭日を除く492回)した。ばく露中のエアロゾル濃度は、第4章4.2.3.項「吸入ばく露濃度の設定及び吸入ばく露方法とMWCNTエアロゾルの評価法(濃度、粒度分布及び形態)」で記述した方

法で2週間毎にK値を求め、この値を用いてばく露中の濃度を質量変換濃度としてリアルタイムで表示した。1週間のチャンバー濃度の平均値を1プロットとして2年間の濃度-時間推移値として図5-1に示した。

粒度分布の測定は、サンプリング流量、30 L/minのMOUDIを用い13週毎に測定し、第2章2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)(3)MWCNTエアロゾルの粒度分布」で記述した方法で評価した。結果は表5-1に示した。

形態観察及び評価は、第2章2.3.2.項「発生装置の性能確認(動物未使用)(4)MWCNTエアロゾルの形態観察」で記述した方法により13週毎にSEMを用いて観察した。結果は写真5-1に示した。また、各吸入チャンバーのMWCNTを200本計測し、繊維長及び繊維径を求めた。

5.2.4. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査

表記の測定方法は、第4章4.2.4.項「生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査」に記述した内容と同様ある。ただし、肺重量については、BALF検査(左肺)を行った動物については、右肺のみ測定した。

5.2.5. 気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)

解剖時に肉眼的に単核球性白血病を示唆する所見、すなわち脾臓の腫大が認められなかった動物番号の小さい雌雄各群5匹の左肺を5 mLの培養液(MEM)で2回ずつ洗浄し、BALFを回収した。BALF液を用いて、細胞学的検査と生化学的検査を行った。測定方法は、第4章4.2.4.項「生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重、摂餌量、肺重量、気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査)、肉眼的及び病理組織学的検査」に記述した内容と同様ある。ただし、BALF中の細胞数は、多項目自動血球分析装置(XT-2000 iv シスメックス株式会社)を使用し計測した。

5.2.6. 肺内 MWCNT の分析

104 週のばく露期間途中に死亡した動物(各群雌雄 8~12 匹)及び 104 週間のばく露を行った雌雄ラット(各群雌雄 10 匹)について、第 3 章 3.2.6.項「肺内 MWCNT の分析」記述した方法で肺中 MWCNT の定量を行った。

5.2.7. 胸腔、腹腔及び肺内 MWCNT の SEM 観察

BALF の検査動物を除き、解剖時に肉眼的に単核球性白血病を示唆する所見、すなわち脾臓の腫大が認められなかった動物の胸腔を雌雄とも 8 mL の MEM で洗浄し、洗浄液を回収した。腹腔は、雌雄とも 40 mL の MEM で洗浄し、洗浄液を回収した。それぞれの溶液を遠心分離(12000 rpm(3000 g))した後、沈殿中の生体試料を Kohyama ら²³⁾の方法で完全に除去し、0.2 µm 小孔のポリカーボネート製のフィルターでろ過して、観察用試料を得た。雌雄各群 1 匹を代表として、SEM による MWCNT の形態観察を行い、本数を計測した。さらに、肺内 MWCNT の分析用として提供された肺について、Kohyama ら²³⁾の方法で 5 日間処理した試料溶液の沈殿に近い部分を採取し、0.2 µm 小孔の MILLIPORE 製のフィルターでろ過して MWCNT を SEM で観察した。また、雌雄各群 1 匹を代表として肺内 MWCNT を 200 本計測し、繊維長及び繊維径を求めた。

5.2.8. 統計検定及び解析

体重、摂餌量、肺重量、BALF、病理組織学所見の統計検定と解析法は第 4 章 4.2.6.項「統計検定及び解析」に記述した内容で行った。生存曲線は Kaplan-Meier 法³⁹⁾によってプロットし、雌雄それぞれのばく露群と対照群間の統計学的有意差を、log-rank 法⁴⁰⁾を用いて検定した。なお、腫瘍性病変の発生率は、用量相関性と生存期間を考慮した Peto 検定⁴¹⁾及び対照群との発生率の比較は Fisher 検定により解析した。また、統計学的には有意差を示さないが、生物学的に意味のある腫瘍の発生増加については、日本バイオアッセイ研究センターのヒストリカルコントロールデータ(1987 年から 2016 年までの 29 年間に実施された、げっ歯動物を用いた 2 年発がん性試験における対照動物にみられた腫瘍の自然発生率の集計データ)

の腫瘍の最大発生率等と比較して評価した。各検定は5%の有意水準で、Peto検定、Fisher検定は片側検定、その他の検定は両側検定を行い、検定結果を表示する場合には5及び1%の有意水準の表示を行った。

5.2.9. 遵守規定及びテストガイドライン等

本発がん研究は、OECD GLP¹⁴⁾及びOECD化学品テストガイドライン451「発がん性試験」(OECD, 2009)⁴²⁾に準じて行い、第2章2.3.7.項「遵守規定及びテストガイドライン等」で記述した、指針、基準及び法令を遵守し動物を取り扱った(試験番号:0800)。

5.3. 結果

5.3.1. ばく露環境(濃度制御及び粒度分布)

0.02、0.2及び2 mg/m³に設定した吸入チャンバー濃度(変換質量濃度)の測定結果は、それぞれ0.020 ± 0.001、0.204 ± 0.014、2.018 ± 0.069 mg/m³であった。設定濃度で安定したばく露が確認された(図5-1、表5-1)。エアロゾルの分散性の指標であるMMAD(GSD)は1.2~1.4 µm(2.6~3.0)となり、エアロゾルの粒子径及び分散に濃度及びサンプリング時期の違いによる差はみられなかった(表5-1)。ばく露群の吸入チャンバーからサンプリングしたMWCNTは、SEM観察により繊維状のものが多く認められ、ばく露期間中各ばく露群に差はみられなかった(写真5-1)。ばく露群の吸入チャンバーから採取し計測したMWCNTの繊維長平均(200本計測)は5.4~5.9 µm、直径(200本計測)は92.9~98.2 nmであり、チャンバー間に差はなく、また、ばく露に使用したMWCNT試料との差もなかった。

5.3.2. 生存率、一般状態(臨床症状)観察、体重及び摂餌量

生存率は、対照群及びばく露群の間に差はみられなかった(図5-2、表5-2)。ばく露期間最終週の生存率は、雄は、0 mg/m³(対照群)72%、0.02 mg/m³群84%、0.2 mg/m³群76%、2 mg/m³群74%であり、雌は対照群で84%、0.02 mg/m³群68%、0.2 mg/m³群78%、2 mg/m³群72%であった。対照群及びばく露群に毒性所見は観察されなかった。体重については、順

調な体重増加が認められたが、雌の 2 mg/m³ 群でばく露最終盤に僅かな体重の低値がみられた(図 5-3)。各群のばく露期間最終体重を対照群の値を基準(100 %)として表すと、雄の 0.02 mg/m³ 群は対照群の 98 %、0.2 mg/m³ 群は 102 %、2 mg/m³ 群は 100 %であり、雌は同じく 0.02 mg/m³ 群で 95 %、0.2 mg/m³ 群で 100 %、2 mg/m³ 群で 94 %であった(表 5-2)。摂餌量についても、104 週間のばく露期間中に対照群及びばく露群との間に差は認められなかった。

5.3.3. 肺重量、肉眼的及び病理組織学的検査

雄は 0.2 mg/m³ 以上の群、雌は最低濃度の 0.02 mg/m³ 群から肺の重量増加が認められた。雌雄とも 2 mg/m³ 群の増加が顕著であり、雄は対照群の 1.8 倍、雌は同じく 2.1 倍であった(表 5-2)。

104 週間のばく露終了時の解剖における肉眼的観察では、雌雄の 0.2 mg/m³ 以上の群で肺の結節が観察された。雌雄の 2 mg/m³ 群では、これに加え、肺の白色斑が全葉に散在状にみられ、肺は黒色調(写真 5-2B)を示した。なお、ばく露期間の途中で死亡した動物においても肺に白色斑や黒色調を呈する変化が認められたが、肺の結節は観察されなかった。

病理組織学的検査(表 5-3)では、腫瘍性病変として、雌雄の 2 mg/m³ 群及び雄の 0.2 mg/m³ 群で肺の細気管支-肺胞上皮癌(表 5-3、写真 5-3C,D)の発生増加がみられた。これらの群では、細気管支-肺胞上皮腺腫と細気管支-肺胞上皮癌を合わせた発生数が有意に増加した。その他、肺の扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び腺癌(低分化)等が雌雄の 2 mg/m³ 群の少数例にみられた。

また、非腫瘍性病変(表 5-3)として、雌雄の 2 mg/m³ 群で肺の細気管支-肺胞上皮過形成、異型過形成(写真 5-2E)、肺胞上皮(Ⅱ型)過形成、気管支上皮(気管支終末部)過形成、マクロファージの浸潤、肺胞壁の限局性線維化、肉芽腫様変化、及び肺胸膜(臓側胸膜)の限局性線維化の発生増加が認められ、さらに雄では壁側胸膜の中皮単純過形成(写真 5-2F)及び限局性線維化の発生増加も観察された。これらのうち肺胞壁の限局性線維化と肉芽腫様変化は、雌雄の 0.2 mg/m³ 群でも発生の増加が認められ、さらに雄では、細気管支-肺胞上皮過形成及び肺胞上皮(Ⅱ型)過形成の発生増加もみられた。肺胞壁の限局性線維化と肉芽腫様変化は、少数例

ながら雌雄の 0.02 mg/m³ 群でも認められた。

肺胞マクロファージに関しては、MWCNT を貪食した細胞に変性及び膨化が認められ、この変化はばく露濃度依存的であった。細胞形態学的には、細胞質内に空胞を持つ小腔が充満していること、一部の肺胞マクロファージでは、MWCNT を貪食した状態で細胞質が消失し、その細胞死が認められていたことが特徴的であった。

その他の臓器・器官には肉眼的変化及び病理組織学的変化は観察されなかった。

5.3.4. 気管支肺胞洗浄液(BALF)検査(細胞学的及び生化学的検査) (図 5-4)

BALF 検査の細胞学的検査では、雌雄の 2 mg/m³ 群で、好中球、リンパ球及び好酸球の増加が認められ、雌には肺胞マクロファージ数の増加も認められた。生化学的検査では、雌雄の 0.2 mg/m³ 以上の群で、肺血管透過性の増大を示す総蛋白並びに細胞障害性を示す逸脱酵素の LDH 及びⅡ型肺胞上皮の障害性の指標となる ALP の増加が認められた。

5.3.5. 肺内 MWCNT の分析

104 週のばく露期間途中で死亡した動物の肺の MWCNT の分析結果を図 5-5 と表 5-4 に示す。ばく露回数に対応した肺内 MWCNT の負荷が認められた。104 週間のばく露を行った動物の肺 MWCNT の分析結果を図 5-6 及び表 5-4 に示す。ばく露濃度と MWCNT の負荷量に良好な相関性が認められた。肺当たりの負荷量は、雄が雌より高かったが(図 5-6A)、体重 1 g あたりに補正すると雌雄同程度であった(図 5-6B)。

5.3.6. 胸腔、腹腔及び肺内 MWCNT の SEM 観察

SEM を使用して試料中に含まれる本数を計測した結果、MWCNT 1 µg 中には、 9.03×10^6 本の MWCNT が存在することが明らかとなった。

胸腔、腹腔及び肺で認められた MWCNT の SEM 観察結果を写真 5-3A~D に示す。

肺組織を完全に溶解して、SEM で観察した結果、10~20 µm の球状を呈する MWCNT の集合体が、濃度依存的に認められた(写真 5-3B)。吸入チャンバーでは観察されない MWCNT

の形状であることから肺胞マクロファージに貪食されたためこのような形状となったと判断した。各ばく露群の肺で認められた MWCNT の平均繊維長(200 本計測)は、5.8~5.9 μm で、MWCNT 試料及び吸入チャンバー(5.4~5.9 μm)で採取したものと大差はなかった。一方、繊維径(200 本計測)は 95.5~109.6 nm で MWCNT 試料及び吸入チャンバー(92.9~98.2 nm)の計測値より、若干大きくなったが、その差は 10 nm 程度であり差は大きなものとは考えなかった。

ばく露濃度、肺癌の発生例数とともに総本数を示す(表 5-5)。試料 1 μg 中の MWCNT の本数(9.03×10^6 本)及び本章 5.3.5.項「肺内 MWCNT の分析」で求めた各ばく露群の雌雄の肺内 MWCNT 負荷量(μg)から肺 MWCNT の総本数を算出すると、0.02 mg/m^3 群の雄では 0.09×10^9 本、雌は 0.07×10^9 本、0.2 mg/m^3 群の雄は 1.38×10^9 本、雌では 1.07×10^9 本、2 mg/m^3 群の雄は 16.2×10^9 本、雌は 10.4×10^9 本と求められた。

表 5-6 に胸腔及び腹腔中の MWCNT の本数を示す。胸腔及び腹腔では、最低濃度の 0.02 mg/m^3 から濃度に対応して MWCNT が認められた。観察された MWCNT は、繊維長約 5 μm 、繊維径約 70nm の繊維状のものがほとんどであった。この観察により全ばく露群で胸腔及び腹腔に MWCNT が到達したことが明らかとなった。

5.4. 考察

発がん研究の実施を目標として開発した MWCNT エアロゾル発生装置を用いて、0.02、0.2 及び 2 mg/m^3 の濃度で雌雄ラットに MWCNT を 104 週間ばく露した結果、雌雄に肺癌が認められ、肺発がん性を明らかにした。吸入チャンバー環境及びばく露濃度は、104 週間、設定値通りに維持された。粒度分布の測定及び形態観察からは、ばく露濃度及びサンプリング時期の違いによる差は認められず、等分散した MWCNT が認められた。104 週間、精度よく MWCNT のばく露が行えた。

104 週間の MWCNT ばく露により、肺癌及び腺腫を合わせた腫瘍の発生は、雄では 0.2 mg/m^3 以上の群、雌では 2 mg/m^3 群で増加した。また、細気管支-肺胞上皮由来で腫瘍の前段階と考えられる異型過形成や細気管支-肺胞上皮細胞過形成^{43,44,45)}も腫瘍の発生した群で

同様に増加した。これらに加えて、雄では、腺扁平上皮癌、雌では、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌が少数例認められた。これらの腫瘍は、いずれも当センターのヒストリカルコントロールデータではみられない稀な腫瘍であった。従って、肺癌(細気管支-肺胞上皮癌、扁平上皮癌、腺扁平上皮癌及び低分化型腺癌)の発生増加は雌雄のラットに対する発がん性を示す証拠と考えた。

非腫瘍性病変については、雌雄ともばく露濃度に対応して肺胞壁の限局性線維化及び肉芽腫様変化の増加がみられ、 0.2 mg/m^3 以上の群で有意な増加を示した。これらの変化は本研究に先立って行った13週間吸入ばく露研究(第4章)においてもみられたMWCNTばく露に特有の変化であった。

壁側胸膜では、限局性線維化と中皮の単純過形成が 2 mg/m^3 群の雄で増加し、雌でも少数例に観察された。また、中皮の単純過形成は横隔膜や縦隔の表面を覆う中皮に観察され、その多くは炎症性細胞浸潤を伴っていた。胸腔洗浄液中では、ばく露濃度に相関してMWCNTの本数の増加が認められた。

