

外来性繊維状異物のマウスにおける胎仔毒性

Fetal Toxicity of Exogenous Fibrous Materials in Mice

平成 28 年度 論文博士申請者 藤谷 知子 (Fujitani, Tomoko)

指導教員 池田 玲子

ナノ物質は少なくとも一次元が 100nm より小さい素材で、医薬品、化粧品、家電、電気電子製品などでの応用が期待されており、その利用促進の為に、入念な安全性試験が必要と考えられる。代表的なナノ物質であり、既に多方面に使用されて需要が伸びている多層カーボンナノチューブ (MWCNT) について、マウスおよびラットにおける中皮腫発生の報告がある。^{1,2)} しかし、母体の曝露による胎仔への影響に関しては知られていないため、MWCNT およびその類似物質であるアスベストについて、胎仔への影響をマウスにおいて検討した。

なお、本実験は、東京都健康安全研究センターにおける研究倫理規定に基づき適正に行われた。マウスの取り扱いは、東京都健康安全研究センター動物実験実施規定に従って適正に行われた。

1.MWCNT の胎仔への影響³⁾

【方法】 MWCNT は、すでにマウス (*p53* gene 欠損)¹⁾ およびラット²⁾ において中皮腫発生が認められた三井 MWNT-7 (現在は保土ヶ谷工業取扱い) を用いた。被検物質は、2%カルボキシメチルセルロースナトリウムに懸濁し、高圧蒸気滅菌したものを、腹腔内

投与では 10mL/kg 体重、気管内噴霧投与では 1mL/kg 体重で母体に投与した。対照群には、懸濁溶媒のみを投与した。妊娠 9 日の ICR (Crlj:CD1) マウス母体に、被検物質を腹腔内 (2-5mg/kg 体重) あるいは気管内 (3-5mg/kg 体重) 噴霧投与し、妊娠 18 日に、子宮を切開して、死胚および生存胎仔の数および位置を確認し、生存胎仔および母体の主要臓器を秤量した。生存胎仔は、雄雌の確認および外表奇形検査後に、定法に従って骨格を観察した。対照群と投与群の差は、Scheffe の多重比較検定および、 χ^2 検定で分析した。

【結果】 腹腔内投与では、4-5mg/kg 体重群で投与直後から臍出血が認められ、最終母体体重が低下した。全投与群 (2-5mg/kg 体重) で母体の脾臓重量が用量依存性に増加し、2-4mg/kg 体重群で好中球数および好酸球数が増加していた。4-5mg/kg 体重群で早期死胚の発現 % が増加し、全投与群で、生存胎仔中の外表奇形 (四肢形成不全) 発現頻度と骨格奇形 (脊椎および肋骨の癒合) 発現頻度が増加した。投与部位に投与物質の残留が周産期まで肉眼で認め

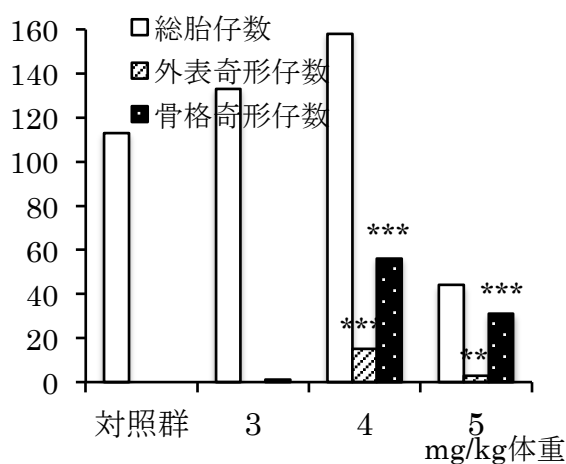


図 1. MWCNT の気管内投与による奇形発現頻度
 : $p < 0.01$, *: $p < 0.001$

られたにもかかわらず、後期死胚の増加は認められなかった。気管内投与では、5mg/kg 体重群で母体体重の有意な低下と脾臓重量の有意な増加および白血球数の有意な増加が見られ、4-5mg/kg 体重群で生存胎仔中の外表奇形発現頻

度と骨格奇形発現頻度が有意に増加していた（図 1）

【考察】死胚や奇形の発現が見られた投与群で、母体の白血球（特に好中球）数の増加、脾臓重量の増加が見られ、母体内の炎症性反応が示唆された。妊娠は、生体内に自己とは異なる遺伝子をもつ生命の発育を例外的に認めるといふ、免疫学的に微妙なバランスを保った状態であり、そのバランスを乱す炎症反応の促進等は、容易に死胚の増加や胎仔への悪影響を引き起こす可能性がある。多層カーボンナノチューブやアスベストによる中皮腫発現の作用機序として、炎症反応の持続が推測されており、今回の実験でも、母体の炎症性反応が示された。しかし、本実験で観察されたのは、早期死胚であること、および欠指や欠肢は妊娠 9 日のダメージによって特異的に見られる奇形であることから、本実験で重要なのは、投与直後初期の炎症反応と考えられる。

