

表 2. 白金ナノ粒子懸濁液の超遠心上清の白金濃度

試料	希釈媒体	濃度 (ng/mL)		
		1 回目超遠心上清	2 回目超遠心上清	3 回目超遠心上清
PtNP-1	超純水	2054 ± 12	1048 ± 25	985 ± 9
	培地	2016 ± 30	1035 ± 21	798 ± 13
PtNP-2	超純水	900 ± 11	0.9 ± 0.0	1.5 ± 0.0
PtNP-1	培地	105 ± 3	11.0 ± 0.1	12.5 ± 0.2

図 1 の超遠心上清について測定した。

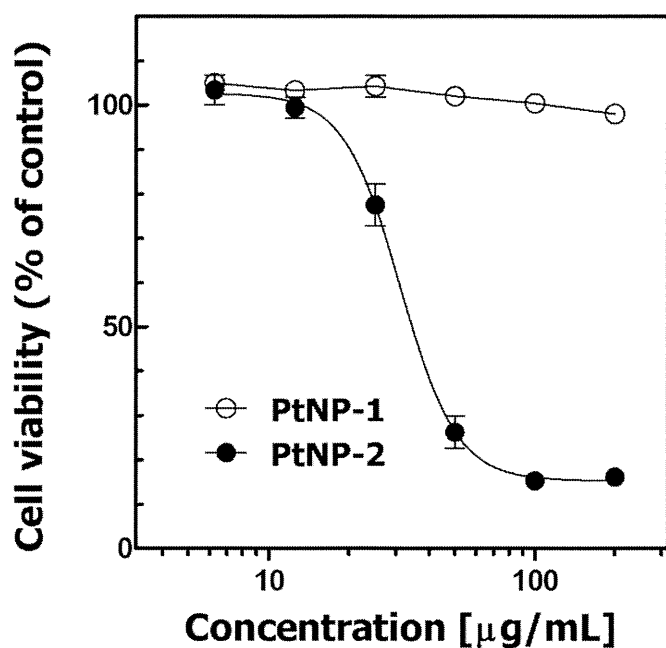


図 2. 白金ナノ粒子曝露 24 時間後の PMA 処理 THP-1 細胞の生存率

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と  
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:ナノマテリアル曝露による炎症誘発で生じるがん原性物質の探索

分担研究者 大島寛史 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

食品栄養環境科学研究院 教授

研究協力者 伴野 勸 静岡県立大学大学院 薬食生命科学総合学府

食品栄養環境科学研究院 客員共同研究員

## 研究要旨

多層炭素ナノチューブ (MWCNT) のラット経気管肺内噴霧投与により増加することが認められた脂肪酸由来のアルデヒド [ノナナール ( $C_9H_{18}O$ )、デカナール ( $C_{10}H_{20}O$ ) など] とデオキシグアノシン (dG) との付加体の標品を合成し、LC/ESI-MS/MS による DNA 付加体分析の最適化を行った。MWCNT (直径 15 nm、長さ  $3\mu m$  の VGCF あるいは直径 150 nm、長さ  $10\mu m$  の VGCF-X) を経気管肺内噴霧投与されたラットおよび対照としての vehicle 群のラット肺 (各  $n=10$ ) から、 $NaBH_3CN$  存在下で抽出した核酸を試料として DNA 付加体を網羅的に分析したところ、非常に多くの DNA 付加体が検出された。MWCNT の経気管投与により炎症を誘発させたラット肺組織中には、健常ラットの肺と比較して、構造未知のものを含めて、より多くの DNA 付加体が存在すること、その一部は、MWCNT 投与により顕著に増加することが認められた。これらの結果は、炎症誘発により、高濃度の脂質過酸化物が生成し、DNA と反応し付加体を生成する可能性を示唆している。

## A. 研究目的

ナノマテリアル (NM) への曝露によって生じる健康影響、特に長期毒性と発がん性、を評価することを目的に、LC/ESI-MS/MS による DNA 付加体の網羅的分析法の開発・最適化を行う。さらに、開発した方法を用いて、NM を曝露させたラット肺に存在する DNA 付加体を網羅的に分析し、健常ラット肺 (vehicle 群) に存在する DNA 付加体と比較検討する。NM 曝露の肺から検出される DNA 付加体は、NM 曝露により生じる発がん物質と DNA が反応して生成することから、NM 曝露のバイオマーカーとして分析できる可能性がある。

## B. 研究方法

市販の脂肪酸由来のアルデヒド [アセトアルデヒド ( $C_2H_4O$ )、ノナナール ( $C_9H_{18}O$ )、デカナール ( $C_{10}H_{20}O$ ) など] とデオキシグアノシン (dG) を還元剤 ( $NaBH_3CN$ ) 存在下で反応させ、生成した付加体を HPLC で精製・単離した。この合成した付加体標品を用いて LC/ESI-MS/MS による DNA 付加体分析の最適化を行った。多層炭素ナノチューブ (MWCNT) (直径 15 nm、長さ  $3\mu m$  の VGCF あるいは直径 150 nm、長さ  $10\mu m$  の VGCF-X) を 14 日間、経気管肺内噴霧投与されたラットおよび対照としての vehicle 群のラット肺 (各  $n=10$ ) から、 $NaBH_3CN$  存在下で DNA を抽出し、各試料からの

DNA10  $\mu$ g を酵素的にヌクレオシドにまで加水分解し分析試料とした。DNA 付加体は、LC/ESI-MS/MS によりデオキシリボース ( $m/z$  116.047) の開裂損失を起こす化合物を網羅的に検出する方法 (DNA アダクトーム法) で分析した。この方法により、未知の DNA 付加体を含めて、分子量 727 までの付加体の存在、濃度、極性などの情報が得られた。

(倫理面への配慮)

動物実験は、研究者の所属機関における規程に従い、事前に動物実験倫理委員会に計画書を提出して実施承認を得る。また、実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針に従い、動物へ苦痛を与えないよう留意するとともに、使用する動物数を最小限に留めるなど、動物の愛護に十分配慮して行う。

### C. 研究結果

NM 曝露による炎症誘発により顕著に増加することが認められた脂肪酸由来のアルデヒド [ノナナール ( $C_9H_{18}O$ )、デカナール ( $C_{10}H_{20}O$ ) など] と dG との付加体の標品を合成し、LC/ESI-MS/MS による DNA 付加体の網羅的分析法の最適化をおこなった。アルデヒド化合物は、核酸塩基のアミノ基と反応して不安定なシッフ塩基として存在すると考えられることから、核酸抽出時に、還元剤 ( $NaBH_3CN$ ) を使用することにより、不安定なアルデヒド-核酸のシッフ塩基を安定なアルキル-核酸に変換させ、最適化した方法によりラット肺試料中に存在する DNA 付加体を網羅的に分析した。MWCNT (VGCF) 曝露の肺 DNA からは 676、MWCNT (VGCF-X) 曝露の肺 DNA からは 693、対照の vehicle 群の肺 DNA からは 611 のピークが検出された。LC での保持時間及び付加体の  $m/z$  から、これらのピークのいくつかは、アセトアルデヒド-dG、ブタナール-dG、ノナナール-dG、デカナール-dG 由来の相当するアルキル-dG 付加体と同定した。また、vehicle 群と比較して、MWCNT (VGCF) 群で 26、MWCNT (VGCF-X) 群で 27 のピークが有意に増加していた。さらに、vehicle 群では検出されないが、

