表題：

p53+/-マウスにおける多層カーボンナノチューブ腹腔内投与による中皮腫の発生

著者：

Atsuya Takagi, [1] Akihiko Hirose, [2] Tetsuji Nishimura, [3] Nobutaka Fukumori, [4] Akio Ogata, [4] Norio Ohashi,[4] Satoshi Kitajima[1] and Jun Kanno[1]

所属施設：

[1] 東京都世田谷区上用賀 1-18-1、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部

[2] 東京都世田谷区上用賀 1-18-1、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター総合評価研究室

[3] 東京都世田谷区上用賀 1-18-1、国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部

[4] 東京都新宿区百人町 3-24-1、東京都健康安全研究センター環境保健部

論文のタイプ：原著

欄外見出し：**MWCNT** による **p53+/-**マウスの中皮腫

カテゴリー：

A11 Other compounds

B10 Other systems

C4 Carcinogenesis

連絡先：

菅野純、東京都世田谷区上用賀 1-18-1、国立医薬品食品衛生研究所安全性生物試験研究センター毒性部、

電話: +81-3-3700-9619

ファックス: +81-3-3700-9647

e-mail: kanno@nihs.go.jp

要約

炭素由来のナノ材料（Nanomaterials）は一つ以上の次元がマイクロメータ単位のサイズとなる様々な形態の粒子を形成する傾向がある。その中で多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は長さがおよそ 10～20µm で縦横比が 3 以上の繊維状又は棒状の粒子を形成する。アスベスト及びいくつかの人造繊維を含め、このサイズの繊維状粒子はがん原性、典型的には中皮腫、を示すことが報告されている。本報告書で我々は、アスベストに高い感受性を示すことが知られている p53 ヘテロ欠失マウスに MWCNT を腹腔内投与したとき、陽性対照物質のクロシドライト（青石綿）と同様に中皮腫が惹起されたことを報告する。この結果は、炭素から構成されるマイクロメータサイズの繊維状又は棒状の粒子も、アスベストで想定されている発がんメカニズムを共有する可能性を示唆している。ナノ材料の産業化を適切に継続するために、その生物学的特性なかんずくがん原性に係わる特性、とくにその生体内における長期耐久性（biodurability）が十分に評価されるまで、労働環境及び将来の市場の両者における繊維状又は棒状の炭素粒子ばく露を適正に制御する戦略を実行するのが賢明であろう。

キーワード

多層カーボンナノチューブ (MWCNT)

アスベスト

フラーレン

中皮腫

P53 ヘテロ欠失マウス

マイクロメータのサイズの粒子

緒言

ナノ材料の消費財や医薬品への応用が近い将来急速に増加することが予測され、ヒト及び環境に対するその潜在的な毒性を理解することの重要性が指摘されている（Lam et al., 2006; Donaldson et al., 2006）。それらのナノ材料の中で、カーボンナノチューブ及びフラーレンは最も広範に研究され、開発されてきたナノ粒子である。カーボンナノ粒子は凝集する性質があるために、互いに凝集してマイクロメータサイズの粒子となる傾向がある（Lam et al., 2006; Luo et al., 2004）。そして、それは生体内で非常に安定であると考えられている。この二つの要因から、ナノメータサイズの真のナノ粒子の生体内における性質についての考察を始める以前に、毒性学者としてはマイクロメータサイズの粒子の慢性毒性に懸念をいだくものである。非分解性のマイクロメータサイズの粒子が一旦体内にとりこまれると、その沈着部位でそれらに対する長期に持続する除去作用及び炎症作用が持続的な酸化的ストレス反応を惹起し、その結果組織の破壊を来たし、ときにはがん原性を発現する可能性がある（Coussens and Werb, 2002）。さらに、それがマイクロメータ長の繊維状又は棒状の粒子であった場合は、ヒト及び動物でがん原性が報告されているアスベストと形状が共通していることも懸念事項となる（Hei, et al., 2006; WHO.1986, 1998）。アスベストのがん原性に関連して知られているもう一つの因子は鉄（Fe）の含量である。最も毒性の強いアスベスト（クロシドライト又は青石綿）は鉄の含量が最も高い（WHO, 1986）。フェントン反応が酸素のラジカル種の産生を促進してがん原性を誘導することも指摘されている（Jiang et al., 2006; Gulumian and Wyk, 1987）。