一方、ナノサイズの直径の繊維性異物であるアスベストは、ヒトおよび実験動物で胎盤通過と胎児（仔）への移行が実証されており、腹腔内投与直後にマクロファージによる貪食が促されるとの報告がある。本報告に述べた実験でも、腹腔内に投与した MWCNT が胸腔内縦隔リンパ節に移行して黒く着色しているのが観察されており、貪食された MWCNT が、リンパの流れあるいは血流に乗って体内を移動していることが推測される。培養細胞において、カーボンナノチューブが細胞分裂を阻害し倍数体を生じるという報告がある。細胞分裂により急激な成長をしている胎仔においては、細胞分裂阻害は胎仔の死や発育の阻害（四肢の奇形）等を引き起こすであろう。マウスの妊娠 9 日目に投与された化合物の母体血中濃度

の上昇と胎仔への移行により欠指や欠肢を引き起こした報告があり、本実験でも、同様のことが起こった可能性がある。

2. アスベストの胎仔への影響⁴⁾

【方法】アスベストは、国際対がん連合（UICC）標準品のクロシドライト、クリソタイルおよびアモサイトをを用いた。3種のアスベストの等用量（40mg/kg体重）をマウスに腹腔内投与し、MWCNTの実験と同様に死胚や奇形の観察をした。

【結果および考察】3種のアスベストの投与では、クロシドライト群およびアモサイト群で脾臓重量と好中球数の有意な増加が見られ、クリソタイル群とアモサイト群で早期死胚を有する母体の頻度

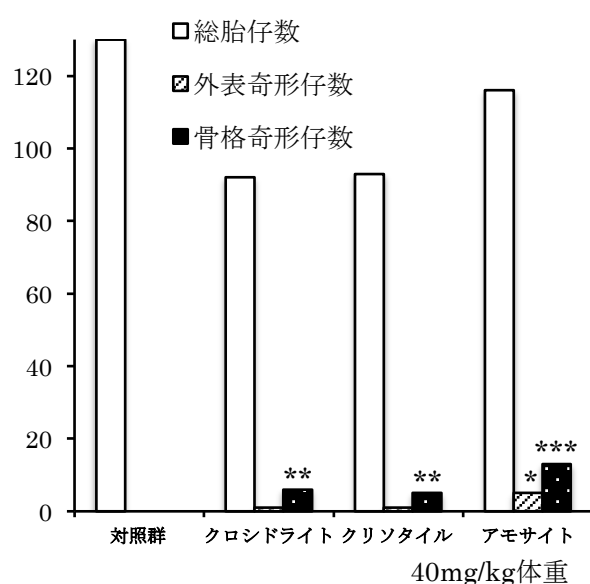


図2. アスベストの投与による奇形発現頻度

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

が有意に増加し、アモサイト群の外表奇形発現頻度と3種の全ての群の骨格奇形発現頻度が有意に増加していた(図2)。観察された奇形は、MWCNTと同様のものであった。このアスベストの胎仔毒性の作用機序は、MWCNTと同様と考えられる。

3. サイズの異なる6種のMWCNTの胎仔毒性の比較⁵⁾

【方法】1.の実験の検体(C)を含む、長さの異なる6種のMWCNT(表1)の等用量(4mg/kg体重)を、マウスに腹腔内投与して胎仔毒性を比較するとともに、投与後2時間の母体血中のインターロ

イキン-6 (IL-6) および単球走化性因子 (MCP-1) 濃度を測定した。

表 1. 6 種の MWCNT のサイズ、純度および鉄含量

MWCNT 製品	長さ (μm)	直径 (nm)	純度 (%)	鉄含量 (%)
A	0.5-2	40-70	-	0.046
B	1-4 ; 50.9% 5-20 ; 27.5% 20- ; 21.6%	50-80 ; 94.8%	>98	0.046
C	1-4 ; 38.6% 5-20 ; 58.3% 20- ; 3.1%	50-80 ; 97.2%	>95	0.35
D	0.5-10	85-200	-	6.504
E	平均 6	平均 150	>99.95	<0.005
F	数十～数百	20-100	85-94	