MWCNT (VGCF) 群で 6、MWCNT (VGCF-X) 群で 14 のピークが新たに検出された。しかし、これらの付加体の多くは、合成した DNA 付加体標品の保持時間及び  $m/z$  と一致せず構造を同定することはできなかった。

### D. 考察

本研究で最適化した方法を用いて、ラット肺試料中に存在する DNA 付加体を網羅的に分析したところ、従来報告されてきた DNA 付加体数よりもさらに多くの DNA 付加体の存在することが確認された。この結果は、生体試料中の DNA は、多種類のアルデヒド化合物と反応して不安定なアルデヒド-核酸のシッフ塩基として存在する可能性を示唆している。今後この LC/ESI-MS/MS による網羅的 DNA 付加体検出法 (DNA アダクトーム法) を用いて、MWCNT 投与により、特異的に生成・増加する DNA 付加体の同定と定量を行い、MWCNT 曝露による炎症誘発、DNA・組織損傷との関連などについて検討を行う必要がある。

### E. 結論

以上より、本研究により、NM の経気管投与により炎症を誘発させたラット肺組織中には、健常ラットの肺と比較して、構造未知のものを含めて、より多くの DNA 付加体が存在すること、その一部は、炎症により顕著に増加することが認められた。これらの結果は、炎症誘発により、活性酸素・窒素酸化物が生成され、続いて、高濃度の脂質過酸化物が生成し、DNA と反応し付加体を生成する可能性を示唆している。

### F. 健康危機情報

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H.

Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.* (2015) **988**, 149-156.

Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H. Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, (2014) **446**, 702-8.

## 2. 学会発表

伴野 勸、三好規之、徐結荀、津田洋行、大島寛史

多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物の網羅的解析、第67回日本酸化ストレス学会学術集会、2014年9月4～5日、京都

## G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

### 1. 特許取得

なし

### 2. 実用新案登録

なし

### 3. その他

なし

分担研究報告書

研究課題名：カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析とそれに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名：呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

分担研究者	今泉祐治	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	教授
研究協力者	山田 茜	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	
	大羽輝弥	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	
	鈴木良明	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	助教
	山村寿男	名古屋市立大学大学院薬学研究科	細胞分子薬効解析学分野	准教授

**研究要旨** カーボンナノマテリアルの呼吸器に対する毒性・発ガン機構解明にあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な気道上皮繊毛細胞における細胞障害性とその機構の解明を目指した。気道繊毛細胞は異物の口腔側への輸送を直接的に担っているため、細胞障害による繊毛運動機能低下は、異物排泄機能低下に直結する。ラットの気管内にカーボンナノチューブを噴霧し組織切片を作成、観察したところ気道上皮繊毛細胞の脱落と組織肥厚が見られた。さらに蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価モデルを使用した検討では、カーボンナノチューブ投与群において気管・気管支における蛍光ビーズの貯蓄量が増加した。さらに単離肺胞マクロファージのカーボンナノチューブ貪食による細胞の生存率及び貪食能の変化を検討したところ、生存率・貪食能の低下が明らかとなった。本結果は、気道内へ取り込まれたカーボンナノチューブが気道上皮繊毛細胞の繊毛に付着することで気道上皮繊毛細胞の脱落が生じ、気道クリアランスを低下させること、また肺胞マクロファージに取り込まれ細胞障害を生じること、などによりカーボンナノチューブが気道・肺胞に貯留し、リモデリング等の他細胞への影響や更なる炎症の促進を引き起こしている機構が示唆された。

#### A. 研究目的

分担研究課題名：呼吸器系細胞における細胞障害評価系の確立

各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブの呼吸器に対する毒性・発ガン機構を解明するにあたり、被検物暴露のごく初期における直接的な呼吸器細胞障害を生化学的・生理学的・薬理学的手法を駆使して解析することを目的とした。特に異物の口腔側への輸送を直接的に担ってい

る気道上皮繊毛細胞に対する細胞障害性に関して検討を行ったところ、短期的なカーボンナノチューブ暴露において気道上皮繊毛細胞の脱落が示された。この障害性の評価系を確立し、カーボンナノチューブの気道クリアランスへの影響を検討することを目的とした。さらに肺においては異物排泄機能として咳反射や肺胞マクロファージによる貪食、分解、輸送による機構があり、肺胞マクロファージの機能への影響について

も検討した。

## B. 研究方法

### B-1 In vivo でのカーボンナノチューブ噴霧によるモデル作成

気道内へ2種類のカーボンナノチューブ (VGCF・VGCF-X) を0.5% Pluronic F68 (PF68) の生理食塩水を分散剤として用い、別々の Wister/ST ラット雄性8週齢にそれぞれ1、4、7日目に気管内に噴霧した。溶媒群のラットには0.5% Pluronic F68 (PF68) の生理食塩水を噴霧した。

### B-2 蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価方法

上記の方法で作成したモデルに対し、最後の噴霧から24時間後に直径0.5 $\mu$ mの蛍光ビーズを気管内に噴霧した。以下の実験で用いた蛍光ビーズは全て TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards (Invitrogen) を使用した。噴霧してから2時間後に気管及び肺を摘出し、それぞれの組織を洗浄しその洗浄液中の蛍光量を測定した。

### B-3 肺胞マクロファージの回収

Wister/ST ラット雄性8~12週齢の気管及び肺を摘出し、気管内にカニューレを挿入し、6mlのリン酸緩衝液 (PBS (-)) を注入して肺内を洗浄し、肺洗浄液を得た。これを5回繰り返し、回収した洗浄液から肺胞マクロファージを得た。

### B-4 MTT 試験

ラットから回収した肺洗浄液を2000g $\times$ 10分で遠心した後、上清を除き、10%FBS RPMI1640培地にて懸濁した。これをシャーレにまき、CO<sub>2</sub> インキュベーターで24時間培養した後、実験に使用した。肺胞マクロファージをシャーレから剥がし、96well-plate に1wellあたり10000細胞となるように調整した。その後、2種類のカーボンナノチューブ (MWCNT-L・MWCNT-S) 及び0.5% Pluronic F68 (PF68) の生理食塩水をそれぞれ別のwellに加え、2時間後、1日後、

