

多層カーボンナノチューブの気管内投与によるマウス胎仔および母体への影響

藤谷 知子^a, 安藤 弘^a, 久保 喜一^a, 矢野 範男^a, 高橋 博^a, 湯澤 勝廣^a, 長澤 明道^a,
広瀬 明彦^b, 西村 哲治^c, 猪又 明子^a, 小縣 昭夫^a, 中江 大^d

多層カーボンナノチューブの安全性評価の一環として、ヒトでの暴露形態に近いと思われる気管内曝露による催奇形性試験をマウスにおいて実施した。多層カーボンナノチューブを2%カルボキシメチルセルロースナトリウム/りん酸緩衝生理食塩水に懸濁して、0.0 (対照群), 3.0, 4.0, あるいは5.0 mg/kg体重を、妊娠9日のマウス母体に単回気管内投与し、妊娠18日に、妊娠に関する指標と、胎仔および母体への影響を検査した。5.0 mg/kg群で生存胎仔総重量および生存胎仔平均重量(雌雄)が減少した。4.0 および5.0 mg/kg群で、四肢減形成、無尾・短尾などの外表奇形と、脊椎癒合・不整、肋骨の癒合・不整、指骨の欠損、指骨の過多などの骨格奇形の発現が増加した。5.0 mg/kg群の母体の肺重量が有意に増加し、4.0および5.0 mg/kg群の母体の白血球数、特に好中球数が有意に増加していた。多層カーボンナノチューブは、4.0 mg/kg体重以上の気管内投与で、母体の白血球数を増加をもたらすとともに、胎仔においては著しい催奇形性を示した。多層カーボンナノチューブの催奇形性の作用機序の解明には、母体免疫系への影響による胎仔毒性発現、あるいは、多層カーボンナノチューブの胎盤通過性や胎児/仔への移行などの検討が必要であると考えられる。

キーワード: 多層カーボンナノチューブ, マウス, 気管内投与, 胎仔, 早期死胚, 四肢減形成, 脊椎癒合, 白血球数, 好酸球数

はじめに

カーボンナノチューブは、近代工業で作り出されたカーボンの結晶で、ナノマテリアルの中でも最も応用が期待される物質である。一方で、カーボンナノチューブのヒトへの危害も注目されており、国内外で多くの努力がはらわれている。中でも、その構造がアスベストと類似していることから、発ガン性の可能性が検討されてきた。高木らは、P53遺伝子欠損マウスにおいて、腹腔内投与された多層カーボンナノチューブ(以下、MWCNTと略す)が中皮腫を誘発することを最初に報告した¹⁾。直後に、坂本らは、(遺伝子操作されていない)正常ラットへの陰嚢腔内投与によって中皮腫の発生を確認し、MWCNTによる発ガンがマウスに限らず、普遍的なことを示した²⁾。以来、MWCNTの発ガン性は熱心に研究されているが、その発現機序については未だ不明である。MWCNTの遺伝子への作用が、直接にあるいは間接にあるとすれば、胎仔期の曝露による影響、特に催奇形性についても検討されるべきであると考えられるが、この点に関しての文献は見当たらなかった。そこで、MWCNTの腹腔内投与による催奇形性試験を行ったところ、前報に述べたように、MWCNTの催奇形性が確認された³⁾。そこで、投与経路をよりヒトでの曝露に近いと思われる、気管内投与として催奇形性試験を行ったので結果を報告する。

実験方法

1. 被検物質と実験動物

MWCNTは、高木ら¹⁾と坂本ら²⁾と同じ製品を、2%カルボキシメチルセルロースナトリウム(東京化成工業㈱)/りん酸緩衝生理食塩水に超音波ソニケーターで懸濁し、高圧滅菌したものを用いた。対照群には、2%カルボキシメチルセルロースナトリウム/りん酸緩衝生理食塩水を高圧滅菌したものを用いた。

Crlj:CD1(ICR)マウスは日本チャールスリバー(株)から購入し、1匹/ケージに収容し、室温23-25°C、相対湿度50-60%、照明12時間/日の飼育室で、餌と水を自由に摂取させ、当所の実験動物倫理規定に従って扱った。

2. 実験

マウスは、膣栓の認められた日を妊娠0日として、妊娠9日に、MWCNT0.0(対照群), 3.0, 4.0, 5.0 mg/kg体重を、容量1 mL/kg体重で、エアロゾライザーゾンデ(Penn-Century社製MicroSprayer Model IA-1B)を用いて気管内投与した。体重および摂餌量の測定と一般症状観察を毎日行った。

妊娠18日の午前中に、母体をジエチルエーテルで麻酔し、下腿動脈よりEDTA2Kを塗布した試験管に採血し、帝王切開にて子宮内を観察し、生存胎仔数および死胚数の計測と、母体の肝臓、腎臓、心臓、肺、脾臓、卵巣、胸腺、胸部縦隔洞リンパ節を秤量した。死胚のうち、胎仔および胎盤の

^a 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部生体影響研究科 169-0073 東京都新宿区百人町 3-24-1

^b 国立医薬品食品衛生研究所 158-8501 東京都世田谷区上用賀 1-18-1

^c 帝京平成大学薬学部 164-8530 東京都中野区中野 4-21-2

^d 東京都健康安全研究センター薬事環境科学部

吸収が進んでいるものを早期死胚とし、胎仔の形状が残存しているものを後期死胚とした。卵巣の黄体数を実体顕微鏡下で計数した。

生存胎仔は、外表観察で雌雄の確認後、肉眼で内臓の異常を観察すると共に、子宮・卵巣あるいは精巣の有無で雌雄を再確認し、95%エタノール溶液で1週間以上固定した後、表皮を剥離し、5%水酸化カリウムで24時間、5%水酸化カリウム0.002%アリザリンレッドで24時間、5%水酸化カリウム20%グリセリンで24時間、50%グリセリンで24時間以上処理して、実体顕微鏡下で骨格の観察をした。

新鮮血の白血球数、赤血球数、ヘモグロビン値およびヘマトクリット値をSYSMEX KX21NVで計数し、平均血球容積、平均血球ヘモグロビン量および平均血球ヘモグロビン濃度を算出した。血液塗抹標本を、Diff-Quik (SYSMEX)で染色し、光学顕微鏡下で白血球サブタイプを計数した。

3. 統計

対照群と投与群間の差は、Scheffeの多重比較検定と χ^2 検定を用いて分析した。

結 果

MWCNTを気管内投与された母体体重の推移を図1に示した。5.0 mg/kg群で、MWCNT投与後から妊娠の経過に伴う体重の伸びが有意に抑制された。妊娠10日（投与翌日）から13日の実摂餌量および妊娠10日と11日の相対摂餌量が、5.0 mg/kg群で有意に減少していた（データは示していない）。

妊娠・出産に関する指標と胎仔への影響を表1に示した。妊娠母体中の生存胎仔を有する母体数、卵巣の黄体数、着床数、前期死胚数および頻度、後期死胚数および頻度、生存胎仔数および頻度は、対照群と投与群間で有意な差は見られなかった。しかし、母体あたりの生存胎仔総重量、雄胎仔平均重量および雌胎仔平均重量は、5.0 mg/kg群で有意に低下していた。生存胎仔を有した母体中の外表奇形仔を有した母体の頻度、および群の中の総胎仔数中の外表奇形を有する胎仔数が、4.0と5.0 mg/kg群で有意に上昇していた。外表奇形は、4.0 mg/kg群では短尾・無尾および四肢減形成(図2)が、5.0 mg/kg群では短尾・無尾が観察された。同様に、生存胎仔を有した母体中の骨格奇形仔を有した母体数の頻度およびそのパーセンテージが、4.0と5.0 mg/kg群で有意に上昇していた。群の中の総胎仔数中の骨格奇形を有する胎仔数が、4.0と5.0 mg/kg体重群で有意に上昇して、4.0 mg/kg群では肋骨の癒合、脊椎の癒合および指骨の不足が、5.0 mg/kg群では肋骨の癒合および脊椎の癒合が観察された。3.0と5.0 mg/kg群で、指骨の過多が1例ずつ見られたが、その頻度は統計学的に有意ではなかった。

