

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

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(H28-化学-一般-004)

分担研究課題:動物実験 遺伝子蛋白解析

|       |      |   |
|-------|------|---|
| 研究分担者 | 菅野 純 | 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員<br>独立行政法人労働者健康安全機構<br>日本バイオアッセイ研究センター 所長 |
| 研究協力者 | 大西 誠 | 独立行政法人労働者健康安全機構<br>日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部分析室<br>技術専門役        |
| 研究協力者 | 高橋祐次 | 国立医薬品食品衛生研究所<br>安全性生物試験研究センター 毒性部 室長                        |

### 研究要旨

本研究班の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧(TIPS)投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。

TIPSは吸入曝露とは異なり、投与した殆どが肺に負荷されるため初期負荷量の把握は容易であるが、投与後は休薬して最長104週まで経時的な観察を行うため、肺及び胸腔内の病変と肺負荷量の関係を明らかにするためには、その減衰を調べる必要がある。H30年度の本分担研究では、DWCNTおよびMWCNTの肺負荷量の経時変化の解析である。研究分担者は、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとしてMWCNTを定量する方法(大西法)を開発している。MWCNTを対象として開発した方法であるが、昨年度、DWCNTへの適用条件を構築し、今年度、TIPS投与された肺検体の測定を実施した。測定試料は、研究代表者から送付されたTIPS投与されたラットから経時的に採材した肺試料を用いた。投与検体は何れもTaquann法処理を行っている。その結果、検体の濃度とマーカーのHPLC測定における面積値の相関係数は、DWCNT、MWCNTそれぞれ0.9949、0.9961と良好な直線性を示し、0.2~1.0 µg/mLの範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。肺負荷量測定の結果、DWCNT群のラット肺当りの肺負荷量は、低用量の投与2週後では64.4 µg/g、6週後では65.4 µg/g、中用量の投与2週後では137.0 µg/g、6週後では108.6 µg/g、高用量の投与2週後では248.8 µg/g、6週後では173.1 µg/gであった。MWCNT群のラット肺当りの肺負荷量は、投与2週後では284.8 µg/g、6週後では398.5 µg/gであった。非投与群および媒体対照群のラット肺には計測されなかった。マ

ーカー法はカーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して、グラファイト積層と同様の選択性のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いたMWCNTの極微量定量法である。本分担研究により、カーボンナノチューブ一般に適用できる可能性が見いだされた。

## A. 研究目的

本研究班の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧(TIPS)投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。

TIPSは吸入曝露とは異なり、投与した殆どが肺に負荷されるため初期負荷量の把握は容易であるが、投与後は休薬して最長104週まで経時的な観察を行うため、肺及び胸腔内の病変と肺負荷量の関係を明らかにするためには、その減衰を調べる必要がある。

低分子化合物の体内動態は、mass spectroscopyあるいはisotopeを用いて定量することが一般に行われている。カーボンナノチューブ(CNT)の体内動態の測定にもこれに準じた方法が適用され、isotopeとmass spectroscopyを使用する方法、Raman分光を使用する方法、組織を灰化して除去後更に高温でCNTをメタンとして定量する方法が報告されている。一方、研究分担者らはカーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して、グラファイト積層と同様の選択性のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いたMWCNTの極微量定量法を開発している(図1)。具体的には、マーカー分子としてBenzo[ghi]perylene (BgP)を用い、MWCNTと混合してBgPをMWCNTの表面に吸

着させ、過剰なBgPを洗浄除去、MWCNT表面からBgPを抽出しHPLCにて定量してMWCNTの質量に換算する。MWCNT(MWNT-7、原末およびTaquann法処理検体)に関しては既に技術を確立済みであるが、DWCNTについては未検討であるため、肺からの抽出方法、測定方法について検討を行い、分析を行った。

## B. 研究方法

### B-1 測定試料

測定試料は、研究代表者から送付されたTIPS投与されたラットから経時的に採材した肺試料を用いた。何れも、投与2週後、6週後のサンプルを使用した。投与された検体はTaquann法処理を行っている。

G1:非投与群

G2:媒体対照群(Saline + 0.5%PF68)

G3:DWCNT低用量群(125 µg/rat)

G4:DWCNT中用量群(250 µg/rat)

G5:DWCNT高用量群(500 µg/rat)

G6:MWCNT(500 µg/rat)

### B-2 DWCNTおよびMWNT-7のマーカー法による測定

#### (1) 装置、器具及び試薬

高速液体クロマトグラフ(HPLC、Acquity UPLC、ウォーターズ)