7日後にMTTアッセイを行い、生存率を検討した。

### B-5 貪食能実験

ラットから回収した肺洗浄液を2000g $\times$ 10分で遠心した後、上清を除き、10%FBS RPMI1640培地にて懸濁した。懸濁液を肺胞マクロファージが10000細胞/100mlとなるように調整し、2種類のカーボンナノチューブ (MWCNT-L・MWCNT-S) 及び0.5% Pluronic F68 (PF68) の生理食塩水を加え、37 $^{\circ}$ Cのインキュベーター内で振とう培養を行った。培養を始めてから2時間後に蛍光ビーズを加え、さらに2時間培養した。顕微鏡下で400細胞の肺胞マクロファージをランダムに数え、その中で貪食された蛍光ビーズ数を解析した。

(倫理面への配慮)

実験動物に関する名古屋市立大学の実験倫理指針に従って実験を行った。

## C. 研究結果

C-1 蛍光ビーズによるクリアランス測定  
カーボンナノチューブをラットの気管内に噴霧して作成したモデルに対し、蛍光ビーズによる気道クリアランスの評価を行ったところ、気管ではVGCF群において洗浄液中の蛍光量が溶媒群と比べ有意に増加したがVGCF-X群では変化が見られなかった。さらに、肺の洗浄液中の蛍光量は両群とも有意な変化は見られなかった。

C-2 肺胞マクロファージの生存率  
MTTアッセイを用いて検討したところ、VGCF群において1日後、7日後の生存率が溶媒群と比べ有意に減少した。しかし、VGCF-X群に関しては生存率の低下傾向は見られたが有意な差はなかった。

C-3 肺胞マクロファージの貪食能  
400細胞の肺胞マクロファージ中で蛍光ビーズを貪食している細胞の割合及び貪食された蛍光ビーズの合計を検討した。VGCF群において蛍光ビーズを貪食している細胞の割合、及び合計数が溶媒群に比べて有意に減少したが、VGCF-X群に関しては減少傾向が見られたが、有意な差はなかった。

## D. 考察

気管の上皮の繊毛細胞は吸入された粒子などに対する第一の防御機構であり、繊毛の動きによって咽頭側へと移行する。今回、蛍光ビーズを用いた気道クリアランス評価系において、VGCF 群の気管における洗浄液の蛍光量が溶媒群と比べ有意に増加した。これは以前の組織標本で示されたように吸入したカーボンナノチューブによって気道上皮繊毛細胞が減少することで異物排泄能が低下し、蛍光ビーズが気道上皮にとどまっているためであると考えられる。VGCF-X 群でも気道上皮に損傷が見られ、有意な差はなかったものの繊毛細胞の減少傾向が確認されたが、気管の洗浄液における蛍光量に変化は見られなかった。これは繊毛細胞の脱落以外に、びらんの形成などによる上皮細胞の剥離により気道上皮上に蛍光ビーズがとどまることができず、肺まで侵入したのではないかと推測される。

肺の洗浄液中の蛍光量は VGCF 群ではほとんど変化が見られず、VGCF-X 群では増加傾向にあったが、両軍ともに溶媒群との間に有意な差はなかった。VGCF-X 群での増加傾向は気道上皮で捉えきれなかった蛍光ビーズが肺まで侵入した可能性が考えられ、以前の組織標本の結果から VGCF-X 群において肺の障害性がより強く、炎症の程度の違いも寄与しているのではないかと考えられる。今後は粒径の異なる蛍光ビーズなども用い、さらなる検討を重ねていく必要がある。

単離肺胞マクロファージの生存率、及び貪食能について、カーボンナノチューブを貪食することにより、細胞死が引き起こされ、貪食する蛍光ビーズの数が低下すると考えられる。しかし、VGCF 及び VGCF-X では生存率及び貪食能への影響が異なっており、これはそれぞれのカーボンナノチューブの形などの特性による違いではないかと考えられ、今後さらなる検討が必要である。

## E. 結論

カーボンナノチューブによって気道クリアランスが低下することがわかったが、形状の異なる2種類のカーボンナノチューブによって結果が異なり、それぞれのカーボンナノチューブの性質や炎症の程度を考慮に入れて、今後検討していく必要がある。また肺胞マクロファージの貪食能及び生存率に対しての影響も2種類のカーボンナノチューブによって異なった。今後は肺胞マクロファージがカーボンナノチューブの長さや直径によってどのように影響を受けるかを、より詳細に検討する必要がある。

## F. 健康危機情報

特になし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

Ohba T., Jiegou Xu, Alexander D. B., Yamada A., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Imaizumi Y.  
MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents.  
The Journal of Toxicological Sciences Vol. 39,  
No. 3, 499-505, 2014

#### 2. 学会発表

多層カーボンナノチューブの気道クリアランスへの影響

○山田 茜 1、大羽 輝弥 1、徐 結荀 2、鈴木 良明 1、山村 寿男 1、津田 洋幸 2、今泉 祐治 1

1 名古屋市立大・院・薬・細胞分子薬効解析、2 名古屋市立大・津田特任研究室

(第 88 回 日本薬理学会年会 名古屋)

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

#### 1. 特許取得

特になし

#### 2. 実用新案登録

特になし

#### 3. その他

特になし

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と  
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:カーボンナノマテリアル肺内投与に伴うサイトカイン発現プロファイル

分担研究者 酒々井眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 教授

研究協力者 二口 充 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 准教授

深町勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 講師

吉本恵里 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子毒性学分野 技術職員

## 研究要旨

ナノチューブが惹起する肺障害性についてヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築は重要課題である。本研究では多層カーボンナノチューブ(MWCNT-N)の肺内投与に伴うサイトカイン発現プロファイルを解析した。MWCNT-Nを25 µm meshの篩(ふるい)によりflow through (FT)分画、primary mixed(P)分画、remaining(R)分画に分け、各分画をラット肺内に投与後2週間、1年および2年経過の肺あるいは腫瘍組織を検体とした。肺組織中のMWCNT-Nの平均長測定では偏光顕微鏡像をマップメーターにて長さを測定した。HPLCアッセイにて肺組織でのMWCNT-N沈着量を測定した。凍結肺組織および腫瘍組織を材料にtotalRNAとタンパクを抽出し定量的RT-PCRアッセイおよびwestern blotアッセイにて各分画ごとのmRNAおよびタンパク発現レベルを調べた。肺組織中のMWCNT-Nの平均長(µm)はflow through(FT)分画で $2.6 \pm 0.8$ (mean  $\pm$  SD)、primary mixed(P)分画で $2.7 \pm 1.0$ 、remaining(R)分画で $3.1 \pm 0.9$ であった。本研究の実験システムにおいて肺内に投与されたMWCNT-Nは1年経過後も一定量が肺内にとどまることがわかった。MWCNT-N投与によりP分画は他の2分画と比べて約2倍量が肺内に沈着し、PおよびR分画では2年経過後に初期沈着量に比べて1/4程度に減少、FT分画は1/2程度に減少した。先行研究によりMWCNT-Nによる肺発がんとの関連が示唆された4つのサイトカイン(Csf3、IL6、Cxcl2、Ccl4)発現については、2週間試験のmRNA発現ではいずれの分画でも著しい発現増加はみられないが、1年試験ではとくにCsf3発現についてPおよびR分画で著しい増加がみられた。タンパク発現について2週間試験においてP分画で4つのサイトカインのいずれも比較的発現が高かった。いずれの分画でも1年経過してタンパク発現が維持されるのはCsf3およびCxcl2であった。平均長が約2~4 µmのMWCNT-Nをラット肺内に投与する実験条件下では2年経過後も肺実質に炎症像および胸膜肥厚像がみられ、1年経過後もCsf3およびCxcl2のタンパク発現増加、腫瘍のCsf3/IL6 mRNA発現増加等の所見がみられることを合わせるとMWCNT-Nの肺発がん性にはMWCNT-N自体の存在にくわえて炎症の影響を考慮する必要がある。また、Csf3とCxcl2のタンパク発現statusと炎症はリンクすると考えられる。



## A. 研究目的

本研究では多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N) の肺内投与に伴うサイトカイン発現プロファイルを解析した。ナノチューブが惹起する肺障害性についてヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築は重要課題である。この観点から、先行研究では MWCNT-N 投与後 65 週以降に心外膜・胸膜中皮腫の発生を報告した (腫瘍発生プロファイル)。本研究では 2 週間試験、1 年および 2 年試験の試料を適宜用いて分画化したナノチューブの肺組織内の平均長、投与後 2 週間と 2 年経過後での肺内沈着量、凍結肺組織および腫瘍組織での炎症性サイトカイン発現の詳細な解析を進めた。

## B. 研究方法

本研究で用いたナノチューブは日機装社製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N) である。MWCNT-N を 25  $\mu\text{m}$  mesh の篩 (ふるい) により flow through (FT) 分画、primary mixed (P) 分画で、remaining (R) 分画に分け、各分画をラット肺内に投与後 2 週間、1 年および 2 年経過の肺組織を検体として用いた。肺組織中の MWCNT-N の平均長測定では、各群 5 匹の個体の肺組織スライドから複数視野にて測定した。偏光顕微鏡を用いて MWCNT-N をモニタ上に投影しマップメーターにて長さを実測し拡大率より micrometer オーダーに換算した。各群 560 ~ 700 本を計測しその平均長を計算、分布を解析した。HPLC アッセイにて肺組織での MWCNT-N 沈着量を測定した。2 週間試験では各群 5 匹、2 年試験では各群 6 匹の試料を用いた。凍結肺組織および腫瘍組織を材料に totalRNA とタンパクを抽出し定量的 RT-PCR アッセイおよび western blot アッセイにて各分画ごとの mRNA およびタンパク発現レベルを調べた。解析対象のサイトカインは先行研究にて初代培養肺 macrophage に MWCNT-N をばく露し網羅的にスクリーニング (Toray3D-GeneChip 20k) した結果発現量の高かった Csf3 (colony stimulating factor3)、IL6 (interleukin6)、Ccl4 (macrophage inflammatory protein1 beta)、Cxcl2 (macrophage inflammatory

protein2) とした。Total RNA を trizol reagent を用いて抽出し oligo dT primer (Invitrogen) にて cDNA を合成後、これを template として DNA を合成、発現レベルを actin にて標準化した (ImageJ)。タンパクを RIPA lysis buffer にて抽出し SDS-PAGE 後に各 1 次抗体にて反応させ発現レベルを actin にて標準化した。2 ~ 5 個体のサンプルをアッセイし平均した。使用した 1 次抗体は Csf3 (SantaCruz)、IL6 (SantaCruz)、Ccl4 (GeneTex)、Cxcl2 (GeneTex)、actin (SantaCruz) である。

(倫理面への配慮)

我が国の「動物の保護及び管理に関する法律 (昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105) 並びに「動物の飼育及び保管等に関する基準 (昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号) を遵守し、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った (H22M-19)。

## C. 研究結果

肺組織中の MWCNT-N の平均長 ( $\mu\text{m}$ ) は flow through (FT) 分画で  $2.6 \pm 0.8$  (mean  $\pm$  SD)、primary mixed (P) 分画で  $2.7 \pm 1.0$ 、remaining (R) 分画で  $3.1 \pm 0.9$  であった。平均長は各群間で有意差があった ( $P < 0.0001$ )。MWCNT-N 投与開始後 2 週間での肺内沈着量 ( $\mu\text{g/g}$  lung tissue) は FT 分画で  $887 \pm 131$ 、P 分画では  $1,912 \pm 162$ 、R 分画では  $1,019 \pm 165$  (mean  $\pm$  SE)、2 年経過後の肺内沈着量は FT 分画で  $426 \pm 116$ 、P 分画では  $486 \pm 44$ 、R 分画では  $268 \pm 43$  であった。2 週間試験では P 分画の沈着量は他の 2 群の沈着量より有意に高かった ( $P < 0.01$ )。2 年試験での有意な群間差はみられなかった。2 週間試験と 2 年試験での群間に有意差を認めた ( $P < 0.05$ )。また、4 種類のサイトカインの発現レベルはつぎのとおりである (VEH は vehicle control)。

2 週間試験の mRNA 発現 (mRNA 発現レベルを 3 分画と VEH の間で比較した) : Csf3 の発現レベルに

ついてFT分画>VEH>PおよびR分画であった。IL6およびCxcl2の発現レベルについてP、FTおよびR分画<VEHであった。Ccl4の発現レベルについてFTおよびR分画>VEH>P分画であった。

2週間試験のタンパク発現(タンパク発現レベルを3分画とVEHの間で比較した):CsF3、IL6、Cxcl2およびCcl4の発現レベルについてP、FTおよびR分画>VEHであった。

1年試験のmRNA発現(mRNA発現レベルを3分画とVEHの間で比較した):CsF3の発現レベルについてPおよびR分画>VEH>FT分画であった。IL6、Cxcl2、Ccl4の発現レベルについてP、FT、R分画>VEHであった。

1年試験のタンパク発現(タンパク発現レベルを3分画とVEHの間で比較した):CsF3の発現レベルについてPおよびFT分画>VEH=R分画であった。IL6およびCcl4の発現レベルについてP、FTおよびR分画<VEHであった。Cxcl2の発現レベルについてP、FTおよびR分画>VEHであった。

2年試験のmRNA発現(mRNA発現レベルをR分画とVEHの間で比較した):実験終了時に腫瘍を認めた個体のうち2個体について腫瘍サンプルを材料にmRNAおよびタンパク発現を調べた結果、1個体のCsF3およびIL6の発現レベルについてR分画>VEHであった。2個体ともにCxcl2およびCcl4の発現レベルについてはVEH>R分画であった。