解剖時の肉眼的観察では、雌雄の 0.2 mg/m^3 以上の群で肺の結節が観察され、さらに、雌雄とも 2 mg/m^3 群に肺の散在性の白色斑や黒色調変化が全葉にみられた。肺の結節のほとんどは病理組織学的検査で肺腫瘍であったが、一部の結節は他臓器腫瘍からの転移であった。肺の白色斑は胸膜の線維性肥厚や肺胞腔内へのマクロファージ浸潤に対応する変化であり、肺の黒色斑はMWCNTの沈着に対応した変化であった。雄の 0.2 mg/m^3 以上の群及び雌の 2 mg/m^3 群における肺重量の増加は、腫瘍、肺胞マクロファージ浸潤、肺胞壁の線維性肥厚等の肺の病理組織学的変化に対応するものと考えた。しかし、雌の 0.2 及び 0.02 mg/m^3 群の肺重量の増加に対応する病理組織学的変化はみられなかった。

MWCNTの発がん性、特に中皮腫の発生に関しては、p53遺伝子欠損マウスを使用した腹腔内¹¹⁾やF344ラットの陰嚢腔への投与¹²⁾によって報告されている。また、最近、Wistarラットの腹腔内へ長さや形態が異なる4種類のMWCNTを投与した結果、いずれのMWCNTにおいても腹膜中皮腫が発生したと報告された⁴⁶⁾。

さらに、Suzuiら⁴⁷⁾によってラットへの気管内投与による肺癌及び中皮腫の発生が発表さ

れた⁴⁷⁾。繊維長 4.2 μm 、繊維径は 30~80 nm の MWCNT(MWCNT-N (Nikkiso 製))試料を使用し、これを目開き径 25 μm の篩を使い、篩を通過した MWCNT(平均繊維長 2.6 μm)と篩上に残った 2.6 μm より長い MWCNT (繊維長の測定はなし) に分画した。なお、分画しても繊維径は 30~80 nm のままであった。3 種類の長さ(篩無処理、篩通過、篩残)の MWCNT をそれぞれラットに 125 μg /匹の用量で 2 週間に合計 8 回、気管内投与(総投与量 1 mg)し、109 週間飼育した。繊維長の違いによらず肺に腺癌の発生増加が認められ、篩無処理群では 4 匹/12 匹、篩通過群では 3 匹/12 匹、篩残群では 7 匹/14 匹であった。中皮腫の発生は、篩無処理群では 3 匹、篩通過群では 3 匹に認められ、篩残群では 0 匹と報告されている。

吸入ばく露による発がん研究については、我々の他に、腫瘍イニシエータの methylcholanthrene を前投与したマウスに 5 mg/m^3 の濃度の MWCNT(MWNT-7 保土谷化学)を 15 日間繰り返し吸入ばく露し、そのまま 17 ヶ月間飼育した結果、肺の腺癌の発生が促進したとの報告が NIOSH からなされているが、コントロール群及び MWNT-7(5 mg/m^3)単独ばく露群には腫瘍の増加は認められなかった¹³⁾。

以上のように、肺腫瘍は吸入ばく露及び気管内投与により認められた。肺腫瘍について、我々のデータと Suzui ら⁴⁷⁾、NIOSH¹³⁾ の研究結果を比較した。我々と Suzui らは、ラットを使用し、NIOSH はイニシエータを前投与したマウスを使用した。また、我々と NIOSH は吸入ばく露で、Suzui らは気管内投与である。投与(ばく露)期間は、我々は 104 週間の連続ばく露で、Suzui ら及び NIOSH は、短期間の投与(ばく露)を行った後、無処置のまま長期間飼育した。肺負荷量については、我々の研究において癌の認められた雄の 0.2 mg/m^3 では、152.4 μg /肺と求め、MWCNT の本数を 1.38×10^9 本/肺と算出した。また、Suzui らは、109 週で 268~486 $\mu\text{g}/\text{g}$ 肺、NIOSH は、15 日ばく露後は 31.2 μg /肺と報告したが、17 ヶ月後は明らかにされていない。Suzui らの負荷量は、我々の研究で癌の認められた 152.4 μg /肺(1g 当りの肺重量に補正すると 101.5 $\mu\text{g}/\text{g}$ 肺)を超えた。肺で観察された MWCNT の繊維長は、我々は 5.8~5.9 μm 、Suzui らは 2.0~3.2 μm 、NIOSH は計測しておらず不明であった。これらのことから、ラットの肺発がんには、大量の肺負荷が必要であることが示され、MWCNT の肺の長期間の滞留性が肺癌の発生に深く関係することが示された。繊維長については、5

μm 以上の長さは必須ではないことが示唆された。

一方、中皮腫は、中皮に覆われた腹腔や陰嚢腔への直接投与により発生し^{11,12,46)}、気管内投与でも発生することが報告された⁴⁷⁾。しかし、吸入ばく露では認められなかった。これまで、5 μm 以上の長さの繊維の発がん性は強い^{8,9,10)}といわれてきたが、Suzui ら⁴⁷⁾の報告では平均繊維長 2.6 μm の MWCNT の気管内投与で発生しており、2.6 μm より長い群では発生しなかった。これに関し彼らは、短い MWCNT は胸腔移行しやすく、長い MWCNT はそうではないことを推察している。実験初期の大量投与とその後の 100 週間以上の長期にわたる飼育期間により、多くの MWCNT が胸腔に移行したとも推察されるが、その経路及び移行量は不明である。吸入ばく露による我々と NIOSH の研究では中皮腫の誘発は認められなかった。特に我々の研究で、胸腔及び腹腔から採取した MWCNT の本数は、 10^3 本レベルで、肺の $1/10^6$ 程度であった。腹腔内へ長さや形態が異なる 4 種類の MWCNT を腹腔内へ投与した結果、いずれの MWCNT においても腹膜中皮腫が発生した⁴⁸⁾との報告がある。興味深いことに中皮腫の発生は 1×10^9 本から 5×10^9 本の投与で 40~100 %であった。以上、中皮腫の発生においても、大量の MWCNT が必要であると推察された。

本研究で用いた MWCNT は直線性の繊維状構造を持ち、表面の化学的性質は異なるが、細くて長い形状や機械的強度等の物理学的特徴は、アスベストに類似している。アスベストの雄ラットを用いた吸入ばく露による発がん研究では、肺腫瘍及び中皮腫の発生が報告されており、発生した肺腫瘍の種類は、アモサイトでは腺腫、腺癌、扁平上皮癌及び分類不能肺癌⁴⁸⁾、クリソタイルでは腺腫、腺癌、扁平上皮癌⁴⁹⁾である。本研究もこれらと同様な肺の腺腫及び癌の発生が示され、アスベストとの類似性が認められた。一方、胸膜中皮腫の発生は、アモサイトやクリソタイルの投与で少数認められているが、我々の研究では、その発生はなかった。アスベストでの発がん性には繊維長や生体耐久性が最も重要であると考えられているが^{49,50)}、この他にも、組成、例えばマグネシウムや鉄等の金属の含有量も発がんに影響すると考えられている^{48,49)}。今回、我々の使用した MWCNT(MWNT-7)は、製造過程の最終段階で 2500 °C に昇温され、最外層のグラフェンに不純物として含まれる鉄等の金属は取り除かれると推察される^{3,17,18)}。従って、細胞においては、接触時の MWCNT からの金属の溶

出やイオンによる毒性影響を無視でき、化学反応よりも長さ、太さ、強度等の物理的な反応を出発点として毒性反応は惹起されると考えられる。

マクロファージを含む肺組織を完全に溶解して、観察した結果、直径 10~20 μm の MWCNT からなる球状の塊が濃度依存的に観察され、MWCNT の肺胞マクロファージによる貪食状態が把握できた。MWCNT は、これまで行った単回から 13 週間のばく露研究でも肺胞マクロファージに貪食されていたが、貪食時の状態を SEM で観察したのは今回が初めてである。MWCNT は、肺胞マクロファージに巻き込まれるような形態で観察されていることから、マクロファージの貪食運動によって形が変わる程度の柔軟性も明らかとなった。これまで MWCNT による肺胞マクロファージ及び肺胞に対する毒性については、その長さや硬さによって肺胞マクロファージが完全に貪食できない、いわゆる不完全貪食によるストレス状態が長く続くことによって^{50,51)}、肺胞マクロファージは、内包するサイトカイン類や ROS 種を放出することで肺上皮細胞に障害を与えると考察されてきた^{51~55)}。BALF 検査及び病理組織学的観察では、MWCNT を貪食した肺胞マクロファージに細胞変形や膨化が認められ、細胞質内に空胞を持つ小腔が充満していること、MWCNT を貪食した状態で細胞質が消失し、細胞死が認められることが特徴的で、この変化はばく露濃度依存的であった。今回の SEM による観察並びに BALF 検査及び病理組織学的観察結果を総合して考えると、MWCNT を完全に貪食したマクロファージであっても、過剰に貪食したものは、ストレス状態となりうることが示唆され、繊維長のみならず量による毒性発現の可能性が強く示唆された。

アスベストのみならず、生体内で耐久性があり細くて長い繊維状物質は、化学組成や結晶構造に関係なく発がん性を持つとされるいわゆるスタントン・ポットの仮説は広く浸透している^{8,9,10)}。また、国際がん研究機関/International Agency for Research on Cancer(IARC)では、健康影響に重要な意味を持つ人造鉱物繊維の浮遊性粉じんの大きさは、概ね長さ 5 μm 以上、太さ 3 μm 未満、長さとの太さの比(アスペクト比)は 3 : 1 以上と考えている⁵⁶⁾。本研究では、肺で認められた MWCNT の平均繊維長は 5.8~5.9 μm であり、上記の繊維長仮説を支持する結果となった。しかし、MWCNT で肺癌が発生した本数は、 10^9 本レベル以上の大量が必要であった。また、肺では、MWCNT は肺胞マクロファージに貪食され、その中で「ぐ

るぐる巻き」にされている状態で観察された。がん化には、繊維を不完全食食し、ストレス状態となった肺胞マクロファージから放出されるサイトカイン類や ROS 種の影響が考えられるが、詳細な肺がんの発生機序は未だ不明である。本研究からは、MWCNT の肺発がんには、5 μm 以上の十分な長さ、 10^9 本以上の量、2 年間という長い時間が必要であることが結論され、かつ、MWCNT を大量食食した肺胞マクロファージはストレス状態となり得、これが発がんに関与することが示唆された。

本研究からは、既存の遺伝毒性データを加味し、発がん性についての NOAEL を雌雄ラットで肺癌が認められなかった 0.02 mg/m^3 と決定した。一方、US EPA の Benchmark dose software(ver. 2.6)(US EPA, 2015)⁵⁷⁾ を利用して、ラットのばく露濃度と肺癌率(肺癌物数/全動物数)のデータを線形多段階モデル(linearized multistage model)に適用し、ベンチマーク用量(BMD)を求めた。ベンチマーク用量の優れた点は、実際の実験用量である NOAEL/LOAEL と違い実験用量に依存しないこと及び NOAEL/LOAEL が求められなくても数理モデルと直線の傾き(発がんスロープファクター)から数値を算出できることである。US EPA Software より過剰腫瘍発生推定用量 BMDL₁₀ は、0.01 mg/m^3 と算出された。一般毒性については、雌の肺重量の増加が 0.02 mg/m^3 群で認められたこと並びに雌雄の 0.02 mg/m^3 群で肺の限局性線維化及び肉芽腫様変化、胸膜の限局性線維化が認められたことから、NOAEL は求められず、LOAEL を 0.02 mg/m^3 とした。

以上、MWCNT を 0、0.02、0.2 及び 2 mg/m^3 の濃度で 2 年間(104 週)にわたり雌雄の F344/DuCrI Crj ラットに全身ばく露した結果、雄では 0.2 mg/m^3 以上の群、雌では 2 mg/m^3 群で肺の悪性腫瘍(癌)の発生増加が認められた。従って、MWCNT (MWNT-7) はラット雌雄への全身ばく露により明らかながん原性を示した。発がん性については、雄ラットの肺癌をエンドポイントとして NOAEL を 0.02 mg/m^3 であると決定した。一般毒性については、雌の肺重量の増加及び雌雄の肺の病理組織学的変化をエンドポイントとして LOAEL を 0.02 mg/m^3 とした。

5.5. 小括

雌雄の F344 ラットに 0、0.02、0.2 及び 2 mg/m³ の濃度で MWCNT エアロゾルを 6 時間/日、5 日/週、104 週間(492 回)全身ばく露した結果、雄では 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 2 mg/m³ の群で明らかな肺癌の発生増加が認められた。また、肺癌及び腺腫を合わせた腫瘍の発生も雄では 0.2 mg/m³ 以上の群、雌では 2 mg/m³ 群で増加した。腫瘍の前段階と考えられる異型過形成や細気管支-肺胞上皮細胞過形成も腫瘍の発生した群で同様に増加した。しかし、胸膜中皮腫の発生は認められなかった。胸腔では、限局性線維化と中皮の単純過形成が 2 mg/m³ 群で増加したのみであった。

発がん性の NOAEL は、雄ラットの肺癌をエンドポイントとして、0.02 mg/m³ であると決定した。一般毒性の LOAEL については、雌の肺重量の増加が 0.02 mg/m³ 群で認められたこと並びに雌雄の対照群では観察されなかった肺の限局性線維化、肉芽腫様変化及び胸膜の限局性線維化が 0.02 mg/m³ 群で認められたことから、0.02 mg/m³ とした。

MWCNT(MWNT-7)の肺がんについては、MWCNT の(1) 5 µm 以上の十分な長さ、(2) 2 年のばく露期間、(3) 10⁹ 本以上の量が必要であったと結論した。

