

研究課題名: ナノマテリアル吸入曝露影響評価のための効率的慢性試験法の開発に関する研究

分担研究課題名: 慢性影響を考慮した効率的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 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 客員研究員
研究分担者: 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: 中江 大	帝京平成大学健康医療スポーツ学部	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: 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: 猪又 明子	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: 中村 麻里	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: 篠岡 恭子	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: 稲葉 涼太	東京都健康安全研究センター	精度管理室
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

MWCNT の 2 年間の吸入試験の報告は MWNT-7 をラットに吸入させた Kasai らの試験 1 報のみである。本研究では、こ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、気管内反復投与による、MWNT-7 の肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発性について十分な用量反応性データを得ることを目的とした。

今回使用する保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) の投与分散液における二次粒子径は 571.4 nm であり、三井製の MWNT-7 に比べやや小さかった。F344 雄性ラットを 4 群に分け、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の条件で 4 回の反復気管内投与を行い、予備的に肺負荷量を測定したところ、それぞれ、7.1、55.8、182.9 および 274.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は最も低い用量では 40%、他の群では 60%から 80%であった。

予備試験の結果を確認後、同じ投与条件で 2 年間の本試験を行うこととした。F344 雄性ラットを対照群 (C 群)、低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群) 高用量群 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の 5 群に分け、動物数はそれぞれ 40、50、50、50 および 30 匹とした (投与群については肺負荷量測定のためのサテライト動物 10 匹を含む)。10 週齢から、C 群には 0.1% Tween 含有生理食塩水を、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の用量で MWNT-7 (保土ヶ谷) を 1 週間毎に 1 回、合計 13 回、気管内に投与した。最終投与の翌日に、投与群の 5 匹ずつを剖検し、MWCNT の肺負荷量を測定した結果、それぞれ 30、191、980 および 1369 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75%

であり、H群とEH群で90%を超えていた。既報と比較する限りでは、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられる。

現在、残りの動物は観察中であり、途中解剖および2年後の最終解剖の病理組織学的検索により、MWNT-7の発癌性を評価する。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、多様かつ特殊な物理特性のために *in vitro* 試験等の簡便な評価手法が確立しておらず、特に慢性毒性については *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。過去には、Kasai らにより MWNT-7 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¹⁾、吸入試験の実施には特殊な設備とコストが必要となるため、2年間の連続吸入による発癌試験の報告は他に無く、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り、Suzui らは MWNT-7 に類似する形状の MWCNT-N について、2週間で合計8回の反復気管内投与 (TIPS法) 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²⁾。一方で、2019年には Numano らは、TIPS法により MWNT-7 を投与した結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸膜中皮腫が発生した。³⁾ これらの TIPS法による試験では MWCNT の最大肺負荷量は吸入曝露試験と同程度であったが、吸入曝露では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¹⁾、TIPS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となるため、AUCの形状等点で違いがあった²⁾、³⁾。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

いに起因すると考えられてきた。

しかし、昨年度の我々の MWNT-7 の2年間の間欠気管内投与試験で AUC を右肩上がりにした結果、TIPS試験の結果より頻度が低いものの、やはり胸膜中皮腫が誘発され、胸膜中皮腫は気管内投与で発生しやすいことが示された。また、これは、胸腔への MWCNT 繊維の移行効率が高いことが原因と考えられる。我々の結果と、Numano らの報告とを踏まえると、気管内投与による呼吸器毒性の評価には、中皮腫による早期死亡を考慮した用量設定が重要である。

一方で、肺腫瘍に関しては、我々の試験結果を AUC をもとに Kasai らの試験と比較すると、用量反応性が異なることが示唆された。ただし、我々の試験では、2用量しか設定できなかったことと、上記の通り中皮腫の発症により、肺発がんを評価できる個体数が減少したことから、MWNT-7 による肺発がん性について十分な用量反応性を把握することはできなかった。

