

研究課題名:ナノマテリアル曝露による慢性影響の効率的評価手法開発に関する研究

分担研究課題名:慢性影響を考慮した気管内投与法の確立に関する研究

研究分担者:	北條 幹	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	主任研究員
研究分担者:	小林 憲弘	国立医薬品食品衛生研究所	生活衛生科学部	室長
研究分担者:	広瀬 明彦	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部長	
研究分担者:	高橋 祐次	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	室長
研究分担者:	菅野 純	日本バイオアッセイ研究センター	所長	
研究協力者:	坂本 義光	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
研究協力者:	前野 愛	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
研究協力者:	大貫 文	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	主任研究員
研究協力者:	長谷川 悠子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	
研究協力者:	鈴木 俊也	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	研究科長
研究協力者:	猪又 明子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	参事研究員
研究協力者:	守安 貴子	東京都健康安全研究センター	薬事環境科学部	部長
研究協力者:	横田 理	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
研究協力者:	大西 誠	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	技術専門役
研究協力者:	後藤 裕子	日本バイオアッセイ研究センター	試験管理部	主任研究員
研究協力者:	中江 大	東京農業大学	応用生物科学部	教授
研究協力者:	牛田 和夫	国立医薬品食品衛生研究所	安全性予測評価部	研究員

研究要旨

ナノマテリアルの呼吸器系を介した慢性影響に関するデータの蓄積は不十分であり、MWCNT の慢性吸入試験については Kasai ら¹⁾ の報告のみである。本研究では、2 年間の吸入試験と同レベルの評価が可能なラットによる代替慢性試験法を開発することを目的とした。2 年間にわたって 4 週間毎に 1 回の計 26 回、反復気管内投与を行い、Kasai らの結果と同程度の肺負荷量を与えて発がん性を評価するという試験系を計画している。

今年度は、2 年間の反復気管内投与試験の投与条件を決めるため、MWNT-7 を被験物質とし、F344 雄性ラットを用いて予備検討を実施した。まず、経口ゾンデとスプレー式ゾンデを用いて 2 日毎に 1 回の計 8 回の短期反復投与試験を実施し、炎症反応や MWCNT 繊維の分布を観察した。病理組織学的解析から、両投与器具の間に顕著な違いは認められなかったため、毒性試験で広く利用されている経口ゾンデを使うこととした。次に、投与後の MWCNT の肺負荷量を経時的に観察した。125 µg/rat (0.50 mg/kg 体重) の投与条件下では投与翌日に約 50%まで減少し、少なくとも 16 週後まではその量が維持されることが分かった。また、4 週間ごとに合計 3 回の反復投与を実施して負荷量を測定した場合、単回投与の結果から予測される蓄積量とおおむね一致していることが確認できた。さらに、2 年間の反復投与試験においては凝集体の少ない試料が適すると考えられたため、Taquann 処理 MWCNT を投与して肺負荷量を測定した。投与 4 週後の負荷量は、

100 µg/rat (0.71 mg/kg 体重) の投与条件では投与時の 31.7%に、25 µg/rat (0.18 mg/kg 体重) の条件では 20.0%に、それぞれ減少しており、原末の MWCNT よりもクリアランスが高いことが示唆された。

上記の予備検討から、2年間の反復投与試験の1回ごとの投与用量は、低用量群で 0.125 mg/kg 体重に、高用量群で 0.50 mg/kg 体重に設定した。2年後の MWCNT の肺内蓄積量は、低用量群で 240 µg/lung、高用量群で 1440 µg/lung と試算しており、Kasai ら¹⁾の報告における中濃度群および高濃度群の負荷量と同レベルの肺負荷量になることが期待される。

2年間の反復投与試験は現在進行中である。

A. 研究目的

ナノマテリアルの健康影響については、その特有の物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、*in vivo* 試験を元にした毒性の評価手法の検討が依然として重要である。MWCNT はアスベストに類似する性質を持つため、慢性毒性として肺がんや胸膜中皮腫などの呼吸器系への影響が懸念されている。ナノマテリアルの毒性評価方法としては、欧米ではヒトへの曝露形態に近い吸入試験が推奨されているが、慢性吸入試験の実施には多大なコストがかかる。過去には、MWNT-7 の2年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺がんが発症することが Kasai らにより報告されたが¹⁾、上市される多数のナノマテリアルに慢性吸入試験を課すことは事実上不可能である。そこで、慢性影響を評価できる効率的な評価手法が求められている。

気管内投与法を用いた慢性試験は有力な代替手法の候補の一つであるが、報告例は少ない。Suzui らは2週間で8回の MWCNT (Nikkiso) の投与を行い、その後、2年間の観察により、肺がんに加えて胸腔内中皮腫が発症することを報告した²⁾。MWCNT の肺負荷量に注目すると、吸入試験と気管内投与試験のどちらも最大で 1000 µg/lung を超えているが^{1),2)}、吸入試験では、2年間にわたり次第に肺内に MWCNT が蓄積し、AUC

(Area Under the Curve) は右肩上がりの形状になるのに対し¹⁾、Suzui らの気管内投与試験では、肺負荷量が実験開始直後に最大となり、次第に減少するという右肩下がりの AUC の形状となっていた (図 1)²⁾。ヒトのアスベスト中皮腫の発症メカニズムからラットの胸膜中皮腫の発症にも長い時間を要すると考えられるため、両実験における胸腔内中皮腫の発症の有無は AUC の形状の違いに起因すると推測されている³⁾。

そこで、本研究では、2年間の慢性吸入試験と同レベルの評価が可能な代替慢性試験法を開発することを目的とした (図 1)。4週間に1度の間隔で MWNT-7 の気管内投与を実施し、右肩上がりの形状の AUC を描きながら最終的に Kasai らの結果と同程度の肺負荷量を達成できるように投与量を設定する。この試験で得られる結果を、Kasai らの吸入試験¹⁾と Suzui らの気管内投与試験²⁾の結果と比較することで、肺負荷量に着目した MWCNT の発がん性評価の重要性を示すことができ、また、気管内投与試験の有用性が再認識されることが期待される (図 1)。

今年度は、2年間の反復投与試験の一回当たりの投与量を決定するため、単回投与後の減衰量を把握することを目的とした。カーボンナノチューブの肺負荷量の減衰については、これまでにいくつかの報告があるが⁴⁾⁻⁹⁾、曝露方法、投与量および MWCNT

の測定方法が異なっているため、結果は論文により大きく異なる。例えば4週間後の残存量は20から80%までの幅を持つ(図2)。今回、我々は、KasaiらとSuzuiらが用いた手法^{9),10)}によって肺内MWCNT量を測定した。また、気管内投与に使用する器具についてスプレー式ゾンデと経ロゾンデの2種類を用いた場合の毒性の違いと肺負荷量についても同時に検討した。

B. 研究方法

i) 反復気管内投与試験における2種の投与器具の比較

16週齢のF344雄性ラットを10匹ずつ3群に分け、対照群、スプレー式ゾンデ群、経ロゾンデ群とした(図3)。MWCNTは、MWNT-7(三井)を用い、0.3 mg/mLの濃度で0.1%Tween80含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。経ロゾンデ(夏目製作所)あるいはスプレー式ゾンデ(PennCentury)を用い、62.5 µg/0.25 mL/rat/回の用量で、1日おきに8回投与した。投与量の合計は1匹あたり500 µgとなる。また、対照群には、分散媒体のみをスプレー式ゾンデで投与した。

最終投与翌日に全動物を剖検し、胸郭ごと胸腔内臓器をダビッドソン液で固定し、気管、肺および全身のリンパ節を病理組織学的に検索した(図3)。肺実質の病理所見は、左葉(4か所)、右前葉、右中葉、右後葉(3か所)および副葉(2か所)の各切片において、病変分布(局所性+〜び慢性+++)、肺胞上皮の増生(+〜+++)、肉芽腫の個数、炎症細胞浸潤(+〜+++))について評価した。一方、気管の病理所見は、上部(3か所)および下部(縦隔リンパ節の付近を

3か所)の各切片において、粘膜上皮粘膜の菲薄化(+〜+++)、粘膜上皮の重層化(+〜+++)、粘膜内炎症細胞浸潤(+〜+++)、肉芽腫の個数、扁平上皮化生(+〜+++))について評価した。それぞれ、+を1点、++を3点、+++を5点としてスコア化し、肉芽腫の個数はそのままの数値を加算した。さらに、各葉における肉芽腫の大きささと数をImageJにより計測し、両群で比較した。解析には経ロゾンデ群5匹およびスプレー式ゾンデ群4匹のそれぞれにおいて、全葉にわたる10枚の組織切片を用いた。

ii) MWCNTの肺負荷量の経時変化

10週齢のF344雄性ラットを3群に分け、スプレー式ゾンデ群(単回投与)24匹、経ロゾンデ群(単回投与)24匹、経ロゾンデ反復投与群15匹とした(図4)。MWNT-7を0.5 mg/mLの濃度で0.5%PuronicF含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。経ロゾンデあるいはスプレー式ゾンデを用いて、125 µg/0.25 mL/rat/回(およそ0.50 mg/kg体重)の用量で気管内投与した。経ロゾンデ反復投与群については、初回投与の4週間および8週間後に上記用量で投与を繰り返した。

単回投与実験の各群においては、投与1日後、4週間、8週間、12週間および16週後に、各群それぞれ3匹ずつ剖検し、MWCNTの肺負荷量測定に供した。スプレー式ゾンデ群のみ、投与直後の3個体についても測定を行った。経ロゾンデ反復投与群については、2回目の投与1日後、3回目の投与1日後および3回目の投与8週後に剖検し、肺負荷量測定を測定した(図4)。

MWCNTの測定は、Ohnishiらの蛍光マーカ

一を用いて検出する手法（大西法）に従った^{9),10)}。肺の全ての葉を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、肺組織をアルカリ溶液で溶解した。十分に分散させた後、一部を2 mL チューブに移し、残存する肺組織を酸で溶解した後、MWCNT にベンゾ-ジ-ペリレン (B[ghi]P) を吸着させた。フィルターでMWCNT を捕捉してから、アセトニトリル溶液にB[ghi]P を脱着させ、HPLC の分析に供した。

また、投与1日後、8週後および16週後には、各群それぞれ肺負荷量測定とは別の3匹を剖検し、呼吸器系の組織を10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定し、病理組織学的に解析した。

iii) Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

7週齢のF344雄性ラットを、低用量群10匹と高用量群10匹の2群に分けた(図5)。53 μm 径のシーブを用いて Taquann 処理¹¹⁾を施した MWNT-7 に、夾雑物を除去するため200°C・2時間の熱処理を加えた後、0.18 mg/mL あるいは0.71 mg/mL の濃度で0.1% Tween80 含有生理食塩水に懸濁し、超音波浴槽で30分以上分散させた。投与には経口ゾンデを用い、低用量群は25 μg/0.14 mL/rat の用量で(およそ0.18 mg/kg 体重)、一方、高用量群は100 μg/0.14 mL/rat の用量で(およそ0.71 mg/kg 体重)、それぞれ単回の気管内投与を行った。

