

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 客員研究員
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: 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: 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: 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: 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: 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、保土ヶ谷製 MWNT-7 (NT-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 NT-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。

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、L 群、M 群、H 群および EH 群にはそれぞれ 0.0175、0.07、0.28 および 0.42 mg/kg 体重の用量で Taquann 処理 NT-7 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。試験開始後 81 週経過時点において、投与に関連した死亡は認められていない。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、NT-7 の発癌性を評価する。

また、前回の研究班で報告した三井製 MWNT-7 の 2 年間の間欠気管内投与試験では、胸膜中皮腫が高頻度に発生し、その発生部位が縦隔部であることが示唆されたため、今回、発生部位について詳細な組織学的な解析を行うため、別途、EH 群と同条件で少数の動物に NT-7 を反復投与し 1 週間後に剖検し、胸郭全体を固定し標本作製した。

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 (保土ヶ谷製) 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。

気管内投与法を用いた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 (三井製) を投与した結果、5%の動物に肺腫瘍が、95%の動物に胸腔中皮腫が発生した。³⁾ さらに、我々の MWNT-7 (三井製) の 2 年間の間欠気管内投与試験では、TIPS 試験の結果より頻度が低いものの、やはり胸腔中皮腫が誘発され、胸腔中皮腫は気管内投与で発生しやすいことが示された (Hojo ら)⁴⁾。これは、気管内投与では Dose Rate が著しく高いために胸腔への 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投与頻度や用量設定が重要である。

一方で、肺腫瘍に関しては、我々の間欠投与試験の結果を 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。2 年間の実験期間の初期 (13 週間) に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、過去に本研究班で使用されてきた三井製の 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。

13 週間の反復投与は令和 3 年度に終了しており、今年度は、経過観察を行った。

また、Hojo らの間欠投与試験で発生した胸腔中皮腫の詳細な組織学的解析からは、その発生部位が縦隔部、特に Retrocardiac Pleural Fold (RPF) 周辺であることが示唆された。そこで、追加試験として、中皮腫の発生が期待される超高用量群 (EH 群) と同じ条件で投与した少数の動物に関して、RPF を含む胸膜全体の組織学的な解析を行うこととした。

B. 研究方法

i) MWCNT の調製

保土ヶ谷製の MWNT-7 (NT-7) を Taquann 処理 (53 μ m メッシュ)⁵⁾した。この T-NT-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 (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。

なお、0.01 mg/mL の分散液を DLS で測定した二次粒子径は 571.4 nm であった。

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°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。

2 年間の本試験については、1 週間に 1 度、13 回投与後に 2 年間観察飼育した。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測定のため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 (PennCentury 製) 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。

胸膜の詳細観察用の追加試験については、本試験の EH 群と同様に 5 匹の雄性 F344 ラ

ットについて実施し、13 回の反復投与終了の 1 週間後に剖検した。

全動物について、1 週間から 4 週間に一度以上の頻度で、体重を測定した。

iii) 剖検・採材

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 10% 中性ホルマリン溶液にて固定した。

追加試験については、胸腔内全体の胸膜の状態を詳細に観察するため、横隔膜および胸郭を部分的に除去した後、胸郭全体をホルマリン固定した。RPF を含む縦隔胸膜や横隔膜組織の強い収縮を避けるため、また、胸郭全体の切片を作製するため、セロイジン包埋を行った。脱灰後、水洗、脱水 (70%、80%、90%、95%、100% アルコールの順にそれぞれ 24 時間以上) を行い、ジエチルエーテル・アルコール等量混合液に 24 時間浸漬させた。次に、1% セロイジン液に 3 日間浸漬した後、1% セロイジン液を交換し、液量が 2/3 になるまで濃縮させ、クロロホルム蒸気で硬化させた (24 時間)。ブロックを頭尾軸に沿って、一定間隔で切り出した。

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^{6),7)}。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) 本試験

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1)。

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2・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2)。

今年度末(試験開始後81週経過)までに途中解剖した個体は、各群2匹程度で、いずれも、投与との関連は無いものと考えられた(表1)。餌詰まりによる死亡が目立ったため、体重減少など、状態の悪い個体については同じ成分の粉末飼料に変更して対応することとする。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。

胸膜の詳細観察用の標本については、セロイジン包埋を実施し、ブロックの作製を完了したところである(図3)。

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)、我々の昨年度の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。中皮腫が高頻度で発生したNumanoらやHojoらの試験は三井製を用いていたのに対し、中皮腫が発生しなかったKasaiらの報告では、保土ヶ谷製を用いていた。試験方法だけではなく、製造元の違いもこの差異に寄与したのかもしれない。

