

201236005A

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究

平成24年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 25 年(2013 年)5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と  
その作用の分子機序解析法の開発に関する研究 (H22-化学-一般-005)

平成 24 年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 津田 洋幸

平成 25 年 (2013 年) 5 月

## 目 次

I. 総括研究報告書	1
カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法と その作用の分子機序解析法の開発に関する研究 津田 洋幸	2
II. 研究分担報告書	17
1. ナノマテリアルの炎症・免疫修飾作用の解析 五十嵐 良明	18
2. 呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立 今泉 祐治	27
3. 発がんに関与する貪食マクロファージの <i>in vivo</i> および <i>in vitro</i> 作用機序解析 酒々井 眞澄	30
4. ナノ材料の噴霧曝露後、長期間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索 二口 充	36
5. カーボンナノマテリアルによる肺毒性と発がん作用の中期評価法と その分子機序解析法の開発 津田 洋幸	41
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	47
IV. 研究成果の刊行物・別冊	51

平成24年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

I. 総括研究報告書

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総括研究報告書

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の分子機序解析法の開発に関する研究

研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

### 研究要旨

単層/多層カーボンナノチューブ (S/MWCNT)、フラーレン (C60) 等の炭素ナノマテリアルについて、中・短期の有害作用検出システムの確立を目的として、ラットを用い全身吸入曝露の代替法として当該研究班で開発した経気管内噴霧 (Transtracheal intra-pulmonary spraying, TIPS) 投与方法を用いて、毒性、発がん性の探索とその機序に基づく短・中期 *in vivo-in vitro* 評価モデルの構築を行った。

1) 発がん 2 段階モデルでは PF68 分散 MWCNT-M (原体) には明らかな肺胞腺がんプロモーション作用はなかった。2) ラットへの短期投与 (9 日に 1.25mg) による炎症/免疫反応/増殖性病変の解析では、MWCNT-M、MWCNT-N は crocidolite (青アスベスト) と同様に胸腔内に移行して胸膜中皮の過形成増殖を誘発した。この結果は、検体が肺胞から胸腔に移動して中皮腫を発生させる可能性を示唆する。3) 篩板 (ふるい) によって分画した MWCNT-N は平均長 2.6 mm 以上の濾過分画に明らかな炎症が見られた。しかし肺組織では篩分画に関わり無く Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4 などの炎症性因子が誘導された。2 週間に計 1.0 mg を投与後 52 週観察群では肺胞上皮の一過性の過形成増殖をみたが腫瘍発生はなかった。65 週以後で縦隔、胸腔の肉腫、中皮腫の発生が少数みられ、発がん標的は肺胞上皮よりむしろ胸膜中皮である可能性が示唆された。4)

MWCNT-N 曝露後に単離した気管支上皮繊毛細胞では繊毛運動の低下が見られ、ATP 依存性 K<sup>+</sup> チャンネルと細胞内 Ca<sup>2+</sup> 濃度異常を誘発した可能性が示された。5) MWCNT には多種の金属が夾雑するが、溶出はいずれも量が少なく、感作性物質による反応を増強しなかった。

以上から、TIPS 投与方法を用いて、S/MWCNT の有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与といくつかの炎症性サイトカイン種の関与を明らかにした。発がん標的に胸膜中皮を考慮に入れる必要がある。さらに中期評価法として発がんプロモーション試験法、2 週以内の短期 *in vivo* 試験、およびマクロファージの炎症・障害作用へ関与を解析する *in vitro* 試験法を組み合わせた方法が有用であることを明らかにした。



#### 研究分担者

五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所  
生活衛生化学部 部長

今泉 祐治 名古屋市立大学大学院薬学研  
究科 細胞分子薬効解析学分野  
教授

酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研  
究科分子医学講座分子毒性学  
分野 教授

二口 充 名古屋市立大学大学院医学  
研究科分子医学講座分子毒性  
学分野 准教授

#### 研究協力者

澤田 英士 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学分野

大羽 輝弥 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学分野

鈴木 良明 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学分野

山村 寿男 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学分野

大矢 進 名古屋市立大学大学院薬学研究  
科 細胞分子薬効解析学分野

深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究  
科 分子医学講座分子毒性学分  
野 助教

飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究  
科 分子医学講座分子毒性学分  
野 研究員

吉本 恵理 名古屋市立大学大学院医学研究  
科 分子医学講座分子毒性学分  
野 技術職員

徐 結苟 名古屋市立大学津田特任教授研  
究室 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学津田特  
任教授研究室 研究員

#### A. 研究目的

炭素ナノマテリアルのフラーレン (C60)、単層/多層炭素ナノチューブ (SWCNT/MWCNT) 等の有害作用についての知見は未だ乏しく、とくに呼吸器における慢性毒性と発がん性の評価は得られていない。その理由は、ヒトの主な曝露経路を想定した全身吸入曝露試験には、高価な専用設備と長期試験の実施には莫大な費用が要求されるからである。これを補完する安価な中・短期の毒性・発がん性の評価法の開発は必須である。