投与1週後および4週後にそれぞれ5匹ずつ剖検し、大西法により肺負荷量を測定した(図5)。

<倫理面への配慮>

本研究では、人を対象とした研究、人の遺伝子解析および疫学研究は行っていない。

動物飼育及び動物実験は東京都健康安全研究センター動物実験実施規程に基づいて、動物実験委員会の事前審査および承認を受け、その管理のもと実施された。

C. 研究結果

i) 反復気管内投与試験における2種の投与器具の比較

光学顕微鏡観察において、MWCNT の繊維は、肺門付近から臓側胸膜までほぼび漫性に存在したが、壁側胸膜には認められなかった。繊維は多くの場合、マクロファージに貪食された状態や肉芽組織内に凝集した状態で観察されるが、比較的微細な繊維束が炎症細胞を伴わずに肺胞壁に認められることもあった。リンパ組織への移行については、縦隔リンパ節に多く(図6)、他のリンパ節にはほとんど認められなかった。これらについて投与器具の違いによる顕著な差異は見られなかった。

肺ではMWCNT の沈着に関連した炎症反応が認められ、肺胞内にはMWCNT を貪食したマクロファージが多数認められ、好中球、好酸球およびリンパ球の間質への浸潤も見られた(図7)。また、終末気管支から肺胞管領域を中心に、軽度の肺胞上皮細胞の増生や間質の肥厚が見られ、肉芽腫の形成が認められた(図8)。これらの炎症反応は、いずれの器具を用いた場合にも、同程度に認められ(図9)、左葉の尾側や右後葉でやや強い傾向があった(図10)。各葉における肉芽腫の大きさと数を測定した結果、肉芽腫の数は両群間で有意差が認められなかったが、個々の肉芽腫の面積は、スプレー式ゾンデ群において経口ゾンデ群に比べて有意に大きいことが分かった(図11)。

一方、気管の所見については両群間で顕著な差異があった。挿管された投与器具の先端部の到達部位に相当する気管分岐部の5 mmほど上部では、剖検時に、スプレー式ゾンデ群には肉眼的にMWCNTの沈着を反映した約3 mm²程度の黒色斑を認めた。組織学的には、粘膜下にMWCNTを内包する大型の肉芽腫が存在し、一部では気管粘膜上皮の扁平上皮化生が見られた(図12)。経口ゾンデ群にもMWCNTの沈着と炎症細胞の浸潤はわずかにみられるが、スプレー式ゾンデ群に比べると低レベルであった(図12)。

ii) MWCNTの肺負荷量の経時変化

スプレー式ゾンデ群と経口ゾンデ群の動物の肺を肉眼観察すると、いずれも、MWCNTは肺実質内では深部まで分散しているが(図13)、葉間の偏りあるいは個体差が多少認められた。また、投与1日後から投与16週間まで時間が経過しても肺内の沈着量に顕著な減少は見られなかった。

また、i)の結果と同様に、スプレー式ゾンデ群では、気管分岐部のやや上部にMWCNTの沈着が、投与直後から投与16週間まで観察された(図14)。肉眼的な観察から、気管へのMWCNT沈着は気管の腹側および左側に多かったが(図15)、肺の左葉あるいは右葉への沈着の偏りとの関連性は見られなかった。

組織学的には、投与1日後には、肺実質内でび慢性にMWCNTの沈着と炎症反応を認めた(図16)。MWCNT線維は肺胞内に遊離した状態あるいはマクロファージに貪食された状態で観察され、臓側胸膜まで達していた。炎症反応の主体はマクロファージであるが、好酸球および好中球も見られた。8

週間には、好酸球や好中球の浸潤は目立たず、繊維を貪食したマクロファージの集合が肺胞内に多数観察された。16週間には、MWCNTを内包する肉芽腫が観察された(図16)。これらの組織所見について、経口ゾンデ群とスプレー式ゾンデ群の間に差異は見られなかった。

125 µg/ratの用量でスプレー式ゾンデにより単回投与した直後、1日後、4週間、8週間、12週間および16週間の肺負荷量の平均値は、それぞれ132.5、60.7、58.4、64.6、37.5 および79.7 µg/lungであった(図17・緑色)。一方、経口ゾンデで単回投与した1日後、4週間、8週間、12週間および16週間の平均値は、73.8、68.6、35.5、35.6 および47.3 µg/lungであった(図17・青色；投与直後のデータ無し)。各時期の測定値は、個体差が大きく、両群間で差異は認められなかった。

反復投与群では、単回投与に比べて強い炎症反応が観察された(図18)。肺負荷量は、2回目の投与1日後、3回目投与1日後および3回目の投与8週間について3回測定し、それぞれ115.5、161.5 および154.5 µg/lungであった(図19)。

iii) Taquann処理MWCNTの肺負荷量

Taquann処理MWCNTを低用量(25 µg/rat)で単回投与した後の肺負荷量は、投与1週後に10.1 µg/lung、4週後に5.0 µg/lungであり、投与1週後に半量以下まで減衰した後、さらに3週間でクリアランスが進行することがわかった(図21・水色)。一方、高用量(100 µg/rat)ではそれぞれ30.4 および31.7 µg/lungであり、投与1週間以内に減衰して以降、肺内のMWCNT量は維持さ

れた (図 21・橙色)。

D. 考察

i) 反復気管内投与試験における 2 種の投与器具の比較

気管内投与試験において、経口ゾンデとスプレー式ゾンデの両者を比較すると、スプレー式ゾンデのほうが、経口ゾンデよりも被験物質が肺の深部まで到達しやすく、葉の偏りも少ないことが示されている¹²⁾¹³⁾。しかし、今回、短期間の 8 回の反復投与の条件下においては、両者に顕著な違いは見られなかった。複数回の投与により差異が見えづらくなった可能性が考えられる。葉の偏りについては、左右ともに尾側(後方)にやや反応が強く、動物の尾を下に傾けて固定して投与していることによると思われるが、どちらの器具を用いた場合にも、同じ傾向であった。

今回、スプレー式ゾンデを用いた場合に、肺実質における肉芽腫の大きさがやや大きなることがわかった。スプレー式ゾンデにより MWCNT 繊維が加圧されて肺内の細胞に接触し、また、投与された瞬間に広く肺内に分布することが推測されるが、今回の観察結果はこれらに起因しているのかもしれない。また、ゾンデ先端部分が位置する気管の上皮に肉芽腫ができることが示された。これは、経口ゾンデでは MWCNT が直線状に噴出されるのに対し、スプレー式ゾンデでは先端部から霧状に広がるためと思われる。今回、短期間に比較的高用量で反復投与したことが原因か、個体によっては巨大な肉芽腫が形成されていた。

前述のように、スプレー式ゾンデのほう

あることを示す報告もあるが¹⁴⁾、今回、8 回の反復投与においては結果に顕著な違いが見られなかった。経口ゾンデを用いた場合に懸念される肺葉や肺実質内の偏りについては、本研究が 26 回におよぶ長期の反復投与試験であることを考えれば、無視できるものと思われる。実際、両者を比較し、ナノ物質の肺内分布や肺泡洗浄液の生化学分析結果に差が無かったという情報もある^{14, 15)}。また、気管内投与を吸入試験の代替手法として提案する場合に投与器具の入手のしやすさは重要な点であると考えられる。

以上を踏まえ、本研究の 2 年間の反復投与試験においては、原則的には経口ゾンデを用いて、気管内投与を実施することとした。しかし、気管内投与試験により MWCNT の発がん性を報告している Suzui らのグループがスプレー式ゾンデを使用していることから²⁾、比較のためにスプレー式ゾンデを用いた群を設けることにした(後述)。

ii) MWCNT の肺負荷量の経時変化

125 μg を単回投与し、定期的に剖検して肺内負荷量を測定した結果、個体差が大きいものの、1 日後に投与した量のおよそ半量まで減少したが、その後、4 週後、8 週後および 16 週後の結果は同程度で、経時変化はあまり見られないことが分かった。組織学的には MWCNT の存在形態や炎症像は時期によって変化しているものの、この条件下では、肺外へのクリアランスはあまり進行しなかったことが分かる。

一方で、投与翌日に大きく負荷量が減少したのは、おそらく気道粘膜上皮の「繊毛エレベーター運動」による排出が原因と考えられる。気道から排出された MWCNT は消

化器系へ移行することが推測されるが、消化管内の MWCNT 量の分析が、今後必要である。

MWCNT の肺内の減衰量を測定した過去の報告とは諸条件が異なるため単純に比較できないが、投与 90 日後までの観察において、直線的に次第に減少するものもあれば、今回の我々の結果と同様の減衰曲線を描くものもある (図 2)⁶⁾⁹⁾。例えば、Shinohara らは⁶⁾、ラットに経口ゾンデにより 220 μg を単回投与し、投与直後 (1 日後) に 60% 程度まで減衰し、その後は 1 年間ほとんど MWCNT 量が増加しないという結果であり (図 2)、今回の我々の結果と似ている。MWCNT 繊維はその強固で長い形態のために、マクロファージが貪食と破裂を繰り返して肺胞内に維持される、またはリンパ管等にトラップされて肺組織内に維持される、あるいは、肉芽組織によって肺実質に維持される等の挙動が提唱されている¹⁶⁾。

本研究の長期反復試験においては、このように MWCNT が肺内に維持され、慢性的な炎症反応が引き起こされることを期待し、毎回の投与で一定量を残留させ、2 年間で 1500 $\mu\text{g}/\text{lung}$ 程度まで負荷を増加させることを目指している。今回、125 μg を 2 回および 3 回の反復投与した場合には、1 回あたりの投与で 125 μg が 62.5 μg まで半減することを仮定した場合に予測される数値 (図 20・赤色の破線) と同程度であった。このことから、4 週間に 1 度の反復投与によって次第に肺内蓄積量が増加することが期待される (図 21)。

iii) Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

本研究で実施する反復投与試験は、Kasai

らの吸入試験にできるだけ近い条件にするため、Taquann 処理 MWCNT を使用することにした。吸入試験では粒径の大きなものは鼻腔で捕捉されることが指摘されているため、鼻腔を経由しない気管内投与の系では、凝集体の少ない MWCNT を用いるほうが適切である。

今回、低用量 (25 $\mu\text{g}/\text{rat}$) と高用量 (100 $\mu\text{g}/\text{rat}$) の 2 つの条件で投与を実施した結果、どちらも、一週間後にはすでに半量を下回っており、ii) で原末の MWCNT を用いた場合と同様に、投与後早い段階でクリアランスが起こることが分かった。

ii) の実験に近い用量の高用量群 (100 $\mu\text{g}/\text{rat}$) においては、1 週後と 4 週後の負荷量がほぼ同じであったため、原末と同様に一定量の蓄積が見込まれることが分かった。ただし、Taquann 処理 MWCNT が原末よりもクリアランスが高いことが示唆された。体重および週齢が異なるが、体重当たりの投与量に換算すると、ii) の原末 MWCNT が 0.50 mg/kg 体重なのに対し、Taquann 処理 MWCNT (高用量群) では 0.71 mg/kg 体重となるため Taquann 処理 MWCNT の実験のほうが負荷は高かったことになる。しかし、4 週後の残存割合を比較すると、原末 MWCNT の 59% に比べて Taquann 処理 MWCNT は 31.7% と大幅に低かった (表 1)。これは Taquann 処理 MWCNT が凝集体の含有が少ないためと推測される。

また、高用量群と低用量群を比較すると、クリアランスの違いが認められた。4 週後の残存割合は、高用量 (100 $\mu\text{g}/\text{rat}$) の場合が 31.7%、低用量 (25 $\mu\text{g}/\text{rat}$) の場合が 20.0% であった。今回、公比 5 で 2 用量を検討したが、低用量ではクリアランスが

良いことから、2年間の反復投与試験を実施した場合の最終的な負荷量は、高用量の5分の1よりもさらに低くなることが予測される。

E. 結論

今年度は、2年間の長期反復投与試験の投与条件を決めるために、投与器具による毒性の差異、原末および Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量の経時変化を検討した。

まず、経口ゾンデとスプレー式ゾンデを用いた場合に炎症反応や MWCNT のクリアランスに顕著な違いは無いため、基本的には入手しやすい経口ゾンデを用いるが、スプレー式ゾンデ投与群を1群設けることとする。次に、MWCNT の肺負荷量は、125 µg/rat (0.50 mg/kg 体重) の投与条件において投与翌日に半量程度になり、その後は長期間減少しないことが分かった。また、4週間おきに反復投与を実施した場合、単回投与の結果から予測される量で蓄積することが確認できた。さらに、Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量を測定したところ、原末よりもクリアランスが高いことが示唆され、その4週後の残存割合は、100 µg/rat の投与条件 (0.71 mg/kg 体重) では 31.7%、25 µg/rat の投与条件 (0.18 mg/kg 体重) では 20.0% であった。

上記を踏まえ、2年間の反復投与試験の実験条件は以下の通りとした (表 2)。F344 雄性ラットに対して、Taquann 処理 MWNT-7 を 1 mL/kg/回の投与量で、4週間に1度、合計 26 回投与する。対照群、低用量群、高用量群、高用量群 (スプレー式ゾンデ使用群) および無処置群の 5 群を設ける。投与用量は、低用量群を 0.125 mg/kg 体重に、

高用量群を 0.50 mg/kg 体重に設定する (初回投与で、9 週齢の約 200 g のラットにそれぞれ、25 および 100 µg/rat の量で投与することに相当)。一定数を途中解剖し、発がん性評価を各群 30 匹で行うことのできるように動物数を設定する (表 2)。

上記の用量で2年間投与を実施し、投与した量のうち低用量で 20% まで、高用量で 30% まで 4 週間で減衰すると仮定し、肺負荷量を試算すると、2年後の蓄積量の予測は、低用量で 240 µg/lung、高用量で 1440 µg/lung となる (図 22)。肺内蓄積量が増すにつれて、また、加齢によって、クリアランスが低下する可能性はあるが、Kasai ら¹⁾の中濃度群および高濃度群の負荷量 (それぞれ 150 および 1800 µg/lung) に近いものになると期待される (図 22)。

現在、全 26 回の投与のうち 4 回まで実施済みである。

F. 参考文献等

- 1) Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct;13(1):53.
- 2) Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abdelgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Alexander WT, Jiegou X, Tsuda H. Cancer Sci. 2016

Jul;107(7):924-35.

3) Carcinogenicity of multi-walled carbon nanotubes: challenging issue on hazard assessment. Fukushima S, Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Sasaki T, Matsumoto. *J Occup Health*. 2018 Jan 25;60(1):10-30.

4) General procedures for safety tests on carbon nanomaterials. Chapter.V. Endo S, Maru J. 2017. Procedures for sample preparation, characterization, in vitro cell-based assays, and animal tests on carbon nanomaterials. AIST.

5) Respiratory toxicity of multi-wall carbon nanotubes. Muller J, Huaux F, Moreau N, Misson P, Heilier JF, Delos M, Arras M, Fonseca A, Nagy JB, Lison D. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2005 Sep 15;207(3):221-31.

6) Long-term retention of pristine multi-walled carbon nanotubes in rat lungs after intratracheal instillation. Shinohara N, Nakazato T, Ohkawa K, Tamura M, Kobayashi N, Morimoto Y, Oyabu T, Myojo T, Shimada M, Yamamoto K, Tao H, Ema M, Naya M, Nakanishi J. *J Appl Toxicol*. 2016 Apr;36(4):501-9.

7) Biodistribution and clearance of instilled carbon nanotubes in rat lung. Elgrabli D, Floriani M, Abella-Gallart S, Meunier L, Gamez C, Delalain P, Rogerieux F, Boczkowski J, Lacroix G. *Part Fibre Toxicol*. 2008 Dec 9;5:20.

8) Translocation and fate of multi-walled carbon nanotubes in vivo. Deng X, Jia G, Wang H, Sun H, Wang X, Yang S, Wang T, Liu Y.

9) Novel method using hybrid markers:

development of an approach for pulmonary measurement of multi-walled carbon nanotubes. Ohnishi M, Yajima H, Kasai T, Umeda Y, Yamamoto M, Yamamoto S, Okuda H, Suzuki M, Nishizawa T, Fukushima S. *J Occup Med Toxicol*. 2013 Oct 25;8(1):30.

10) Improved method for measurement of multi-walled carbon nanotubes in rat lung. Ohnishi M, Suzuki M, Yamamoto M, Kasai T, Kano H, Senoh H, Higashikubo I, Araki A, Fukushima S. *J Occup Med Toxicol*. 2016 Sep 15;11:44.

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

12) Intratracheal instillation methods and the distribution of administered material in the lung of the rat. Hasegawa-Baba Y, Kubota H, Takata A, Miyagawa M. *J Toxicol Pathol*. 2014 Oct;27(3-4):197-204

13) Significance of Intratracheal Instillation Tests for the Screening of Pulmonary Toxicity of Nanomaterials. Morimoto Y, Izumi H, Yoshiura Y, Fujisawa Y, Fujita K. *J UOEH*. 2017;39(2):123-132.

14) ナノ材料の気管内投与試験の試験標準化に向けた検討～投与器具及び投与液量の影響～小林 俊夫, 大嶋 浩, 坪倉 靖祐, 菊池 純一, 橋爪 直樹, 井上 義之, 中井 誠, 安心院 祥三, 古川 浩太郎, 今田中 伸哉, 坪倉靖祐 (2014).第41 回日本毒性学会学術年会. *J Toxicol Sci*. 39 (Suppl), S266.

- 15) General procedures for safety tests on carbon nanomaterials. Chapter. VII. Morimoto Y, Izumi H, Fujita K. 2017. Procedures for sample preparation, characterization, in vitro cell-based assays, and animal tests on carbon nanomaterials. AIST.
- 16) Asbestos, carbon nanotubes and the pleural mesothelium: a review of the hypothesis regarding the role of long fibre retention in the parietal pleura, inflammation and mesothelioma. Donaldson K, Murphy FA, Duffin R, Poland CA. Part Fibre Toxicol. 2010 Mar 22;7:5.

G. 研究発表

(論文発表)

Sakamoto Y, Hojo M, Kosugi Y, Watanabe K, Hirose A, Inomata A, Suzuki T, Nakae D. Comparative study for carcinogenicity of 7 different multi-wall carbon nanotubes with different physicochemical characteristics by a single intraperitoneal injection in male Fischer 344 rats. J Toxicol Sci. 43(10):587-600. 2018.

(学会発表)

Hirose A., Hojo M., Kobayashi N., Impact of sample preparation of MWCNT for developmental toxicity by intratracheal instillation. The 10th Congress of Toxicology in Developing Countries (CTDC2018) (April 2018 Belgrade, Serbia)

坂本義光,北條幹,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,広瀬明彦,中江大:多層カーボンナノチ

ューブ(MWCNT)を単回経気管噴霧投与した後終生飼育したラットの肺および中皮組織における増殖性病変の発生. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

北條幹,小林憲弘,長谷川悠子,安藤弘,久保喜一,海鉾藤文,田中和良,五十嵐海,村上詩歩,多田幸恵,生嶋清美,湯澤勝廣,坂本義光,前野愛,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,高橋祐次,広瀬明彦,中江大:多層カーボンナノチューブのマウス気管内投与による発生毒性と肺の炎症との関連性. 第45回日本毒性学会学術年会(2018年7月大阪)

Hojo M, Kobayashi N, Hasegawa Y, Sakamoto Y, Murakami S, Yamamoto Y, Tada Y, Maeno A, Kubo Y, Ando H, Shimizu M, Taquahashi Y, Suzuki T, Nakae D, Hirose A: Relationship between developmental toxicity of multi-wall carbon nanotubes (MWCNT) and lung inflammation in pregnant mice after repeated intratracheal instillation. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) (September 2018 Brussels, Belgium)

坂本義光,多田幸恵,北條幹,前野愛,鈴木俊也,猪又明子,守安貴子,中江大:ラットにおいてDHPNで誘発されたメソテリン陽性肺増殖性病変の病理組織化学的性状. 第35回日本毒性病理学会学術集会(2019年1月東京)

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得 (該当なし)
2. 実用新案登録 (該当なし)
3. その他 (該当なし)

