

多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の生体影響について

小縣 昭夫、坂本 義光、福森 信隆、斎藤 育江、栗田 雅行、大橋 則雄、矢口 久美子、中江 大

東京都健康安全研究センター 環境保健部
〒169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

ナノテクノロジーはナノサイズという微小な世界を操る技術であり、分子や原子の配列を自在に制御し、今までにない高性能の半導体や工業材料、また、革新的な治療を可能にする医療の実現が期待されている。しかしながら、この様に特定の機能を意図して合成された純粋な単体としてのナノ物質が生体に及ぼす影響については多くの点で未知である。ナノテクノロジーは我々の生活を豊かにしてくれる未来社会を担う革新的技術としての期待が大きいだけに、その研究開発の段階から社会的影響（健康、安全、環境等）の大枠を明らかにし、ナノテクノロジーの利用が安心して進められるように対応することが求められている。

最近、管野らはP53 ヘテロノックアウトマウスを用いた多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の腹腔内投与により中皮腫が誘発されることを報告した¹⁾。管野らの結果は MWCNT がアスベスト様の腫瘍誘発作用を有していることを示すものであり、MWCNT ばかりでなくナノ物質全体のリスク管理に関する貴重な情報を与えた。

一方、東京都健康安全研究センター（以下センターと略）では現在、アスベスト代替物の生体影響評価の一環としてラット陰嚢腔内投与による腫瘍誘発性について検討を行っている。アスベスト代替物は形状がアスベストに類似していることから、アスベスト同様の腫瘍を誘発するのではないかと危惧されており、現在、WHO でも情報収集が行われている。MWCNT はサイズが、 $20\mu\text{m}$ 以下の長さ、アスペクト比（繊維長 / 繊維径）が3 以上の 繊維状粒子を形成するとされ、その形状がアスベストに似ていることから、安全性に関して、アスベスト類似の作用が懸念されている。そこで、その生体影響を評価することを目的に、アスベスト代替物での検討に併せ、MWCNT のラット陰嚢腔内投与による試験を実施した。陰嚢腔は腹腔と繋がっており、結果的には腹腔内投与と同様な効果に終わる可能性も否定できないが、投与物質が陰嚢腔内に高密度に留まることで、腫瘍誘発を早めることを期待したものである。

ここでは、センターにおいて、正常ラットの陰嚢腔内にMWCNTを投与したことにより中皮腫の誘発が認められたことを報告した坂本らの実験²⁾を中心に述べ、さらに、センターにおける今後のMWCNT等ナノ物質の健康影響評価への取り組みについても紹介する。

(1) MWCNTの発がんハザード同定

実験材料および方法

1. 実験動物

動物は（株）日本チャールスリバーよりF344/DuCr1Cr1j雄ラットを4週齢で購入し、12週齢の発育良好なものを実験に供した。

2. 被検物質

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)はナノカーボンテクノロジー株式会社より無償提供を受けたMWNT-7を用いた。陽性対照として用いたUICC級クロシドライトは東京都健康安全研究センター保有のものを用いた。

3. 投与方法と動物数

MWCNT は2%CMC に分散懸濁させ、2%CMC1ml 当たり MWCNT が 0.5mg になるように調整した。また、陽性対照のクロシドライトは 2%CMC1ml 当たり 1mg になるよう調整した。投与は陰嚢腔内に麻酔下（ネブタール）、陰嚢部皮膚を数ミリ切開し、注射筒を用い、懸濁液を体重 kg 当たり 2ml の割合で、MWCNT (1mg/kg) を 7 匹のラットに、陽性対照としてクロシドライト(2mg/kg)を 10 匹のラットに、また、陰性対照として2%CMCのみを 5 匹のラットに単回投与した。