#### D. 考察

本研究の実験システムにおいて肺内に投与されたMWCNT-Nは1年経過後も一定量が肺内にとどまることがわかった。投与によりP分画は他の2分画と比べて約2倍量が肺内に沈着し、PおよびR分画は2年経過後に初期沈着量に比べて1/4程度に減少、FT分画は1/2程度に減少した。FT平均長は他の2分画より0.1~0.5 μm短いので、長さの違いはMWCNT-Nの排除システムやmacrophage取り込み

に影響する可能性がある。実験に使用したMWCNTは日機装社製であり1~4 μmのfiberが51%、5~20 μmのfiberは47%含まれている(日機装社提供データ)。25 μm meshの篩(ふるい)にかけた肺内投与試料でFT分画の平均長が2.6、P分画が4.2、R分画は2.6 μm以上である。今回の肺内でのfiber平均長を求めた実験結果を合わせると我々の篩分画システムではおおよそ2~5 μm程度のfiber長に分けることができ、実際の肺内にとどまるfiberの長さは2~4 μm程度であることがわかった。4つのサイトカインについては、2週間試験のmRNA発現はいずれの分画でも著しい発現増加はみられないが、1年試験ではいずれの分画でも発現増加傾向がみられ、とくにCsF3発現についてPおよびR分画で著しい発現増加がみられた。タンパク発現については、4つのサイトカインについて2週間試験でいずれの分画でも発現増加傾向があり、比較的発現が高いのはP分画であった。1年経過していずれの分画でもタンパク発現が維持されるのはCsF3とCxcl2であり、とくにCsF3発現についてP分画で著しい増加がみられた。本研究での所見を考慮すると平均長が約2~4 μmのMWCNT-Nが肺内にばく露された場合に1~2年経過後も組織学的に炎症像は持続してみられるのでCsF3とCxcl2のタンパク発現statusと炎症はリンクすると考えられる。MWCNT-Nの肺内投与により生じた腫瘍のmRNA発現についてはR分画をばく露された個体に生じた腫瘍においてCsF3およびIL6発現が増加した。CsF3は細胞増殖と炎症の両者を反映するマーカーでありtumorigenesisとの詳細な関連を調べる必要がある。

#### E. 結論

平均長が約2~4 μmのMWCNT-Nをラット肺内に投与する本実験条件下において、その肺発がん性にはMWCNT-N自体の存在にくわえて炎症の影響を考慮する必要がある。また、CsF3とCxcl2のタンパク発現statusと炎症はリンクすると考えられる。

#### F. 健康危機情報

該当なし。

## F. 研究発表

### 1. 論文発表

Shibata K, Fukamachi K, Tsuji A, Saga T, Futakuchi M, Nagino M, Tsuda H, Suzui M. *In vivo* <sup>18</sup>F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human *Kras*<sup>G12V</sup> oncogene. *Oncol Lett*, 9: 2112-2118, 2015.

Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Miyoshi I, Tsuda H, Suzui M, Hayashi H. A novel transgenic mouse model carrying human tribbles related protein 3 (TRB3) gene and its site specific phenotype. *Biol Pharm Bull*, 37: 1068-1074, 2014.

Nunamo T, Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Furukawa F, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Suzui M. Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *Asian Pac J Cancer Prev*, 15: 929-935, 2014.

Fukamachi K, Iigo M, Hagiwara Y, Shibata K, Futakuchi M, Alexander DB, Hino O, Suzui M, Tsuda H. Rat N-ERC/mesothelin as a marker for *in vivo* screening of drugs against pancreas cancer. *PloS One*, 9: e111481, 2014.

Iigo M, Alexander DB, Xu J, Futakuchi M, Suzui M, Kozu T, Akasu T, Saito D, Kakizoe T, Yamauchi K, Abe F, Takase M, Sekine K, Tsuda H. Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine. *Biometals*, 27: 1017-1029, 2014.

Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A,

Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes. *Cancer Sci*, 105: 763-769, 2014.

Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H. Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol*, 88: 65-75, 2014.

### 2. 学会発表

松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉(バショウ、*Musa basjoo*)抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第135年会: 神戸; 2015年3月28日

安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミチン酸誘導体の *in vivo* 抗がん効果. 個体レベルでの癌研究の新展開: 大津; 2015年2月6日

加賀志稀、安藤さえこ、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブの長さの違いによる肺障害と遺伝子発現への影響. 個体レベルでの癌研究の新展開: 大津; 2015年2月6日

酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸. 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル. 第31回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 江戸川: 2015年1月30日

深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 血清診断マーカーN-ERC/mesothelinによる抗がん剤の治療効果の判定. 第31回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 江戸川: 2015年1月30日

二口充、深町勝巳、酒々井眞澄. 骨転移巣の悪政形質を規定する microRNA の同定とその機序解析.

第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 27 日

佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。デセン酸誘導体の抗がん作用機序解析。第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 26 日

酒々井眞澄、佐藤圭悟、磯田泰彰、沼野琢旬、二口充、深町勝巳、徐結苟、津田洋幸。ラット肺におけるナノチューブの発がんプロファイル。第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 26 日

深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄。膵がんモデル動物における血清診断マーカー。第 73 回日本癌学会学術総会; 横浜: 2014 年 9 月 26 日

佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄。新規デセン酸誘導体はアポトーシス誘導により大腸がんを抑制する。平成 26 年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2014 年 9 月 6 日

Fukamachi K, Yabushita S, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. Identification of serum tumor marker of pancreas cancer by omics analysis. 第 29 回発癌病理研究会; いわき: 2014 年 9 月 1-3 日

Sato K, Isoda Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel decenoic acid derivative inhibits colon carcinogens by inducing apoptosis. 第 29 回発癌病理研究会; いわき: 2014 年 9 月 1-3 日

津田洋幸、徐結苟、酒々井眞澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純。多層カーボンナノチューブの肺と胸膜組織における有害性と発がん性の *in vitro-in vivo* システム検索法の開発。第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014 年 7 月 3 日

津田洋幸、David B. Alexander、藪下晴津子、住田佳代、徐結苟、樋野興夫、辻厚至、佐賀恒夫、柳原

五吉、酒々井眞澄、二口充、深町勝巳。活性型 ras コンディショナルトランスジェニックラットを用いた人モデルとしての膵癌。第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014 年 7 月 4 日

酒々井眞澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸。カーボンナノチューブの中皮腫発がんプロファイル。第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014 年 7 月 3 日

深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄。ラット膵がん血清診断マーカーの有効性の検討。第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014 年 7 月 3 日

二口充、徐結苟、井上義之、高月峰夫、津田洋幸、酒々井眞澄。カーボンナノチューブおよびカーボンブラックの肺内噴霧により誘発された肺胞過形成様病変。第 41 回日本毒性学会学術年会; 神戸: 2014 年 7 月 4 日

