

平成27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:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

研究分担者 津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

研究協力者 徐 結苟 名古屋市立大学大学特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学大学特任教授

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古屋市立大学大学院医学研究科院生
飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 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

カーボンナノチューブ(CNT)等個体ナノマテリアルは急速な研究開発が進められる一方、健康への影響、とくに呼吸器における中・長期毒性と発癌性評価は遅れている。このためには吸入暴露試験が必要であり、実施には高額な専用吸入施設と稼働コストが必要であるためである。さらにこれらの炭素粒子は生体内で代謝分解されず、細胞・組織に長く沈着するために、従来の化学物質のADMEの概念では障害・発がん作用の機序の評価はできない。本研究では、MWCNTの毒性、発がん性について、生体・細胞への沈着とMの活性化に着目して、長期吸入暴露試験に代替可能な一連の試験系として、①ラット肺マクロファージ(M)を用いた短期*in vitro*試験法、②吸入暴露に替わる全経過2週のラット肺内噴霧投与(TIPS)による*in vivo*毒性の観察と回復の解析法、②より派生した③2~8週投与後に長期(2年)観察する発がん性試験による①②③における病変発がん性との関連の検証試験について検討した。その結果、①および②法における中皮の増殖所見および②では凝集体が針状のMWCNT-Lと綿菓子状凝集体のMWCNT-Sの胸膜中皮に対する持続的障害作用・増殖刺激作用が示された。③において両者の8週投与後2年の観察実験が終了し、病理組織学的解析を実施中である。

A. 研究目的

カーボンナノチューブ等の急速な研究開発が進む一方、その健康影響、とくに呼吸器における中・長期毒性および発癌性の評価は必須であり、それには吸入暴露が望まれている。しかし、吸入暴露試験の実施には高額な専用

吸入暴露施設が必要であるために実施は困難である。日本においてはバイオアッセイ研究センターのみで実施が可能であり、現状では世界でただ1種MWCNT-7(M-H社)について実施されているのみである。従って、世界では次々に生産される多種のナノカーบอนはリス

ク評価がなされないまま市場に導入されつつある。他方、試験管内試験や短期の試験で得られるデータは極めて限定的である。そこで、吸入暴露に代替できる信頼性の高いリスク評価法の開発が不可欠である。本研究では、サイズと形状の異なるMWCNT種を対象に、マクロファージ(M_φ)を介した傷害作用を評価する*in vitro* 短期試験法、ラットを用いた経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を用いて、中期・長期2種の*in vivo* 試験系を開発し、実際のリスク評価に資する機序に基づく信頼性の高い評価法の開発を目指した。

B. 研究方法

① 肺胞M_φ の*in vitro* における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) 10週齢の雌F344ラットにチオグリコレートをTIPS投与して肺胞内にM_φを誘導した後に肺を取り出し、メッシュ濾過にてM_φを採取(現状で採取細胞の95%)する。一定量のM_φ(10⁶個)をRPMI 1640(10%FBS)培地に移し、0.1% Tween含有生理食塩水に懸濁した各種のMWCNT(500μg/ml)を培地に加えて24時間培養した。この上清を採取して、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2(中皮腫細胞上皮型/肉腫型)、CCD34(肺線維芽細胞)、A549(肺癌)、SNU-475(肝癌)、Caki-1(腎癌)、A2780(卵巣癌)、MCF-7/T47D(乳癌)等の培地に加えて12時間培養し、これらの細胞に対する増殖活性を観察した。またCNTを貪食した培養M_φが分泌する主として炎症性サイトカインと増殖因子等について肺組織の免疫染色、ELISAおよび蛋白アレイ解析を実施した。

② 回復試験における炎症・増殖性病変の解析

1) 被検物質のMWCNT-L(A社)(直径=150nm、針状凝集体)、MWCNT-7(直径=70-130nm針状凝集体)、Crocitolite(UICC gradeアスベスト、直径=0.01-1.5μm、針状凝集体)を250および500μg/mlを、肺毒性は僅少でMWCNTの分散性能の高いことを確認している生食中に

0.5%pluronic 68コポリマー分散剤(PF68)に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与(合計1mg/ラット)を行い、投与終了後1日と、12週に屠殺して病変発生(2週目)とその回復の程度(14週目)を検討した(津田、酒々井)。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡便検索法

MWCNT-N(N社)(針状凝集体、長さ3.5μm、直径30nm)を250および500μg/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)投与終了後無処置で2年間観察し、発がん性について検討した。またMWCNT-Lについて8週投与後2年観察する試験結果は解析中である。

