

**厚生労働科学研究費補助金研究報告書**  
**化学物質リスク研究事業**

**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**

平成 28 年度

総括・分担研究報告書

**研究代表者 津田 洋幸**

平成 29 年（2017 年）5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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)

平成 28 年度 総括・分担研究報告書  
研究代表者 津田 洋幸

平成 29 年 (2017 年) 5 月

## 目 次

．総括研究報告書	1
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 津田 洋幸	2
．研究分担報告書	9
1．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 津田 洋幸	10
2．フラーレンナノウィスカーの肺・胸膜毒性および発がん性に関する研究 内木 綾	14
3．動物実験 遺伝子蛋白解析 菅野 純	17
4．カーボンナノチューブ吸入暴露による気道クリアランスと 細胞マクロファージへの影響 山村 寿男	26
．研究成果の刊行に関する一覧表	30
．研究成果の刊行物・別冊	33



平成 2 8 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 )

・ 総括研究報告書

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

研究代表者:津田 洋幸

名古屋市立大学津田特任教授研究室 特任教授

### 研究要旨

カーボンナノチューブ (CNT) は生体内で難分解性であるために吸入されると肺・胸膜等に沈着して異物炎症を誘発する。このような粉体・線維状物質の有害作用の評価には吸入曝露試験が要求されている。しかし、現状ではその専用設備と高額な稼働費用のために、世界で唯一 MWCNT-7 の吸入曝露試験が実施され、その肺発がん性が報告されたのみである。本研究では、経気管肺内噴霧投与 (TIPS) によって、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺胞 M<sub>1</sub> を介する肺障害と細胞増殖刺激作用の評価、胸腔洗浄液による胸膜病変の把握、短期 (投与終了後 1 日～4 週) 及び長期 (52 週と 104 週) 観察による発がんの早期病変と発がん性の検証を行った。検体は、既に発がん性が明らかにされている MWCNT-7 (吸入曝露試験・日本バイオアッセイ研究センターで実施)、および申請者らが TIPS 投与後 2 年の観察にて発がん性を明らかにした MWCNT-N (Cancer Science, 2016) を陽性対照として、長さ・形状・層数の異なるいくつかの MWCNT とチタニウム化合物について解析を進め、普遍性のある高効率の気管内投与評価系を確立しつつある。

津田は、① 2 週間 TIPS 投与ラットの肺胞・細気管支中の M<sub>1</sub> の培養上清および胸腔洗浄液について、肺胞と胸膜中皮由来の不死化細胞等に対する増殖活性とその因子の把握を行っている。また投与物質の分散性のさらなる向上のために、凝集体・凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法 (Taquann 法を) を改良している。

② 同様の 2 週間 TIPS 投与・無処置観察試験: 2 週間の TIPS 投与後に無処置にて 2 年までの経時的観察を行い、発がん性の簡易スクリーニング法の開発とその早期病変の把握を試みた。その結果、発がん陽性検体の MWCNT-7 と MWCNT-N を含めて幾つかの MWCNT を貪食させた M<sub>1</sub> 初代培養上清の肺胞と胸膜中皮細胞等に対する増殖活性試験が観察され、胸腔洗浄液等の解析とほぼ同じ結果が得られた。この系において 2 層カーボンナノチューブ (DWCNT) について上記の方法にて解析を進めている (津田)。

内木は、フラーレン分子 (FL) およびフラーレンから構成され鉄を全く含まないフラーレンウィスカー (FLW)、発がん性において陽性対照の MWCNT-7 による肺、胸膜中皮の細胞障害性、増殖活性および発がん性に対する酸化ストレスの役割についての解析を津田と同じ①、②の結果を解析中、③の実験は経過中である

菅野は、Taquann 法の超音波の出力を上げることによって MWCNT-N について検討したところ、2.5 mm 以下の繊維は 14.7%、5 mm 以上は 85.7%、10 mm 以上は 52.0%、平均繊維径は 70nm であり、中皮腫発がんに寄与する可能性のある繊維が高率に含まれていると考えられた。

山村は、TIPS 法にて投与した MWCNT-7 の気道および肺での異物排除機構を担う気道上皮繊毛細胞と肺胞マクロファージに注目して、蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系にて曝露により細気管支の炎症によって閉塞するため、肺への異物侵入が少なかったが、MWCNT-L (針状) 曝露によって、肺胞マクロファージの生存率は有意に減少した。一方、MWCNT-S (毛玉状) の肺胞マクロファージに対する毒性は弱いことが分かった。

## 研究分担者

- 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 講師
- 菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 客員研究員  
独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター  
所長
- 山村 寿男 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野 准教授

## 研究協力者

- 徐 結苟 名古屋市立大学特任教授
- 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院生
- Ahmed Maher Mahmoud Elgazzar 名古屋市立大学大学院医学研究科研究員
- 高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所  
安全性生物試験研究センター  
毒性部 室長
- 神藤 秀基 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野
- 山田 茜 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野
- 鈴木 良明 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野 助教
- 今泉 祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科細胞分子薬効解析学分野 教授

## A. 研究目的

金属粒子、炭素線維等は生体内で分解されないために、肺内に吸引されたCNTは肺胞・肺胞壁、胸膜等に沈着して異物炎症を誘発するために発がん性

が疑われてきた。事実、MWCNTのひとつであるMWCNT-7は全身暴露吸入曝露試験によって肺発がん性が見出された（労働者安全機構・日本バイオアッセイ研究センター）が、MWCNTは事業者によって形状・物性が異なるために、この結果をほかのすべてのMWCNTに適用することはできない。MWCNTの年間生産量は本邦で100t、世界で300t程度であるが（経済産業省ナノマテリアル情報提供シート等）、吸入曝露試験には高額な専用設備と稼働費用が要求されるために、多くは毒性・発がん性試験が実施され無のままに上市されようとしている（IARC Group 3の状態）。最近では2層のDWCNTが多く生産されるようになった。

申請者らは、MWCNTのTIPS投与による胸腔の顕著な炎症と胸膜中皮増殖、それに対するM 分泌サイトカインの関与（Cancer Sci, 2010）を見出し、MWCNT-N（N社製、MWCNT-7とは別の事業者）投与後の観察によって胸膜中皮の持続増殖（Cancer Sci, 2012）が誘導されて2年後にはがんの発生に至ることを見出した（Suzui, Cancer Sci, 2016）。この知見に基づき、本研究では、津田らが開発した経気管肺内噴霧投与（TIPS）法によってラットを用いて生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ（MWCNT）について、特にM による検体の貪食によって分泌される肺胞、気管・気管支、胸膜組織におけるサイトカインおよび酸化ストレス（ROS）に注目した有害性・発がん性について、安価にして信頼性の高い評価法の確立と前駆病変の把握についての研究を行った。

## B. 研究方法

1) ① 短期TIPS投与による炎症・増殖性病変の解析：

MWCNTは気中分散後にt-butyl alcohol（TBA）に懸濁凍結させた状態（Taquann法）（Taquahashi, Toxicology Lett, 2016）にして、投与直前にTBAを凍結乾燥後直ちにPF68コポリマー液含有生食中に分散させて125 µg/0.5mlを15日間に8回（計0.25～1mg/ラット）投与後に屠殺する。肺は、1）メッシュ濾過法または肺胞細気管支洗

浄液にてM を採取し、一定量のM をRPMI 1640 (10% FBS) 培地に移し24時間培養して得られた培養上清のヒトがん細胞A549肺がん・Met5A(中皮細胞)・MESO-1/2(悪性中皮腫細胞上皮型/肉腫型)・CCD34(肺線維芽細胞)等に対する増殖活性を観察する。胸膜洗浄液についても同様の解析を行った。

2) 凍結試料とパラホルムアルデヒド1日固定後病理標本とする。凍結試料からRNA、蛋白を抽出して炎症性サイトカインと酸化損傷マーカーの解析を行い、サイズと形態との関連について相関性を明らかにする。MWCNTの量はB(ghi)P 吸着による定量測定(日本バイオアッセイ研究センター・大西法)を行う予定である。さらに検体のTaquann分散法について、エアロソル分散後TBA分散剤中にてさらに強力な超音波(出力160W)で30秒間の超音波照射を繰り返し、分散状態の向上を図った(津田、内木、菅野)。

② 短期TIPS投与後2年までの経時観察による慢性毒性・発がん性観察:

2週間TIPS投与終了後に無処置にて2年までの無処置群を置いて観察する。各検体について、投与終了時、52週、104週で屠殺して病変の持続性と可逆性並びに最終的な発がんに関して、各検体の特性を考慮しつつ検討する。具体的には、胸腔洗浄液の解析、血清サイトカイン解析、全身臓器の病理組織学的観察及び肺と胸膜中皮の前がん病変を含めた腫瘍病変の発生頻度・個数を解析する。また被検物質の肺、胸腔以外に、肝、腎、脾、リンパ節及び全身臓器への移行について偏光顕微鏡観察にて明らかにする。さらにパラフィンブロックから戻し電顕標本とし、走査・透過電顕により粒子凝集体の組織と細胞内局在の同定を行っている。この長期実験は経過中にある。

