

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: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
(H30-化学-指定-004)

分担研究課題名:慢性影響を考慮した肺負荷量に基準を置く全身曝露吸入法の確立に関する研究

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
公益財団法人 日産厚生会 玉川病院 病理診断科 部長

研究協力者:北條 幹 東京都健康安全研究センター
薬事環境科学部生体影響研究科・主任研究員

研究協力者:横田 理 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 主任研究官

研究協力者:栗形 麻樹子 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究協力者:高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長

研究要旨

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定、及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係の情報を取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

本分担研究では、OECD TG451 により実施された MWNT-7 の先行試験(Particle Fibre Tox 2016, 13:53)との比較、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との比較を目的とした2年間の吸入曝露実験を実施した。曝露時間は6時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために4週毎の間欠全身曝露吸入を行った。今年度は、本分担研究において、曝露開始後24ヵ月の最終解剖を実施した。

曝露濃度は、低濃度群(L群); $2.7 \pm 0.1 \text{ mg/m}^3$ 、高濃度群(H群); $5.2 \pm 0.2 \text{ mg/m}^3$ であった。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察においてL群に2例に肺がんを示唆する病変が観察された。

A. 研究目的

工業的に大量生産されるナノマテリアルの産業応用が急速進展する中、製造者及び製品利用者の健康被害の防止のための規制決定及び、業界における安全面からの国際競争力の保持の観点から、基礎的定量的な毒性情報を得る評価法の確立が急がれる。毒性未知の物質を取り扱う基本的な戦略は、ヒトで想定される暴露経路に即した動物実験によりハザードを同定し、メカニズムを同定し、用量作用関係を情報の取得し、そこからヒトに対する毒性の推定と用量相関性の推定を行うことであるが、ナノマテリアルに関して最も重要な暴露経路である吸入曝露に関しては、動物実験を遂行する際の技術的障壁が高く、実施例は数少ない。

本分担研究では、既に報告のあるOECD TG451により実施されたMWNT-7の長期吸入発がん性試験試験(Particle Fibre Tox 2016, 13:53)、および、本事業において並行して実施される気管内投与実験との、試験プロトコルの違いによる肺病理及び発がん性の差の比較を目的とし2年間の吸入曝露実験を実施した。曝露時間は6時間/回、過剰な肺負荷量を避けるために4週間毎の間欠全身曝露吸入とし、今年度は、曝露開始後24ヵ月の最終定解剖を行った。現在病理標本を作製中である。

B. 研究方法

本分担研究では、主として肺の病理組織学的な検討を実施した。以下に検体、曝露方法、使用動物の概要を記載する(詳細は研究分担者 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部 室長 高橋祐次の項を参照)。

B-1. 検体

検体は多層カーボンナノチューブの一つであるMWNT-7(三井、lot No.: 060125-01k)を使用した。高分散性の乾燥検体とするため、tert-ブチルアルコール(特級、関東化学株式会社)に懸濁、53 μ mの金属シーブ(特注品、セイシン企業)でろ過、凍結乾燥によって乾燥検体を得る Taquann 法処理を行った。以下、Taquann 処理 MWNT-7 を、T-CNT7#53 と記載する。

B-2. マウス全身曝露吸入実験

1) 動物

C57BL/6NcrSLC(日本エスエルシー株式会社)雄性マウスを10週齢で購入し2週間の馴化期間を経たのち12週齢にて使用した。

2) 群構成

対照群(C群、清浄空気のみ)、低濃度群(L群、目標濃度3 mg/m³)、高濃度群(H群、目標濃度6 mg/m³)の3群構成とした。各群50匹のマウスを使用し、1日6時間(10:00~16:00)の全身曝露吸入を4週毎に行い、2年間で26回の曝露を行った。