本研究では、炭素系ナノマテリアルを被検物質として、ラットを用いてこれらの短期有害作用 (急性、亜急性毒性、免疫毒性) および慢性毒性・発がん性をより短期 (20~40 週程度) に明らかにし、その機序 (mechanism of action, MOA) を重視した一連の *in vivo-in vitro* 評価システムの開発を行った。被検物質は単層カーボンナノチューブ (SWCNT) 及び製造会社の異なる各種多層カーボンナノチューブ (MWCNT) を用いた。MWCNT では篩板濾過による大きさの差異についても検討した。方法は、ラットを用いて、TIPS 投与によって MWCNT の夾雑金属にも注意を払いつつ、1) TIPS 投与方法による 20~40 週の中期肺毒性・発がんプロモーション作用検出系の開発、2) 9~14 日間の炎症、増殖病変、免疫毒性およ

び気道上皮への直接障害作用等の解析試験、  
3) 初代培養マクロファージ・気管支上皮の運動への関与、および不死化がん細胞等に被検物質を曝露させた場合のサイトカイン産生、免疫反応、増殖反応の機序把握による一連の試験系の開発を行った。

## B. 研究方法

### 1. 発がん2段階モデルによるプロモーション作用またはMWCNTのみの長期投与の検討

10週齢雌雄SDまたはF344系ラットに肺標的発がん物質の

N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)を2週間飲水投与し、その2週後に麻酔下で被検物質を250及び500 $\mu$ g/ml (=250および500ppm)にて1回あたり0.5mlを2週に1回肺TIPS投与し、40週後(18回投与)に屠殺剖検した。被検物質と媒体対照群は以下に記す。

(1) MWCNT-M (M社)「あり姿(製造梱包されたままの原体)」(コポリマーPF68分散)

(2) MWCNT-N (N社) (0.5%PF68含有生食)をポリトロンにてホモジナイズ後、篩板(篩目直径25 $\mu$ m)による原体(W)、濾過分画(FT)、非濾過分画(R)に分画した。各分画の電子顕微鏡をプリントアウトし、300~500本のMWCNT線維を画像上でマップメーターにてなぞってMWCNTの長さを測り、平均長を算出した。

(3) 陽性対照はcrocidolite (IARC Group 1)を用いた。全身臓器への分布と、DHPN誘発肺胞上皮過形成と腺腫、腺がん発生のプロモ

ーション作用の検索を行った。MWCNTについてはイニシエーション処置をしないで各篩板分画の長期投与実験も実施した(津田・酒々井・二口)。

### 2. 短期投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1)「あり姿」のSWCNT-N(N社)、MWCNT-MおよびMWCNT-Nについて、0.1%Tween含有生食に分散して、TIPS投与した。

(1) 肺と胸腔の炎症の観察:ラットに0.5ml(500mg/mL)を9日間に5回投与し、最終投与から6日、30日後に麻酔下で開腹し、横隔膜より胸腔内にDMEM細胞培養液10mLを注入して洗浄液を吸引採取した。洗浄液遠沈ペレットを4%パラフォルム固定パラフィンブロックとした。肺の光顕および電顕標本を作成し、炎症反応と被検物質のマクロファージ取り込みを検討した。さらに被検物質の肺、肝、腎、脾、脳、リンパ節および全身臓器への移動について偏光顕微鏡、走査および透過電顕にて、局在観察を行った。また、肺の一部は生化学用に冷凍保存し、mRNAマイクロアレイ、サイトカインアレイによる解析、偏光顕微鏡と電顕による被検物質の局在、免疫染色による増殖因子の局在観察を行った(津田、酒々井)。

(2) 10週齢の雌SDラットにSWCNT-N、MWCNT-N、MWCNT-Mおよびcrocidoliteを、250 $\mu$ g/mlの濃度で0.05%Tween20含有生食に懸濁し、0.5mlをTIPS投与した。9日間に合計5回噴霧し、最終噴霧から6時間後および30日後に屠殺剖検した。噴霧直後および噴霧後30日経過した時点のそれぞれにおいて、

肺における炎症反応程度、M2型マクロファージの誘導およびIL-1 $\beta$ を産生するマクロファージの数を検索した。異物を貪食したマクロファージのタイプの同定：肺組織標本を用い、CD68（マクロファージのマーカー）、CD163、CD204（腫瘍発生促進に関与するM2型マーカー）の免疫染色によるそれらの誘導を解析した（二口）。

2) MWCNTの原態体を篩板によってサイズの異なるMWCNTに分けて肺障害と発がん性の検証を行った。ラットにW、FT、R各分画を2週間に8回（計1.0mg）TIPS投与し、最終投与6時間後に肺を摘出した。mRNAおよびタンパク発現をマイクロアレイ解析した。各HEスライドをイメージアナライザーにて炎症部面積、上皮・中皮過形成/腫瘍病変の面積を計測した。同様処置後、52週および104週まで観察する長期試験群を設け観察した（酒々井、津田）。

3) *In vivo*でのカーボンナノチューブ噴霧による気道上皮組織機能への影響及び細胞障害性の評価では、「あり姿」のMWCNT-NをTIPS投与し、7日後に気道上皮組織を摘出し非固定のままチャンバー内でカーボンナノチューブの貯留を観察する。他のナノマテリアル（球形マイクロスフェアなど）を噴霧・吸引した場合の貯留を定量的に比較する方法を開発し、気道での異物クリアランス評価法としての確立を目指した（今泉）。