以上①②において、MWCNT-7(針状、長さ3.5 $\mu\text{m}$ ・直径30~80nm)及びMWCNT-N(日機装、針状、長さ2~4 $\mu\text{m}$ ・直径30~80nm)(以上発がん陽性対照)を陽性対照として、幾つかのMWCNTについての実験が進行中である(津田、内木)。

2)MWCNTの気道クリアランスの測定をするために、蛍光シリカビーズをマーカーとしてPBS(-)溶液に

懸濁し、ラット気管内に噴霧した後に気管と肺を摘出した。摘出した器官の洗浄液から蛍光ビーズを回収し、蛍光強度を測定した。またラット肺胞マクロファージにMWCNT-S、MWCNT-L、PF68(溶媒)をそれぞれ添加し、細胞生存率をMTT法で測定した。また、細胞障害性は乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイで行った(山村)。

### 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、各職員は「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、当該法令の規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる研究は行わない(全員)。

### C. 研究結果

1) ①MWCNTを貪食させた培養上清の肺胞と胸膜中皮細胞等に対する増殖活性試験は、層数の少ない(柔らかい)二層CNT(DWCNT)について、陽性対照のMWCNT-7と同様に肺がんと胸膜悪性中皮腫細胞に対する増殖刺激作用がみられた(津田)。また、このモデルにおいてFLとFLWを投与した実験では投与終了1週目の剖検を実施した。肺重量は、無処置群(絶対重量0.96 $\pm$ 0.04g、相対重量0.32 $\pm$ 0.01g)と比較して、対照群(絶対重量1.34 $\pm$ 0.03g、P<0.001、相対重量0.47 $\pm$ 0.01g、P<0.001)、FL群(絶対重量1.40 $\pm$ 0.08g、P<0.001、相対重量0.50 $\pm$ 0.03g、P<0.001)、FLW群(絶対重量1.50 $\pm$ 0.09g、P<0.001、相対重量0.54 $\pm$ 0.04g、P<0.001)、MWCNT-7群(絶対重量1.60 $\pm$ 0.07g、P<0.001、相対重量0.56 $\pm$ 0.03g、P<0.001)、MWCNT-N群(絶対重量1.64 $\pm$ 0.04g、P<0.001、相対重量0.59 $\pm$ 0.01g、P<0.001)で有意な増加を認めた。また、対照群と比較して、FL群では肺の絶対および相対重量に有意な変化はなかったが、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、有意に増加した(いずれもP<0.001)。現在増殖刺激、病理検査等の解析を実施中である(内木)。

検体の分散性において、MWCNT-Nの原末500mg

に 35 ℃ に加温して溶解した TBA 約 250mL を加えて小型ホイッパーで攪拌混合した。次に、混合液を氷冷しながら MWCNT-N と TBA を十分に混和し 1,000 mL 容量のメディウム瓶に移し、-25 ℃ で凍結した。約 60 ℃ に加温した TBA を添加し全量を 1,000mL とした。凍結再融解した MWCNT-N の TBA 懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置 160W で 30 秒間照射を繰り返して混合液を得た。続いて MWNT-7 と同様に濾過、凍結・固化した。MWCNT-N の平均繊維長は  $8.5 \pm 5.5$  nm (N=279) 最大値 36.4 nm、最小値 0.7 nm であった。繊維長のヒストグラムから、2.5 nm 以下の繊維は 14.7%、5 nm 以上は 85.7%、10 nm 以上は 52.0% であった(菅野)。

② MWCNT を 2 週投与後 2 年観察する長期試験は経過中である(津田・内木)。

#### 2) MWCNT 気道クリアランス評価系の構築

a) ラットに蛍光ビーズを気管内噴霧した。気管では、噴霧 2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 69%、500 nm ビーズが 85%、100 nm ビーズが 94% 排泄された。24 時間後では、3.0  $\mu$ m ビーズが 95%、500 nm ビーズが 97%、100 nm ビーズが 97% 排泄された。一方、肺では、2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 13%、100 nm ビーズが 62% の排泄率だった。24 時間後でも、3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 63%、100 nm ビーズが 67% の排泄率だった。

b) MWCNT 吸入暴露後の気道クリアランスの障害

MWCNT-L、MWCNT-S、溶媒群に蛍光ビーズを気管内噴霧し、気道クリアランスを測定した。噴霧直後に気管内に取り込まれたビーズの蛍光強度は同程度だった。2 時間後には、蛍光ビーズの 80% 以上が排泄され、MWCNT 群の気管クリアランスも溶媒群と同程度だった。一方、噴霧直後に肺内に取り込まれたビーズの蛍光強度は MWCNT 群で約 50% 低下していた。

c) MWCNT 吸入暴露後の肺胞マクロファージ

肺胞マクロファージの細胞生存率は、時間依存的に減少した(2 時間後 52%、1 日後 80%、7 日後 84% 減少)。同様の結果が LDH アッセイによっても認められた(山村)。

## D. 考察

1. 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。吸入暴露が本来であるかも知れないが、毒性試験が容易に実施できないのであれば、事実上、簡便にして低コストの TIPS 法しかないと考える。また実際の暴露経路を考えるとラット・マウスでは複雑な構造の鼻腔でトラップされるので(口腔呼吸はできない)、そのまま人に外挿ルートではない。ヒトは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)、気管内投与が現実にはそぐわないとは言い切れない。その意味で、TIPS 投与はリスク評価上妥当性がある。
2. さらに、従来の発がん試験はヒトには起こり得ない腹腔内暴露(投与)であることに較べて、リスク評価への外挿において合理性がある。
3. 検体の分散性において Taquann 法にて分散後のものを使用することによって分散性に改良が加えられた。
4. 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の発生について多くの有用な情報が得られつつある。
5. MWCNT に対する M 1 の動態に注目した解析法は、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、早期病変の検出法の開発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、今までに 62 物質が再評価され、そのうち 5 物質は G2A (おそらくヒト発がん要因) から G1 (ヒト発がん要因) 評価になった。こうした意味でも本法による M 1 活性の解析による発がん機序解析手法は有用である。
6. 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」が通例の 2 年発がん性試験の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。また、発がん性の有無を重視する  
 場合でも「2週TIPS投与-2年無処置観察モ  
 デル」は、2年吸入曝露法に比べ圧倒的に低コ  
 ストであり、MWCNTの有害・発がんリスク評価  
 の加速化が可能となる。また多種のMWCNTにつ  
 いて試験を実施することによって、提案の試験  
 方法の普遍性を検証出来る。

## E. 結論

1. H28度の申請の①検体をTIPS法にて2週間の  
 短期に投与したラットについて、1) ①肺、気  
 管、胸腔、胸腔洗浄液等の炎症/毒性/増殖病変と  
 その作用因子解析にける炎症反応の解析と、2) ②  
 ②投与後2年までの経時観察による慢性毒性・発  
 がん性観察の試験系において、現在①について結  
 果が得られつつある。②についてはMWCNT-Nにつ  
 いてすでに肺と胸膜中皮に発がん性が見出され  
 おり(Cancer Sci. 2014) 現在進行中の長期実験  
 で同様の結果が観察されれば、短期試験の病変と  
 の関連を明らかにして、試験期間の短縮に利用す  
 ることが出来る。

2. TIPS投与では一定量の検体を末梢肺胸腔まで  
 確実に送達できる。また腹腔内投与法に較べてヒ  
 トのリスク評価への外挿において合理性がある。  
 さらに、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。

3. この方法「TIPS投与2週直後-2年無処置観察  
 モデル」は、2年吸入曝露法に比べ圧倒的に低コ  
 ストであり、MWCNTの有害・発がんリスク評価の加  
 速化が可能となる。また多種のMWCNTについて試験  
 を実施することによって、提案の試験方法の普遍  
 性を検証できる。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 津田洋幸 カーボンナノチューブの肺と胸膜  
 中皮に対する毒性と発がん性の簡易  
 評価法, 医学のあゆみ, vol.259 No. 3,  
 223-227, 2016
2. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K,  
 Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S,  
 Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S,  
 Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y,  
 Alexander DB, Xu J, Tsuda H.  
 Multiwalled carbon nanotubes  
 intratracheally instilled into the rat  
 lung induce development of pleural  
 malignant mesothelioma and lung  
 tumors. Cancer Sci, doi:10.1111/cas.  
 12954, 2016.
3. Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito  
A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M,  
 Kuno T, Takahashi S. Pioglitazone, a  
 Peroxisome Proliferator-Activated  
 Receptor  $\gamma$  Agonist, Suppresses Rat  
 Prostate Carcinogenesis. Int J Mol Sci.  
 17:pii: E2071, 2016
4. Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H,  
 Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S,  
 Mori H, Takahashi S. Preventive effects  
 of fermented brown rice and rice bran  
 against prostate carcinogenesis in  
 TRAP rats. Nutrients. 8:421, 2016.
5. Sato S, Katsushima K, Shinjo K,  
 Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S,  
Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S,  
 Kondo Y. Histone deacetylase  
 inhibition in prostate cancer triggers  
 miR-320-mediated suppression of the  
 androgen receptor. Cancer Res.  
 76:4192-4204, 2016
6. Naiki-Ito A, Kato H, Sato S, Suzuki S,  
 Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S.  
 Dysfunction of gap-junctional  
 intercellular communication promotes  
 hepatocarcinogenesis. 現代医学,  
 64:103-108, 2016
7. 菅野 純、ナノマテリアル毒性のと  
 らえ方とその難しさ、医学のあゆみ、  
 259巻3号、217-222、2016
8. 高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸  
 入システムによるマウス吸入毒性-  
 ヒトの現実的な曝露シナリオに基づ  
 いたナノマテリアルの吸入毒性評価  
 の迅速化と効率化に向けて-、医学の  
 あゆみ、259巻3号、234-240、2016

