



図 3. ASC-mGFP 融合タンパク質を発現させた THP-1 細胞の位相差 (Left) および蛍光 (Right) 顕微鏡像

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:多層カーボンナノチューブ肺内投与によって生じるDNA付加体の網羅的解析

分担研究者 三好 規之 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 助教

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

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露によって生じるがん原性物質の探索を目的として、MWCNT肺内投与されたラット肺組織中のDNA付加体の網羅的解析をLC/ESI-MS/MSを用いて行った。その結果、対照群と比較して直径の異なる2種のMWCNTを曝露した群で、既知、未知を含めてDNA付加体の生成量が増加することがわかった。そのうち、malondialdehydeや4-hydroxy-2-nonenal、4-hydroxy-2-hexenalなど脂質過酸化由来の活性カルボニル化合物(RCs)のDNA付加体が有意に増加していることを確認した。これらのRCsは強い細胞傷害性を有することから、MWCNT曝露による発がん要因の一つである可能性が示唆された。

## A

### 研究目的

これまでの検討で、MWCNTs曝露ラット肺組織中においてアルデヒドやケトン基を有する活性カルボニル化合物(Reactive carbonyl species; RCs)が生成し、様々な分子種のRCsが増加することがわかってきた。酸化ストレス下で増加するRCsは核酸付加体を形成するがん原性物質であることが示唆されている。そこで本研究では、MWCNTs曝露による発がん機構の解明を目的として、MWCNTs肺内投与ラット肺組織中DNA付加体の網羅的解析を行った。

### B. 研究方法

8-9週齢の雄性F344ラットに0.5 mLの0.5% PF68 saline または、250 mg/mLになるように

0.5% PF68 溶液に懸濁した形状の異なる2種のMWCNT (MWCNT-L; 8 $\mu$ m, d=150 nm, MWCNT-S; 3 $\mu$ m, d=15 nm)を2日に1回、14日間(計8回)経気管肺内噴霧投与した。14日後、解剖し、肺組織を採取した。採取した肺組織のうち20 mgを取り、DNAを抽出した。次に抽出したDNAを酵素的にヌクレオシドに加水分解した。得られたDNA加水分解物をLC/ESI-MS/MS解析試料とした。それをDNA付加体の分子イオンピーク[M+H]<sup>+</sup>からデオキシリボースの脱離によって生じる[M+H-116]<sup>+</sup>という特徴的なフラグメントを利用したLC/ESI-MS/MS (SRM)により網羅的解析を行った。

調製した試料はLC/ESI-MS/MS [HPLC: Agilent 1200 (Agilent Technologies), MS:

G6410B Triple Quadrupole (Agilent Technologies)) により測定した。被験試料の注入量は 10  $\mu$ L とした。カラムは TSK-GEL Super-ODS 2.3  $\mu$ m (東ソー(株)、100 $\times$ 内径 2.0 mm)、流速は 200  $\mu$ L/min、分離・流出は A 液 : H<sub>2</sub>O (0.1% FA) B 液 : ACN (0.1% FA) によるグラジエント方式でおこなった。グラジエント条件は 0 分で A 液 99%、B 液 1%、15 分で A 液 20%、B 液 80%、30 分で A 液 20%、B 液 80%、30.01 分で A 液 99%、B 液 1% で、40 分で A 液 99%、B 液 1% とした。測定モードは SRM モードで  $m/z$  [M+H]<sup>+</sup> (228~727)/ [M-116+H]<sup>+</sup> をモニターした。(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定に従い、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た後、実施機関における実験動物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った。

### C. 研究結果

DNA 付加体の網羅的解析を行った結果、対照群で 611、MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットでそれぞれ 693、676 ピークが検出され、そのうち MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットで 27、26 ピークが有意に増加していた。そのうち、脂質過酸化由来のアルデヒド化合物である 4-hydroxy-2-nonenal (HNE) のデオキシグアノシン (dG) 付加体である HNE-dG や malondialdehyde の dG 付加体である M<sub>1</sub>-dG が対照群と比較して MWCNT-L、MWCNT-S 曝露ラット共に有意に増加していた。また、MWCNT-S において 2-hexenal と dG の付加体である 2-HE-dG や 4-hydroxy-2-hexenal (HHE) と dG の付加体である HHE-dG の有意な増加が確認された。また、acetaldehyde、acrolein、crotonaldehyde や長鎖脂肪酸アルデヒド類などの様々な脂質過酸化由来のアルデヒド化合物と dG との付加体の存在を確認した。この付加体は対照群と比較して、MWCNT 投与ラットにおい

て有意差は見られなかったが増加傾向を示した。これらの結果より、脂質過酸化物の付加反応によって生じる DNA 付加体の増加が発がんに関与する可能性が示唆された。

さら  $m/z$  336.1、343.1、344.1、355.1 などのピークが MWCNTs 曝露によって顕著に増加していた。これらの有意に増加したピークはいずれも化学構造や付加化合物の詳細が決定されていない未知の DNA 付加体であった。

### D. 考察

MWCNTs 肺内投与ラットの肺組織ではこれまでにマクロファージの浸潤による炎症惹起や活性酸素種産生による酸化ストレスの亢進により脂質過酸化由来の RCs が増加することが知られている。本研究結果においても脂質過酸化由来 RCs の DNA 付加体が有意に増加したことから、MWCNTs 曝露による DNA 付加体の増加は RCs の生成・増加による DNA の修飾増加が一因であると推察された。

### E. 結論

MWCNTs 曝露群で対照群と比較して DNA 付加体が有意に増加していた。このことから、MWCNTs の曝露は 14 日間という比較的短期間においても RCs を含むがん原性物質の生成・増加により、DNA を損傷し、発がん機構に関与する可能性が示唆された。

### F. 健康危機情報

### G. 研究発表

#### 1. 論文発表

1. Tomono S, Miyoshi N, Ohshima H, Comprehensive analysis of the lipophilic reactive carbonyls present in biological specimens by LC/ESI-MS/MS. (2015) *J. Chromatogr. B.*, 149-156.