電子天秤(AE163、日本シベルワーグナー)

振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)

遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベッ

クマンコールター)  
超音波分散機(VP-30S、タイテック)

## (2) 試薬

アセトニトリル(HPLC用、富士フイルム和光純薬)  
メタノール(HPLC用、富士フイルム和光純薬)  
Benzo[ghi]perylene(BgP、試薬特級、富士フイルム和光純薬)  
TWEEN 80(富士フイルム和光純薬)

## (3) HPLC測定条件

HPLC：ウォータース Acquity UPLC  
カラム：Acquity BEH C18 (ウォータース)  
カラム粒径、長さ × 内径：1.7 μm、100 mm × 2.1 mm  
カラム温度：40  
検出器：蛍光検出器(励起波長：294 nm、蛍光波長：410 nm)  
試料注入量：5 μL  
移動相組成：アセトニトリル：メタノール：蒸留水 = 75：20：5  
移動相流量：0.5 mL/min

## (4) 肺溶解液の調製

あらかじめ80℃に加熱した超純水1400mLに100gのKOHを加えた。その溶液に1%SDS水溶液を200mL及び1%EDTA2Naを200mLを加えた。その後、アスコルビン酸40g添加し、超純水で2000mLにメスアップし、80℃で加熱することにより溶解状態とし、肺溶解液を調製した。

## (5) 検量線原液の調製

DWCNTまたはMWCNTを各約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、0.1% Tween水溶液(Tw-sol)を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰り返す。最後にTw-solで100 mLにメスアップした。その溶液を超音波分散機により1分間、超音波分散した。(以下用いる周波数と強度は20 kHz、

300 Wで共通、DWCNTまたはMWCNT各原液：50 μg/mL)

## (6) 検量線溶液 C5 の調製

(5)項で調製したDWCNTまたはMWCNTの各原液0.2 mLを15 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブに採取し、Tw-solにより10 mLにメスアップし、1分間超音波分散した。(検量線溶液C5：1 μg/mL)

## (7) 検量線溶液 (C1～C5)の調製

(6)調製した検量線溶液C5を採取し、2mL容の遠心分離用チューブに入れ、さらにTw-solをそれぞれの量を添加して検量線溶液(C1～C5)を作成した(表1)。

表1

| 試料名  | C5採取量 (mL) | Tw-sol添加量 (mL) | 濃度 (μg/mL) |
|------|------------|----------------|------------|
| 溶液C1 | 0.1        | 0.9            | 0.2        |
| 溶液C2 | 0.2        | 0.8            | 0.4        |
| 溶液C3 | 0.4        | 0.6            | 0.8        |
| 溶液C4 | 0.6        | 0.4            | 1.2        |
| 溶液C5 | 0.8        | 0.2            | 1.6        |

## (8) マーカー溶液の調製

200mL容のメスフラスコにBenzo[ghi]perylene(BgP)マーカー約1mgを秤量し、アセトニトリルを加え十分に溶解し、アセトニトリルでメスアップしてBgPマーカー原液(5.0 μg/mL)とした(冷暗所に保存)。その溶液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合攪拌した溶液2.5 mLをTw-sol 50 mLに加え混合攪拌し、マーカー溶液とした。

## (9) 肺試料からDWCNTおよびMWNT-7の抽出とサンプル調製

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に1か月以上

浸透した試料の肺を 50 mL の肺溶解液 (B-5-1) で 60 °C で 24 時間かけて溶解した。なお、操作開始前に気相部分は窒素ガスで置換した。溶解した肺溶液は 60 秒間超音波分散した。その溶液中の DWCNT または MWCNT の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し、60 秒間超音波分散した。

#### (10) 試料の前処理とHPLCによる測定

図 2 に DWCNT または MWCNT の前処理について示した。B-5-3 及び B-7 項で調製した各溶液 1 mL は 12000 rpm で 10 分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、TW-mixture を 1 mL 加え、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を除去し、それぞれに濃塩酸 0.2mL を加えタッチミキサーで 10 秒間攪拌し、12000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液を除去し濃硫酸 0.2mL を加え、残渣を分解し、タッチミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、12.4. 項で調製したマーカー溶液 1 mL をそれぞれに添加し、10 秒間超音波分散し、振とう機で 15 分間攪拌させた後、0.4 µm のフィルター (ワットマン : GE Healthcare UK Ltd) でろ過したフィルター上の DWCNT または MWCNT をポンチ (8 mm) でくり抜き、PP 試験管に入れ、アセトニトリル 1 mL を加え、タッチミキサーで 10 秒間攪拌・抽出し、その溶液を HPLC で測定した。

