

平成30年度 厚生労働行政推進調査事業費補助金（化学物質リスク研究事業）
分担研究報告書

研究課題名：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：ナノマテリアルの気管内投与曝露評価手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：David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

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 Abd El-gied 名古屋市立大学大学院医学研究科
博士課程院生

Ahmed Maher Mahmoud El-Gazzar 名古屋市立大学大学院医学研究科研究生

沼野 琢旬 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究要旨

目的：申請者が開発したナノマテリアルの経気管肺内噴霧投与（TIPS法）による簡易 *in vivo* 毒性評価法を用いて、1）無コーティング・アナターゼ型二酸化チタニウム（球状・直径 6nm）（an）とコーティング・ルチル型二酸化チタニウム（長球形・直径 10-20 μ m）（ru）、およびチタン酸カリウム（ $K_2O \cdot 8TiO_2$ ）（線維状・平均長 6.0 μ m、直径 305 nm）（POT）の肺と胸膜における炎症と障害作用、細胞増殖刺激作用の解析を行った。

方法：F344 系雌ラットを用い検体を 500 μ g/mL 濃度にて 0.5%PF68 分散剤添加生食（PF68 saline）に懸濁して、15 日間に 8 回投与し（計 1 mg/ラット）、最終投与 6 時間および 4 週間後さらに 52 週後に屠殺した。投与物質は予め Taquann 法にてエアロゾル分散後に *tert*-ブチルアルコール（TBA）に溶解し氷結保存した。これを使用直前に凍結乾燥させて PF68 saline に懸濁して使用した。麻酔下に脱血致死させて、胸腔洗浄液（PLF）と細胞ペレットを採取し、右肺より肺胞洗浄液（BALF）、および肺組織を採取して、炎症サイトカイン値、炎症の状態、肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖について解析した。左肺は凍結保存し CCL 種について RT-PCR と ELISA 解析をした。対照は無処置および PF68 saline 群とし 104 週まで無処置観察した。また、長さの異なる二層カーボンナノチューブ（1.5、7.0、15 μ m の DWCNT）を同じ本数（ 22×10^{12} 本/ラット）を投与して、長さの差異と炎症反応の程度について比較する研究は投与 4 週屠殺群についてデータを解析中である。

結果：肺では 6h ではすべての群に $M\phi$ を含む肺胞内炎症がみられ、4 w では持続する異物炎症に加え POT 群に肺胞上皮と胸膜中皮の PCNA ラベル値、肺組織の CCL 種の高値がみられた。PLF 上清には *in vitro* でのヒト肺がんと悪性中皮腫細胞に対する増殖刺

激、BALFには細胞障害に起因するALPとLDHの高値が見られた。またPLF細胞ペレットには全ての投与群で投与検体が観察された。104週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度においてPOT(0.25と0.5mg合計)とMWCNT-7に有意の増加が見られた。悪性中皮腫はPOT群に計4/33例(12%)発生し、日本バイオアッセイ研究センターの対照群historical incidenceより140倍の高値であった(投稿中)。

結論: an、ruおよびPOTは肺胞に多数のMφを見る異物炎症を誘導し、POTでは4wでも粒子TiO₂よりも顕著であったことから、52週では胸膜中皮の過形成、104週では有意に高率に見られ、発がん性が証明された。この結果はこれらの難分解性被検体の長期実験においてTIPS法の実用性を示すものとする(投稿中)。さらに、長さの異なる二層カーボンナノチューブ(1.5、7.0、15micro-mのDWCNT)についても慢性試験を継続中である。

A. 研究目的

二酸化チタニウム(TiO₂)粒子は塗料・化粧品材料として広く利用されている。WHO国際がん研究機関(IARC)は、ナノサイズを含むTiO₂粒子をラットに吸入曝露した場合に肺発がん性を示すことからGroup 2B(動物において発がん性を示す十分な証拠がある)と評価している。鉱物として製錬されたTiO₂粒子は製造過程で熱処理によりアナターゼ型、ルチル型およびブルカイト型に分けられている。このうち、光触媒活性の強いアナターゼ型(an)は主として外壁塗料や白色色素として、ルチル型(ru)は化粧品等に用いられている。我々はこれまでに、ラットにおいて非コーティングruには肺発がんプロモーション作用がみられ、その機序にはruを食食したMφの産生するラジカルおよび分泌される炎症性タンパク(CCL3)による細胞増殖誘導作用が関与する事を明らかにしてきた(Xu, Carcinogenesis, 2010)。一方、anの有害性影響について、光・UV照射下での知見は乏しい。このために皮膚塗布と肺内TIPS投与にて実施してきた有害性研究においては、an(非コーティング、直径25nm)ru(非コーティング、直径20nm)について明らかな差異は観察されなかった(Numano, Asian Pacific J Cancer Prevention, 2014)。最近の研究におい