3) 吸入曝露実験装置

T-CNT7#53のエアロゾル化は、既設のTaquann直噴全身吸入装置Ver3.0を使用した(共同開発 柴田科学株式会社、特許申請中)。

B-3. 解剖

マウスは吸入麻酔器(TK-7、バイオマシナリー)を用い3.5~4%イソフルラン(DSファーマアニマルヘルス)による深麻酔下で、眼窩より採血を行い、その後、腋窩動脈を切断して放血致死後に解剖した。被毛に付着しているT-CNT7#53が組織に混入することを防止するため、開胸前に剥皮して除去した状態にしてサ

ンプリングを行った。

肺負荷量測定用の動物は、開胸して肺を取り出し、肺門部で気管を除去して湿重量測定後に-80℃で凍結保存した。

免疫機能解析用の動物は、開胸後に留置針を気管に挿入し生理食塩水または細胞保存液(MACS® Tissue Storage Solution, MACS)を1 mL 注入してBALFを採取した。この作業を2回行い、約2 mLのBALFを回収した。BALFを回収した肺は、遺伝子発現解析用に副葉を採取してRNALater®に保存した。その後、4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を約1.5 mL 注入し、同組成の固定液に浸漬固定した。

病理標本用の動物は、気道内のT-CNT7#53の人為的移動を避けるため、気管からの固定液の注入は行わず、点滴回路を用いた灌流装置により灌流固定した。具体的には、開胸前に喉頭部を絹糸で結紮して開胸時の肺の虚脱を防止した後、開胸し、右心室に翼状針(21G、SV-21CLK-2、テルモ株式会社)を刺入して生理食塩水(大塚生食注、大塚製薬工場)を約40cm水柱の静水圧により注入し、右心耳を切開して血液を除去した。その後、右心室から翼状針を引き抜いて左心室に刺入して血液を除去した後、回路を切り替えて4%パラホルムアルデヒド・リン酸緩衝液(和光純薬工業、組織固定用、用時調製)を同静水圧にて約3分灌流して固定後、同組成固定液に浸漬固定を行った。流量は点滴調節器により適宜調節した。

倫理面への配慮

本実験は動物愛護に関する法律、基準、指針を遵守し国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の承認のもとに人道的実施された。ナノマテリアルの実験に際しては、当研究所の専用実験施設内で、その運用規則に従い実

施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実験を行った。

B-4. BALF 細胞の染色

回収したBALFは、スライドガラス(Matsunami)をセットしたShandon™ EZ single cytofunnel (A78710003, Thermo Fisher Scientific)に150µL分注し、Cytospin 3(Thermo Fisher Scientific)を用いて、700 rpm、5分間の遠心を行い、細胞塗抹標本を作製した。冷風乾燥、メタノール(試薬特級、富士フィルム和光純薬株式会社)で1分間固定した後、pH6.4リン酸緩衝液(武藤化学株式会社)にて洗浄した。3%メイグリュンワルド染色液(富士フィルム和光純薬株式会社)にて45分間染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄した。その後、5%ギムザ染色液(富士フィルム和光純薬株式会社)にて45分間染色し、pH6.4リン酸緩衝液で洗浄し、乾燥、封入を行った。

B-5. 血液検査及び血液生化学検査

採血直後の血液を対象として、電解質とヘマトクリットを測定した(STAX-5 inspire、株式会社テクノメディカ)。血清を対象として、乾式臨床化学分析装置(富士ドライケムNX500s、富士フィルム株式会社)を用いて血液生化学検査を行った。

C. 研究結果

C-1. 一般状態と体重推移

体重は初回曝露後54週まで、対照群とT-CNT7#53曝露群との間に差はみられなかったが、54週以降、H群で体重低下傾向であった(図1)。2年間の曝露期間において、死亡または切迫屠殺に供した動物は、対照群7/50匹、L群9/50匹、H群13/50匹であった。曝露後24ヶ月の最終解剖に供した動物数は、対照群

20 匹、L 群 18 匹、H 群 16 匹であった。死亡率について Kaplan-Meier 解析 (R version 4.0.4) を行い、Log-rank 検定を行ったところ、群間に差は認められなかった (図 2)。