**3. *in vitro*系による貪食マクロファージを介する炎症と培養液の不活化細胞に対する増殖活性、気管上皮の障害、および免疫**

### 担当細胞反応の解析

1) マクロファージの活性の解析：正常ラットにチオグリコレート（6% 溶液 0.5ml/rat）をTIPS投与によって肺胞マクロファージを誘導した後に肺からマクロファージを濾過採取し、一定数をRPMI 1640（10% FBS）培地に移し、その培養液中に「あり姿」のMWCNT-M（津田）、篩板分画したMWCNT-N（酒々井）を10ppmの濃度で加えて、24時間後に培養上清を採取した。その培養上清をヒト肺がん細胞株A549、ヒト中皮細胞等の培養液に加えて増殖活性を観察した。さらに、そのマクロファージからtotal RNAを抽出、マイクロアレイ解析（東レ、Rat Oligo 20k）を行った（酒々井）。発現が増加した遺伝子のmRNAおよびタンパク発現をRT-PCR法およびウエスタンブロット法にて解析した。また、*in vivo*の実験で胸膜中皮の過形成増殖を見たことから、そのラット胸水を採取して、ヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性も検討した（津田、酒々井）。

2) 「あり姿」のMWCNT-N懸濁液をラット気道上皮組織から、コラゲナーゼ処理により細胞を単離し初代培養を行った。顕微鏡下、繊毛運動の見られる繊毛細胞にパッチクランプ法を適用し、膜電流を解析した。また細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度をCa<sup>2+</sup>蛍光色素fura2あるいはfluo3を用いることにより、膜電位を電位感受性蛍光色素DiBAC<sub>4</sub>(3)により測定した。繊毛運動は高速デジタルビデオカメラを用いて定量的に解析し、方法論を構築した（今泉）。

3) 免疫能、夾雑金属、粒度分布の測定および細胞表面抗原の解析：



「あり姿」の MWCNT-M、MWCNT-N、MWCNT-S、MWCNT-S を用いた。各種 MWCNT に細胞培養液を加えて 30 分間超音波処理後、37°C で 24 時間抽出した。抽出液は硝酸を加えてマイクロウェーブ分解処理した後、ICP-MS を用いて金属を定量した。金属酸化物は動的光散乱法により測定した。さらに、ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞に  $\text{AlCl}_3$ 、 $\text{VCl}_3$ 、 $\text{FeCl}_2$ 、 $\text{FeCl}_3$ 、 $\text{MnCl}_2$  及び  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  等の金属塩または金属酸化物を添加して 24 時間培養後、感作性物質 DNCB を加えて更に 24 時間培養した。細胞を回収し FITC 標識した各抗体及び PI 色素で染色し、フローサイトメーターで生存率と、CD86 または CD54 発現率をフローサイトメーターで解析した。また培養上清を回収し、ケモカイン濃度を ELISA で測定した（五十嵐）。

#### 4. データのヒトへの外挿とリスク評価

以上の実験より、SWCNT、MWCNT について、陽性対照のアスベスト（肺腺がんと中皮腫発がん物質）と比較して毒性および発がんプロモーション作用の機序に関する因子を解析し、最終的には動物より得られたデータから評価系の構築をすすめヒトの曝露量との比較外挿出来る基礎データを得る（津田）。

#### 倫理面への配慮

本研究における倫理面への配慮については、各班員は動物実験において我が国の「動物の保護及び管理に関する法律(昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105)」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準(昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号)」に準拠するとともに、当該

規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会、遺伝子組換え実験の承認等の審査を経て研究を実施した。ヒト材料を用いる実験は実施しなかった。

#### C. 研究結果

##### 1. 発がん 2 段階モデルによるプロモーション作用および長期投与の影響

1) 「あり姿」MWCNT-M: 氷砂糖溶液に分散した場合には明らかなプロモーション作用はなかったため、今回は分散性に優れかつ肺毒性（炎症）の少ない PF-68 コポリマーにて再実験した。その結果、肺胞上皮過形成の増加が見られたが明らかなプロモーション作用はなかった（津田、二口）。

2) 分画 MWCNT-N: FT、R、W 分画平均長は、各々 FT は  $2.6 \pm 1.6 \mu\text{m}$ 、W は  $4.2 \pm 2.9 \mu\text{m}$  であり ( $P < 0.001$ )、R は塊状で測定不能であった。FT および W の平均長別本数は正規分布を示した。検体投与のみの実験を行い、52 週群は H24 年 9 月に屠殺した。炎症面積 (FT:  $46 \pm 11\%$ 、R:  $39 \pm 17\%$ 、W:  $52 \pm 12\%$ ) は溶媒対象群 ( $3.0 \pm 1.4\%$ ) と比較して有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。3 分画での線維化巣の数 ( $9 \sim 11 \text{ 個}/\text{mm}^2$ ) は溶媒対象群 ( $0.1 \text{ 個}/\text{mm}^2$ ) と比較して有意に増加したが分画間差はなかった。臓側胸膜上の中皮細胞の増生病変の数は溶媒対象 ( $0.02 \pm 0.05 \text{ 個}/\text{cm}$ ) と比較して 3 分画共に (FT:  $0.47 \pm 0.32 \text{ 個}/\text{cm}$ 、R:  $0.28 \pm 0.22 \text{ 個}/\text{cm}$ 、W:  $0.23 \pm 0.16 \text{ 個}/\text{cm}$ ) 有意に増加していた ( $P < 0.05$ )。104 週投与群では、死亡例において 65 週で腺がん（原発不明）、66 週で縦隔悪性組織球腫、78 週（経過観察中）

で胸腔肉腫（中皮腫疑い）の発生がみられた（酒々井、二口）。

## 2.短期（9～14日）投与による毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析

1)「あり姿」MWCNT-M、MWCNT-Nによる肺と胸腔内炎症および多臓器への移動:

「あり姿」のMWCNT-M、MWCNT-N、crocidoliteを投与した肺胞内ではMWCNTを貪食したマクロファージ、好中球、リンパ球が混在する線維化炎症巣が散在性に発生した。胸膜洗浄液の炎症細胞数（主としてマクロファージ、他好中球、リンパ球）は、対照群で $7.35/10^4\text{ml}$ に対して、MWCNT-Nは11.20、MWCNT-Mは13.95、crocidoliteは12.13で有意に増加した（ $p<0.05\sim 0.001$ ）。MWCNTは胸腔生食洗浄液ペレットと縦隔リンパ節に最も多く、肝、腎、脳にも少数観察された。肺胞からリンパ流介して縦隔に入ったと考えられた。また臓（肺）側胸膜中皮細胞の過形成増殖巣が発生し、中皮8個以上からなる過形成巣数のPCNA値が対照の9～10倍（ $p<0.001$ ）に増加した。さらに、胸腔浸出液の上清にはヒト不死化中皮細胞の増殖活性（1.2～1.4倍）が見出された（津田）。

2)篩板分画によるMWCNTの肺障害性、サイトカインのアレイ解析：短期試験ではCsf3およびIL6のFTおよびW分画でのタンパク発現レベルが上昇していた。Csf3およびIL6のR分画では長期試験でのタンパク発現レベルは短期試験の発現レベルより上昇傾向にあった。一方、短期試験および長期試験においてCxcl2およびCcl4では3分画共にタンパク発現レベルが高い傾向にあった（酒々

井）。

3)MWCNT、C60およびCB貪食マクロファージのタイプの同定では、投与直後の肺組織では、多数のマクロファージと比較的強い炎症が観察されたが、30日経過後にSWCNT-NとMWCNT-N群では弱い異物反応が観察されたが、他の群では殆どなかった。それらのうちCD68陽性マクロファージは直後ではいずれの群でも媒体群に比べ有意に増加していたが、30日経過した時点では、いずれの群でも直後の数の40%-60%にまで減少していた。同様にM2型CD204陽性マクロファージも30日経過した時点では対照群のレベルにまで減少した。crocidoliteを貪食したIL-1 $\beta$ 分泌マクロファージは30日経過後ではほとんど観察されなかった。（二口）。

4)初代培養マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動評価

マウス呼吸器系器官（気管・気管支）より酵素処理によって急性単離した上皮繊毛細胞から膜電流を測定したところ、ATP感受性K<sup>+</sup>（KATP）チャネル開口薬のdiazoxideで活性化され、阻害薬のglibenclamidで抑制される電流成分の存在が明らかとなった。繊毛細胞だけを微小吸引ピペットで30個ほど採取し、主にK<sup>+</sup>チャネルに関して網羅的にRT-PCR解析したところ、上記電流成分に対応したKir6.2チャネルと修飾分子であるSUR2.1の発現が見出された（今泉）。

### 3. *in vitro*系による貪食マクロファージを介する炎症と培養液の不死化細胞に対する増殖活性、ならびに気管上皮の障害、免疫担当細胞反応の解析

1) MWCNT-M、MWCNT-N、C60 の 5 回/9 日の TIPS 投与によるサイトカインアレイ解析：*In vivo* にて観察された胸膜中皮の過形成増殖の機序解析のために、正常ラット初代マクロファージを肺より集めて培養液に移して、「あり姿」MWCNT-M、MWCNT-N および crocidolite を投与した培養液上清、およびこれらの物質を投与したラットの胸水上清のヒト不死化中皮細胞、悪性中皮腫細胞に対する増殖活性は、*in vitro* と *in vivo* の両系において対照の 1.3~1.4 倍に増加した。(津田)。

2) 篩板による W、FT、R 分画の細胞増殖活性：各分画を貪食させたマクロファージの培養上清はト肺がん細胞株 A549 に対して 18~20%有意に増加した ( $P<0.01$ ) が分画間での有意差はなかった。貪食マクロファージの mRNA マイクロアレイ解析では、増殖系遺伝子群では Csf3 (コロニー増殖因子) が 9 倍、サイトカイン系遺伝子群では IL6 (インターロイキン) が 11 倍、マクロファージ系遺伝子群では、Cxcl2 (Mip2) が 7 倍および Ccl4 (Mip1  $\beta$ ) が 6 倍に上昇していた。タンパク発現も増加傾向を示した。これらに分画間での有意差はなかった (酒々井)。

3) 気管支上皮細胞の膜電位と細胞内  $Ca^{2+}$  濃度および繊毛運動に及ぼす影響：急性単離した繊毛細胞をパッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから  $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定した。その結果、(1) 急性単離した繊毛細胞をパッチクランプ法による電位固定下、パッチピペットから  $Ca^{2+}$  感受性蛍光色素 fluo3 を細胞内へ導入し、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度を測定し

た。その結果、膜電位を-過分極させることにより、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇し、この上昇は外液中の  $Ca^{2+}$  除去により消失することを発見した。さらに膜電位固定下での過分極時に繊毛運動が増強されることを高速画像解析により明らかにした。(2)  $K_{ATP}$  チャンネル開口薬の diazoxide の適用により繊毛細胞に過分極が生じ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇すること、また繊毛運動も増大することを見出した。これらは glubenzclamid により抑制された。(3) 単離繊毛細胞に MWCNT-N 懸濁液を灌流したところ、細胞内  $Ca^{2+}$  濃度が上昇した。また一定時間洗浄後にも、ナノチューブの繊毛への貯留が認められた。一方、直径 1 ミクロン程度の蛍光球形ビーズを同様に適用したところ、顕著な  $Ca^{2+}$  濃度変化はなく、また洗浄後の繊毛中への貯留は認められなく明らかな差異があった。