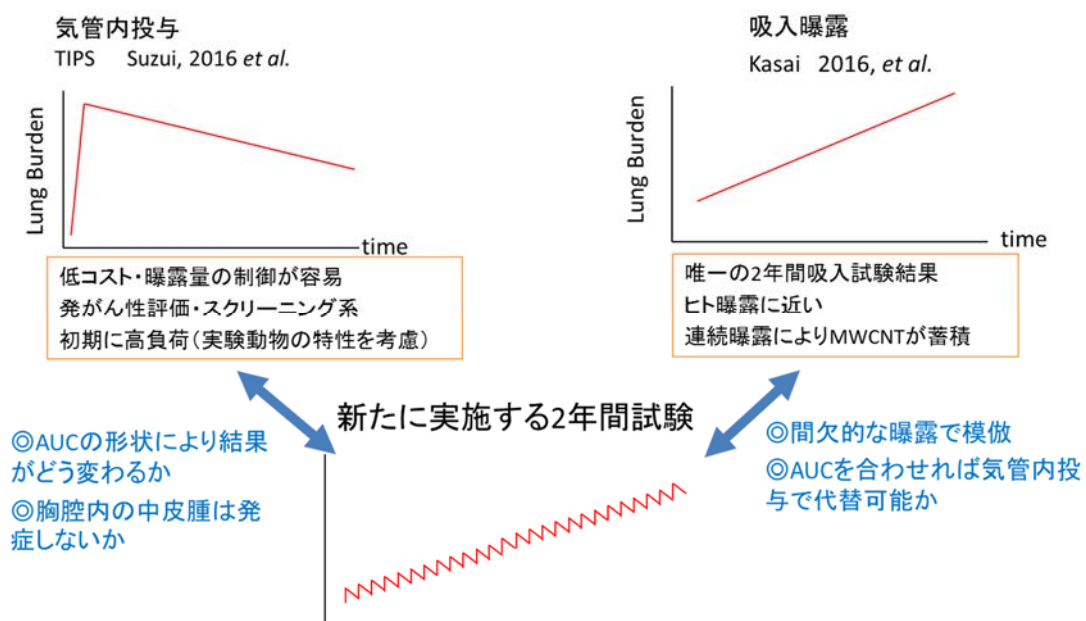


図 1. 既報の MWNT 慢性毒性評価と新規試験の肺負荷量と研究の意義

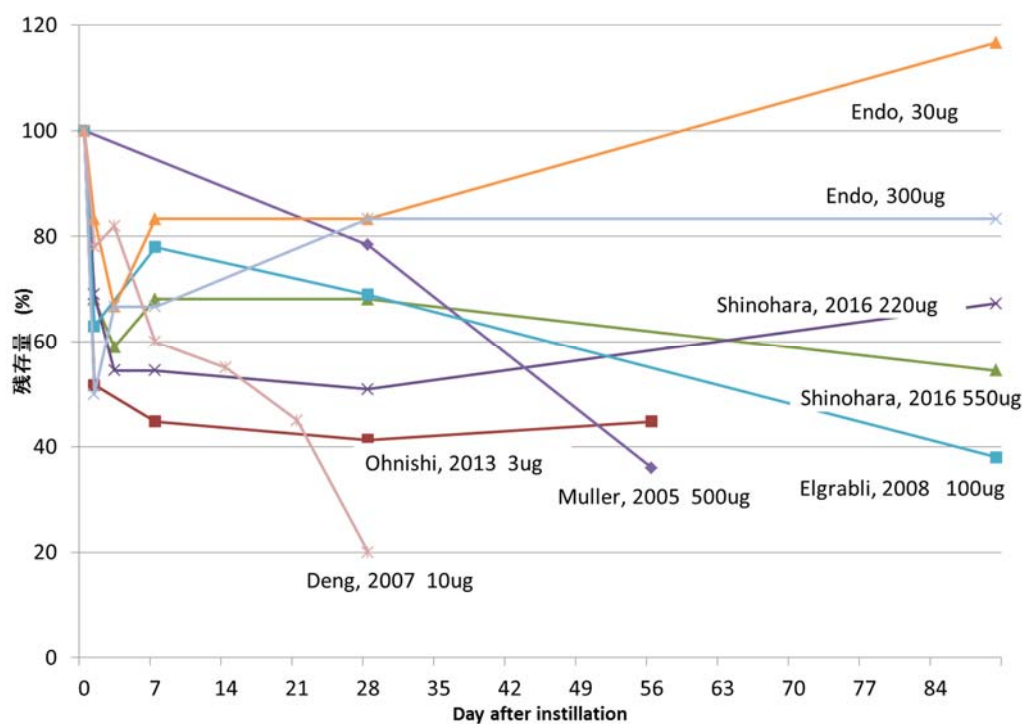


図 2. カーボンナノチューブばく露後の肺負荷量の減衰 (文献 4) -9)

- 動物: F344雄性ラット(16週齢)
- 投与濃度: 0.3 mg/mL
- 投与物質: MWNT-7
- 懸濁媒体: 0.1%Tween80/生理食塩水
- 投与用量: 62.5ug/0.25 ml/rat/回 × 8
合計 500ug/rat

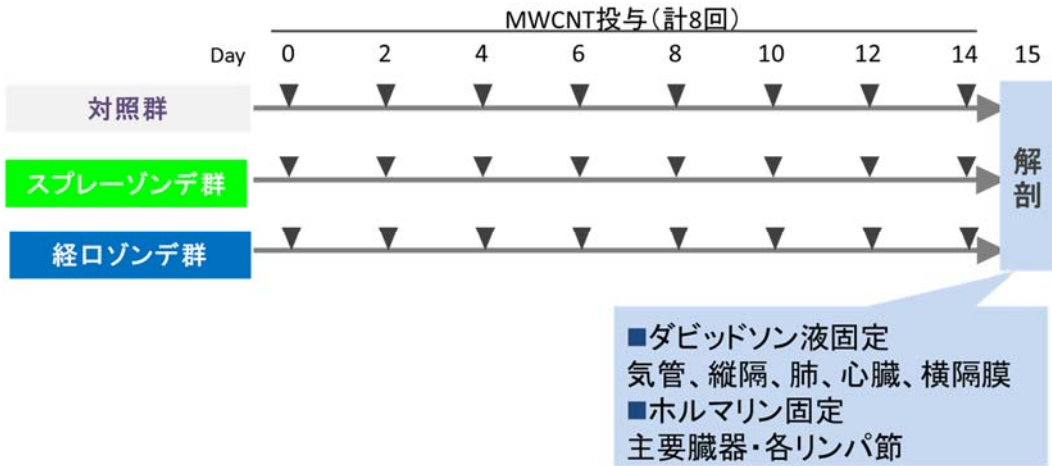


図 3. 反復気管内投与試験における 2 種の投与器具の比較 実験概要

- 動物: F344 ラット ♂ 10-wk old
- 試料: MWNT-7 (原末)
- 投与器具: スプレー式ゾンデ (PennCentury, 1A/1B)、経口ゾンデ (Natsume)
- 投与用量: 125 μ g/0.25ml/ラット/回 \approx 0.50 mg/kgBW
- 投与媒体: 0.5% pF 68 / 生理食塩水
- MWCNT量の測定: 大西法

