

平成30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

Dina Mohammed Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程

#### 研究要旨

CNTは製品によって形状・物性が異なるためにこの製品についての安全性の評価が必要である。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現状では上市された全ての製品について試験を実施することは不可能である。我々はそのMWCNT-7の発がん性が発表される以前に、ラットにおける気管内投与法を用いて多層CNT (MWCNT) MWCNT-Nに肺と胸膜中皮に発がん性のあることを報告した。本研究では、ラット経気管肺内噴霧投与法 (Trans-tracheal Intra-pulmonary Spraying・TIPS) 法を開発して長期吸入曝露試験に代替し得る低コストなMWCNTの毒性・発がん性の評価法の開発を実施した。本研究では、壁の暑さの異なる2種のMWCNTおよびアスベスト Crocidolite (CRO) について、TIPS法投与における肺と胸膜中皮への障害作用と発がん性について検証し、TIPS法の有用性の検討を行った。

① 壁層の異なる MWCNT-A (針状、直径 150nm、210-215 層) と MWCNT-B (綿菓子状、直径 15nm、15-18 層) では、肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種数とその程度は B の方がやや顕著であった。②の長期試験では MWCNT-A と MWCNT-B では肺胞上皮における肺胞上皮過形成、腺腫、腺がんの合計発生が MWCNT-A は 14/40 ( $p < 0.05$ )、MWCNT-B で 12/40 ( $p < 0.01$ )、CRO (7/20) ( $p < 0.05$ ) であった。また、MWCNT-7 では 18/19 (95%) に悪性中皮腫が発生しており (肺腫瘍は 0/19)、日本バイオアッセイ研究センターで実施された吸入曝露試験の結果 (肺腫瘍のみ発生) とは異なった結果であった (論文投稿中)。以上から、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、炎症の程度、発がんに関与する DNA 障害性代謝物のかんよが示された。②の2週 TIPS 投与-2年無処置観察モデルは、さらに MWCNT-7 では新たに悪性中皮腫の発生すること (吸入曝露では肺腫瘍のみ) が発生することを明らかにした。吸入曝露法に比べ急性毒性、亜急性毒性および慢性毒性 (発がん性) 評価において圧倒的に低コストであり、リスク評価の加速化に十分に貢献できる。

## 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はラット・マウスへの腹腔内投与によって高率に腹腔悪性中皮腫を発生させることから、WHO国際癌研究機構(WHO/IARC)は「ヒト発がんの可能性のある物質(Group 2B)」と評価した。またMWCNT-7は日本バイオアッセイ研究センターにおける2年間吸入暴露試験では肺発がん性(悪性中皮腫は発生しない)を示すことが判ってきた。しかし、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。すなわち、新しく作られる個々のMWCNTについてリスク評価に資する吸入暴露発がん試験を実施する必要がある。しかし、その稼働費用・設備の面でほとんど実施は困難であり、MWCNT-7以外のMWCNTについて以後長期吸入暴露試験は実施されていない。本研究では、それに代替し得る簡便かつ低コストな気管内投与方法によってMWCNTの慢性毒性、発がん性の評価法を開発し、障害・発がん機序について明らかにすることを目的として以下の研究を実施している。

明らかにした範囲では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 $\phi$ )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-N(N社製、MWCNT-7とは別社の製品)のTIPS投与後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, Chem Res Toxicol, 2018)。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、TIPS法を用いた①②の方法によってがん性の検索を行いつつシステムの検証を行ってきた(付図参照)。

① 検体のMWCNT(MWCNT-A、MWCNT-BおよびMWCNT-7)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。一部の実験

では検体はTaquann法にてエアロゾル分散したものを生食(抗凝集剤0.5% PF68 コポリマー添加)にて懸濁投与した。

② ラットへの2週間TIPS投与後無処置観察実験にて、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暴露試験に代替でき得る可能性があり、8<sup>th</sup> 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)、MWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)、MWCNT-7(針状、直径100nm、40層)およびアスベストCrocidolite(UICC grade、針状、長さ24.4 $\pm$ 0.5 $\mu$ m)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、MWCNT-7は1.5mg/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、moribundの個体は途中屠殺を行った。

① 2週間TIPS投与ラット肺胞と胸膜中皮由来の細胞等に対する増殖活性因子の把握：  
物性と層数の異なる上記の15-150層MWCNT(発がん性未知のMWCNT-AとMWCNT-Bおよび暴露吸入試験で肺発がん性の報告されたMWCNT-7及びCrocidolite)をTaquann法にてエアロゾル分散後に加温tert-butylalcohol(室温で凍結する)に懸濁させて、投与直前に凍結乾燥して凝集体形成を最小限にして0.1%Tween含有PF68コポリマー溶液に懸濁した。これを0.25mg~1.5mg/ラットになるように2週間位8回TIPS法投与した。肺と縦隔リンパ節を摘出後、病理組織標本にて炎症像の観察を光顕、走査及び透過電顕観察を行い、凍結肺は炎症サイトカイン、ケモカイン種についてELISA計測した。

さらに、炎症と発がん機序の解析として、アルデヒドやケトンなどのタンパクアレイ解析や活性カルボニル化合物(RCs)の同定とRCs-DNA付加体についてLC/ESI-MS/MS(SRM)による網羅的解析を実施した。候補物質について不死化M $\phi$ を用いて

