

Crocidolite の初発時期よりも早期であった。投与後 100 週までの観察期間中に中皮腫が 17/100 例に観察された。陽性対照とした Crocidolite では同期間中に中皮腫は観察されなかった。本研究で投与した繊維数は、T-CNT は約  $3 \times 10^7$  本/動物、Crocidolite は約  $9 \times 10^7$  本/動物であり、繊維数は Crocidolite が約 3 倍程度多い。重量ベース、繊維数ベースにおいても MWCNT は Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられた。その理由として、MWCNT は、frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれることが考えられた。表面活性の差の可能性については、さらなる検討が必要であると考えられた。また、T-CNT 投与群の肝では、被膜肥厚に起因すると考えられる辺縁鈍化が認められた。Crocidolite では、これの変化を認めなかった。病理組織検査において、辺縁が鈍を呈した肝では、漿膜がび漫性に 20~100  $\mu\text{m}$  程度の線維性肥厚を示し、肝実質細胞と皮膜肥厚部の間に、MWCNT とマクロファージを認めた。この変化は、H24 に同様の方法で T-CNT を投与した p53+/-マウスには認められない病変であり、p53+/-マウスと野生型マウス、MWCNT と Crocidolite に線維化誘発に差がある可能性がある。MWCNT は細胞外マトリクスあるいは scaffold protein と直接的に相互作用する可能性も考えられる。以上より、中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53+/-マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。

## A. 研究目的

本研究では、高生産量ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行い、ナノマテリアルによる生体影響評価のための、特に慢性影響・遅発影響を適切に検出する評価手法の開発を目標としている。

平成 18~20 年度の厚生労働科学研究「ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価及び体内動態評価に関する基盤研究」の分担研究課題「高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究」では、過去にアスベスト代替繊維の発癌性評価に用いられた腹腔内投与試験系と、Agnes Kane らの p53+/-マウスにおけるアスベスト中皮腫発癌の知見<sup>1)</sup>を基盤に、MWCNT が雄性 p53 +/-マウス腹腔内投与により 3  $\mu\text{g}$ /動物から 3,000  $\mu\text{g}$ /動物の範囲で、用量依存的に中皮腫を誘発することを示した<sup>2,3)</sup>。

その際、初発までの潜伏期間に用量依存

性が認められないこと、及び、中皮腫前駆病変と考えられる異型中皮過形成巣の誘発には散在性の MWCNT 単離繊維を貪食したマクロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症が重要であり、凝集した MWCNT 繊維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽腫及びその線維化痕はそれに寄与しないことが示唆された。尚、これらの実験では MWCNT 原末を一般的な分散方法で調製しており、投与検体には凝集体を含んでいた。ここでの経験、及び気管内投与文献の知見から、MWCNT の生体影響を正しく評価するためには、凝集体を含まない、より高度に分散された検体を使用することが重要であることが再認識された。

そこで、本研究では実験動物による MWCNT の生体影響の評価・予測の人への外挿を高める為に、MWCNT の原末に含まれる凝集体を高率に除去し単離繊維を高度に分散する方法 (Taquann 法、特許出願済) を開発し、動物実験用の検体として使用している<sup>4)</sup>。

H24 年度には、Taquann 法処理した MWCNT を p53+/-マウス腹腔内投与モデルに適用し、経時的に採血を行い、血清 Mesothelin 測定を試料に供すると共に、中皮腫発癌までを経時的に組織観察し、既に実施した実験 (MWCNT 原末を一般的分散法により投与) の組織変化との比較を行った。その結果、中皮腫誘発は、初発までの潜伏期間、初期病理組織像を含め、先行研究の実験結果と良く一致した。一方、検体の重量ベースで、Taquann 処理検体の 10 µg/動物の発癌性が従来法による検体の大凡 200 µg/動物に相当することが判明した。これは、Taquann 処理検体が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊維が重量当たり 20 倍含まれていることと良く一致していた。

H25 年度に MWCNT がアスベストと同様の機序で野生型マウスにおいても中皮腫を誘発するか否かを確認する目的として、T-CNT 10 µg/動物を腹腔内投与しその後 1 年 6 箇月の観察を行う計画で実験を開始した。H26 年度は投与後 60 週及び 80 週の定期解剖を実施した。現在、投与後 100 週を経過し観察を継続中である。

## B. 研究方法

### B-1. 検体

#### 1) MWCNT

MWCNT は三井物産の MWNT-7 を使用した。

繊維径	70-170 nm (平均 100 nm) <sup>a)</sup>
長さ	1-19 µm (> 5 µm 27.5%) <sup>a)</sup>
繊維数	3.55 × 10 <sup>11</sup> 本/g <sup>a)</sup>
製品形状	繭状凝集体及び単離繊維
化学組成	炭素純度 99.5%以上
	鉄：3500 ppm (0.35%) <sup>a)</sup>
	硫黄：470 ppm <sup>a)</sup>
	塩素：20 ppm <sup>a)</sup>
	フッ素：<5 ppm <sup>a)</sup>
	臭素：<40 ppm <sup>a)</sup>

<sup>a)</sup>東京都健康安全研究センターの測定データ <sup>2,3)</sup>

MWNT-7 の原末は Taquann 法 <sup>4)</sup> を適用して使用した。以下、T-CNT と記載する。

Taquann 法は、走査型電子顕微鏡 (SEM) の試料作製方法である「臨界点乾燥」の概念と、液相での分散と濾過を組み合わせた技術であり、濾液の分散媒を除去する際に表面張力を生じないため、分散質の分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、MWCNT 原末を三級ブタノール (TB、融点；25.69°C、関東化学株式会社 特級) に分散、懸濁させて、凍結融解による分散促進を一回行った後、金属製フィルター (セイシン企業、目開き 25 µm) でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固相状態のろ液を溶媒回収型真空ポンプ (Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK) により減圧し、液相を介さずに昇華させ、TB を分離除去することで、分散性の保たれた乾燥状態の MWCNT を得る。

T-CNT には、3×10<sup>6</sup> 本/µg の繊維数が含まれる <sup>4)</sup>。

#### 2) Crocidolite (陽性対照)

Crocidolite (UICC-grade) は国立医薬品食品衛生研究所で保管している検体を使用した <sup>2)</sup>。Crocidolite には 2.93×10<sup>9</sup> 本/mg の繊維数が含まれる <sup>2,5)</sup>。

#### 3) 溶媒

溶媒は 0.1% Tween80 (「日局」ポリソルベート 80 (HX)、日油株式会社) を含む生理食塩液 (大塚製薬工場) を用いた。

#### 4) 検体の調製方法

T-CNT と Crocidolite はガラスバイアル内で生理食塩液と混合、オートクレーブで

滅菌処理した後に Twenn80 を添加し、超音波浴槽 (SU-3TH、出力 40W、発振周波数 34kHz、柴田科学) で超音波を 5 分間照射し、懸濁液とした。

## B-2. 使用動物、飼育管理

### 1) 使用動物

先行研究では、C57BL/6NCrSlc (日本エスエルシー株式会社) をバックグラウンド (40 代以上) とする p53+/-マウス (自家繁殖) を使用して研究を進めてきたため、本研究では、C57BL/6NCrSlc の野生型雄性マウスを使用した。合計 260 匹の 6 週齢マウスを 1 週間の期間を空けて 130 匹ずつ 2 回に分けて購入し、6 週間の馴化期間を設け 12 週齢で実験に供した。

### 2) 飼育管理

ポリカーボネイト製のケージに紙製の床敷を使用し、1 ケージ当り 10 匹のマウスを収容した。ケージラックはケミカルセーフティ対応のケージ個別換気式飼育装置 (VIC システム、ダイダン株式会社) を使用した。飼育条件は、温度 ;  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ 、湿度 ;  $55 \pm 5\%$ 、換気回数 ; 約 20 回/h、照明時間 ; 8 時~20 時点灯 (照明明暗サイクル 12 時間) とし、固型飼料 CRF-1 (オリエンタル酵母工業株式会社) を付属の給餌器を使用して自由摂取させ、飲水は市水をフィルター濾過し自動給水装置により自由摂取させた。個体識別は、耳介にハサミで切り込みを入れる方法で行った。

