

令和3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：ナノマテリアルの短期気管内投与評価手法に関する研究

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

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

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

Sivagami Gunasekaran 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

Omnia Hosny Mohamed Ahmed 名古屋市立大学津田特任教授研究室 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・室長

魏 民 大阪市立大学大学院医学研究科分子病理学 准教授

鶴岡 秀志 信州大学先端領域融合研究群 先鋭材料研究所 教授

**研究要旨**

**目的**：長さの異なる2層カーボンナノチューブ（DWCNT）線維の気管支と肺における毒性・発がん性について、当研究室が開発してきた経気管肺内噴霧投与（TIPS法）による試験研究を実施した。

**方法**：F344雄ラットを用いて長さが1.5、7.0および15 $\mu$ mに調整作製したDWCNTを体重300gラット1匹あたりの投与本数 $22 \times 10^{12}$ 本となるように調整して投与した。陽性対照としてMWCNT-7を0.5mg/ラット、対照は無処置と分散剤PF68含有生理食塩水のみを投与した群とした。投与終了後4週（開始後6週）と104週後に屠殺し、肺と胸膜中皮の炎症程度と腫瘍発生について解析した。

**結果**：6wの肺胞炎症程度は長さに相関した。104wの肺腫瘍（adenoma+carcinoma）の発生頻度においてDWCNTの長さとの相関は見られなかったが、3種の線維長群の合計の頻度において、無処置群および分散剤群（共に腫瘍発生なし）と比べて有意の増加（9/32、 $P < 0.05$ ）が見られた。また、MWCNT-7では悪性中皮腫（malignant mesothelioma）が有意に発生した（11/13、 $P < 0.001$ ）であり、胸膜中皮に対して強い発がん性を示すことが再確認された。

**結論**：1.5、7.0および15 $\mu$ m投与群のDWCNTの肺発がん性は1.5~15 $\mu$ mの範囲では発がん性があるが、頻度に線維長との相関はなかった。またMWCNT-7はこの条件では胸膜中皮に強い発がん性を示すことが再確認された。

## A. 研究目的

カーボンナノチューブの長さや肺障害性及び発がん性との関連について解析する目的で、長さ 1.5、7.0 および 15  $\mu\text{m}$  長さの 2 層カーボンナノチューブ (DWCNT) を MWCNT-7 との比較において、当該研究室が開発してきた線維および粒子状物質の経気管肺内噴霧投与 (TIPS 法) による実験を実施した。

## B. 研究方法

F344 雄ラットを用いて製造時の長さが 1.5、7.0 および 15  $\mu\text{m}$  の DWCNT をラット 1 匹当たり投与本数は  $22 \times 10^{12}$  本/ラットとなるように調整して、投与は 2 週間に 8 回 TIPS 投与した。陽性対照として MWCNT-7 は 0.5mg/ラットとした。対照群は無処置及び溶媒 vehicle (0.5% poloxamer 188 solution) (P5556; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) とした (1 群 10 ~ 13 匹)。DWCNT と MWCNT-7 は Taquan 法にて分散して t-ブチルアルコールにて凝集を防いで凍結保存し、投与直前に室温にて凍結乾燥させて、溶媒に加えて超音波分散させて用いた。

## C. 結果

- 1) 6 週屠殺群 (各群 3 ~ 5 匹) を除き、75 週生存以上生存動物を有効数とした。1 群 8 ~ 13 匹であった。
- 2) Vehicle 中の各線維状凝集体の長さは 1.5  $\mu\text{m}$  は 4  $\mu\text{m}$ ; 7.0  $\mu\text{m}$  は 6  $\mu\text{m}$ ; 15  $\mu\text{m}$  は 10  $\mu\text{m}$  であったが群間の有意差はなかった。
- 3) 投与終了 6 w では肺胞肉芽形と増殖細胞核マーカー PCNA ラベル率は長さに比例して 15  $\mu\text{m}$  で最も高く、ついで 7  $\mu\text{m}$ 、1.5  $\mu\text{m}$  は最少であった。
- 4) 肺胞上皮腫 (adenoma+carcinoma) と胸膜中皮悪性中皮腫の発生頻度：