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、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(NOEL)が得られると思われる。

本試験の投与プロトコールはNumanoらの試験と類似しているため、EH群では早期

の中皮腫死亡が予想された。Numanoらの報告では試験開始後47週時点で初めて中皮腫個体が発生し、次々と死亡したのに対し、本試験では、試験開始後81週経過時点において、1例も中皮腫の個体は確認されていない。これは、前述のようにNT-7の繊維長が短いために、中皮腫誘発性が弱いからかもしれない。引き続き、注意して観察を行う。

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。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。試験開始後81週経過時点において、投与に関連した死亡は認められていない。

(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、技術的支援をしていただいた、生嶋清美氏、湯澤勝廣氏、宮尾佳伸氏、河合礼果氏、平松恭子氏、長澤明道氏、故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(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) Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A,

Inomata A, Nakae D. Part Fibre Toxicol. 2022, 19(1), 38

- 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.

G. 研究発表

(論文発表)

- Hojo M, Maeno A, Sakamoto Y, Ohnuki A, Tada Y, Yamamoto Y, Ikushima K, Inaba R, Suzuki J, Taquahashi Y, Yokota S, Kobayashi N, Ohnishi M, Goto Y, Numano T, Tsuda H, Alexander DB, Kanno J, Hirose A, Inomata A, Nakae D: Two-year intermittent exposure of a multiwalled carbon nanotube by intratracheal instillation induces lung tumors and pleural mesotheliomas in F344 rats. Part Fibre Toxicol. 19(1), 38, 2022.
- Horibata K, Takasawa H, Hojo M, Taquahashi Y, Shigano M, Yokota S, Kobayashi N, Sugiyama KI, Honma M, Hamada S: In vivo genotoxicity assessment of a multiwalled carbon nanotube in a mouse ex vivo culture.

Genes Environ. 44(1), 24.

(学会発表)

- 前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 生嶋 清美, 山本 行男, 平松 恭子, 矢野 範男, 大貫 文, 稲葉 涼太, 鈴木 仁, 横田 理, 高橋 祐次, 小林 憲弘, 菅野 純, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間間欠気管内投与によるラット発がん性試験. 第49回日本毒性学会学術年会 (札幌). 2022年6月30日
- 北條 幹: ラット気管内投与法によるナノマテリアルの発癌性の評価手法の発展と課題. 第49回日本毒性学会学術年会 (札幌) シンポジウム. 2022年6月30日
- 前野 愛, 北條 幹, 坂本 義光, 湯澤 勝廣, 長澤 明道, 平松 恭子, 大貫 文, 稲葉 涼太, 鈴木 仁, 横田 理, 高橋 祐次, 小林 憲弘, 広瀬 明彦, 猪又 明子, 中江 大: 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の2年間間欠気管内投与によるラット肺腫瘍及び中皮腫の発生. 第39回日本毒性病理学会学術集会 (東京・ハイブリッド). 2023年1月25-26日
- Taquahashi Y, Yokota S, Tsuji M, Morita K, Suga K, Hojo M, Hirose A, Kanno J. Preliminary report on a two-year, 4-week-interval intermittent whole body inhalation study of the multi-walled carbon nanotube (MWNT-7) in male mice. Society of Toxicology 62nd Annual Meeting, Nashville, US, 2023. 3. 19-23.

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 途中解剖個体の一覧 (2023年3月時点) D: 斃死、MS: 瀕死

群名	動物番号	剖検種別	解剖日	経過週	所見
H	14	D	2022/4/11	21	膀胱内出血
M	24	D	2022/8/24	40	急激な体重減少。餌詰まり
L	40	D	2022/11/9	51	体重減少後、回復せず。餌詰まり
H	29	MS	2022/11/11	51	脳出血あり
C	7	MS	2022/12/13	56	下半身麻痺状態で発見、肉眼的には異常なし
EH	4	MS	2023/1/16	61	下垂体腫瘍
H	37	D	2023/2/8	64	持続的な体重減少。餌詰まり
L	14	D	2023/3/14	69	突然死、餌詰まり
C	6	D	2023/3/20	70	持続的な体重減少。餌詰まり
H	22	MS	2023/3/20	70	貧血、黄疸、脾臓腫大