## 2. 学会発表

1. 伴野勸、三好規之、徐結苟、津田洋幸、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。2014年9月4日～5日 京都

## H. 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

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	
	神藤秀基	名古屋市立大学薬学部薬学研究科	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および発ガン機構解明にあたり、被検物曝露のごく初期に起こる直接的な気道上皮繊毛細胞の細胞障害性とその機構の解明を目指した。気道上皮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の機能低下は、異物排泄の機能低下に直結する。本研究では、気道上皮繊毛運動による異物排泄機能を評価する簡便な気道クリアランス測定法を確立することを目指した。さらに、その測定法を活用して、気道クリアランスにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の影響について解析した。蛍光シリカビーズを用いて気道クリアランスを測定したところ、気管および肺において時間依存的な蛍光シリカビーズの排泄が認められた。MWCNT 吸入モデル動物では、気管クリアランスは低下する傾向にあった。以上の結果は、蛍光シリカビーズを用いた簡便な気道クリアランス評価系が構築できたことを示している。この評価系を用いて、MWCNT は気道上皮繊毛細胞の機能障害を引き起こし、また気管および肺内に沈着することで、気道クリアランスを低下させることが明らかとなった。本研究成果は、MWCNT の人体への影響を予測する上で重要な知見になると考えられる。

### A. 研究目的

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および発ガン機構を解明するにあたり、被検物曝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評価することが肝要である。本研究では、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注目し、その細胞障害性を定量的に評価可能な簡便な気道クリアランス評価系を

確立することを目指した。さらに、その評価系を活用し、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を気管内噴霧した際の気道クリアランスを評価することも目的とした。

### B. 研究方法

1) 蛍光ビーズを用いた気道クリアランスの測定法  
蛍光ポリスチレンビーズ(粒子径、 $490 \pm 1.5$  nm: TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards、

Invitrogen:最大励起波長、365 nm、505 nm、560 nm、660 nm)または蛍光シリカビーズ(粒子径、3.0 μm、500 nm、100 nm : Sicastar-redF、Micromod Partikeltechnologie:最大励起波長、569 nm)の各100 μlをPBS(-)溶液(100 μl)に懸濁し、ラットの気管内に噴霧した。噴霧後、2、4、8、24 時間後に気管および肺を摘出し、2 ml のPBS(-)溶液中に浸した。摘出した気管は、内部を洗浄して洗浄液を回収した。肺はダウンス型ホモジナイザーを使用して肺全体をすり潰し、これを洗浄液として肺組織内の蛍光ビーズを回収した。回収した洗浄液に1 mg/ml コラゲナーゼ(Worthington Biochemical)を加え、37°C で5時間インキュベーションした。さらに、20% SDS/50% DMF 溶液に置換し、37°C で12時間インキュベーションした。その後、メッシュおよびシリンジフィルターを用いて、組織および細胞の残渣を除去し、遠心機を用いてサンプル量を100 μlまでスケールダウンし、マルチラベルカウンター(1420 ARVO、Perkin Elmer)を用いて蛍光強度を測定した。ポリスチレンビーズの蛍光強度は、励起波長485 nm、測定波長535 nmで測定した。シリカビーズの蛍光強度は、励起波長560 nm、測定波長590 nmで測定した。

## 2)MWCNT 吸入モデル動物の作製法とその気道クリアランス測定法

ラット(雄性、Wistar/ST、8~10 週齢:日本 SLC)にMWCNT-L(250 ppm:昭和電工)、MWCNT-S(250 ppm:昭和電工)、PF68(0.5%、溶媒対照群)を含有する生理食塩水(0.3 ml)をそれぞれ初回投与した。3日後と6日後にも噴霧し、MWCNT 吸入モデル動物とした。噴霧開始から7日目に実験に使用した。蛍光シリカビーズを気管内に噴霧した2時間後に気管および肺を摘出して蛍光シリカビーズを上述した方法で回収し、その蛍光強度を測定した。

### (倫理面への配慮)

動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に基づき適正に行った。本実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会で承認済である(承認番号:H24-P-13)。

## C. 研究結果

### 1) 気道クリアランス評価系に適した蛍光ビーズ素材の検討

以前までに報告した気道クリアランス評価系では、多波長励起・蛍光の特性を有するポリスチレン製の蛍光ビーズ(TetraSpeck Fluorescent Microsphere Standards、Invitrogen:最大励起波長、365 nm、505 nm、560 nm、660 nm)を使用していた。しかし、その回収率が非常に低かった(3~24%)。これは、組織洗浄液から蛍光ビーズを回収する際の遠心分離において、十分に回収できていなかったためだと考えられた。そこで、蛍光ポリスチレンビーズ(1 g/ccm)よりも比重が大きい蛍光シリカビーズ(1.8~2.0 g/ccm)を用いて、同様の実験を行った。その結果、蛍光ビーズの回収率が飛躍的に改善し(70~91%)、その蛍光強度は4~23 倍に増大した。使用した蛍光シリカビーズ(Sicastar-redF、Micromod Partikeltechnologie:最大励起波長、569 nm)の励起・蛍光波長ともに単波長だが、気道クリアランス評価系の構築に関しては特段の問題はないと考えられる。