## B-3 群構成、投与 (表 1)

### 1) 群構成

動物は溶媒対照群 80 匹、T-CNT 100 匹、Crocitolite 投与群 80 匹に設定した。最初に購入した 130 匹の動物を A グループ、2 回目に購入した 130 匹を B グループのサブグループとし、それぞれのサブグループ毎に、

投与前日の体重を指標にして群わけを行った。投与前日の体重の平均は、A グループ  $27.2 \pm 1.6\text{g}$ 、B グループ  $26.2 \pm 1.5\text{g}$  であり、グループ間に差は認められなかった。

### 2) 投与

投与液量は  $0.5\text{ mL}$ /動物とした。溶媒対照群には溶媒のみ、T-CNT 群には  $10\mu\text{g}$ /動物、Crocitolite 群には  $30\mu\text{g}$ /動物を単回腹腔内投与した。T-CNT 群では、動物 1 匹当たりに投与した繊維数は、約  $3 \times 10^7$  本である。Crocitolite 群では、動物 1 匹当たりに投与した繊維数は約  $9 \times 10^7$  本である。

### 3) 観察、中皮腫による死亡率の計算

全ての動物について、一般状態観察を 2 日毎、体重測定を 4 週間毎に実施した。死亡した動物及び一般状態の悪化が認められた動物は直ちに解剖した。中皮腫による死亡率を Kaplan-Meier 法により求めた。

## B-4 解剖及び病理組織標本

### 1) 解剖及びサンプリング

投与後 20 週毎に 10~20 匹の動物を定期解剖に供し、観察期間 1 年 6 カ月 (80 週) の計画とした。

動物は吸入麻酔器 (TK-7、バイオマシナリー) を用いイソフルラン (イソフル、DS ファーマアニマルヘルス) 麻酔下で眼窩より採血し、腋下動脈を切断して放血による安楽死後に剖検を行った。血液は、室温で約 30 分静置後、 $4^\circ\text{C}$ 、 $2,500 \times \text{g}$  で血清を分離し  $-80^\circ\text{C}$  で保存した。肝、腎 (左右)、脾、心は固定前重量を測定した。全ての臓器は 10% 中性緩衝ホルマリンで固定した。横隔膜は胸郭下口に付着させた状態で固定した。腹壁はろ紙に伸展させ、ゴム板に虫ピンで固定した後に固定液に浸漬した。

### 2) 病理組織標本

固定後に臓器を切り出し、常法に従っ

て脱水、パラフィン包埋し、薄切してH&E染色と、必要に応じてマッソン・トリクローム染色標本を作製した。

組織中のMWCNTの観察は、偏光フィルターを装着した通常の光学顕微鏡観察及び、高分解能暗視野コンデンサを用いた散乱光によるナノ粒子の検出システム(High Resolution Adapter (HRA)、CytoViva®)を使用した。

### 倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

## C. 研究結果

H25年度に投与後20週及び40週、H26年度には60週及び80週の定期解剖を実施した。観察期間中、一般状態が悪化した動物は速やかに解剖を行った。現在、投与後100週を経過し観察を継続中である。

### C-1 体重推移 (表2、図1)

投与開始時の平均体重は溶媒対照群 26.8 ± 1.6g、T-CNT 群 26.8 ± 1.8g、Crocidolite 群 26.5 ± 1.6g であった。T-CNT 群では、投与16~32週、44週、52~60週において有意な体重増加抑制が認められた。Crocidolite 群では、投与後4~32週、40~44、及び52週に有意な体重増加抑制が認められた。

### C-2 臓器重量

#### 1) 投与後20週の定期解剖 (表3-1)

各群19匹の解剖を行った。T-CNT 群の腎、

脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意な増加が認められた。Crocidolite 群では、脾の絶対重量の有意な増加、心、腎及び脾の相対重量の有意な増加が認められた。

#### 2) 投与後40週の定期解剖 (表3-2)

各群10匹の解剖を行った。T-CNT 群では、変化は認められなかった。Crocidolite 群では、肝の相対重量に有意な増加が認められた。

#### 3) 投与後60週の定期解剖 (表3-3)

各群10匹の解剖を行った。T-CNT 群では、腎及び脾の相対重量に有意な増加が認められた。Crocidolite 群では、腎絶対重量及び相対重量に有意な増加が認められた。

#### 4) 投与後80週の定期解剖 (表3-4)

各群10匹の解剖を行った。T-CNT 群では、心絶対重量に有意な低下が認められた。Crocidolite 群では、変化は認められなかった。

## C-3 剖検所見

### 1) 定期解剖

#### (1) 投与後20週 (表4)

溶媒対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。T-CNT 群では、腎、脾の被膜(漿膜)のびまん性網状肥厚が10/19例、肝の辺縁鈍化が16/19例に認められた。Crocidolite 群では、全ての動物に異常は認められなかった。

#### (2) 投与後40週 (表4)

溶媒対照群では、全ての動物に異常は認められなかった。T-CNT 群では、腎、脾の被膜(漿膜)のびまん性網状肥厚が10/10例、肝の辺縁鈍化が9/10例に認められた。Crocidolite 群では、全ての

動物に異常は認められなかった。

### (3) 投与後 60 週 (表 4)

溶媒対照群では、肝の小葉明瞭化が 3/10 例にみられた。T-CNT 群では、中皮腫が 1/10 例、腎、脾の被膜 (漿膜) のびまん性網状肥厚が 9/10 例、肝の辺縁鈍化が 10/10 例、肝と横隔膜の癒着が 8/10 例に認められた。その他に、精囊の腫大、精囊炎が 3/10 例、縦隔リンパ節、腸間膜リンパ節の腫大がそれぞれ 1/10 例にみられた。Crocitolite 群では、肝の小葉明瞭化、腎腫大、脾の腫大、精囊の膿瘍がそれぞれ 1/10 例にみられた。

### (4) 投与後 80 週 (表 4)

溶媒対照群では、肝の小葉明瞭化が 2/10 例、精囊の腫大が 9/10 例、肝の白色点、心肥大、鼠径リンパ節腫大がそれぞれ 1/10 例にみられた。

T-CNT 群では、腹水を伴う中皮腫が 1/10 例、腎、脾の被膜 (漿膜) のびまん性網状肥厚が 10/10 例、肝の辺縁鈍化が 9/10 例、肝と横隔膜の癒着が 8/10 例、前胃の結節が 2/10 例、精囊の腫大が 10/10 例認められた。その他に、パイエル氏板、腸間膜リンパ節の腫大がみられた。Crocitolite 群では、精囊の腫大が 8/10 例、認肝の小葉明瞭化、肝の腫瘍性病変、腎腫大、心肥大、精囊の腫大がそれぞれ 1/10 例にみられた。

定期解剖の全群において、肝の辺縁鈍化が MWCNT 群では 44/49 例に認められたが、溶媒対照群及び Crocitolite 群には認められなかった (表 5)。

## 2) 途中死亡と瀕死期屠殺動物 (表 6)

投与後 100 週までの観察期間において、溶媒対照群では、3/80 例の死亡動物、10/80

例の瀕死期屠殺動物、合計 13/80 例を定期解剖以外で解剖した。死亡例はファイティングによる外傷 1 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 2 例であった。瀕死期屠殺例は、リンパ腫 3 例、胸腺腫 1 例、肺水腫とそれに伴う心拡張 (肺性心) が 2 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大を認めたもの 2 例、精囊腫大と腸管出血 1 例、斜頸と体重減少 1 例であった。