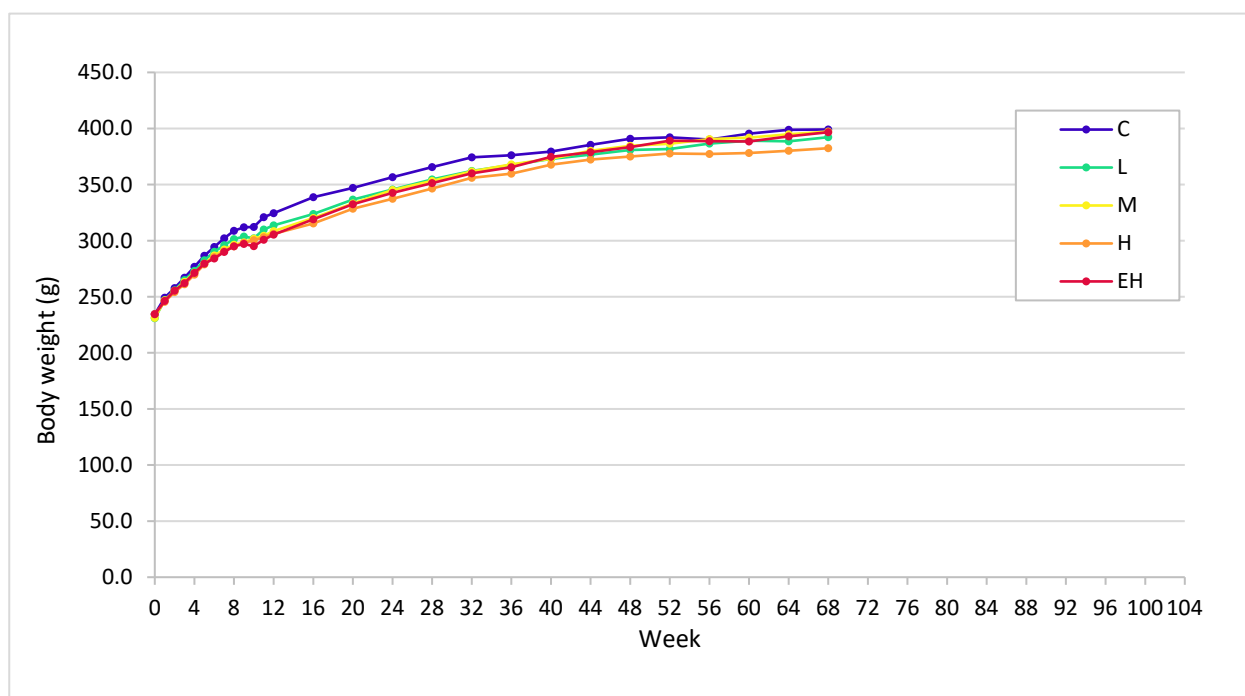


図1. 本試験における体重推移 (令和4年度末時点)

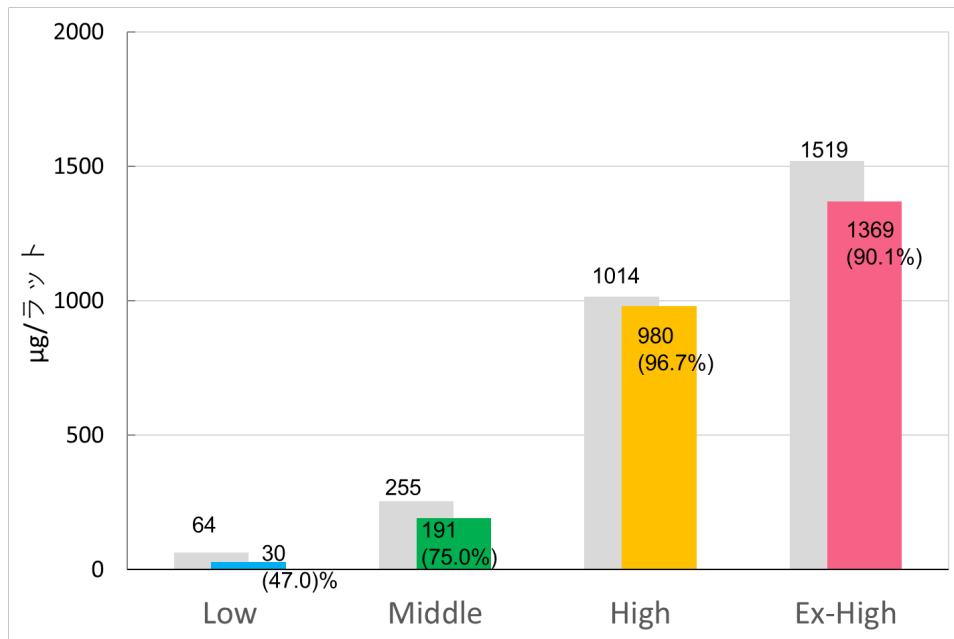


図2. 本試験における投与総量（灰色）と肺負荷量の測定結果



図3. 追加試験におけるラット胸郭部のセロイジン包埋後の切り出しサンプル