動物は投与後、5 2週目の観察を目標として飼育を行った。

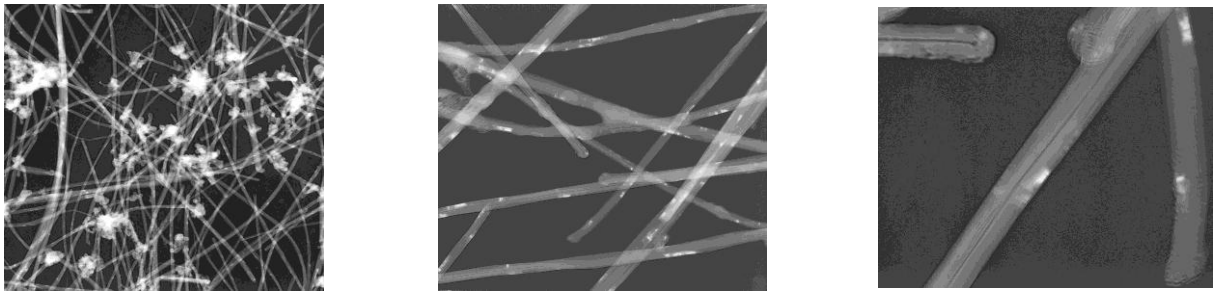
4. 病理組織学的観察

途中死亡例および屠殺例について、摘出した臓器および腫瘍組織は10%緩衝ホルマリン溶液で固定後、定法によりパラフィン切片を作成し、ヘマトキシリン・エオジン染色を行い観察した。

結 果

1. MWCNTの長さおよび幅の分布についての検討

MWCNTの形態的特徴を把握し、生体内でのCNTの検索が容易に行えるように、種々の分散剤を用いてCNTの分散の検討を行った後、分散状態の良好な分散剤を用いて、電子顕微鏡によるMWCNTの形態的特徴を観察し、長さ及び幅の分布を調べた。

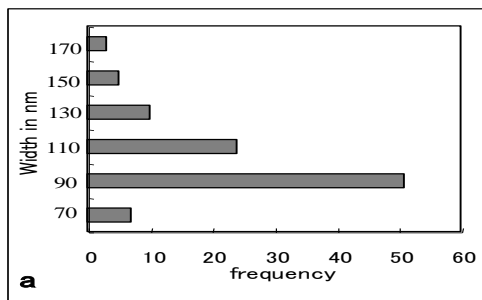


写真：MWCNTを水に懸濁したときの透過電顕像

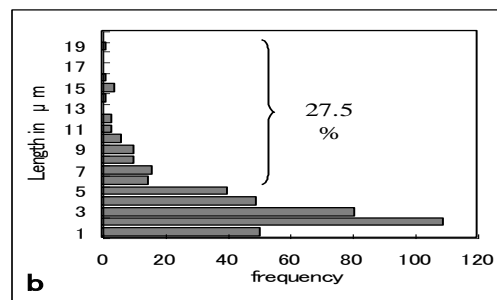
写真左：X 10,000 繊維状にからみついたMWCNT

写真中央：X 30,000 繊維状のMWCNT。白く見えるのは電子密度の高い部分。

写真右：X 50,000 中空構造が認められる。層になっているのがわかる。先端は丸まっている。



図a MWCNTの幅における度数分布



図b MWCNTの長さにおける度数分布

MWCNTの粒子数は1 g当たり 3.55×10^{11} 個の粒子を含んでおり、粒子の幅と長さは、図に示すように、太さ（直径）は、70～110nmが82%を占めており、測定された繊維の殆どが、ナノ粒子として定義されている範囲に含まれていた（図a）。また繊維の長さは1～4μmが72.5%、5～19μmが27.5%であった（図b）。

クロシドライトの粒子数は文献値で1g当たり 2.93×10^{12} 個であった。

また、MWCNTの合成過程で使用している金属は、精製により取り除かれているが、微量元素が残存している可能性があり、生体での炎症作用にこれらに関与するのではとの報告もある。そこで、供された試料について、不純物元素の定性及び定量を行った。蛍光X線分析装置による元素の定性分析で検出された主な元素は、Fe及びSで、その他、塩素（Cl）及びアルミニウム（Al）であった。その際、ICP-MSによる、Fe（質量数56）の平均濃度は0.35%であった。

2. 動物実験による発がん性の同定

MWCNT投与群のラットで投与開始から37～40週にかけて途中死亡動物や瀕死動物を認め、実験終了（52週目）まで生存した動物は1匹であった（Table 1）。途中死亡および瀕死動物の剖検所見では、体重の減少を認め、いずれも開腹時に血性腹水の貯留が認められた。さらに、腹腔内には大小様々な白色結節が腹膜表面の至るところに認められ、中には、胸腔内に同様な結節が認められる動物もみられた。また、肝臓は変形し、横隔膜に癒着していた。実験終了まで生存した1匹のラットでは肝臓の変形が見られた他、各臓器の癒着や陰嚢壁に白色の微小結節が認められた。

陽性対照としてクロシドライトを投与した10匹のラットおよび陰性対照として2%CMCを投与した5匹のラットでは実験終了の52週目までに体重の減少もなく、死亡および瀕死の動物は認められなかった。クロシドライト投与群の動物の剖検所見では陰嚢腔内、腹腔内に黒青色点が散在していた以外、肝臓の変形もなく、微小結節も認められなかった。2%CMC投与群でも剖検所見での変化は全く認められなかった。