T-CNT 群では、12/100 例の死亡動物、33/100 例の瀕死期屠殺、合計 45/100 例を定期解剖以外で解剖した。中皮腫は死亡例に 1 例、瀕死期屠殺例に 14 例、合計 15 例であった。死亡例では、血性腹水を伴う中皮腫 1 例、腹水貯留が 2 例、精囊腫大とそれに伴う精囊炎 1 例、肺水腫とそれに伴う肺性心が 4 例、尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 3 例であった。瀕死期屠殺では、14 例に血性腹水を伴う中皮腫を認め、初発例の解剖は投与後 204 日であった (図 2)。腹水貯留が 12 例、精囊腫大とそれに伴う精囊炎 3 例、を尿の排泄障害とそれに伴う水腎症が疑われる腎腫大 1 例、肺水腫とそれに伴う心拡張 (肺性心) が 1 例、胸腺腫 1 例、胸腺の黄緑色化を認めたもの 1 例であった。なお、肝の辺縁鈍化は、解剖した 45 例すべてに認められた (表 5)。

Crocitolite 群では、5/80 例の死亡動物、12/80 例の瀕死期屠殺動物、合計 17/80 例を定期解剖以外で解剖した。死亡例はリンパ腫 1 例、精囊腫大とそれに伴う精囊炎 1 例、自己融解が強く死因を同定できなかったもの 3 例であった。瀕死期屠殺では投与後 646 日及び 652 日に腹水貯留が 2 例みとめられたが肉眼的観察では中皮腫は確認できなかった。その他、リンパ腫 1 例、胸腺

腫 1 例、ファイティングによる外傷 2 例、  
嚢胞腎 2 例、脾及び鼠径リンパ節腫大と精  
嚢硬化を認めたもの 1 例、肺水腫とそれに  
伴う肺性心を認めたもの 1 例、消瘦 1 例、  
後肢麻痺 1 例であった。

#### C-4 Kaplan-Meier 法による中皮腫による死 亡率(図 3)

投与後 100 週目までを観察期間とし、中  
皮腫による死亡率について、Kaplan-Meier  
法により計算した。野生型マウスと p53+/-  
マウスの死亡率を比較するため、H24 年度  
に実施した p53+/-マウスに T-CNT 10 µg/  
動物を単回腹腔内投与した実験結果を同グ  
ラフにプロットした。p53+/-マウスでは中  
皮腫発癌による死亡の初発時期は 134 日、  
野生型マウスでの初発時期は 204 日であっ  
た。

#### C-5 病理組織検査

T-CNT 群で認められた辺縁が鈍を呈した  
肝では、漿膜の全面が線維化し肥厚してい  
る像が観察されたが Crocidolite 群では、  
この変化は認められなかった(図 4)。H24  
年度に実施した T-CNT を腹腔内投与した  
p53+/-マウスの肝においても肝の辺縁の鈍  
化は認められず、漿膜面の線維化は限局性  
であった(図 5)。現在、詳細な評価を進め  
ている。

#### D. 考察

本分担研究では、MWCNT がアスベストと  
同様の機序で野生型マウスにおいても中皮  
腫を誘発するか否かを確認する目的で実験  
を行った。T-CNT 10 µg/動物を単回腹腔内  
投与し、野生型マウスにおいても p53+/-マ  
ウスと同様に中皮腫が誘発されることが明  
らかとなった。病理組織の詳細な評価につ  
いては現在実施中である。中皮腫が誘発さ  
れて瀕死期屠殺した例では、一般状態観察  
において腹部膨満を認め、解剖では血性腹

水の貯留、胃大弯部に壁外発育型の中皮腫、  
横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面に微細白色  
顆粒状の中皮腫を認めた。これらの所見は、  
p53+/-マウスで中皮腫が誘発され瀕死期屠  
殺した所見と同様であった。

野生型マウスに比較して、p53+/-マウス  
はアスベスト腹腔内投与による中皮腫発癌  
に高い感受性を示すことが報告されている<sup>1)</sup>。  
p53+/-マウスでは、200 µg の Crocidolite  
を週 1 回、12 週間の腹腔内投与により約 30  
週後に中皮腫が誘発されるが、野生型マウ  
スでは 60 週を超えた時期に観察されてい  
る。

先行研究では、このモデルを適用し、  
MWCNT が 3~3,000 µg/動物の範囲で用量依  
存的に中皮腫を誘発することを示した<sup>2, 3)</sup>。  
その際、初発時期に用量依存性の早期化が  
認められないこと、及び、中皮腫の誘発に  
は散在性の MWCNT 単離繊維を貪食したマク  
ロファージを伴う非肉芽腫性の局所慢性炎症  
が重要であり、他方、凝集した MWCNT 繊  
維塊を取り囲む類上皮細胞肉芽種及びその  
線維化瘢痕形成は中皮腫発癌に寄与しない  
ことが示唆された。

H24 年度の分担研究では、検体の重量ベ  
ースで、Taquann 処理検体の 10 µg/動物の  
発癌性が従来法による検体の大凡 200 µg/  
動物に相当することが判明した。これは、  
T-CNT が殆ど凝集体を含まず単離 MWCNT 繊  
維が重量当たり 20 倍含まれていることと  
良く一致していた。この結果は、繊維一本  
が中皮腫を誘発する確率が等しいこと、散  
在性の繊維を貪食したマクロファージによ  
る所謂 frustrated phagocytosis に相当す  
ると考えられる非肉芽腫性の局所性遷延性  
慢性炎症巣が重要であるという仮説を支持  
するものであった。

T-CNT 10 µg/動物を p53+/-マウスに単回  
腹腔内投与した実験では中皮腫発癌の初発  
時期は 134 日、野生型マウスに投与した場

合の初発時期は 204 日であった。何れも、文献で報告されている Crocidolite の初発時期よりも早期である。本研究では、Crocidolite 投与後 646 日及び 652 日に血性腹水を呈した個体が認められたが、肉眼所見では明らかな中皮腫は観察されなかった。投与後 100 週を超えた時点においても中皮腫は観察されていない。

T-CNT には、約  $3 \times 10^6$  本/ $\mu\text{g}$  の繊維が含まれ<sup>4)</sup>、Crocidolite には  $2.93 \times 10^9$  本/mg の繊維が含まれる<sup>2, 5)</sup>。本実験で投与した繊維数は、T-CNT で約  $3 \times 10^7$  本/動物、Crocidolite では約  $9 \times 10^7$  本/動物であり、繊維数は Crocidolite が約 3 倍程度多い。本研究結果からは、重量ベース、繊維数ベースにおいても MWCNT は Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられる。その理由の一つとして、繊維長の分布が異なっていることが考えられる。T-CNT の繊維長分布は、5  $\mu\text{m}$  以下が 32~40%、5  $\mu\text{m}$  を超える繊維が 60~64%である。本研究で使用した Crocidolite の繊維長は測定していないが、5  $\mu\text{m}$  以下が 72.5~98.9%、5  $\mu\text{m}$  を超える繊維が 1.1~27.4%という報告がある<sup>6, 7)</sup>。MWCNT は、frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれるため、中皮腫発癌を Crocidolite より早期に誘発する可能性がある。

