

平成29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:カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リスクの
新規高効率評価手法の開発

分担研究課題名:カーボンナノチューブ等の全身臓器における毒性並びに発癌リスクの研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

研究協力者: 徐 結苟 名古屋市立大学特任教授・安徽省医科大学免疫学教室教授

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

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

Mohamed Ahmed Mahmoud Abdelgied 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程

Ahmed Maher Mahmoud Elgazzar 名古屋市立大学大学院医学研究科研究員

研究要旨

カーボンナノチューブ(CNT)は生体内で分解されないため肺・胸膜等に沈着して異物炎症を誘発する。このような繊維の有害作用/発がん性評価には長期吸入曝露試験が要求されているが、専用設備と高額な稼働費のためにさらなる実施は困難である。現状では我国で世界に先駆けてラットにおいて気管内投与法にて多層CNT(MWCNT)MWCNT-Nに肺と胸膜中皮、および長期吸入曝露試験にてMWCNT-7に肺に発がん性が報告されたのみである。本研究では、ラットを用いて短期気管内投与法を開発して長期吸入曝露試験に代替し得る低コスト、簡便なMWCNTの慢性毒性、発がん性の評価法の開発を目指した。本研究では、物性の異なる2種のMWCNTの発がん性と2層CNT(DWCNT)について障害作用について検討を加えた。

①MWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)では、①において肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種数ではBの方がやや顕著であった。②の長期試験では肺胞上皮における腺腫と腺がんの合計発生がA、Bの両投与群に、胸膜悪性中皮腫はB群に1例見られ、合計の腫瘍発生頻度はB群により高い有意差が認められた(論文投稿中)。さらに、MWCNT-Bよりさらに細くて柔らかい2層壁のDWCNT(直径2nm)について①同様の解析を実施し、えられたデータでは肺組織、臓側胸膜、BALF、PLFの炎症関連あるいは発がん性と関連する諸因子の発現は、MWCNT-7と比べて有意に軽度であった(解析中)。

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のひとつであるMWCNT-7(H社製)は2年間吸入曝露試験によって肺発がん性を示すことが明らかにされたが、MWCNTは製造事業者によって形状・物性が異なるた

め、この結果を他の多くのMWCNTに適用できない。検討した範囲ではMWCNTは生体内で難分解性であり、投与されたMWCNTは肺・胸膜等に沈着して持続性異物炎症を誘発する。申請者らは、MWCNTの経気管肺内噴霧投与(TIPS)による安価な有害・発が

ん作用評価法 (TIPS法) を開発し、それによって肺・胸腔の顕著な炎症と胸膜中皮増殖、活性化マクロファージ (M ϕ) の分泌サイトカイン種の肺胞上皮と胸膜中皮増殖への関与 (Cancer Sci, 2010) を見出した。これに基づき、MWCNT-7とは別社の製品のMWCNT-N (N社製) をTIPS法によって検討したところ短期に胸膜中皮の持続増殖が起こり、2年後に悪性中皮腫の発生することを見出した (Cancer Sci, 2016)。この知見に基づき、本研究では多種のMWCNTの壁の層数・直径・鉄含量と投与MWCNT沈着と気管・肺・胸膜への有害性と発がん性に与える影響を明らかにしつつ、TIPS法を用いた①②の方法によってシステムの検証を行いつつ、被検体の障害製と発がん性の検索を行っている。

① 検体のMWCNTを2週間TIPS投与後に無処置観察1~4週間を経たラットの肺胞上皮と胸膜中皮の増殖活性とその因子を把握する。さらに肺におけるDNA付加体量を測定して発癌機序を追究する。検体は生食 (抗凝集剤0.5%PF68コポリマー添加、超音波懸濁) にて懸濁して投与した。

② ラットへの2週間TIPS投与後無処置観察試験にて、2年までの経時的観察を行い、13週、52週での中間屠殺によって発がんに関与する早期病変を把握して可能な限り試験期間の短縮を図る。TIPS法は、設備と費用の面から事実上実施困難な吸入曝露試験に代替でき得る可能性があり、8th International Symposium on nanotechnology Occupational and Environmental Health (May 29-June 1, 2017, Denmark) にて大きな注目を得た。

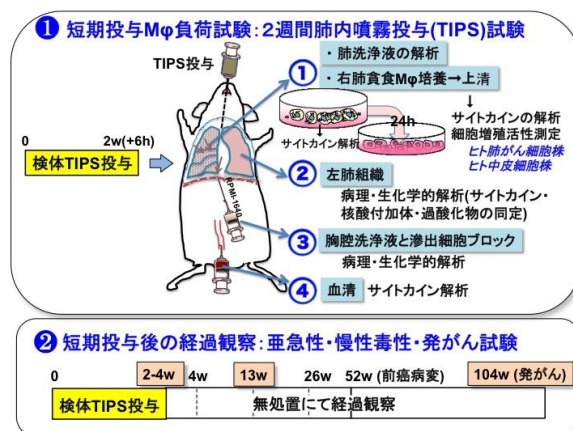
B. 研究方法

検体は、MWCNT-A (針状、直径150nm、210-215層) とMWCNT-B (綿菓子状、直径15nm、15-18層) およびDWCNT (直径2nm) を用いた。

① のプロトコルにてMWCNT-A/-Bは総投与量が0.5mgおよび1.0mg/ラットとなるように8週間に8回TIPS (1回/週) 投与し、②の投与開始より104週後に屠殺し、肺・胸膜等の慢性炎症と腫瘍発生について解析した。

DWCNTは①と同様の2週間に8回投与としたプロトコルにて、投与用量は0.25および0.5mg/ラットとなるように投与し、3週 (投与終了後1週) および投与開始8週 (投与終了後6週) に屠殺した各個体の肺組織の病理と生化学的材料、気管肺洗浄液 (BALF)、胸腔洗浄液 (PLF) 上清と細胞ペ