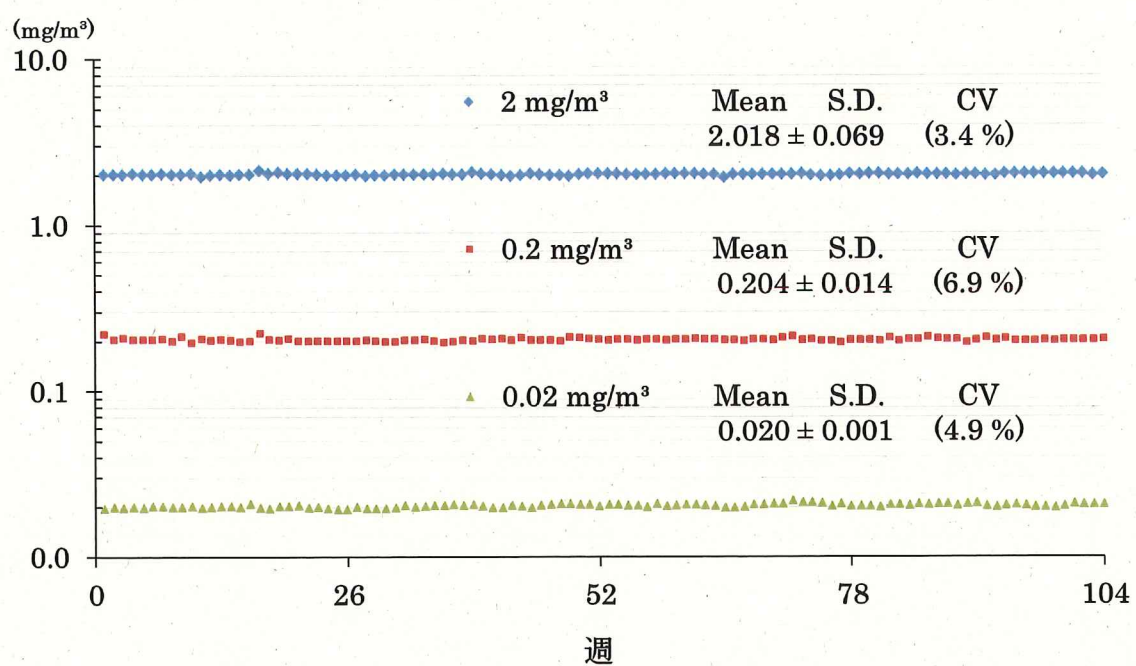
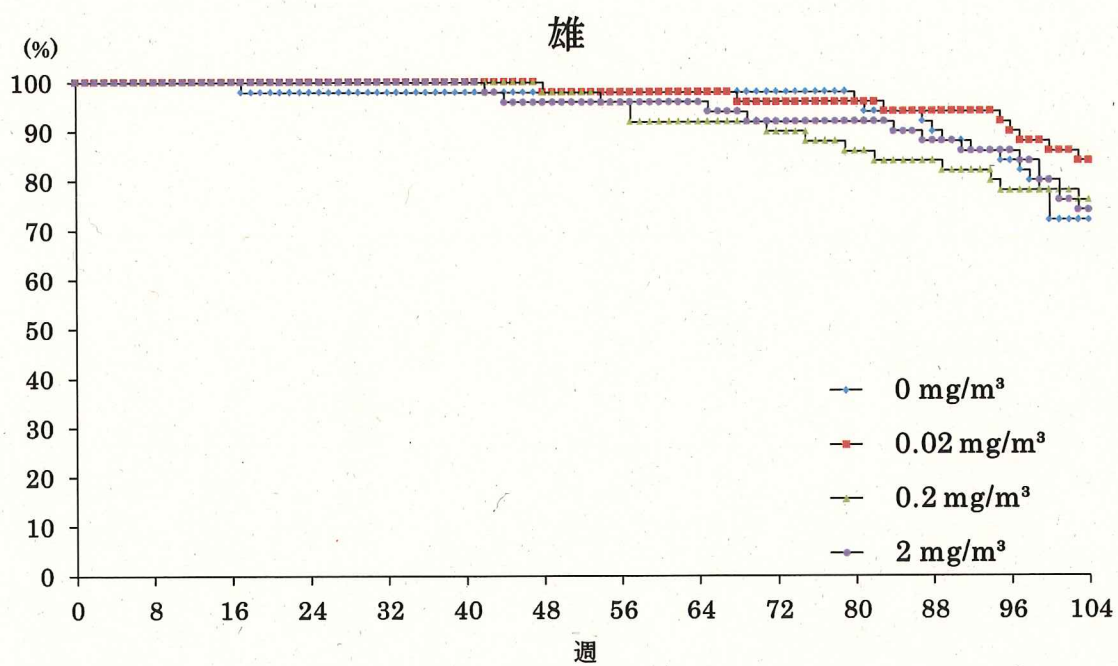


図 5-1 吸入チャンバー内濃度

A



B

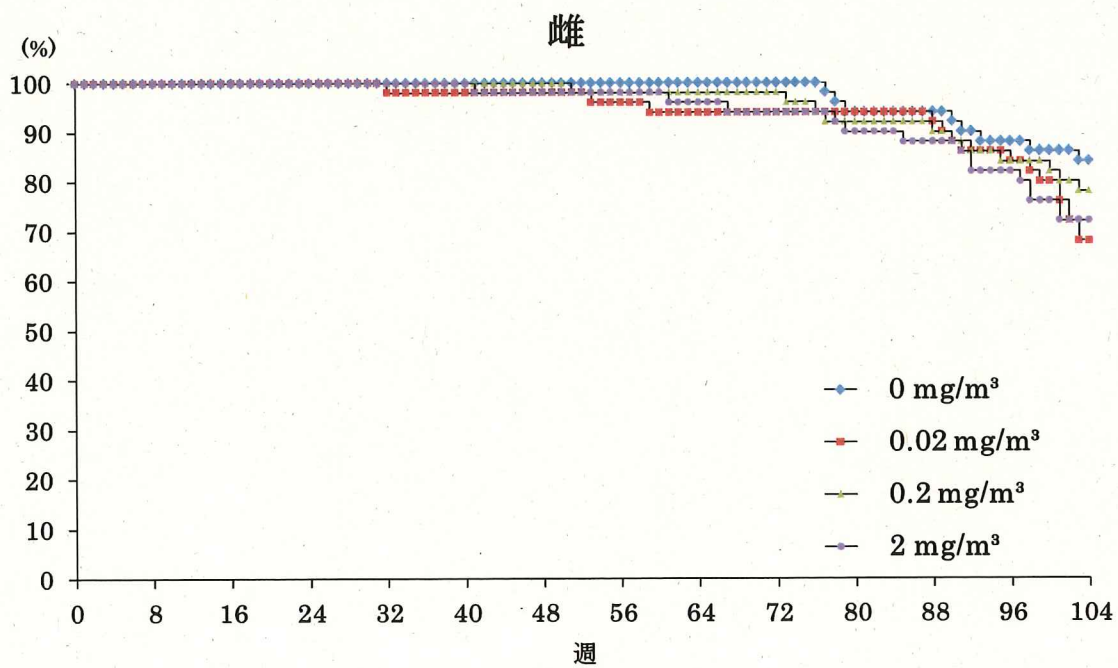
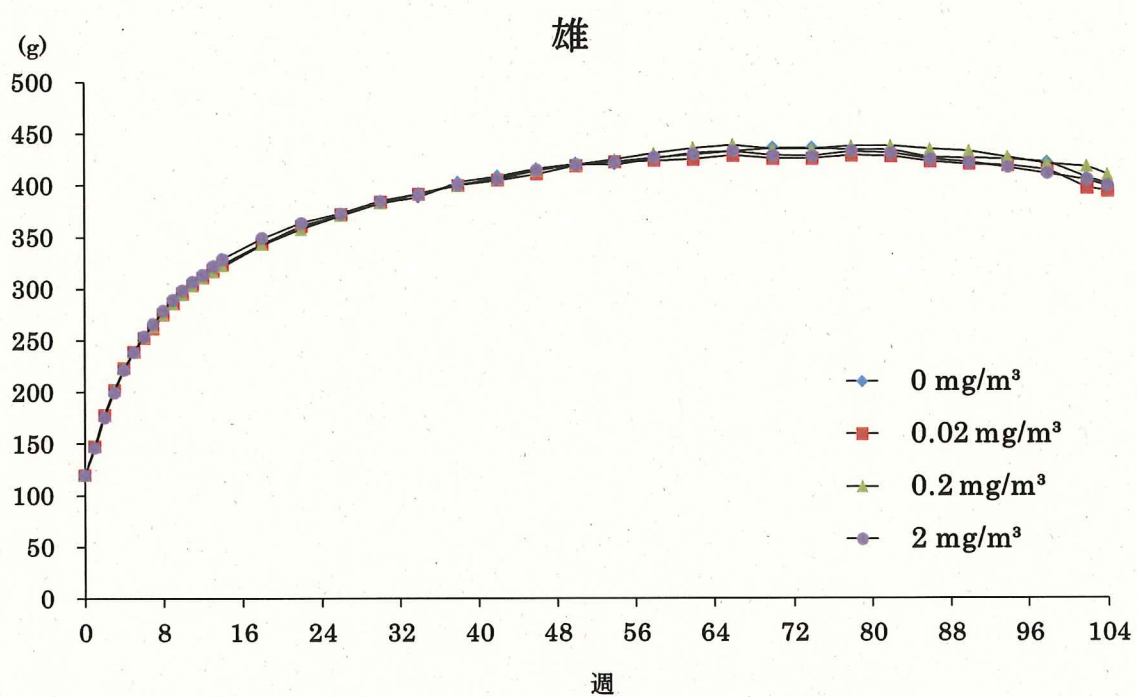


図 5-2 生存率

A



B

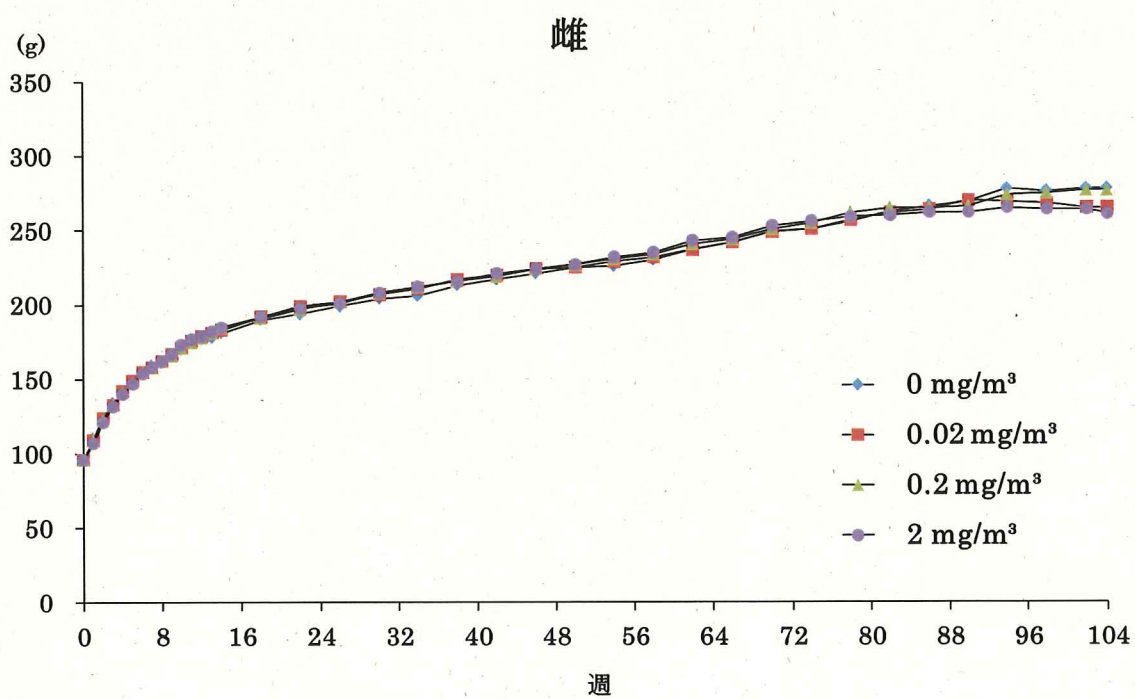
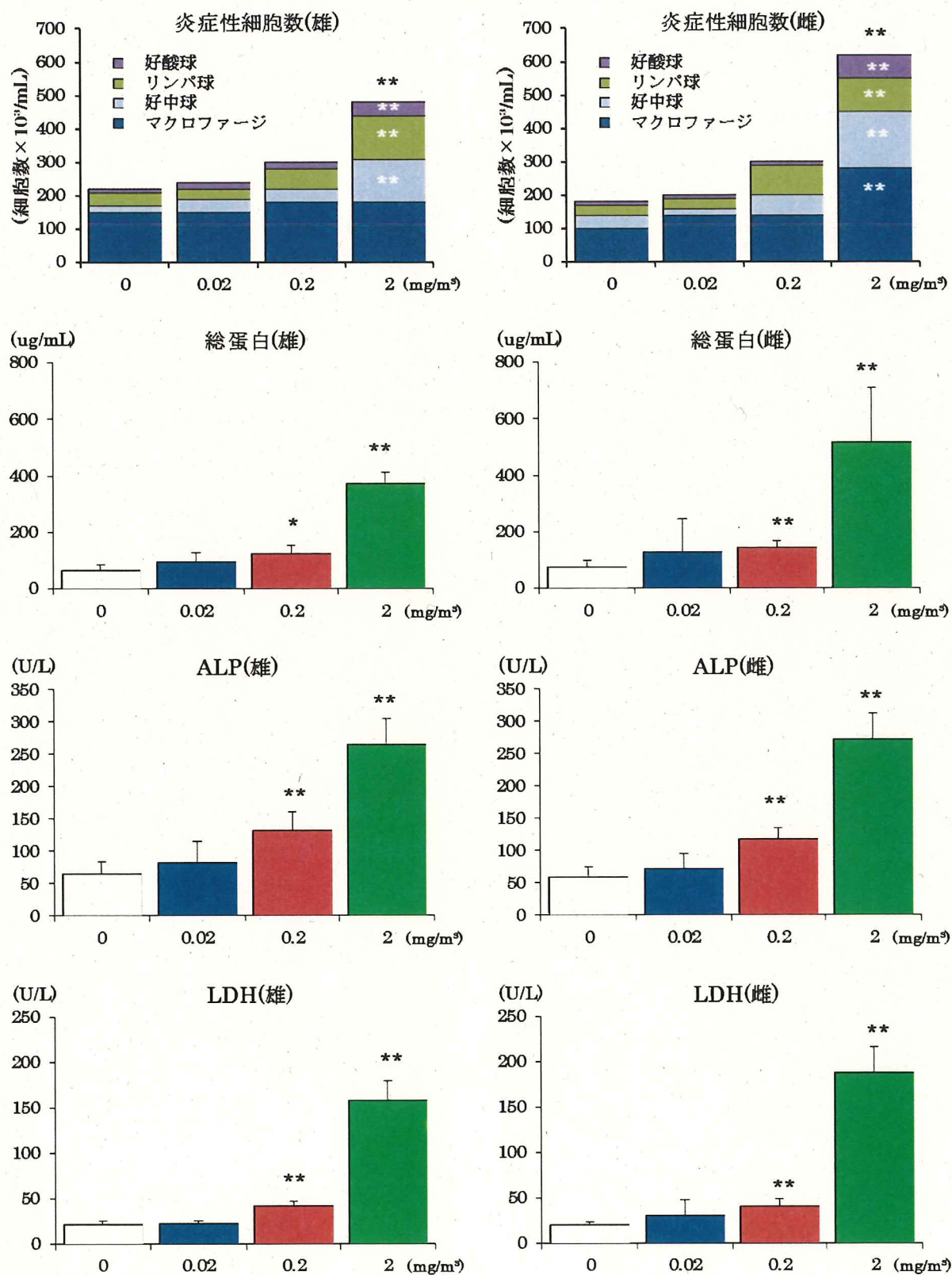