C-2. 肉眼所見・肺重量・BALF 細胞

最終解剖において、肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した。胸腔壁の背側において、ミルキースポットが脊椎骨の両側に L 群 15/18 例、H 群では 15/16 例観察された (図 3)。L 群の 2/18 例において、肺に白色腫瘍が観察された (図 4)。また、胸水が L 群 3/18 例、H 群では 5/16 例観察された。肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し、灰色から黒色を呈する様子が L 群 12/18 例、H 群では 9/16 例観察された。肺の腫大に伴うと考えられる心肥大が、L 群 4/18 例、H 群では 6/16 例観察され、対照群にも 1/20 例観察された (表 1)。肺重量は、曝露濃度依存的に増加した (図 5)。肺負荷量は、L 群の 6 ヶ月、12 ヶ月においてそれぞれ 6.4 μ g/動物、22.3 μ g/動物、H 群の 6 ヶ月、12 ヶ月においてそれぞれ 15.2 μ g/動物、45.8 μ g/動物であった。

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。

C-3. 血液/生化学検査

最終解剖においては、電解質とヘマトクリットに影響はみられなかった。生化学検査においては、T-CNT7#53 曝露群において肝の胆道系酵素である LAP (leucine aminopeptidase)、TCHO、BUN の低下がみられたが、いずれも軽度であった (表 2、表 3)。

D. 考察

本分担研究では Taquann 全身曝露吸入装

置 Ver.3.0 を使用し T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験において、マウスに 6 時間/日、4 週毎の吸入曝露を行い、最終解剖を行った。現在、病理組織標本を作製中であるため、最終的な結論には至っていないが、以下の事が推察された。

Kaplan-Meier 解析では、死因を考慮せずに解析を行った。その結果、Log-rank 検定では、曝露による影響は認められていない。今後の病理組織評価によって死因を分類することができれば、検体による影響を明らかにできる可能性がある。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加していた。このような外観の変化は 6 ヶ月及び 12 ヶ月の解剖では見られておらず、また病理組織評価においては明確な線維性肉芽腫の形成は認められていない。24 ヶ月では肺組織の弾力性を増しており、検体の肺への沈着に伴い、線維化が亢進していることが推察される。

肺に付属するリンパ節は、肉眼で明確に観察できるサイズに腫大し、検体の沈着と考えられる黒色を胸呈していた。肺病変として、L 群に 2 例に発がんを示唆する白色結節が観察されたが、H 群では観察されていない。

肉学所見では中皮腫と考えられる所見は観察されていないが、胸腔の腔壁側にはミルキースポットが観察されており、これが観察された脊椎の両側は、p53 \pm マウスを用いた MWCNT 吸入による先行研究において、肉眼では明らかな変化が観察されないが、中皮腫発がんを示唆する顕微鏡的病変が誘発されること確認している部位であるため、今後の病理組織評価が注目される部位である。

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された

が、多くの細胞は 6 ヶ月、12 ヶ月の中間解剖時に得られた細胞よりも凝集している傾向が強かった。

E. 結論

Taquann 全身曝露吸入装置 Ver.3.0 を用いての T-CNT7#53 の 2 年間の間欠吸入曝露実験を実施し 24 ヶ月の最終期解剖を実施した。群間に死亡率の差は認められなかった。肺の外観は、曝露濃度依存的に灰白色から灰色を呈して腫大し、肺重量が増加した。肉眼的観察において L 群に 2 例に肺がんを示唆する病変が観察された。

謝辞:

本研究の遂行にあたり、技術的支援をしていただいた、辻昌貴氏、森田紘一氏、菅康佑氏、相田麻子氏、相原妃佐子に深く感謝する。

F. 参考文献

Kasai T, Umeda Y, Ohnishi M, Mine T, Kondo H, Takeuchi T, Matsumoto M, Fukushima S. Lung carcinogenicity of inhaled multi-walled carbon nanotube in rats. Part Fibre Toxicol. 2016 Oct 13;13(1):53.

G. 研究発表

1. 論文発表

Matsumoto M, Kasai T, Saito A, Takanobu K, Senoh H, Umeda Y, Kanno J. Carcinogenicity of butyl 2,3-epoxypropyl ether in rats and mice by whole body inhalation for two years. J Toxicol Sci. 2020;45(1):1-14.

Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, Naiki-Ito A, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, Tsuda H. Comparative

carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intratracheal instillation in the rat.

Hojo M, Yamamoto Y, Sakamoto Y, Maeno A, Ohnuki A, Suzuki J, Inomata A, Moriyasu T, Taquahashi Y, Kanno J, Hirose A, Nakae D., Histological sequence of the development of rat mesothelioma by MWCNT, with the involvement of apolipoproteins.

2. 学会発表

北嶋聡、種村健太郎、菅野純、室内揮発性有機化学物質の極低濃度下における吸入曝露の際のマウス中枢神経系への影響. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

種村健太郎、齊藤洋克、古川佑介、相崎健一、北嶋聡、菅野純、低用量/低濃度化学物質の発生-発達期ばく露による情動認知行動毒性～情動認知行動毒性評価系の国際標準化に向けた対応～. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

菅野純、発生発達期暴露による情動認知行動毒性の背景とその評価系に関する国際的動向. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

小野竜一、相崎健一、北嶋聡、菅野純、化学物質の反復投与によるゲノムワイドなヒストン修飾の変化. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

菅野純、北嶋聡、相崎健一、小野竜一、Percellome Project における精度管理とその解析への影響. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.6.30)、Web 開催、シンポジウム、口演

- 相崎健一、長谷武志、北嶋聡、小野竜一、北野宏明、菅野純、米国毒性学会合同シンポジウム: Current and future application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web 開催、シンポジウム、口演
- 菅野純、シグナル毒性の概念とその拡張. 第 47 回日本毒性学会学術年会、(2020.7.1)、Web 開催、ワークショップ、口演
- 菅野純、職場環境における化学物質の毒性発現機構の多様性と評価・管理の連関性に関する一考察、第 289 回 日本産業衛生学会 関東地方会例会 (2020. 8.29)、口演
- Jun Kanno, Ken-ichi Aisaki, Ryuichi Ono and Satoshi Kitajima、Application of PERCELLOME database as a part of big data to toxicological research: The 36th Annual Meeting of KSOT/KEMS, Special lecture, Web, Oral presentation.
- Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koich Morita, Masaki Tsuji, Kousuke Suga, Makiko Kuwagata, Motoki Hojyo, Akihiko Hirose, and Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th NANO Conference (2020.11.12-13) e-poster.
- 種村健太郎、菅野純、低用量化学物質の周産期暴露による情動認知行動影響解と評価系の国際標準化に向けた展開、日本学術会議公開シンポジウム「食の安全と環境ホルモン」(2020.12.5) Web 口演
- J Kanno, K. Aisaki¹, R. Ono¹, and S. Kitajima. Comprehensive Histone, DNA Methylation, and mRNA Expression Analysis of Murine Liver Repeatedly Exposure to Chemicals—Percellome Project 2021 Update, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- M. Hojo, Y. Yamamoto, Y. Sakamoto, A. Ohnuki, A. Maeno, T. Moriyasu, Y. Taquahashi, J. Kanno, A. Hirose, and D. Nakae. Declines in Serum Levels of Apolipoproteins during the Development of Peritoneal Mesothelioma by Multiwalled Carbon Nanotube in Rats, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- Y. Taquahashi, S. Yokota, M. Hojyo, K. Morita¹, M. Tsuji, K. Suga, M. Kuwagata, A. Hirose, and J. Kanno, Interim Report of the 4-Week Interval Intermittent Whole Body Inhalation Study on Multiwalled Carbon Nanotube in Mice, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual
- D. M. Saleh, W. T. Alexander, T. Numano, O. H. Ahmed, S. Gunasekaran, D. B. Alexander, M. Abdelgied, A. El-Gazzar, H. Takase¹, A. N. Ito, S. Takahashi, A. Hirose, M. Onishi, J. Kanno, and H. Tsuda, Thin-Tangled Multiwalled Carbon Nanotubes Are Carcinogenic to the Rat Lung after Administration by Intra-tracheal Instillation, SOT 2021 (2021.3.17), Poster, virtual

H. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

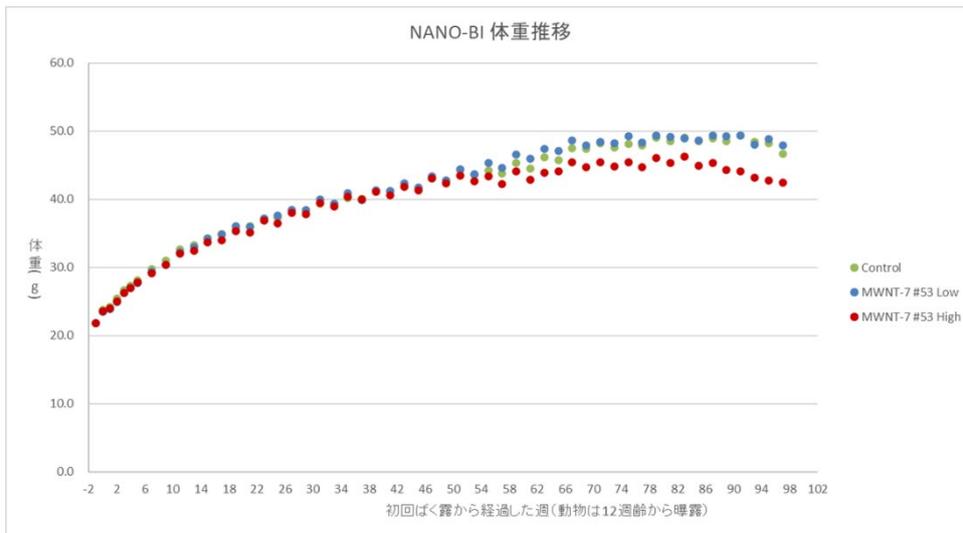


図 1 体重推移

体重は初回曝露後 54 週まで、対照群と T-CNT7#53 曝露群との間に差はみられなかったが、54 週以降、H 群で体重低下傾向であった。

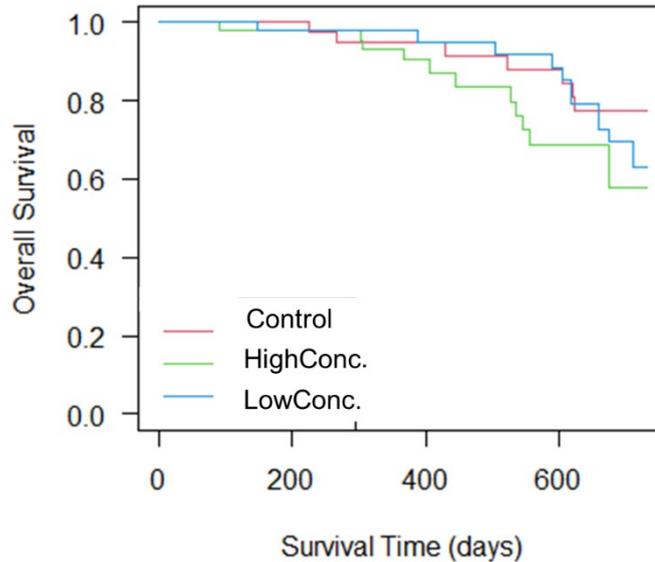


図 2 Kaplan-Meier 解析結果

死因は考慮せずに Kaplan-Meier 解析を行った。Log-rank 検定では群間に差は認められなかった。