### 2) 気道クリアランス評価系の構築

ラットに粒子径の異なる3種類の蛍光シリカビーズ(粒子径:3.0 μm、500 nm、100 nm)を気管内噴霧した。蛍光シリカビーズの粒子径は、体外から侵入する異物の代表例として、花粉、タバコの煙に含まれる粒子、ウイルスなど想定して選択した。気管内噴霧し、2~24 時間後の気管および肺の洗浄液の蛍光強度を測定した。蛍光ビーズは、気管では時間依存的に体外へと排泄された(24 時間後の排泄率:約80%)。肺でも時間依存的に排泄されたが、その速度は気管と比較するとかなり遅く、24 時間後でも約50%程度の蛍光強度を示した。

### 3)MWCNT の気道クリアランスに対する影響

MWCNT-L、MWCNT-S、PF68(溶媒対照群)をそれぞれ投与したラット群に蛍光シリカビーズを気管内噴霧し、2 時間後の気道クリアランスについて解析した。気管では、MWCNT 群において、蛍光強度が増加(1.3~3 倍)、すなわち異物排泄率が低下する傾向にあった。一方、肺においては、MWCNT 群の蛍光強度は有意に減少した(0.2~0.7 倍)。また、

MWCNT-LとMWCNT-Sでは、気道クリアランスに対する影響の程度が一部異なっていた。

#### D. 考察

従来使用していた蛍光ポリスチレンビーズを蛍光シリカビーズに変更することによって、より正確で感度の高い気道スクリーニング系を構築することができた。さらに、構築した気道クリアランス評価系を用いて、気管内噴霧した蛍光シリカビーズの気管および肺における排泄の経時変化を示すことができた。気管では蛍光シリカビーズ噴霧後、数時間以内に殆どの蛍光ビーズが組織内より排泄された。一方、気管と比較して肺での排泄速度は遅く、蛍光シリカビーズ噴霧 24 時間後でも、蛍光シリカビーズの半数程度が肺組織内に貯留したままだった。これは、蛍光ビーズが肺胞マクロファージに貪食された後に気管支終末へと輸送される、また排泄されなかった蛍光ビーズは肺胞壁などに沈着して貯留するためだと推測される。

MWCNT 吸入モデル動物において、蛍光シリカビーズに対する気道クリアランスを測定した。その結果、MWCNT 吸入モデルラットの気管クリアランスは低下していた。これは、噴霧した MWCNT によって気道上皮に炎症が生じるためだと考えられる。一方、MWCNT 吸入モデルラットの肺クリアランスは増加しているような結果が得られたが、炎症により細気管支が狭窄し、蛍光ビーズが肺の深部まで到達しなかったためではないかと推測される。また、MWCNT の形状(MWCNT-L は針状の形態、MWCNT-S は綿飴状の凝集体)によって気道クリアランスに対する影響の程度が一部異なっていたが、形状と気道クリアランスに対する影響の相関関係については今後の検討課題である。

#### E. 結論

MWCNT は既に様々な分野で使用されており、今後さらにその使用量および応用分野は拡大されていくと考えられている。しかし、その形状からアスベスト様の症状を起こすことが報告されている。肺組織への投与では炎症や酸化ストレスなどを引き起こし、腹腔内投与などにより中皮腫が生じ、マクロファージへ

の毒性も多数報告されている。そのため、本研究では蛍光シリカビーズを用いた簡便な気道クリアランス評価系を確立し、MWCNT が気道クリアランスにおよぼす影響を評価した。MWCNT は気道上皮繊毛細胞の機能障害や気管および肺組織内に沈着することによって、気道クリアランスを低下させることが分かった。気道クリアランスの低下は、さらに侵入した異物によるさらなる炎症の促進や感染症の誘発につながると考えられる。本研究成果は、MWCNT の使用方法や人体への影響を予測する上で重要な知見と考えられる。

#### F. 健康危機情報

特にありません。

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

なし。

##### 2. 学会発表

山田茜, 大羽輝弥, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. マウス気道上皮繊毛細胞における繊毛運動制御に対するCIチャンネル活性の寄与. 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月9日(横浜).

#### H. 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。

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肺病変とサイトカイン発現との関連

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

ヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築を目的として本研究では多層カーボンナノチューブ(MWCNT-N)のラット肺内投与に伴う肺障害とサイトカイン発現との関連を解析した。MWCNT-Nを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年経過の肺組織を検体として用いた。分画後の平均長( $\mu\text{m}$ , mean $\pm$ SD)はそれぞれ2.6 $\pm$ 2.9、4.2 $\pm$ 1.6、>2.6、肺組織中の平均長はそれぞれ2.6 $\pm$ 0.8、2.7 $\pm$ 1.0、3.1 $\pm$ 0.9であった。平均長に大きな差は認めなかったことから、投与されたMWCNTは形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留したと考えられ、その平均長は2.6  $\mu\text{m}$ 以上である。サイトカイン/ケモカインの持続的な発現が、肺がんの発生に関与しているか否かを調べるために2年経過後に発生した腫瘍のサンプルを用いて腫瘍組織中の発現レベルを解析した。我々の先行研究により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)を解析対象として、凍結サンプルからtotalRNAとタンパクを抽出し半定量的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。各サンプルは中分化腺がん(moderately differentiated adenocarcinoma)あるいは肉芽腫(granuloma)であった。がん組織ではCsf3およびIL6のmRNA発現が溶媒対照群よりも2~5倍有意に増加していた。Csf3、Cxcl2およびCcl4のタンパク発現は溶媒対照群に比べ6~11倍有意に高い値を示した。一方、肉芽腫では溶媒対照群よりも低値であった。まとめると、本実験システムにおいて平均長2.6  $\mu\text{m}$ 以上のMWCNT投与52週経過後の時点では腫瘍は発生せず、平均して90~100週経過後に腫瘍が発生するので52~90週目までの期間に、Csf3、Cxcl2およびCcl4は発がんプロモーション効果を発揮する可能性がある。これらの3つのサイトカイン/ケモカイン発現は腫瘍組織でも有意に高値を示している。よって65週以上の炎症の持続とCsf3、Cxcl2およびCcl4の発現レベル増加は肺発がん重要な役割を果たしている。