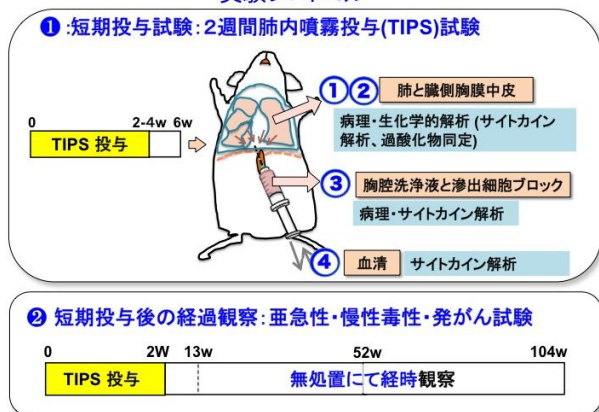
サイトカインの産生の把握を行っている。また、肺気管支洗浄液についても4°C、1000 rpm、5分間遠心して上清を除き、肺胞マクロファージを得て肺気管支の炎症と障害について解析した。

検体の凝集体成分を可能な限り減少させるために独自に開発した Taquann 法によって、気管内投与に適した検体を随時班員に供給している。Benzo(ghi)perylene 吸着法による投与前及び投与肺の MWCNT の定量測定(日本バイオアッセイ研究センター・大西氏法)を行い沈着量と所見との相関を明らかにする。

## ② 2週間TIPS投与後の長期経時観察：

① における検体投与ラットについて、投与終了後1週と52週での中間屠殺および104週における最終屠殺による慢性炎症の程度と発がん性の評価を行った。各屠殺群におけるMWCNTの量は、MWCNT計測のためのHPLC、透過型・走査型電子顕微鏡は主任研究者の施設の共同研究施設に設置されている。胸腔洗浄液の遠心沈渣は病理標本にして、炎症細胞の分画、偏光顕微鏡によるMWCNT数の算定を行った。胸膜等の慢性炎症と腫瘍発生について解析した。

### 実験プロトコル



### 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。crocitolite 群では有意差はなかった(論文執筆中)。さらに、MWCNT-7 では②の TIPS 投与後の長期試験において、高頻度(95%)に胸膜中皮腫が早期に発生したが(平均生存週齢 78.6 週)、肺腫瘍は 1 例のみ(溶媒群と同じ)であった。Crocitolite 群には悪性中皮腫の発生はなかった(論文投稿中)。

## D. 考察

1) MWCNT-A と MWCNT-B では肺腫瘍の発生は MWCNT-B におおく、短期試験における炎症の程度の強さと相関する傾向が見られた。

2) MWCNT-7 では 95%の動物に悪性中皮腫の発生を見た。この結果は、日本バイオアッセイ研究センターで実施された吸入暴露の結果(肺腫瘍のみ)とは異なっており、曝露経路によって標的臓器に差異があることが明らかとなった。その機序については悪性中皮腫が発生して早期に死亡してしまったために肺腫瘍の発生に至らなかったが一因と考えられる。また CRO はこれらの MWCNT と比べて、肺と胸膜中皮に対する発がん性は検索した MWCNT より遥かに弱い。

3) TIPS投与では一定量の検体を末梢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)。さらにまた実際の曝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。

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

5) 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。

6) 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、62物質のうち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)への再評価になった。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。

7) 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スキー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。

## E. 結論

提案の主題である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投与後2年無処置観察モデルは、吸入曝露法に比べ急性毒性、亜急性毒性および慢性毒性(発がん性)評価においての圧倒的に低コストであり、リスク評価の加速化に充分貢献できる。事実、発がん性において、新たにMWCNT-AとMWCNT-Bの肺発がん性およびMWCNT-7の胸膜中皮発がん性を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. Liao D., Wang Q., Alexander D., Abdelgied M., Elgazzar AM., Futakuchi M., Suzui, M., Kannno J., Hirose A., Xu J., Tsuda H.

Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes, Chem. Res. Toxicol., 31(10):1025-1031. 2018.

2. Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, Arch. Toxicol., 93: 43-59, 2019
3. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats, Cancer Sci., 109(7):2164-2177. 2018
4. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, Arch. Toxicol., 93(4): 909-920, 2019

### 2. 学会発表

1. 津田 洋幸, 徐 結 苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野 琢 旬, 広瀬 昭 彦, 菅野 純 ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪 2018年7月

- |   |   |
|---|---|
| <p>2. 津田洋幸,徐結苟, Alexander WT.,<br/>Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A.,<br/>沼野琢旬,広瀬昭彦,菅野純ナノマテリアル<br/>特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中<br/>皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与<br/>(TIPS)試験法の開発 第45回日本毒性学<br/>会学術年会 大阪 2018年7月</p>   | <p>toxicology (EUROTOX2018) Brussels,<br/>Belgium, Sept. 2018</p>                 |
| <p>3. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D.,<br/>Alexander W., Numano T., Iigo M.,<br/>Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H.,<br/>Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J.,<br/>Takahashi S., Tsuda H. Potassium<br/>octatitanate fibers are possibly<br/>carcinogenic in male Fisher 344 rats.<br/>54<sup>th</sup> congress of the European societies of</p> | <p>H. 知的財産権の出願・登録状況<br/>1. 特許取得<br/>なし<br/>2. 実用新案登録<br/>なし<br/>3. その他<br/>なし</p> |