MWCNT はマイクロメータサイズの繊維状又は棒状粒子を形成をする。その直径は 0.01～0.2μm（Hou et al., 2003）、長さは数 10μm にもなって、アスベストのサイズと形に一致する。さらに、CNTs は製造工程に由来するかなりの量の鉄を含有していることが報告されている（Lam et al., 2006）。それらの特性から、我々は生体がアスベストと同じ経路で MWCNT のばく露を受けた場合にアスベストと類似したがん原性が示されるかもしれないとの仮説をたてた。本研究では、短期のバイオアッセイ法、則ち p53 ヘテロ欠失マウスを用いた腹腔内投与モデルを採用したが、この p53 ヘテロ欠失マウスモデルはアスベストに感受性が高く、中皮腫の発生が早いことが知られている（Marsella et al., 1997; Vaslet et al., 2002）。このマウスモデルは遺伝毒性を有するがん原性物質（Pritchard et al., 2003）のみではなく活性酸素種（ROS）関連発がん物質（Tazawa et al., 2007）にも感受性が高いことが報告されており、そのために、想定されているアスベスト及びアスベスト様粒子の発がんメカニズム（Marsella et al., 1997; Vaslet et al., 2002）に適合するも

のである。

材料及び方法

実験動物

p53 ヘテロ欠失（p53(+/-)）マウスは Dr. S. Aizawa より譲与された(Tsukada et al., 1993)。この p53(+/-)マウスを正常な野生型雌 C57BL/6 マウス（SLC, Shizuoka, Japan）と交配した。20 世代以上の戻し交配を行い、9〜11 週齢の雄 p53(+/-)マウス 76 匹を実験に用いた（19 匹/群）。すべてのマウスを国立医薬品食品衛生研究所（NIHS、東京、日本）の動物飼育施設で照明を 12 時間の明暗サイクルとした SPF の条件下で個別に飼育した。マウスには水道水及び滅菌 CRF-1 飼料（Oriental Yeast Co. ltd.）を自由に摂取させた。実験は NIHS の動物飼育管理委員会の規則及び承認のもとに人道的に実施された。

組織学的方法

がん原性の評価のために、肝臓、腎臓、脾臓、肺、消化管の各臓器及び肉眼で認められた腫瘍（腹膜癒着が著しい場合には一塊として）を 10%中性緩衝ホルマリンに固定した。通常の方法で標本作製を行ってパラフィン包埋切片をヘマトキシリン・エオシン染色（H&E）し、光学顕微鏡で病理組織学的に検査した。

材料

本研究では、多層カーボンナノチューブ（MITSUI MWCNT-7, Lot NO. 060125-01k）、UICC 標品クロシドライト（NIHS 保管品）、フラーレン（C_{60}, Nanom purple, Frontier Carbon Corporation, Tokyo Japan）を使用した。

MWCNT の重量あたりの粒子数及び粒度分布を次の方法で測定した。すなわち、1.03 mg の MWCNT を 5 ml の 5%Triton X-100 (Qbiogene, CA, USA)に懸濁し、30 分間超音波処理をしてから直ちに 5%Triton X-100 で 100 倍に希釈した。さらに、その 5µl をスライドグラス上に載せた。そのスライドグラスを電気オーブンで 480℃まで 20 分間加熱し、プ