图 5-3 体重推移



有意差; *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

図 5-4 BALF の細胞学的及び生化学的検査

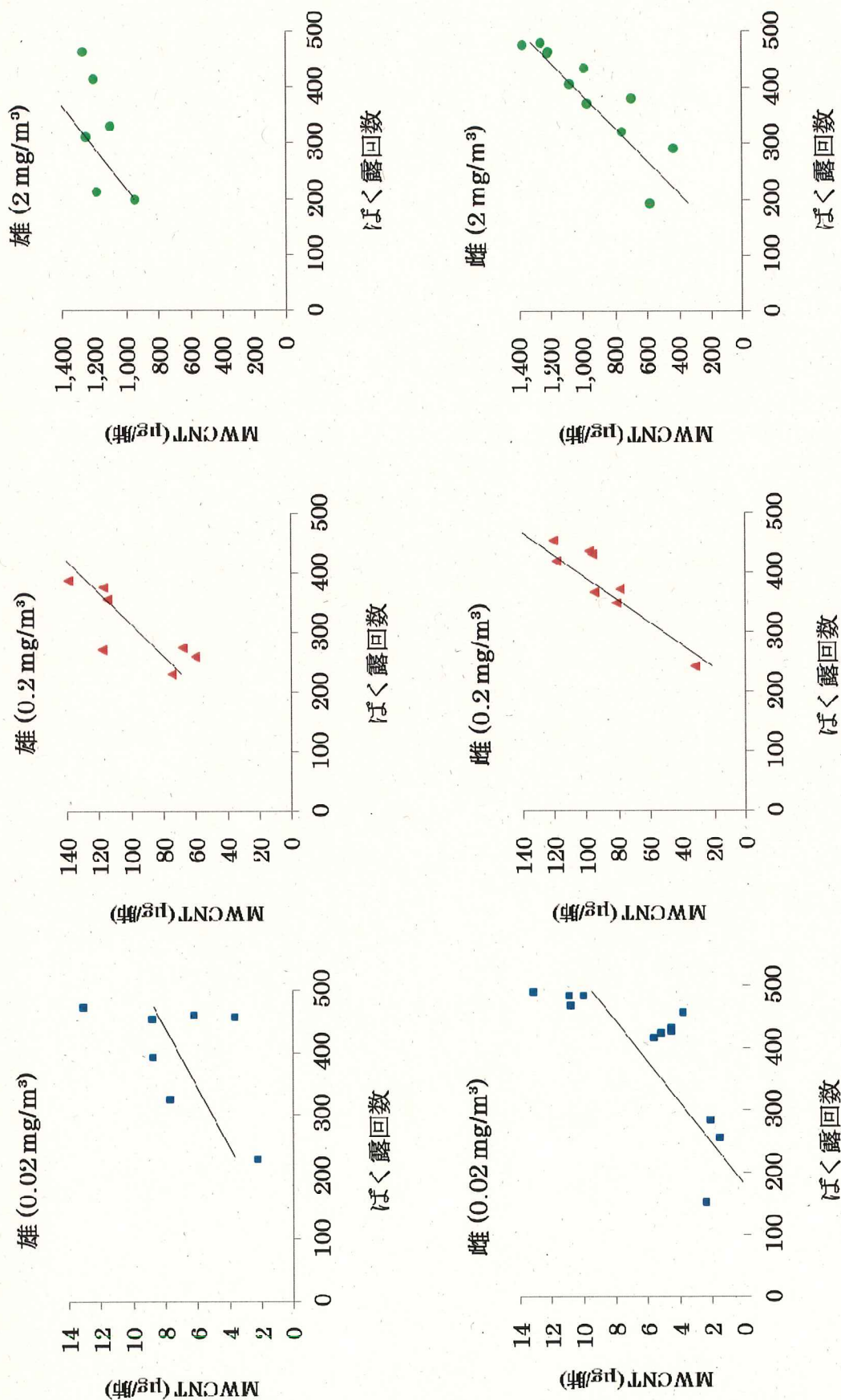


図 5-5 途中解剖動物の肺負荷量

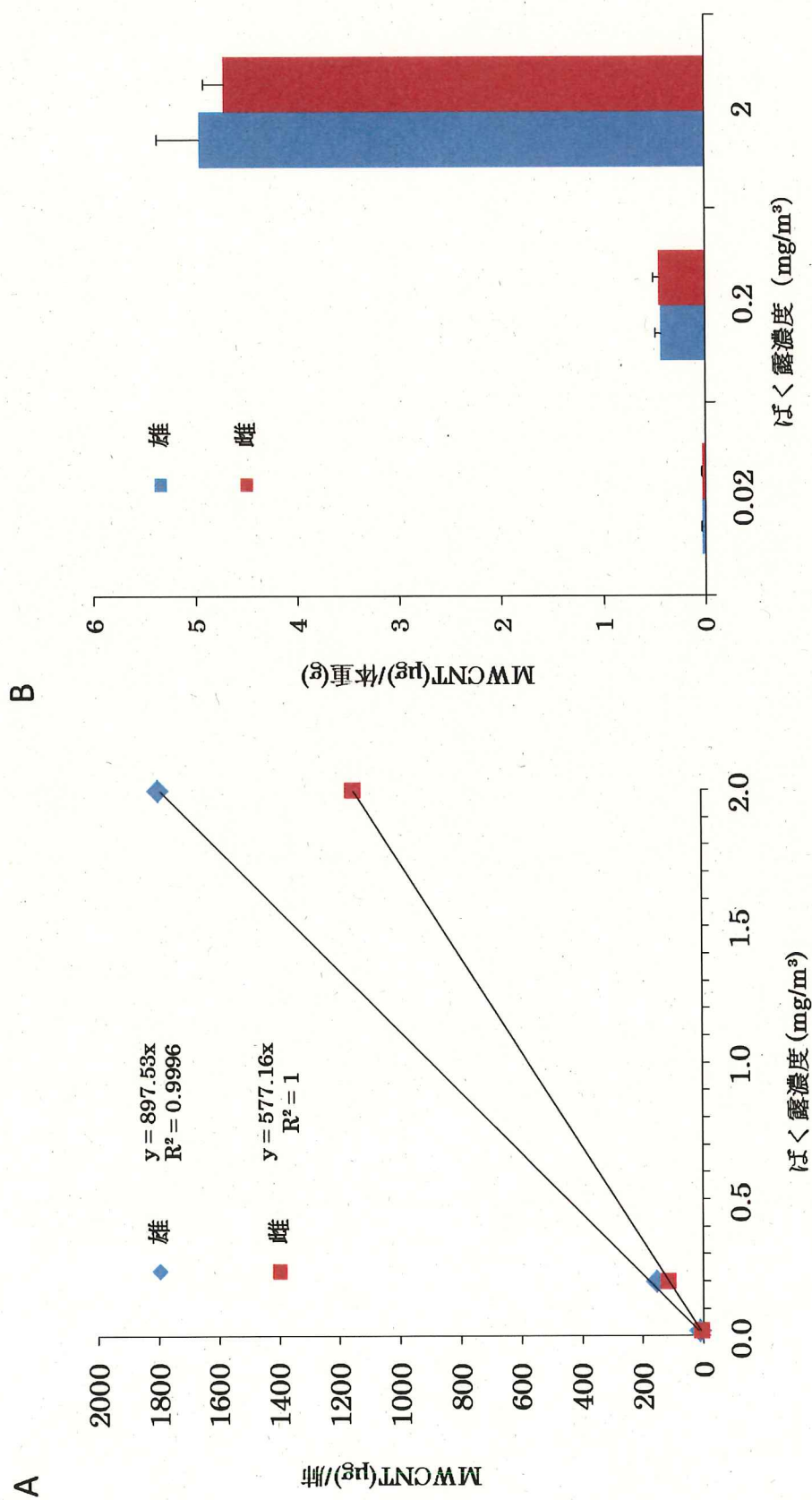


図 5-6 定期解剖動物の肺負荷量

表 5-1 吸入チャンバー環境

設定濃度 (mg/m ³)	0	0.02	0.2	2
チャンバー温度 (°C)	23.0 ± 0.2	22.9 ± 0.1	23.0 ± 0.2	23.0 ± 0.2
チャンバー湿度 (%)	53.8 ± 1.8	52.9 ± 2.4	53.3 ± 2.1	52.7 ± 2.0
チャンバー換気流量 (L/min)	1670 ± 37	1671 ± 36	1671 ± 37	1668 ± 38
質量濃度 (mg/m ³) ^a	0.000 ± 0.000	0.020 ± 0.001	0.204 ± 0.014	2.018 ± 0.069
MMAD (GSD): 1 週 ^b	-	1.3 µm (3.0)	1.4 µm (2.9)	1.3 µm (2.6)
MMAD (GSD): 14 週	-	1.3 µm (2.8)	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.9)
MMAD (GSD): 27 週	-	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.8)
MMAD (GSD): 40 週	-	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.7)
MMAD (GSD): 53 週	-	1.4 µm (3.0)	1.4 µm (2.9)	1.4 µm (2.9)
MMAD (GSD): 66 週	-	1.2 µm (2.9)	1.3 µm (2.9)	1.4 µm (2.8)
MMAD (GSD): 79 週	-	1.3 µm (2.9)	1.3 µm (2.9)	1.4 µm (2.8)
MMAD (GSD): 92 週	-	1.3 µm (3.0)	1.3 µm (3.0)	1.4 µm (2.8)
MMAD (GSD): 102 週	-	1.4 µm (2.9)	1.3 µm (2.7)	1.3 µm (2.9)

平均 ± 偏差

a: K値を用いた変換質量濃度

b: MMAD: 空気動力学的質量中位径, GSD: 幾何標準偏差

表 5-2 生存率、体重及び肺重量

設定濃度 (mg/m ³)		雄				雌			
		0	0.02	0.2	2	0	0.02	0.2	2
検査動物数		50	50	50	50	50	50	50	50
生存動物数(生存率(%))		36(72)	42(84)	38(76)	37(74)	42(84)	34(68)	39(78)	36(72)
体重									
投与終了時体重(g)	平均	401	394	410	399	278	265	277	261 *
	偏差	45	37	39	38	31	26	23	26
体重/対照群体重(%)		平均	100	98	102	100	95	100	94
肺重量									
投与終了時肺重量(g)	平均	1.31	1.34	1.51 **	2.37 **	0.90	0.94 **	1.14 **	1.87 **
	偏差	0.10	0.12	0.13	0.31	0.21	0.10	0.27	0.18
肺重量/体重(%)	平均	0.36	0.37	0.40 **	0.65 **	0.35	0.38 **	0.45 **	0.79 **
	偏差	0.06	0.05	0.06	0.20	0.10	0.05	0.14	0.16

有意差: *: $p \leq 0.05$ **: $p \leq 0.01$ Dunnett's 検定

表 5-3 病理組織学的検査結果

設定濃度(mg/m ³)	雄				Peto	雌				Peto
	0	0.02	0.2	2	test	0	0.02	0.2	2	test
検査動物数	50	50	50	50		50	50	50	50	
腫瘍性病変										
肺										
細気管支-肺胞上皮癌	1	1	8 [#]	10 ^{##}	↑↑	0	1	0	5 ^{##}	↑↑
腺扁平上皮癌	0	0	0	1		0	0	0	1	
低分化型腺癌	0	0	0	0		0	0	0	1	
扁平上皮癌	0	0	0	0		0	0	0	1	
肺癌	1	1	8 [#]	11 ^{##}	↑↑	0	1	0	8 ^{##}	↑↑
細気管支-肺胞上皮腺腫	1	1	7 [#]	5		3	1	4	3	
肺腫/肺癌 [*]	2	2	13 ^{##}	16 ^{##}	↑↑	3	2	4	11 [#]	↑↑
腹膜										
悪性中皮腫	0	3	1	1		0	0	0	0	
非腫瘍性病変										
肺										
細気管支-肺胞上皮過形成	2	6	13 [*]	22 ^{**}		3	3	8	12 [*]	
異型過形成	0	0	1	10 ^{**}		0	0	0	14 ^{**}	
肺胞上皮細胞過形成	0	2	13 ^{**}	41 ^{**}		1	1	6	41 ^{**}	
終末細気管支上皮過形成	0	0	4	8 ^{**}		0	0	4	26 ^{**}	
マクロファージの浸潤	2	7	5	48 ^{**}		2	6	9	48 ^{**}	
肺胞壁の限局性線維化	0	2	43 ^{**}	48 ^{**}		0	3	44 ^{**}	49 ^{**}	
肉芽腫性変化	0	5	42 ^{**}	50 ^{**}		0	3	45 ^{**}	50 ^{**}	
胸膜										
中皮単純性過形成	3	3	7	12 [*]		3	2	6	10	
限局性線維化(壁側)	0	0	2	6 [*]		0	0	0	3	
限局性線維化(臓側)	0	2	4	19 ^{**}		0	2	2	20 ^{**}	
炎症:縦隔膜	15	18	21	26 [*]		17	17	16	19	
炎症:横隔膜	0	0	1	1		0	1	1	1	

数値は病変を示した動物数

有意差:^{*}p≤0.05 ^{**}p≤0.01 カイ二乗検定, [#]p≤0.05, ^{##}p≤0.01 フィッシャー検定, ↑p≤0.05, ↑↑p≤0.01 ペトー検定

※: 腫瘍または癌を持っている動物数を示す。従って腺腫と癌の両方を持つ動物が存在するため、腺腫と肺癌の合計値ではない。

表 5-4 肺内 MWCNT の分析結果

設定濃度(mg/m ³)	雄(μg/肺)	雌(μg/肺)
0.02	10.0 ± 2.6	8.1 ± 2.0
0.2	152.4 ± 17.7	118.4 ± 15.0
2	1797.8 ± 158.7	1154.1 ± 75.3

表 5-5 肺癌の発生率及びMWCNTの肺内負荷(量、本数)

雄						
設定濃度 (mg/m ³)	肺癌発生率(%)	肺負荷				
		肺内MWCNT量 (μg/肺)	肺内MWCNT (本数/肺)	肺内MWCNT量 (μg/体重:g)	肺内MWCNT本数 (本数/体重:g)	
0	2	-	-	-	-	
0.02	2	10.0	0.09×10 ⁹	0.029	0.26×10 ⁶	
0.2	16 *	152.4	1.38×10 ⁹	0.434	3.92×10 ⁶	
2	22 **	1797.8	16.2×10 ⁹	4.954	44.7×10 ⁶	

雌						
設定濃度 (mg/m ³)	肺癌発生率(%)	肺負荷				
		肺内MWCNT量 (μg/肺)	肺内MWCNT (本数/肺)	肺内MWCNT量 (μg/体重:g)	肺内MWCNT本数 (本数/体重:g)	
0	0	-	-	-	-	
0.02	2	8.1	0.07×10 ⁹	0.034	0.31×10 ⁶	
0.2	0	118.4	1.07×10 ⁹	0.453	4.09×10 ⁶	
2	16 **	1154.1	10.4×10 ⁹	4.712	42.5×10 ⁶	