て、繊維状のカーボンナノチューブにはアスベストと似た発がん性を示すものがあることが分かってきた(Kasai, Particle and Fibre Tox, 2015; Suzui, Cancer Sci, 2014)。その機序について、繊維状の形状が発がんに関与するかについては未だ明らかではない。

本研究では、プラスチック等の補強材、自動車用ブレーキの摩擦調整剤、精密フィルターなどに広く用いられている線維状のTiO₂であるチタン酸カリウム(K₂O・8TiO₂)(POT)について、球状で直径6nmのアナターゼ型TiO₂(AMT-100)(an)および直径10-20μm類球形ルチル型TiO₂(ru)との肺と胸腔における障害作用について比較検討し、炎症反応の状態と持続性を明らかにし、52、104週屠殺を実施した。

さらに、長さの異なる二層カーボンナノチューブ(1.5、7.0、15micro-mのDWCNT)について22x10¹²本/ラット投与終了4週について解析している。

B. 研究方法

3種のTiO₂は日本化粧品工業会より提供された(広瀬明彦主任研究者より提供)。

10週齢F344雄ラットを用い、500μg/mlの濃度は無コーティングのan(直径6nm、AMT-100)、ru(直径10-20μm)およびPOT

(当研究室による計測にて平均長 6.0 μm 、直径 305 nm) について、Taquan 法にてエアロソル分散後 t-ブチルアルコールに溶解氷結し (高橋祐次博士、Taquahashi, J Toxicol Sci., 2013)、使用直前に凍結乾燥させて粉体とした生食中に 0.05% non-ionic, biocompatible amphiphilic block copolymers (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) (PF68) を加えた分散媒体に懸濁して 0.5mL (125 μg /ラット) を 15 日間に合計 8 回肺内噴霧 (TIPS) 投与した (計 1 mg/ラット)。最終投与の 6 時間後 (6h) および 4 週間後 (4w) に以下の検索を行った (各群 8 匹)。イソフルラン麻酔下に大動脈より採血によって致死させた後に開腹し、腹膜経由で胸腔中に 10ml の RPMI 1640 培養液を注入洗浄後に取り出し、胸腔洗浄液 (PLF) を得た。左肺は経気管的に採取した気管支肺胞洗浄液 (BALF) について炎症性細胞とくに M ϕ の検体貪食の状態と組織障害マーカー (ALP、LDH) の解析を行った。さらに左肺の一部は 4% パラホルムアルデヒド注入による固定をして病理標本とした。BALF を採取しない右肺は凍結保存し CCL 種の RT-PCR および ELISA 解析に用いた。

さらに、長さの異なる DWCNT は (1.5、7.0、15 μm) は POT の場合と同じプロトコールにて、各群 14~16 匹として 1 匹あたりの 2 週における全投与量は 22×10^{12} 本/ラットとなるように調整して投与した。陽性対照として MWCNT-7 を 1mg/ラット (15 μm の DWCNT の投与量 1mg/ラットに合わせた) 対照群は無処置と PF68 含有生理食塩水のみを投与した群とした。以上の条件で慢性試験を継続中である。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターで行った。実験計画書は、動物の愛護と使用のガイドラインに則り、名古屋市立大学大学院医学研究科

動物運営委員会の承認を経て行った。

C. 研究結果

1) 組織標本による肺胞上皮と臓側胸膜中皮の増殖の解析：無処置と生食対照群より明らかな炎症細胞浸潤の増強が見られた。6h では肺胞中に検体貪食 M ϕ と好中球が主として見られたが、4w では線維化肉芽が多く散見され、肉芽中には検体を貪食した M ϕ および好中球、リンパ球を主とする炎症細胞が見られた。肺胞上皮と臓側胸膜中皮の PCNA ラベル率は POT において PF68 生食対照群 (以下対照群) より増加した。