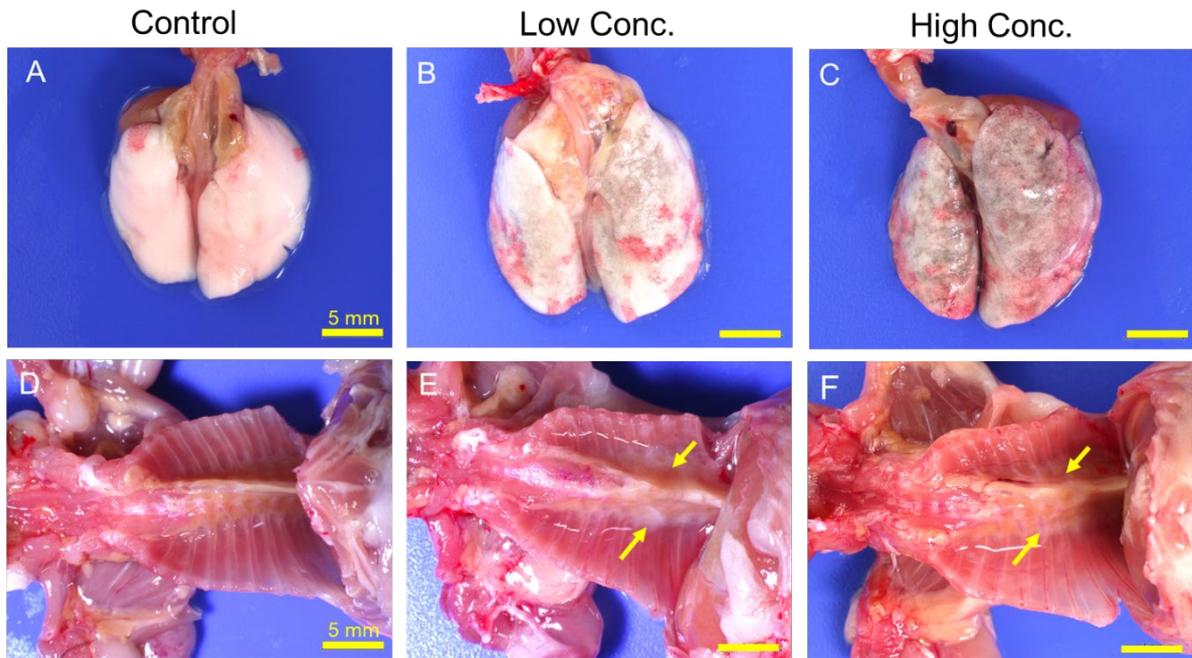


図3 肉眼所見

肺は曝露濃度依存的に腫大し、色調は灰白色～灰色を呈した(A～C)。胸腔壁の背側において、ミルクスポット(E,F:矢印)が脊椎骨の両側に L 群 15/18 例、H 群では 15/16 例観察された(スケールバー:5mm)。

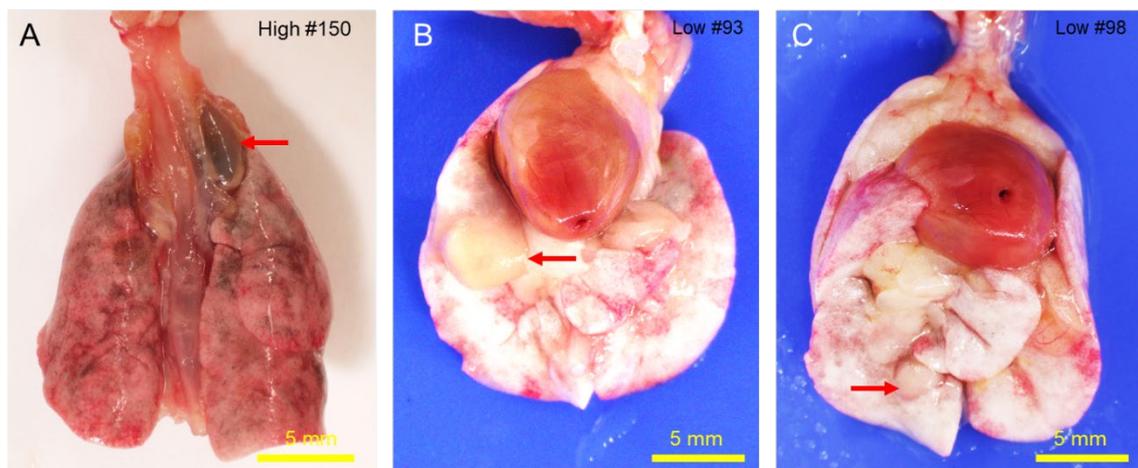


図4 肺に病変がみられた例

A: 肺右葉の気管近傍に位置するリンパ節は腫大し(矢印)、灰色から黒色を呈する様子が L 群 12/18 例、H 群では 9/16 例観察された。B:L 群の 2 例において、肺に白色腫瘍が観察された。