そこで、本研究では、2年間の吸入曝露試験を代替しリスク評価へ活用できる試験法の開発を目指し、気管内投与による肺発がんの用量反応性を把握できる2年試験を行うこととした。TIPS試験のように2年間の実験期間の初期に13回の反復投与後に無処置で飼育するプロトコルを採用し、胸膜中皮腫が発生し得る超高用量から NOAEL になることが想定される低用量まで投与群を4用量設定した。また、被験物質は、過去の試験で利用してきた三井製の MWNT-7 ではなく、Kasai らが使用した保土ヶ谷製 (NT-7) を用いることにした。

今年度は、予備試験として、サンプル分散状態の確認と4回反復投与後の肺負荷量の測定を行った後、2年間の本試験を開始した。

B. 研究方法

i) MWCNTの調製と二次粒子径の測定

保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) を Taquann 処理 (53 μ m メッシュ)⁴⁾した。この T-NT-7 を、200 $^{\circ}$ 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 (100W) で 30 分以上分散させた。サンプル濃度は、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/mL とし、それぞれを低用量群 (L 群)、中用量群 (M 群)、高用量 (H 群) および超高用量群 (EH 群) の投与に用いた。

また、0.01 mg/mL の分散液の二次粒子径を DLS で測定した。

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 (ジャクソンラボラトリー・ジャパン)、コンベンショナル飼育室にて、床敷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 $^{\circ}$ 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。

予備実験として、4 回の反復投与による肺蓄積のレベルを確認するため 10 週齢のラットに 1 週間に 1 度、合計 4 回、T-NT-7 を気管内投与した。投与用量は、L 群、M 群、H 群および EH 群の各 4 匹の動物対し、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重とした。イソフルラン吸入麻酔下で、動物に 1 mL/kg 体重の投与量でマイクロスプレイヤー (PennCentury) を用いて投与した。

2 年間の本試験の実験デザインは、1 週間に 1 度、13 回投与後に 2 年間観察飼育することとした。F344 雄ラットを、対照群 (C 群)、L 群、M 群、H 群および EH 群の 5 群に分け、動物数は C 群は 40 匹、L・M・H 群は 50 匹、EH 群は 30 匹とした (投与群については肺負荷量のサテライト動物を含む)。

10 週齢の時点から、1 週間に 1 度、1 mL/kg 体重の投与量で、マイクロスプレイヤーを用いて合計 13 回投与した。投与用量は、予備試験と同様に、L 群、M 群、H 群および EH 群の各群について、0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重と設定した。

全動物について、1 週間に一度、体重を測定した。

iii) 剖検

予備試験では、4 回目の投与 1 週間後に全動物をイソフルラン深麻酔下の全採血により安楽死させ、肺の全葉を摘出し、ホルマリン固定した。

本試験については、13 回目の投与翌日に、全投与群 (4 群) について、サテライト動物 5 匹を剖検し、肺の全葉をホルマリン固定した。

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^{5), 6)}。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。

<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) T-NT-7 の分散状態

Taquann 処理サンプル (T-NT-7#53) は、0.1% Tween80 含有生理食塩水に良好に分散し、目視では三井製の T-MWNT-7 #53 よりも速やかな分散性が確認された。

DLS による二次粒子径のピーク値は 571.4 nm であり、三井製のサンプルと比較すると小さかった (図 1)。

ii) 予備試験

4 回の反復投与の結果、剖検時、肺には、び慢性に黒色斑が観察され、用量に応じて色味は強くなっていた。L 群、M 群、H 群および EH 群の総投与量の平均値は、それぞれ、17.2、68.8、275.3 および 413.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった (図 2・灰色棒グラフ)。一方、肺内の MWCNT 量の測定結果は、それぞれ、7.1、55.8、182.9 および 274.0 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった (図 2)。蓄積率は L 群でおよそ 40%、他の群では 60%から 80%であった。

iii) 本試験 (13 回投与)

全投与群で、投与期間中に体重の抑制傾向が認められ、投与終了後には、いずれの群も平均体重が投与群に比べ 5%程度低い値となった (図 3)。

本試験における、13 回投与後の L 群、M

群、H 群および EH 群の、総投与量の平均値は、それぞれ、64、255、1014 および 1519 であった (図 4・灰色棒グラフ)。一方、肺内の MWCNT 量の測定結果はそれぞれ 30、191、980 および 1369 $\mu\text{g}/\text{Lung}$ であった。蓄積率は、L 群が 47%、M 群が 75%であり、H 群と EH 群で 90%を超えていた。(図 4)。

なお、実験開始 21 週後に、H 群の 1 匹が死亡した。膀胱内に出血が見られ、投与との関連は無いと考えられた。

現在、残りの動物は観察中であり、途中解剖および 2 年後の最終解剖から、発癌性を評価する。なお、最終解剖時にも各群 5 匹のサテライト動物について肺負荷量を測定する予定である。

D. 考察

今回の研究班で用いる NT-7 は、これまで使用してきた三井製の MWNT-7 に比べて性状が異なることが示唆されている。原末の凝集体の形状が異なることや平均長が短いことが報告されており (横田研究分担者)、我々の DLS の測定結果も、T-MWNT-7 と比べるとやや小さい粒子径であることが示された。Kasai らの 2 年間の吸入試験と比較するためには、今回の保土ヶ谷製の NT-7 を使うことは、より適切であると考えられる。例えば、平均長が異なることは、胸膜中皮腫の誘発性に影響を与える可能性がある。三井製を用いた Numano らの報告や、我々の昨年度の試験で、中皮腫発生率が高かったのに対し、保土ヶ谷製を用いた Kasai らの報告で中皮腫が発生しなかったことに関係があるかもしれない。

13 回投与後の H 群と EH 群における肺負荷量の蓄積率は、予備試験に比べると、

かなり高くなった。4回目以降から次第にクリアランス機能が低下したためと推測される。この結果から、EH群では、Numanoらの報告と同様に、早期の胸膜中皮腫の発生が予想される。いっぽう、仮にH群で胸膜中皮腫の発生率が高くなりすぎると、本研究の目的を果たせない恐れがあるが、H群は、Suzuiらの試験と同程度の肺負荷量であったため、彼らの結果と同様に、肺腫瘍と胸膜中皮腫の発生率が有意に増加することが期待される。一方、L群ではクリアランスが良好であったことから、肺腫瘍が認められないレベル (NOAEL) が得られると思われる。

E. 結論

T-NT-7 の投与サンプルの性状は三井製 MWNT-7 とはやや異なることがわかった。また、予備的に4回の反復投与による肺内負荷量の確認を行った。本試験の13回投与後の肺負荷量は、予想よりも蓄積率が高くなってしまったが、既報の情報から、用量依存的に肺腫瘍および胸膜中皮腫の誘発が期待できるレベルと考えられる。

(謝辞)

本研究の遂行にあたり、技術的な助言をいただいた、大西誠先生、後藤裕子先生、また、技術的支援をいただいた、生嶋清美氏、平松恭子氏、湯澤勝廣氏、長澤明道氏、矢野範男氏に深く感謝する。

F. 参考文献

- 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;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) 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.
- 4) 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.
- 5) 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.

- 6) 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.

G. 研究発表 (論文発表)

- 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. Cancer Sci. 112(6): 2185–2198, 2021
- Maeno A., Sakamoto Y., Hojo M., Tada Y., Suzuki J., Inomata A., Moriyasu T., Hirose A., Kemuriyama N., Miyajima K., Nakae D. A case of spontaneous Zymbal's gland carcinoma with lung metastasis in an aged Fischer 344 rat. J Toxicol Pathol. (4):353-358, 2021
- Tada Y., Hojo M., Yuzawa K., Nagasawa A., Suzuki J., Inomata A., Moriyasu T., Nakae D. Iron oxide nanoparticles exert inhibitory effects on N-Bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine (DHPN)-induced lung tumorigenesis in rats. Regul Toxicol Pharmacol. 128:105072, 2022.