ラチナとパラジウムで金属化してから走査型電子顕微鏡で観察した。全視野を写真撮影し、拡大した写真の上で粒子の数とサイズを測定した。その結果、1g の MWCNT に含まれる粒子数は $3.55x10^{11}$ であった。その長さと幅の分布を Figure 1 に示した。UICC 標品のクロシドライトの重量あたりの粒子（繊維）数は $2.93x10^{12}$/g と報告されている（Moalli et al., 1987）。MWCNT 中にふくまれる元素の量はコリジョンタイプの誘導結合プラズマイオン質量分析装置（ICP-MS 7500ce, Agilent Technologies, Inc., Santa Clara, CA, USA）と燃焼分解イオンクロマトグラフィー（DX-120, Dionex Corporation, Sunnyvale, CA, USA）で測定した。高周波加熱による硝酸・過塩素酸混合液溶解で測定した鉄の平均含量は約 3,500 ppm（0.35%）であった。硫黄含量は約 470 ppm。塩素は 20 ppm で、フッ素及び臭素は検出限界（各 5 及び 40 ppm）未満であった。

粒子懸濁液の調製

MWCNT、クロシドライト及びフラーレンを 3mg/ml の濃度で 0.5%メチルセルロース（信越化学）溶液に懸濁し、滅菌（121℃、15 分間）した。Tween 80（東京化成工業）の添加（最終濃度が 1.0%）後、その溶液を超音波ホモジナイザー（VP30s, TAITEC Co. Japan）を用いて超音波処理した（Figure 2 を参照すること）。

マウスへの投与

19 匹の 9～11 週齢の雄 p53(+/-)マウスに粒子数 1×10^9（3 mg/匹に相当）の MWCNT 懸濁液 1 ml を単回腹腔内に投与した。この粒子数は報告されている範囲（Roller et al., 1997）の中では中等度のものであり、人造鉱物繊維に対するガイドライン案（Bernstein and Riego Sintes, 1999）で推奨されている最大量に相当する。実験第一日目には、別の 19 匹のマウスには 3mg/匹のフラーレンを懸濁液（1 ml）として単回腹腔内に投与し、さらに、がん原性試験陽性対照として別の 19 匹のマウスに $1x10^{10}$（3mg/匹に相当）のクロシドライトを懸濁液（1 ml）として投与した。溶媒（1 ml）を 19 匹のマウスに投与して陰性対照とした。各処理群に対応するサテライト群をそれぞれ 6 匹の野生型雄 C57BL/6 マウスで構成し、同様の処理を行なった後、実験 10 日に安楽死させ、投与後早い時期の腹腔内の変化を観察した。

結果

MWCNT 懸濁液を腹腔内投与の前に十分に撹拌したが、分散した棒状又は繊維状粒子の中に凝集塊（aggregates）も含まれていた（Figure 2）。クロシドライト懸濁液では棒状又は繊維状粒子が均等に分散していた（Figure 3a）。フラーレンはマイクロメータのサイズの多角形粒子であった（Figure 3b）。

実験 10 日にサテライト群で投与後の早い時期の腹腔内変化を観察した（Figure 4）。MWCNT を投与したマウスでは軽度な線維素性癒着がわずかな腹水とともに認められ、MWCNT 凝集塊による散在性の黒色斑も認められた。腸管（intestine loop）は水腫状であり、弛緩していた。クロシドライトを投与したマウスでも同じ所見が認められたがその変化の程度は軽く、明らかな腹膜癒着は認められなかった。クロシドライトを投与したマウスではクロシドライト凝集塊による青緑色斑が腹膜表面に認められた。フラーレンを投与したマウスでは、漿膜表面に凝集塊による黒色斑が認められた以外はほとんど変化がなかった。