(4) 繊毛細胞培養液中に MWCNT-N 懸濁液を加えて数日間培養したところ、半日後には媒体群より有意に繊毛運動を停止している繊毛細胞の割合が増加した。また 18 時間後にはカーボンナノチューブ適用群において、繊毛細胞の割合が有意に減少した (今泉)。

4) 免疫能、夾雑金属、粒度分布の測定および細胞表面抗原の解析

MWCNT-M からは V が溶出し、MWCNT-SD2 は Mn と Mo の溶出が認められた。MWCNT 中に比較的多く定量された Fe と Al については、培養液と MWCNT 抽出液との間に変化はなかった。 $Al_2O_3$  懸濁液の平均粒子径は 150 nm 程度であり、1000  $\mu\text{g/ml}$  まで濃度を上げてても細胞毒性は認められなかった。FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub> 及び Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> の細胞毒性は弱く、MnCl<sub>2</sub>、

VCl<sub>3</sub>とは大きな差が認められた。FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>、AlCl<sub>3</sub>、VCl<sub>3</sub>及びNa<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>共存下でのDNCCBに対する細胞表面抗原発現率は金属塩非共存下での反応と差はなかった。MWCNT抽出物について同様に前処理の効果を調べたが細胞表面抗原発現率が増加しなかった。培養上清のケモカイン濃度のうち、DNCCBによって明確な増加が認められたものはIL-8であった。IL-8産生量を指標として、FeCl<sub>2</sub>、FeCl<sub>3</sub>またはMnCl<sub>2</sub>の前処理による効果について調べたが、影響はなかった(五十嵐)。

#### **D. 考察**

この研究の難しいところは、被検物質として扱う炭素ナノマテリアルの生体作用を明らかにしつつ評価法の開発を同時に行うことにある。そのために、以下の基本的枠組みを設けて有害作用を観察しつつ効率よく評価系の開発を行った。ラットへの投与は検体を肺内に効率よく送達できるTIPS法を用いた

1. 発がん2段階モデルによるプロモーション作用の検討。
2. ラットへの短期(9~14日)投与を行った場合の肺、気管上皮組織における毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析。
3. *in vitro*系による初代培養マクロファージに検体を貪食させた場合の炎症ならびに気管上皮、免疫担当細胞反応の解析。

MWCNT-Mは分散液中あるいはリンパ節、胸腔内等では異物として認識されてマクロファージに貪食される。これを光学顕微鏡と電子顕微鏡で観察すると、様々な大きさや形態の凝集塊を呈していた。このような形態や大

きさの違いが、肺の炎症やマクロファージの動員、他臓器への移動のメカニズムに関与するかを明らかにするには、生体影響を明らかにする上で重要なポイントになる。その目的で、あり姿(製造梱包された原体の懸濁液)と濾過による大きさまたは繊維の長さの違いの影響を把握することが必要となった。

1) 「あり姿」のMWCNT-MとMWCNT-N  
(1) DHPN投与後に「あり姿」MWCNT-MをPF68に懸濁して25、250、500ppmを40週投与した実験を2回実施したが、肺胞上皮腫瘍の発生に明らかなプロモーション作用は見られなかった。前回の結果と併せ、再度確認する必要がある(津田)。

(2) 0.1% Tween含有生食懸濁  
MWCNT250ppm懸濁液を8日間に5回TIPS投与し、胸腔と全身臓器の分布を観察したところ、胸膜洗浄液ではいずれの検体も主としてマクロファージに貪食された状態で観察された。胸膜洗浄液以外では縦隔リンパ節、肝、腎、脳に少量見出されたことから、リンパ、血液を介して肺から全身に移動することが明らかとなった。また臓(肺)側胸膜中皮細胞の増殖巣が発生したことは、MWCNTの腹腔内投与による中皮腫の発生の機序の一端を担うものと考えられた。また、アスベスト吸入による悪性中皮腫の発生における初期変化とも考えられる。したがってMWCNTの発がん標的は肺胞上皮よりはむしろ胸膜中皮である可能性が考えられる(津田)。

(3) 篩目25 $\mu$ mの篩板を用いて篩板濾過前(W)、篩板濾過分画(FT)、濾過されない残存分画(R)に分画した。*in vitro*系ではすべ

での分画（平均長が 2.6~4.2  $\mu\text{m}$ ）でコロニー刺激因子(Csf3)の mRNA 発現がみられた。貪食肺マクロファージは Csf3, IL6, Cxcl2, Ccl4 などの因子を分泌しヒト肺がん細胞株の増殖を促進した。*in vivo* では MWCNT (W) の曝露により沈着部位の肺胞上皮の増殖は持続的に存在し、52 週を経た時点でも観察され、上記 4 遺伝子のタンパク発現が維持された。CNT の肺投与による特に、2 週目より誘発された Cxcl2 と Ccl4 遺伝子のタンパク発現は 52 週後も維持されており、これら 2 つの遺伝子は MWCNT の曝露マーカーになり得る。DHPN による肺胞上皮発がんイニシエーション処置を行わない実験で死亡例において 65 週で腺がん（原発不明）、66 週で縦隔悪性組織球腫、78 週で胸膜肉腫（中皮腫疑い）の発生がみられた。これらの自然発生頻度を勘案すれば、MWCNT には縦隔組織と胸膜中皮に弱い発がん作用がある可能性は否定できない（酒々井、津田）。

