

201424004B

厚生労働科学研究費補助金研究報告書

化学物質リスク研究事業

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

平成25年度～27年度

総合研究報告書

研究代表者 津田 洋幸
名古屋市立大学

平成28年(2016年)5月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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
(H25-化学-一般-004)

平成 25 年度～27 年度 総合研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 28 年 (2016 年) 5 月

目 次

| | |
|--|----|
| I. 総合研究報告書 | 1 |
| 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 津田 洋幸、内野 正、三好 規之、今泉 祐治、酒々井 眞澄 | 2 |
| II. 研究成果の刊行に関する一覧表 | 21 |
| III. 研究成果の刊行物・別刷 | 27 |

平成25年度～27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)

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

I. 総合研究報告書

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）

総合研究報告書

研究課題：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

研究代表者：津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授研究室 特任教授

研究分担者：内野 正 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 主任研究官

研究分担者：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

研究分担者：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

研究分担者：酒々井 眞澄 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座分子毒性学分野
教授

研究協力者：神野 透人 名城大学薬学部 教授

研究協力者：五十嵐 良明 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 部長

研究協力者：秋山 卓美 国立医薬品食品衛生研究所生活衛生化学部 室長

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

研究協力者：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

研究協力者：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

研究協力者：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

研究協力者：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

研究協力者：吉本 恵理 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

研究協力者：徐 結 苟 名古屋市立大学大学特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学大学特任教授

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

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

研究協力者：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) は商品として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。理由は、要求される吸入暴露試験の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に検体数が著しく制限されることにある。従来の化学物質の ADME の概念が当てはまるとは限らないことによる。本研究では、MWCNT の毒性、発がん性について、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点に注目して、肺内吸入による肺胞内沈着と肺胞 Mφ による貪食とその活性化に着目し、*in vitro* と *in vivo* の一連の試験系からなる、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ラットへの吸入暴露に替わる肺内噴霧投与 (TIPS) による全経過 2 週 of *in vivo* 毒性試験法、②より派生した③ 2～8 週投与終了後に長期 (2 年まで) 飼育観察する慢性毒性/発がん性試験法を開発して、呼吸器毒性および発がん性と関連する増殖病変について検討した。その結果、アスベストと検索した 3 種の MWCNT に共通して①における胸膜中皮細胞と肺がん細胞に対する増殖刺激作用、②法において、針状の MWCNT-7 (三井社)、MWCNT-N (日機装) および MWCNT-L (A 社) と、綿菓子状凝集体の MWCNT-S (A 社) は胸膜中皮に対する持続的障害・増殖刺激作用を持つことが示された。また MWCNT は気管支上皮表面の線毛へ付着して異物移送障害と上皮の剥離等の障害をおこすことが分かった。また、MWCNT による肺と胸膜中皮の障害作用と観察され、肺組織における脂質由来のアルデヒド類を含む DNA 障害性の活性カルボニル化合物 (RCs) の産生を検出した。さらに③において MWCNT-N の 2 週投与後 2 年の観察実験における肺と胸膜中皮における発がん性を予測通り見出し、この検索システムの妥当性が証明された。この結果は、MWCNT の経気管肺内投与による発がん性を証明した世界で最初の報告である (Cancer Science, 2016, in press)。他社の MWCNT を同様投与後に 2 年観察した実験は終了し、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が求められているが、それには吸入暴露が必須と考えられている。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と稼働コストが要求されるために実施は遅々とし、開発された MWCNT の市場導入には全く追いついていない。日本において吸入暴露試験は事実上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 (三井社) について実施され、ようやく発がん性を認めた報告書が提出された。国内では年間 100 トンの生産量があり、多種多様なナノカーボンはリスク評価を経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種々の知見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各社の MWCNT を対象に、マクロファージ (M ϕ) 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、主として呼吸器にける有害作用リスクを明らかにする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 ϕ 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 ϕ を誘導した後に肺を取り出し、メッシュ濾過にて M ϕ を採取 (現状で採取細胞の 95%) する。一定量の M ϕ (10^6 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 ($500 \mu\text{g/ml}$) 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 ϕ 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) ナノマテリアルの M ϕ における影響をより直接的に観察するために、マクロファージ様に分化させた THP-1 細胞に対する白金ナノコロイド PtNP-1 (平均一次粒子径 2 nm, 水懸濁液, 白金濃度 2%, 表面保護剤ポリアクリル酸, 田中貴金属製) 及び水系白金ナノ分散液 PtNP-2 (平均一次粒子径 100 nm 未満, エタノール・水 (1:1) 懸濁液, 白金濃度 1%, 保護剤なし, 四国計測工業製) の影響を比較検討した。ヒト急性単球性白血病由来 THP-1 細胞を 96-well plate に 10^5 cells/well ずつ播種し、

Phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) 200 nMで20時間処理した後に、終濃度として200 µg/mLから公比2で6段階希釈した試料溶液を加えた。24時間培養後に培地を交換し、各wellにWST-8 (Cell Counting Kit-8) 10 µLを添加してCO₂インキュベーター内で1時間静置した。マイクロプレートリーダーを用いて450 nmにおける吸光度を測定し、コントロールに対する吸光度の比から細胞生存率 (%) を算出した。細胞内の活性酸素種をTotal ROS/Superoxide Detection Kitを用いて測定した。細胞内グルタチオン濃度をGSH-Glo™ Glutathione Assay を用いて定量した (五十嵐-内野)。

② 検体の MWCNT を TIPS 法にてラットにおいて 2 週間に 1mg/ラットにて投与後 12 週で屠殺、および 24 週まで 1 回/2 週で 13 回投与 (1.625mg/ラット) した実験系にて、発生した病変の回復性、持続性を観察し、2 年試験の基礎資料とした。

1) 被検物質の、MWCNT-7 (直径=70-130nm 針状凝集体)、MWCNT-L (A 社) (直径=150 nm、針状凝集体) および Crocidolite (UICC grade アスベスト、直径=0.01-1.5 µm、針状凝集体) を 250 および 500 µg/ml を、肺毒性は僅少で MWCNT の分散性能の高い 0.5% pluronic 68 コポリマー分散剤添加生食 (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

を検討した (津田)

2) 炎症に起因する ROS の発生を容易に核酸やタンパク質と反応して付加体を形成するアルデヒドやケトンなどの活性カルボニル化合物 (RCs) に着目し、MWCNT 投与ラット肺組織中 RCs および DNA 付加体の網羅的解析を行った。方法は直径の異なる 2 種の MWCNT (MWCNT-L、MWCNT-S) TIPS 投与された肺組織をホモジナイズ後、RCs 画分を抽出した。次に RCs 画分を RCs と特異的に反応する dansyl hydrazine (DH) で誘導体化し、DH 誘導体に特徴的なフラグメントイオン (m/z 236.1) を利用した LC/ESI-MS/MS (SRM) により、ラット肺組織中 RCs の網羅的解析を行った。さらに、DNA 付加体の網羅的解析は、肺より抽出した DNA を酵素的加水分解後、ヌクレオシドに特徴的なフラグメントイオン (m/z 116) を利用した LC/ESI-MS/MS (SRM) により、ラット肺組織中 RCs-DNA 付加体の網羅的解析を行った。(三好)。

③ MWCNT の短期投与・長期観察による発がん性の検索

1) 検体投与後 2 年観察 : MWCNT-N (長さ 1 ~ 20 µm、直径 3.5nm、日機装) について直径 35 ミクロンの孔版篩 (ふるい) によって長さが 2.6 µm 以下とそれ以上の分画に分けて、PF68 中に 125 µg/0.5ml を 2 週間に 8 回 (合計 1.0mg/ラット) 肺内 TIPS 投与後、2 年間の長期観察による発がんの有無を確認し、本提案①②③のプロトコルより得た胸腔中膜上皮の過形成による悪性中皮腫の発生予測の妥当性を検証した。

2) この実験の経過中に、分画化したMWCNT-Nの投与後2週間と2年経過後での肺組織内での平均長、肺内沈着量、肺組織および腫瘍組織でのサイトカイン/ケモカイン(IL6, Csf3, Cxcl2, Ccl4)発現レベルを詳細に解析した(津田、酒々井)。

2) MWCNT-L(A社)(直径=150 nm)とMWCNT-S(A社)(直径=15 nm)を8週間に1mg/ラットTIPS投与して全経過108週まで観察した(津田)。

(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Mφ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MφにMWCNT-7、MWCNT-N及び

Crocidolite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)、MES0-1/2(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、他のがん細胞に対する増殖活性は無か

った。またMWCNTを貪食した培養Mφの分泌する炎症性サイトカインでは、IL2、IL18、CCL2、CCL3、GRP/KC等が増加していた(対照の2~5倍)(酒々井)。

2) PtNP-1はTHP-1細胞の生存率の低下を起さなかったが、PtNP-2は顕著な細胞生存率の低下が観察され、LC50値は約30 µg/mLであった。細胞内活性酸素種の産生では、細胞生存率の有意な低下が認められる濃度のPtNP-2(5 µg/mLおよび200 µg/mL)をPMA処理THP-1細胞に曝露し、10分後及び30分後にTotal ROS並びにSuperoxideの産生量は、PtNP-2曝露10分後において顕著なTotal ROSレベルの上昇が認められ、曝露濃度25 µg/mL時ではコントロール群の約5倍、200 µg/mLではコントロール群の約50倍まで増加し、曝露30分後においても同レベルの上昇が観察された。Superoxide産生量については、PtNP-2曝露10分後に200 µg/mL曝露群でコントロール群の約2倍の上昇が認められ、処理30分後においても同レベルであった(五十嵐-内野)。