T-CNT 群で認められた辺縁が鈍を呈した肝では、漿膜が線維化し肥厚している像が観察された。この変化は、Crocidolite 群及び H24 に同様の方法で T-CNT を投与した p53+/-マウスには認められない病変である。ラットの臍を実験的に傷害させて p53 の機能を抑制すると、臍の治癒が遷延化することから<sup>8)</sup>、p53+/-マウスと野生型マウスでは線維化誘発に差がある可能性がある。その機序の一つとして、MWCNT を複合した足場材料を用いると骨形成が促進されることから<sup>9)</sup>、MWCNT は細胞外マトリクスあるいは

scaffold protein と直接的に相互作用する可能性が考えられる。

## E. 結論

本分担研究では、MWCNT が野生型マウスにおいても中皮腫を誘発することを明らかにした。MWCNT は重量ベース、繊維数ベースにおいても Crocidolite よりも中皮腫誘発能が高いと考えられ、その機序として frustrated phagocytosis を引き起こす長さの繊維が多く含まれることが原因である可能性がある。MWCNT の表面特性による差については、さらなる検討が必要である。肝では、漿膜が線維化し肥厚している像が観察された。この変化は、Crocidolite p53+/-マウスには認められない病変であることから、p53+/-マウスと野生型マウス、MWCNT と Crocidolite に線維化誘発に差がある可能性が考えられる。以上より、中皮腫の基本的な発症メカニズムは p53+/-マウスと野生型マウスに違いが無いことが示唆されたが、線維化誘発に差がある可能性が考えられた。

## F. 参考文献

1. Vaslet CA, Messier NJ, Kane AB. Accelerated progression of asbestos-induced mesotheliomas in heterozygous p53+/- mice. *Toxicol Sci.* 2002 Aug;68(2):331-8.
2. Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J., Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube., *J Toxicol Sci.* 2008 Feb;33(1):105-16.
3. Takagi A, Hirose A, Futakuchi M, Tsuda H, Kanno J, Dose-dependent mesothelioma

induction by intraperitoneal administration of multi-wall carbon nanotubes in p53 heterozygous mice. *Cancer Sci.* Aug;103(8):1440-4, 2012

4. Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38(4):619-28.

5. Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol* 1987Sep;128(3):426-45.

6. Langer AM, Mackler AD, Pooley FD. Electron microscopical investigation of asbestos fibers. *Environ Health Perspect.* 1974 Dec;9:63-80.

7. Moalli PA, MacDonald JL, Goodglick LA, Kane AB. Acute injury and regeneration of the mesothelium in response to asbestos fibers. *Am J Pathol.* 1987 Sep;128(3):426-45.

8. Marsolais D(1), Côté CH, Frenette J. Pifithrin-alpha, an inhibitor of p53 transactivation, alters the inflammatory process and delays tendon healing following acute injury. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 2007 Jan;292(1):R321-7.

9. Usui Y, Aoki K, Narita N, Murakami N, Nakamura I, Nakamura K, Ishigaki N, Yamazaki H, Horiuchi H, Kato H, Taruta S, Kim YA, Endo M, Saito N. Carbon nanotubes with high bone-tissue compatibility and bone-formation acceleration effects.

*Small.* 2008 Feb;4(2):240-6.

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Ohba T, Xu J, Alexander DB, Yamada A, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Imaizumi Y. (2014) MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents. *J Toxicol Sci.*;39(3):499-505.

Yokoyama A, Igarashi K, Sato T, Takagi K, I MO, Shishido Y, Baba T, Ito R, Kanno J, Ohkawa Y, Morohashi KI, Sugawara A. (2014) Identification of myelin transcription factor 1 (MyT1) as a Subunit of the Neural Cell Type-specific Lysine-specific demethylase 1 (LSD1) Complex. *J Biol Chem.* ;289(26):18152-62.

Janesick A, Nguyen TT, Aisaki K, Igarashi K, Kitajima S, Chandraratna RA, Kanno J, Blumberg B. (2014) Active repression by RAR $\gamma$  signaling is required for vertebrate axial elongation., *Development.* ;141(11):2260-70.

Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. (2014) Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis and mesothelial proliferation by multi-walled carbon nanotubes., *Cancer Sci.* ;105(7):763-9.

Numano, T., Xu, J., Futakuchi, M., Fukamachi, K., Alexander, D.B., Furukawa, F., Kanno, J., Hirose, A., Tsuda, H., Suzui, M. (2014), Comparative Study of Toxic Effects of Anatase and Rutile Type Nanosized Titanium Dioxide Particles in



vivo and in vitro. Asian Pac J Cancer Prev.;15(2):929-35

## 2. 学会発表

Jun Kanno, "Taquann" Dispersion Method with Direct Injection Whole-Body Inhalation System for Engineered Nano Materials Toxicity Studies, the 54th Annual Meeting of the Society of Toxicology (2015. 3. 25) San Diego, USA, poster

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、広瀬明彦、Toxicological considerations for particulate matter as foreignbody carcinogen. 第 73 回日本癌学会学術総会 (2014. 9. 26) 横浜、シンポジウム

Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Jun Kanno, Nanotoxicology - its chronic aspects: Taquann-Direct Injection whole body inhalation system. 国際材料研究学会連合-アジア国際会議 2014 (IUMRS-ICA2014) (2014. 8. 25) 福岡、シンポジウム

菅野 純、高橋祐次、高木篤也、広瀬明彦、今井田克己、津田洋幸、ナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて、第 41 回日本毒性学会学術年会 (2014. 7. 3) 神戸、シンポジウム

菅野 純、評価と管理の分界に関する考察、平成 26 年度日本環境変異原学会公開シンポジウム (2014. 5. 24) 東京

Jun Kanno, Yuhji Taquahashi, Atsuya Takagi, Masaki Tsuji, Koichi Morita, Yukio Ogawa, Mesotheliomagenesis of micrometer-sized MWCNT: findings from intraperitoneal injection and whole body inhalation studies of highly

dispersed "Taquann" treated MWCNT. 7th International Nanotoxicology Congress (2014. 4. 24) Antalya, Turkey, invited

## H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

表1 群構成

Group	Dose ( $\mu\text{g}/\text{animal}$ )	Concentration ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	Volume ( $\text{mL}/\text{animal}$ )	scheduled sacrifice	Number of animals
Vehicle Control	0	0	0.5	20W(140D)	80
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	
MWCNT	10 ( $3 \times 10^7$ )	20	0.5	20W(140D)	100
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	
Crocidolite (Positive control)	30 ( $9 \times 10^7$ )	60	0.5	20W(140D)	80
				40W(280D)	
				60W(420D)	
				80W(560D)	

表2 体重推移

Weeks		0	4	8	12	16	20	24	28	32	36	40	44	48
Control	mean	26.8	30.4	32.4	33.7	35.4	36.1	38.4	39.1	39.6	39.7	39.8	41.8	42.3
	SD	1.6	2.7	3.1	3.6	3.8	4.1	4.3	4.5	4.8	5.3	4.9	5.7	6.3
	N	80	80	80	80	80	79	60	60	60	59	57	47	47
MWCNT	mean	26.8	29.9	31.9	33.1	34.1	34.7	36.3	37.2	37.6	38.3	38.5	39.6	40.2
	SD	1.8	2.1	2.4	2.7	3.1	3.3	3.6	4.2	4.7	5.0	4.8	5.2	5.3
	N	100	99	98	98	96	96	77	77	76	76	74	62	61
		N.S	N.S	N.S	N.S	*	*	**	*	*	N.S	N.S	*	N.S
Crocidolite	mean	26.5	29.5	31.3	32.6	33.7	34.4	35.9	36.9	37.2	37.9	37.9	39.1	40.1
	SD	1.6	1.9	2.1	2.5	3.0	3.2	3.7	4.1	4.3	4.6	4.8	5.3	5.7
	N	80	80	80	79	79	79	59	57	55	55	54	44	44
		N.S	*	**	*	**	**	***	**	**	N.S	*	*	N.S
Weeks		52	56	60	64	68	72	76	80	84	88	92	96	100
Control	mean	43.3	43.9	45.0	45.2	45.9	46.6	46.1	46.0	45.4	44.5	42.2	40.5	38.8
	SD	6.2	6.6	6.8	6.9	7.1	7.1	7.7	7.2	6.2	6.1	6.2	5.3	5.8
	N	46	46	45	35	35	34	34	34	24	23	22	20	18
MWCNT	mean	40.9	40.9	41.3	43.0	43.7	43.9	43.6	45.1	45.1	43.6	44.9	43.3	44.4
	SD	5.8	5.9	6.0	6.1	5.9	6.2	6.9	6.7	6.2	5.9	6.0	7.3	5.6
	N	58	56	54	40	39	36	34	27	16	12	8	7	6
		*	*	**	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S
Crocidolite	mean	40.6	41.9	43.2	45.4	45.0	45.4	44.9	44.8	44.7	43.6	42.4	42.4	41.5
	SD	6.0	6.0	6.1	6.0	6.1	5.6	5.8	5.8	5.6	5.9	6.5	5.6	5.1
	N	44	43	42	32	31	30	30	29	19	18	17	14	14
		*	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S	N.S