2) MWCNT に含まれる Fe は生体内で Fenton 反応によって水酸化ラジカルを発生して DNA 障害をもたらし、発がんへの関与が疑われている。Fe 以外の種々の金属も検出されたが、Fe を含めて生体に吸収されたとしても遊離量はごくわずかであった。これら金属イオン及び酸化物共存下で細胞の皮膚感作性物質に対する抗原提示能は変化せず、免疫増強作用はないと思われた（五十嵐）。

4) MWCNT-M の吸入経路である気管支、細気管支上皮と終末細気管支上皮に沈着して障害作用を及ぼす可能性が示唆された。機序として MWCNT のような繊維状異物による物理

的作用でカルシウムチャンネルの異常が明らかとなり、障害作用の指標として重要な知見となる（今泉）。

## E. 結論

多種のナノマテリアルの短期、長期の有害作用の検出システムの開発と標準化モデルの確立を目的として、以下の研究を実施した。

1) 発がん 2 段階モデルによるプロモーション作用の検索：MWCNT-M について肺腺がんプロモーション作用は見出されなかった。

2) ラットへの短期（9~14 日）投与試験による体内分布/毒性/炎症/免疫反応/増殖性病変の解析：MWCNT-M、MWCNT-N は crocidolite（青アスベスト）と同様に短期 TIPS 投与試験において迅速に胸腔内に移行し、臓側中皮の過形成増殖を誘発していたことから、これらの物質は吸入によって肺胞内から、胸膜腔への移動することが明らかになった。そのルートは縦隔リンパ節を経るリンパ行性が考えられる。

3) 篩板（ふるい）によって MWCNT-N を分画し、DHPN を投与しないで投与した場合、分画に関わり無く平均長が 2.6  $\mu\text{m}$  以上のものには炎症を含む肺障害性が認められた。*in vivo* さらに、分画に関わり無く Csf3, IL6, Cxcl2, Ccl4 などの因子が誘導され、52 週経過後には腫瘍の発生には至らなかったので一過性の増殖と考える。65 週以後の長期実験では肺腺がんは無く、少数ではあるが自然発生の稀な縦隔、胸腔の肉腫、中皮腫の発生がみられた（経過中）。以上から、発がん標的臓器は肺胞上皮に対しては弱く、むしろ胸膜中皮を標的とす

る可能性が高い。

4) SWCNT, MWCNT などの繊維性ナノ材料および CRO を噴霧した群のいずれも、噴霧直後にマクロファージが誘導と肺の炎症像が観察されたが、30 日経過すると炎症は消退しマクロファージの数も減少し、腫瘍の促進作用の報告のある M2 型の CD204 陽性マクロファージの数、クロシドライトを貪食し IL-1 $\beta$  を分泌するマクロファージの数も同様に直後より著しく減少した。

5) MWCNT-N 曝露後に単離した気管支上皮繊毛細胞では繊毛運動の異常が見られた。

MWCNT-N の繊毛への貯留が繊毛運動を含む細胞機能障害さらには細胞障害を引き起こす可能性がある。

7) カーボンナノマテリアルに残存する金属に着目し、それらの炎症及び免疫反応、特にアレルギー反応に対する増強作用の有無を検討した。MWCNT から溶出する金属はいずれも量が少ないこと、及びこれら金属の濃度では感作性物質による反応を増強しなかったことから、カーボンナノマテリアルの免疫作用に対する金属の関与は少ないことが示唆された。

以上から、TIPS 投与方法によって、カーボンナノマテリアルの有害作用とくに発がん性について、マクロファージの関与を明らかにした。また、発がん標的は肺胞上皮に加え、胸膜中皮も考慮に入れる必要のあることがわかった。さらに通常の 2 年吸入曝露試験に替わる評価法として 40 週以内の発がんプロモーション試験法、有害作用・発がん性機序の解析法として 2 週以内の *in vivo* 試験、および

マクロファージの関与を解析する *in vitro* 試験法を組み合わせた方法が実地に有用であることを明らかにした。

## **F. 健康危機情報**

特になし。

## **G. 研究発表**

### 1. 論文発表

- 1) Sagawa Y, Futakuchi M, Xu J, Fukamachi K, Sakai Y, Ikarashi Y, Nishimura T, Suzui M, Tsuda H, Morita A. Lack of promoting effect of titanium dioxide particles on chemically-induced skin carcinogenesis in rats and mice. *J Toxicol Sci* 37: 317-27, 2012.
- 2) Takagi, A., Hirose, A., Futakuchi, M., Tsuda, H., and Kanno, J. Dose-dependent mesothelioma induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci. Cancer science* 103: 1440-1444, 2012.
- 3) Ohba t, Sawada E, Suzuki Y, Yamamura, H, Ohya S & Imaizumi Y. Ca<sup>2+</sup> influx facilitated by membrane hyperpolarization due to ATP-sensitive K<sup>+</sup> channel openers enhances ciliary beating in mouse airway ciliated cells. *J Pharmacol Exp Ther.* 投稿、改訂中.
- 4) Xu J, Futakuchi M, Shimizu H, Alexander DB, Yanagihara K, Fukamachi K, Suzui M, Kanno J, Hirose A, Ogata A, Sakamoto Y, Nakae D, Omori T, Tsuda H.