レットにおける炎症性マーカーについて解析した。



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、「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、名古屋市立大学動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施した。

C. 研究結果

MWCNT-A とMWCNT-Bは、①においてTIPS投与後に肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種ではBの方がやや顕著であった。②のTIPS投与後の長期試験ではMWCNT-A とMWCNT-Bにおいて1.0mg と0.5mg/ラットの頻度の合計において、肺胞上皮における腺腫と腺がんの合計発生が、溶媒対照群と比較して有意の増加、胸膜悪性中皮腫はB群に1例見られ、腺腫+腺がん+悪性中皮腫3種合計の腫瘍発生頻度には有意差が認められた。crocidolite 群では有意差はなかった。

(論文執筆中)

DWCNTにおいて肺胞内のM ϕ 数 (/cm²)、PCNA値、8-OHdG、MDA (Malondialdehyde: oxidative stress marker)、炎症性サイトカイン (CCL種) は陽性対照MWCNT-7 (0.25mg、0.5mg) より低値であった。現在、胸膜中皮の増殖、胸腔洗浄液 (PLF)、気管肺洗浄液 (BALF) について解析である。

D. 考察

1. MWCNT-A (針状、直径150nm、210-215層) とMWCNT-B (綿菓子状、直径15nm、15-18層) およ

びDWCNT(直径2nm)についてTIPS法にて投与して、MWCNT-AとMWCNT-Bにおいて、投与開始後104週にて有意の肺腫瘍の発生が確認された。

MWCNT-AとMWCNT-Bに発がん性に大きな差異はなかった。DWCNTにおいて、短期屠殺群では起炎症性変化は陽性対照MWCNT-7(0.25mg、0.5mg)より低値であったことから、肺障害性は弱い可能性が考えられた。現在、胸膜中皮の増殖、胸腔洗浄液(PLF)、気管肺洗浄液(BALF)について解析である。

2.TIPS投与では一定量の検体を抹消肺胞腔まで確実に送達できる。実際に、気管内投与の優位性について、吸入曝露法と較べて、1)投与用量が明確なので、リスク評価に適している。2)発がん性試験における検出感度が高い3)設備費用が格段に安い、ということは明言されている(Mohr U, Heinrich Ernst, Markus Roller, Friedrich Pott, Exp Toxicol Pathol, 2006)。さらにまた実際の暴露経路を考えるとラット・マウスではMWCNT等の固形物は複雑な構造の鼻腔を通過するときにトラップされるので、必ずしも人に近似するルートではない。ヒトはげっ歯類と異なって口から直接肺に吸気が入る場合が多々あるので(タバコ等)、気管内投与が人工的であるとは言い切れない。その意味で、TIPS投与にはリスク評価を行う上で妥当性がある。

3.TIPS投与法は従来の多くの腹腔内投与法に較べてヒトのリスク評価への外挿において合理性がある。

4.胸腔洗浄液の解析は線維状物質に特異的とも言える胸膜病変について多くの有用な情報が得られる。

5.MWCNTに対するMの動態に注目した解析法では、肺胞上皮細胞と胸膜中皮の増殖の機序の解析として有効であり、早期病変の検出につながると考える。WHO/IARC発がん性モノグラフでは、発がん機序が動物とヒトで共通して作動するという知見によって、今までに62物質が再評価され、そのうち5物質はG2A(おそらくヒト発がん物質)からG1(ヒト発がん物質)評価になった。こうした意味でも本法によるM活性の解析を重視した発がん機序解析手法は有用である。

6.厚生労働省の有害物質リスク対策における「職場で使用される化学物質の発がん性評価の加速化」作業では「前がん病変を指標とした中期

発がん性試験」が代替法として採用されている。本法における経時観察によって前がん病変を把握できれば、中期検索法として評価アルゴリズムに組み込むことによって、発がん性リスク評価の高速化に大いに貢献できる。

7.酸化ストレス下で生成・増加する活性カルボニル化合物(RCs)は、アルデヒド基やケトン基を有する特徴的な化学構造から、DNAと容易に付加反応し、DNAを傷害することで発癌に関与すると考えられている。RCsおよびRCs-DNA付加体の質的・量的変化(MWCNT曝露群>対照群)を解析することで、発癌機序の一端が明らかになる。

E. 結論

1.H28度の申請の①のラットへ短期TIPS投与における肺、気管、胸腔、胸腔洗浄液等の炎症/毒性の増殖病変の把握が可能である。②の2週TIPS投与-2年無処置観察モデルは、2年吸入曝露法に比べ圧倒的に低コストであり、MWCNTの有害・発がんリスク評価の加速化が可能となる。事実、発がん性において、MWCNT-7、MWCNT-Nに新たにMWCNT-AとMWCNT-B加えることになった。

F. 健康危険情報 なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 in press.
2. Magaki M, Ishii H, Yamasaki A, Kitai Y, Kametani S, Nakai R, Alexander DB, Tsuda H, Ohnishi T A high-fat diet increases the incidence of mammary cancer in c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats, *J Toxicol Pathol* 2017; 30: 145-152
3. Alexander D., Iigo M., Abdelgied M., Ozeki K., Tanida S., Joh T., Takahashi S., Tsuda

H. Bovine lactoferrin and Crohn's disease: a case study, *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1): 133-141, 2017.

male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄

2. 学会発表

1. 津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬昭彦、菅野純 気管内噴霧投与法による各種の MWCNT の毒性と発がん性試験結果の比較, 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜
2. Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第44回日本毒性学会学術年会、7月10-12日、横浜
3. Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第34回日本毒性病理学会総会、1月25-26日、沖縄
4. Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし