

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:	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:	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:	菅野 純	国立医薬品食品衛生研究所	毒性部	
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:	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:	山本 行男	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:	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:	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<sup>1)</sup>の報告のみである。本研究では、ラットの2年間の吸入試験と同レベルの評価が可能な慢性試験方法の開発を目指し、2年間にわたる間欠的な気管内投与試験を実施した。

F344雄性ラットを、対照群(C群)、低用量群(L群)、高用量群(H群)および高用量スプレー式ゾンデ群(HS群)の4群に分け、動物数はそれぞれ30匹とした。ただし、経過観察と肺負荷量測定のためのサテライト動物を用意した。9週齢から、C群には0.1%Tween含有生理食塩水を、L群には0.125 mg/kg体重、H群およびHS群には0.5 mg/kg体重の用量でMWNT-7(三井)を4週間毎に1回、合計26回、気管内に投与した。投与にはHS群のみスプレー式ゾンデを、その他の群には経口ゾンデを用いた。実験開始から2年後に、最終解剖を実施し、病理組織学的検索および気管支肺胞洗浄液(BALF)分析と、肺負荷量の測定を行った。

組織学的には、投与群の全個体で、肺実質にび慢性にMWCNT繊維を貪食したマクロファージの凝集および線維化を伴う肉芽腫様の炎症反応が認められた。腫瘍性病変として、各投与群で腺腫と腺癌が、H群・HS群においては、胸腔内中皮腫が観察された。途中解剖及び最終解剖に供した動物における肺腫瘍の発現頻度は、C群、L群、H群およびHS群のそれぞれで、1/30例(3.3%)、4/30例(13.3%)、10/30例(33.3%;  $p<0.01$ )および6/30例(20.0%)であった。また、胸腔内中皮腫の発現頻度はそれぞれ0/30例(0%)、2/30例(6.7%)、8/30例(26.7%;  $p<0.01$ )および10/30例(33.3%;  $p<0.01$ )であった。BALF中の白血球数はHS群において対照群に対して有意な増加が認められた。BALF中のLDH活性および総タンパク質量は、全てのMWCNT投与群で有意に増加してい

た。最終解剖時のL群、H群およびHS群のMWCNT肺負荷量は、それぞれ、 $920 \pm 240$  (Mean  $\pm$  S. D.)  $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 、 $3615 \pm 902$   $\mu\text{g}/\text{Lung}$  および  $3902 \pm 350$   $\mu\text{g}/\text{Lung}$  だった。

肺腫瘍の発生には用量依存性が認められ、その発現率はKasaiらの吸入曝露試験<sup>1)</sup>の結果と同程度であったため、本研究における反復気管内投与法は、吸入曝露試験の代替法になりうることが示唆された。今回、吸入曝露試験では発症しなかった胸膜中皮腫が観察されたが、その発現率は、Suzuiら<sup>2)</sup>と同程度であった。H・HS群では、吸入曝露試験の結果に比べて肺内MWCNTの総蓄積量が多く、胸腔内へ移行した繊維量も多くなったことが推測され、そのために、中皮腫が発生したと考えられる。なお、今回、2種類の投与器具を用いたが、器具の違いによる腫瘍発生頻度に顕著な差異は見られなかった。本プロトコールで肺腫瘍と中皮腫を評価する場合、1回あたりの投与用量や投与回数を詳細に検討の上、総負荷量を調整することが肝要である。

## 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 (三井) の2年間の全身吸入曝露試験が実施され、肺の腺腫および腺癌が発症することが報告されたが<sup>1)</sup>、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評価手法が求められている。

気管内投与法による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週間で合計8回のMWCNT (日機装) の反復投与を行い、その後、2年間飼育し、肺腫瘍および胸腔内中皮腫が発症することを報告した<sup>2)</sup>。MWCNTの肺負荷量に注目すると、吸入曝露試験と気管内投与試験のどちらも最大で  $1000$   $\mu\text{g}/\text{Lung}$  を超えているが<sup>1),2)</sup>、吸入曝露試験では、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<sup>1)</sup>、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の形状となった (図1)<sup>2),3)</sup>。胸膜中皮腫の発症には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<sup>3)</sup>。なお、2019年にはNumanoらが、反復気管内投与により1匹あたり総計  $1500\mu\text{g}$  のMWNT-7を曝露した後に2年間経過観察する実験を行った<sup>4)</sup>。その結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生し、気管内投与により初期に投与負荷を高くすると胸膜中皮腫が高頻度で発症することが示された。

本研究では、2年間の吸入曝露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)。MWNT-7の気管内投与を間欠的に実施し、右肩上がりの形状のAUCを描きながら最終的にKasaiらの結果と同等以上の肺負荷量を達成できるように投与量を設定した。

H30年度末から、低用量群に  $0.125$   $\text{mg}/\text{kg}$  体重、高用量群に  $0.5$   $\text{mg}/\text{kg}$  体重の用量で4週間に1回、気管内投与を行ってきたが、1年経過後までは投与に関連する増殖性病変の

発症は認められなかった。今年度は、2年間で合計26回の投与を終え、最終解剖を行い、発がん性を評価した。

## B. 研究方法

### i) MWCNTの調製

Taquann 処理(53 $\mu$ m メッシュ)<sup>5)</sup>した MWNT-7 を 200°C で 2 時間処理し、0.1% Tween80(ポリソルベート、日油)含有生理食塩水を加え超音波浴槽で 30 分以上分散させた。低用量群の試料は 0.125 mg/mL、高用量群の試料は 0.5 mg/mL の濃度にそれぞれ調製した。

### ii) 動物飼育および投与

5 週齢の F344/DuCr1Cr1j の雄性ラットを購入し(日本チャールス・リバー)、コンベンショナル飼育室にて、床敷(アルファドライプラス、ESP 益新)入りのプラスチック製ケージに 3 匹ずつ収容し、基礎飼料 CE-2(日本クレア)と、限外ろ過した水道水を自由摂取させ、室温 24 $\pm$ 1°C、湿度 50 $\pm$ 5%、換気回数毎時 10 回(HEPA フィルター経由)、12 時間蛍光灯照明の条件下で飼育した。

7 週齢の時点で、対照群(C 群)、低用量群(L 群)、高用量群(H 群)および高用量スプレー式ゾンデ群(HS 群)の 4 群に分けた。動物数は 1 群あたり 30 匹とし、経過観察のため全群に 10 匹の、さらに、MWCNT の肺負荷量測定のため L 群・H 群・HS 群それぞれに 15 匹のサテライト動物を用意した。

全動物について、1 週間に一度、体重を測定した。

9 週齢から、C 群、L 群および H 群については経口ゾンデ(夏目製作所)を、HS 群についてはスプレー式ゾンデ(PennCentury)をそれぞれ用いて、イソフルラン吸入麻酔

下で、1 mL/kg 体重の投与量で 4 週間に 1 度の頻度で気管内投与を行った(図 2)。MWCNT の投与用量は、L 群で 0.125 mg/kg 体重、H 群および HS 群で 0.5 mg/kg 体重とした。

### iii) 剖検

半年経過後および 1 年経過後に、各群 5 匹を経過観察用に、別の 5 匹を MWCNT の肺負荷量測定用に、それぞれ解剖した(昨年度報告済み)。

2 年経過後(26 回投与後)に最終解剖を実施した。全動物について、イソフルラン麻酔下で全採血し、全臓器を摘出し、10%中性緩衝ホルマリン溶液で固定した。肺は気管からホルマリン溶液を注入して固定した。また、最終解剖以前に、人道的エンドポイントに達した動物および死亡動物についても同様に剖検した。

最終解剖では、各群最大 10 匹について、右葉にリン酸緩衝液(PBS)を注入して BALF を回収した。BALF は遠心分離し、沈殿は白血球数の計数に、上清は総タンパク質量の測定に用いた。また、MWCNT 投与群の肺負荷量測定用の 5 匹については、各葉を切り離し、ホルマリン溶液に浸漬してから分析に用いた。

### iv) 気管支肺胞洗浄液(BALF)の分析

BALF の沈殿を 2%の BSA 含有 PBS で再懸濁し、チュルク液で染色後に総細胞数の計測を行った。また、再懸濁液から自動遠心塗抹装置によって塗抹標本作製し、メイグリュンワルド・ギムザ染色し、白血球を分類・計数し、各種の白血球の個数を算出した。

BALF の上清の乳酸脱水素酵素(LDH)活性

は、LDH Cytotoxicity Detection kit (タカラバイオ) により、また、総タンパク質量は、2-D Quant Kit (GE ヘルスケア) により測定した。

#### v) 病理組織学的解析

固定した臓器から、定法によりヘマトキシリン・エオジン染色標本を作製し、光学顕微鏡による病理組織検索を行った。

#### vi) 肺負荷量の測定

肺内の MWCNT の測定は、Ohnishi らの蛍光マーカーを用いて検出する手法 (大西法) に従った<sup>6),7)</sup>。肺組織をアルカリ溶液で溶解し、十分に分散させ、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 繊維を捕捉してから、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。

#### vii) 統計学的解析

体重、臓器重量、BALF 中の白血球数、LDH 活性および総タンパク質量の結果については Dunnett の多重比較検定を、腫瘍の発現率の結果については Fisher の直接確率検定を行った。生存率については、Kaplan-Meier 法により生存期間を解析し、log-rank test により検定を行った。

#### <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) 体重および臓器重量

最終解剖時の生存個体の C 群、L 群、H 群および HS 群の平均体重は、それぞれ、416.4 g、399.4 g、386.3 g および 380.5 g であり、C 群に対し、H 群および HS 群の体重は有意に低下した (表 1)。

主要臓器の臓器重量については、肺を除き、C 群に対する有意な変化はみられなかった (表 2)。肺全葉の重量は、いずれの投与群においても C 群に対して有意に増加した。

### ii) 途中解剖と生存曲線

投与開始後 104 週までの観察期間において、C 群では、5/40 例の途中解剖を行い、内訳は、脳腫瘍を疑う 2 例、大顆粒リンパ球性白血病 (LGL) 2 例、腹腔内中皮腫 1 例であった。L 群では、10/55 例の途中解剖を行い、内訳は、投与直後の窒息 3 例、餌詰まり 1 例、骨肉腫 1 例、神経鞘腫 1 例、LGL2 例、ハーダー腺腫瘍を疑う 1 例、下垂体腫瘍 1 例であった。H 群では、20/55 例の途中解剖を行い、内訳は投与直後の窒息 2 例、LGL4 例、ジンバル腺腫瘍 1 例、下垂体腫瘍 3 例、肺腫瘍 1 例、胸腔内中皮腫 7 例、不明 2 例であった。HS 群では、16/55 例の途中解剖を行い、内訳は投与直後の窒息 1 例、LGL5 例、包皮腺腫瘍を疑う 1 例、腹腔内中皮腫 1 例、胃部の腫瘍 1 例、下垂体腫瘍 1 例、胸腔内中皮腫 6 例であった。

H 群・HS 群において、投与開始 80 週後から胸腔内中皮腫による瀕死例・死亡例が発生し (図 3・矢頭)、C 群に比較して有意な生存率の低下が認められた。最終解剖時に

における C 群、L 群、H 群および HS 群の生存率はそれぞれ、25/30 例 (83.3%)、22/30 例 (73.3%)、12/30 例 (40.0%) および 15/30 例 (50.0%) であった。

### iii) BALF の生化学および細胞学的解析

BALF の沈殿の白血球数は、HS 群のみで C 群に対して投与群で有意に増加した。好中球は投与各群で、リンパ球は H 群、HS 群で有意な増加を示した。BALF 上清の LDH 活性と総タンパク質量は、C 群に対し、各投与群で有意に上昇し、HS 群では H 群よりもやや平均値が高かった (図 4)。

### iv) 病理組織学的解析

肉眼的に、投与群の肺は MWCNT の沈着により黒色を呈し、投与用量に応じて色味は強かった (図 5)。HS 群においては、すべての動物に気管分岐部の付近に複数個の黒色斑が認められた (図 5 ; 矢印)。これは昨年度報告したように、スプレー式ゾンドの先端が位置する気管粘膜部位で局所的に沈着した MWCNT であった。投与群の一部の動物では、肺実質に 1 から 3mm 程度の白色のドーム状の結節が認められた (図 6)。投与 80 週以降の途中解剖では、胸水の貯留や心タンポナーデにより状態の悪化した個体が多く、これらの個体では、臓側胸膜・横隔膜・心嚢膜等に、白色結節が播種状に観察された (図 7)。

組織学的には、投与群の全個体で、肺実質にび漫性に MWCNT 繊維を貪食したマクロファージの凝集および線維化を伴う肉芽腫様の炎症反応が認められた (図 8)。また、1 年経過後の解剖時と同様に MWCNT 繊維の沈着に関連した部位に反応性 II 型肺胞上皮細

胞過形成が見られた。また、気管支肺胞上皮過形成も散見された。

腫瘍性病変として、肺実質では、腺腫と腺癌が投与群で認められた (表 3)。腺癌の多くで、細胞異型の強い腫瘍細胞が間質や血管へ浸潤しているのが観察された (図 8)。腺腫と腺癌の両者を合わせた発生頻度は、C 群、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ、3.3%、13.3%、33.3% および 20.0% であり、H 群では C 群に比較して有意な増加を示した (表 3)。いっぽう、H 群・HS 群では、中皮腫が認められた (表 3)。多くの症例が、上皮型と肉腫型の両方の特徴を示す中皮腫であり、横隔膜等周辺組織への浸潤が顕著であった (図 9)。胸腔内中皮腫の発生頻度は、C 群、L 群、H 群および HS 群で、それぞれ、0%、6.7%、26.7% および 20.0% であり、H 群・HS 群で有意な増加をみた (表 3)。

### v) MWCNT の肺負荷量

最終解剖時の L 群、H 群および HS 群の、肺内の MWCNT 量はそれぞれ  $920 \pm 240$  (Mean  $\pm$  S. D.)  $\mu\text{g}/\text{Lung}$ 、 $3615 \pm 902$   $\mu\text{g}/\text{Lung}$  および  $3902 \pm 350$   $\mu\text{g}/\text{Lung}$  であった (図 10)。いずれの群においても、半年から 1 年後の結果と比べると、やや急な勾配をもって増加していた。

## D. 考察

2 年間にわたる間欠の反復気管内投与により、MWCNT の発がん性試験を評価した結果、用量依存的な肺腫瘍および胸腔内中皮腫の増加が認められた。肺腫瘍の発生頻度は、Kasai ら<sup>1)</sup>の吸入曝露試験と同程度であり、今回の気管内反復投与試験が、代替試験になりうることを示された。しかしながら、総

肺負荷量が Kasai らの結果より 2 倍程度多くなったため、下記の通り、肺腫瘍の発現率や、中皮腫の発症の有無等の差異をもたらしたと考えられる。

まず、2 年後の肺負荷量に着目し、肺腫瘍の発現率について、Kasai らの吸入曝露試験の結果と比較すると、やや肺腫瘍が発生しづらかったことがわかる。Kasai らの高濃度群では肺負荷量が 1800  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  で、肺腫瘍の発現率が 16/50 例 (32%;  $p < 0.01$ ) であったのに対して、肺負荷量がこの 2 倍以上だったにも関わらず、H 群、HS 群の発現率はそれぞれ、10/30 例 (33.3%;  $p < 0.05$ )、6/30 例 (20.0%) だった。これは、H 群・HS 群の最終解剖時の生存率が 40 から 50% と低かったことが要因の一つと思われる。例えば、同じ気管内投与の実験でも、Suzui ら<sup>2)</sup>の実験では生存率は 40% 前後で、肺腫瘍の発現率が 37% であったのに対し、Numano ら<sup>4)</sup>の実験では、中皮腫による早期死亡が多かったため、生存率は 5% であり、肺腫瘍の頻度は 1/19 例 (5%) であった。肺腫瘍の発生には 2 年の期間が必要と考えられる。いっぽう、Kasai らの中濃度群の結果は、肺負荷量が 150  $\mu\text{g}/\text{lung}$  で、肺腫瘍の発現率が 13/50 例 (26%;  $p < 0.01$ ) だったのに対し、肺負荷量がこの 6 倍であった L 群では、早期死亡が少なかったにも関わらず、肺腫瘍の発現率が 4/30 例 (13.3%) と低かった。このことは、MWCNT 肺負荷量よりも、曝露形態の違いが及ぼす影響のほうが大きかったことを疑わせる。毎日の吸入曝露による呼吸器への MWCNT の沈着に比べると、4 週間に 1 度の気管内投与によるサージ的な MWCNT の負荷が、強い急性炎症を引き起こしたと考えられる。これが、肺組織における、慢性炎症、線維化

および免疫抑制的な微小環境の形成を阻害し、腫瘍化を抑制したのかもしれない。

次に、今回の結果を、気管内投与試験の既報と比較すると、L 群の肺腫瘍の発現率の低さは、AUC の形状の違いが関係していたことも考えられる。今回の試験は、右肩上がり AUC 形状の MWCNT 蓄積量だったが、L 群の肺腫瘍の発現率 (13.3%) は、右肩下がり AUC 形状と同程度の面積である Suzui らの結果 (36.8%) や、半分程度の AUC 面積である Abdelgied ら<sup>8)</sup> (42.8%) あるいは Saleh ら<sup>9)</sup> (25.0%) の結果よりも、低かった。MWCNT の種類が違うために、一概には言えないが、初期に高負荷を与えることが、肺腫瘍の誘発に、より重要であることが示唆された。

今回、H 群・HS 群で胸腔内中皮腫が発症したことは、Kasai らの吸入曝露試験との重要な相違点であった。不溶性の微粒子は肺実質に分布した後、大部分が肺門側へ向かうリンパ経路へ、ごく一部が胸膜へ向かう経路へ、それぞれ移行する。アスベストや MWCNT 等の微小繊維が胸膜を超えて胸腔へ移行すると、壁側胸膜のストーマにトラップされ、frustrated phagocytosis 等の機構により中皮組織の慢性炎症や中皮腫が発生すると考えられている<sup>10)</sup>。ヒトのアスベスト胸膜中皮腫で証明されたように、中皮腫の発症には長い期間を要するため、ラットの 2 年間の発がん試験で中皮腫が発症するには、実験初期に胸膜が MWCNT 繊維に曝露される必要があると思われる。今回の実験では、例えば半年経過時点で、L 群の肺負荷量は約 150  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  で 2 年後の中皮腫発現率は有意な増加を示さなかった一方、H 群・HS 群の肺負荷量は約 700  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  で同発現率が有意に増加したため、肺負荷量に応じ

て、胸腔内に移行した繊維が増えたものと思われる。同じく中皮腫を誘発した Suzui らあるいは Numano らの半年時点での負荷量は、約 700  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  あるいは 1000  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  程度と推測される。これに対し、Kasai らの高濃度群の実験開始半年後の肺負荷量は、500  $\mu\text{g}/\text{Lung}$  程度と推測される。吸入曝露試験においても、さらに高濃度の曝露により実験期間の初期に負荷が上がっていれば胸腔内の繊維の量が増加し、中皮腫が発症していた可能性はある。

最後に、H 群と HS 群の結果を比較すると、多少の差異はあるものの、使用器具の違いは、肺腫瘍・中皮腫の発がん性評価に及ぼす影響は軽微であることが示唆された。昨年度に報告したように、スプレー式ゾンデを使用すると、経ロゾンデよりも、均一に MWCNT が沈着することがわかっている。今回、HS 群で、H 群よりも、肺重量や BALF の分析結果の値がやや高かったのは、肺内で、比較的広範囲の肺胞に MWCNT による細胞障害が生じたからと考えられる。また、HS 群では、器具先端が位置する気管上皮への局所的な MWCNT 沈着とそれに関連した肉芽腫形成が起こった。しかし、これらの現象は、最終解剖までの発がん試験の結果に影響は及ぼさなかった。HS 群では肺腫瘍の発生頻度が、C 群に対して有意に上昇しなかったものの、これは前述の通り、生存数の少なさに起因するものと推測される。スプレー式ゾンデは高額で供給は限られているため、気管内投与のプロトコルを広く提案していく上で、経ロゾンデが使用可能なことは重要な点と言える。

## E. 結論

ラットへ MWNT-7 の 4 週間に 1 度、合計 26 回の気管内投与を 2 年間実施した結果、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫が誘発された。Kasai らの吸入曝露試験と同様の AUC 形状での反復曝露により、同程度の肺腫瘍が見られたため、代替法として有用であることが示唆された。しかしながら、肺腫瘍の頻度がやや低くなることや、負荷量が重い場合に中皮腫による早期解剖が増え、肺腫瘍の評価が難しくなること等の問題点があった。今回の 2 年間の試験をベンチマークとして、1 回あたりの投与量、投与頻度、投与回数を検討し、今後、さらに簡易化・最適化していく必要がある。なお、経ロゾンデとスプレー式ゾンデの器具の違いが発がん試験に及ぼす影響は軽微であった。

## (謝辞)

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、津田洋幸先生、沼野琢旬先生、大西誠先生、後藤裕子先生、また、技術的支援をしていただいた、生嶋清美氏、長谷川悠子氏、湯澤勝廣氏、長澤明道氏、故・久保喜一氏、安藤弘氏、田中和良氏、海鉦藤文氏、矢野範男氏に深く感謝する。

## 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) MWCNT-7 administered to the lung by intratracheal instillation induces development of pleural mesothelioma in F344 rats. Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Takase H, Hirose A, Naiki-Ito A, Suzuki S, Takahashi S, Tsuda H. *Cancer Sci.* 2019 Aug;110(8):2485-2492.
  - 5) 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.
  - 6) 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.
  - 7) 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.
  - 8) Carcinogenic effect of potassium octatitanate (POT) fibers in the lung and pleura of male Fischer 344 rats after intrapulmonary administration. Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Hirose A, Taquahashi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Takahashi S, Alexander DB, Tsuda H. *Part Fibre Toxicol.* 2019 Sep 2;16(1):34.
  - 9) Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intra-tracheal instillation in the rat. 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. *Part Fibre Toxicol.* 2020 Oct 15;17(1):48.
  - 10) 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

(学会発表)

前野愛、北條幹、坂本義光、生嶋清美、山本行男、湯澤勝廣、長谷川悠子、長澤明道、久保喜一、安藤弘、田中和良、鈴木仁、猪又明子、守安貴子、高橋祐次、横田理、小林憲弘、広瀬明彦、中江大。ラットによる多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の長期気管内反復投与試験：1年経過時点における報告。第47回日本毒性学会 2020.6.29-7.1 (オンライン)

Akihiko Hirose, Motoki Hojo, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Ai Maeno, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Makoto Ohnishi, Yuko Goto, Dai Nakae. Development of an intermittent exposure type chronic toxicity assessment method for MWCNT as an alternative to the continuous two-year inhalation protocol. 9th Nanoconference

(NanOEH) 2020.11.12-13. (Online)  
Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Makiko Kuwagata, Motoki Hojo, Akihiko Hirose, Jun Kanno. Interim report of four-week interval intermittent inhalation study on multi-walled carbon nanotube in mice. 9th Nanoconference (NanOEH) 2020.11.12-13. (Online)

Motoki Hojo, Yukio Yamamoto, Yoshimitsu Sakamoto, Aya Ohnuki, Ai Maeno, Takako Moriyasu, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Dai Nakae. Declines in serum levels of apolipoproteins during the development of peritoneal mesothelioma by multiwalled carbon nanotube in rats. SOT 2021 第60回米国毒性学会 2021.3.12-16 (Online)

## 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)

表 1. 最終解剖時の体重

	C群	L群	H群	HS群
動物数 <sup>a)</sup>	25	27	17	20
体重 (g)	416.4±32	399.4±27	386.3±23**	380.5±41**

Mean ± S.D.

\*\*: $p < 0.01$ 

a) サテライトを含む

表 2. 臓器重量

	C群	L群	H群	HS群
動物数	10	10	10	10
肺(左葉) (mg)	427.3±30	883.6±193**	1132.4±67** a)	1146.7±90**
脳 (g)	2.21±0.04	2.22±0.05	2.17±0.06	2.18±0.08
脾臓 (g)	1.10±0.22	1.13±0.29 <sup>b)</sup>	1.04±0.27	0.92±0.16 <sup>b)</sup>
肝臓 (g)	13.3±0.92	13.1±1.3	12.9±0.78	12.7±1.3
腎臓 (g)	2.71±0.19	2.76±0.22	2.66±0.09	2.67±0.15
副腎 (mg)	45.2±12	48.5±6.3	46.4±8.1	51.5±14 <sup>c)</sup>

Mean ± S.D.

\*\*: $p < 0.01$ 

a) N=9 1個体欠測

b) N=9 LGL個体を除外

c) N=7 副腎腫瘍個体を除外

表 3. 肺腫瘍と胸腔内中皮腫の発生頻度

	C群	L群	H群	HS群
動物数	30	30	30	30
肺腺腫+肺腺癌	1 (3.3)	4 (13.3)	10** (33.3)	6 (20.0)
肺腺腫	0	1	6	3
肺腺癌	1	3	4	3
胸腔内中皮腫	0 (0)	2 (6.7)	8** (26.7)	10** (33.3)

腫瘍を発症した個体数

カッコ内は割合 (%)

\*\*: $p < 0.01$

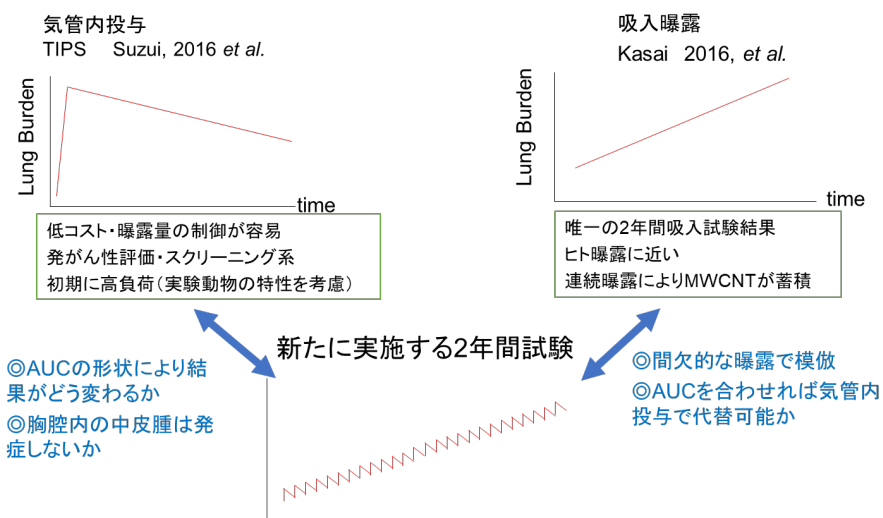


図 1. 既報の MWCNT 慢性毒性評価と本研究の肺負荷量と研究の意義

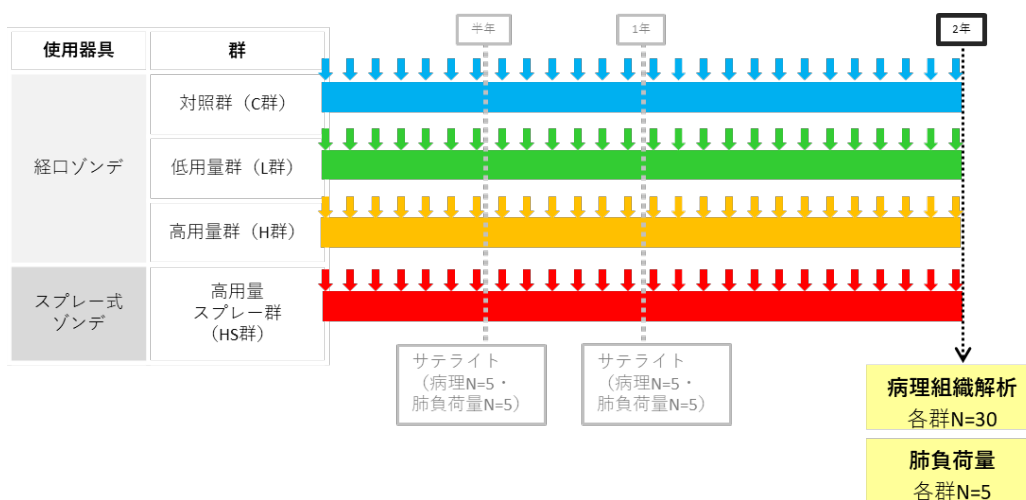


図 2. 実験デザイン

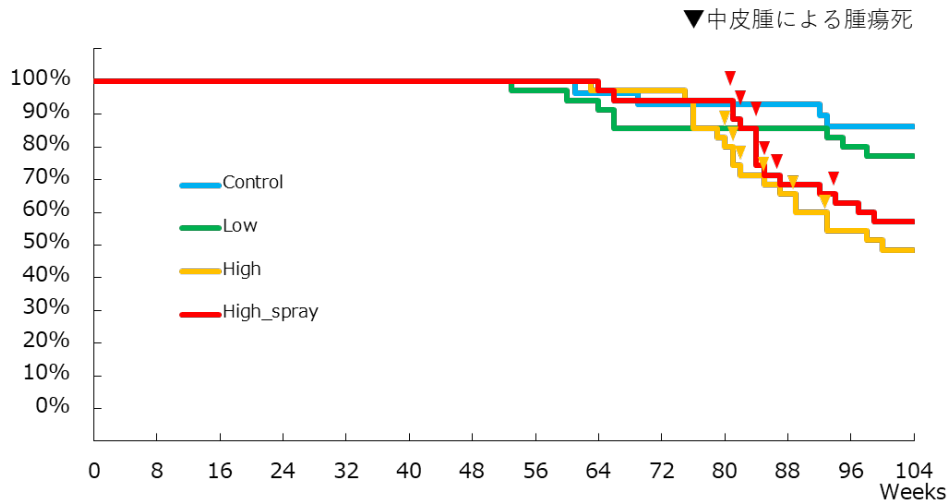


図 3. 生存曲線

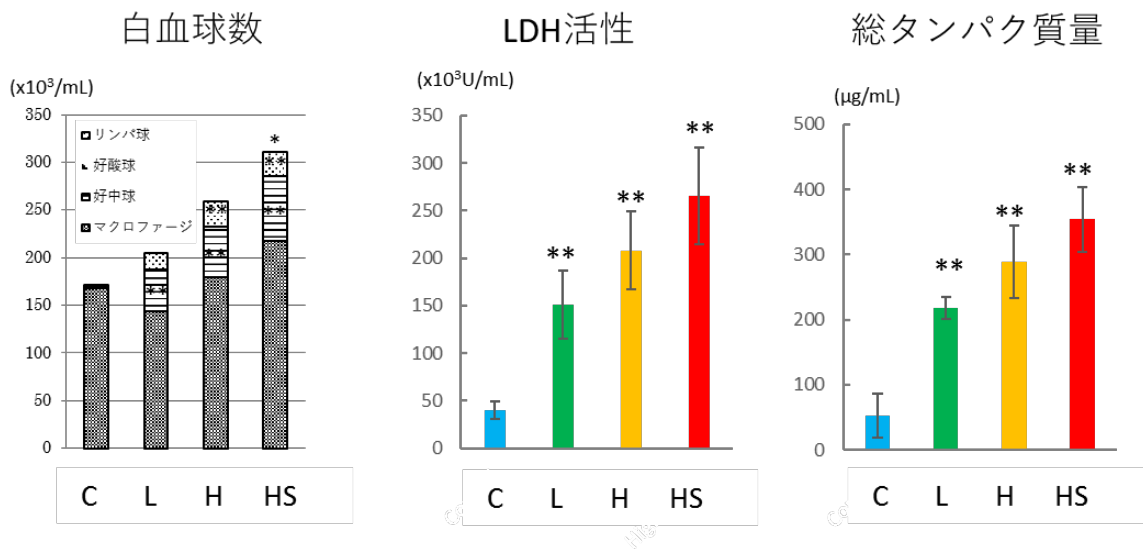


図 4. BALF の解析

\*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$

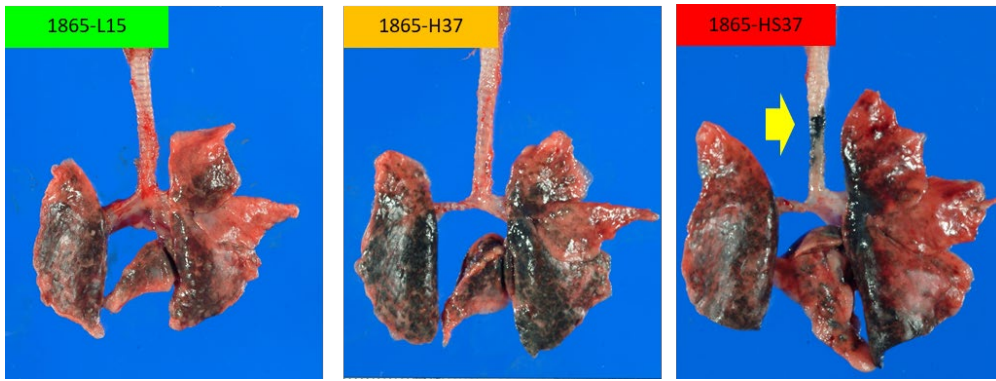


図 5. MWCNT 投与群の肺の肉眼所見  
矢印：スプレー式ゾンデ群に特有の黒色斑

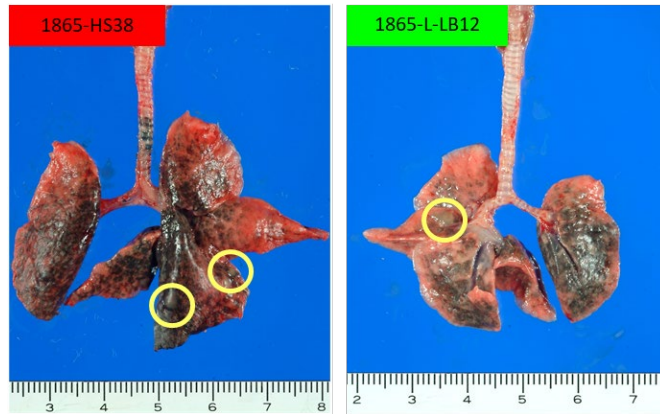


図 6. 肺腫瘍の肉眼所見  
黄色丸印；白色結節

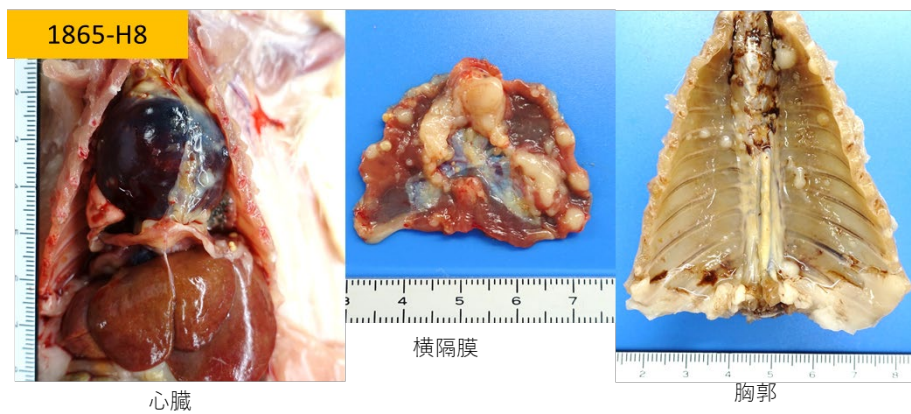


図 7. 胸腔内中皮腫の肉眼所見



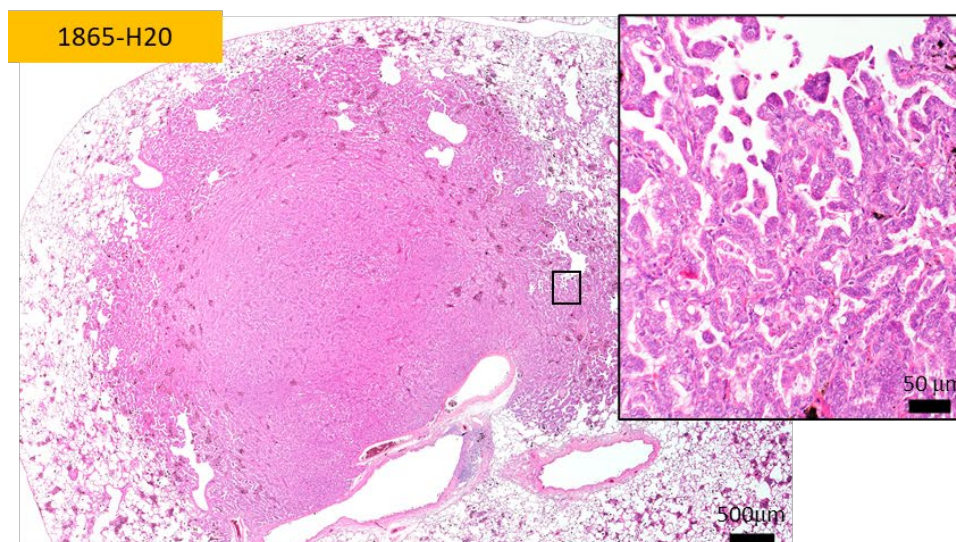
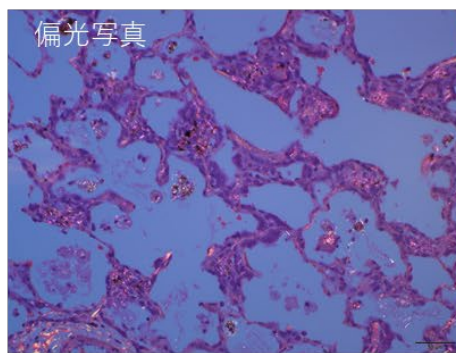
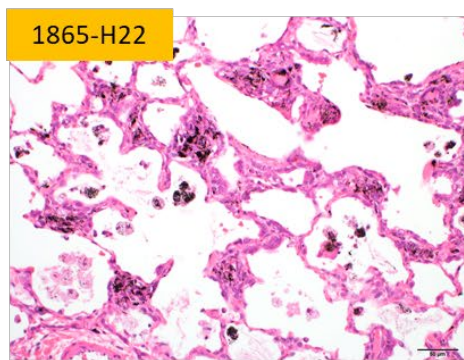
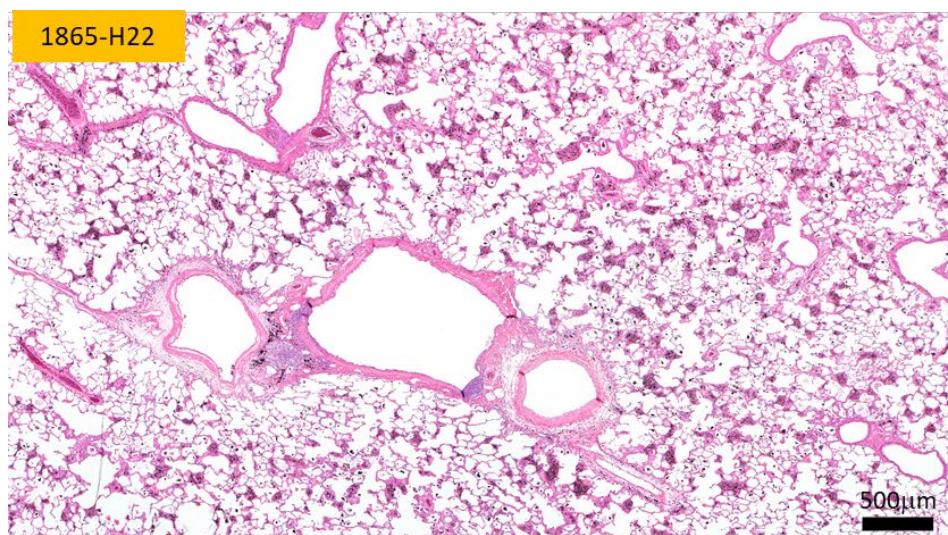