溶媒投与対照群では腹腔内に変化は認められなかった。

主実験群においては、ひとつの群で死亡率が 100％になるまでマウスの観察を継続した。MWCNT 投与群で最も高い死亡率が認められ、次はクロシドライト投与群であった。実験は 25 週で終了し、この時点で溶媒投与及びフラーレン投与群のすべてのマウス及びクロシドライト投与群の 6 匹のマウスを剖検した。MWCNT 投与群では、わずかな腹水を伴う中等度から高度な線維性腹膜癒着（fibrous peritoneal adhesion）、ときには黒色沈着物を伴う線維性腹膜肥厚（fibrous peritoneal thickening）及び高頻度に最大 2.7 x 1.5cm 大の肉眼的腹膜腫瘤（peritoneal tumor）が認められた（Figure 5a）。アスベスト投与群では、その程度は低いものの MWCNT 投与群と同様な所見が青緑色斑とともに認められた。なお、数例には漿膜表面に小型のポリープ様結節（polyp-like nodules）も認められた（Figure 5b）。フラーレン投与群では腹膜癒着も線維性肥厚もまた腫瘍も認められなかった。この群では漿膜表面に小型の黒色斑が散在性に認められたのみであった。

組織学的には、MWCNT 投与群にみられた腹膜癒着及び線維性肥厚は、MWCNT に対する線維性瘢痕及び異物肉芽腫の形成によるもので、多核巨細胞を含む食細胞を伴うものであった。この線維肉芽腫性（fibrogranulomatous）病巣に隣接して次のような多様な腹膜中皮腫の病巣が認められており、異型中皮腫細胞からなる結節性重層化病変（nodular mesotheliomatous pile-ups）（Figure 6）、時に鋲釘状を示し（occasional hobnail appearance）、軽度から中等度の血管を伴った間質形成（fibrovascular stem formation）を伴う典型的な上皮型中皮腫（Figure 7a）から、高度異型悪性中皮腫に匹敵し、時に中心壊死を示し、高頻度の分裂像を伴う未分化細胞で構成された直径が 2.7 x 1.5cm といった大きな腫瘍（Figure 7a）まで、多様な腹膜中皮腫がみられた。この大きな腫瘍は腹壁、横隔膜、肝臓実質及び膵臓に浸潤し、ときには胸腔にまで及んでいいた。なお、遠隔転移は認められなかった。

中皮腫による累積死亡率を Figure 8 に示した。侵襲性の高い大きな中皮腫が死因と考えられるマウスを Kaplan-Meier 法でプロットした。2 番目に多い死因（second major cause of death）は高度な腹膜癒着による絞扼性イレウス（constriction ileus）であった。衰弱あるいは死亡したマウス又は 25 週目に安楽死させたマウスの中で、MWCNT 投与群で 3 匹（死因 : 3 匹全てがイレウス）、クロシドライト投与群で 6 匹（死因 : 3 匹がイレウス、3 匹は 25 週における安楽死）に偶発性の中皮腫（incidental mesotheliomas）が認められた。中皮腫の発生は、MWCNT 投与群においては投与 84 日目に初めて偶発性のケースがみつかり、その後全体を通じての発生率は 14/16 （87.5%、 11 例では死因となり 3 例では偶発性）であったが、クロシドライト投与群では 14/18（77.8%、8 例は死因となり 6 例では 25 週目における安楽死させた 3 例を含め偶発性）であった。 フラーレン投与群 152 日目の慢性腎盂腎炎による途中死亡一匹を除き、フラーレン投与群及び対照群では腫瘍発生及び途中死亡は認められなかった。

大きな線維性瘢痕/肉芽（granulation）の中に、Figure 2c 及び 2d に示したものと類似した凝集塊が包み込まれているのが認められた。MWCNT 及びクロシドライトの分散した繊維が線維化病変部の細胞外に、又は食細胞によって貪食された像として認められた。そのような繊維を含んだ細胞（fiber-laden cells）が腹膜の病変部のみならず肝類洞内又は肝葉間の線維性中隔に沿って及び腸間膜リンパ節の中にも認められた（Figure 9）。