(学会発表)

前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長谷川 悠子, 長澤 明道, 生嶋 清美, 平松 恭子, 海鉦 藤文, 山本 行男, 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: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間ラット気管内反復投与試験における投与器具の違いによる毒性の比較: 1年経過時点での報告. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸/ハイブリッド (2021. 7. 7-9)

雑賀 絢, 北條 幹, 生嶋 清美, 前野 愛, 武藤 千恵子, 中村 麻里, 海鉦 藤文, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 山本 行男, 田中 和良, 安藤 弘, 大貫 文, 五十嵐 剛, 秋山 美乃里, 牧 倫郎, 島田 知子, 鈴木俊也, 鈴木 仁, 猪又 明子, 守安 貴子: マウス吸入曝露試験による硫酸アンモニウムの喘息増悪影響の評価. 第62回大気環境学会年会、オンライン (2021. 9. 15-17)

北條 幹、ラット反復気管内投与による多層カーボンナノチューブの発がん性評価手法の検討. 日本薬学会第142年会、オンライン (2022. 3. 26)

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)

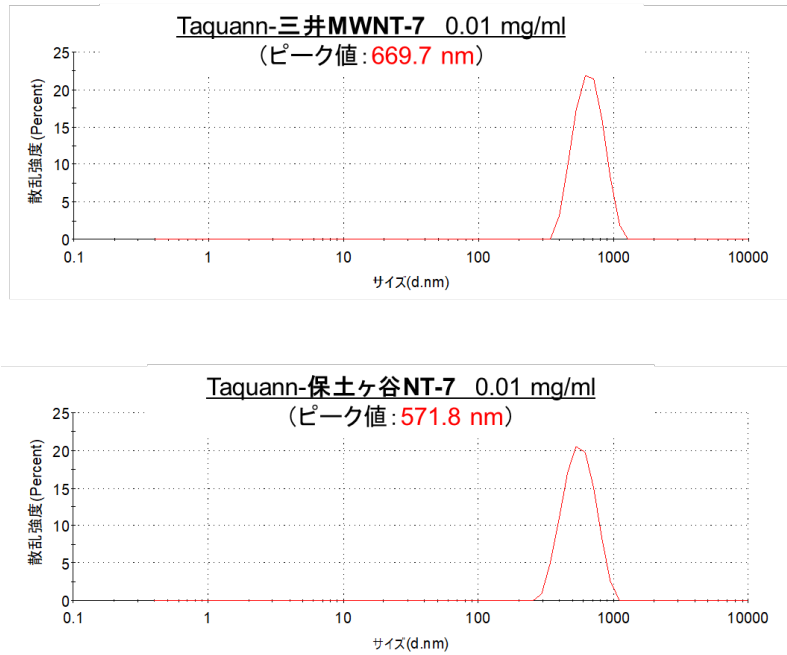


図 1. MWNT-7 の投与用分散液のDLS測定結果
(三井製 MWNT-7 と保土ヶ谷製 NT-7 の比較)