### 2. 学会発表

#### 国内学会

1. 津田洋幸、徐結荀、William  
 Alexander, David Alexander,  
 Mohamed AbdelGied, 沼野琢旬、  
 酒々井真澄、二口充、深町勝美、広  
 瀬昭彦、菅野純 機序に基づくナノ

- マテリアルの発がん性評価法の開発, 第 43 回日本毒性学会学術年会、6 月 29 日、名古屋
2. 内木綾、加藤寛之、佐藤慎哉、鈴木周五、山下依子、久野壽也、高橋智. 去勢抵抗性前立腺癌に対する luteolin の治療効果、第 105 回日本病理学会総会、仙台 (2016 年 5 月)
  3. Aya Naiki-Ito, Taku Naiki, Hiroyuki Kato, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Toshiya Kuno, Satoru Takahashi. Chemotherapeutic effect of luteolin on castration-resistant prostate cancer, 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜 (2016 年 10 月)
  4. 内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智. ラット前立腺発がんに対する angiotensin II receptor type 2 アンゴニストの化学予防効果、第 33 回日本毒性病理学会、大阪 (2017 年 1 月)
  5. 高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純, MWCNT のマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体 (Taquan 法) の肺沈着量の比較、第 34 回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題 (口演)
  6. 相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会 (2016.8.23)、長野、口演
  7. 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス気管支平滑筋における  $Ca^{2+}$  活性化  $K^+$  チャネル修飾サブユニット  $\gamma 1$  の生理機能解明。生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 25-26 日、仙台。
  8. 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2 ポドメイン  $K^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 17 日、名古屋。
  9. 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。気管支平滑筋細胞における  $BK_{Ca}$  チャネル  $\gamma 1$  サブユニットの生理機能解明。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎。
  10. 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2 ポドメイン  $K^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎。

#### 国際学会

1. Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J,

Development of a series of assay model of toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016

2. Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the Rat. XIV International Congress of Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6, 2016.
3. Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium & Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演
4. Yuhji Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress of Toxicology ( ICT2016 ) Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium
5. Taquahashi1, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral
6. Jun Kanno, Yuhji Taquahashi1, Atsuya Takagi1, Masaki Tsuji1, Koichi Morita1, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

##### 1. 特許取得

- 1) 菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343、登録番号: 第 6051427 号 (2016.12.9 )
- 2) 今泉祐治、山村寿男、鈴木良明、川崎桂輔、成田寛。イオンチャンネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用。特願 2016-214685、2016 年 11 月 1 日。

##### 2. 実用新案登録

なし

### 3 . その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation for NOAA  
(nano-objects and their aggregates and agglomerates)  
air exposure studies. 6.5 Liquid Phase  
Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary  
Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection  
System for whole body inhalation studies

平成 2 8 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)

. 研究分担報告書

平成28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  
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  
博士課程院生  
Ahmed Maher Mahmoud Elgazzar 名古屋市立大学大学院医学研究科研究員

### 研究要旨

金属粒子、炭素線維などは生体内で分解されないため、肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発する。本研究では、フラーレン分子(FL)およびフラーレンから成るナノサイズ物質、フラーレンウィスカー(FLW)による肺、胸膜中皮の細胞障害性、増殖活性および発がん性に対する酸化ストレスの役割についての解析を行う。本年度は、使用動物、被検物質であるFL、FLWあるいは陽性対照であるカーボンナノチューブ(MWCNT-7、-N)の準備および2週間の経気管内噴霧(TIPS)投与を実施し、3週間目の途中剖検を行った。その結果、被検物質および陽性対照の気管内投与による体重の有意な変化は見られず、肺重量はFLW、MWCNT-7,N投与群で有意に増加し、鉄を含まないFLWにもCNTと同様に炎症が発生している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

炭素線維は生体内で分解されないため、吸引されると肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発し発癌性を発揮する。フラーレンウィスカー(FLW)は、 $C^{60}$ や $C^{70}$ などのフラーレン分子(FL、60あるいは70個の炭素原子からなる閉じたサッカーボール状分子)から成る単結晶ナノファイバーである。超伝導・強磁性素材として知られており、従来の超電導物質が金属やセラミックなど重量が大きく硬いのに対して、軽くしなやかなナノファイバー素材として開発が進んでいる。 $C^{60}$ の世界規模の生産量は、2001年の時点で200kg程度であったが、2016年に

は約78トンになると予測され、急速に増加しているものの、吸入による肺毒性や発がん性における情報がほとんどない。FLWの生体内動態は不明であるが、長さや形状からはカーボンナノチューブ(MWCNT)と同様に肺や胸膜に対する異物炎症の誘発や、発がん性を有する可能性が考えられる。本研究は、FLW短期間経気道的気管内投与によるラット肺・胸膜における細胞障害および発がん性に対する影響を明らかにすることを目的としている。またFLWは鉄を含有しないため、鉄を含有し発がん性があるMWCNT-7(3,000ppm)とMWCNT-N(300ppm)の投与群も同時に設けることにより、ナノマテリア

ル発がんや酸化ストレスに対する鉄の役割についても明確化する。

## B. 研究方法

本研究の被検物質である FW、FLW および陽性対照の MWCNT-7、MWCNT-N は、PF ポリマー分散液 (0.5% Pluronic F68 含有生理食塩水) に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12 週齢雄性 F344 ラットに、FW、FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N を、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ 31.2、62.5  $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ /ラットの用量で 2 週間に 8 回 (合計投与量 0.25 および 0.5mg/ラット) 気管内投与する。対照群として、無処置および PF ポリマー液投与 (対照) 群を設ける。3 週間目 (投与終了後 1 週間) と 104 週間目にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺 (3 週目は 無処置群、対照群および FL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N の高用量群から各群 5 匹、104 週目は各群 20 匹) して、肺・胸膜の急性と慢性病変について、肺・胸膜の病理組織学的変化、胸膜洗浄液・血清における炎症関連サイトカイン、細胞増殖関連遺伝子の発現を解析する。今年度は、実験計画の申請、審査後承認、動物および検体の準備を完了し、気管内投与および 3 週間目の剖検を実施した。3 週間目では、肺、胸膜における早期毒性、増殖活性とタンパク・遺伝子発現レベルの関連を解析することにより、慢性毒性、発がん性の早期指標となりうる因子を検索する。また、肝、腎、副腎、脾、膵、精巣と脳を病理組織学的に解析し、投与物質の全身分布を観察する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、平成 18 年 4 月 28 日環境省告示第 88 号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度

として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており (H28M-45)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行った。

## C. 研究結果

気管内投与中および投与後において、無処置群と比較して、その他の処置群では摂餌量の減少および体重の減少傾向が軽微に観察されたが、有意な差は認めなかった。また対照群と比較して、被検物質および陽性対照群において摂餌量変化や体重増加に影響は見られなかった。

3 週目の剖検時、体重および肝、腎、肝、腎、脾、膵、脳の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群 (絶対重量  $0.96 \pm 0.04\text{g}$ 、相対重量  $0.32 \pm 0.01\text{g}$ ) と比較して、対照群 (絶対重量  $1.34 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量  $0.47 \pm 0.01\text{g}$ 、 $P < 0.001$ )、FL 群 (絶対重量  $1.40 \pm 0.08\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量  $0.50 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$ )、FLW 群 (絶対重量  $1.50 \pm 0.09\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量  $0.54 \pm 0.04\text{g}$ 、 $P < 0.001$ )、MWCNT-7 群 (絶対重量  $1.60 \pm 0.07\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量  $0.56 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$ )、MWCNT-N 群 (絶対重量  $1.64 \pm 0.04\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量  $0.59 \pm 0.01\text{g}$ 、 $P < 0.001$ ) で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、FL 群では肺の絶対および相対重量に有意な変化はなかったが、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N 投与により、有意に増加した (いずれも  $P < 0.001$ )。

## D. 考察

気管内投与処置による摂餌量および体重の変化は認めなかったことから、処置操作自体による動物への侵襲はないと考えられ

た。3週間解剖時の肺重量は、気管内投与により有意に上昇していた。このことから、噴霧された Pluronic F68 含有生理食塩水（総量 4ml）はほとんど吸収されているものの、軽度の炎症反応あるいは肺水腫が発生している可能性が推察された。

MWCNT は黒色物質で、投与群において肺両葉にびまん性の黒色素沈着を認めた。このことから、検体が肺全体に均一に投与できていることが確認された。また、FL、FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N においては、対照群と比較してさらに肺重量が増加し、後者 3 剤では有意差を認めた。MWCNT-N については、本研究と同様の短期間経気道的肺内投与による肺、胸膜における炎症の持続（Cancer Sci、105:763-769、2014）および長期観察による肺、胸膜発がん性（Cancer Sci、107:924-935、2016）を津田らが報告している。また MWCNT-7 についても 2 年間吸入試験による肺発がん性が示されている（Part Fibre Toxicol、13:53、2016）。FLW は MWCNT と異なり、鉄を含有しないが、本研究では MWCNT と同様に、FLW では肺重量の増加を認めていることから、鉄の有無に関わらず肺炎が誘発されている可能性が考えられ、長期観察による発がん性を有する可能性が考慮される。現在病理組織標本の作製中であり、今後は組織学的とともに、発現解析を進め、肺、胸膜の炎症、酸化ストレスや増殖活性について、明らかにしていく。

## E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラーレンおよびフラーレンウィスカーの肺・胸膜毒性について検討した。短期(3週間目)の剖検が終了し、フラーレンウィスカーは、陽性対照であるカーボンナノチューブと同様に、有意に肺重量の増加を誘発した。このことから、フラーレンウィスカーは肺、胸膜毒性を有することが明らかとなり、長期観察による発がん性の可

能性が示唆された。

## F. 健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. 津田洋幸 カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法, 医学のあゆみ, vol.259 No. 3, 223-227, 2016
2. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. Cancer Sci, doi:10.1111/cas. 12954, 2016.