酒々井眞澄、佐藤圭悟、二口充、深町勝巳、磯田泰彰。蜂産品由来デセン酸誘導体の抗がん効果。文科省新学術領域研究・がん支援「化学療法基盤支援活動」第 3 回シンポジウム; 名護: 2014 年 5 月 12 日

## G. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許第 5597427 号、抗がん剤、H26.8.15 登録、特許権者酒々井眞澄、飯沼宗和、発明者酒々井眞澄、飯沼宗和

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

平成 26 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と  
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

分担研究課題名:カーボンおよび金属ナノマテリアルによる肺および全身臓器障害と発がん作用の機序解析と  
それに基づく中期検索法の開発に関する研究

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 飯郷 正明 名古屋市立大学大学院医学研究科 研究員

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

徐 結荷 名古屋市立大学大学特任教授

David B. Alexander 名古屋市立大学大学特任教授

## 研究要旨

MWCNT の毒性、発がん性について、長期吸入暴露試験に代替可能な短期試験系として、①ラット肺 Mφ を用いた短期 *in vitro* 試験法、②吸入暴露に替わる全経過 1～2 週のラット肺内噴霧投与 (TIPS) による *in vivo* 毒性解析法、③ 20 週程度の発癌プロモーション試験、および今年度では③より派生した④検体のみを 2 週間 TIPS 投与後 2 年間の病変の可逆性と長期 (2 年) 発がん性の検討を行い提案し、①②③④の妥当性について検討した。今年度は④において、MWCNT-L (昭和電工)、陽性対照の MWCNT-7 (保土谷化学工業, WHO/IARC にて Group 2B--動物発がんに必要な証拠) および青アスベストの crocidolite (IARC grade、WHO/IARC にて Group 1--ヒト発がん物質) を PF68 コポリマー分散剤に 500 μg/ml に懸濁して TIPS 法にて 0.5ml (=250 μg) x 2 回/週にて 4 週間 (合計 8 回、2 mg/ラット) 投与し、終了後 1 日と 12 週 (合計 16 週) における肺と胸膜の病変の可逆性について比較検討した。その結果、1) 胸膜の線維性肥厚は、いずれの検体でも増加していて、MWCNT-7 群において、最も著明であった (P<0.01)。肺では肺胞の異物肉芽と繊維化は残存した。2) 胸膜中皮細胞の増殖率は、すべての投与群において溶媒群の約 4～6 倍に増加 (P<0.001) していた。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数はすべての検体で 4 週より減少したが、胸腔洗浄液中の検体 (繊維) の数および CTGF、IL-2 と IP-10、IL-18 レベルは 3 種の検体のうち MWCNT-7 でより高値であった。

その結果、MWCNT-L、MWCNT-7 および青アスベストの crocidolite は肺実質と胸膜の炎症と線維化を発生させた。しかし、胸腔において MWCNT-L による臓側、壁側中皮細胞の増殖が 16 週まで残存することが分かった。MWCNT-L は肺から胸腔、全身臓器に移動したが、極めて少量で沈着局所の炎症は殆どなかった。以上の結果と酒々井班員の同様法による投与後 2 年観察における悪性中皮腫発生の結果を併せると、①短期 *in vitro* 試験および、④ 2～4 週の投与による遷延性繊維化と中皮細胞の増殖は、提案の短期試験の早期発がん指標として重要な所見である。

## A. 研究目的

ナノマテリアル（短径 100nm 以下の粒子・線維）には二酸化チタニウム等の金属粒子、フラーレン、フラーレンウィスカー、単層/多層炭素ナノチューブ（SWCNT/MWCNT）等がある。これらは、生体内で分解されることは無く異物として細胞・組織に沈着するために、従来の化学発癌の概念（自体が代謝変換されて結果 DNA 障害を起こす物質に変換される、または代謝の過程で ROS を産生する等）において、毒性・発癌性を評価することはできない。これまでの我々の研究によって、MWCNT は経気管肺内に噴霧（TIPS）投与すると胸腔、脾、リンパ節、肝、腎、脳等へ移行すること、更に MWCNT-7（凝集体長径 50~120nm）は肺内投与で肺、胸腔に顕著な炎症と中皮の増殖を誘発することを報告した（Cancer Science, 2012）。本研究では製造設計によって線維の太さと長径の異なる MWCNT について、TIPS 投与によって肺胞と胸膜中皮における毒性、炎症誘発、細胞増殖刺激の有無と程度、その機序について解析し、その手法：①短期 *in vitro* 試験並びにラットを用いた② *in vivo* 系における解析、③の短期投与から派生した④さらに長期（16 週）期間投与する方法に見られる病変の可逆性、について検討し、長期吸入試験の代替法の開発を試みた。

## B. 研究方法

材料：MWCNT-L（製造時長径=8 $\mu$ m, 太さ直径=150nm）、陽性対照として発がん性の明らかな MWCNT-7 および crocidolite を用いた。検体は 0.5% Pluronic F68 (PF68) ポリプロピレンコポリマー（Sigma-Aldrich）に分散懸濁して、投与直前に超音波による再分散をおこなった。投与試料の走査電顕像による観察では、溶媒中のサイズ（長径）は MWCNT-L は不規則な針状・棒状の線維が不定形の凝集塊をつくり、その平均長径は 7 $\mu$ m であった。これらについて、今までの実験系に基づき、長期吸入試験に代替可能な試験法の確立を試みた。その概要は、検体 4 週の投与：MWCNT-L、および陽性対照の MWCNT-7（保土谷化学工業、

WHO/IARC、Group 2B・腹腔内投与で動物に発がん性あり）と青アスベスト（crocidolite、UICC grade、WHO/IARC、Group 1A・ヒト発がん性あり）について 500  $\mu$ g/mL を 0.5ml にて 4 週投与終了（計 2mg/ラット）の 1 日後と 12 週後（投与開始から 16 週後）に屠殺し、a) 胸膜壁肥厚、b) 胸膜中皮増殖、および c) 胸腔と肺の炎症病変について、それらの消長について観察した。

### （倫理面への配慮）

本研究における倫理面への配慮については、各職員は動物実験及び所属施設において、我が国の「動物の保護及び管理に関する法律（昭和 48 年 10 月 1 日、法律第 105）」並びに「実験動物の飼育及び保管等に関する基準（昭和 53 年 3 月 27 日、総理府告示第 6 号）」を遵守するとともに、当該規程に基づく各施設の動物実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施する。ヒト組織から得た材料を用いる実験は実施しなかった。