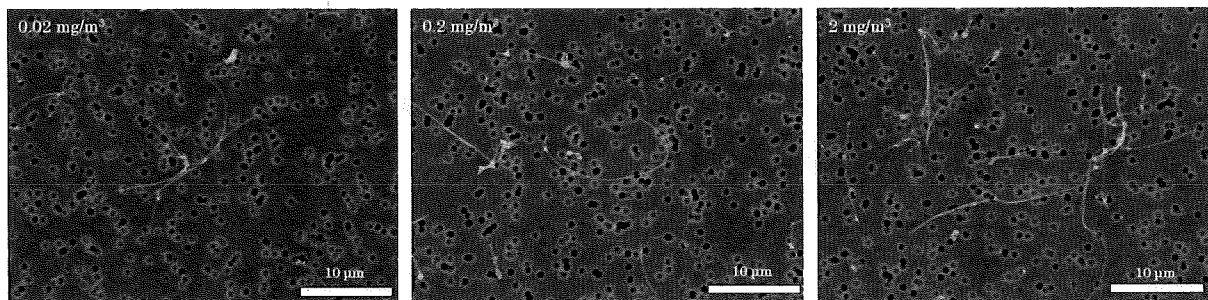
MWCNT本数: 1μg=9.03×10⁶ (SEMで計測)

有意差; *: p≤0.05 **: p≤0.01 ファイッシャー検定

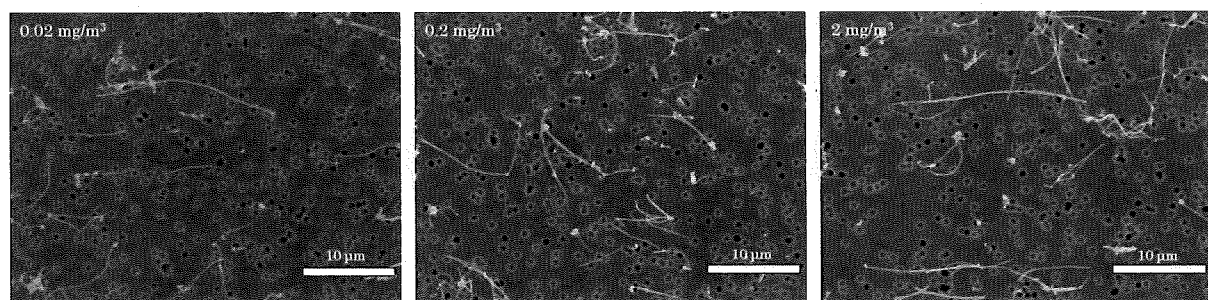
表 5-6 胸腔及び腹腔内の MWCNT の本数

設定濃度 (mg/m ³)	胸腔		腹腔	
	雄	雌	雄	雌
0.02	38	23	16	34
0.2	134	240	161	294
2	1468	847	2429	3329

ばく露 1 週目



ばく露 53 週目



ばく露 102 週目

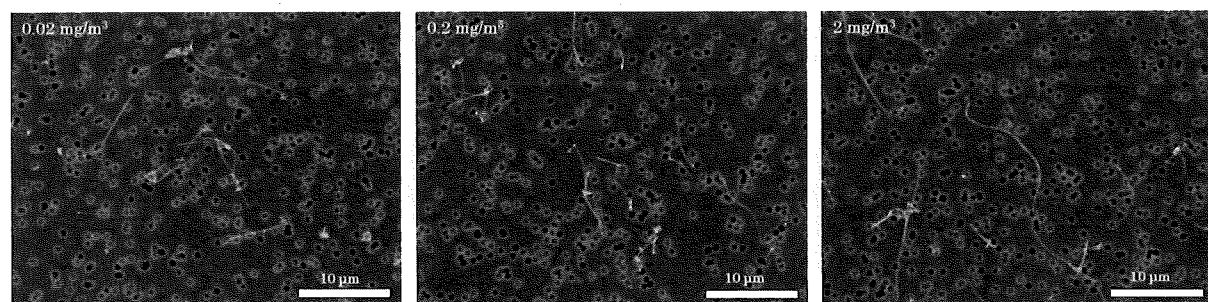


写真 5-1 吸入チャンバー内 MWCNT の SEM による観察



写真 5-2A 正常な肺の肉眼所見



写真 5-2B 肺に白色腫瘍と多数の白色斑

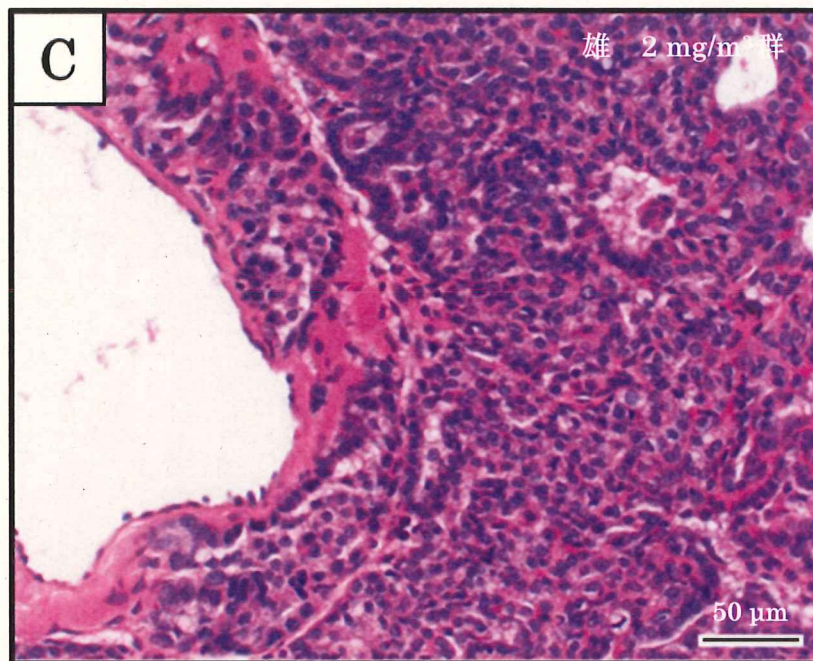


写真 5-2C 肺の細気管支-肺胞上皮癌、血管壁に癌細胞の浸潤がみられる

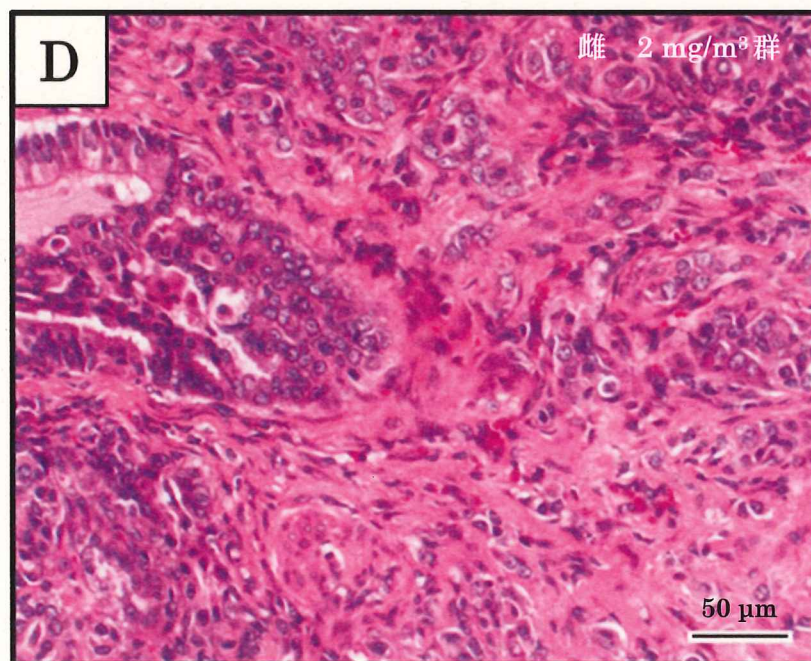


写真 5-2D 肺の細気管支-肺胞上皮癌、MWCNT 投与群に特徴的な線維化を伴った像

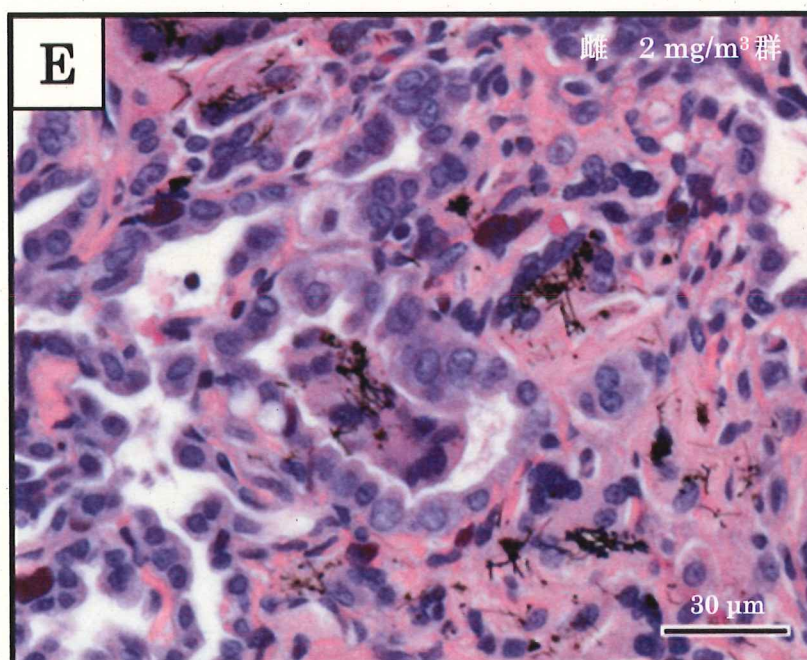


写真 5-2E 肺の異型過形成、線維化を伴った異型な肺胞上皮細胞の増殖

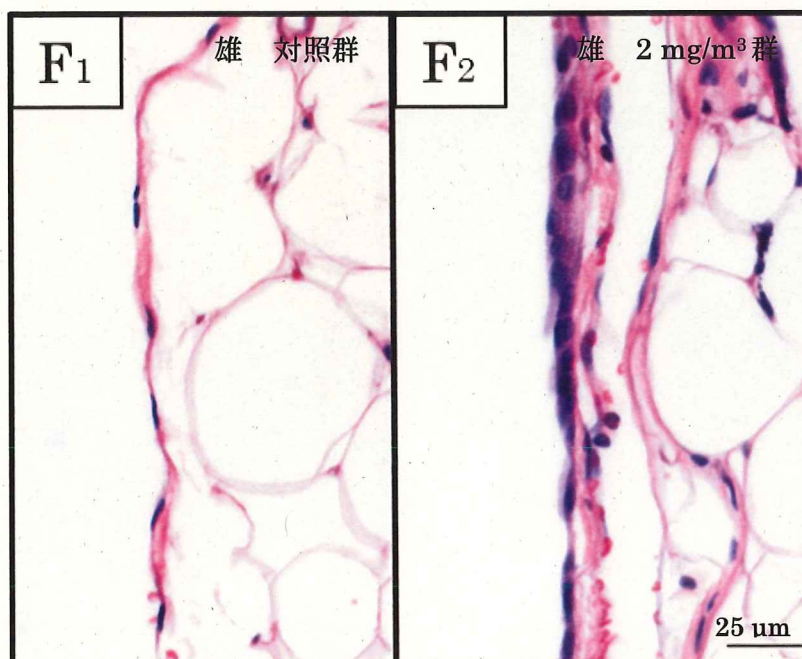
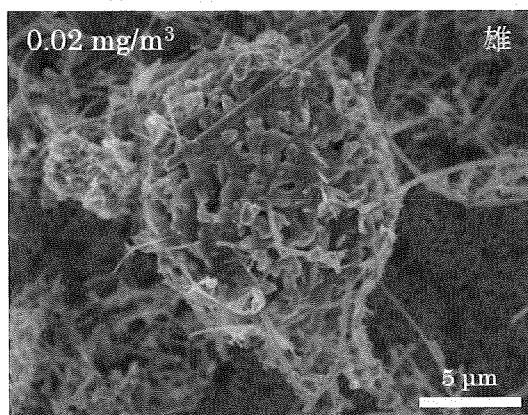
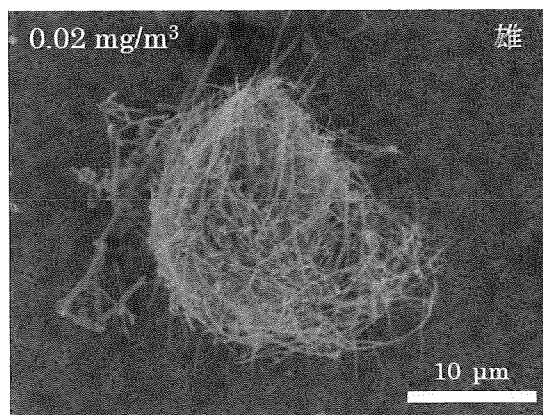


写真 5-2F F1 正常な壁側胸膜、F2 壁側胸膜の中皮単純過形成

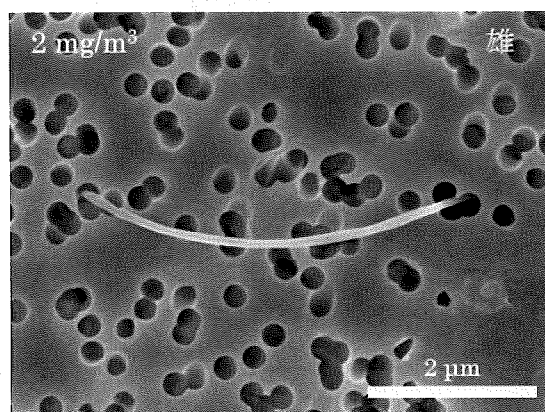
A 肺胞マクロファージ
(不完全溶解)



B MWCNT
(肺胞マクロファージを完全溶解)



C 胸腔MWCNT



D 腹腔MWCNT

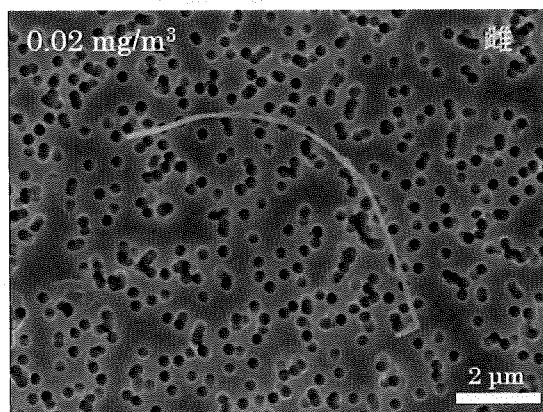


写真 5-3 胸腔、腹腔及び肺内 MWCNT の SEM 像

第6章 総括

6.1. 本研究の総括

本学位論文では、MWCNTの中でもマウスの腹腔内やラットへの陰嚢腔投与により中皮腫の発生がみられた繊維状の MWNT-7 を研究材料に選択し、ヒトでの健康影響、特に難治性で重篤な疾患である「がん」を引き起こす可能性を解明すべく、労働者のばく露環境を実験的に再現した乾式エアロゾル吸入ばく露法によりラットを使用した毒性、特に発がん研究を実施した。