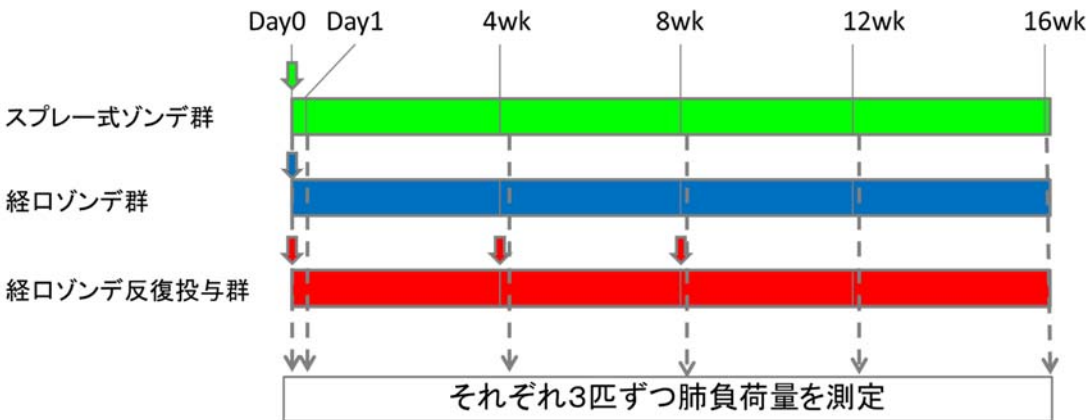


図 4. MWCNT の肺負荷量の経時変化 実験概要

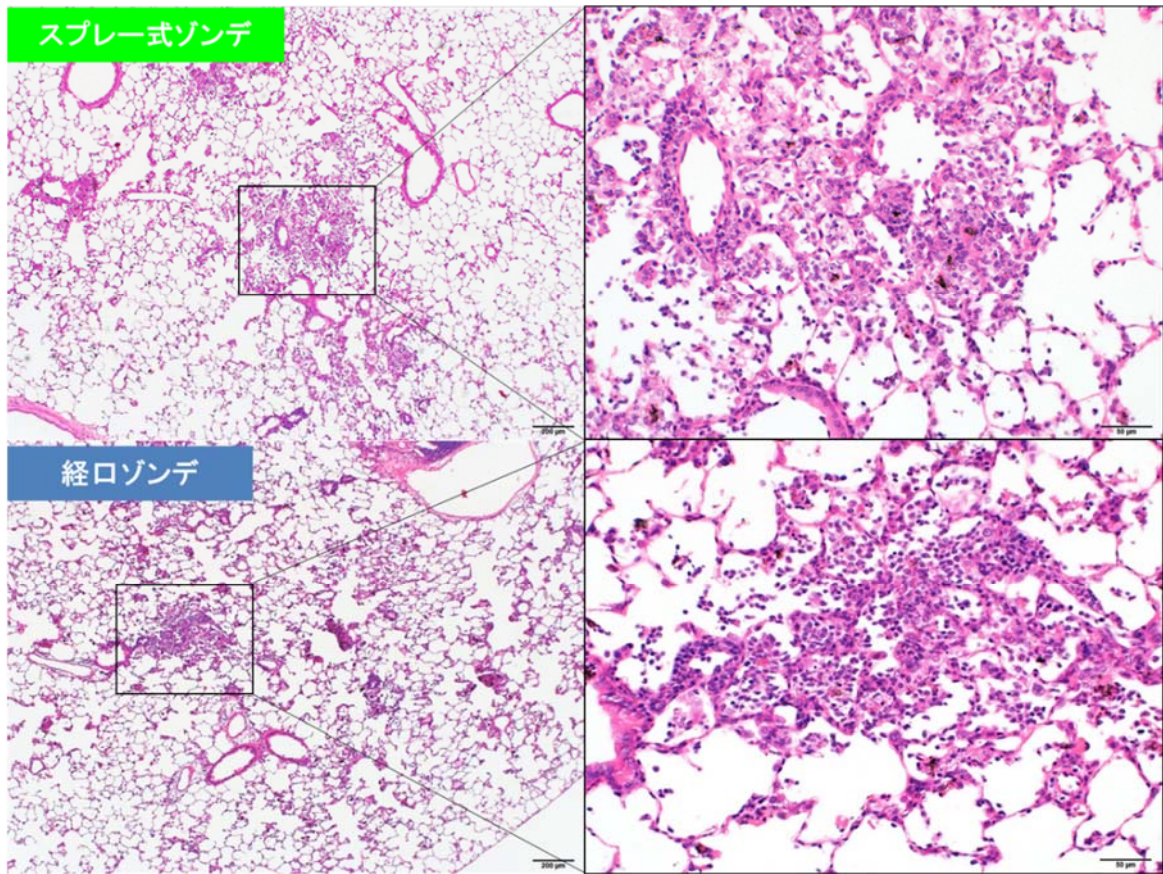


図 7. 反復投与後の肺の病理組織像

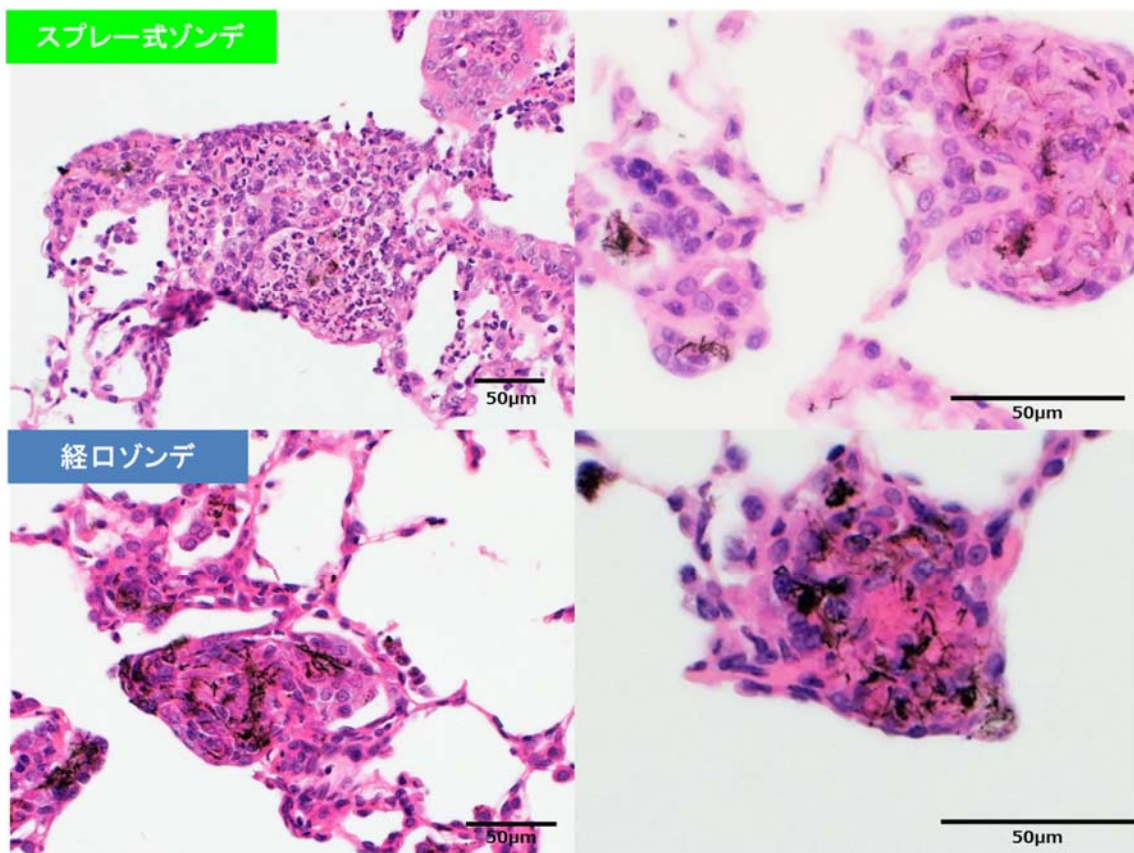


図 8. 反復投与後の肺の病理組織像 (肉芽腫)

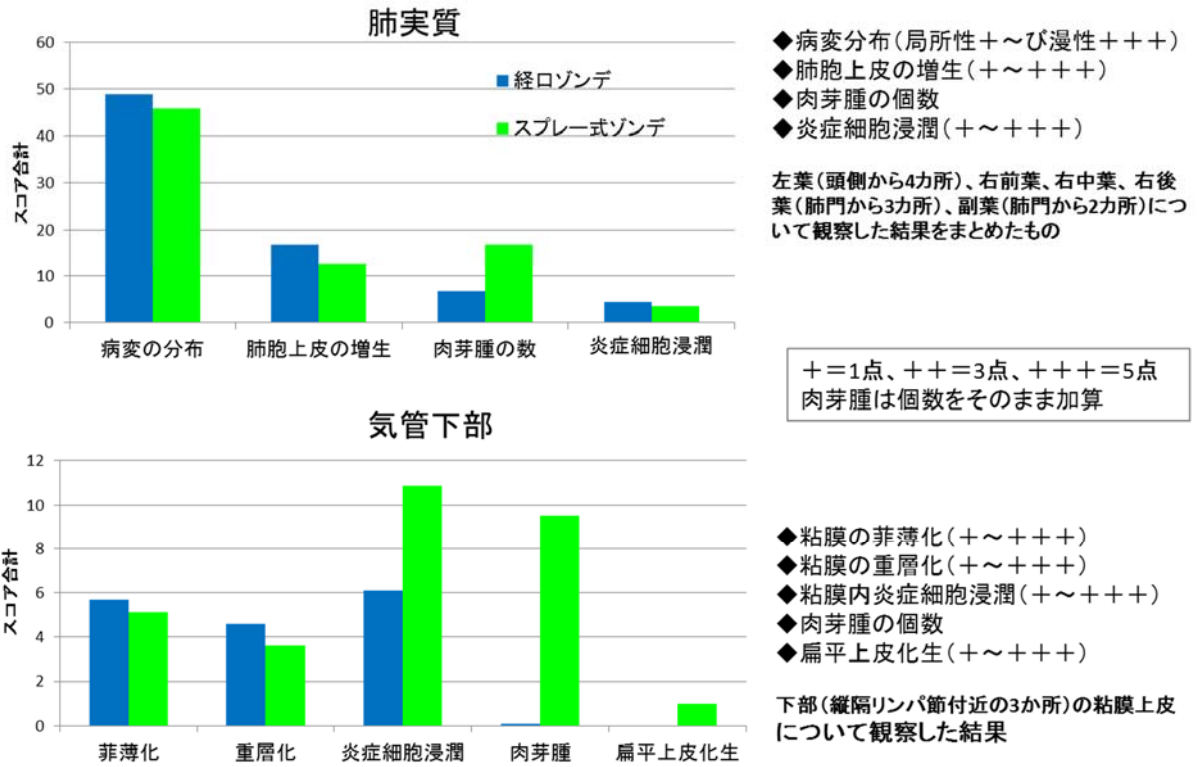


図 9. 反復投与後病理組織学的評価のまとめ

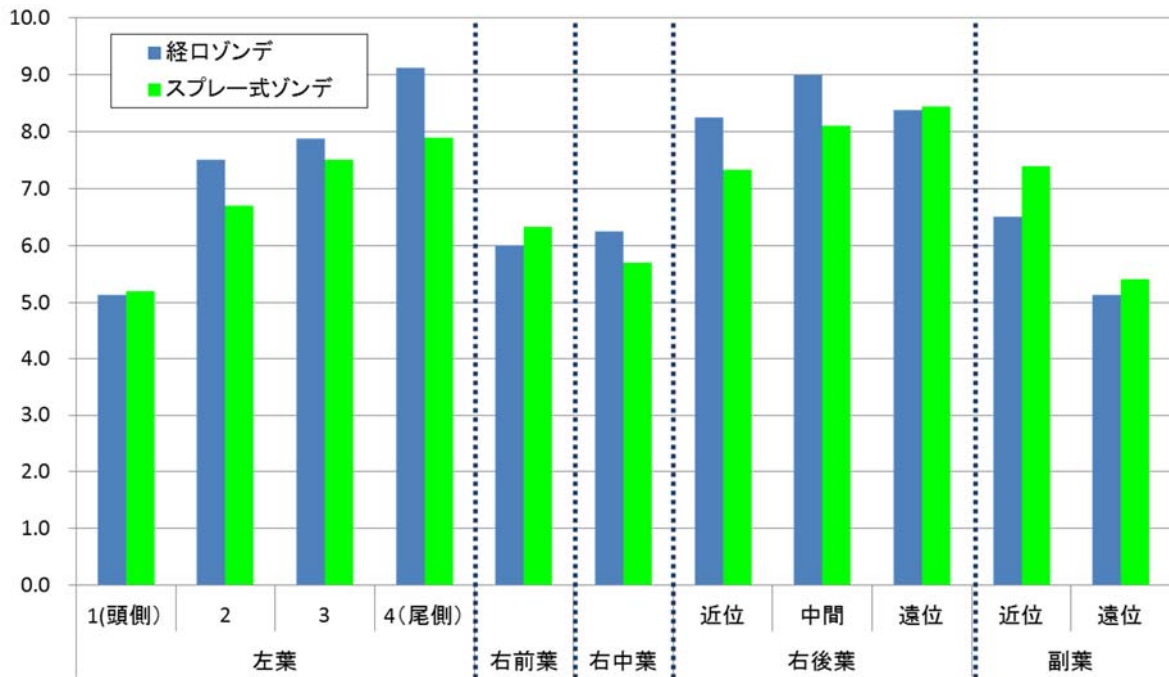


図 10. 反復投与後病理組織学的評価 (肺実質のみ、葉別の結果)