(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、各班員は動物実験及び所属施設において、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)を遵守するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる実験は実施しなかった。

C. 研究結果

① 肺胞M_φ の*in vitro* における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) ラットのチオグリコレート誘導M_φにMWCNT-7、MWCNT-N及びCrocitoliteを貪食させて得られた培養上清は、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2(中皮腫細胞上皮型/肉腫型)とA549(肺癌)に対して増殖活性(対照の1.5~2倍)を示したが、CCD34(肺線維芽細胞)、SNU-475(肝癌)、Caki-1(腎癌)、A2780(卵巣癌)、MCF-7/T47D(乳癌)細胞に対する増殖活性は無かった。またCNTを貪食した培

養M の分泌する炎症性サイトカイン、増殖因子等について遺伝子・蛋白発現のアレイ解析を行い、関与する責任サイトカイン遺伝子/蛋白の同定では、IL2、IL18、CCL2、CCL3、GRP/KC等が増加していた(対照の2~5倍)(津田・酒々井)。

② 短期投与試験および短期投与-回復試験による炎症・増殖性病変の解析

1) MWCNT-L, MWCNT-7 (WHO/IARC Group 2B) および crocidolite (UICC grade) 投与による a) 胸膜の肥厚、b) 中皮の増殖、および c) 胸腔洗浄液の細胞とサイトカイン組成変化の程度とそれらの回復 (Reversibility) の状態について、投与終了1日と12週後における回復の程度について検討した。a) 臓側(肺側)と壁側(胸腔側)胸膜の線維性肥厚は、いずれの検体群でも PF68 群より投与群に有意に増加した ($P < 0.001$)。検体群間では壁側胸膜肥厚は12週において MWCNT-7 群が他の検体よりも最も高値であった ($P < 0.01$)。b) 臓側(肺側)と壁側(胸腔側)胸膜中皮細胞の PCNA ラベル率は、すべての投与群において1日と12週とも溶媒群の約4~6倍に増加し ($P < 0.001$)、それらの値は12週まで減少なく維持された。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数 (M、好中球、リンパ球等の合計) はすべての検体で12週において1週の70~60%に減少したが、MWCNT-7では他の約1.5~2倍の高値(有意)であった。胸腔洗浄液中の主としてM中の投与検体(繊維)の数(/100,000個細胞)は、12週で明らかな減少を示したが、MWCNT-7が最も高値を維持した。胸腔洗浄液のサイトカインアレイ解析ではIL-2 IL-18が検体間ではMWCNT-7がより高値でしかも持続した。肺の組織変化ではいずれの検体も12週では異物肉芽中に被包化されて観察された。1日群では一部で特に

crocidolite で肺胞上皮の過形成増殖を見たが、12週では全く消退していた(津田)。

2) MWCNT-L を24週間に1.625 mg/ラットに投与した実験では、肺胞の肉芽形成とMを主とする炎症細胞浸潤はMWCNT-Sにより著名であった。臓側(肺側)胸膜ではPCNAラベルでみる中皮の増殖像はMWCNT-7と同程度であった(津田)。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡易検索法

MWCNT-N を250および500 $\mu\text{g/ml}$ を0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)投与終了後無処置で2年間観察した実験では、心嚢、胸膜の悪性中皮腫(6/41, 14.6%)と肺胞上皮腺腫(14/41, 34.4%)と腺がん(3例)(計12/41匹)両者合計で20/41, 48.8%(すべて有意差)に発生した。発がんまでの平均経過は94週と極めて長期間を要する事が分かった。なお、肺組織中のMWCNT-Nは、篩板通過分画では $2.6 \pm 0.8 \mu\text{m}$ 、残存分画では $3.1 \pm 0.9 \mu\text{m}$ 以上であった。悪性中皮腫の発生は65週以後であり、発がんには長期を要することがわかった(酒々井、津田)。さらに、MWCNT-Lについての同様の試験は現在病理標本作中で、発がん性については組織票本を解析中である。

D. 考察

① における肺胞Mの*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析において、MWCNTをMに貪食させて得られた培養液中には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を示す因子が存在することが示され、かつ他の臓器由来の細胞にはその作用がないことになる。すなわち発がん性があれば標的細胞は肺と中皮ということ示唆する。さらにその因子にはIL2、

