

令和元年度 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及び遅発毒性評価手法の開発に関する研究

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

研究協力者：William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究協力者：Dina Mohammed Mourad Saleh 名古屋市立大学大学院医学研究科博士課程院生

研究協力者：Sivagami Gunasekaran 名古屋市立大学大学院医学研究科研究生

研究協力者：Omnia Hosni Mohamed Ahmed 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

研究協力者：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、以下の物質について肺と胸膜における炎症と障害作用、発がん性を明らかにした。

方法：F344雄ラットを用いて検体を分散剤添加（PF68）生食に懸濁して、15日間に8回経気管肺内（TIPS）投与し（計1mg/ラット）、投与終了後6時間、4、52、104週後に屠殺した。

1）無コーティング・アナターゼ型二酸化チタン（球状・直径6nm）（an）とコーティング・ルチル型二酸化チタン（長球形・直径10-20µm）（ru）、およびチタン酸カリウム（ $K_2O \cdot 8TiO_2$ ）（POT）（線維状・平均長6.0µm、直径305nm）（POT）の肺と胸膜における炎症と障害・細胞増殖刺激作用の解析を行った。2）カーボンナノチューブ（MWCNT）は、その長さで肺・胸膜中皮への障害性・発がん性との相関を明らかにする目的で、長さの異なる2層カーボンナノチューブ（1.5、7.0、15µmのDWCNT）を1匹あたり同じ本数（ 22×10^{12} 本）になる様に調整して投与した。

結果：1）チタン：POTにおいて、52週では胸膜中皮の過形成が見られ、104週では悪性中皮腫は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 の40倍であり生物学的に有意と判断された。2）長さの異なる2層カーボンナノチューブの104週投与終了群について解析中である（病理標本作成中）。

結論：1）POTでは、胸膜中皮の過形成は、52週から発生し104週では生物学的有意の増加となり、POTに初めて発がん性を見出した（Particle and Fibre Toxicol, 2019）。2）1.5、7.0、15µmのDWCNT1.5、7.0、15µmのDWCNTについては解析中である。104週について解析中である（病理標本作成中）。

A. 研究目的

1) 二酸化チタニウム (TiO_2) 粒子は塗料・化粧品の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 TiO_2 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。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 を貪食した M ϕ 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) 品研究では、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 TiO_2 であるチタン酸カリウム ($\text{K}_2\text{O} \cdot 8\text{TiO}_2$) (POT) について、球状で直径 6nm のアナターゼ型 TiO_2 (AMT-100) (an) および直径 10-20 μm 類球形ルチル型 TiO_2 (ru) との肺と胸腔における障害作用および発がんについて比較検討した。

2) 最近の研究において、多層 (40 層以上) 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 (Suzui, Cancer Sci, 2014; Kasai, Particle and Fibre Tox, 2015; Numano, 2019)。その機序については、繊維状の形状、壁層数または長さが障害性と発がん性に関与するかについては明らかではない。本研究では長さの異なる薄層 (2 層) カーボンナノチューブ (1.5、7.0、15 μm の DWCNT) を各長さ、 22×10^{12} 本/ラットにて投与終了して、急性炎症像と発がん性について検討した。

B. 研究方法

1) an、ru および POT は広瀬明彦主任研究者より提供された。10 週齢 F344 雄ラットを用い、500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ の濃度は無コーティングの an (直径 6nm、AMT-100)、ru (直径 10-20 μm) 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て生食中に 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投与液とし、0.5mL/ラット (=125 μg /ラット) を 15 日間に 8 回肺内噴霧 (TIPS) 投与した (合計量 1 mg/ラット)。最終投与の 6 時間後 (6h) および 4 週後 (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。投与終了後 6 時間、 4、52、104 週後に屠殺した

(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) 酸化チタニウム : (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 : 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、4 w 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 および好中球と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 4 w に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) 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 有意の増加が見られた。

(5) 52 週群では、肺 M ϕ 数は減衰するもの の溶媒群より高値あった。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 (12.1%) 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おける 生物学的有意の発生頻度と考えられた

(Mohamed et al, Particle and Fibre Toxicol, 2019)。

2) 1.5、7.0、15 μm の DWCNT については解析中である。陽性対照の MWCNT-7 では 104 週に達する前にすべてのラットは 胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

D. 考察

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 M ϕ 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 M ϕ 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と考えられた。事実、この研究におけるTIPS投与後104週観察する実験において発がん性を強く示唆する（がん発生頻度が生物学的に有意）結果が得られた。

また、長さの異なるDWCNTについて、今までの報告で0.7 μmのMWCNTの腹腔内投与では発がん性はみられなかった報告(Muller, 2009)から、1.5、7.0、15 μmのDWCNTについてTIPS投与を行った。発がんについて病理学的結果が待たれる。

E. 結論。

1) 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、さらに投与本数と炎症、発がんの関係が明らかとなる。

2) 1.5、7.0、15 μmのDWCNTについては解析中である。陽性対照のMWCNT-7では104週に達する前にすべてのラットは胸膜悪性中皮腫悪性中皮腫で死亡している。

F. 健康危険情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander TW.,

Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid, M., Khaled AA., Takahashi S., Alexander BD, Tsuda H. Carcinogenic effect of potassium octatitrate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration, *Particle and Fibre Toxicology* <https://doi.org/10.1186/s12989-019-0316-2> 16:34, 2019.

Tsuda, H., Alexander D. Development of intratracheal intrapulmonary of spraying (TIPS) administration as a feasible assay method for testing the toxicity and carcinogenic potential of multiwall carbon nanotubes, In *Vivo Inhalation Toxicity Screening Methods for Manufactured Nanomaterials*, Toru Takebayashi T., Landsiedel R., Gamo M. eds, In *Current Topics in Environmental Health and Preventive Medicine*, Springer (Springer Nature Singapore Pte Ltd), pp145-163, 2019, DOI:10.1007/978-981-13-8433-2

Numano T., Higuchi H., Alexander D., Alexander W., Abdelgied M., Elgazzar AM., Saleh D, Takase H., Hirose A, Naiki-Ito A., Suzuki S., Takahashi S., Tsuda H. MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats, *Cancer Sci.*, 110 (8): 2485-2492, 2019

Fukamachi, K., Hagiwara Y., Futakuchi M., Alexander DB., Tsuda H., Suzui M. Evaluation of a biomarker for the diagnosis of pancreas cancer using animal

model. J Toxicol. Pathol., 32(3):135-141,
2019

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

Tsuda H., Demonstration of the
carcinogenicity of a flexible tangled
multi-walled carbon nanotube in the rat
lung, AACR サテライトミーティング
-Environmental Carcinogenesis:
Potential Pathway to Cancer Prevention,
Charlotte (USA) 2019年6月

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