フラーレン投与群では腹膜の病変はわずかであり、小さな暗褐色斑が漿膜表面に認められたのみであった。この暗褐色斑は組織学的には泡沫細胞の薄い層に囲まれた多角形の裂隙（polygonal clefts）ないし裂孔（lacunae）が、線維中隔で隔てられている像を示していた（Figure 10）。この裂隙ないし裂孔は投与したフラーレン凝集塊のサイズと形に一致していた。フラーレンは有機溶媒とくにキシレンによく溶けるために、埋め込まれていた粒子が組織標本の作成中に溶けて洗い流されて、裂隙として残ったものと思われる。その裂隙の辺縁が褐色に染まっており、食細胞によるフラーレン粒子の表面の生体

内分解の可能性を示唆していることは注目される。すなわち、サブミクロンサイズとなったフラーレン粒子が蛋白及び/又はその他の有機成分と混合したために、溶媒に溶けにくくなっていることが想像される。

以上をまとめると、p53(+/-)マウス発がんモデルにおいてMWCNTの腹腔内投与により中皮腫が惹起された。そして、これはおそらくアスベストとサイズ及び形状が類似していること、並びに生体内に於ける滞留性（biopersistency）によるものである。

考察

異物発がんは様々な発がんメカニズムの中のひとつのカテゴリーである。生体分解を受けず（non-digestive）体内に長期間残留する異物に対する炎症反応によって局所に生ずるROS及び/又はRNSががん原性の反応を惹起することが想定されている（Tazawa et al., 2007）。そして、この性質を促進する特殊な形とサイズについて、アスベストや人造繊維状物質に対する研究がなされてきた（WHO 1986, 1998）。アスベスト型のがん原性を研究するために、吸入あるいは経気管経路による肺へのばく露と並行し、腹腔内投与も実施されている。げっ歯類モデルがヒトにおける吸入ばく露と同等と見なせるか否かの議論が行われてきた（Pott et al., 1994）。そして現在、ハザードを確認するという点では腹腔内投与モデルも重要な意味をもつと理解されている（WHO 1998, 2002）。一方、p53 (+/-)マウスは一般に発がん物質とくに遺伝毒性に基づく発がん物質の予測に適切なモデルであると言われている（Pritchard et al., 2003）。また最近、異物発がんのように酸化的ストレスによるがん原性に感度が高く、野生型マウスよりも比較的短期間の潜時で腫瘍を生じることが報告されている（Tazawa et al., 2007）。実際に、このモデルにアスベストを腹腔内投与した場合、短期間で中皮腫が発現している（Marsella et al., 1997; Vaslet et al., 2002）。MWCNTの遺伝毒性はまだ不明だが、我々の実験は、腹腔内投与されたMWCNTがおそらくその形/サイズ及び生体内での安定性によってp53 (+/-)マウスに対してがん原性を発揮したことを示した。

ヒトにおけるMWCNTによる中皮腫誘発性の予測がp53 (+/-)マウスモデルを用いたこの試験で完了したとは言えない。例えば、グラスファイバーは沈着部位から比較的早く消失するために、アスベストと同じ形及びサイズであってもヒトに中皮腫を誘発しにくいようである（Lippmann, 1990）。いかなる法的規制措置を行う前にMWCNTの生体内における耐久性（biodurability）を厳密に試験しなければならない。同じように、我々

が使用した MWCNT の Fe 含量はクロシドライトよりも低かったが、Fe 含量もがん原性のひとつの重要な因子である(WHO, 1986)。

Figure 1 に示したように、本試験で使用した MWCNT は様々なサイズの棒状及び繊維状粒子から成るものであった。一般に、ナノ材料のバルクには様々なタイプの粒子が含まれ、少なくともサイズは数十乃至数百マイクロメータから小さいものは真のナノメータまでと広範囲のものを含む。フラーレンの試験から示唆されたように、マイクロメータのサイズの粒子は食細胞の異物消化作用のような生物学的な作用によりはるかに小さなサイズになる可能性がある。本試験については、5 マイクロメータ以上の長さの MWCNT の生物学的作用を検討したことにその意義を限定して解釈することが重要である。本試験の 25 週間という時間枠では真にナノメートルのサイズの CNTs 及びフラーレンの生物学的作用は評価しておらず、それらについてはさらに研究が必要である。繰り返しになるが、本実験は、マイクロメータサイズの棒状の粒子による中皮腫発がんを検出するのに対しては十分であると考える。しかし、真のナノサイズ粒子の CNT やフラーレンび生体影響については何らの評価もできないので、これらについては今後の研究を待つ必要がある。