【結果】6 種の MWCNT の腹腔内投与では、母体の脾臓重量が B および C 群で有意に上昇し、C 群の白血球数、B および C 群の好中球が有意に上昇し、B 群の生存胎仔率はゼロ%、C 群の生存胎仔率は $39 \pm 40\%$ と著しく減少した (図 3)。生存胎仔の減少は、早期死胚の増加によるものであった。母体血中の IL-6 および MCP-1 濃度は、B および C 群で著しく上昇し、また D および E 群では上昇傾向を示し、A 群および F 群では変化が軽微であった (図 4)。

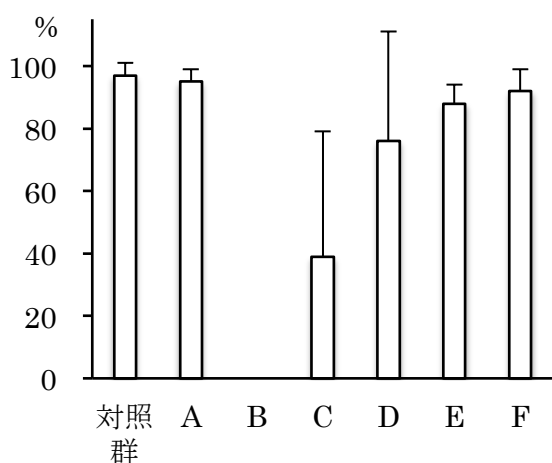


図 3. 生存胎仔率
カラムは母体間の平均値、バーは標準偏差

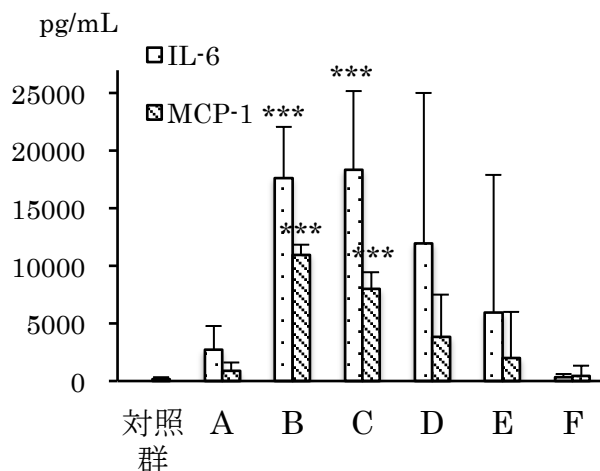


図 4. 母体血中 IL-6 および MCP-1 濃度
カラムは平均値、バーは標準偏差
***: $p < 0.001$

【考察】MWCNTの胎仔毒性を同じ投与量で比較すると、直径・純度・鉄含有量とは明確な関連性がなく、短い製品（A）と長い製品（F）には胎仔毒性がなく、中間の長さの製品で胎仔毒性が鋭敏に表れるというサイズ依存性があるようであった。また、この実験においても、鋭敏に胎仔毒性が見られたB群およびC群で白血球（好中球）数の上昇や脾臓重量の増加のほか、IL-6およびMCP-1の血中濃度上昇も胎仔毒性と合致していたことから、母体の炎症性反応による胎仔毒性の可能性が強く示唆された。

4.総括

繊維状外来異物である多層カーボンナノチューブとアスベストはマウスにおいて胎仔毒性（死胚・奇形）を示し、その作用は、母体における炎症作用と関連することが示唆された。また、被検物質の母体内での移動が視認され、胎盤通過・胎仔への移行後の細胞分裂阻害作用による胎仔毒性発現機序も可能性として残された。

参考文献

- 1 . Takagi A., Hirose A., Nishimura T., Fukumori N., Ogata A., Ohashi N., Kitajima S., Kanno J., *J. Toxicol. Sci.*, **33**,105-116. (2008).
- 2 . Sakamoto Y., Nakae D., Fukumori N., Tayama K., Maekawa A., Imai K., Hirose A., Nishimura T., Ohashi N., Ogata A., *J. Toxicol. Sci.*, **34**, 65-76 (2009).
- 3 . Fujitani T., Ohyama K., Hirose A., Nishimura T., Nakae D., Ogata A., *J. Toxicol. Sci.*, **37**, 81-89 (2012).
- 4 . Fujitani T., Hojo M., Inomata A., Ogata A., Hirose A., Nishimura T., Nakae D., *J. Toxicol. Sci.*, **39**, 363-370 (2014).
- 5 . Fujitani T., Inomata A., Ogata A., Sakamoto Y., Hirose A., Nishimura T., Ikeda R., Nakae D., *Toxicology Reports.*, **2**, 1404-1408 (2015).