第2章では、MWCNT エアロゾルを一定の濃度で継続的に供給可能なばく露装置を独自に開発した。本装置は、MWCNT と高速旋回気流を衝突させることにより MWCNT をエアロゾル化し、遠心力による粒子の分級及び篩(直径 200 mm、目開き径 53 μm)を用いた粒子径の制限を行い、細かな MWCNT のみを実験動物にばく露するという特徴を持つ。0.2~5 mg/m^3 の濃度での性能確認の結果、粒子の分布は一様で、高精度な濃度制御を確認した。最終性能判定のために雄ラットに 5 mg/m^3 の濃度で MWCNT を 6 時間(単回)吸入ばく露した後、最長で 28 日間観察した結果、MWCNT はラットの肺胞に到達し、肺胞マクロファージに貪食されるものの生物学的な修飾や分解を受けることなく、28 日後まで存在すること、また、好中球浸潤を始めとする炎症反応が惹起されること、そして、28 日後に肺の肉芽腫様変化が認められたことを記述し、本装置は吸入実験に十分に適用できる性能を有すると判断した。

第3章では、雌雄ラットに 0、0.2、1 及び 5 mg/m^3 の濃度で、6 時間/日、5 日/週、2 週間(10 回)の吸入ばく露研究を行った。ばく露動物の半数は、2 週間のばく露終了翌日に解剖を行い、残る半数は 4 週間の回復期間後に解剖し、肺を中心とした毒性学的検索を行った。2 週間ばく露により雌雄ともばく露濃度に対応した、肺胞マクロファージの減少、肺の重量増加及び早期の肉芽腫様変化が認められた。また、MWCNT の肺負荷量とばく露濃度との間に高い相関性が認められた。4 週間の回復期間を経ても MWCNT は、ばく露終了時の約 80 % が肺に保持され、ばく露終了時に観察された肉芽腫様変化が悪化した。2 週間吸入ばく露の毒性影響について、無毒性量(NO_{OAEL})は 0.2 mg/m^3 と決定した。

第4章では、13週間ばく露によるラット亜慢性毒性検討及び発がん研究でのばく露濃度を決定する目的で、2週間研究と同じ0、0.2、1及び5 mg/m³の濃度で6時間/日、5日/週、13週間(3ヶ月)のMWCNT吸入ばく露研究を行った。1 mg/m³以上の群で肺の炎症、肺重量増加及び肺胞壁の限局性線維化の有意な増加が認められ、0.2 mg/m³以上の群で肉芽腫様変化が認められた。濃度依存的なMWCNTの肺負荷が観察された。特に、2週間ばく露では観察されなかった肺胞壁の線維化が観察されたことから、ばく露期間の延長による毒性の増強が確認された。13週間吸入ばく露の毒性影響について、NOAELは得られなかったがLOAELを0.2 mg/m³とした。

発がん研究のばく露濃度設定については、線維化が1 mg/m³以上の群で観察されたことから、最高濃度としては1 mg/m³以上の濃度が望ましいが、最大耐量を考慮した場合5 mg/m³では高すぎると考え、1から5 mg/m³の間の2 mg/m³が妥当と判断した。また、中間濃度は、13週間と104週間でのばく露期間の違いによる毒性の比較が容易に行える利点があることから本研究で設定した0.2 mg/m³の濃度を設定した。最低濃度は、発がん性の有無に関わらず無毒性量が決定できたならば、慢性毒性研究として社会貢献度が大きいと考えられていることから、本研究の最低ばく露濃度の1/10の0.02 mg/m³を設定した。以上により、発がん研究のばく露濃度は、0、0.02、0.2及び2 mg/m³と決定した。

第5章では、0、0.02、0.2及び2 mg/m³の濃度で、6時間/日、5日/週、2年間の吸入発がん研究について記述した。雄では0.2及び2 mg/m³群、雌では2 mg/m³群で肺癌の発生増加が認められた。しかし、中皮腫の発生は観察されなかった。この研究の中で、肺のMWCNT負荷量からMWCNTの本数を明らかにした。104週のばく露途中に死亡した動物の肺内MWCNTの分析により、MWCNTは、ばく露回数依存的に肺に負荷されることが明らかとなった。また、104週ばく露終了時でも濃度依存的な肺負荷が示された。肺内の本数は、0.02 mg/m³群の雄は 0.09×10^9 本、雌は 0.07×10^9 本、0.2 mg/m³群の雄は 1.38×10^9 本、雌は 1.07×10^9 本、2 mg/m³群の雄は 16.2×10^9 本、雌は 10.4×10^9 本であった。0.02 mg/m³の雌雄では、癌の発生増加はなかった。また、一般毒性に対するNOAELは求められなかったが、LOAELは、0.02 mg/m³と決定した。以上のように、肺発がん性の明らかな証拠を得るとともに、明

らかな吸入ばく露用量-発がん反応関係を決定した。

また、文献によればラットを用いた気管内投与（総投与用量：1mg/ラット、最終肺負荷量：268~486 $\mu\text{g/g}$ 肺）⁴⁷⁾ で肺癌及び中皮腫が発生したとの報告、ラットを用いた腹腔内投与で、 1×10^9 本の投与により投与動物の 40 %に中皮腫が発生したとの報告⁴⁶⁾、さらには、マウスを用いた腹腔内投与においても 1×10^6 本以上の投与により中皮腫が観察されたとの報告⁵⁸⁾があり、MWCNT の発がんには、大量の MWCNT(本数)が必要であることが示唆された。我々の発がん研究で肺癌の認められた肺の MWCNT の総負荷数は、雄では 1.38×10^9 本、雌では 10.4×10^9 本であった。そして、中皮腫は認められないものの胸腔及び腹腔から採取した MWCNT の本数は、 10^3 本レベルで、肺の $1/10^6$ 程度であった。我々の研究からは、明らかな肺負荷量(本数)-発がん反応関係が認められた。MWCNT(MWNT-7)の肺がんについては、MWCNT の(1) 5 μm 以上の十分な長さ、(2) 2 年のばく露期間、(3) 10^9 本以上の量が必要であったと結論した。本研究は、長期吸入ばく露試験研究において、実験動物での MWCNT の発がん性を初めて証明したものとなった。

2、13 及び 104 週間のばく露において、エアロゾルの細かさの指標となる MMAD は、1.2~1.6 μm の範囲にあった。また、13 及び 104 週間研究における吸入チャンバー内の MWCNT 繊維長は 5.4~6.5 μm 、同じく繊維径は 92.9~98.2 nm であり、幾何学的な計測からもばく露期間の違いによる差は認められないことから、MWCNT のエアロゾル環境は全期間を通して一様であったと考えた。そこで、2 週間の毒性研究から 104 週間の発がん研究までの全研究を横断したばく露濃度と肺負荷の関連性について考察を行った。単純なばく露濃度での比較では、ばく露期間が異なるために評価が行えないため、ばく露濃度とばく露回数の積を総ばく露量として横軸にとり、縦軸には、肺の MWCNT 負荷量(2 及び 13 週ばく露では 1 g あるいは左肺の負荷量を示したが、ここでは肺あたりの負荷量を示した)をとって、グラフ化した(図 6-1)。その結果、総ばく露量と肺負荷量には高い相関性が認められた。興味深いことに、MWCNT の肺負荷量は、雌雄とも 104 週間研究の 0.2 mg/m^3 群(雄のみではあるが肺癌の認められた濃度)よりも 13 週間研究の 5 mg/m^3 群の方が多かったことである。当然ながら 2 及び 13 週間の短期間のばく露では、がんの発生は認められていない。このことから、が

んを検出するためには、組織における濃度や量は重要であるが、長いばく露期間が必要であることが改めて示され、また、長期間にわたる肺の炎症反応が重要な役割を持つことが示唆された。

6.2. 労働者の発がんリスク評価の試行

職業性ばく露限界値を設定する場合、有用な疫学的調査データが存在すれば、それが最も重要な拠り所となるが、多くの場合、十分な疫学的証拠が得られることは少ない。従って、動物実験から得られたデータを基に職業性ばく露限界値を設定することができれば、労働災害を未然に防ぐことに役立ち、これには職業性ばく露を反映した吸入経路による実験データが重要となる。本項では、第5章のラットにおける肺発がん研究の結果を基に、MWCNT(MWNT-7)を製造し、取り扱う労働者の発がんリスク評価を試行する。

MWCNTの許容濃度等については、日本産業衛生学会では未設定である。NIOSHは、2013年3月に単層CNT、MWCNT及びカーボンナノファイバーについて8時間時間加重平均(TWA)の推奨職業性ばく露限界値を 0.001 mg/m^3 (炭素として)と提案した⁵⁹⁾。この濃度は、現時点で測定可能な最低濃度であること及び動物実験のNOAELから算出される生涯労働時間等価の推定値でもあるとされている。日本においては、国立研究開発法人 産業技術総合研究所(産総研)により、 0.03 mg/m^3 が提案されている⁶⁰⁾。

104週間吸入ばく露研究の結果、雄ラットのMWCNT肺負荷量は、 0.02 mg/m^3 群で 0.01 mg/肺 、 0.2 mg/m^3 群で 0.15 mg/肺 、 2 mg/m^3 群で 1.8 mg/肺 であった。ヒトとラットでは体重はもちろん肺胞面積、肺の換気量が大きく異なる。ラットの肺胞表面積を 0.4 m^2 、ヒト肺胞表面積を 102 m^2 として、我々の研究で求めた負荷量と同等となるヒト肺胞表面積あたりの負荷量を下式で求めた^{61,62)}。

ヒト肺負荷量 = ラット肺負荷量 \times ヒト肺胞表面積(102 m^2) / ラット肺胞表面積(0.4 m^2)

これにより、ラット肺あたりの肺負荷量 0.01 、 0.15 、 1.8 mg は、ヒトでは同じく、 2.6 、 38.3 、 459 mg に相当すると計算された。

仮想の労働環境として、MWCNTの吸入性粉じんが常時発生している作業現場で、1日8

時間、45 年間、軽作業に従事した労働者の肺に、2.6、38.3、459 mg の MWCNT が負荷する職場環境濃度を試算した。計算条件^{61,62)}は、(1) ヒト肺換気量は 20L/分、(2) 労働時間は 8 時間/日、5 日/週、52 週/年で 45 年間業務に従事し、(3) 肺に沈着する MWCNT の沈着率は 4 %とする。

下式より求めた環境濃度は、それぞれ 0.6、8.5、102.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ であった。

ヒトの肺総負荷量=(ばく露濃度) \times (20 L/分 $\times 10^{-3}\text{m}^3/\text{L}\times 60$ 分/時 $\times 8$ 時間/日 $\times 5$ 日/週 $\times 52$ 週/年 $\times 45$ 年) $\times 4$ %

これまで報告されている MWCNT の労働環境濃度は、0.7~332 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ ^{36,20,26,63)}と総括される。ラットで肺癌の認められた濃度(0.2 及び 2 mg/m^3)から試算した仮想労働環境濃度(8.5 及び 102.2 $\mu\text{g}/\text{m}^3$)は、実際に報告されている労働環境濃度の範囲内となった。報告の中で最も薄い濃度の 0.7 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ は、我々の研究では肺癌は認められなかったものの、ばく露群の少数例に肉芽腫様変化及び肺の線維化が認められた 0.02 mg/m^3 群から算出した仮想労働環境濃度 0.6 $\mu\text{g}/\text{m}^3$ とほぼ同等であった。

化学物質のリスクアセスメントを行う場合、その物質が遺伝毒性物質である場合とそうではない場合では、考え方は大きく異なる。化学物質が遺伝毒性を有する場合には、その発がん性に閾値は存在しないとされる。一方、遺伝毒性を有しない場合には、その発がん性には閾値が存在するとみなすことができ、それに基づいて職業性ばく露限界値を設定することが可能となる。MWNT-7 の *in vitro* 遺伝毒性としては、直接的な DNA 損傷、染色体損傷は認められておらず^{64,65)}、細胞分裂阻害作用に由来する倍数性・異数性誘発性作用としての染色体の異常が報告されている⁶⁴⁻⁶⁶⁾。また、MWNT-7 の *in vivo* 遺伝毒性としては、MWNT-7 を気管内投与した *gpt delta* マウスの肺組織で DNA 損傷性や突然変異誘発性が認められたが、著者らは、MWNT-7 を原因とする酸化ストレスによる DNA 損傷や突然変異の誘発の可能性が高いことを述べている⁶⁷⁾。このように、文献によれば、MWCNT は遺伝毒性物質と考えられるが、MWCNT それ自体による DNA の塩基置換レベルでの突然変異ではなく、二次的な DNA への作用と考えられている。直接、DNA をターゲットとせず、二次的なメカニズムにより突然変異を示し、かつ、発がん性を示す化学物質は、閾値を持つ発がん物質に分類で

き、より現実的で合理的な濃度で取扱い管理を行うことが可能となる⁶⁸⁻⁷¹⁾。

第5章では、雄ラットの肺癌をエンドポイントとして、発がん性の NOAEL を 0.02 mg/m^3 と決定した。この値から、ヒト職業性ばく露限界値を試算した。ヒトと実験動物の種差に対する不確実性として 10、毒性の重篤性(発がん作用)として 10、感受性の個人差については、労働者は健常な一般成人であり、保護具の着用や化学物質の有害性に対する知識を有していることを考慮して¹⁷²⁾、従って総不確実係数は 100 とし、動物実験のばく露 6 時間を 8 時間の労働時間で補正したヒト職業性ばく露限界値は、下式より $0.15 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ と求められた。

$$0.02 \text{ mg/m}^3 \times 1/100 \times 6/8 \text{ 時間/日}$$

以上のように労働者にとって主要なばく露経路である経気道投与によるエアロゾル吸入ばく露法を用いた MWCNT の一般毒性及び発がん研究を実施した。MWCNT のばく露濃度－毒性反応関係、体内負荷量－発がん反応関係を明らかにし、発がん性における NOAEL は、 0.02 mg/m^3 と決定した。MWCNT(MWNT-7)の肺発癌には、 $5 \text{ } \mu\text{m}$ 以上の繊維長、 10^9 本以上の大量の MWCNT 量、2 年間という長い時間が必要と結論された。また、発がん研究の結果を基に職業性ばく露限界値を試算した結果、その値は $0.15 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ と求められ、NIOSH より推奨された職業性ばく露限界値($1 \text{ } \mu\text{g/m}^3$)の見直しが必要と考えられる結果が得られた。これまで MWCNT のラットを用いた長期吸入ばく露による実験的発がん研究の報告はなく、本研究の結果は、労働現場でのリスク軽減の科学的根拠を与えるものと考えられ、管理濃度や許容濃度の設定のために新規性のある重要な情報を提供できるものとする。

6.3. 今後の課題

MWCNT の中でも有害性が強いとされる繊維状の MWNT-7 を研究材料に選択し、ヒトでの健康影響、特に難治性で重篤な疾患である「がん」を引き起こす危険性を解明すべく、吸入ばく露による発がん研究を実施した。その結果、繊維状 MWCNT の肺発癌には、 $5 \text{ } \mu\text{m}$ 以上の繊維長、 10^9 本以上の大量の MWCNT、2 年間という長い時間が必要と推察された。そして、本論文筆者は、MWCNT のヒト職業性ばく露限界値が未設定であることから、本発がん研究結果を基にしてこれを試算し、その値を $0.15 \text{ } \mu\text{g/m}^3$ と考えた。今後は、この試案につ

いての国内外の有識者からの意見等を参考にして、許容濃度や管理濃度の設定に向けて更なる考察が必要と思われる。これに加え、発がんには、マクロファージを中心とする ROS 種やサイトカインネットワークの関与も示唆された。しかし、肺がんの発生機序は未だ不明であり、詳細な発がん機序の解明も今後の重要な研究課題と思われる。