図 8. 投与群の肺の病理組織像 (H 群)  
上：び漫性のマクロファージ集簇および肉芽腫性炎症  
中：強拡大、MWCNT の分布 (偏光写真)  
下：肺腺癌



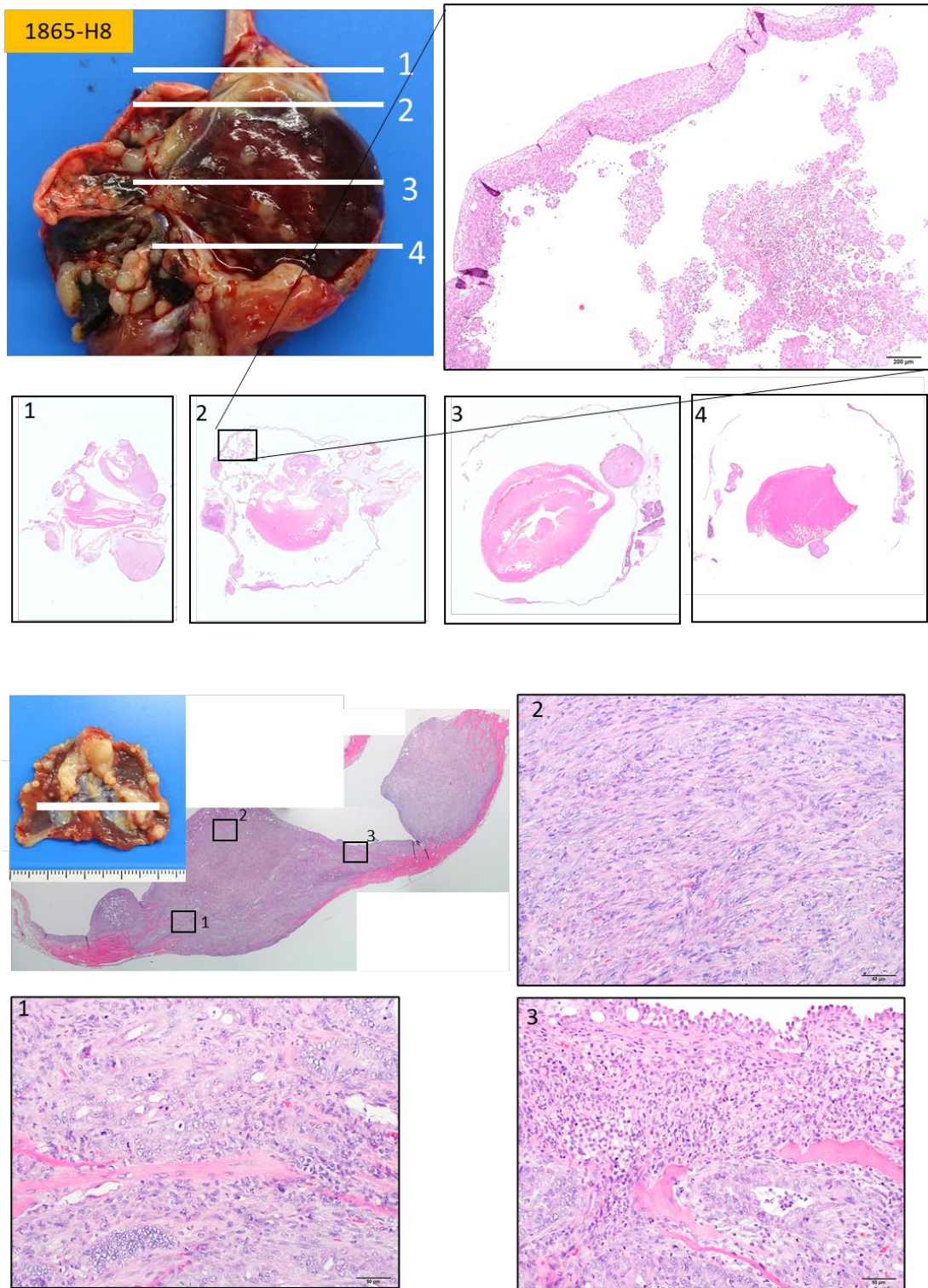


図 9. 胸腔内中皮腫の病理組織像 (H 群)

上：心嚢膜周囲

下：横隔膜周囲

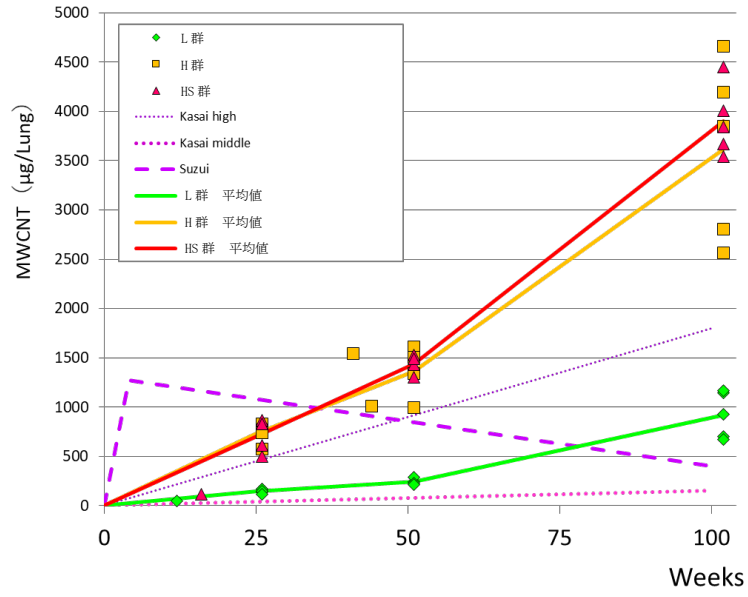


図 10. MWCNT の肺負荷量  
半年後、1 年後、2 年後および途中解剖