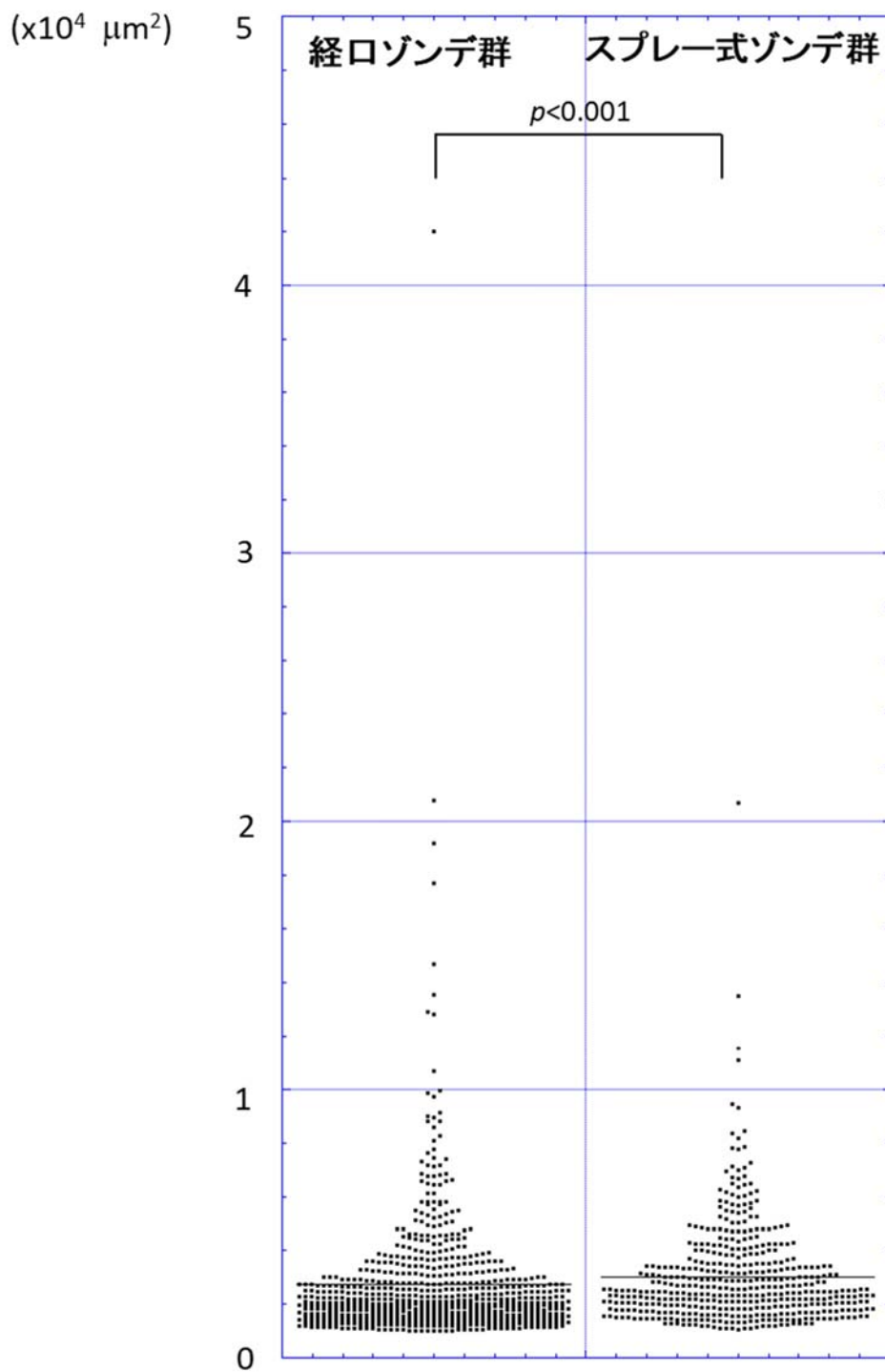


図 11. 反復投与試験における個々の肉芽腫の面積
 (経口ゾンデ 5 匹およびスプレー式ゾンデ 4 匹、それぞれの全データ)
 Mann-Whitney U test ($p < 0.001$)

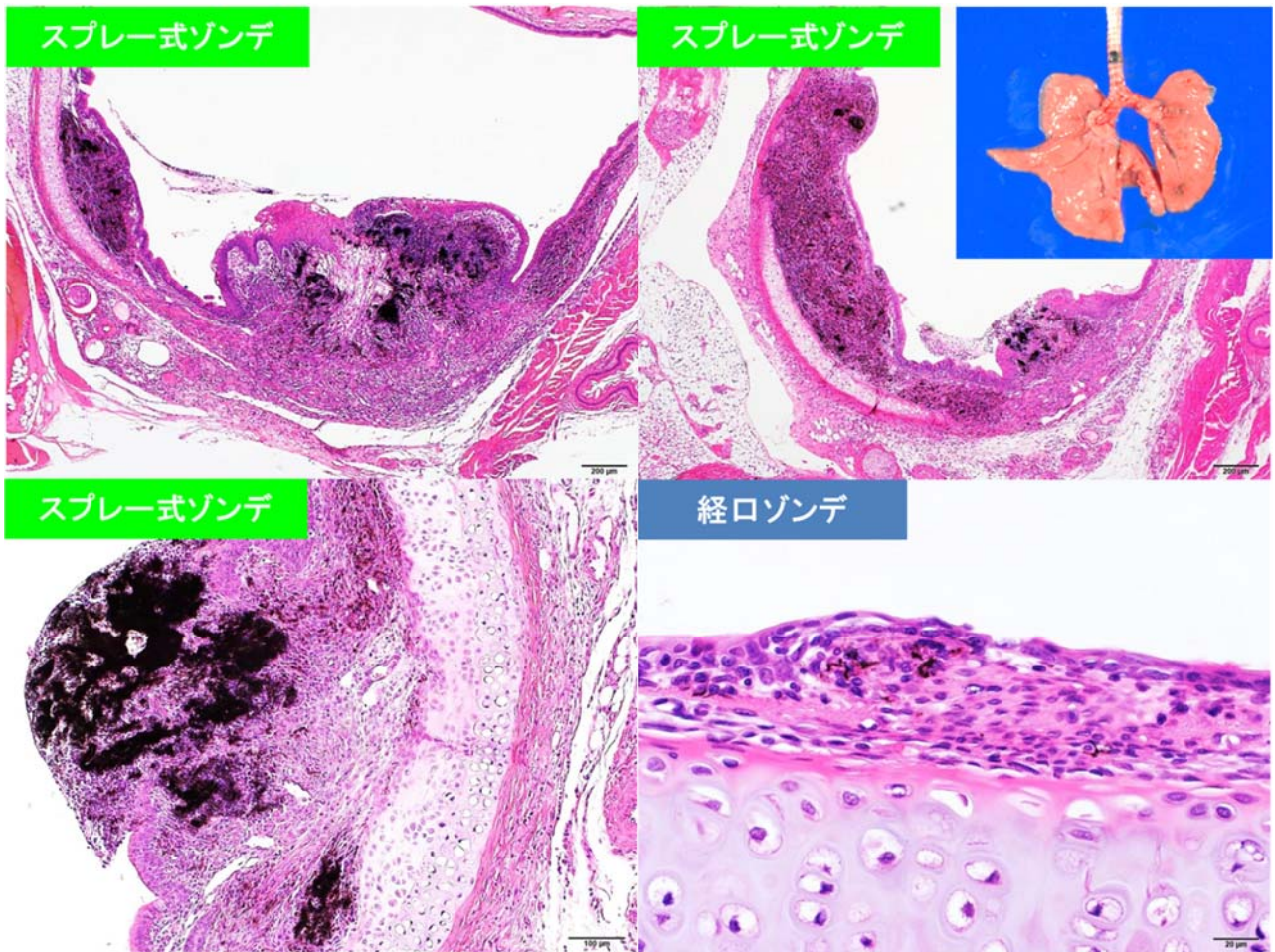


図 12. 気管上皮の大型の肉芽組織

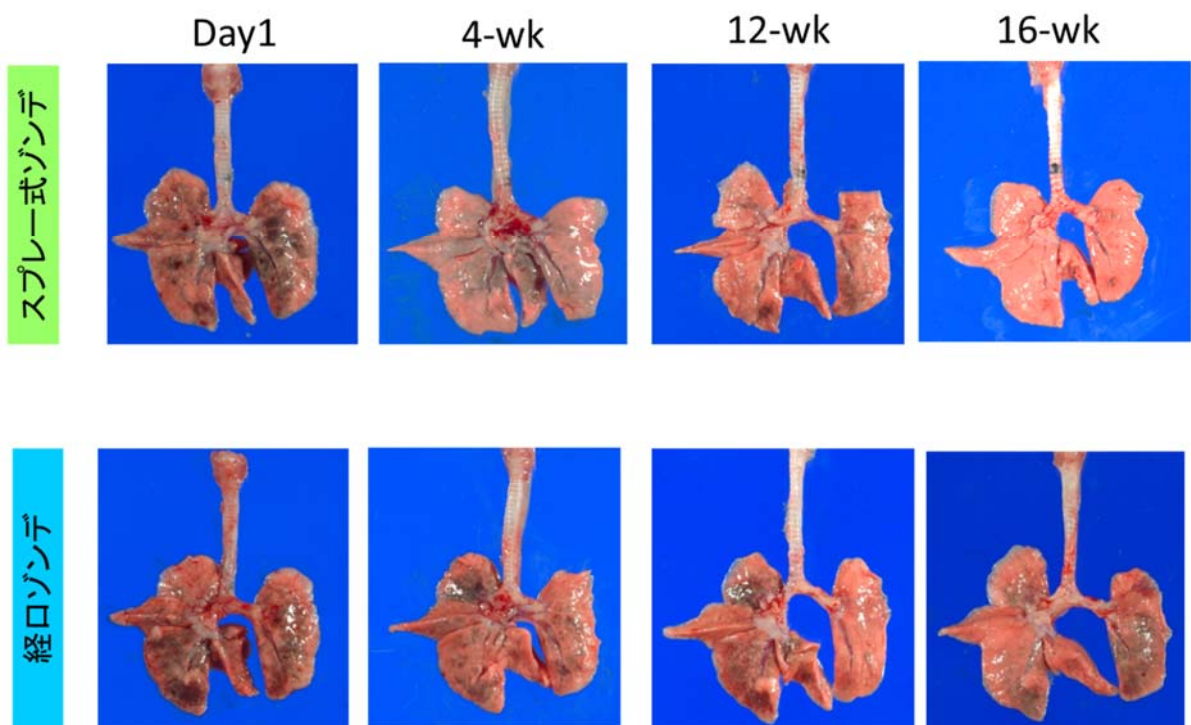


図 13. 単回投与後の肺組織の経時変化 (剖検時肉眼観察)