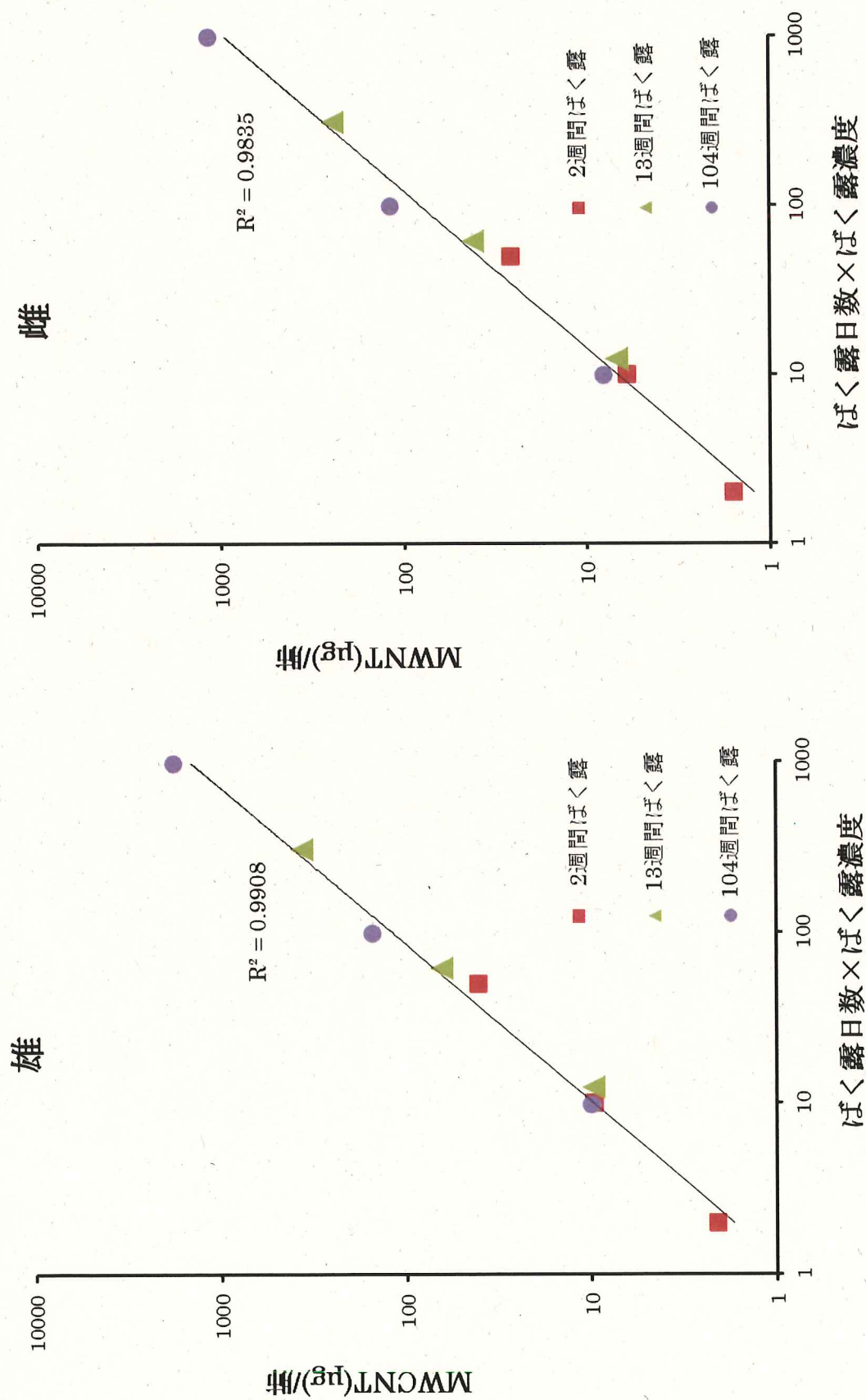


図 6-1 肺蓄積性: 2 週間から 2 年間吸入ばく露まで MWCNT の肺沈着量

謝 辞

この研究は、日本バイオアッセイ研究センター所長 福島昭治先生（当時）のご指導の下、厚生労働省「ナノマテリアルの有害性等調査事業」として実施した、多層カーボンナノチューブの吸入ばく露のための発生装置の開発からラットを用いた発がん性試験に至る約 8 年間の成果を、北里大学医学部教授 堀口兵剛先生のご指導を頂戴しまとめたものです。

本学位論文の審査にあたり、貴重なご意見、ご助言を賜りました、主査 北里大学医療衛生学部教授 太田久吉先生、副査 学校法人北里研究所理事長 小林弘祐先生、副査 北里大学医学部教授 村雲芳樹先生、副査 北里大学医学部教授 佐藤俊哉先生に感謝いたします。

私は昭和 61 年に日本バイオアッセイ研究センターに勤務依頼、化学物質の有害性研究に携わって参りました。その間、歴代所長、坂部弘之先生、舘正知先生、吉川博先生、松島泰次郎先生、福島昭治先生、菅野純先生のご指導を賜りました。ここに感謝いたします。

本学位論文の作成にあたり、多くの方々のご協力、ご助言を賜りました。特に、試験の遂行、原著論文及び学位論文作成に多大なご指導、ご助言をいただきました日本バイオアッセイ研究センター 研究顧問 福島昭治博士に心から感謝いたします。また、日本バイオアッセイ研究センター梅田ゆみ博士には本研究の病理診断や論文作成について貴重なご助言をいただきました。峯多加志氏には学位論文作成に多大なご協力をいただきました。ここに深く感謝いたします。

その他、本研究に係わった日本バイオアッセイ研究センター職員、協力会社職員、アシスタント職員に深く感謝いたします。

以上のように多くの人々のご指導、ご助言、ご協力があって、この研究がまとまりました。もう一度、皆様に御礼を申し上げます。

引用文献

1. 厚生労働省:「ヒトに対する有害性が明らかでない化学物質に対する労働者ばく露の予防的対策に関する検討会（ナノマテリアルについて）報告書 2008 年 11 月」
<<http://www.mhlw.go.jp/shingi/2008/11/dl/s1126-6a.pdf>>
2. Iijima S: Helical microtubules of graphite carbon. *Nature* 1991;354:56-8.
3. Endo M: Grow carbon fibers in the vapor phase. *CHEMTECH* 1988;18:568-76.
4. 厚生労働省:「平成 21 年度 厚生労働省請負業務 ナノマテリアル安全対策調査事業 報告書 平成 22 年 3 月 株式会社 三菱化学テクノロジー」
<<http://www.nihs.go.jp/mhlw/chemical/nano/nanopdf/H21houkoku/honbun/all.pdf>>
5. Dahm MM, Schubauer-Berigan MK, Evans DE, Birch ME, Fernback JE, Deddens JA: Carbon Nanotube and Nanofiber Exposure Assessments: An Analysis of 14 Site Visits. *The Annals of occupational hygiene* 2015;59:705-23.
6. 鷹屋光俊、芹田富美雄、小野真理子、篠原也寸志、齊藤宏之、甲田茂樹: 多層カーボンナノチューブ製造工場における気中粒子の測定及び炭素分析 1-袋詰め作業-。産業衛生学雑誌 2010;52:182-8.
7. Tabet L, Bussy C, Amara N, Setyan A, Grodet A, Rossi MJ, *et al.*: Adverse effects of industrial multiwalled carbon nanotubes on human pulmonary cells. *J Toxicol Environ Health A* 2009;72:60-73.
8. Stanton MF, Layard M, Tegeris A, Miller E, May M, Morgan E, *et al.*: Relation of particle dimension to carcinogenicity in amphibole asbestoses and other fibrous minerals. *J Natl Cancer Inst* 1981;67:965-75.
9. Pott F: Animal experiments on biological effects of mineral fibers. In: J. C. Wagner, editor. *Biological effects of mineral fibers*. IARC Scientific Publication No. 30. Lyon: International Agency for Research on Cancer 1980:261-72.

10. McDonald JC, Armstrong B, Case B, Doell D, McGaughey WTE, McDonald AD, *et al.*: Mesothelioma and asbestos fiber type. Evidence from lung tissue analyses. *Cancer* 1989;63:1544-7.
11. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, *et al.*: Induction of mesothelioma in p53^{+/+} mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. *J Toxicol Sci* 2008;33:105-16.
12. Sakamoto Y, Nakae D, Fukumori N, Tayama K, Maekawa A, Imai K, *et al.*: Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J Toxicol Sci* 2009;34:65-76.
13. Sargent LM, Porter DW, Staska LM, Hubbs AF, Lowry DT, Battelli L, *et al.*: Promotion of lung adenocarcinoma following inhalation exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Part Fibre Toxicol* 2014;11:3.(doi:10.1186/1743-8977-11-3)
14. Organisation for Economic Co-operation and Development: OECD principles on good laboratory practice. OECD series on principles of good laboratory practice and compliance monitoring No.1. Paris: OECD;1998.
15. 経済産業省: 「ナノマテリアル情報提供シート 材料名:多層カーボンナノチューブ (MWCNT)事業者名: 保土谷化学工業株式会社 平成 26 年 6 月時点」
<http://www.meti.go.jp/policy/chemical_management/files/nanomaterial/140606CNT_5.pdf>
16. Takaya M, Serita F, Yamazaki K, Aiso S, Kubota H, Asakura M, *et al.*: Characteristics of multiwall carbon nanotubes for an intratracheal instillation study with rats. *Ind Health* 2010;48:452-9.
17. Kim JS, Sung JH, Song KS, Lee JH, Kim SM, Lee GH, *et al.*: Persistent DNA damage measured by Comet Assay of Sprague Dawley rat lung cells after five days of inhalation exposure and 1 month post-exposure to dispersed multi-wall carbon

- nanotubes (MWCNTs) generated by new MWCNT aerosol generation system. *Toxicol Sci* 2012;128:439-48.
18. Porter DW, Habbs AF, Chen TB, McKinny W, Mercer R, Wolfarth MG, *et al.*: Acute pulmonary dose-responses to inhaled multiwalled carbon nanotubes. *Nanotoxicology* 2012;7:1179-94.
 19. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): NIOSH Pocket Guide to Chemical Hazards-Graphite (synthetic). 2011;
<<https://www.cdc.gov/niosh/npg/npgd0307.html>>
 20. Han JH, Lee EJ, Lee JH, So KP, Lee YH, Bae GN, *et al.*: Monitoring multiwalled carbon nanotube exposure in carbon nanotube research facility. *Inhal Toxicol* 2008;20:741-9.
 21. Methner M, Hodson L, Dames A, Geraci C: Nanoparticle emission assessment technique (NEAT) for the identification and measurement of potential inhalation exposure to engineered nanomaterials –Part B: Results from 12 field studies. *J Occup Environ Hyg* 2010;7:163-76.
 22. 阿部正信: 長期毒性試験に用いるラット、マウスの体重変化の解析による群分けの適正層別方式の確立. *薬理と治療* 1986;14:7285-302.
 23. Kohyama N, Suzuki Y: Analysis of asbestos fibers in lung parenchyma, pleural plaques, and mesothelioma tissues of North American insulation workers. *Ann NY Acad Sci* 1991;643:27-52.
 24. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals, No. 412 Subacute Inhalation Toxicity: 28-Day Study. Paris: OECD;2009.
 25. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guidance document on acute inhalation toxicity testing. OECD environment, health and safety publication series on testing and assessment No. 39. Paris: OECD;2009.

26. Lee JH, Lee SB, Bae GN, Jeon KS, Yoon JU, Ji JH, *et al.*: Exposure assessment of carbon nanotube manufacturing workplaces. *Inhal Toxicol* 2010;22:369-81.
27. Ma-Hock L, Treumann S, Strauss V, Brill S, Luiz F, Mertler M, *et al.*: Inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes in rats exposed for 3 months. *Toxicol Sci* 2009;112:468-81.
28. McKinney W, Chen B, Frazer D: Computer controlled multi-walled carbon nanotube inhalation exposure system. *Inhal Toxicol* 2009;21:1053-61.
29. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, *et al.*: Novel method using hybrid markers: development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. *J Occup Med Toxicol* 2013;8:30. (doi: 10.1186/1745-6673-8-30)
30. Brown JS, Wilson WE, Grant LD: Dosimetric comparisons of particle deposition and retention in rats and humans. *Inhal Toxicol* 2005;17:355-85.
31. Aiso S, Kubota H, Umeda Y, Kasai T, Takaya M, Yamazaki K, *et al.*: Translocation of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes to lung-associated lymph nodes in rats. *Ind Health* 2011;49:215-20.
32. Morrow PE: Lymphatic drainage of the lung in dust clearance. *Ann NY Acad Sci* 1972;22:46-65.
33. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals, No. 413 Subchronic Inhalation Toxicity: 90-day Study. Paris: OECD;2009.
34. Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Kasai T, Takaya M, *et al.*: Pulmonary toxicity of intratracheally instilled multiwall carbon nanotubes in male Fischer 344 rats. *Ind Health* 2010;48:783-95.

35. Porter DW, Hubbs AF, Mercer RR, Wu N, Wolfarth MG, Sriram K, *et al.*: Mouse pulmonary dose- and time course-responses induced by exposure to multi-walled carbon nanotubes. *Toxicology* 2010;269:136-47.
36. Pauluhn J: Subchronic 13-week inhalation exposure of rats to multiwalled carbon nanotubes: Toxic effects are determined by density of agglomerate structures, not fibrillar structures. *Toxicol Sci* 2010;113:226-42.
37. Bannasch P, Griesemer RA, Anders F, Becker R, Cabral JR, Della PG, *et al.*: Long-term assays for carcinogenicity in animals. In: Montesano R, Bartsch H, Vainio H, Wilbourn J, Yamasaki H, editors. Long-term and short-term assays for carcinogens: A critical appraisal. Lyon: IARC Scientific Publications No. 83; 1986. p.13-83.
38. Sontag JM, Page NP, Saffiotti U: Guidelines for carcinogen bioassay in small rodents. NCI-CG-TR-1. Washington DC: DHEW;1976.
39. Kaplan EL, Meier P: Nonparametric estimation from incomplete observations. *Am Stat Assoc J* 1958;53:457-81.
40. Peto R, Pike MC, Armitage P, Breslow NE, Cox DR, Howard SV, *et al.*: Design and analysis of randomized clinical trials requiring prolonged observation of each patient. II. Analysis examples. *Br J Cancer* 1977;35:1-39.
41. Peto R, Pike MC, Day NE, Gray RG, Lee PN, Parish S, *et al.*: Guidelines for simple, sensitive significance tests for carcinogenic effects in long-term animal experiments: Long-term and short-term screening assays for carcinogens: a critical appraisal. IARC monographs Suppl 2 1980;311-426.
42. Organisation for Economic Co-operation and Development. OECD guideline for testing of chemicals 451 Carcinogenicity Studies. Paris: OECD;2009.