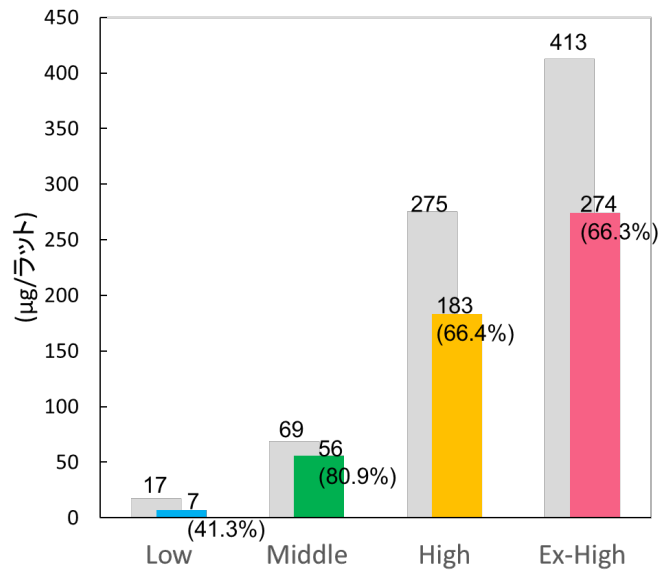


図 2. 予備試験 (4回投与) における投与総量 (灰色) と肺負荷量の測定結果

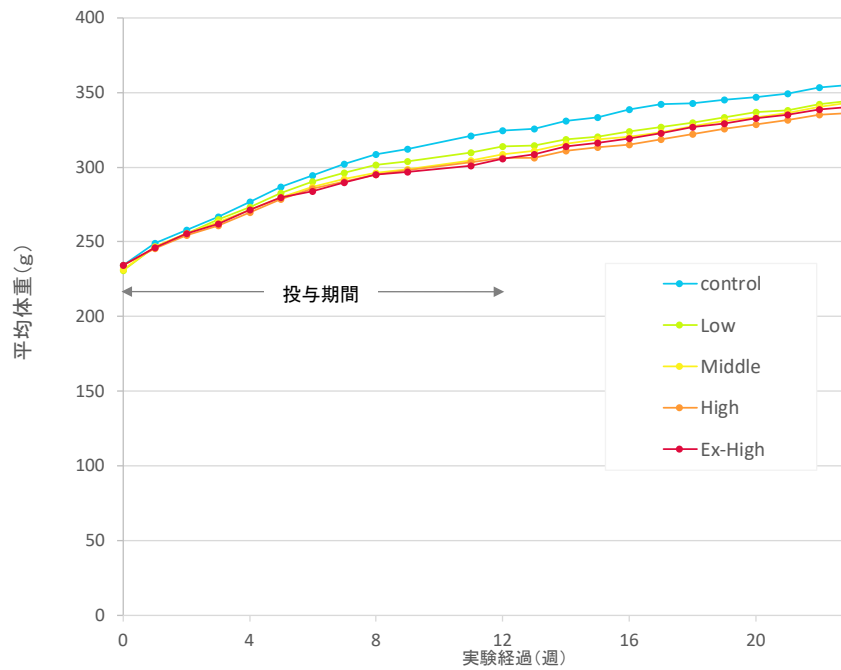


図 3. 本試験における体重推移（年度末時点）
投与 11 週目は欠測

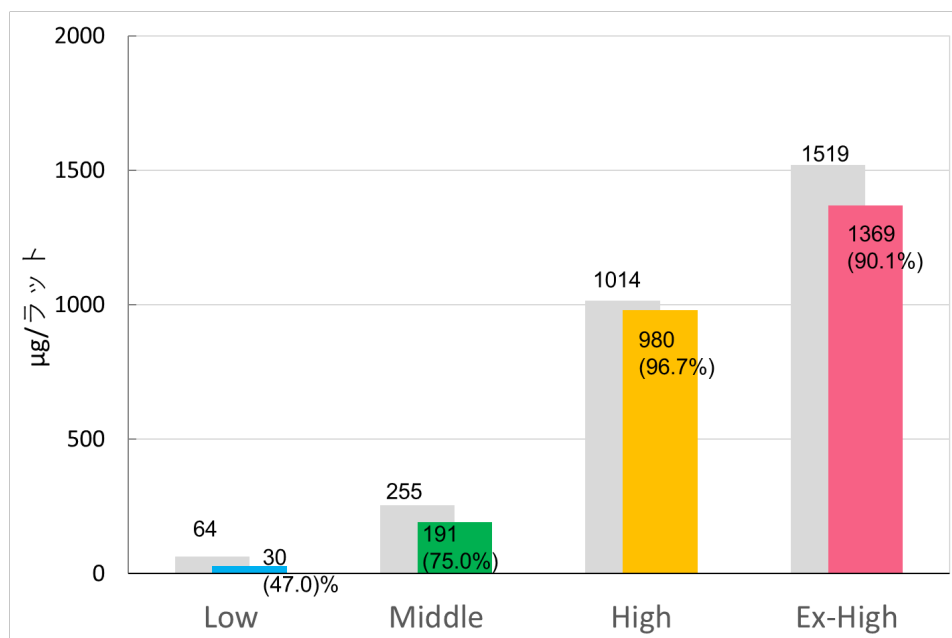


図 4. 本試験（13回投与）における投与総量（灰色）と肺負荷量の測定結果