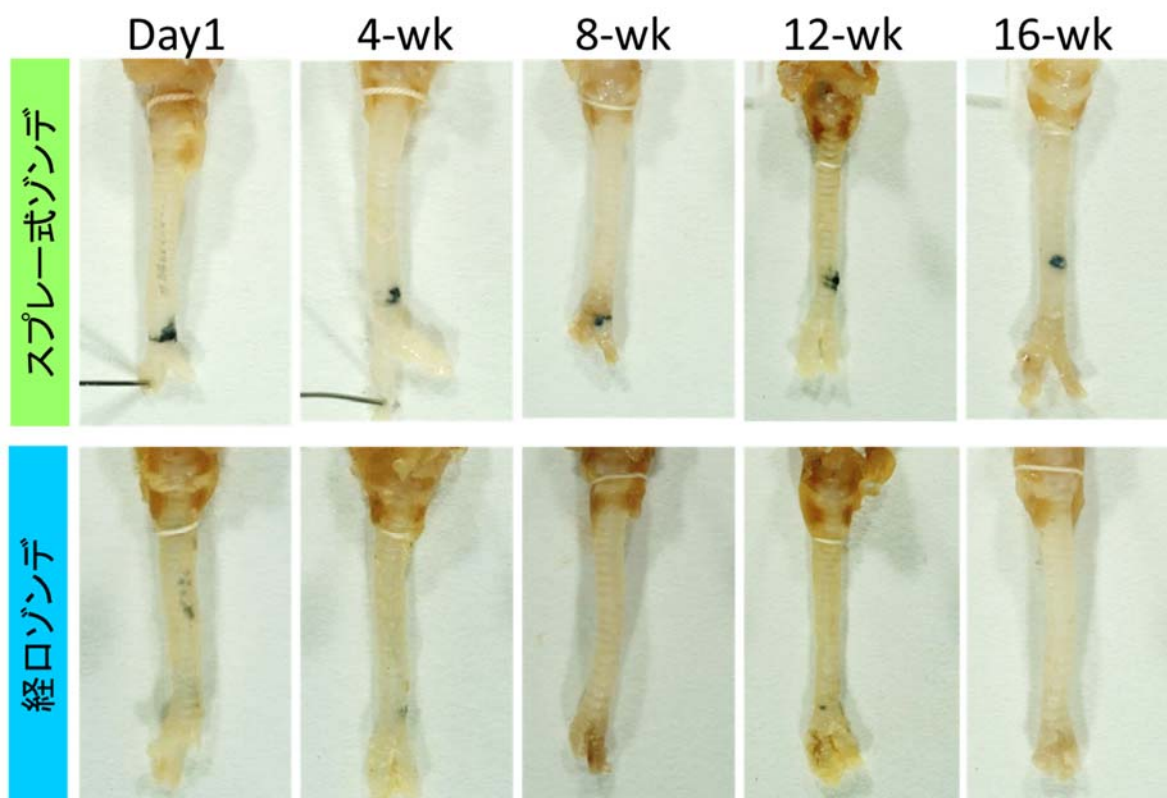


図 14. 単回投与後の気管における MWCNT 沈着 (固定後の肉眼観察)

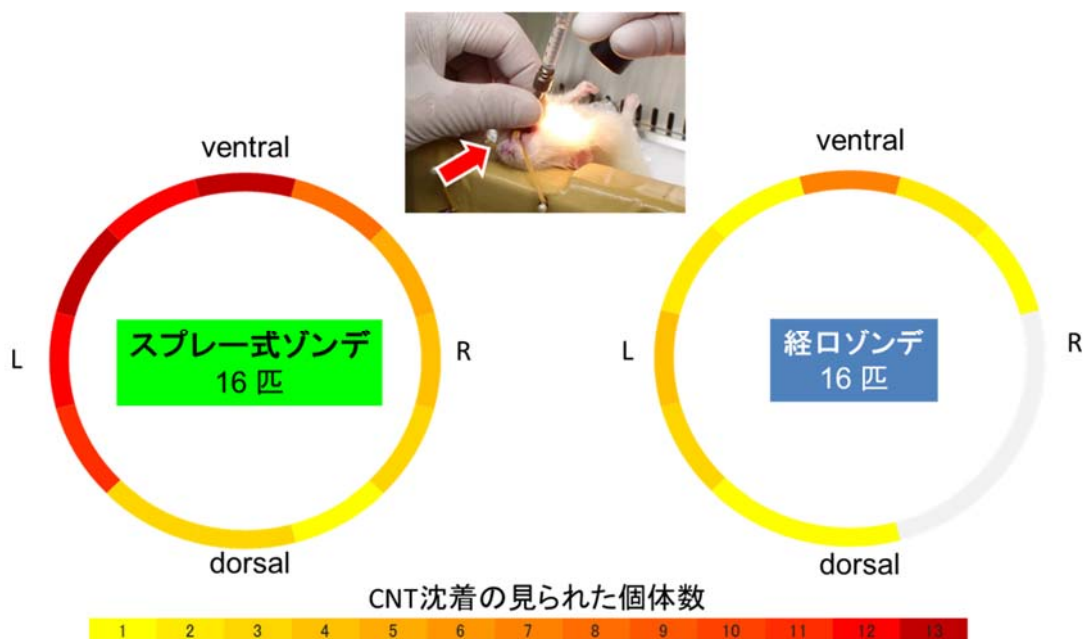


図 15. 気管の MWCNT の沈着部位

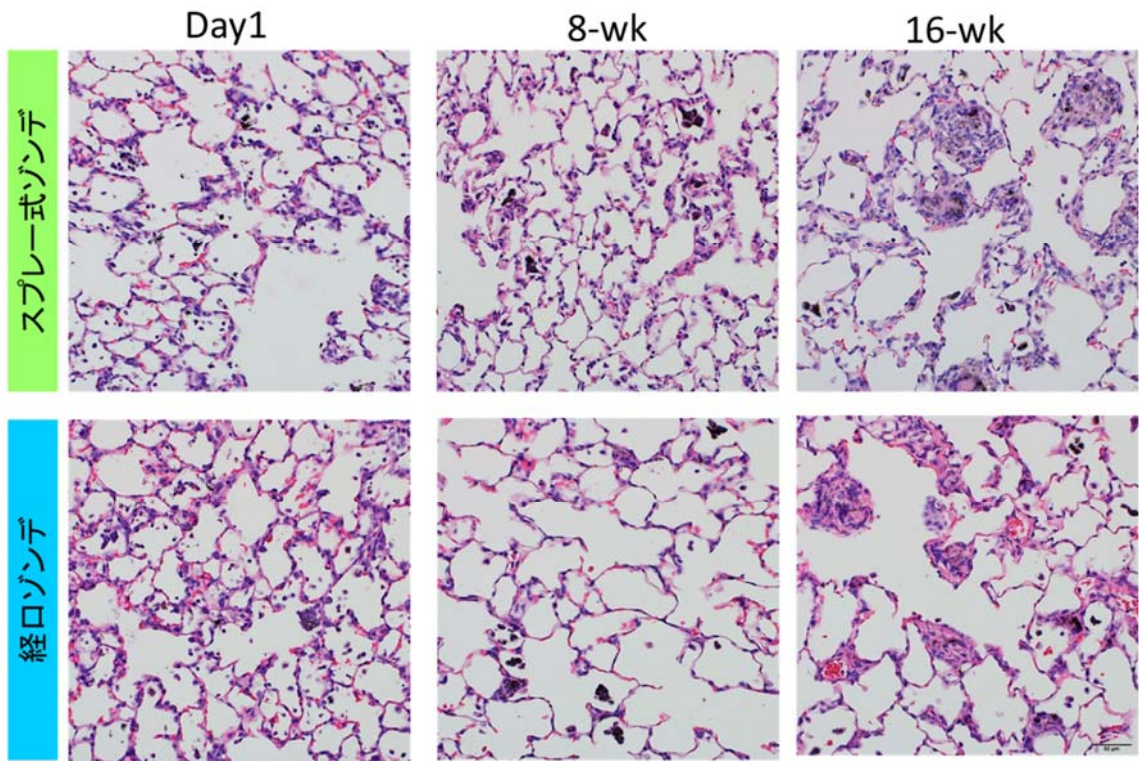


図 16. 単回投与後の肺の病理組織像

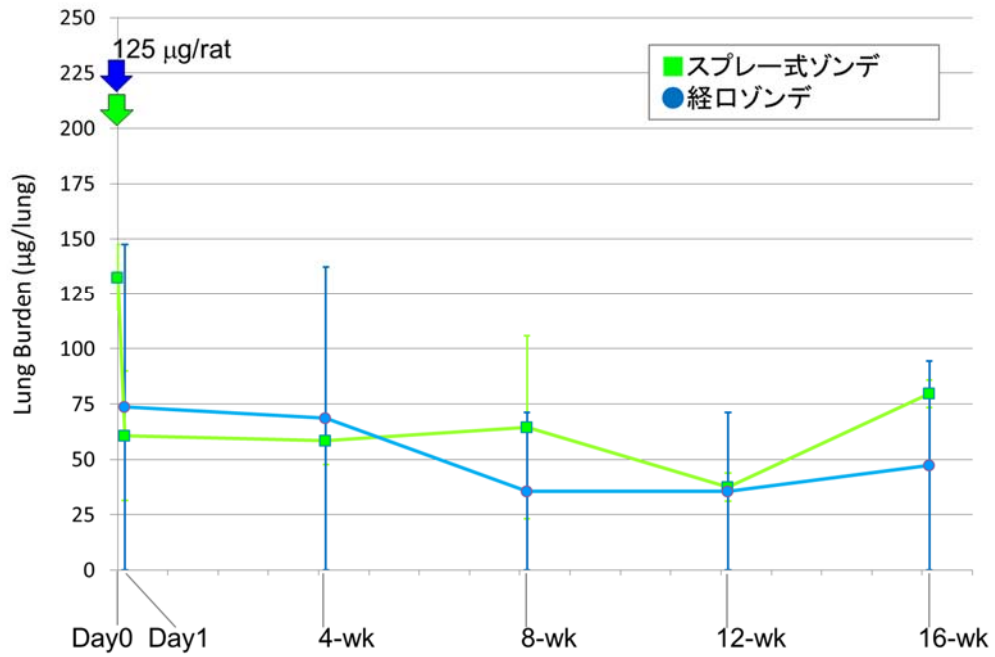


図 17. 単回投与後の肺負荷量の経時変化 (平均値±SD)