表 1:肉眼所見結果のまとめ

Autopsy Findings					
Period	24M	Control	Low Concentration	High Concentration	
Number of animals examined			20	18	16
Not remarkable			1	0	0
Organ	Findings				
Lung	Swelling		2	16	13
	Grayish white		0	18	0
	Grayish		0	0	16
	Edema		2	0	0
	Left median lobe, Raised Node		0	1	0
	Left caudal Lobe, Raised Node		0	1	0
	Lymph node, swelling		0	12	9
	Lymph node, black		0	12	9
Thymus	Swelling		1	1	0
Thoracic cavity	Milky spot		0	15	15
	Pleural effusion		0	3	5
Axillary lymph node	Swelling		0	0	1
Heart	Hypertrophy		1	4	6
Liver	Rough-surfaced		0	0	1
	Lateral left lobe, white macule		0	0	1
	Lateral left lobe, raised node		2	1	1
	Caudate lobe, raised node		1	0	0
	Swelling		1	0	0
	Small		0	0	1
	Adhesion		0	3	0
Adhesion with diaphragm		0	0	1	
Kidney	Left, white macule		0	0	2
	Swelling, bilateral		1	0	0
	Right, cystic kidney		1	0	0
	Discoloring		1	0	0
Spleen	Swelling		6	2	3
abdominal cavity	Mesenteric lymph nodes, swelling		4	2	0
	Hemorrhagic ascites		1	1	0
Seminal vesicle	Swelling, brown		18	16	15