#### A. 研究目的

ヒトに外挿できる作用機序解析モデルの構築を目的として本研究では、MWCNTの肺内投与に伴う炎症および腫瘍性病変とサイトカイン/ケモカイン発現の

的として本研究では、MWCNTの肺内投与に伴う炎症および腫瘍性病変とサイトカイン/ケモカイン発現の



関連を調べた。MWCNT 投与後 2 年経過した時点で生存したラット肺組織を検体にサイトカイン/ケモカイン IL6、Csf3、Cxcl2 および Ccl4 の mRNA/タンパク発現レベルを解析した。

## B. 研究方法

本研究では日機装社製多層カーボンナノチューブ (MWCNT-N) を用いた。MWCNT-N を 25 mm mesh の篩 (ふるい) により各分画 flow through (FT)、primary mixed (P)、remaining (R) に分け、ラット肺内に投与後 2 年経過の肺組織を検体として用いた。組織学的検索には HE 染色を行った。非腫瘍組織は各群 3~5 匹、腫瘍組織は 2 匹から凍結検体を採取した。腫瘍組織では凍結検体をホルマリン固定し HE 染色することで正確に診断した。各検体から totalRNA およびタンパクを抽出し半定量的 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/ケモ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 protein1beta)、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。1 個体につき複数の検体を採取し、各検体につき複数回アッセイすることで発現量を平均した。使用した 1 次抗体は Csf3 (sc13102, 200 倍希釈, SantaCruz)、IL6 (RD53324, 250 倍希釈, RD Systems)、Ccl4 (GTX45129, 2000 倍希釈, GeneTex)、Cxcl2 (GTX29777, 1500 倍希釈, GeneTex)、actin (A5441, Sigma) である。mRNA およびタンパク発現量の検定には、Dr.SPSS II (SPSS) を用い等分散性の検定には Levene 検定、3 群以上の平均値の比較に一元配置

分散分析 one-way ANOVA を用いた。等分散の多事比較には Bonferroni の多重比較および Dunnett 法を用いた。不等分散の多重比較には Dunnett' C 法および Games-Howell 検定を用いて統計学的解析を行った。 $P < 0.05$  を有意差があると判定した。以下の文章で発現量とするのは各検体の発現量/actin の平均値である。

(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

分画後の平均長 ( $\mu\text{m}$ , mean $\pm$ SD) は FT:  $2.6\pm 2.9$ 、P:  $4.2\pm 1.6$ 、R:  $>2.6$ 、肺組織中の平均長は FT:  $2.6\pm 0.8$ 、P:  $2.7\pm 1.0$ 、R:  $3.1\pm 0.9$  であった。非腫瘍組織の mRNA 発現量: Csf3 発現量は VEH (溶媒対照群) と比較すると、P 分画および FT 分画で低く、R 分画において高かった。IL6 発現量は VEH と比較すると、P 分画において低かった。FT 分画においてわずかに高く、R 分画において低かった。Cxcl2 では、VEH に比べ P、FT、R 分画においていずれの mRNA 発現量は高かった。Ccl4 発現量は P 分画において低く、FT 分画では高く、R 分画において低かった。FT 分画は Notx (無処置群) に比べ有意に高かった ( $P < 0.05$ )。

非腫瘍組織のタンパク発現量: Csf3 発現量は VEH (溶媒対照群) と比較すると、P 分画において高く、FT 分画においてわずかに高く、R 分画において低かった。IL6 では VEH に比べ P、FT、R 分画においていずれも低かった。Cxcl2 発現量は VEH と比較すると、P 分画において低く、FT 分画において高く、R 分画で

はわずかに低かった。Ccl4 発現量は VEH と比較すると、P 分画および FT 分画において高く、R 分画では低かった。Notx (無処置群) よりも高い発現を示したのは Csf3 の P 分画のみであった。

腫瘍組織の mRNA およびタンパク発現量: 計 15 匹のラットの中で実験終了時まで生存し屠殺時に結節性病変が確認された個体は 2 匹 (個体 A と B とする、共に R 分画投与) であった。この個体の結節性病変より凍結組織を採取、解析に用いた。個体 A では 4 個、個体 B では 2 個の結節性病変が観察された。個体 A に観察された 4 個の結節 (A1~A4) は、組織学的にはいずれも中分化型の腺がんであった。個体 B で観察された 2 個の結節性病変 (B1, B2) のうち、1 つは肉芽腫 (B1) で、1 つは中分化型腺がん (B2) であった。VEH (溶媒対象) および Notx (無処置) 群のラットの肺組織には、結節性病変も炎症性変化も観察されなかった。各腺がん組織の Csf3 および IL6 の mRNA 発現量は、VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ A1~A4 で 2~5 倍、B2 で 2.5 倍高かった ( $P<0.05$ )。肉芽腫 B1 発現量は VEH より低値であった。Cxcl2 および Ccl4 の発現量は VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ同等か低値であった。各腺がん組織の Csf3、Cxcl2 および Ccl4 のタンパク発現量は、VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ A1~A4 では 6~11 倍、B2 は 10~11 倍高かった ( $P<0.05$ )。肉芽腫 B1 発現量は VEH より低値であった。IL6 の発現量は VEH (溶媒対照群) 平均値に比べ同等か低値であった。