## C. 研究結果

④のプロトコルにて、MWCNT-L、MWCNT-7、crocidolite (UICC grade) 投与による a) 胸膜の肥厚、b) 中皮の増殖、および c) 胸腔洗浄液の細胞とサイトカイン組成、における病変の程度と可逆性 (Reversibility) の状態について、溶媒の PF68 群と投与群における投与終了 1 日と 12 週後において比較検討した。a) 臓側（肺側）と壁側（胸腔側）胸膜の線維性肥厚は、いずれの投与群でも PF68 群より有意に増加した ( $P < 0.001$ )。検体群間では MWCNT-7 群の壁側胸膜の 12 週において他の検体よりも最も高値であった ( $P < 0.01$ )。b) 臓側（肺側）と壁側（胸腔側）胸膜中皮細胞の PCNA ラベル率は、すべての投与群において 1 日と 16 週とも溶媒群の約 4~6 倍に増加し ( $P < 0.001$ )、それらの値は 16 週まで維持された。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数 (M $\phi$ 、好中球、リンパ球等の合計) はすべての検体で 16 週において 1 週目の値の 60~70% に減少した。MWCNT-M では減少率は他物質より小さく、それらとの比は約 1.5~

2倍であった(有意)であった。胸腔洗浄液中の主としてMφ中の投与検体(繊維)の数(/100,000個細胞)は、12週で明らかな減少を示したが、腹腔内投与で中皮細胞に発がん性の明らかな(腹腔内投与)MWCNT-7が最も高値を維持した。胸腔洗浄液のサイトカインアレイ解析ではIL-2とIP-10、IL-18さらにCTGF(Connecting Tissue Growth Factor)が同定され、12週でいずれも減少したが、検体間ではMWCNT-7がより高値が持続していた。肺の組織化ではいずれの検体も16週では異物肉芽中に被包化されていた。

#### D. 考察

以上から、MWCNT-Lは針状形態を示すものMWCNT-7、やcrocidoliteとよく似た針状の線維形態を示し、肺内投与で胸腔と肺に強い炎症を起こし、中皮の増殖と間質の線維化肥厚を誘発した。この炎症は投与終了後も遷延して、12週経過後でも観察された。この炎症の原因は肺内、胸腔鏡内に残存する投与物質による炎症反応に起因する。サイトカイン発現解析ではこれらの被験物質の周囲に浸潤したMφの分泌するMip1α、CTGF、Csf3およびCxc12の関与が考えられる。さらに、これらのサイトカインによって、胸膜肥厚、中皮細胞の増殖(PCNAラベル率の高値)、胸膜洗浄液の炎症細胞増加をきたし、線維の残存によってこれらの有害作用が遷延したものと考えられた。とりわけMWCNT-7が他のMWCNT-Lとcrocidoliteより高値であった。このことは発がんポテンシャルの評価において重要な意味を持つ。

この結果とすでに報告されている腹腔内投与による腹腔悪性中皮腫の発生を勘案すれば、本法の被験体のTIPS法による肺内投与後にさらに長期の観察をすることによって胸腔悪性中皮腫の発生が充分予測される。

以上から、本提案の、①短期*in vitro*試験並びにラットを用いるTIPS法による②*in vivo*系における解析、および、③発癌プロモーションモデルから派生した④検体のみを一定期間投与する試験系にて、2年余の時間を要する吸入暴露試験

に代替できる簡便で安価な試験法への道が開けてきたと考える。

#### E. 結論

以上から、①の*in vitro*実験および②の短期*in vivo*試験において、MWCNTの特に針状形態を示すもの(MWCNT-7、MWCNT-L)は肺内投与で胸腔と肺に強い異物炎症を起こし、中皮の増殖線維化を誘発した。この病変は投与終了後と遷延性化して長期に観察された。機序についてはMφ由来の細胞増殖活性のあるサイトカイン・ケモカインのMip1α、CTGF(Connecting Tissue Growth Factor)、Csf3およびCxc12の関与が考えられる。

従って、提案してきた①初代培養肺胞Mφを用いたMφの反応の*in vitro*試験、および②の短期*in vivo*試験の結果から、④の長期試験の予測が可能となると考える。実際に④の長期試験において中皮および肺に発がんが認められれば、TIPS法が、専用の設備と高額な稼働費による吸入暴露試験の代替法として、次々と市場に導入されてくるMWCNTの有害性、特に発がん性の短期評価法として有用であると考ええる。なお発がん短期試験を参考にしたプロモーション試験にはやはり1年以上を要することがわかった。

#### F. 健康危機情報

特に無し。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Benbrahim-Tallaa L, Lauby-Secretan B, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Rusyn II, Fritschi L, Sergi CM, Hansen J, Le Curieux F, Bolt HM, Fukushima S, Ichihara G, Kamae K,

- Kumagai S, Tsuda H, Kjaerheim K, Bartell SM, Cesta MF, Chiu W, Cooper G, DeWitt JC, Friesen M, Lash LH, Steenland K, Cherrie JW. Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone. *Lancet Oncol.* 2014 Aug;15(9):924-5.
2. Ohba T., Sagawa E., Suzuki Y., Yamamura H., Ohya S., Tsuda H., and Imaizumi Y. Enhancement of Ca<sup>2+</sup> Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to ATP-Sensitive K<sup>+</sup> Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells. *J Pharmacol Exp Ther* 347:145-153, Oct, 2013
  3. Grosse Y1, Loomis D1, Guyton KZ1, Lauby-Secretan B1, El Ghissassi F1, Bouvard V1, Benbrahim-Tallaa L1, Guha N1, Scoccianti C1, Mattock H1, Straif K1; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Kane AB, Debia M, Dion C, Møller P, Savolainen K, Canu IG, Jaurand MC, Comba P, Fubini B, Kobayashi N, Morimoto Y, Tsuda H. Yu IJ, Vermeulen R, Bugge MD, Bateson TF, Kuempel ED, Morgan DL, Pinkerton KE, Sargent LM, Stayner L. Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes. *Lancet Oncol.* 2014 Dec;15(13):1427-8. doi: 10.1016/S1470-2045(14) 71109-X. Epub 2014 Oct 31.
  4. Xu J., Futakuchi M., Alexander D.B., Fukamachi K., Numano T., Suzui M., Shimizu H., Omori T., Kanno J., Hirose A., and Tsuda H. : Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles. *Arch Toxicol.*, 88(1) : 65-75 Jan. 2014.
  5. Numano T., Xu J., Futakuchi M., Fukamachi K., Alexander D.B., Shimizu H., Furukawa F., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., and Suzui M., : Comparative study of the toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro. *Asian Pacific J Cancer Prev.* 15:929-935. 2014.
  6. Ohba T., Xu J., Alexander D.B., Yamada A., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., and Imaizumi Y. MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents. *J Toxicological Science*, 39: 499-505 2014
  7. Xu J., Alexander D.B., Futakuchi M., Numano T., Fukamachi K., Suzui M., Omori T., Kanno J., Hirose A. and Tsuda H. Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis and mesothelial proliferation by multi-walled carbon nanotubes. *Cancer Science.* 105:763-769, 2014
  8. Fukamachi, K, Iigo, M., Hagiwara, Y., Shibata, K., Futakuchi, M., Alexander, D. B., Hino, O., Suzui, M., Tsuda, H., Rat, N-ERC/Mesothelin as a marker for In vivo Screening of drugs against pancreas cancer *PLoS ONE* 9(10): e111481. doi:10.1371/journal.pone.0111481, 2014
  9. Xu J., Alexander DB., Iigo M., Hamano H., Takahashi S., Yokoyama T., Kato M., Usami I., Tokuyama T., Tsutsumi M., Tamura M., Oguri T., Niimi A., Hayashi Y., Yokoyama Y., Tonegawa K., Fukamachi K., Futakuchi M., Sakai Y., Suzui M., Kamijima M., Hisanaga N., Omori T., Hirose A., Kanno J., Nakae D., and Tsuda H Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of



persons exposed to asbestos: A patient-based study. Cancer Sci., in press, 2015.