IL18、CCL2、CCL3等のサイトカイン群が関与することが明らかとなった。今後これらの暴露、障害マーカーとしての有用性について検討する予定である。

② TIPS 法による短期投与（2～4週）による炎症・増殖性病変の *in vivo*-回復状態の解析では、胸膜の肥厚、中皮の増殖は投与中止後でも半年近くでも持続することが明らかとなった。これはMWCNTのような固形物質は体内で代謝分解されることなく沈着局所において炎症反応を惹起して慢性的な組織・細胞損傷が長期間持続することによる。また、胸腔洗浄液の炎症細胞とサイトカインにも同様に持続した。これらのことは慢性毒性・発がん性併合試験を実施する場合に、従来の化学物質の評価のような長期投与は不必要で短期間投与のみでも結果が得られることを示し、今回報告するMWCNT-Nの発がん性結果と一致すると考える。また胸腔洗浄液の細胞とサイトカインに組成およびMWCNTの肺からの移動の評価等における有用性が明らかとなり、実際の短期代替評価法において極めて有用な成果である。

一方、MWCNTには様々なサイズ、形態があってそれらは製造会社によって様々である。MWCNT-L（針状の凝集体）について、4週間または24週間投与して、比較検討したところ、MWCNT-Nと同様形態のMWCNT-Lは胸膜に対してよく似た障害性を示すことがわかった。さらに、この実験における回復観察では、肺と胸膜中皮の障害作用は投与中止後も長く持続することは、発がん性を考慮する上で重要である。MWCNT-Lの短期投与（8週）後2年間無処置観察結果について解析中である（津田）。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡便検索法においては、TIPS法による短期投与後に2年間観察するモデルにて

MWCNT-Nの肺と胸膜中皮における発がん性が明らかとなった。このことはこのモデルでは検体の短期間の投与後放置観察することで発がん評価が可能であることが示されたことになる。この方法について多種のMWCNTについての試験を行い、モデルのvalidationを行うことが必要である。その際に、今回の実験では発がんは64週以後に見られ、担がん動物の平均発生週は64週であり、さらに最終発生頻度がかかなり高い（48%）にも関わらず95週であることは、今後試験法の短縮を試みる上で注意すべき知見と考える。（酒々井、津田）。

E．結論

1) *in vitro* において、肺胞MにMWCNTを貪食させると、その培養上清には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖因子が含まれる。同様な細胞増殖作用は、MWCNTを投与したラットの胸腔洗浄液でも観察された。この*in vitro* 試験系はMWCNTによる細胞増殖因子の産生の短期検索法として有用となる。

2) MWCNTの組織・細胞障害、増殖関連因子として主としてMを介するCCL3、IL-2、IP10、IL-18、VEGF等の関与が示唆される。

3) ラットを用いた短期回復試験、中期投与試験、および短期投与・長期観察試験の結果より、TIPS法は全身暴露法に代替でき得る。この方法における胸腔洗浄液の解析は胸腔内炎症の解析に有用な手段である。またMWCNTは肺胞以外に気管支上皮の線毛運動に対して強い阻害作用を示し、顕著な粘膜上皮の損傷を起こす。

4) MWCNTのサイズと形状（直径、針状、綿状）の差異は肺と胸膜中皮に対する炎症と障害作用において異なる可能性がある。

・研究発表

1. 論文発表

1. Suzui M, Futakuchi M., Fukamachi K., Numano T., Mohamed Abd Elgied, Takahashi S., Ohnishi M., Omori, T., Tsuruoka S., Hirose A., Kanno J., Sakamoto Y., Alexander D.B., Alexander W.T., Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Science*, 2016 (in press)
2. Xu J., Alexander D.B., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Nakae D., Hirose A., Kanno J., and Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Science.*, 106(7): 825-832, 2015.
3. Xu J, Alexander D.B., Futakuchi M., Numano T., Fukamachi K., Suzui M., Omori T., Kanno J., Hirose A., Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Science*, 105 (7): 763-769, 2014.

2. 学会発表

国内学会

1. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第31回日本毒性病理学会総会 東京 1月29日-30日
2. 津田洋幸、徐結旬、Alexander D.B., 酒々井

真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチューブの発がん標的性組織; 第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日。

3. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄 (2016) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響; 第32回日本毒性病理学会総会 高松 1月28日-29日

国際学会

1. 津田洋幸 (2015) Mechanisms of nanotoxicology: The 7th International Congress of Asian Society of Toxicology 韓国 (済州) 6月23-26日

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

無し

2. 実用新案登録

無し

3. その他

特に無し。