母体への影響を表2に示した。肺重量が5.0 mg/kg群で有意に増加していた他は、母体臓器重量に投与による変化は見られなかった。4.0と5.0 mg/kg群で白血球数、特に好中球数が有意に増加していた。

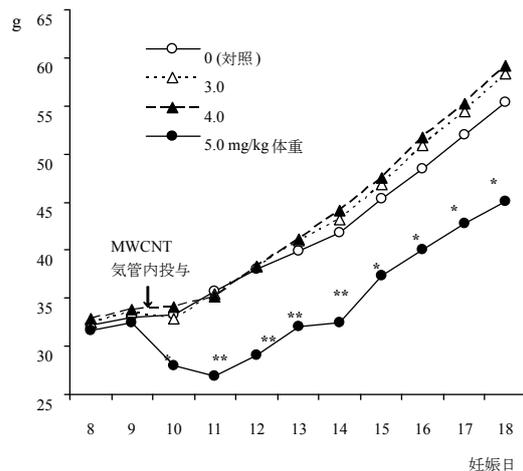


図1. 妊娠9日に3.0-5.0 mg MWCNT/kg体重を単回気管内投与された母体の体重変化

*, **: 対照群と比べてそれぞれ $p < 0.05$, 0.01



図2. 4.0 mg/kg体重群の胎仔。

左右前肢に減形成（少指・短肢）が見られる。

考 察

MWCNTは、マウスに単回気管内投与すると、4.0 mg/kg体重以上の用量で、四肢減形成や脊椎癒合・不整などの奇形を誘発することが明らかとなった。別報³⁾の腹腔内投与では、母体の胸部縦隔洞リンパ節の有意な重量増加と黒色化により、MWCNTが腹腔内から循環系に侵入したことが示唆されたが、本研究でも、胸部縦隔洞リンパ節の腫脹と黒色化が見られ、腹腔内投与の場合と同様の状況が発生したと推察される。MWCNTの胎盤通過性や経胎盤による胎仔の曝露について、明確な根拠を求めることが今後の喫緊の課題である。

また、腹腔内投与では、母体の脾臓重量や白血球（好中

球・好酸球) 数の増加から, MWCNTが母体免疫系に作用した可能性が示されたが, 本研究においても, 脾臓重量の増加は有意ではなかったものの, 白血球(好中球) 数の有意な増加が見られた. しかしながら, MWCNTの母体免疫系への影響が, このナノマテリアルによる胎仔毒性発現に関与するのか, またその作用機序については, 現在のところ判断に足るデータがなく, 今後の検討を予定している.

MWCNTの経気管曝露による催奇形性の無毒性量(no-observed-advance-effect level, NOAEL) は, 3.0 mg/kg体重以下であった. MWCNTの環境中存在量やヒトへの曝露量についてはほとんど明らかになっていないが, ヒトに

おける作業環境での曝露量を0.58-6.20 μ g/kg体重と推定した報告⁴⁾があり, 本研究で得られたNOAELは, この推定曝露量の484-5172倍である. したがって, MWCNTの催奇形性については, 少なくとも現在得られる情報に基づく限り, 直ちにヒトに対するリスクがないものと考えられる.

まとめ

MWCNTは, 妊娠9日のマウス母体への4.0mg/kg体重以上の単回気管内投与で, 母体の脾臓重量の増加や白血球数の増加をもたらした. 胎仔においては, 著しい四肢減形成や脊椎の癒合・不整などの奇形を誘発した.