\*;  $p < 0.05$ , \*\*;  $p < 0.01$ , \*\*\*;  $p < 0.001$  v.s. Control Student's t-test

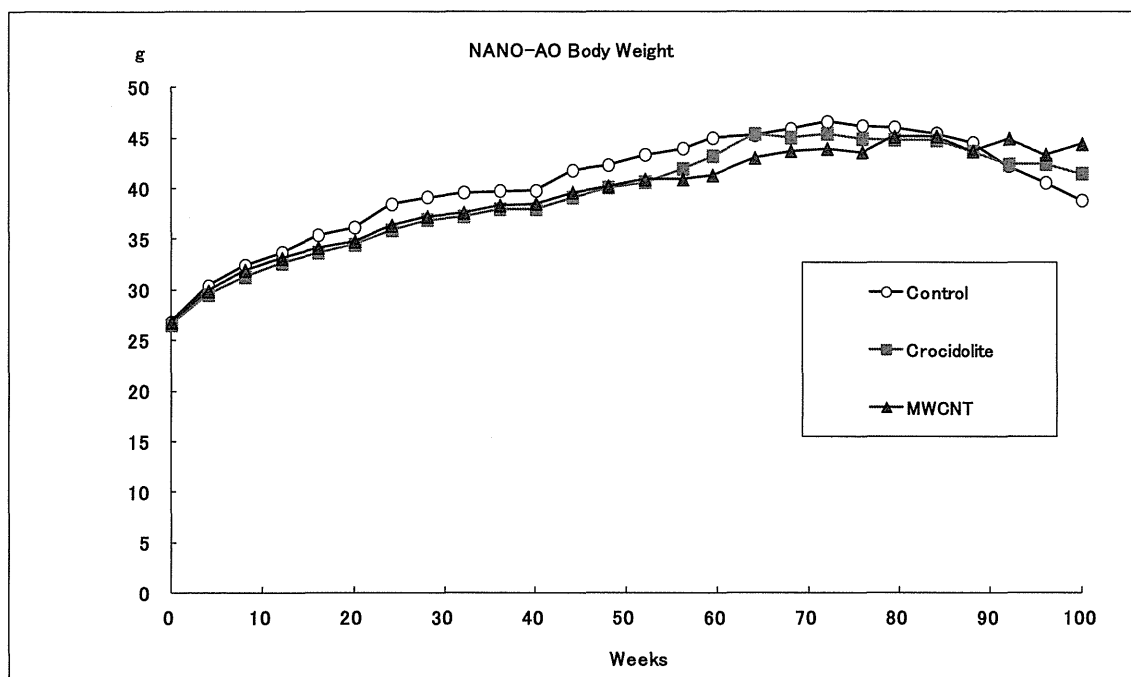


図1 体重推移グラフ

表 3-1 投与後 20 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight						Relative Organ Weight				
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	34.7	0.15	1.74	0.20	0.20	0.086	0.43	5.02	0.59	0.57	0.250
	SD	4.6	0.03	0.34	0.02	0.03	0.018	0.08	0.65	0.08	0.08	0.055
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
MWCNT	mean	33.3	0.17	1.76	0.23	0.22	0.126	0.50	5.30	0.68	0.66	0.380
	SD	2.9	0.02	0.16	0.03	0.02	0.023	0.08	0.46	0.08	0.06	0.079
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
				**	*	***	*		**	**	***	
Crocidolite	mean	33.6	0.17	1.82	0.22	0.21	0.123	0.50	5.46	0.66	0.64	0.377
	SD	3.0	0.03	0.15	0.03	0.03	0.038	0.09	0.71	0.09	0.09	0.156
	N	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19	19
							***	*	*	*	**	

\*; p<0.05, \*\*; p<0.01, \*\*\*; p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 3-2 投与後 40 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight						Relative Organ Weight				
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	37.0	0.19	1.91	0.24	0.25	0.118	0.51	5.20	0.64	0.67	0.320
	SD	2.7	0.03	0.11	0.04	0.04	0.044	0.10	0.53	0.12	0.10	0.117
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MWCNT	mean	36.9	0.17	1.88	0.24	0.23	0.112	0.48	5.13	0.66	0.63	0.310
	SD	5.2	0.01	0.20	0.02	0.02	0.009	0.08	0.45	0.08	0.08	0.053
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Crocidolite	mean	37.3	0.19	1.71	0.24	0.23	0.098	0.51	4.61	0.65	0.63	0.268
	SD	4.0	0.03	0.27	0.04	0.02	0.017	0.11	0.56	0.11	0.09	0.061
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

\*

\*, p< 0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 3-3 投与後 60 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight						Relative Organ Weight				
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	46.3	0.19	2.34	0.23	0.23	0.117	0.42	5.03	0.51	0.50	0.249
	SD	6.2	0.02	0.51	0.06	0.03	0.046	0.10	0.66	0.16	0.11	0.074
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MWCNT	mean	39.3	0.19	1.96	0.24	0.25	0.140	0.50	4.89	0.64	0.65	0.359
	SD	6.8	0.02	0.49	0.04	0.02	0.048	0.08	0.64	0.16	0.10	0.105
	N	10	10	8	9	9	9	10	8	9	9	9
Crocidolite	mean	38.0	0.19	1.98	0.25	0.26	0.101	0.49	5.23	0.68	0.68	0.270
	SD	3.5	0.03	0.27	0.04	0.03	0.026	0.09	0.69	0.14	0.08	0.086
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

\*\*

\*

\*, p< 0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 3-4 投与後 80 週の定期解剖における臓器重量

		Absolute Organ weight						Relative Organ Weight				
Group	BW	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	Heart	Liver	KidneyR	KidneyL	Spleen	
Control	mean	43.6	0.20	1.99	0.27	0.26	0.093	0.49	4.56	0.65	0.62	0.219
	SD	7.9	0.02	0.45	0.02	0.01	0.013	0.12	0.38	0.11	0.11	0.048
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10
MWCNT	mean	42.7	0.18	2.24	0.28	0.35	0.134	0.44	5.19	0.68	0.887	0.3246
	SD	6.9	0.02	0.60	0.04	0.25	0.051	0.06	0.84	0.13	0.729	0.1665
	N	10	10	6	8	9	6	10	4	7	8	5
Crocidolite	mean	42.7	0.21	2.18	0.27	0.25	0.113	0.52	5.09	0.63	0.589	0.2699
	SD	6.5	0.05	0.99	0.04	0.03	0.030	0.19	1.96	0.08	0.071	0.0752
	N	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10	10