### 2. 学会発表

#### 国内学会

1. 津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed AbdelGied, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬昭彦、菅野純機序に基づくナノマテリアルの発がん性評価法の開発, 第 43 回日本毒性学会学術年会、6 月 29 日、名古屋

#### 国際学会

1. Tsuda H, Xu J, Alexander DB, Alexander WT, Mohamed Abd El-gied, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Takahashi S, Ohnishi M, Hirose A, Kanno J, Development of a series of assay model of toxicity and carcinogenicity of carbon nanotubes. 2016 Korean Association for Laboratory Animal Science, 慶州, Korea, Aug. 24-26, 2016
2. Tsuda H, Alexander DB, Alexander WT, AbdElgied M, ELGazzar A, Xu J, Numano T, Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Hirose A, Kanno J, Development of a Mechanism Based Short-term Assay Protocol to Test Carcinogenicity of Multiple Wall

Carbon Nanotubes (MWNCTs) in the  
Rat. XIV International Congress of  
Toxicology, Merida, Mexico, Oct. 2-6,  
2016.

なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他

該当なし

**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

平成28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:フラーレンナノウィスカーの肺・胸膜毒性および発がん性に関する研究

分担研究者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 講師

### 研究要旨

金属粒子、炭素線維などは生体内で分解されないため、肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発する。本研究では、フラーレン分子 (FL) およびフラーレンから成るナノサイズ物質、フラーレンウィスカー (FLW) による肺、胸膜中皮の細胞障害性、増殖活性および発がん性に対する酸化ストレスの役割についての解析を行う。本年度は、使用動物、被検物質である FL、FLW あるいは陽性対照であるカーボンナノチューブ(MWCNT-7、-N)の準備および2週間の経気管内噴霧(TIPS)投与を実施し、3週間目の途中剖検を行った。その結果、被検物質および陽性対照の気管内投与による体重の有意な変化は見られず、肺重量はFLW、MWCNT-7,N投与群で有意に増加し、鉄を含まないFLWにもCNTと同様に炎症が発生している可能性が示唆された。

### A. 研究目的

炭素線維は生体内で分解されないため、吸引されると肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発し発癌性を発揮する。フラーレンウィスカー (FLW) は、 $C^{60}$  や  $C^{70}$  などのフラーレン分子 (FL、60 あるいは 70 個の炭素原子からなる閉じたサッカーボール状分子) から成る単結晶ナノファイバーである。超伝導・強磁性素材として知られており、従来の超電導物質が金属やセラミックなど重量が大きく硬いのに対して、軽くしなやかなナノファイバー素材として開発が進んでいる。 $C^{60}$  の世界規模の生産量は、2001年の時点で200kg程度であったが、2016年には約78トンになると予測され、急速に増加しているものの、吸入による肺毒性や発がん性における情報がほとんどない。FLWの生体内動態は不明であるが、長さや形状からはカーボンナノチューブ(MWCNT)と同様に肺や胸膜に対する異物炎症の誘発や、発がん性を有する可能性が考えられる。本研究は、FLW 短期間経気道的

気管内投与によるラット肺・胸膜における細胞障害および発がん性に対する影響を明らかにすることを目的としている。またFLWは鉄を含有しないため、鉄を含有し発がん性があるMWCNT-7(3,000ppm)とMWCNT-N(300ppm)の投与群も同時に設けることにより、ナノマテリアル発がんや酸化ストレスに対する鉄の役割についても明確化する。

### B. 研究方法

本研究の被検物質であるFW、FLWおよび陽性対照のMWCNT-7、MWCNT-Nは、PFポリマー分散液(0.5%Pluronic F68含有生理食塩水)に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12週齢雄性F344ラットに、FW、FLW、MWCNT-7およびMWCNT-Nを、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ31.25、62.5 $\mu$ g/0.5ml/ラットの用量で2週間に8回(合計投与量0.25および0.5mg/ラット)気管内投与する。対照群として、無処置およびPFポリマー液投与(対照)群を設ける。3週間目(投

与終了後1週間)と104週間目にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺(3週目は無処置群、対照群およびFL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nの高用量群から各群5匹、104週目は各群20匹)して、肺・胸膜の急性と慢性病変について、肺・胸膜の病理組織学的変化、胸膜洗浄液・血清における炎症関連サイトカイン、細胞増殖関連遺伝子の発現を解析する。今年度は、実験計画の申請、審査後承認、動物および検体の準備を完了し、気管内投与および3週間目の剖検を実施した。3週間目では、肺、胸膜における早期毒性、増殖活性とタンパク・遺伝子発現レベルの関連を解析することにより、慢性毒性、発がん性の早期指標となりうる因子を検索する。また、肝、腎、副腎、脾、膵、精巣と脳を病理組織学的に解析し、投与物質の全身分布を観察する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており(H28M-45)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行った。

### C. 研究結果

気管内投与中および投与後において、無処置群と比較して、その他の処置群では摂餌量の減少および体重の減少傾向が軽微に観察されたが、有意な差は認めなかった。また対照群と比較して、被検物質および陽性対照群において摂餌量変化や体重増加に影響は見られなかった。

3週目の剖検時、体重および肝、腎、肝、腎、

脾、膵、脳の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群(絶対重量 $0.96 \pm 0.04g$ 、相対重量 $0.32 \pm 0.01g$ )と比較して、対照群(絶対重量 $1.34 \pm 0.03g$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.47 \pm 0.01g$ 、 $P < 0.001$ )、FL群(絶対重量 $1.40 \pm 0.08g$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.50 \pm 0.03g$ 、 $P < 0.001$ )、FLW群(絶対重量 $1.50 \pm 0.09g$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.54 \pm 0.04g$ 、 $P < 0.001$ )、MWCNT-7群(絶対重量 $1.60 \pm 0.07g$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.56 \pm 0.03g$ 、 $P < 0.001$ )、MWCNT-N群(絶対重量 $1.64 \pm 0.04g$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.59 \pm 0.01g$ 、 $P < 0.001$ )で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、FL群では肺の絶対および相対重量に有意な変化はなかったが、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、有意に増加した(いずれも $P < 0.001$ )。

### D. 考察

気管内投与処置による摂餌量および体重の変化は認めなかったことから、処置操作自体による動物への侵襲はないと考えられた。3週間解剖時の肺重量は、気管内投与により有意に上昇していた。このことから、噴霧されたPluronic F68含有生理食塩水(総量4ml)はほとんど吸収されているものの、軽度の炎症反応あるいは肺水腫が発生している可能性が推察された。

MWCNTは黒色物質で、投与群において肺両葉にびまん性の黒色色素沈着を認めた。このことから、検体が肺全体に均一に投与できていることが確認された。また、FL、FLW、MWCNT-7およびMWCNT-Nにおいては、対照群と比較してさらに肺重量が増加し、後者3剤では有意差を認めた。MWCNT-Nについては、本研究と同様の短期間経気道的肺内投与による肺、胸膜における炎症の持続(Cancer Sci、105:763-769、2014)および長期観察による肺、胸膜発がん性(Cancer Sci、107:924-935、2016)を津田らが報告している。またMWCNT-7についても2年間吸入試験による肺発がん性が示されている(Part Fibre Toxicol、13:53、2016)。FLWはMWCNTと異なり、鉄を含有しないが、本研究ではMWCNTと同様に、FLWでは肺重量の増加を認めていることから、鉄の有無に関

ならず肺炎が誘発されている可能性が考えられ、長期観察による発がん性を有する可能性が考慮される。現在病理組織標本の作製中であり、今後は組織学的とともに、発現解析を進め、肺、胸膜の炎症、酸化ストレスや増殖活性について、明らかにしていく。

#### E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラレンおよびフラレンウィスカーの肺・胸膜毒性について検討した。短期(3週間目)の剖検が終了し、フラレンウィスカーは、陽性対照であるカーボンナノチューブと同様に、有意に肺重量の増加を誘発した。このことから、フラレンウィスカーは肺、胸膜毒性を有することが明らかとなり、長期観察による発がん性の可能性が示唆された。

#### F. 健康危機情報

なし

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T, Takahashi S. Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 17:pii: E2071, 2016

Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H, Takahashi S. Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. Nutrients. 8:421, 2016.

Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S, Kondo Y. Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. Cancer Res. 76:4192-4204, 2016

Naiki-Ito A, Kato H, Sato S, Suzuki S,

Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. Dysfunction of gap-junctional intercellular communication promotes hepatocarcinogenesis. 現代医学, 64:103-108, 2016

##### 2. 学会発表

内木綾、加藤寛之、佐藤慎哉、鈴木周五、山下依子、久野壽也、高橋智. 去勢抵抗性前立腺癌に対する luteolin の治療効果、第 105 回日本病理学会総会、仙台(2016年5月)

Aya Naiki-Ito, Taku Naiki, Hiroyuki Kato, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Toshiya Kuno, Satoru Takahashi. Chemotherapeutic effect of luteolin on castration-resistant prostate cancer, 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜(2016年10月)

内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智. ラット前立腺発がんに対する angiotensin II receptor type 2 アゴニストの化学予防効果、第 33 回日本毒性病理学会、大阪(2017年1月)

#### G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

##### 1. 特許取得

なし

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

平成28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  
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)  
分担研究報告

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  
独立行政法人労働者健康安全機構  
日本バイオアッセイ研究センター 所長  
研究協力者 高橋祐次 国立医薬品食品衛生研究所  
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。本分担研究では、ラットを用いた2週間のTIPS投与試験に供するMWCNT検体について、独自に開発した第三級ブチルアルコール (TB) を用いる Taquann 法により処理を行い、凝集体成分を除去し、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製し調製し研究代表者に供給した。具体的には、MWCNTの一つである MWNT-7 (三井物産) を事例対象として、研究分担者が独自に開発した凝集体・凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法 (Taquann 法) により検体処理を行った。Taquann 法は汎用性が高く、これまで、各種二酸化チタン、チタン酸カリウムにおいて MWNT-7 と同様の方法により分散性の高い検体が得られることを確認している。本年度の分担研究では、MWNT-7 とは性状が異なる MWCNT-N への適用を試みた。MWCNT-N は MWNT-7 よりも繊維が長く細いため、原体は繊維が絡まった不織布状を呈し、従来のプロトコルを適用した場合の TB への懸濁性が極めて不良であった。そのため、分散条件の検討を行った結果、超音波処理の出力を増加させることで良好な分散検体得られることが判明した。以上より、本研究結果として、MWNT-7 と性状の異なる MWCNT にも、条件の微調整により Taquann 法処理が適用可能であることが示された。

なお、この検体の繊維長を走査型電子顕微鏡により測定した結果、2.5  $\mu\text{m}$  以下の繊維は 14.7%、5  $\mu\text{m}$  以上は 85.7%、10  $\mu\text{m}$  以上は 52.0%、平均繊維径は 70nm であ

り、中皮腫発癌に寄与する可能性のある繊維が高率に含まれていると考えられた。

## A. 研究目的

本研究の目的は、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。

本分担研究では、ラットを用いた 2 週間の TIPS 投与方法に供する MWCNT 検体について、独自に開発した Taquann 法により処理を行い、凝集体成分を除去し、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製し研究代表者に供給する。

MWCNT は製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分が含まれている。この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の進入を阻害する可能性がある。ヒトに比較して細い気道径を有するげっ歯類を用いた動物実験では、凝集体によるこのような影響が大きいことが推察されるため、ヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。

そこで、研究分担者らは、MWCNT の一つである MWNT-7 (三井物産) を対象に、凝集体・凝固体を除去し単

離成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法 (Taquann 法) を独自開発した。Taquann 法は走査型電子顕微鏡の試料作製方法である「臨界点乾燥」に着想を得た技術である。乾燥時に表面張力を受けないため再凝集せず、分散性が確保される事を利用したものである。具体的には、MWCNT 原末を 第三級ブチルアルコール (TB、融点; 25.69 ) に分散、懸濁させて、金属製フィルター (目開き 25  $\mu\text{m}$ ) でろ過し大型の凝集体を除くとともに、分散を図り、ろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させる。固化した状態の MWCNT 懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TB を分離除去することで分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る方法である (図 1)。

Taquann 法は汎用性が高く、原理的には TB に耐性のある検体に適応可能である。これまで、各種二酸化チタン、チタン酸カリウムにおいて MWNT-7 と同様の方法により分散性の高い検体を得られることを確認している。本年度の分担研究では、MWNT-7 とは性状が異なる NWCNT-N への適用を試みた。MWCNT-N は、従来のプロトコールを適用した場合の TB への懸濁性が極めて不良であったため、分散条件を再検討した。また、走査型電子顕微鏡観察により、Taquann 法処理した MWCNT-N の繊維長及び繊維径について測定を行った。

## B. 研究方法

### B-1 MWNT-7 Taquann 処理検体

MWNT-7の原末500 mgをビーカーに入れ、35℃に加熱して溶解したTB約250 mLを加えてステンレス製のスパテルで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらスパテルで攪拌しTBがシャーベット状になった状態でMWNT-7とTBを十分に混和し、1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃で一晩凍結した。約60℃に加熱したTBを添加し全量を1,000 mLとした（凍結再融解処理）。凍結再融解したMWNT-7のTB懸濁液を超音波洗浄器SU-3TH（柴田科学株式会社）にて、40Wの出力により15分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。

MWNT-7の懸濁液を約50℃に加熱し、金属製フィルター（セイシン企業、目開き25 μm）にてろ過し大型の凝集体を除去した。金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター（FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量：17.6m/s<sup>2</sup>）をリムに4個装着し、フィルターを振動させながらろ過を行った。得られたろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固化した状態のMWCNT-N懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ（Vacuubrand、MD4CNT+AK+EK）で液相を介さずに乾燥させ、TBを分離除去し高分散性の乾燥検体を得た。

これまでの研究により、Taquann法処理を行ったMWNT-7の繊維長の平均は7.1 ± 6.0 μm、繊維径の平均は115 ± 74 nmであることが示されている<sup>1)</sup>。

### B-2 MWCNT-N Taquann 処理検体

#### (1) MWCNT-NのTBへの懸濁方法とTaquann法処理

MWCNT-Nの原末は、肉眼的にはフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相を呈している（図2）。これは、粉末～繭状凝集体の外観を呈するMWNT-7とは大きく異なる。TBにMWNT-7と同様の方法で分散を試みたが分散性の高い懸濁液が得られなかったため、TBへの分散方法の検討を行った。幾つかの条件を試み、以下の方法で良好な懸濁液を得た。

MWCNT-Nの原末500 mgをビーカーに入れ、35℃に加熱して溶解したTB約250mLを加えてステンレス製の小型ホイッパーで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらホイッパーで攪拌しTBがシャーベット状になった状態でMWCNT-NとTBを十分に混和し1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃で一晩凍結した。約60℃に加熱したTBを添加し全量を1,000mLとした。

凍結再融解したMWCNT-NのTB懸濁液をサンプル密閉式超音波破碎装置BIORUPTOR®UCD-250HSA（コスモ・バイオ株式会社）にて、160Wの出力で30秒間の超音波照射を6回繰り返して、MWCNT-Nが十分に懸濁した混合液を得た（図3a）。以降は、MWNT-7と同様に濾過、凍結・固化、TBの分離を行い、分散性の高い乾燥検体を得た（図3b、図4）。

#### (2) MWCNT-Nの形態観察

アルミナフィルター（Anodisc、孔径0.02 μm、φ12mm、ワットマン）を口

ート型ガラス濾過器(51G-1、三商)に載せ、ピペティングにより十分に分散させた Taquann 法処理 MWCNT-N 懸濁液 1  $\mu$ L を滴下し吸引濾過した。フィルターを室温で乾燥し、真鍮製 SEM 観察台(S-GA、 $\phi$ 15 $\times$ 5 mm、日新 EM)にカーボンシール( $\phi$ 12 mm、日新 EM)で固定した。オスミウムコーター(HPC-1 SW 型、真空デバイス)により 5 秒間処理を行い走査型顕微鏡(VE-9800、KEYENCE)によって 400~10,000 倍、加速電圧 2.5~5.0 kV の条件で観察した。MWCNT の繊維長の計測は ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>)を用いて行った。

### C. 研究結果

MWNT-7 と同様の方法では MWCNT-N は TB への分散性が不良であった。そのため分散工程において、

TB と MWCNT-N を混合する器具をスパーテルからホイッパーに変更、超音波処理を 40W $\times$ 15 分から 160W $\times$ 3 分処理に変更することで良好な懸濁液を得ることが可能となった。

走査型電子顕微鏡による観察の結果、Taquann 法処理を行った MWCNT-N の平均繊維長は  $8.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$  (N=279)、最大値 36.4  $\mu\text{m}$ 、最小値 0.7  $\mu\text{m}$  であった(図 5a)。繊維の平均直径は  $69 \pm 22 \text{ nm}$  (N=100)、最大値 129 nm、最小値 29 nm であった(図 5b)。繊維長のヒストグラムから、2.5  $\mu\text{m}$  以下の繊維は 14.7%、5  $\mu\text{m}$  以上は 85.7%、10  $\mu\text{m}$  以上は 52.0% であった。