#### D. 考察

本研究では、多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺内投与に伴う肺病変 (炎症および腫瘍) とサイトカイン発現との関連について調べた。肺内投与前の液相分離での MWCNT の平均長は 2.6~4.2  $\mu\text{m}$ 、実際に肺内に存在した MWCNT の平均長は 2.6~3.1  $\mu\text{m}$  であった。平均長に大きな差は認

めなかったことから、投与された MWCNT は形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留したと考えられ、その平均長は 2.6  $\mu\text{m}$  以上である。

我々の先行研究で、ラットの初代培養肺マクロファージを作成し MWCNT をばく露しマイクロアレイ解析により 25,000 遺伝子の中で発現量の高かった 2 つのサイトカイン (Csf3, IL6) および 2 つのケモカイン (Cxcl2, Ccl4) に本研究では着目した。Csf3、Cxcl2、Ccl4 のタンパク発現は MWCNT 投与後 1 年経過まで炎症の存在とよくリンクしていた (我々の先行研究)。本研究を始めた時点では、25  $\mu\text{m}$  メッシュで分画化した MWCNT の平均長に依存して炎症の程度とサイトカイン/ケモカイン発現への影響が異なると予測していた。しかし、炎症の程度 (我々の先行研究) およびサイトカイン/ケモカイン発現 (本研究) について分画間で一定の差はみられなかった。よって、今回の実験で試験した平均長 2.6~4.2  $\mu\text{m}$  の MWCNT の肺内投与では炎症とサイトカイン/ケモカイン発現に対してサイズに依存した影響は少ないと考えられる。

MWCNT 投与 2 週間経過後では VEH 群よりも高い値を示していた mRNA は Csf3 および Ccl4、タンパク発現では Csf3、Cxcl2 および Ccl4 であった。1 年経過後も mRNA あるいはタンパクが持続的に発現しているものは Csf3、Cxcl2 および Ccl4 であり、これらは炎症や肉芽腫の惹起に関連していると考えられる。これら 3 種類のサイトカイン/ケモカインは好中球の役割に関わるものである。好中球は異物を認識し、異物除去を行う。本研究では、ラット肺胞マクロファージが MWCNT を貪食し、マクロファージにより放出された Csf3 が好中球の増殖動員および機能強化を行いケモカイン Cxcl2 および Ccl4 により好中球および単球が遊走しマクロファージさらに動員するという循環が生じると考えられる。肺組織での持続的な炎症像とサイトカイン/ケモカイン発現プロファイルはこの循環状態を反映している。MWCNT 投与 1 年経過後の時点

では腫瘍は発生せず、平均して90～100週経過後に腫瘍が発生するので52～90週目までの期間にCsf3、Cxcl2 および Ccl4 は発がんプロモーション効果を発揮する可能性がある。

まとめると、少なくとも本実験システムにおいてMWCNTの肺内投与は炎症と腫瘍(中皮腫、原発性肺がん)を誘発する。炎症は1年経過後も持続してみられCsf3、Cxcl2 および Ccl4 のタンパク発現状況と炎症像はリンクしていると考えられる。これらの3つのサイトカイン/ケモカイン発現は腫瘍組織でも有意に高値を示している。よって65週以上の炎症とCsf3、Cxcl2 および Ccl4 の発現レベル増加は肺発がんに重要な役割を果たしている。

## E. 結論

投与された平均長2.6 μm以上のMWCNTは形態的に大きな影響を受けることなく肺内に長期間残留する。平均長2.6～4.2 μmのMWCNTの肺内投与では炎症とサイトカイン/ケモカイン発現に対してサイズに依存した影響は少ない。65週以上の炎症とCsf3、Cxcl2 および Ccl4 の発現レベル増加は肺発がんに重要な役割を果たしている。

## F. 健康危機情報

該当なし。

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzui M, Futakuchi M, Fukamachi K, Numano T, Abd Elgied M, Takahashi S, Ohnishi M, Omori T, Tsuruoka S, Hirose A, Kanno J, Sakamoto Y, Alexander DB, Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce development of pleural malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Sci*,

Epub, 2016.

2. Futakuchi M, Fukamachi K, Suzui M. Heterogeneity of tumor cells in the bone microenvironment: mechanisms and therapeutic targets for bone metastasis of prostate or breast cancer. *Adv Drug Deliv Rev*, Epub, 2015.
3. Tuboly E, Futakuchi M, Varga G, Erces D, Tokes T, Meszaros A, Kaszaki J, Suzui M, Imai M, Okada A, Okada N, Boros M, Okada H. C5a inhibitor protects ischemia/reperfusion injury in rat small intestine. *Microbiol Immunol*, Epub, 2015.
4. 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.
5. 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, Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Sci*, 106: 825-832, 2015.