2) 凍結肺における炎症性 CCL サイトカイン種の解析：肺組織における CCL 種の RT-PCR 解析では、POT が 6h と 4w において有意の増加を示した。

3) BALF の解析：4w において ALP 活性は対照より増加し、さらに POT においてより高値であった。LDH では an と POT において増加した。LDH 活性も an と POT において増加した。

4) PLF と PLF 細胞ペレットの解析：胸腔洗浄液より得た M ϕ の初代培養のコンディショナル培養液において、ヒト中皮腫細胞 (Met5A) に対する増殖活性には有意の増加が見られた。PLF 細胞ペレットでは 6h において M ϕ と好中球が大多数を占め、4w でリンパ球の割合が増加した。また 6h と 4w のいずれにも偏光顕微鏡で視認される投与検体が検出された。

5) 52 週群では、肺 M ϕ 数は減衰するものの溶媒群より高値であった。一方、PLF のタンパク量、臓側胸膜中皮の PCNA は 3w (投与終了 1w) より有意に増加した。

6) 104 週では、肺胞上皮過形成・腺腫・腺がんの合計および胸膜中皮過形成と悪性中皮腫の合計頻度において POT (0.25 と 0.5mg 合計) と MWCNT-7 に有意の増加が見られた。悪性中皮腫は POT 群に計 4/33 例 (12.1%)

発生した。統計的有意差ではないが、日本バイオアッセイ研究センターの対照群 historical incidence より 140 倍の高値であり、IARC の Preamble における評価基準位における生物学的有意の発生頻度と考えられた（投稿中）。

D. 考察

すでにラットにおいて吸入暴露試験法によって肺発がん性が明らかにされている無コーティング ru (WHO/IARC Group 2B) について、我々の開発したナノ粒子の TIPS 投与による短期毒性リスク評価法を用いて、Mφ の分泌する CCL3 を介する発がん促進作用を見出した (Xu et al., Carcinogenesis, 2010)。また、ru を表皮剥離した皮膚に塗布しても障害作用は見られなかった (Xu et al., Food Chem Toxicol. 2011 および Sagawa et al., J Toxicol Sciences, 2012)。さらに、直径 25nm の an と直径 20nm の ru についても同様の *in vitro* および *in vivo* 試験で比較したが差異はなかった (Numano Asian Pac J Cancer Prev, 2014)。

以上の知見に基づき、光触媒活性がより顕著で、生物毒性がより強力である小さいサイズの 6nm の an と、長球形の ru、および線維状で Mφ に対するストレスがより顕著と考えられている POT を肺内に投与して 2 週後の急性毒性、4 週を経た亜急性毒性について検討した。その結果、検体の肺から胸腔への移動は 6h でも検出され、炎症は 6h と 4 w とも POT にやや強く、肺胞内における CD68 染色で認識される Mφ の数は、POT で有意の増加をみた。また 6w でも炎症の程度は持続して観察された。PLF における Mφ の分泌する CCL 種によると考えられる肺がん細胞と中皮腫細胞に対する増殖活性の観察等から、肺と胸膜組織への遷延性の炎症は繊維性の POT でより強く誘導されることは胸膜中皮において発がんに関連する病変とすると考えられた。

長さの異なる DWCNT については、今までの報告で 0.7micro-m の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかったこと (Muller, 2009) から、二つのことが明らかとなる。一つは長さ、さらに投与された本数と発がんの関係が明らかとなる。104 週の結果が待たれる。

E. 結論。

すべての検体において肺から胸腔への移動がみられ、Mφ の数は、肺から胸腔の炎症象は POT により顕著で、さらに肺がん細胞、中皮腫細胞の増殖活性は POT に強く見られた。POT には胸膜中皮において過形成病変を誘導し、これが発癌性と関連していると考えられる。また、DWCNT について、長さとともに投与本数と炎症、発がんの関係が明らかとなる。

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., 15:31(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., Alexander 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.*, <https://doi.org/10.1007/s00204-019-02410-z>, Feb. 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
2. 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 ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS) 試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪2018年7月
3. Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M.,

Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) Brussels, Belgium, Sept. 2018

H. 知的財産所有権の出願・登録状況 (予定も含む)

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
該当なし
3. その他
該当なし