② 2週投与試験

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)。

2) 各種サイトカインの 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った。Csf3、Cxcl2、Ccl4 のタンパク発現は 1 年経過後まで炎症の存在とよくリンクしていた分画後の平均長 (mm, mean \pm SD) は FT: 2.6 ± 2.9 、P: 4.2 ± 1.6 、R: > 2.6 、肺組織中の平均長は FT: 2.6 ± 0.8 、P: 2.7 ± 1.0 、R: 3.1 ± 0.9 であった。MWCNT-N 投与 2 週間での肺内沈着量 (mg/g lung tissue) は FT 分画で 603 ± 238 、P 分画では 605 ± 119 、R 分画では 701 ± 165 (mean \pm SE)、2 年経過での肺内沈着量は FT 分画で 426 ± 176 、P 分画では 486 ± 44 、R 分画では 268 ± 43 であり、2 週時との比較では FT 分画で 71%、P 分画で 80%、R 分画で 38% であり 2 年経過後でもかなり大量に残存していることが示された (酒々井)。

3) DNA 付加体の網羅的解析では、対照群で 611、MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットでそれぞれ 693、676 個のピークが検出され、そのうち MWCNT-L、MWCNT-S 投与ラットでは 27、26 個ピークが対照群より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 M₁-dG が MWCNT-L、MWCNT-S 曝露ラット共に対照群と比較

して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。RCs網羅的解析の結果、既知、未知を含めてvehicle群、MWCNT-L群、MWCNT-S群のDH誘導体由来のピーク数としてそれぞれ、175、169、149のピークが確認された。また、MWCNT-L群、MWCNT-S群ではvehicle群と比較してそれぞれ115、82のピークが増加し、そのうち、acrolein、glyoxal、crotonaldehydeや4-hydroxy-2-hexenal (HHE)など脂質過酸化由来のアルデヒド化合物が有意に増加していることを確認した。

2) 気管における0.1 μ m蛍光ビーズクリアランスはMWCNT-L群とMWCNT-S群でPF68群より増加し、MWCNT-L群でMWCNT-S群よりも有意に減少した。肺では0.1 μ m、0.5 μ m、3.0 μ mの蛍光ビーズで蛍光量が両投与群でPF68群と比較して減少した。(今泉)。

③ MWCNTの短期投与・長期観察による発がん性の検索

1) MWCNT-Nでは109週で終了して腫瘍

の発生数・頻度を集計した。各分画を併せた発生頻度は、対照群では胸膜中皮と肺の腫瘍の発生頻度は0であったのに対し、心嚢、胸膜の悪性中皮腫(6/38, 15.8%)と肺胞上皮腺腫(4例)と腺がん(10例)の両者合計で14/41, 36.8%($P < 0.01$)であり、肺胞上皮と胸膜中皮に発がん性が有ることがわかった。これらの発生頻度の分画による差異はなかった。また発がんには65週以上の長期を要することがわかった(Cancer Science, 2016, in press)(酒々井、津田)。

2) MWCNT-L(A社)(直径=150 nm)とMWCNT-S(A社)(直径=15 nm)を8週間に1mg/ラットTIPS投与して全経過108週まで観察した試験は現在標本作成中である(津田)。

D. 考察

① における肺胞M ϕ 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M ϕ 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を示唆する。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、形態があつ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。

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って酸化ストレ

スが亢進することが分かってきた。本研究結果においても酸化ストレス下で増加する脂質過酸化由来RCsである **acrolein** や **glyoxal**、**4-HHE** などが有意に増加することがわかった。また、各種RCsのDNA付加体の生成を確認し、その中で**4-HHE**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。（三好）

TIPS法による投与で、MWCNT-Lには気管支上皮に対する強い障害作用があり、多くの粘膜面で糜爛または潰瘍を形成し、その修復は遅延した。この理由はMWCNT-L自体の線毛運動による排出機能が障害されることによると考えられた。障害機序については今後の課題である（今泉）。

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。これは、経気管的に肺内に投与したMWCNTの肺と胸膜中皮における発がん性を明らかにした世界で最初の論文である（Cancer Science, 2016, in press）。この噴霧投与（TIPS）法は今後検証を重ねて発がん性の整合性が検証されれば全身暴露吸入試験の代替法として使用できる可能性がある。今後のvalidationが待たれる。この試験系では発がんに要した期間は65週、平均発

がん期間は95週であることは、今後試験法の短縮を試して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。また65週以上の炎症とCsf3、Cxc12およびCcl4の発現レベル増加は肺がん重要な役割を果たしている可能性がある。

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) MWCNTs曝露群で対照群と比較して脂質過酸化由来のRCsおよびRCs-DNA付加体が有意に増加していた。RCsは強い細胞傷害性を有することから、MWCNT曝

露によって生成されたRCsが炎症さらには発がんに至る要因と考えられる。

F. 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. 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* ¹⁸F-fluorodeoxyglucose-positron emission tomography/computed tomography imaging of pancreatic tumors in a transgenic rat model carrying the human *Kras*^{G12V} oncogene.