## 2. 学会発表

1. 松本晴年、木村和哲、酒々井眞澄. 沖縄県産植物芭蕉(バショウ)抽出物のがん細胞増殖抑制効果. 日本薬学会第 136 年会; 横浜: 2016 年 3 月 29 日
2. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. **Anticancer mechanism of action of palmitoyl piperidinopiperidine.** 平成 27 年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016 年 2 月 3 日
3. 加賀志稀、安藤さえこ、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. **Relationship between pulmonary lesions induced by intrapulmonary instillation of multiwall carbon nanotubes and expression status of specific cytokines.** 平成 27 年度「個体レベルでの癌研究支援活動」ワークショップ; 大津: 2016 年 2 月 3 日
4. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の肺障害性と遺伝子発現への影響. 第 32 回日本毒性病理学会総会及び学術集会; 高松: 2016 年 1 月 28 日
5. 松本晴年、木村和哲、酒々井眞澄. **Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells.** 日本病院薬剤師会東海ブロック日本薬学会東海支部合同学術大会 2015; 名古屋: 2015 年 11 月 1 日
6. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、礒田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. 新規物質パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性の検証. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 9 日
7. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. ラット膵がんの治療効果判定に有用な血清マーカー. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
8. 酒々井眞澄、安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、深町勝巳、二口充. 新規大腸がん治療薬パルミトイルピペリジン誘導体の開発. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
9. 二口充、深町勝巳、酒々井眞澄. 骨微小環境におけるがん幹細胞の悪性形質発現のメカニズム. 第 74 回日本癌学会学術総会; 名古屋: 2015 年 10 月 8 日
10. 加賀志稀、安藤さえこ、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブによる肺障害性および特異的サイトカイン発現への影響. 平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015 年 9 月 3 日
11. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. パルミトイルピペリジノピペリジンの抗がん活性. 平成 27 年度がん若手研究者ワークショップ; 蓼科: 2015 年 9 月 3 日
12. Sacko Ando, Shiki Kaga, Katsumi Fukamachi,

- Mitsuru Futakuchi, Masumi Suzui. Anticancer activity of palmitoyl piperidinopiperidine. 第30回発癌病理研究会; 小豆島: 2015年8月28日
13. 加賀志稀、安藤さえこ、松本晴年、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Effecton profiles of specific cytokines and pulmonary injury induced by instillation of multiwall carbon nanotube. 第61回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015年7月4日
  14. 安藤さえこ、加賀志稀、松本晴年、佐藤圭吾、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井眞澄. Anticancer activity of a novel compound palmitoyl piperidinopiperidine. 第61回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015年7月4日
  15. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井眞澄. Growth inhibition of the crude extracts of *Musa basjoo* in human colon cancer cells. 第61回日本薬学会東海支部総会・大会 2015; 名古屋: 2015年7月4日
  16. 加賀志稀、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井眞澄. 多層カーボンナノチューブの肺障害性と遺伝子発現への影響. 第42回日本毒性学会学術年会; 金沢: 2015年6月29日
  17. Shiki Kaga, Saeko Ando, Katsumi Fukamachi, Mitsuru Futakuchi, Hiroyuki Tsuda, Masumi Suzui. Effects of multiwall carbon nanotube on the pulmonary injury and expression status of specific cytokines. The 7<sup>th</sup> International Congress of Asis society of Toxicology; Jeju Island, Korea: Jun, 25<sup>th</sup>, 2015.
  18. 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. 新規抗がん物質の個体レベルにおける効果の検証. がん予防学術大会 2015; 埼玉県さいたま市: 2015年6月5日
  19. 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
  20. 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
  21. 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
  22. 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
  23. 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

## H. 知的財産権の出願・登録状況

### 1. 特許取得

特許出願 2015-070424、抗がん剤、出願 2015 年 3 月 30 日、発明者:酒々井眞澄、飯沼宗和、出願人:公立大学法人名古屋市立大学、日油株式会社

### 2. 実用新案登録

該当なし。

### 3. その他

該当なし。

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 徐 結苟 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

Mohamed Ahmed Mahmoud Abd El-gied 名古屋市立大学大学院医学研究科院生

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

## 研究要旨

カーボンナノチューブ (CNT) 等個体ナノマテリアルは急速な研究開発が進められる一方、健康への影響、とくに呼吸器における中・長期毒性と発癌性評価は遅れている。このためには吸入暴露試験が必要であり、実施には高額な専用吸入施設と稼働コストが必要であるためである。さらにこれらの炭素粒子は生体内で代謝分解されず、細胞・組織に長く沈着するために、従来の化学物質の ADME の概念では障害・発がん作用の機序の評価はできない。本研究では、MWCNT の毒性、発がん性について、生体・細胞への沈着と Mφ の活性化に着目して、長期吸入暴露試験に代替可能な一連の試験系として、①ラット肺マクロファージ (Mφ) を用いた短期 *in vitro* 試験法、②吸入暴露に替わる全経過 2 週のラット肺内噴霧投与 (TIPS) による *in vivo* 毒性の観察と回復の解析法、②より派生した③ 2～8 週投与後に長期 (2 年) 観察する発がん性試験による①②③における病変発がん性との関連の検証試験について検討した。その結果、①および②法における中皮の増殖所見および②では凝集体が針状の MWCNT-L と綿菓子状凝集体の MWCNT-S の胸膜中皮に対する持続的障害作用・増殖刺激作用が示された。③において両者の 8 週投与後 2 年の観察実験が終了し、病理組織学的解析を実施中である。

## A. 研究目的

カーボンナノチューブ等の急速な研究開発が進む一方、その健康影響、とくに呼吸器における中・長期毒性および発癌性の評価は必須であり、それには吸入暴露が望まれている。しかし、吸入暴露試験の実施には高額な専用

吸入暴露施設が必要であるために実施は困難である。日本においてはバイオアッセイ研究センターのみで実施が可能であり、現状では世界でただ 1 種 MWCNT-7 (M-H 社) について実施されているのみである。従って、世界では次々に生産される多種のナノカーボンはリス