- Multi-walled carbon nanotubes translocate into the pleural cavity and induce visceral mesothelial proliferation in rats. *Cancer Sci* 103: 2045-50, 2012.
- 5) Ohba t, Xu J, Sawada E, Suzuki Y, Tsuda H & Imaizumi Y. Interference of carbon-nanotubes on functional activities in primary cultured airway ciliary cells of the mice. 投稿準備中
  - 6) Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Sumida K, Deguchi Y, Sukata T, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Tsuda H. Circulating MicroRNAs in Serum of Human *K-ras*Oncogene Transgenic Rats With Pancreatic Ductal Adenocarcinomas. *Pancreas* 41: 1013-8, 2012.
  - 7) 吉岡智史, 西村一彦, 高村岳樹, 酒々井眞澄, 津田洋幸, 板橋豊. キラル高速液体クロマトグラフィー/大気圧化学イオン化質量分析法によるグリシドール脂肪酸エステルの光学異性体分析. *分析化学* 61: 783-790, 2012.
  - 8) Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol* 7: 14-28, 2012.
  - 9) Alexander DB, Iigo M, Yamauchi K, Suzui M, Tsuda H. Lactoferrin: an alternative view of its role in human biological fluids. *Biochem Cell Biol* 90: 279-306, 2012.
  - 10) Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that expresses LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis* 51: 268-74, 2013.
  - 11) M. Futakuchi. Animal model of lung metastasis of hepatocellular carcinoma; A tool for the development of anti-metastatic therapeutics. *Journal of Cancer Therapy* ; 4 420-425, 2013.
  - 12) M. Futakuchi, R.K. Singh. Animal model for mammary tumor growth in the bone microenvironment. *Breast cancer* (Tokyo, Japan) 2013.
  - 13) Xu J, Futakuchi M, Alexander DA, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Archives of Toxicology*, in press 2013.
  - 14) Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *Oncol Rep* 30; 64-70, 2013.
  - 15) Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S,

- Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, in press.
- 16) Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, in press.
2. 学会発表
- 1) 五十嵐良明、内野 正、西村哲治. ICP-MS によるカーボンナノマテリアルの金属の分析. 第 39 回日本トキシコロジー学会学術年会; 2012 年 7 月
- 2) M. Suzui, T. Numano, M. Futakuchi, K. Fukamachi. Evaluation of carcinogenic effect of multiwall carbon nanotubes on the rat lung at 2 and 52 weeks after pulmonary instillation. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.
- 3) T. Numano, J. Xu, M. Futakuchi, K. Fukamachi, F. Furukawa, M. Suzui, H. Tsuda. Effect of anatase type nanosized titanium dioxide particles on the rat lung and cultured macrophage. American Association for Cancer Research Annual Meeting 2013; Washington DC: April 9, 2013.
- 4) 大羽輝弥、澤田英士、鈴木良明、山村寿男、大矢進、今泉祐治 「K<sub>ATP</sub> チヤネル開口薬によって引き起こされる膜電位の変化による繊毛運動への影響」 第 86 回日本薬理学会年会 平成 25 年 3 月 23 日 (福岡)
- 5) 柴田耕治、辻厚至、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. Kras トランスジェニックラット肺がんモデルにおける画像診断の試み. 個体レベルのがん研究による相乗効果; 琵琶湖: 2013 年 2 月 7 日
- 6) 酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの肺ばく露 2 週間および 52 週間経過後の影響. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013 年 1 月 31 日
- 7) 二口充、徐結荷、深町勝巳、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノ材料の吸入暴露後、長時間経過して発生するリスクの背景となる肺組織の検索. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つくば: 2013 年 1 月 31 日
- 8) 深町勝巳、大嶋浩、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 29 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; つく

- ば: 2013年1月31日
- 9) 酒々井眞澄, 徐結苟, 深町勝巳, 二口充, 菅野純, 広瀬明彦, 津田洋幸. 多層カーボンナノチューブ (CNT) の肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響解析. 第 29 回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
  - 10) 深町勝巳, 二口充, 徐結苟, 井上義之, 高月峰夫, 酒々井眞澄, 津田洋幸. フラーレンの気管内噴霧による肺発がん促進作用. 第 29 回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
  - 11) 二口充, 徐結苟, 井上義之, 高月峰夫, 津田洋幸, 酒々井眞澄. カーボンブラックの気管内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変. 第 29 回日本毒性病理学会 2013年1月31日、2月1日
  - 12) 沼野琢旬, 徐結苟, 二口充, 深町勝巳, 酒々井眞澄, 津田洋幸. アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタニウムの肺組織および培養マクロファージへの影響. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012年9月19日
  - 13) 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. カーボンナノチューブのラット肺組織、細胞増殖、遺伝子発現の影響. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012年9月19日
  - 14) 坂井勇斗, 深町勝巳, 二口充, 林秀敏, 酒々井眞澄. マウス乳がん細胞株を用いた pseudokinase TRB3 の機能解析. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012年9月20日
  - 15) 深町勝巳, 大嶋浩, 二口充, 津田洋幸, 酒々井眞澄. ラット肺がんモデルにおける血清診断マーカー. 第 71 回日本癌学会学術総会; 札幌: 2012年9月20日
  - 16) 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の長さの違いにおける遺伝子発現への影響. 平成 24 年度がん若手研究者ワークショップ 2012年9月15日
  - 17) 大羽輝弥, 澤田英士, 鈴木良明, 山村寿男, 大矢進, 今泉祐治 「マウス気道上皮繊毛細胞運動の細胞内  $Ca^{2+}$ 濃度及び膜電位への ATP 依存性  $K^{+}$ チャネル開口薬の作用」 次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2012, 2012年9月1日 (神戸)
  - 18) 酒々井眞澄, 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 徐結苟, 津田洋幸. カーボンナノ材料の肺障害性の検討. 第 27 回発癌病理研究会; 修善寺: 2012年8月28日
  - 19) 池永周平, 深町勝巳, 二口充, 酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ (CNT) の長さの違いにおける遺伝子発現への影響. 第 31 回分子病理学研究会 2012年7月22日
  - 20) 酒々井眞澄, 徐結苟, 深町勝巳, 二口充, 津田洋幸. 長さの異なる多層カーボンナノチューブの肺組織、細胞増殖および遺伝子発現への影響. 第 39 回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012年