### D. 考察及び結論

MWCNT-N の原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相と呈している。繊維長の平均値は MWNT-7 よりも若干長く、また繊維径は細いため繊維が絡みやすいと考えられる。MWNT-7 の調製で使用していた超音波処理条件(40W $\times$ 15 分; 36,000J)では TB への懸濁性が不良であった。本研究では、より高出力が得られる超音波処理装置を用い、160W $\times$ 3 分; 28,800J の条件において良好な懸濁液が得られた。総エネルギーは従来法が大きい、単位時間当たりのエネルギーは従来法の 20 倍である。超音波処理は溶液中に圧力差によるキャビテーションを発生させることで、溶液中の物質に激しい衝撃を与えて分散を図る方法である。そのため、強力な超音波処理では、MWCNT-N の繊維長に影響を与える可能性がある。走査型電子顕微鏡による繊維長の測定では、5  $\mu\text{m}$  以上の長さの繊維が約 85%、10  $\mu\text{m}$  以上は 52.0% であった。処置前の繊維長の正確な値は不明であるが、極端な断片化は生じていないと考えられた。なお、処理の検体に中皮腫発癌に寄与する可能性のある繊維が高率に含まれていると考えられた。繊維状物質の中皮腫発癌性はサイズに依存するため<sup>2)</sup>、繊維長の分布が処置後も保持される点は重要であると考えられる。

本研究結果から、MWNT-7 とは性状の異なる MWCNT にも Taquann 法処理が適用可能であることが示された。

## 【引用文献】

- 1) Taquahashi Y, Ogawa Y, Takagi A, Tsuji M, Morita K, Kanno J. An Improved dispersion method of multi-wall carbon nanotube for inhalation toxicity studies of experimental animals. *J Toxicol Sci.* 2013;38 ( 4 ) :619-28.
  - 2) Roller M, Pott F, Kamino K, Althoff GH, Bellmann B. Dose-response relationship of fibrous dusts in intraperitoneal studies. *Environ Health Perspect.* 1997 Sep;105 Suppl 5:1253-6.
- E. 健康危機情報**  
なし
- F. 研究発表**
1. **学会発表**
    1. 高橋祐次、小川幸男、高木篤也、辻 昌貴、森田 紘一、今井田 克己、菅野 純、MWCNT のマウス全身暴露吸入における原末と高分散処理検体 ( Taquann 法 ) の肺沈着量の比較、第 34 回日本毒性学会、名古屋、(2016.7.1)、一般演題 ( 口演 )
    2. 相磯成敏、梅田ゆみ、笠井辰也、妹尾英樹、高信健司、斎藤美佐江、福島昭治、菅野純、MWNT-7 吸入暴露で誘発されたラット肺病変の経時的解析、第 31 回発癌病理研究会(2016.8.23)、長野、口演
    3. Jun Kanno, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., The 14th International Nanotech Symposium & Nano-Convergence Expo (NANO KOREA 2016) (2016.7.14), Korea, 基調講演
    4. Yuhji Kanno J, Taquahashi Y, Introduction to Nanomaterials safety: Predicting the chronic effects. XIV International Congress of Toxicology ( ICT2016 ) Merida-Mexico, (2016.10.3), Symposium
    5. Taquahashi1, Atsuya Takagi, Yukio Ogawa, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Katsumi Imaida, Jun Kanno, Level of dispersion of MWCNT aerosol affects the lung burden and lung lesion in whole body inhalation study, XIV International Congress of Toxicology Merida-Mexico, (2016.10.5), Oral
    6. Jun Kanno, Yuhji Taquahashi1, Atsuya Takagi1, Masaki Tsuji1, Koichi Morita1, Yukio Ogawa, Shigetoshi Aiso, Yumi Umeda, Tatsuya Kasai, Hideki Senoh, Kenji Takanobu, Misae Saito, Shoji Fukushima, Nanomaterials safety: Predicting their long-term effects by in vivo studies., Inhalation Toxicity Test Advisory Council, Korea Occupational Safety and Health Agency (KOSHA). Seoul, Korea, Invited
  2. **論文発表**
    1. 菅野 純、ナノマテリアル毒性のとらえ方とその難しさ、医学のあゆみ、259 巻 3 号、217-222、2016

2. 高橋祐次、高分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて-、医学のあゆみ、259 巻 3 号、234-240、2016

## G. 知的財産の出願・登録情報

### 1. 特許取得

菅野純、高橋祐次、「高分散性ナノマテリアルの調製方法」、特願 2012-158343、登録番号:第 6051427 号(2016.12.9 )

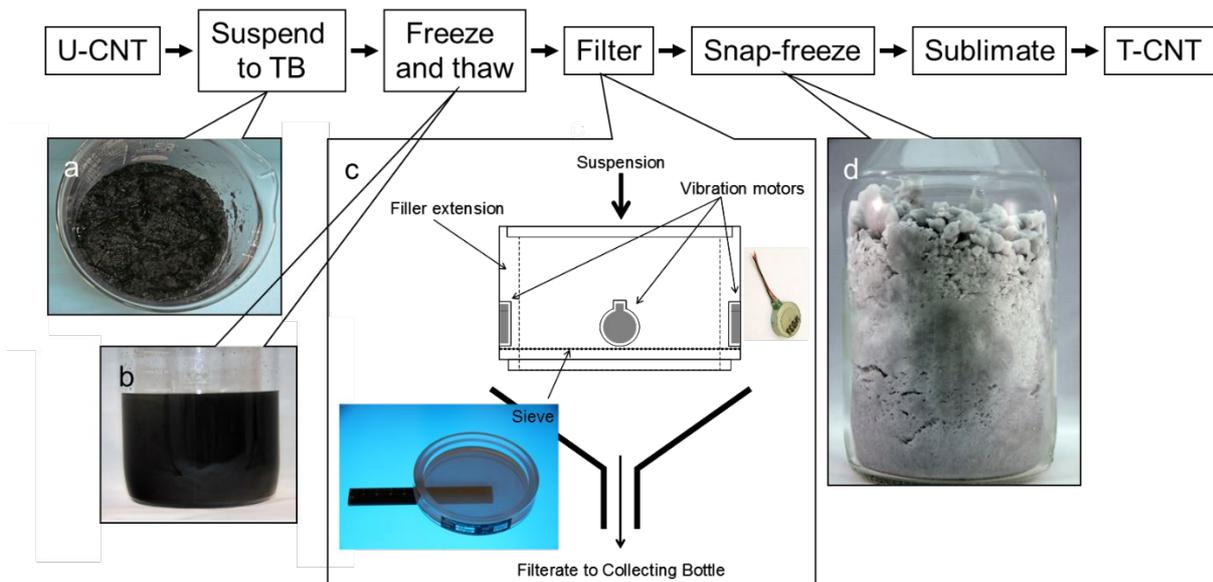
### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

ISO TC 229/SC /WG 3

Nanotechnologies- Aerosol generation for NOAA (nano-objects and their aggregates and agglomerates) air exposure studies. 6.5 Liquid Phase Filtration/Dispersion – Critical Point Drying (Tertiary Butyl Alcohol Sublimation) and Direct Injection System for whole body inhalation studies



### 図 1 Taquann 法の概要

MWCNT 原末を 第三級ブチルアルコール (TB) に混合する。氷冷下でスパーテルを用いて攪拌し TB をシャーベット状にして十分に混和する (a)。TB への分散性を向上させることを目的として、 $-25^{\circ}\text{C}$  で一晩凍結したのち  $60^{\circ}\text{C}$  に加温した TB を加え凍結再融解を行う (b)。金属製フィルター (目開き  $25\ \mu\text{m}$ ) でろ過し大型の凝集体を除く (c)。ろ液は直ちに液体窒素で凍結・固化させる (d)。固化した状態の MWCNT 懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る (Taquahashi et al., JTS, 2013)。

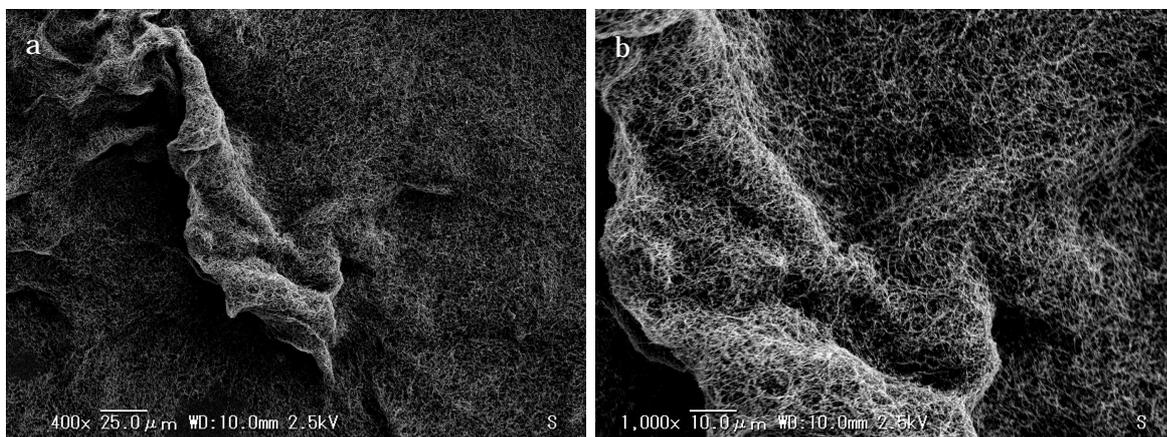
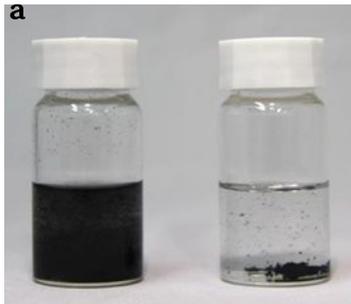
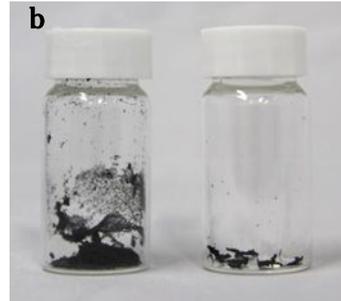