ク評価がなされないまま市場に導入されつつある。他方、試験管内試験や短期の試験で得られるデータは極めて限定的である。そこで、吸入暴露に代替できる信頼性の高いリスク評価法の開発が不可欠である。本研究では、サイズと形状の異なるMWCNT種を対象に、マクロファージ(M $\phi$ )を介した傷害作用を評価する*in vitro* 短期試験法、ラットを用いた経気管肺内噴霧投与(TIPS)法を用いて、中期・長期2種の*in vivo* 試験系を開発し、実際のリスク評価に資する機序に基づく信頼性の高い評価法の開発を目指した。

## B. 研究方法

### ① 肺胞M $\phi$ の*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) 10週齢の雌F344ラットにチオグリコレートをTIPS投与して肺胞内にM $\phi$ を誘導した後に肺を取り出し、メッシュ濾過にてM $\phi$ を採取(現状で採取細胞の95%)する。一定量のM $\phi$ (10<sup>6</sup>個)をRPMI 1640(10%FBS)培地に移し、0.1% Tween含有生理食塩水に懸濁した各種のMWCNT(500 $\mu$ g/ml)を培地に加えて24時間培養した。この上清を採取して、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2(中皮腫細胞上皮型/肉腫型)、CCD34(肺線維芽細胞)、A549(肺癌)、SNU-475(肝癌)、Caki-1(腎癌)、A2780(卵巣癌)、MCF-7/T47D(乳癌)等の培地に加えて12時間培養し、これらの細胞に対する増殖活性を観察した。またCNTを貪食した培養M $\phi$ が分泌する主として炎症性サイトカインと増殖因子等について肺組織の免疫染色、ELISAおよび蛋白アレイ解析を実施した。

### ② 回復試験における炎症・増殖性病変の解析

1) 被検物質のMWCNT-L(A社)(直径=150nm、針状凝集体)、MWCNT-7(直径=70-130nm針状凝集体)、Crocitolite(UICC gradeアスベスト、直径=0.01-1.5 $\mu$ m、針状凝集体)を250および500 $\mu$ g/mlを、肺毒性は僅少でMWCNTの分散性能の高いことを確認している生食中に

0.5%pluronic 68コポリマー分散剤(PF68)に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与(合計1mg/ラット)を行い、投与終了後1日と、12週に屠殺して病変発生(2週目)とその回復の程度(14週目)を検討した(津田、酒々井)。

### ③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡便検索法

MWCNT-N(N社)(針状凝集体、長さ3.5 $\mu$ m、直径30nm)を250および500 $\mu$ g/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)、投与終了後無処置で2年間観察し、発がん性について検討した。またMWCNT-Lについて8週投与後2年観察する試験結果は解析中である。

(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、各班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

### ① 肺胞M $\phi$ の*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析

1) ラットのチオグリコレート誘導M $\phi$ にMWCNT-7、MWCNT-N及びCrocitoliteを貪食させて得られた培養上清は、ヒト由来のMet5A(中皮細胞)、MESO-1/2(中皮腫細胞上皮型/肉腫型)とA549(肺癌)に対して増殖活性(対照の1.5~2倍)を示したが、CCD34(肺線維芽細胞)、SNU-475(肝癌)、Caki-1(腎癌)、A2780(卵巣癌)、MCF-7/T47D(乳癌)細胞に対する増殖活性は無かった。またCNTを貪食した培



養Mφの分泌する炎症性サイトカイン、増殖因子等について遺伝子・蛋白発現のアレイ解析を行い、関与する責任サイトカイン遺伝子/蛋白の同定では、IL2、IL18、CCL2、CCL3、GRP/KC等が増加していた(対照の2~5倍)(津田・酒々井)。

## ② 短期投与試験および短期投与-回復試験による炎症・増殖性病変の解析

1) MWCNT-L, MWCNT-7 (WHO/IARC Group 2B) および 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変化の程度とそれらの回復 (Reversibility) の状態について、投与終了1日と12週後における回復の程度について検討した。a) 臓側(肺側)と壁側(胸腔側)胸膜の線維性肥厚は、いずれの検体群でもPF68群より投与群に有意に増加した ( $P < 0.001$ )。検体群間では壁側胸膜肥厚は12週においてMWCNT-7群が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12週とも溶媒群の約4~6倍に増加し ( $P < 0.001$ )、それらの値は12週まで減少なく維持された。c) 胸腔洗浄液中の炎症浸出細胞数(Mφ、好中球、リンパ球等の合計)はすべての検体で12週において1週の70~60%に減少したが、MWCNT-7では他の約1.5~2倍の高値(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、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 IL-18が検体間ではMWCNT-7がより高値でしかも持続した。肺の組織変化ではいずれの検体も12週では異物肉芽中に被包化されて観察された。1日群では一部で特に

crocidoliteで肺胞上皮の過形成増殖を見たが、12週では全く消退していた(津田)。

2) MWCNT-Lを24週間に1.625 mg/ラットに投与した実験では、肺胞の肉芽形成とMφを主とする炎症細胞浸潤はMWCNT-Sにより著名であった。臓側(肺側)胸膜ではPCNAラベルでみる中皮の増殖像はMWCNT-7と同程度であった(津田)。