43. Dungworth DL, Ernst H, Nolte T, More U: Nonneoplastic lesions in the lung. In: Mohr U, Dungworth DL, Capen CC, editors. Pathology of the aging rats. Vol 1. Washington DC: ILSI press; 1992. p.143-60.
44. Renne R, Brix A, Harkema J, Herbert R, Kittel B, Lewis D, *et al.*: Proliferative and nonproliferative lesions of the rat and mouse respiratory tract. Toxicol Pathol 2009;37:5S-73S.
45. Dungworth DL, Hahn FF, Nikula KJ: Noncarcinogenic responses of the respiratory tract to inhaled toxicants. In 2nd ed, McClellan RO, Henderson RF, editors. Concepts in inhalation toxicology. Washington DC: Taylor & Francis;1995. p.533-76.
46. Rittinghausen S, Hackbarth A, Creutzenberg O, Ernst H, Heinrich U, Leonhardt A, *et al.*: The carcinogenic effect of various multi-walled carbon nanotubes (MWCNTs) after intraperitoneal injection in rats. Part Fiber Toxicol 2014;11:59.
(doi:10.1186/s12989-014-0059-z)
47. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgiued M, Takahashi S, *et al.*: Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. Cancer Sci 2016; 107: 924-35.
48. Davis JM, Addison J, Bolton RE, Donaldson K, Jones AD, Smith T: The pathogenicity of long versus short fibre samples of amosite asbestos administered to rats by inhalation and intraperitoneal injection. Br J Exp Pathol 1986;67:415-30.
49. Davis JM, Jones AD: Comparisons of the pathogenicity of long and short fibres of chrysotile asbestos in rats. Br J Exp Pathol 1988;69:717-37.
50. Mossman BT, Lippmann M, Hesterberg TW, Kelsey KT, Barchowsky A, Bonner JC: Pulmonary end points (lung carcinomas and asbestosis) following inhalation exposure to asbestos. J Toxicol Env Heal B 2011;14:76-121.

51. Donaldson K, Poland CA, Murphy FA, MacFarlane M, Chermova T, Schinwald A: Pulmonary toxicity of carbon nanotubes and asbestos – similarities and differences. *Adv Drug Deliv Rev* 2013;65:2078-86.
52. Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, *et al.*: Involvement of macrophage inflammatory protein 1a (MIP1a) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nanoscale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis* 2010;31:927-35.
53. Pulskamp K, Diabate S, Krug HF: Carbon nanotubes show no sign of acute toxicity but induce intracellular reactive oxygen species in dependence on contaminants. *Toxicology Letters* 2007;168:58-74.
54. Sohaebuddin SK, Thevenot PT, Baker D, Eaton JW, Tang L: Nanomaterial cytotoxicity is composition, size, and cell type dependent. *Part Fibre Toxicol* 2010;7:22.(doi:10.1186/1743-8977-7-22)
55. Ma-Hock L, Strauss V, Treumann S, Küttler K, Wohlleben W, Hofmann T, *et al.*: Comparative inhalation toxicity of multi-wall carbon nanotubes, graphene, graphite nanoplatelets and low surface carbon black. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:23. (doi:10.1186/1743-8977-10-23)
56. WHO Regional Office for Europe, Copenhagen, Denmark, Chapter 8.2 Man-made vitreous fibres 2000;
<http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0004/123088/AQG2ndEd_8_2MMVF.pdf>
57. United States Environmental Protection Agency (US.EPA): Benchmark dose software version 2.6 user's manual. EPA/100/R-12/001. Washington, DC: US EPA; 2015.

58. 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 Science* 2012;103:1440-4.
59. National Institute for Occupational Safety and Health (NIOSH): Current intelligence bulletin 65. Occupational exposure to carbon nanotubes and nanofibers. DHHS (NIOSH) Pub. No. 2013-145 2013; Cincinnati: NIOSH;
<<http://www.cdc.gov/niosh/docs/2013-145/pdfs/2013-145.pdf>>
60. Nakanishi J, Morimoto Y, Ogura I, Kobayashi N, Ema M, Endoh S, *et al*: Risk Assessment of the Carbon Nanotube Group. *Risk Analysis* 2015;35:1940-55.
61. Kuempel ED: Carbon nanotube risk assessment: implications for exposure and medical monitoring. *J Occup Environ Med* 2011;53:S91-7.
62. Erdely A, Dahm M, Chen BT, Zeidler-Erdely PC, Fernback JE, Birch ME, *et al*: Carbon nanotube dosimetry: from workplace exposure assessment to inhalation toxicology. *Part Fibre Toxicol* 2013;10:53.(doi: 10.1186/1743-8977-10-53)
63. Maynard AD, Baron PA, Foley M, Shvedova AA, Kisin ER, Castranova V: Exposure to carbon nanotube material: aerosol release during the handling of unrefined single-walled carbon nanotube material. *J Toxicol Environ Health A* 2004;67:87-107.
64. Ema M, Imamura T, Suzuki H, Kobayashi N, Naya M, Nakanishi J: Evaluation of genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in a battery of in vitro and in vivo assays. *Reg Toxi Pharm* 2012;188-95.
65. Asakura M, Sugiyama T, Sasaki T, Takaya M, Koda S, Nagano K, *et al*: Cytotoxicity and mutagenicity of multi-wall carbon nanotubes in cultured Chinese hamster lung cells. *J Occup Health* 2010;52:155-66.
66. Yasui M, Kamoshita N, Nishimura T, Honma M: Mechanism of induction of binucleated cells by multiwalled carbon nanotubes as revealed by live-cell imaging analysis. *Genes Environ* 2015;36:6.(doi: 10.1186/s41021-015- 0003-y)

67. Kato T, Totsuka Y, Ishino K, Matsumoto Y, Tada Y, Nakae D, *et al*: Genotoxicity of multi-walled carbon nanotubes in both in vitro and in vivo assay systems. *Nanotoxicology* 2013;7:452-61.
68. Bolt HM: The concept of “practical thresholds” in the derivation of occupational exposure limits for carcinogens by the scientific committee on occupational exposure limits (SCOEL) of the European Union. *Genes and Environment* 2008;30:114-9.
69. Bolt HM exposure limits (OELs) for carcinogens. In: Nohmi T and Fukushima S edits. *Thresholds of genotoxic carcinogens of DNA-reactive compounds*. Amsterdam: Elsevier Publisher; 2016. p117-26.
70. Fukushima S, Wei M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Threshold for genotoxic carcinogen:evidence from mechanism-based carcinogenicity studies. *Cancer risk assessment* 2010;(doi: 10.1002/9780470622728.ch8)
71. Fukushima S, Gi M, Kakehashi A, Wanibuchi H: Qualitative and quantitative assessment on low-dose carcinogenicity of genotoxic hepatocarcinogens: Dose-response for key events in rat hepatocarcinogenesis. In: Nohmi T and Fukushima S edits. *Thresholds of genotoxic carcinogens of DNA-reactive compounds*. Amsterdam: Elsevier Publisher; 2016. P.1-18.
72. International Programme on Chemical Safety (IPCS): *Environmental health criteria 170, Assessing human health risks of chemicals: Derivation of guidance values for health-based exposure limits*. WHO, Geneva, 1994.

略語表

ALB: Albumen (アルブミン)

ALP: Alkaline Phosphatase (アルカリフォスファターゼ)

BALF: Bronchoalveolar Lavage Fluid (気管支肺胞洗浄液)

B(ghi)P: benzo[ghi]perylene

BMD: Benchmark Dose (ベンチマーク用量)

BMDL₁₀: Benchmark Dose Yielding the Response with a 10 % extra risk

CAS: Chemical Abstracts Service

CNT: Carbon Nanotube (カーボンナノチューブ)

GLP: Good Laboratory Practice (優良試験所基準)

GSD: Geometric Standard Deviations (幾何標準偏差)

H&E 染色: Hematoxylin·Eosin staining (ヘマトキシリン・エオジン染色)

HPLC: High Performance Liquid Chromatography (高速液体クロマトグラフィー)

IARC: International Agency for Research on Cancer (国際がん研究機関)

LDH: Lactate Dehydrogenase (乳酸脱水素酵素)

LOAEL: Lowest Observed Adverse Effect Level (最小毒性量)

MEM: Minimal Essential Medium (基礎培地)

MMAD: Mass Median Aerodynamic Diameters (空気動力学的质量中位径)

MTD: Maximum Tolerated Dose (最大耐量)

MWCNT: Multi-Walled Carbon Nanotube (多層カーボンナノチューブ)

NIOSH: National Institute of Occupational Safety and Health (米国労働安全衛生研究所)

NOAEL: No-Observed-Adverse-Effect Level (無毒性量)

OECD: Organisation for Economic Co-operation and Development (経済協力開発機構)

PAH: Polycyclic Aromatic Hydrocarbon (多環芳香族炭化水素)

ROS: Reactive Oxygen Species (反応性酸素類)

SEM: Scanning Electron Microscope (走査電子顕微鏡)

SPF: Specific Pathogen Free

TP: Total Protein (総蛋白)

TWA: Time-Weighted Average (時間加重平均)

US EPA: United States Environmental Protection Agency (米国環境保護庁)

業績目録

(I) 原著

○、◎は本学位論文に用いた論文を示し、◎は主論文を、○は副論文を示す。

- ◎1. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S : Lung Carcinogenicity of Inhaled Multi-walled Carbon Nanotube in Rats.
Particle and Fibre Toxicology, 13 : 53, 2016. DOI:10.1186/s12989-016-0164-2

- 2. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Kondo H, Takeuchi T, Aiso S, Nishizawa T, Matsumoto M, Fukushima S : Thirteen-week Study of Toxicity of Fiber-like Multi-walled Carbon Nanotubes with Whole-body Inhalation Exposure in Rats.
Nanotoxicology, 9 : 413~422, 2015. DOI:10.3109/17435390.2014.933903

- 3. Kasai T, Gotoh K, Nishizawa T, Sasaki T, Katagiri T, Umeda Y, Toya T, Fukushima S : Development of a New Multi-walled Carbon Nanotube (MWCNT) Aerosol Generation and Exposure System and Confirmation of Suitability for Conducting a Single-exposure Inhalation Study of MWCNT in Rats.
Nanotoxicology, 8 : 169~178, 2014.

- 4. Aiso S, Take M, Kasai T, Senoh H, Umeda Y, Matsumoto M, Fukushima S : Inhalation Carcinogenicity of Dichloromethane in Rats and Mice.
Inhalation Toxicology, 26 : 435~451, 2014.

- 5. Umeda Y, Kasai T, Saito M, Kondo H, Toya T, Aiso S, Okuda H, Nishizawa T, Fukushima S : Two-Week Toxicity of Multi-walled Carbon Nanotubes by Whole body Inhalation Exposure in Rats.
J Toxicologic Pathology, 26 : 131~140, 2013.

- 6. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S : Novel Method Using Hybrid Markers : Development of an Approach for Pulmonary Measurement of Multi-walled Carbon Nanotubes.

Journal of Occupational Medicine and Toxicology, 8 : 30, 2013.

DOI:10.1186/1745-6673-8-30

7. Ohnishi M, Umeda Y, Katagiri T, Kasai T, Ikawa N, Nishizawa T, Fukushima S : Inhalation Carcinogenicity of 1,1,1-Trichlorethane in Rats and Mice.
Inhalation Toxicology, 25 : 298~306, 2013.
8. Saito A, Sasaki T, Kasai T, Katagiri T, Nishizawa T, Noguchi T, Aiso S, Nagano K, Fukushima S : Hepatotumorigenicity of Ethyl Tertiary-butyl Ether with 2-year Inhalation Exposure in F344 rats.
Archives of Toxicology, 87 : 905~914, 2013.
9. Nagano K, Goto K, Kasai T, Aiso S, Nishizawa T, Ohnishi M, Ikawa N, Eitaki Y, Yamada K, Arito H, Fukushima S : Two- and 13-week Inhalation Toxicities of Indium-tin Oxide and Indium Oxide in rats.
Journal of Occupational Health, 53 : 51~63, 2011.
10. Nagano K, Nishizawa T, Umeda Y, Kasai T, Noguchi T, Gotoh K, Ikawa N, Eitaki Y, Kawasumi Y, Yamauchi T, Arito H, Fukushima S : Inhalation Carcinogenicity and Chronic Toxicity of Indium-tin Oxide in Rats and Mice.
Journal of Occupational Health, 53 : 175~187, 2011.
11. Aiso S, Hisayo K, Umeda Y, Kasai T, Takaya M, Yamazaki K, Nagano K, Sakai T, Koda S, Fukushima S : Translocation of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes to Lung-associated Lymph Nodes in Rats.
Industrial Health, 49 : 215~220, 2010.
12. Aiso S, Yamazaki K, Umeda Y, Asakura M, Kasai T, Takaya M, Toya T, Koda S, Nagano K, Arito H, Fukushima S : Pulmonary Toxicity of Intratracheally Instilled Multiwall Carbon Nanotubes in Male Fischer 344 Rats.
Industrial Health, 48 : 783~795, 2010.

13. Kano H, Umeda Y, Kasai T, Sasaki T, Matsumoto M, Yamazaki K, Nagano K, Arito H, Fukushima S : Carcinogenicity Studies of 1,4-dioxane Administered in Drinking-water to Rats and Mice for 2 years. Carcinogenicity studies of 1,4-dioxane administered in drinking-water to rats and mice for 2 years. Food and Chemical Toxicology, 47 : 2776~2784, 2009.
14. Kasai T, Kano H, Umeda Y, Sasaki T, Ikawa N, Nishizawa T, Nagano K, Arito H, Nagashima H, Fukushima S : Two-year Inhalation Study of Carcinogenicity and Chronic Toxicity of 1,4-dioxane in Male Rats. Inhalation Toxicol, 21 : 889~897, 2009.
15. Ohbayashi H, Umeda Y, Senoh H, Kasai T, Kano H, Nagano K, Arito H, Fukushima S : Enhanced Hepatocarcinogenicity by Combined Inhalation and Oral Exposures to N,N-dimethylformamide in Male Rats. The Journal of Toxicological Sciences, 34 : 53~63, 2009.
16. Kasai T, Saito M, Senoh H, Umeda Y, Aiso S, Ohbayashi H, Nishizawa T, Nagano K, Fukushima S : Thirteen-week Inhalation Toxicity of 1,4-Dioxane in Rats. Inhalation Toxicology, 20 : 961~971, 2008.
17. Yamamoto S, Kasai T, Matsumoto M, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Matsushima T : Carcinogenicity and Chronic Toxicity in Rats and Mice Exposed to Chloroform by Inhalation. Journal of Occupational Health, 44 : 283~293, 2002.
18. Kasai T, Nishizawa T, Arito H, Nagano K, Yamamoto S, Matsushima T, Kawamoto T : Acute and Subchronic Inhalation Toxicity of Chloroform in Rats and Mice. Journal of Occupational Health, 44 : 193~202, 2002.
19. Yamamoto S, Nishizawa T, Nagano K, Aiso S, Kasai T, Takeuchi T, Matsushima T : Development of Resistance to Chloroform Toxicology in Male BDF₁ Mice Exposed to a Stepwise Increase in Chloroform Concentration. The Journal of Toxicological Science, 24 : 421~424, 1999.

(II) 著書

な し

(III) 総説・講座,

な し

(IV) 症例・臨床治験・その他

な し