ナノ粒子のような新規の物質の安全性評価は新たなパラダイムを提起する。それについての鍵となることは、公衆に対するそのような新規物質の全面的な暴露がまだはじまっていないことである。したがって、有害性（hazard）を評価する試験からの情報を直接に製品開発計画にフィードバックすることができる機会があり、そうすることで有害な暴露を事前に防止できる。そうすることで製造業者は、初期の（安全性の低い）製品を広く市販した後に、がん原性試験などの一連の慢性毒性試験が終了するのを待つようなリスクに製造業者自身及び消費者をさらすことなく、より安全な製品を製造することができると考える。

謝辞

技術的な支援をしていただいた Mr. Masaki Tsuji に感謝する。本研究は厚生労働省健康科学研究補助金・H17-科学-012 及び H18-科学一般-007（Health Sciences Research Grants H17-kagaku-012 and H18-kagaku-ippan-007）によって実施されたものである。

文献

Bernstein, D.M. and Riego Sintes, J.M. (1999): Methods for the determination of the hazardous properties for human health of man made mineral fibres (MMMF). In: European Commission Joint Research Centre. Institute for Health and Consumer Protection, Unit: Toxicology and Chemical Substances. European Chemicals Bureau. pp. 44-45.

Coussens, L.M. and Werb Z. (2002): Inflammation and cancer. Nature, 420, 860-867.

Donaldson, K., Aitken, R., Tran, L., Stone, V., Duffin, R., Forrest, G. and Alexander, A. (2006): Carbon nanotubes: a review of their properties in relation to pulmonary toxicology and workplace safety. Toxicol. Sci., 92, 5-22.

Gulumian, M. and van Wyk, J.A. (1987): Hydroxyl radical production in the presence of fibres by a Fenton-type reaction. Chem. Biol. Interact., 62, 89-97.

Hei, T.K., Xu, A., Huang, S.X. and Zhao, Y. (2006): Mechanism of fiber carcinogenesis: from reactive radical species to silencing of the beta igH3 gene. Inhal. Toxicol., 18, 985-990.

Hou, P.-X., Xu, S.-T., Ying, Z., Yang, Q.-H., Liu, C. and Cheng, H.-M. (2003): Hydrogen adsorption/desorption behavior of multi-walled carbon nanotubes with different diameters. Carbon, 41, 2471-2476.

Jiang, L., Zhong, Y., Akatsuka, S., Liu, Y.T., Dutta, K.K., Lee, W.H., Onuki, J., Masumura, K., Nohmi, T. and Toyokuni, S. (2006): Deletion and single nucleotide substitution at G:C in the kidney of gpt delta transgenic mice after ferric nitrilotriacetate treatment. Cancer Sci., 97, 1159-1167.

Lam, C.W., James, J. T., McCluskey, R., Arepalli, S. and Hunter, R. L. (2006): A review of carbon nanotube toxicity and assessment of potential occupational and environmental health risks. Crit. Rev. Toxicol., 36, 189-217.

Lippmann, M. (1990): Effects of fiber characteristics on lung deposition, retention, and disease. Environ. Health Perspect., 88, 311-317.

Luo, J., Peng, L.-M., Xue, Z.Q. and Wu, J.L. (2004): Positive electron affinity of fullerenes: Its effect and origin. J. Chem. Phys., 120, 7998-8001.

Marsella, J.M., Liu, B.L., Vaslet, C.A. and Kane, A.B. (1997): Susceptibility of p53-deficient mice to induction of mesothelioma by crocidolite asbestos fibers. Environ. Health Perspect., 105 Suppl 5:1069-1072.