\*\*

\*

\*, p< 0.05, \*\*, p<0.01, \*\*\*, p<0.001 v.s. Control Student's t-test

表 4 定期解剖所見

Group	Scheduled sacrifice	Number of animals examined	Number of incidence	Gross pathological findings	
Vehicle Control	20W(140D)	19	19	Not remarkable	
	40W(280D)	10	10	Not remarkable	
	60W(420D)	10	7	Not remarkable	
			3	Liver; accentuated lobular pattern	
	80W(560D)	10	1	Not remarkable	
			2	Liver; accentuated lobular pattern	
			1	Liver; white spot	
			1	Heart; Hypertrophy	
			1	inguinal lymph nodes; swelling	
MWCNT	20W(140D)	19	16	Liver; dull, marginal	
			10	Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse	
	40W(280D)	10	9	Liver; dull, marginal	
			10	Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse	
	60W(420D)	10	10	Liver; dull, marginal	
			1	mesothelioma	
			8	adhesion	
			9	Kidney; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse	
			9	Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse	
			1	atrophy	
			3	Seminal vesicle; swelling, vesiculitis	
			2	thickening, capsular	
			1	Lymph node, mediastinal;swelling	
	1	Lymph node, mesenteric;swelling			
	80W(560D)	10	9	Liver; dull, marginal	
			1	mesothelioma	
			1	nodal	
			8	adhesion	
10			Kidney; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse		
10			Spleen; thickened serous surface, reticular appearance, diffuse		
2			Forestomach;nodal		
10			Seminal vesicle; swelling, vesiculitis		
2			Peyer's patches; swelling		
1			Lymph node, mesenteric;swelling		
1	ascites fluid				
Crocidolite (Positive control)	20W(140D)	19	19	Not remarkable	
	40W(280D)	10	10	Not remarkable	
	60W(420D)	10	8	Not remarkable	
			1	Liver; accentuated lobular pattern	
	80W(560D)	10	1	Kidney; swelling	
			1	Spleen; swelling	
			1	Seminal vesicle; abscess	
			1	Not remarkable	
			1	Liver; accentuated lobular pattern	
				1	Liver; Neoplastic lesion
				1	Heart; Hypertrophy
				1	Kidney;nodule
1				Seminal vesicle; swelling, vesiculitis	
8				Seminal vesicle; swelling, vesiculitis	

表 5 肝の辺縁の鈍化が認められた動物数

Group	Number of animals	Scheduled		Dead/Moribund
Vehicle Control	80	20W	0/19	0/11
		40W	0/10	
		60W	0/10	
		80W	0/10	
		subtotal	0/49	
MWCNT	100	20W	16/19	45/45
		40W	9/10	
		60W	10/10	
		80W	9/10	
		subtotal	44/49	
Crocidolite (Positive control)	80	20W	0/19	0/17
		40W	0/10	
		60W	0/10	
		80W	0/10	
		subtotal	0/49	

MWCNT 群では定期解剖動物の 44/49 例、死亡または瀕死期屠殺動物の 45/45 例に肝の辺縁の鈍化が認められた。

表 6 死亡または瀕死期屠殺動物数と中皮腫発現数

Group	Number of animals	Scheduled Sacrifice		Found Dead	Moribund Sacrifice	Mesothelioma	in-life @March./10/2015
Vehicle Control	80	20W	19	3	10	0/13	18
		40W	10				
		60W	10				
		80W	10				
		subtotal	49				
MWCNT	100	20W	19	12	33	15/45	6
		40W	10				
		60W	10(1)*				
		80W	10(1)*				
		subtotal	49				
Crocidolite (Positive control)	80	20W	19	5	12	0/17	14
		40W	10				
		60W	10				
		80W	10				
		subtotal	49				

\*: 定期解剖時に血性腹水・中皮腫が認められた動物数 (Kaplan-Meier の計算を含む)

MWCNT 群では定期解剖動物の 2/49 例、死亡または瀕死期屠殺動物の 15/45 例に中皮腫が認められた。

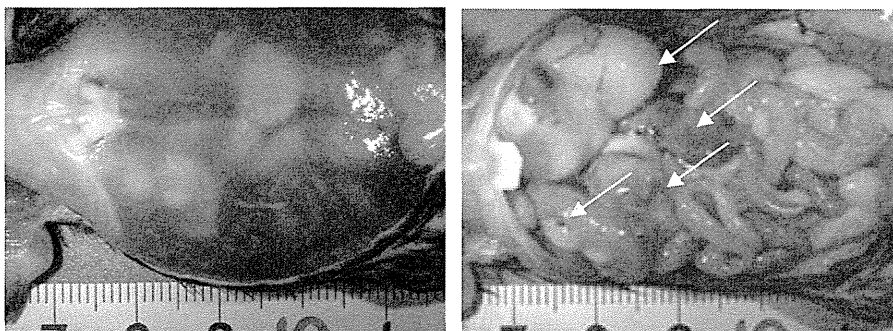


図 2 MWCNT(T-CNT)投与群で中皮腫が認められた例の肉眼所見(投与後 204 日)

胃大弯部:壁外発育型の中皮腫(12.3×15.8×9.8mm)

肝・横隔膜の癒着、中皮腫

腎・脾:被膜(漿膜)のびまん性網状肥厚

横隔膜、腹壁内側、盲腸漿膜面:微細白色顆粒状の中皮腫

血性腹水:7mL

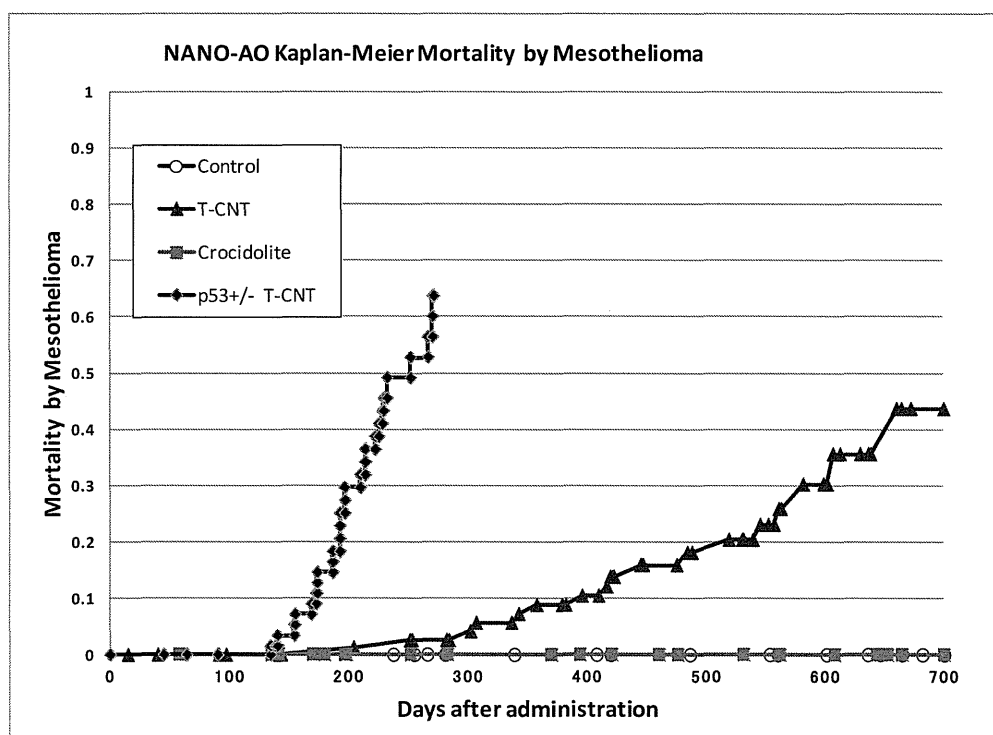


図 3 Kaplan-Meier による中皮腫による死亡率

中皮腫による死亡率と投与量の関係を Kaplan-Meier 法により比較した。野生型マウスで実施した本年度の実験結果(途中経過)を青の曲線(マーカーは三角)、H24 年度に実施した p53+/-マウスの実験結果を黒の曲線(マーカーは菱形)で示した。両実験共に Taquann 法処理検体を 10 $\mu$ g/動物の用量で単回腹腔内投与した。