## 2. 学会発表

### 国内学会

1. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳、二口充、津田洋幸 (2014) カーボンナノチューブの中皮腫発がんプロファイル; 第41回日本毒性学会学術年会 神戸 7月2日-4日
2. Suzui M., Sato K., Isoda Y., Numano T., Futakuchi M., Fukamachi K., Xu J., Tsuda H., (2014) Carcinogenic profile of carbon nanotubes on the rat lung 第73回日本癌学会総会 横浜 9月25-27日
3. 酒々井真澄、沼野琢旬、深町勝巳。二口充、津田洋幸 (2015) 多層カーボンナノチューブの腫瘍発生プロファイル; 第31回日本毒性病理学会総会 東京 1月29日-30日
4. 津田洋幸、徐結旬、Alexander D.B.,酒々井真澄、二口充、深町勝巳、広瀬明彦、菅野純 (2015) 多層カーボンナノチューブの発がん標的性組織; 第14回分子予防環境医学研究会大会 大阪, 2月13日-2月14日.

## G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

### 1. 特許取得

無し

### 2. 実用新案登録

無し

### 3. その他

特に無し。

### Ⅲ. 研究成果の刊行に関する一覧表

## 書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

## 雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
Tomono S., Miyoshi N., Ohshima H.	Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS	J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci	988	149-156	2015
Miyoshi N, Iuliano L, Tomono S, Ohshima H.	Implications of cholesterol autoxidation products in the pathogenesis of inflammatory diseases.	Biochem. Biophys. Res. Commun.,	446	702-708	2014
Ohba T., Xu J, Alexander D. B., Yamada A., Kanno J., Hirose A., Tsuda H., Imaizumi Y.,	MWCNT causes extensive damage to the ciliated epithelium of the trachea of rodents.	The Journal of Toxicological Sciences	39	499-505	2014
Shibata K, Fukamachi K, Tsuji A, Saga T, Futakuchi M, Nagino M, Tsuda H, Suzui M.	<i>In vivo</i> <sup>18</sup> F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human <i>Kras</i> <sup>G12V</sup> oncogene.	Oncol Lett.	9	2112-2118	2015
Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Miyoshi I, Tsuda H, Suzui M, Hayashi H	A novel transgenic mouse model carrying human tribbles related protein 3 (TRB3) gene and its site specific phenotype	Biol Pharm Bull	37	1068-1074	2014
Nunamo T, Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Furukawa F, Kanno J, Hirose A, Tsuda H, Suzui M.	Comparative study of toxic effects of anatase and rutile type nanosized titanium dioxide particles in vivo and in vitro.	Asian Pac J Cancer Prev	15	929-935	2014
Fukamachi K, Iigo M, Hagiwara Y, Shibata K, Futakuchi M, Alexander DB, Hino O, Suzui M, Tsuda H.	Rat N-ERC/mesothelin as a marker for <i>in vivo</i> screening of drugs against pancreas cancer.	PloS One	9	e111481	2014
Iigo M, Alexander DB, Xu J, Futakuchi M, Suzui M, Kozu T, Akasu T, Saito D, Kakizoe T, Yamachi K, Abe F, Takase M, Sekine K, Tsuda H.	Inhibition of intestinal polyp growth by oral ingestion of bovine lactoferrin and immune cells in the large intestine.	Biometals,	27	1017-1029	2014

<p>Xu J, Alexander DB, Futakuchi M, Numano T, Fukamachi K, Suzui M, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H.</p>	<p>Size- and shape-dependent pleural translocation, deposition, fibrogenesis, and mesothelial proliferation by multiwalled carbon nanotubes.</p>	<p>Cancer Sci,</p>	<p>105</p>	<p>763-769</p>	<p>2014</p>
<p>Xu J, Futakuchi M, Alexander DB, Fukamachi K, Numano T, Suzui M, Shimizu H, Omori T, Kanno J, Hirose A, Tsuda H.</p>	<p>Nanosized zinc oxide particles do not promote DHPN-induced lung carcinogenesis but cause reversible epithelial hyperplasia of terminal bronchioles.</p>	<p>Arch Toxicol</p>	<p>88</p>	<p>65-75</p>	<p>2014</p>
<p>Benbrahim-Tallaa L, Lauby-Secretan B, Loomis D, Guyton KZ, Grosse Y, El Ghissassi F, Bouvard V, Guha N, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Rusyn II, Fritschi L, Sergi CM, Hansen J, Le Curieux F, Bolt HM, Fukushima S, Ichihara G, Kamae K, Kumagai S, Tsuda H, Kjaerheim K, Bartell SM, Cesta MF, Chiu W, Cooper G, DeWitt JC, Friesen M, Lash LH, Steenland K, Cherrie JW.</p>	<p>Carcinogenicity of perfluorooctanoic acid, tetrafluoroethylene, dichloromethane, 1,2-dichloropropane, and 1,3-propane sultone.</p>	<p>Lancet Oncol.</p>	<p>15</p>	<p>924-925.</p>	<p>2014</p>
<p>Grosse Y, Loomis D, Guyton KZ, Lauby-Secretan B, El Ghissassi F, Bouvard V, Benbrahim-Tallaa L, Guha N, Scoccianti C, Mattock H, Straif K; International Agency for Research on Cancer Monograph Working Group. Kane AB, Debia M, Dion C, Møller P, Savolainen K, Canu IG, Jaurand MC, Comba P, Fubini B, Kobayashi N, Morimoto Y, Tsuda H, Yu IJ, Vermeulen R, Bugge MD, Bateson TF, Kuempel ED, Morgan DL, Pinkerton KE, Sargent LM, Stayner L.</p>	<p>Carcinogenicity of fluoro-edenite, silicon carbide fibres and whiskers, and carbon nanotubes.</p>	<p>Lancet Oncol.</p>	<p>15</p>	<p>1427-1428</p>	<p>2014</p>