図 2 MWCNT-N 原末の走査型電子顕微鏡像

MWCNT-Nの原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では繊維が絡みあって不織布状の様相を呈している。本画像から繊維長の正確な値は計測できないが、10 $\mu$ mよりも長い繊維が高頻度に確認される。a: 400倍、b:1,000倍



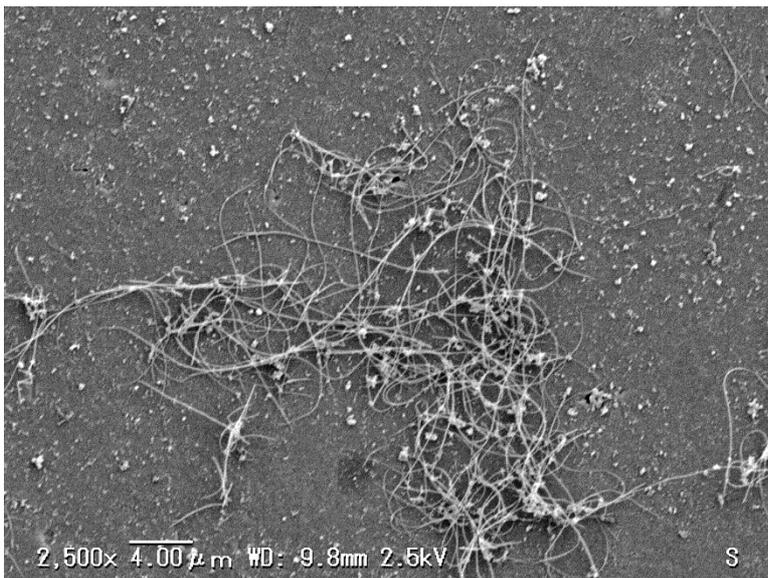
a 左:160W x3分処理 超音波処理 (TB 懸濁液)  
)



b 左:Taquann 処置 MWCNT-N (乾燥後)

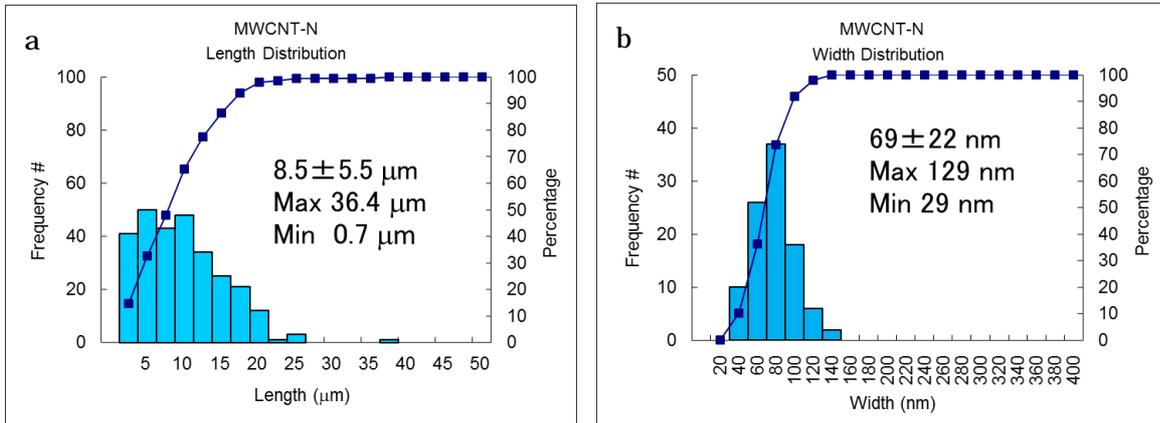
### 図3 MWCNT-NのTaquann法処理検体(懸濁液と乾燥後の肉眼像)

MWNT-7と同様の方法で分散処理ではMWCNT-NはTBに殆ど分散しない(a右)。高出力の超音波処理装置により分散し、良好な懸濁液が得られた(a左)。Taquann法処理検体(b左)は、粉末状の外観を呈し原末(b右)に比較して嵩高い(試料はいずれも5mg)。



### 図4 MWCNT-NのTaquann法処理検体のSEM像

原末に比し良く分散され、単離した繊維として観察される。



**図 5 MWCNT-N Taquann 法処理検体の  
繊維長及び繊維径の分布**

走査型電子顕微鏡による観察の結果、Taquann 法処理を行った MWCNT-N の平均繊維長は  $8.5 \pm 5.5 \mu\text{m}$  (N=279)、最大値  $36.4 \mu\text{m}$ 、最小値  $0.7 \mu\text{m}$  であった (a)。繊維の平均直径は  $69 \pm 22 \text{ nm}$  (N=100)、最大値  $129 \text{ nm}$ 、最小値  $29 \text{ nm}$  であった (b)。繊維長のヒストグラムから  $2.5 \mu\text{m}$  以下の繊維は  $14.7\%$ 、 $5 \mu\text{m}$  以上は  $85.7\%$ 、 $10 \mu\text{m}$  以上は  $52.0\%$  であった。

平成28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吸入暴露による気道クリアランスと  
肺胞マクロファージへの影響

分担研究者	山村寿男	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	准教授
研究協力者	神藤秀基	名古屋市立大学薬学部薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	
	山田 茜	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	
	鈴木良明	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	助教
	今泉祐治	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	教授

## 研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器に対する急性の細胞障害性を明らかにするため、気道および肺での異物排除機構の中核を担う気道上皮繊毛細胞と肺胞マクロファージに注目した。まず、蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系において、MWCNT 吸入暴露による異物排除機能への影響を解析した。気管クリアランスは、MWCNT 吸入暴露群でも顕著な低下は認められなかった。また、MWCNT 吸入暴露により細気管支が炎症して閉塞するため、肺への異物侵入が少なかった。次に、肺胞マクロファージに対するMWCNTの細胞障害性について解析した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は有意に減少した。一方、MWCNT-Sの肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-Lと比較して弱いことが分かった。MWCNT の大きさや形状が、呼吸器系細胞の障害性を決定する要因であることが示唆された。以上より、MWCNT 吸入暴露による気道上皮繊毛運動や肺胞マクロファージの機能障害は、さらに吸入した異物による炎症の促進や感染症の原因になることが予想される。

## A. 研究目的

各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブは異物として排泄されにくいいため、長期的に気道や肺などの呼吸器官に貯留し、組織障害や発がんを引き起こす。そのため、カーボンナノチューブ暴露の初期における直接的な呼吸器細胞障害を解析することは、その病態分子機構の解明につながると考えられる。これまでに我々は、異物の口腔側への輸送を直接的に担う気道上皮繊毛細胞に着目し、その細胞障害性を定量的に評価できる簡便な気道クリアランス評価系を考案した。本研究では、その気道クリアランス評価系の定量性を確立し、多層カーボンナノチューブ

(MWCNT)を気管内噴霧した際の気道クリアランス評価法として活用した。さらに、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージにも注目して、肺胞マクロファージに対するMWCNTの急性作用および細胞障害性を解析した。

## B. 研究方法

### 1) in vivo 気道クリアランスの測定

粒子径が 3.0  $\mu\text{m}$ 、500 nm、100 nm の蛍光シリカビーズ(Sicstar-redF、Micromod Partikeltechnologie、最大励起波長 569 nm)の各 100  $\mu\text{l}$  を PBS(-)溶液(100  $\mu\text{l}$ )に懸濁し、ラットの気管内に噴霧した。その0、

2、4、8、24 時間後に気管と肺を摘出した。摘出した気管は、内部を洗浄して洗浄液を回収した。肺は、ホモジナイズし、これを洗浄液として回収した。回収した洗浄液に 1 mg/ml コラゲナーゼ (Worthington Biochemical) を加え、37°C で 5 時間処理した。次に、20% SDS/50% DMF 溶液に置換し、37°C で 12 時間処理した。その後、メッシュとシリンジフィルターを用いて、組織や細胞の残渣を除去し、遠心機を用いてサンプル量を 100  $\mu$ l までスケールダウンし、マルチラベルカウンター (1420 ARVO, Perkin Elmer) を用いて蛍光強度を測定した (励起波長 560 nm、測定波長 590 nm)。

### 2) MWCNT 吸入モデル動物の作製

ラット (雄性、Wistar/ST、8~10 週齢、日本 SLC) に MWCNT-L (直径 150 nm、長さ 10  $\mu$ m、250 ppm、昭和電工)、MWCNT-S (直径 15 nm、長さ 3  $\mu$ m、250 ppm、昭和電工)、PF68 (0.5%、溶媒対照群) を含有する生理食塩水 (0.3 ml) をそれぞれ初回噴霧した。3 日後と 6 日後にも噴霧し、MWCNT 吸入モデル動物とした。カーボンナノチューブの噴霧開始から 7 日目に蛍光ビーズを気管内に噴霧した。その 0、2 時間後に気管と肺を摘出して、蛍光ビーズを上述した方法で回収し、その蛍光強度を測定した。