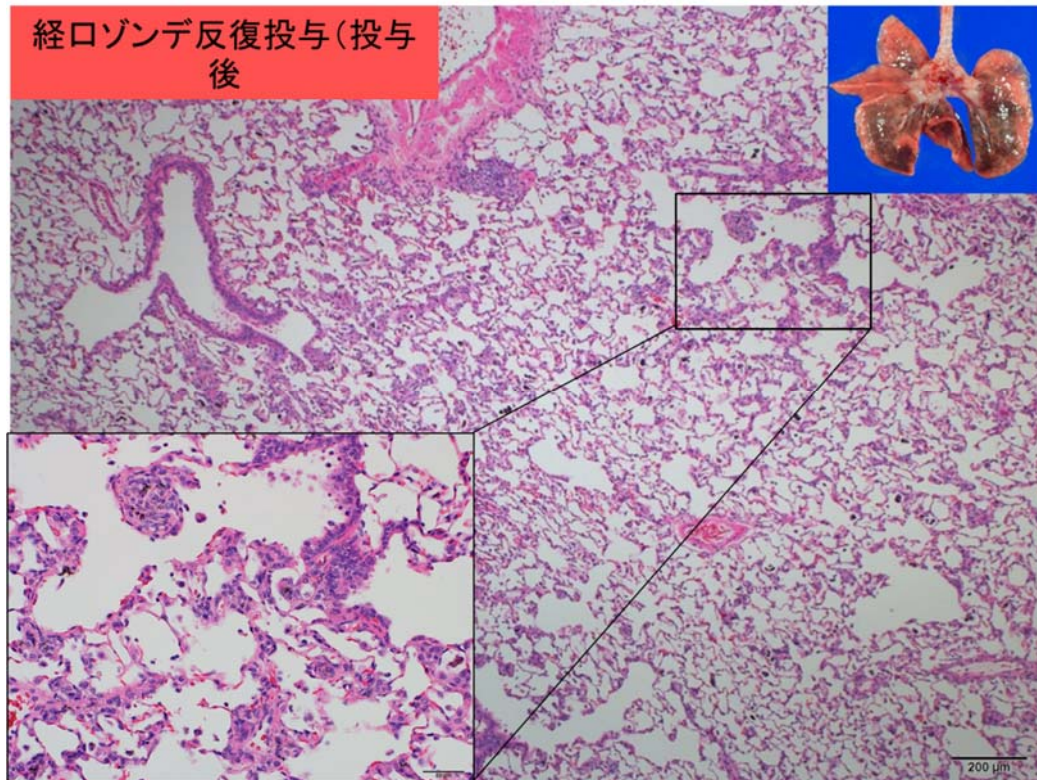


図 18. 3 回の反復投与後（初回投与から 16 週後）の肺の病理組織像

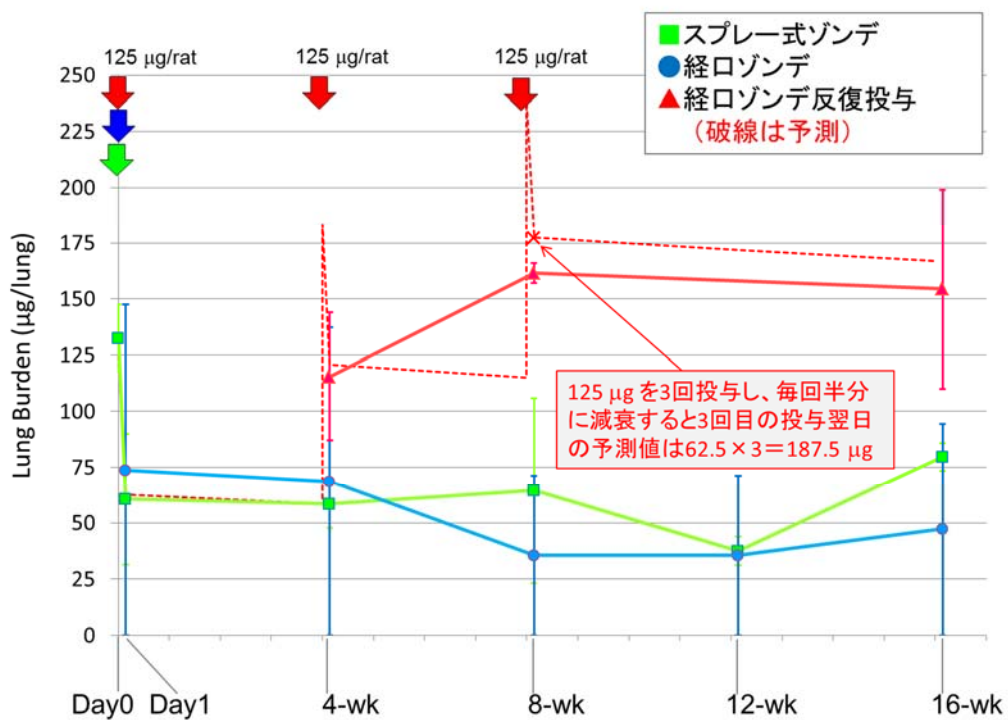


図 19. 反復投与後の肺負荷量の経時変化（平均値±SD）

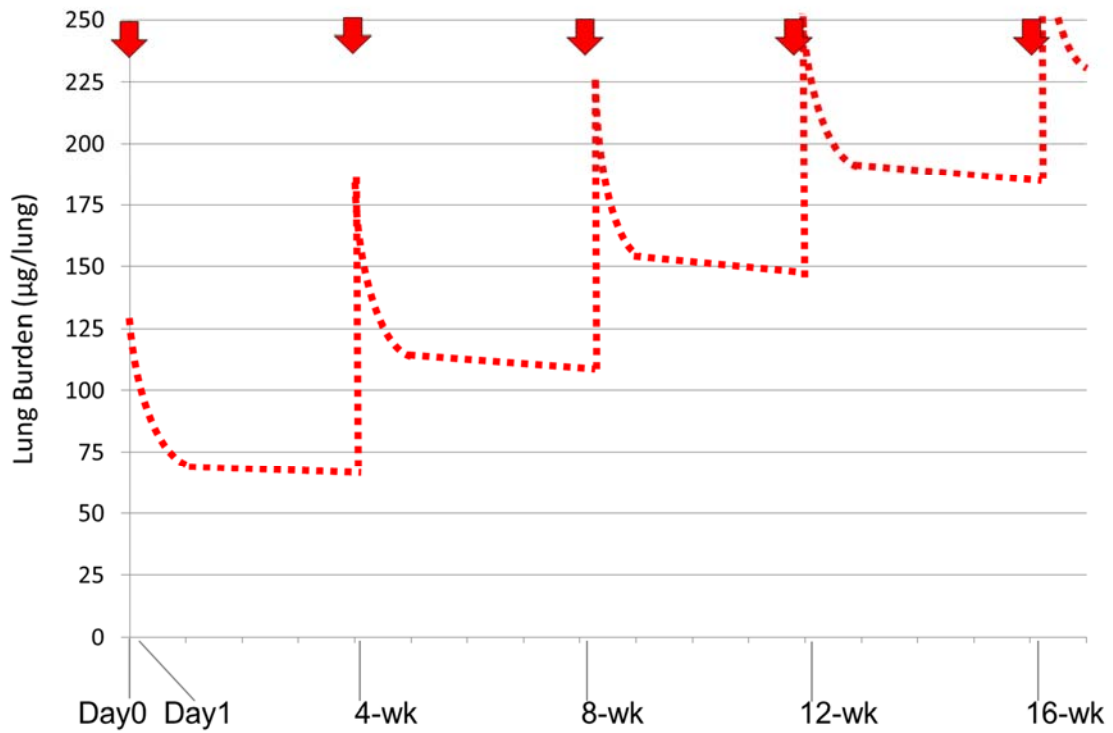


図 20. 反復投与による肺負荷量の増加の予測 (125µg/rat で投与した場合)

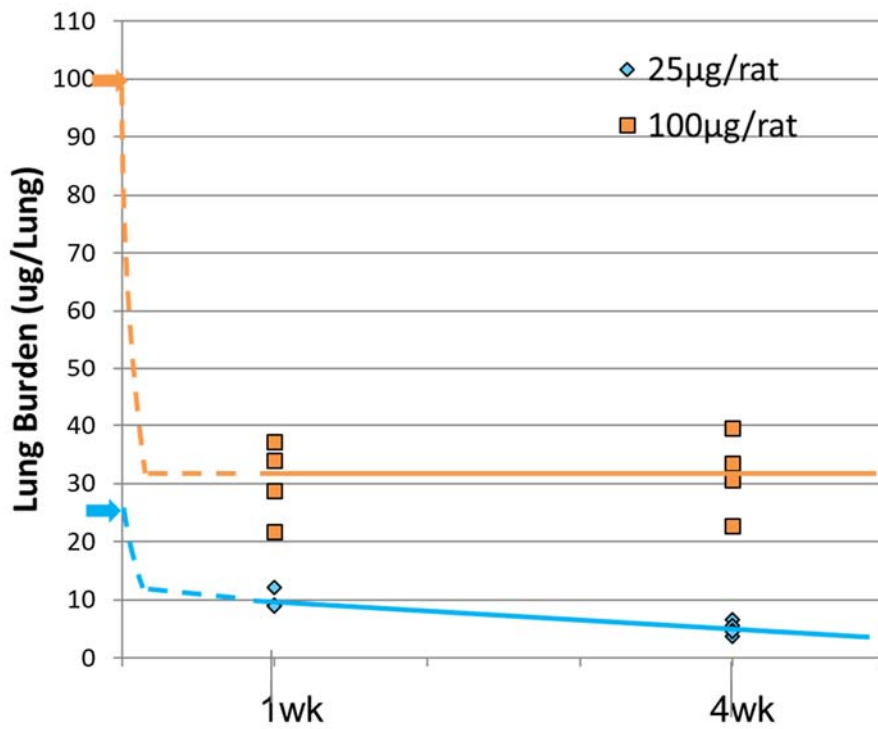


図 21. Taquann 処理 MWCNT の肺負荷量

表 1. 単回投与後の Taquann-MWCNT 残存量 (原末との比較)

MWCNT	器具	投与量 ($\mu\text{g}/\text{rat}$)	用量 (mg/kgBW)	4週後の残存量 ($\mu\text{g}/\text{lung}$)	残存割合 (%)
原末 MWNT-7	スプレー式ゾンデ	125	0.50	60.7	48.6
	経口ゾンデ	125	0.50	73.8	59.0
Taquann MWNT-7	経口ゾンデ	100	0.71	31.7	31.7
		25	0.18	5.0	20.0

表 2. 2年間の気管内反復投与試験の実験計画

群	予測総負荷 ($\mu\text{g}/\text{lung}$) ※	1回あたりの 投与用量 (mg/kg)	動物数		解剖		
					半年	1年	2年
対照群	0	0	40	病理・BAL・PL	5	5	30
				肺負荷量	0	0	0
低用量群	240	0.125	55	病理・BAL・PL	5	5	30
				肺負荷量	5	5	5
高用量群	1440	0.50	55	病理・BAL・PL	5	5	30
				肺負荷量	5	5	5
高用量群 (スプレー)	1440	0.50	55	病理・BAL・PL	5	5	30
				肺負荷量	5	5	5
無処置群	0	-	10	病理・BAL	0	0	10
				肺負荷量	0	0	0

※単回投与後4週間で高用量で30%、低用量で20%に減衰した場合の予測

BAL: 肺胞洗浄液、PL: 胸腔洗浄液