長さが 1.5  $\mu\text{m}$  は 4/13; 7.0  $\mu\text{m}$  は 3/8\*; 15  $\mu\text{m}$  は 2/11、3 線維長群の合計頻度は 9/32\*\*\*であった。これらに前がん病変の過形成を加えると 23/32\*\*\*であった (対・対照 \* $P < 0.05$ 、\*\*\* $p < 0.001$ )。すなわち、7  $\mu\text{m}$  および 1.5、7.0、15  $\mu\text{m}$  の合計の頻度において対照群より有意の増加を示したが線長間には有意差はなかった。

5) MWCNT-7 群では、肺胞上皮腫 (が 2/13 (有意差なし)、悪性中皮腫発生は 11/13 ( $P < 0.001$ ) であった。

## D. 考察

長さの異なる DWCNT について、今までの報告で 0.7  $\mu\text{m}$  の MWCNT の腹腔内投与では発がん性はみられなかった (Muller, 2009)。DWCNT の 1.5  $\mu\text{m}$  長さでも発がんが見られ、単に短い線維に発癌性がないという推察は必ずしも成立しないと考えられた (実験モデルが異なるのでそのまま当てはめることは難しいが)。また、有意差は 7.0  $\mu\text{m}$  の ( $p < 0.05$ ) であったが、他の長さ 1.5 と 15  $\mu\text{m}$  群と併せた合計頻度では有意差が示され、この「長さの範囲の意 DWCNT には発がん性のある可能性が示された。MWCNT-7 の胸膜中皮における強い発がん性が再確認された。

## E. 結論

本研究において DWCNT は肺腫瘍 (adenoma+carcinoma) の発生において製造時の長さが 7  $\mu\text{m}$  および 1.5、7.0、15  $\mu\text{m}$  の合計の頻度において対照群より有意の増加を示したが線長間には有意差はなかった。すなわち発がん性においては長さによる差異はないことが判った。

## F. 研究発表

1. 論文発表  
1) Tanaka H., Gunasekaran S., Saleh D.,

- Alexander TW, Alexander DB., Ohara H., Tsuda H. Effects of oral bovine lactoferrin on a mouse model of inflammation associated colon cancer. *Biochem. Cell Biol.* 99:159-165 (2021).
- 2) Wang Qiqi, Wang Qiong, Zhao Z., Fan J., Qin L., Alexander DB., Tsuda H., Zhao D and Xu J. Surfactant Proteins A/D-CD14 on Alveolar Macrophages Is a Common Pathway Associated With Phagocytosis of Nanomaterials and Cytokine Production. *Frontiers in Immunology*, 12: 1-13 (2021) doi: 10.3389/fimmu.2021.758941
3. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Susumu Tomono, Jun Kanno, Akihiko Hirose, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Two-Year study for the Assessment of the carcinogenic and toxic effect of double walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation *Society of Toxicology*, San Diego (2022 年 3 月)

## 2. 学会発表

1. Dina Mourad Saleh, Shengyong Luo, David B. Alexander, Ahmed M. EL-Gazzar, Mohammed Abdelgaied, Omnia Hosny Mohammed, William T Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Hiroyuki Tsuda Comparative toxicity and carcinogenicity pulmonary study of double walled carbon nanotubes (DWCNT) with multi walled carbon nanotubes-7 (MWCNTS -7) in rat model. 第48回日本毒性学会学術年会、神戸 (2021年 7 月)
2. Dina Mourad Saleh, Omnia Hosny Mohamed Ahmed, David B. Alexander, William T. Alexander, Sivagami Gunasekaran, Takamasa Numano, Hiroshi Takase, Makoto Ohnishi, Satoru Takahashi, Masako Yudasaka, Ryota Yuge, Hiroyuki Tsuda Short term pulmonary toxicity study of carbon nano-horns (CNH) and carbon nano-brushes (CNB) using intra tracheal method 日本毒性病理学会, 神戸 (2022 年 1 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