#### (11) 肺内の DWCNT または MWCNT の沈着量の計算方

DWCNT または MWCNT の検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の HPLC で測定した面積値を直線回帰式に代入し、DWCNT または MWCNT の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、DWCNT または MWCNT の肺個体当りの沈着量 (単位 : µg) と、それらの 2 匹当りの平均値を求めた。また、各肺の重量で除することにより g 当りの値 (単位 : µg/g) とそれらの平均値を求めた。

## C. 研究結果及び考察

### (1) 検量線

DWCNT および MWCNT の濃度とマーカーの HPLC 測定による面積値の相関係数は、DWCNT:0.9949、MWCNT : 0.9961 であり良好な直線性を示した。DWCNT および MWCNT は 0.2 ~ 1.0 µg/mL の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

### (2) ラット肺内の DWCNT 及び MWCNT の肺の負荷量

表 2 に、DWCNT 及び MWCNT を TIPS 投与したラット肺内の DWCNT 及び MWCNT の肺負荷量の結果を示した。

DWCNT 群 (G3, G4, G5) のラット肺当りの肺負荷量は、低用量の投与 2 週後では 64.4 µg/g (肺中含量 : 96.8 µg) 6 週後では 65.4 µg/g (肺中含量 : 96.3 µg) 中用量の投与 2 週後では 137.0 µg/g (肺中含量 : 207.0 µg) 6 週後では 108.6 µg/g (肺中含量 : 182.1 µg) 高用量の投与 2 週後では 248.8 µg/g (肺中含量 : 435.8 µg) 6 週後では 173.1 µg/g (肺中含量 : 358.2 µg) であった。

MWCNT 群 (G5) のラット肺当りの肺負荷量は、投与 2 週後では 284.8 µg/g (肺中含量 : 470.1 µg) 6 週後では 398.5 µg/g (肺中含量 : 254.2 µg) であった。

非投与群 (G1) および媒体対照群 (G2) のラット肺には計測されなかった。

## D. 結論

マーカー法はカーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して、グラファイト積層と同様の選択性のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いた MWCNT の極微量定量法である。本分担研究により、カーボンナノチューブ一般に適用できる可能性が見いだされた。

## E. 健康危機情報

なし

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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. 2019 Feb 13.

Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. PLoS One. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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 Jul;109(7):2164-2177.

### 2. 学会発表

菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファーゼの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)

Jun Kanno, Chuen Jinn Tsai, Plenary Session 4: Improvement of Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM., Plenary Lectures, Xth International Aerosol Conference (IAC 2018), Invited, 2019.9.6, St. Louis.

Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

特許出願; 柴田 眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願; 柴田 眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