表1. 妊娠9日に3.0-5.0 mg MWCNT /kg体重を単回気管内投与したマウスの妊娠に関する指標および胎仔への影響

投与量(mg/kg体重)	0.0(対照)	3.0	4.0	5.0
交配を確認した雌マウス数	11	12	16	6
妊娠していたマウス数	10	10	15	5
生存胎仔を有していた母体数	10	10	14	5
黄体数/母体	14.6±1.5	16.0±1.8	15.1±1.8	15.8±2.3
着床数/母体	12.8±1.6	14.8±2.2	13.8±2.7	11.8±2.9
早期死胚数/母体	1.20±1.48	1.40±1.35	3.13±4.73	2.20±1.92
(着床数中の%)	9.8±13.4	8.8±8.4	21.0±29.8	20.0±17.7
後期死胚数/母体	0.30±0.67	0.10±0.32	0.13±0.35	0.80±1.30
(着床数中の%)	2.0±4.6	0.6±1.8	0.8±2.2	6.3±10.1
生存胎仔数/母体	11.3±2.1	13.3±1.5	10.5±4.4	8.8±2.9
(着床数中の%)	88.1±13.3	90.6±8.3	78.2±29.3	73.7±16.7
生存胎仔総重量/母体(g)	15.4±2.3	17.8±2.7	13.9±5.2	8.9±2.5*
平均胎仔重量(g)				
雄	1.41±0.14	1.36±0.12	1.23±0.19	1.07±0.20*
雌	1.35±0.13	1.31±0.11	1.19±0.19	1.06±0.18*
外表奇形数/母体	0.00±0.00	0.00±0.00	1.14±1.99	0.60±0.89
(生存胎仔中の%)	0.0±0.0	0.00±0.00	15.6±27.9	5.6±8.2
奇形胎仔を有した母体数	0	0	5*	2*
奇形胎仔数/総胎仔数	0/113	0/133	15/158***	3/44**
奇形胎仔数				
四肢減形成	0	0	7*	0
無尾・短尾	0	0	12**	3*
骨格奇形数/母体	0.00±0.00	0.10±0.32	3.93±5.05	6.21±4.02*
(生存胎仔中の%)	0.0±0.0	0.0±0.0	39.9±48.4*	61.9±38.2*
奇形胎仔を有した母体数	0	1	6*	*4
奇形胎仔数/総胎仔数	0/113	1/133	56/158***	31/44***
奇形胎仔数				
肋骨癒合・不整	0	0	7	10
脊椎癒合・不整	0	0	53	25
少指	0	0	11	0
多指	0	1	0	1

数値は, 各群で観察された頻度あるいは平均値±標準偏差.

*, **, ***: 対照群と比べてそれぞれ $p < 0.05$, 0.01 , 0.001

表2. 妊娠9日に3.0-5.0 mg MWCNT/kg体重を単回気管内投与したマウス母体への影響

投与量(mg/kg体重)		0.0(対照)	3.0	4.0	5.0
母体数		10	10	15	5
体重 (g)	妊娠9日	33.0±2.0	33.6±2.8	34.5±2.5	31.5±2.2
	妊娠18日	55.4±3.1	58.4±5.5	55.2±8.6	45.1±4.5*
臓器重量					
	肝臓 (g)	2.80±0.27	2.73±0.36	3.05±0.31	2.44±0.11
	腎臓 (mg)	454±52	431±60	457±54	422±28
	心臓 (mg)	155±10	161±14	162±15	150±9
	肺 (mg)	157±14	168±10	197±51	228±47*
	脾臓 (mg)	136±22	122±29	149±40	158±35
	胸腺 (mg)	19.9±7.5	16.4±5.3	18.9±5.5	13.9±8.9
	胸部縦隔洞リンパ節 (mg)	4.2±3.6	6.8±5.2	6.2±4.3	8.7±2.3
	卵巣 (mg)	22.4±3.0	22.4±4.9	22.3±1.9	21.1±6.2
総白血球数 (10 ² /μL)		37.5±6.4	49.5±11.3	51.6±11.5*	51.3±10.6*
	リンパ球数 (10 ² /μL)	21.0±4.4	30.0±8.2	26.5±7.4	22.5±6.4
	好中球数 (10 ² /μL)	14.7±4.5	17.4±9.7	20.3±11.2*	25.4±11.5*
	好酸球数 (10 ² /μL)	0.7±0.9	1.1±0.7	2.7±2.5	1.6±1.1
	単球数 (10 ² /μL)	1.2±0.7	1.0±0.5	2.2±1.4	1.7±0.4