- 7月17日
- 21) 二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. ナノサイズカーボンブラッグの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成. 第39回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012年7月18日
- 22) 沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、清水秀夫、古川文夫、酒々井眞澄、津田洋幸. アナターゼ型ナノサイズ二酸化チタンニウムの肺組織及び培養マクロファージへの影響—ルチル型との比較検討—. 第39回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012年7月18日
- 23) 深町勝巳、徐結苟、二口充、橋爪直樹、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄. フラーレンの肺内噴霧による肺発がんプロモーション作用の検討. 第39回日本毒性学会学術年会; 仙台: 2012年7月18日
- 24) 沼野琢旬、徐結苟、二口充、深町勝巳、清水秀夫、古川文夫、酒々井眞澄、津田洋幸. ルチル型とアナターゼ型ナノサイズ二酸化チタンニウム (TiO<sub>2</sub>) 気管内噴霧によるラット肺組織に対する影響. 第39回日本毒性学会 2012年7月17日-19日 仙台.
- 25) 酒々井眞澄、深町勝巳、二口充、森脇健太. 定量的構造活性相関によるパルミチン酸誘導体の抗がん活性スクリーニング. がん予防大会 2012 2012年6月22日、23日、岐阜
- 26) 池永周平、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. カーボンナノチューブ (CNT) の長さの違いによる肺組織への影響. 156回名古屋市立大学医学会例会, 2012年6月19日. 名古屋
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)
1. 特許取得  
PCT 出願  
「アスベスト曝露マーカー及びその用途」  
出願番号 PCT/JP2012/056321
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
特になし

平成24年度厚生労働科学研究費補助金  
(化学物質リスク研究事業)

Ⅱ. 研究分担報告書

平成 24 年度 厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）  
分担研究報告書

研究課題名：カーボンナノマテリアルによる肺障害と発がん作用の中期評価法とその作用の分子  
機序解析法の開発に関する研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの炎症・免疫修飾作用の解析

分担研究者 五十嵐良明 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部 部長

### 研究要旨

多層カーボンナノチューブ（MWCNT）が炎症及び免疫反応、特にアレルギー反応に対して増強作用を有するかどうか、特に、MWCNT に残存する金属の影響について検討した。MWCNT を細胞培養液に入れ超音波処理して懸濁後、24 時間静置したときに溶出する金属量を分析した。各培養液に硝酸を加えてマイクロウェーブ分解後、ICP-MS を用いて定量した。培養液の濃度変化が認められた金属は V、Mo、Mn で、うち Mo の増加が最も大きかった。溶出が検出されたこれら金属の免疫修飾作用について調べた。ヒト単球由来細胞株 THP-1 細胞を金属塩や金属酸化物で前処理後、皮膚感作性物質を適用したときの細胞表面抗原やケモカイン産生量を指標に評価した。Fe(II)及び Fe(III)、Al 及び Mo 塩の細胞毒性は弱く、Mn や V 塩とは大きな差が認められた。THP-1 細胞を各金属塩で処理し DNCB を適用したときに発現する CD54 及び CD86 抗原は、金属塩の含まない培地で処理して DNCB を適用したときとほとんど変化はなく、むしろ低下傾向が認められた。また、各培養上清中の IL-8 産生量を調べたが、いずれも減少した。酸化アルミニウムについても酸化鉄と同様、影響しなかった。以上、MWCNT から溶出する金属量は少ないこと、及びこれら金属の感作誘導反応の増強作用を観察することができなかったことから、MWCNT で誘発される発がんや炎症への金属の関与はほとんどないことが示唆された。

#### A. 研究目的

建設材料に用いられてきたアスベストの吸入による中皮腫など、材料のサイズや形状等に起因する健康影響が懸念されている。カーボンブラック（CB）及びカーボンナノチューブ（CNT）のような炭素系ナノ材料（カーボンナノマテリアル）は、その特徴的な化学構造及び物理化学的性質により電子デバイス、

黒色顔料、補強材などとして広く実用化されている。しかしラットやマウスを用いた多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の吸入実験では、MWCNT が胸膜にまで到達している像があること、腹腔内投与した MWCNT で中皮腫が発生するなど、アスベストと同様の生体反応が確認されている。ディーゼル排ガス中の微粒子は喘息症状の増悪への関与が疑