- Oncol Lett, 9: 2112-2118, 2015.
5. 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)
 6. 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.
 7. 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.
 8. 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.
 9. Ohba T., J 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. (Vol.39, No.3, 499-505, 2014, The Journal of Toxicological Sciences)
 10. 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.
 11. 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.
 12. 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.
13. 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.
 14. 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.
 15. 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.
 16. 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 JJ, 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.
 17. Ohba T, Sawada E, Suzuki Y, Yamamura, H, Ohya S & Imaizumi Y. *J Pharmacol Exp Ther* 347:145–153, 2013. Enhancement of Ca²⁺ Influx and Ciliary Beating by Membrane Hyperpolarization due to

- ATP-Sensitive K⁺ Channel Opening in Mouse Airway Epithelial Cells.
18. Suzui M, Morioka T, Yoshimi N. Colon preneoplastic lesions in animal models. *J Toxicol Pathol*, 26: 335-341, 2013.
 19. Sakai Y, Fukamachi K, Futakuchi M, Hayashi H, Suzui M. Promotive effects of cell proliferation and chromosomal instability induced tribbles-related protein 3 in mouse mammary tumor cells. *Oncol Rep*, 30: 64-70, 2013.
 20. Fukamachi K, Tanaka H, Sakai Y, Alexander DB, Futakuchi M, Tsuda H, Suzui M. A novel reporter rat strain that express LacZ upon Cre-mediated recombination. *Genesis*, 51: 268-274, 2013.
 21. Yabushita S, Fukamachi K, Tanaka H, Fukuda T, Sumida K, Deguchi Y, Mikata K, Nishioka K, Kawamura S, Uwagawa S, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Metabolomic and transcriptomic profiling of human K-ras oncogene transgenic rats with pancreatic ductal adenocarcinomas. *Carcinogenesis*, 34: 1251-1259, 2013.
 22. Yabushita S, Fukamachi K, Kikuchi F, Ozaki M, Miyata K, Sukata T, Deguchi Y, Tanaka H, Kakehashi A, Kawamura S, Uwagawa S, Wanibuchi H, Suzui M, Alexander DB, Tsuda H. Twenty-one proteins up-regulated in human H-ras oncogene transgenic rat pancreas cancers are up-regulated in human pancreas cancer. *Pancreas*, 42: 1034-1039, 2013.
 23. Masuda M, Toh S, Wakasaki T, Suzui M, Joe AK. Somatic evolution of head and neck cancer-biological robustness and latent vulnerability. *Mol Oncol*, 7: 14-28, 2013.
- ## 2. 学会発表
- ### 国内学会
1. 内野 正, 神野透人, 香川聡子, 秋山卓美, 五十嵐良明: 化粧品原料として用いられる白金ナノマテリアル粒子の分散状態とその細胞毒性等への寄与. 第 52 回全国衛生化学技術協議会年会 (2015.12)
 2. 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
 3. 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
4. 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
 5. 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
 6. 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
 7. 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
 8. 安藤さえこ、加賀志稀、佐藤圭吾、磯田泰彰、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
 9. 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
 10. 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
 11. 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
 12. 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
13. 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
14. Saeko 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
15. 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. Effectation 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
16. 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
17. 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
18. 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
19. 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
20. 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 (*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
21. 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
22. 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

- 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
23. 酒々井真澄、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
24. 深町勝巳、二口充、津田洋幸、酒々井真澄. 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
25. 山田茜, 大羽輝弥, 鈴木良明, 山村寿男, 今泉祐治. マウス気道上皮繊維毛細胞における繊維毛運動制御に対する Cl⁻チャネル活性の寄与. 第89回日本薬理学会年会, 2016年3月9日(横浜).
26. 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
27. 津田洋幸、徐結荀、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.
28. 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
29. 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
30. 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、大羽輝弥、徐 結荀、鈴木 良明、山村 寿男、津田 洋幸、今泉 祐治 第88回日本薬理学会年会 名古屋
31. 松本晴年、磯田泰彰、木村和哲、酒々井真澄. 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
32. 安藤さえこ、佐藤圭悟、磯田泰彰、深町勝巳、二口充、酒々井真澄. 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
33. 加賀志稀、安藤さえこ、佐藤圭悟、深町勝巳、二口充、酒々井真澄. 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
34. 酒々井真澄、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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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
44. 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
45. 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