### 3) 肺胞マクロファージの生存率測定

ラットから気管と肺を全摘出し、気管からカニューレを挿入して PBS(-) を注入し、肺洗浄液とした。肺洗浄液を 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た。肺胞マクロファージは、RPMI 1640 培地で 24 時間培養後、10000 細胞/ウェルで 96 穴プレートに播種した。次に、MWCNT-S または MWCNT-L を 10  $\mu$ g/ml 添加し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を MTT 法で測定した。対照群には溶媒 (0.5% PF68 含有生理食塩水) のみを添加した。また、細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイは、Cytotoxic LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に基づき適正に行った。本実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会で承認済である (承認番号: H24-P-13)。

## C. 研究結果

### 1) 簡便な気道クリアランス評価系の構築

ラットに粒子径の異なる 3 種類の蛍光シリカビーズ (粒子径: 3.0  $\mu$ m、500 nm、100 nm) を気管内噴霧した。気管内噴霧 0~24 時間後における気管および肺洗浄液の蛍光強度を測定した。気管では、2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 69%、500 nm ビーズが 85%、100 nm ビーズが 94% 排泄された。24 時間後では、3.0  $\mu$ m ビーズが 95%、500 nm ビーズが 97%、100 nm ビーズが 97% 排泄された。一方、肺では、2 時間後に 3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 13%、100 nm ビーズが 62% の排泄率だった。24 時間後でも、3.0  $\mu$ m ビーズが 5% 以下、500 nm ビーズが 63%、100 nm ビーズが 67% の排泄率だった。

### 2) MWCNT 吸入暴露による気道クリアランスへの影響

MWCNT-L、MWCNT-S、PF68 (溶媒対照群) をそれぞれ投与したラット群に蛍光ビーズを気管内噴霧し、0 および 2 時間後の気道クリアランスを測定した。気管内噴霧直後に気管内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、その粒子径に関わらず同程度だった。2 時間後には、蛍光ビーズの 80% 以上が排泄され、MWCNT-L や MWCNT-S 吸入暴露群の気管クリアランスも溶媒群と比較して顕著な低下は認められなかった。一方、気管内噴霧直後に肺内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、溶媒群と比較して、MWCNT-L および MWCNT-S 群ともに約 50% 低下していた。

### 3) MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージへの影響

ラットから単離した肺胞マクロファージに MWCNT-L、MWCNT-S、PF68 (溶媒対照群) をそれぞれ暴露し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を

MTT 法で測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は、2 時間後から時間依存的に減少した(2 時間後 52%、1 日後 80%、7 日後 84%の減少)。一方、MWCNT-S も肺胞マクロファージに対して毒性を示した(2 時間後 24%、1 日後 49%、7 日後 8%の減少)が、MWCNT-L と比較して、その効果は弱かった。また、同様の結果が LDH アッセイによっても認められた。

#### D. 考察

気道クリアランスは、慢性閉塞性肺疾患(COPD)や喘息などの気道炎症時に低下することが知られている。しかし、これまで報告されている気道クリアランス評価系は、放射性物質や X 線撮影などの専門的な技術が要求される手法が主だった。これまでに我々は、シリカ製の蛍光ビーズを使用し、より簡便な気道クリアランス評価系を考案した。本研究では、まず、その気道クリアランス評価系の定量性を確立することを目指した。気管では、蛍光ビーズの噴霧 2 時間後に 70~90%の蛍光ビーズが排泄され、24 時間後に 95%以上が排泄されたことから、気管に侵入した蛍光ビーズは、主に咳嗽により速やかにクリアランスされることが示された。一方、肺では、24 時間が経過しても、30%以上の蛍光ビーズが貯留していたことから、肺に侵入した異物のクリアランスには、咳嗽のみでは不十分であり、さらに長期間を要し、肺胞マクロファージによる貪食や輸送が必要であることが示唆された。

本研究では、体外から侵入する異物の代表例として、花粉、タバコの煙に含まれる粒子、ウイルスなどを想定して、それぞれ 3.0  $\mu\text{m}$ 、500 nm、100 nm の粒子径の蛍光ビーズを使用した。気管および肺ともに粒子径が小さい蛍光ビーズの方が早期にクリアランスされた。特に肺では、その傾向が顕著だった。すなわち、肺において、3.0  $\mu\text{m}$  ビーズは噴霧 24 時間後も殆ど排泄されなかったが、500 nm ビーズは 60%、100 nm ビーズは 70%が 24 時間以内にクリアランスされた。

MWCNT の気管内噴霧は、気道上皮細胞に炎症や障害を引き起こすことが知られている。我々は以前に、MWCNT が気道上皮繊毛細胞を脱落させることや運動性を阻害することを報告した。しかし、気管クリ

アランスは、MWCNT 吸入暴露群でも顕著な低下は認められなかった。その原因として、気管クリアランスが主に咳嗽により行われ、上皮細胞による排泄輸送は補助的であることが推測される。一方、MWCNT 群で肺内に取り込まれた蛍光ビーズの蛍光強度は、溶媒群の半分程度だった。MWCNT 吸入暴露群では、肺内に肉芽形成などの炎症や障害が生じた結果、細気管支が狭窄または閉塞するため、蛍光ビーズが肺の奥まで侵入しなかったものと考えられる。

蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系構築の過程で、肺に侵入した異物のクリアランスには、肺胞マクロファージによる貪食や輸送が必要であることが示唆された。したがって、肺胞マクロファージに対するカーボンナノチューブの毒性や障害性を評価し、肺クリアランスの指標とすることを検討した。MTT 法の結果、MWCNT-L は肺胞マクロファージの生存率を顕著に抑制することが示された。一方、MWCNT-S の肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-L と比較して弱かった。同様の結果が、細胞障害性の指標である LDH アッセイによっても認められた。したがって、MWCNT の大きさや形状は、呼吸器系細胞の障害性およびその程度を決定する因子であることが示唆された。

#### E. 結論

蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系を構築し、気管と肺における蛍光ビーズの時間と粒子径に依存するクリアランスを評価することができた。したがって、簡便な気道クリアランス評価系の基礎が構築できたと考えられる。また、MTT 法と LDH アッセイの結果、MWCNT の形状が、呼吸器系細胞の障害性を決定する要因であることが分かった。以上より、MWCNT 吸入暴露による気道上皮繊毛運動や肺胞マクロファージの機能障害は、MWCNT の気管内および肺内の沈着を維持することが予想される。この結果、さらに吸入した異物により、さらなる炎症の促進や感染症の発症が起ると考えられる。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

## 2. 学会発表

- 1) 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス気管支平滑筋における  $\text{Ca}^{2+}$  活性化  $\text{K}^+$  チャネル修飾サブユニット $\gamma 1$  の生理機能解明。生体機能と創薬シンポジウム 2016、2016 年 8 月 25-26 日、仙台。
- 2) 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2ポアドメイン  $\text{K}^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 38 回生体膜と薬物の相互作用シンポジウム、2016 年 11 月 17 日、名古屋。
- 3) 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。気管支平滑筋細胞における  $\text{BK}_{\text{Ca}}$  チャネル $\gamma 1$  サブユニットの生理機能解明。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 15 日、長崎。
- 4) 山越大槻、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。2ポアドメイン  $\text{K}^+$  チャネルによるマウス腹腔マクロファージの膜電位形成。第 90 回日本薬理学会年会、2017 年 3 月 17 日、長崎。

## G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

### 1. 特許取得

- 1) 今泉祐治、山村寿男、鈴木良明、川崎桂輔、成田寛。イオンチャネルに作用する化合物のスクリーニング用材料及びその利用。特願 2016-214685、2016 年 11 月 1 日。

### 2. 実用新案登録

なし。

### 3. その他

なし。

## ・ 研究成果の刊行に関する一覧表



## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の編集者名	書籍名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
津田洋幸	カーボンナノチューブの肺と胸膜中皮に対する毒性と発がん性の簡易評価法	医学のあゆみ	259	223-227	2016
Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H.	Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors.	Cancer Sci		doi:10.1111/cas.12954	2016
Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T, Takahashi S.	Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor $\gamma$ Agonist, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis.	Int J Mol Sci.	17	pii: E2071	2016
Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H, Takahashi S.	Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats.	Nutrients.	8	421	2016
Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaoka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S, Kondo Y.	Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor.	Cancer Res.	76	4192-4204	2016
Naiki-Ito A, Kato H, Sato S, Suzuki S, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S.	Dysfunction of gap-junctional intercellular communication promotes hepatocarcinogenesis.	現代医学	64	103-108	2016
菅野 純	ナノマテリアル毒性のとりえ方とその難しさ	医学のあゆみ	259	17-222	2016
高橋祐次	分散型小型全身曝露吸入システムによるマウス吸入毒性-ヒトの現実的な曝露シナリオに基づいたナノマテリアルの吸入毒性評価の迅速化と効率化に向けて-	医学のあゆみ	259	234-240	2016



## . 研究成果の刊行物・別冊