数値は各群の平均値±標準偏差.

* : 対照群と比べて $p < 0.05$

文 献

- 1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., *et al.*: *J. Toxicol. Sci.*, **33**, 105-116, 2008.
- 2) Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., *et al.*: *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 65-76, 2009.
- 3) 藤谷 知子, 安藤 弘, 久保 喜一, 他: 東京健安研究年報, **63**, 203-209, 2013.
- 4) ナノ材料リスク評価書—カーボンナノチューブ(CNT)—中間報告書: 2009.10.06, Executive Summary, 中西準子 監修, 産業技術総合研究所

Effects of Intratracheally Administrated Multi-Wall Carbon Nanotubes (MWCNT) on Mouse Fetus and Dam

Tomoko FUJITANI^a, Hiroshi ANDO^a, Yoshikazu KUBO^a, Norio YANO^a, Hiroshi TAKAHASHI^a, Katsuhiko YUZAWA^a, Akemichi NAGASAWA^a, Akihiko HIROSE^b, Tetsuji NISHIMURA^c, Akiko INOMATA^a, Akio OGATA^a and Dai NAKAE^a

In our previous study, multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) intraperitoneally administered in mice had teratogenic effects. In the present study, we examined the possible teratogenicity of intratracheal administration to the dam in mice. Multi-wall carbon nanotubes suspended in 2% sodium carboxymethyl cellulose/phosphate buffered saline, 0(control), 3.0, 4.0 or 5.0 mg/kg b.w. were intratracheally administered on day 9 of gestation in CD1 (ICR) mice. At day 18 of gestation, the parameters of pregnancy, effects on fetuses and effects on dams were examined. The total weight of live fetuses and the mean male and female live fetuse weight in the 5.0 mg/kg group were significantly lower than those of the control group. External malformations (reduction deformity of limbs, absent or short tail) and skeletal malformations (fusion of vertebrae, fusion of rib, hypophalangia, hyperphalangia) were increased in the 4.0 and 5.0 mg/kg groups. The lung weight of dams in the 5.0 mg/kg group and white blood cell counts, especially of the neutrocyte counts, of dam in the 4.0 and 5.0 mg/kg groups were significantly higher than those of the control group. Intratracheally administrated multi-wall carbon nanotubes at a doses of 4.0 or more mg/kg b.w. increased white blood cell counts in dam and had teratogenic effects in the fetus. Examination of a possible fetal toxicity by immunological changes in the dam or a possible trans-placental transfer of multi-wall carbon nanotubes to the fetus would be necessary to clarify the mechanism of teratogenicity of multi-wall carbon nanotube

Keywords: multi-walled carbon nanotubes, mouse, intratracheal, fetus, reduction deformity of limb, fusion of vertebrae, white blood cell count, neutrocytes count

-
- a Tokyo Metropolitan Institute of Public Health
3-24-1, Hyakunin-cho, Shinjuku-ku, Tokyo 169-0073, Japan
 - b National Institute of Health Science
1-18-1, Kamiyohga, Setagaya-ku, Tokyo 158-8501, Japan
 - c University of Teikyou Heisei
4-21-2, Nakano, Nakano-ku, Tokyo 164-8530, Japan