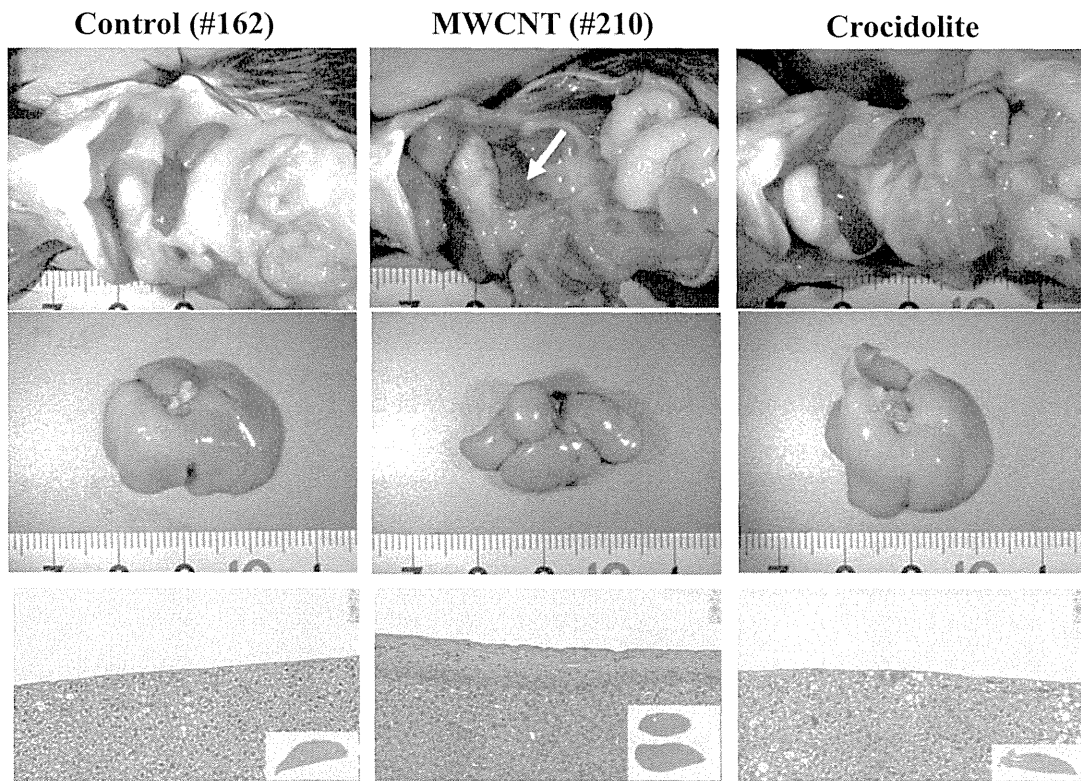


図4 野生型マウスの解剖時肝の肉眼所見及び病理組織所見(投与後40週の定期解剖所見)

MWCNT(T-CNT)投与群では、腎、脾の漿膜面のびまん性網状肥厚、肝の辺縁鈍化が認められた(矢印)。肝の病理組織では、漿膜が線維化して肥厚している像が観察された。



Wild type (#210) 40W

p53+/- (#387) 229D

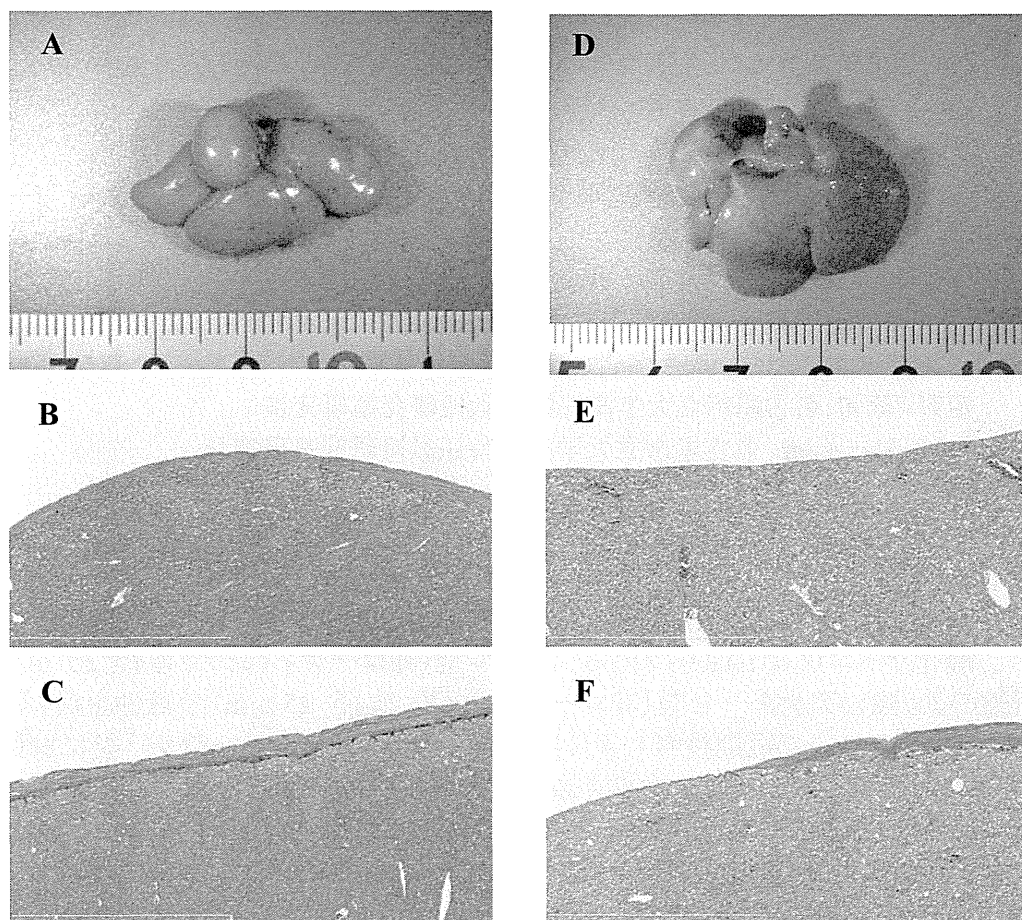


図 5 MWCNT を投与した野生型マウスと p53+/-マウスの肝の比較

MWCNT(T-CNT)投与群の野生型マウスでは、肉眼所見で肝の辺縁鈍化が認められ(A)、線維化が肝の漿膜面全面に認められた(B,C)。

p53+/-マウスでは肉眼所見では肝の辺縁の鈍化は認められず(D)、線維化は限局性である(E,F)。

平成 26 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: ナノマテリアル曝露による生体毒性の慢性移行及び遅発性に関わる評価手法  
の開発研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの発がん性評価手法の開発に関する研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

徐 結苟 名古屋市立大学特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

沼野 琢旬: 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

#### 研究要旨

我々が開発したナノマテリアルの毒性短期評価法としての経気管肺内噴霧法(TIPS 法)を用い、ナノサイズ二酸化チタン( $n\text{TiO}_2$ )のうち、ルチル型(非コーティング、直径 20 nm)および光触媒活性のより強いアナターゼ型(非コーティング、直径 25 nm)の毒性を検索してきた。in vivo ではラットにおいて短期投与(14 日間に8回 500 ppm、計2mg/ラット)後に肺胞組織の M $\phi$ 、8-OHdG、サイトカイン CCL3(Mip1alpha)誘導及び in vitro における肺 M $\phi$ の貪食作用と肺がん細胞に対する増殖能には紫外線照射下および非照射下において、両者には大きな差異はなかった。本研究では、さらに小さいサイズの両タイプの  $n\text{TiO}_2$  について同じ実験系にて肺毒性の差異について検討することを目的とした。方法:F344 系雌ラットを用いて、経気管肺内噴霧投与方法にて  $a10n\text{TIO}_2$  (アナターゼ型、平均一次粒子径 6nm)および  $r15n\text{TIO}_2$  (ルチル型、平均一次粒子径 15nm)を 500ug/mL 濃度にて 0.5mL 生食懸濁液を2週間に8回投与して、最終投与 6 時間後に屠殺して、左肺は-80°Cで保存(8-OHdG 等の生化学的解析)、右肺は 4%パラホルムにて固定した(病理検査・電顕観察を行う。無処置、生食群、 $\text{TiO}_2$  2群の計4群で各7-8匹合計 30 匹とした。さらに in vitro では同系無処置雌ラットの肺より採取した初代培養 M $\phi$  (PAM)培養液に  $a10n\text{TIO}_2$  および  $r15n\text{TIO}_2$ を加えたのちに採取した培養上清のヒト A549 肺細胞、CCD34 間質細胞に対する毒性について UVB 照射(1000 mW/cm<sup>2</sup>, peak at 312 nm, 2 min)の有無による差異についても検討したが、この in vitro 試験系ではルチル型とアナターゼ型の差異はなかった。