## ③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡易検索法

MWCNT-Nを250および500  $\mu$ g/mlを0.5%PF68分散剤に懸濁して0.5mlを2週間に8回TIPS投与を行い(計1mg/ラット)、投与終了後無処置で2年間観察した実験では、心嚢、胸膜の悪性中皮腫(6/41, 14.6%)と肺胞上皮腺腫(14/41, 34.4%)と腺がん(3例)(計12/41匹)、両者合計で20/41, 48.8%(すべて有意差)に発生した。発がんまでの平均経過は94週と極めて長期間を要する事が分かった。なお、肺組織中のMWCNT-Nは、篩板通過分画では $2.6 \pm 0.8 \mu$ m、残存分画では $3.1 \pm 0.9 \mu$ m以上であった。悪性中皮腫の発生は65週以後であり、発がんには長期を要することがわかった(酒々井、津田)。さらに、MWCNT-Lについての同様の試験は現在病理標本作中で、発がん性については組織票本を解析中である。

## D. 考察

① における肺胞Mφの*in vitro*における炎症・細胞増殖作用と機序の解析において、MWCNTをMφに貪食させて得られた培養液中には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖活性を示す因子が存在することが示され、かつ他の臓器由来の細胞にはその作用がないことになる。すなわち発がん性があれば標的細胞は肺と中皮ということ示唆する。さらにその因子にはIL2、

IL18、CCL2、CCL3等のサイトカイン群が関与することが明らかとなった。今後これらの暴露、障害マーカーとしての有用性について検討する予定である。

② TIPS 法による短期投与（2～4週）による炎症・増殖性病変の *in vivo*-回復状態の解析では、胸膜の肥厚、中皮の増殖は投与中止後でも半年近くでも持続することが明らかとなった。これはMWCNTのような固形物質は体内で代謝分解されることなく沈着局所において炎症反応を惹起して慢性的な組織・細胞損傷が長期間持続することによる。また、胸腔洗浄液の炎症細胞とサイトカインにも同様に持続した。これらのことは慢性毒性・発がん性併合試験を実施する場合に、従来の化学物質の評価のような長期投与は不必要で短期間投与のみでも結果が得られることを示し、今回報告するMWCNT-Nの発がん性結果と一致すると考える。また胸腔洗浄液の細胞とサイトカインに組成およびMWCNTの肺からの移動の評価等における有用性が明らかとなり、実際の短期代替評価法において極めて有用な成果である。

一方、MWCNTには様々なサイズ、形態があってそれらは製造会社によって様々である。MWCNT-L（針状の凝集体）について、4週間または24週間投与して、比較検討したところ、MWCNT-Nと同様形態のMWCNT-Lは胸膜に対してよく似た障害性を示すことがわかった。さらに、この実験における回復観察では、肺と胸膜中皮の障害作用は投与中止後も長く持続することは、発がん性を考慮する上で重要である。MWCNT-Lの短期投与（8週）後2年間無処置観察結果について解析中である（津田）。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の簡便検索法においては、TIPS法による短期投与後に2年間観察するモデルにて

MWCNT-Nの肺と胸膜中皮における発がん性が明らかとなった。このことはこのモデルでは検体の短期間の投与後放置観察することで発がん評価が可能であることが示されたことになる。この方法について多種のMWCNTについての試験を行い、モデルのvalidationを行うことが必要である。その際に、今回の実験では発がんは64週以後に見られ、担がん動物の平均発生週は64週であり、さらに最終発生頻度がかかなり高い（48%）にも関わらず95週であることは、今後試験法の短縮を試みる上で注意すべき知見と考える。（酒々井、津田）。

## E. 結論

1) *in vitro* において、肺胞MφにMWCNTを貪食させると、その培養上清には肺がん細胞と悪性中皮腫細胞に対する増殖因子が含まれる。同様な細胞増殖作用は、MWCNTを投与したラットの胸膜洗浄液でも観察された。この*in vitro* 試験系はMWCNTによる細胞増殖因子の産生の短期検索法として有用となる。

2) MWCNTの組織・細胞障害、増殖関連因子として主としてMφを介するCCL3、IL-2、IP10、IL-18、VEGF等の関与が示唆される。

3) ラットを用いた短期回復試験、中期投与試験、および短期投与・長期観察試験の結果より、TIPS法は全身暴露法に代替でき得る。この方法における胸腔洗浄液の解析は胸腔内炎症の解析に有用な手段である。またMWCNTは肺胞以外に気管支上皮の線毛運動に対して強い阻害作用を示し、顕著な粘膜上皮の損傷を起こす。

4) MWCNTのサイズと形状（直径、針状、綿状）の差異は肺と胸膜中皮に対する炎症と障害作用において異なる可能性がある。

## ・研究発表

### 1. 論文発表

1. Suzui M, Futakuchi M., Fukamachi K., Numano T., Mohamed Abd Elgied, Takahashi S., Ohnishi M., Omori, T., Tsuruoka S., Hirose A., Kanno J., Sakamoto Y., Alexander D.B., Alexander W.T., Xu J, Tsuda H. Multiwalled carbon nanotubes intratracheally instilled into the rat lung induce malignant mesothelioma and lung tumors. *Cancer Science*, 2016 (in press)
2. Xu J., Alexander D.B., 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., Nakae D., Hirose A., Kanno J., and Tsuda H. Chemokine (C-C motif) ligand 3 detection in the serum of persons exposed to asbestos: A patient-based study. *Cancer Science.*, 106(7): 825-832, 2015.
3. Xu J, Alexander D.B., 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 Science*, 105 (7): 763-769, 2014.

### 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 (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
2. 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.

3. 松本晴年、深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄 (2016) 多層カーボンナノチューブ (MWCNT) の肺障害性と遺伝子発現への影響;第32回日本毒性病理学会総会 高松 1月28日-29日

#### 国際学会

1. 津田洋幸 (2015) Mechanisms of nanotoxicology: The 7<sup>th</sup> International Congress of Asian Society of Toxicology 韓国 (済州) 6月23-26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