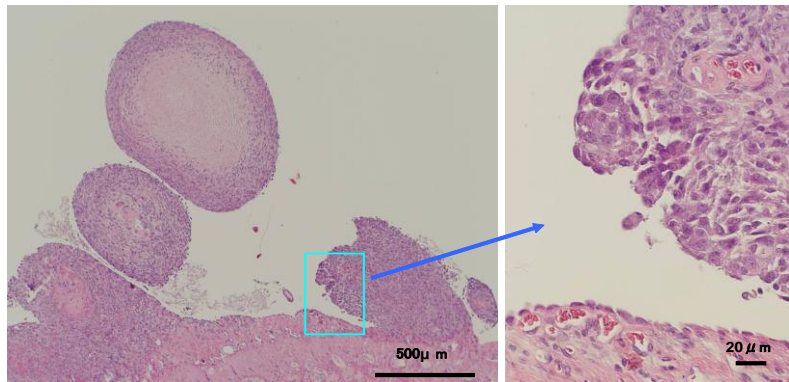
MWCNT投与群に見られた白色結節部位を中心とした病理組織学的所見では、認められた白色結節（腫瘍）の表層部においては、大型で、明瞭な核膜と核小体を有する核と好塩基性の細胞質が観察され、また、多形性を呈する中皮細胞の増殖による、結節性病変や腹腔内に乳頭状に突出する病変が散在していた。さらに、非腫瘍性腹膜においては、全般的に中皮細胞の肥大を認め、随所に過形成性病変の散在を観察した。腫瘍の深部においては、紡錘状の腫瘍細胞により構成される線維肉腫様の形態を取っており、腫瘍性中皮細胞部分との間に移行像が認められた。小型の結節性ないし乳頭状病変には、ほとんど腫瘍性中皮

細胞で構成されているものや、肉腫様部分が比較的少量であるものが認められた。

Table 1. Summary of timing of autopsy

Treatment	Total number of rats	Timing of autopsy (weeks after commencement)							
		26	27	30	37	39	40	50	52
Vehicle	5								5 (S)*
Crocidolite	10								10 (S)
MWCNT	7				1 (D)	1 (D)	2 (D), 1 (M)	1 (M)	1 (S)

*Number of rats autopsied with the autopsy status specified in the parenthesis: S, scheduled sacrifice; D, sacrifice after death; and M, moribund sacrifice.



写真：MWCNTを処置したラットで観察される比較的初期の段階の中皮腫の代表的組織像。

各臓器の漿膜面から、中皮細胞由来の比較的良好に分化した腫瘍細胞が、体腔に向かって、ポリープ状に、突出性に増殖し、一部中心部では壊死や、間質様組織の形成を伴っていた。

拡大図：結節の表層部では、中皮細胞の特徴を残している腫瘍細胞が見られた。周辺の中皮は細胞の肥大や、過形成（ここでは見られない）も認められた。

考 察

上記の結果は、MWCNTが本実験条件下において正常な雄ラットでかなり高い率で中皮腫を誘発することを示している。また、ここには示さなかったが、MWCNT 1mg/ml 2% CMC (2mg/kg) を陰嚢腔内投与した実験においても、同様に顕著な腹腔内腫瘍（中皮腫）の発現を認める動物がみられることから、MWCNTの中皮腫誘発性は疑いないものと考えられる。一方、今回陽性対照として用いたアスベスト（クロシドライト）にはまったく反応がみられなかったが、これは用いた量がラットでのアスベストの腫瘍誘発には少なすぎたことに起因するものかもしれない。

今回の結果は、MWCNTに発がん作用のあることを正常ラットを用いた動物実験で示した初めての報告になる。

本実験は、安全性評価の第一歩としてのMWCNTのハザード同定が目的であるため、用いた動物数も少なく、用量段階も1用量で大量の投与ではあったが、MWCNTやそれに関連する物質の将来の危険度を推測する上で役立つものと考えている。

菅野らの報告および今回の実験から、MWCNTに催腫瘍性のあることが明らかになったことにより、センターでは、現在、腹腔および陰嚢腔内投与で腫瘍誘発性について用量反応関係を求める試験を行っている。また、ヒトでの暴露を想定し、経気道投与による動物実験を計画している。

MWCNTが生体内においてナノサイズの状態のまま存在して作用しているかの議論がよくいわれるところであるが、我々はMWCNTに限らずナノ物質が環境中においてどのような状態で存在しているのか情報もほとんどない今は、現状にあるそのままの姿で生体に暴露された場合についてまずは、そのハザードを評価することが大切と考えている。