## A. 研究目的

二酸化チタン( $\text{TiO}_2$ )粒子は塗料・化粧品の材料として広く利用されている。しかし、WHO 国際がん研究機関 (IARC) は、 $\text{TiO}_2$  粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示す(動物において発がん性を示す十分な証拠がある)ことから Group2B (ヒトに対して発がんの可能性があると分類している。鉱物として製錬された  $\text{TiO}_2$  粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、アナターゼ型(an $\text{TiO}_2$ )は主として外壁塗料に、ルチル型(ru $\text{TiO}_2$ )は化粧品等に用いられている。これまでに我々は、ru $\text{TiO}_2$  にはラットにおいて肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序には ru $\text{TiO}_2$  を貪食した M $\phi$  の産生するラジカルによる細胞障害、および分泌される炎症性タンパク(CCL3)の細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた。一方、アナターゼ型はその強い光触媒活性を利用して外壁塗装用等に大量に生産されているが、UV 照射下でヒト皮膚線維芽細胞およびヒト肺がん細胞に対してルチル型の 100 倍以上の細胞毒性を有するという報告がある(Wu, J., *et al.*, *Toxicol Lett*, 191, 2009)。an $\text{TiO}_2$  はその光触媒活性を利用して、塗料用として大量に生産されているが、毒性学的影響についての知見は乏しく、光・UV 照射下でのリスク知見は乏しい。今までの研究においてルチル型(非コーティング、直径 20 nm)および光触媒活性のより強いアナターゼ型(非コーティング、直径 25 nm)には差異がないことを見出した。本研究では、さらにサイズの小さい a10n $\text{TiO}_2$  (アナターゼ型、平均一次粒子径 6nm)および r15n $\text{TiO}_2$  (ルチル型、平均一次粒子径 15nm)アナターゼ型の

毒性について比較しつつ検討した。

## B. 研究方法

試料の an $\text{TiO}_2$  と ru $\text{TiO}_2$  は日本化粧品工業会より提供された(広瀬明彦主任研究者経由)。

① 14 日間投与による肺発がん機序の検索

SD ラットを用い、a10n $\text{TiO}_2$  および r15u $\text{TiO}_2$  を 500  $\mu\text{g/ml}$  の濃度にて 0.05% Tween20 含有生理食塩水に懸濁して2日に1回の割合で合計8回肺内噴霧投与した(計2mg/ラット)。14 日目の最終投与の6時間後に屠殺剖検した。対照群は 0.05% Tween20 含有生理食塩水のみを投与した。右肺はパラホルムアルデヒド固定後、肺胞 M $\phi$  による貪食の状態、炎症の程度ならびにパラフィンブロックからの戻しエポン再包埋電顕試料による観察を行った。左肺は凍結し、肺組織における CCL3mRNA 発現(RT-PCR 法)、タンパク発現(ELISA 法)および 8-OHdG 量(ELISA 法)にて測定した。

② *in vitro* 系における細胞毒性、発がんメカニズムの検索

1) ラットの肺内に気管よりチオグリコレートを噴霧投与して肺胞 M $\phi$  を誘導し、肺組織より初代培養 M $\phi$  を採取分離し、この培養液(10%FBS)に最終濃度が 10  $\mu\text{g/ml}$  となるように a10n $\text{TiO}_2$  および r15u $\text{TiO}_2$  を加え、24 時間後に培養上清を回収した。この培養上清によるヒト肺腺癌細胞(A549)およびヒト肺線維芽細胞(CCD34)の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。今年度では M $\phi$  の viability をよりよく保つために以前に腹膜中皮細胞の培養に用いた培養液(NCT-16=50:50 DMEM/Defined Keratinocyte-SFM (10744-019) +10% FBS)を用いた。

2) 上記の anTiO<sub>2</sub> および ruTiO<sub>2</sub> を貪食した Mφ と培養上清における CCL3 の mRNA を RT-PCR 法、とタンパク量を ELISA 法にて測定した。

3) UVB による光触媒活性による直接の毒性発現の解析のために、UVB 照射下で A549 に対する細胞毒性を比較検討した。UVB の照射には Transilluminator (Vilber Lourmat, France) を用い、照射波長は 312nm (270nm~330nm)、照射エネルギーは 1000 mW/cm<sup>2</sup> とし、培養細胞が死滅しない UVB 照射時間を設定して、最終的には 2 分としてルチル型とアナターゼ型の細胞毒性の発現と程度を比較した。

#### (倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科 動物運営委員会の承認を経て行った (H22-M19)。

#### C. 研究結果

##### ① 14 日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索

剖検時の所見では両投与群の肺には肉眼的差異はなかった。病理組織学的検査が進行中である。

##### ② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索

1) ヒト肺がん細胞およびヒト肺線維芽細胞増殖促進作用 (肺胞上皮および間質に対する毒性と増殖作用の観察):  
ラットの肺から採取した初代培養 Mφ の培養皿中に a10nTiO<sub>2</sub> (アナターゼ型、平均一次粒子径 6nm) または r15nTiO<sub>2</sub> (ルチル型、平均一次粒子径 15nm) を加えて Mφ に貪食させ、そ

の培養上清を取り出して肺がん細胞 (A549) とヒト肺線維芽細胞 (CCD34) に対する毒性と細胞増殖促進作用を検討した。その結果、ルチル型は A549 細胞増殖を弱く増加させたが、アナターゼ型には両作用は観察されなかった。

#### D. 考察

我々の開発したナノ粒子吸入曝露短・中期毒性・発がん性リスク評価法、① 14 日間投与による肺毒性・肺発がん機序の検索および、② *in vitro* 発がん・毒性比較とそのメカニズムの検索において、すでにラットにおいて肺発がん性の明らかになっている (WHO/IARC Group 2B) ruTiO<sub>2</sub> (無コーティング) について Mφ の分泌する CCL3 を介するが発がん促進作用を見出した (Xu et al., *Carcinogenesis*, 31, 927, 2010)。また、ruTiO<sub>2</sub> を障害された皮膚に塗布して場合には障害作用は見られなかった (Xu et al., *Food Chem Toxicol.* 49:1298-302, 2011 および Sagawa et al., *J Toxicol Sciences*, 37, 317, 2012)。

以上の知見に基づき、光触媒活性がより顕著と考えられ、生物毒性が強力である可能性が危惧されているより小さいサイズのルチル型とアナターゼ型 nTiO<sub>2</sub> について、①と②の方法にて毒性と発がんに関与する細胞増殖誘発作用について r15nTiO<sub>2</sub> との比較対照実験を実施した。

本研究では、① 2 週投与実験では生体内では UV 励起がおこるとは考えられず、粒径を小さくしても毒性にはアナターゼとルチルの差異はなさそうである。病理組織学的解析とサイトカインアレイ解析での確認が必要である。さらに② UVB 照射下においては、肺がん A549 細胞に対する毒作用はアナターゼとルチル型に差異はなはなかったため、新