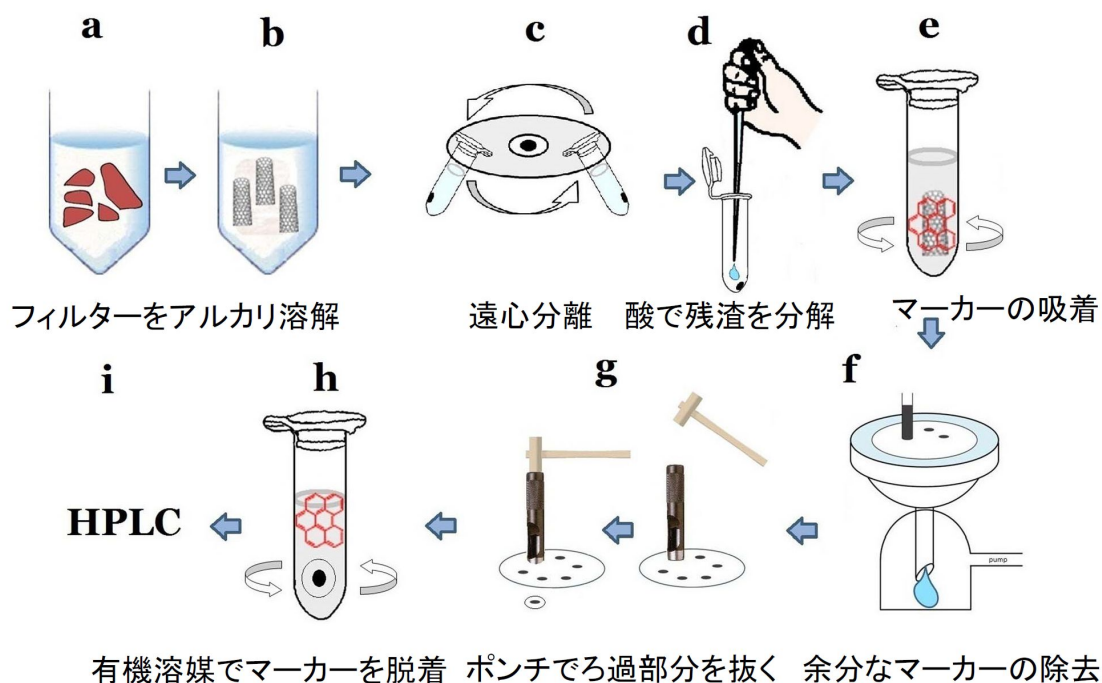


図 1 マーカーを用いた MWCNT 微量定量法（大西法）の概要

MWCNT の質量に比例して吸着するマーカーを用いた極微量定量法（大西法）。マーカーとして Benzo[ghi]perylene (BgP)を用い、MWCNT と混合して BgP を MWCNT の表面に吸着させる。過剰な BgP を洗浄して除去後、MWCNT 表面から BgP を抽出して HPLC にて定量し MWCNT の質量に換算する。

表 2 DWCNT 及び MWCNT の肺中沈着量

| CNT          | 投与総量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 肺中含量<br>( $\mu\text{g}$ ) | 肺重量<br>(g) | 肺 g 当り<br>( $\mu\text{g/g}$ ) | 肺中含量平均<br>( $\mu\text{g}$ ) | 肺 g 当り平均<br>( $\mu\text{g/g}$ ) |
|--------------|---------------------------|---------------------------|------------|-------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|
| 投与 2 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| No treatment | 0                         | 0                         | 1.06       | 0                             | 0                           | 0                               |
| No treatment | 0                         | 0                         | 1.06       | 0                             |                             |                                 |
| 投与 6 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| No treatment | 0                         | 0                         | 1.02       | 0                             | 0                           | 0                               |
| No treatment | 0                         | 0                         | 1.05       | 0                             |                             |                                 |
| 投与 2 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| Vehicle      | 0                         | 0                         | 1.45       | 0                             | 0                           | 0                               |
| Vehicle      | 0                         | 0                         | 1.46       | 0                             |                             |                                 |
| 投与 6 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| Vehicle      | 0                         | 0                         | 1.06       | 0                             | 0                           | 0                               |
| Vehicle      | 0                         | 0                         | 1.01       | 0                             |                             |                                 |
| 低用量投与 2 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 125                       | 96.6                      | 1.60       | 60.4                          | 96.8                        | 64.4                            |
| DWCNT        | 125                       | 97.0                      | 1.42       | 68.3                          |                             |                                 |
| 低用量投与 6 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 125                       | 105.2                     | 1.53       | 68.8                          | 96.3                        | 65.4                            |
| DWCNT        | 125                       | 87.4                      | 1.41       | 62.0                          |                             |                                 |
| 中用量投与 2 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 250                       | 226.0                     | 1.48       | 152.7                         | 207.0                       | 137.0                           |
| DWCNT        | 250                       | 188.0                     | 1.55       | 121.3                         |                             |                                 |
| 中用量投与 6 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 250                       | 172.7                     | 1.80       | 95.9                          | 182.1                       | 108.6                           |
| DWCNT        | 250                       | 191.5                     | 1.58       | 121.2                         |                             |                                 |
| 高用量投与 2 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 500                       | 408.9                     | 1.69       | 242.0                         | 435.8                       | 248.8                           |
| DWCNT        | 500                       | 462.7                     | 1.81       | 255.6                         |                             |                                 |
| 高用量投与 6 週後   |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| DWCNT        | 500                       | 377.9                     | 2.06       | 183.4                         | 358.2                       | 173.1                           |
| DWCNT        | 500                       | 338.5                     | 2.08       | 162.7                         |                             |                                 |
| 投与 2 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| MWNT-7       | 500                       | 453.5                     | 1.62       | 280.0                         | 470.1                       | 284.8                           |
| MWNT-7       | 500                       | 486.6                     | 1.68       | 289.6                         |                             |                                 |
| 投与 6 週後      |                           |                           |            |                               |                             |                                 |
| MWNT-7       | 500                       | 403.3                     | 1.52       | 265.3                         | 398.5                       | 254.2                           |
| MWNT-7       | 500                       | 393.6                     | 1.62       | 243.0                         |                             |                                 |