今回のわれわれの実験は、ある一定の条件下におけるMWCNTの発がんハザード同定である。化学物質のリスク評価には、物質が有する特徴（物理的・化学的性状等）を考慮しながら、生体反応の用量依存性や暴露形態による反応の違い、生体内挙動（代謝等）などのデータが必須であり、MWCNTばかりでなくナノ物質全体についてもそのようなデータの早急な集積が求められる。

(2) ナノ物質に関するセンターの取り組み

東京都健康安全研究センターの役割である都民の安全・安心を科学的根拠に基づいて担保するためには、生活の中にすでに使用されているナノ物質について総合的に評価することが必要と考え、2009年度より「カーボンナノチューブ等ナノ物質の健康影響に関する調査研究」と題して新たに研究計画を作成した。この計画は、健康被害未然防止の観点から、暮らしの中のナノ物質の有害性評価および暴露評価を行い、都民が安全かつ安心して暮らすことができる社会作りを図る行政施策を科学的側面から支援するための基礎的資料を作成することを目的としている。

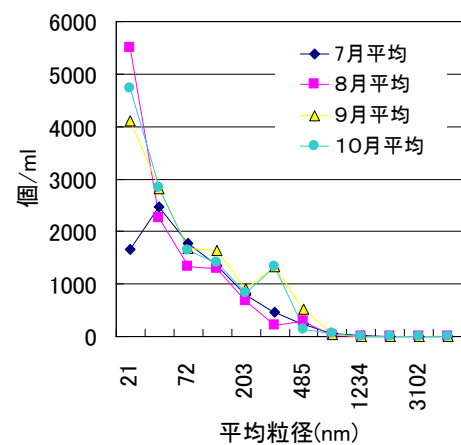
計画では

- (1) 製品中（化粧品、食品等）に含まれるナノ物質の存在状態や含有量についての定量分析法の検討について
- (2) 環境中（大気、室内、水）に放出されるナノ物質の測定法の検討と実態調査について
- (3) カーボンナノチューブ(CNT)等ナノ物質の生体内分布および生体影響の特定・確認について

の3つの項目に分類し、研究を実施する。

(1) では、ある種のナノ物質は、すでに化粧品や健康食品等、製品として流通しているが、製品中にどのように用いられ、どのような状態（ナノサイズ化しているのか）で存在しているのか、また、どの位の量が使用されているのか等、情報はほとんどない。ここでは製品中に含まれるナノ物質の存在状態や含有量について、電子顕微鏡による観察および定量分析法の検討を行う。

(2) では、現在、ナノ物質の環境実態に関する情報がほとんどないことから、環境中ナノ物質の存在実態を明らかにすることを目的としている。まず、環境中のナノ物質の種類を調査するための分析法を検討し、その後MWCNT等ナノ物質の定性、定量を行い、実際の環境中における存在を明らかにする。結果が出るのはまだ先の話になるが、現在、予備的実験として行っている、大気中（センター屋上）ナノ粒子を採取し、その粒径分布と濃度を経時的に測定した結果では、粒径の小さい物質がより多く大気中に存在していることを示唆する結果を得ている（右図）。



(3) では、生体にMWCNT等ナノ物質が暴露された際の、吸収・分布・排泄に関する情報はほとんどない。そこで、呼吸器等を介してMWCNT等ナノ物質が生体内に取り込まれた際の生体内動態を明らかにすること、また、上述したMWCNTの腫瘍誘発性に関する安全性評価のための資料作成や免疫系や脳神経系へのナノ物質の影響および遺伝毒性、細胞毒性等について調べ、影響のあるものについてはその作用機構について解明を進める、というものである。

そしてこれら得られた結果を総合的に評価することによりMWCNT等ナノ物質のリスク評価を行っていきたいと考えている。

参考文献

- 1) Takagi,A., Hirose,A., Nishimura,T., Fukumori,N., Ogata,A., Ohashi,N., Kitajima,S. and Kanno,J. (2008): Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J. Toxicol. Sci., 33, 105-116
- 2) SakamotoY., Nakae D., Fukumori N., Tayama K., Maekawa A., Imai K., Hirose A., Nishimura T., Ohashi N. and Ogata A. (2009): Induction of Mesothelioma by a Single Intrascrotal Administration of Multi-wall Carbon Nanotube in Intact Male Fischer 344 Rats. J. Toxicol. Sci., 34, 65-76