Moalli, P.A., MacDonald, J.L., Goodglick, L.A. and Kane, A.B. (1987): Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. Am. J. Pathol., 128, 426-445.

Pott, F., Roller, M., Kamino, K. and Bellmann, B. (1994): Significance of durability of mineral fibers for their toxicity and carcinogenic potency in the abdominal cavity of rats in comparison with the low sensitivity of inhalation studies. Environ. Health Perspect., 102 Suppl. 5, 145-150.

Pritchard, J.B., French, J.E., Davis, B.J. and Haseman, J.K. (2003): The role of transgenic mouse models in carcinogen identification. Environ. Health Perspect., 111, 444-454.

Roller, M., Pott, F., Kamino, K., Althoff, G.H. and Bellmann, B. (1997): Dose-response relationship of fibrous dusts in intraperitoneal studies. Environ. Health Perspect., 105 Suppl. 5, 1253-1256.

Tazawa, H., Tatemichi, M., Sawa, T., Gilibert, I., Ma, N., Hiraku, Y., Donehower, L.A., Ohgaki, H., Kawanishi, S. and Ohshima, H. (2007): Oxidative and nitrative stress caused by subcutaneous implantation of a foreign body accelerates sarcoma development in Trp53+/- mice. Carcinogenesis, 28, 191-198.

Tsukada, T., Tomooka, Y., Takai, S., Ueda, Y., Nishikawa, S-I., Yagi, T.,

Tokunaga, T., Takeda, N., Suda, Y., Abe, S., Matsuo, I., Ikawa, Y. and Aizawa, S-I. (1993): Enhanced proliferative potential in culture of cells from p53-deficeint mice. Oncogene, 8, 3313–3322.

Vaslet, C.A., Messier, N.J. and Kane, A.B. (2002): Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53+/- mice. Toxicol. Sci., 68, 331-338.

World Health Organization (1986): Environmental Health Criteria 53. Asbestos and Other Natural Mineral Fibres. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (1998): Environmental Health Criteria 203. Chrysotile Asbestos. World Health Organization, Geneva.

World Health Organization (2002): Man-made vitreous fibres. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans., Vol. 81, IARC Lyon.

図の説明

Figure 1.

MWCNT の幅及び長さの分布：

MWCNT（MITSUI MWCNT-7, Lot NO. 060125-01k）の幅及び長さの分布は東京都健康安全研究センターで測定した。幅の平均はおよそ 100 nm であり、粒子の 27.5%は 5 µm より長かった。

Figure 2.

投与した MWCNT の光学顕微鏡像：

超音波処理 MWCNT 懸濁液をスライドグラスに載せた光学顕微鏡像。a) 十分に分散した部分。　b) a)の白枠で示した部分の拡大図。10 µm 以上の長さの微細繊維状又は棒状粒子が認められる。　c) 凝集した MWCNT。　d) c) の白枠で示した部分の拡大図、凝集塊の直径は 50～200 µm

Figure 3.

投与したクロシドライト及びフラーレンの光学顕微鏡像：

投与したクロシドライト及びフラーレンの光学顕微鏡像。a) 様々な長さの棒状粒子で構成されるクロシドライト。　b) 50 µm までのサイズの砂粒様粒子で構成されるフラーレン。

Figure 4.

MWCNT、クロシドライト及びフラーレンに対する初期の腹膜反応（腹腔内投与後 10 日）：

腹腔内投与後 10 日の初期の腹腔所見。a) MWCNT 投与による軽度な線維素性沈着物、癒着、腹水の滞留及び水腫性及び低張性腸係蹄。　b) クロシドライト投与による軽度な水腫性腸係蹄。　c) フラーレン投与では漿膜表面に散在する黒色沈着斑以外は明らかな変化は認められなかった。

Figure 5.