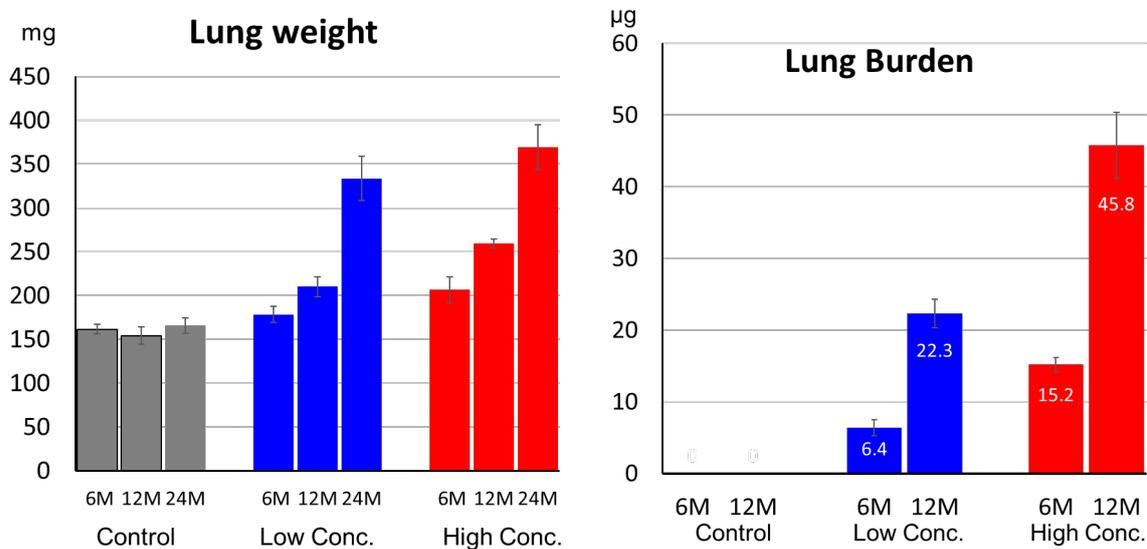


図5 肺重量と肺負荷量

肺重量は、曝露濃度依存的に増加した。

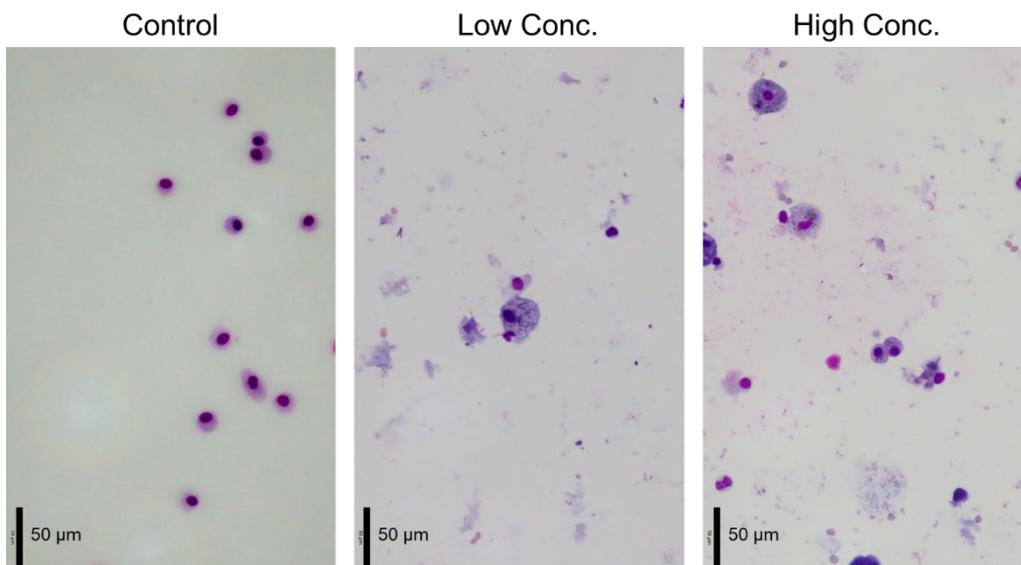


図6 BALF 細胞の観察結果

BALF から得られた細胞の観察を行った結果、細胞数は L 群、H 群で増加しており、T-CNT7#53 を貪食した大型の細胞が観察された。

表 2 血液検査結果のまとめ(電解質・ヘマトクリット)

Period	24M	Na ⁺ mmol/L	K ⁺ mmol/L	Cl ⁻ mmol/L	Hct(%) %
Control	Mean	152	5.2	111.6	29.8
	SD	4.1	0.5	3.9	9.1
	N	20	20	20	20
LowConc.	Mean	152.1	5.1	111.2	31
	SD	2	0.4	2	3.1
	N	18	18	18	18
HighConc.	Mean	152.3	5.3	111	32.7
	SD	1.7	0.5	1.5	10.1
	N	16	16	16	16

表 3 血液生化学検査結果まとめ

Period	24M	ALP U/l	CHE U/l	ALT U/l	AST U/l	LAP U/l	LDH U/l	TBIL mg/dl	TCHO mg/dl	TG mg/dl	CKMB U/l	BUN mg/dl	CRE mg/dl	AMYL U/l	ALB g/dl	TP g/dl	GLU mg/dl
Control	Mean	268	33	59	97	50	389	0.4	95	91	97	24	0.39	4671	2.1	5.0	189
	SD	129	8	86	109	9	176	0.2	27	40	24	5	0.15	1032	0.3	0.7	55
	N	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20	20
LowConc.	Mean	242	28 *	42	66	46	314	0.3 *	93	75	82 *	20.7 *	0.29	5077	2.0	4.8	223
	SD	67	5	32	24	10	103	0.1	32	45	14	3.4	0.17	858	0.3	0.5	58
	N	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18	18
HighConc.	Mean	242	31	53	84	43 **	391	0.4	77 *	66	101	21 *	0.26	4142	2.2	5.0	193
	SD	47	5	82	55	6	235	0.1	24	38	21	3.1	0.23	1177	0.3	0.6	45
	N	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16	16