MWCNT 及びクロシドライトを投与したマウスの腹部臓器の肉眼所見：

一塊として摘出した腹部臓器の肉眼所見。 a) MWCNT 投与群の 147 日に死亡したマウス。内蔵の線維性癒着及び多数の腹膜腫瘍（矢印）が認められる。星印は横隔膜の腹側

切断縁を示す。1 つの腫瘍が横隔膜を貫通しており、胸腔に突き出ている（矢印頭部）。黒色斑は MWCNT の凝集塊。 b) クロシドライト投与群の 172 日に衰弱状態にあったマウス。青緑色斑クロシドライトの凝集塊。結節の組織所見は Figure 7a に示す。

Figure 6.
MWCNT を投与したマウスの中皮反応：
MWCNT を投与したマウスに認められた多核巨細胞を含む食細胞を伴う MWCNT に対応する腹膜の線維性肥厚及び異物性肉芽腫。中皮腫病変は線維症及び肉芽腫の近傍に認められた。肉芽腫上の線維化した腹膜面に顕微鏡で認められる程度の中皮腫性プラーク（高度な腹膜癒着を伴う多数の中皮腫のために 144 日に衰弱状態にあった MWCNT 投与群のマウスより）。

Figure 7.
クロシドライト投与群の中皮腫：
a) クロシドライト投与群のマウスに認められた典型的な中皮腫性結節で、線維質の幹（fibrous stem）を伴う（血性腹水及び腹膜癒着を伴う多数の中皮腫性結節により 172 日に衰弱状態になったマウス）。 b) 浸潤性腫瘍として認められた 1 x 1 cm の大きさの未分化型中皮腫（高異型度悪性中皮腫と言われる）（170 日に衰弱状態になったマウス。1x1.5 cm までの大きさの多数の浸潤性中皮腫、高度な腹膜線維症及び黄疸が認められた。）。

Figure 8.
MWCNT 及びクロシドライトを投与したマウスの中皮腫による累積死亡率：
侵襲性の大きな中皮腫が死因と判断されたマウスを Kaplan-Meier 法でプロットした。2 番目に多い死因と考えられる所見は高度な腹膜癒着による絞扼性イレウス（constriction ileus）であった。衰弱あるいは死亡したマウス又は 25 週（180 日）で安楽死させたマウスの中で、MWCNT 投与群で 3 匹、クロシドライト投与群で 6 匹のマウスに偶発性中皮腫が認められた。フラーレン投与群及び対照群では腫瘍発生は認められなかった。

Figure 9.
短い繊維の腹腔外への遊走：
貪食された短い繊維が肝類洞及び局所リンパ節内に認められた。a) 黒色の繊維を伴う

多核巨細胞（星印）及び単核食細胞（矢印頭部）が腸間膜リンパ節に認められる（中皮腫及び線維性癒着を発現した MWCNT 投与群の 159 日の衰弱例）。b) 肝類洞内の MWCNT を含んだ食細胞（矢印頭部）（0.7 x 0.7 cm までの大きさの多数の中皮腫、高度な腹膜線維症及び胸水が認められた MWCNT 投与群の 84 日の死亡例）。

Figure 10.

フラーレンの沈着：

フラーレン投与群のマウスでは投与後の 25 週の間には漿膜にわずかな反応しかみられなかった。表面に黒色斑が散見された。これは組織学的には泡沫細胞及び線維性隔膜で囲まれた多角形の間隙（polygonal slits）であり、こじんまりとした線維性瘢痕を形成している。フラーレン投与による中皮の反応は認められない。フラーレンは有機溶媒とくにキシレンによく溶けるために、包み込まれていた粒子が溶けて洗い流されて、裂隙が残った。その裂隙の辺縁が褐色に染まっており（挿入図の矢印頭部）、食細胞によるフラーレン粒子の表面の生体内分解の可能性を示唆していることは注目される。すなわち、サブミクロンサイズとなったフラーレン粒子が蛋白及び/又はその他の有機成分と混合したために、溶媒に溶けにくくなっていることが想像される。