

平成28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:カーボンナノチューブ等の肺、胸腔及び全身臓器における有害性並びに発癌リスクの
新規高効率評価手法の開発

分担研究課題名:フラーレンナノウィスカーの肺・胸膜毒性および発がん性に関する研究

分担研究者 内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科実験病態病理学 講師

研究要旨

金属粒子、炭素線維などは生体内で分解されないため、肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発する。本研究では、フラーレン分子 (FL) およびフラーレンから成るナノサイズ物質、フラーレンウィスカー (FLW) による肺、胸膜中皮の細胞障害性、増殖活性および発がん性に対する酸化ストレスの役割についての解析を行う。本年度は、使用動物、被検物質である FL、FLW あるいは陽性対照であるカーボンナノチューブ(MWCNT-7、-N)の準備および2週間の経気管内噴霧 (TIPS) 投与を実施し、3週間目の途中剖検を行った。その結果、被検物質および陽性対照の気管内投与による体重の有意な変化は見られず、肺重量は FLW、MWCNT-7,N 投与群で有意に増加し、鉄を含まない FLW にも CNT と同様に炎症が発生している可能性が示唆された。

A. 研究目的

炭素線維は生体内で分解されないため、吸引されると肺、胸膜等に沈着して、異物炎症を誘発し発癌性を発揮する。フラーレンウィスカー (FLW) は、C⁶⁰ や C⁷⁰ などのフラーレン分子 (FL、60 あるいは 70 個の炭素原子からなる閉じたサッカーボール状分子) から成る単結晶ナノファイバーである。超伝導・強磁性素材として知られており、従来の超電導物質が金属やセラミックなど重量が大きく硬いのに対して、軽くしなやかなナノファイバー素材として開発が進んでいる。C⁶⁰ の世界規模の生産量は、2001 年の時点で 200 kg 程度であったが、2016 年には約 78 トンになると予測され、急速に増加しているものの、吸入による肺毒性や発がん性における情報がほとんどない。FLW の生体内動態は不明であるが、長さや形状からはカーボンナノチューブ (MWCNT) と同様に肺や胸膜に対する異物炎症の誘発や、発がん性を有する可能性が考えられる。本研究は、FLW 短期間経気道的

気管内投与によるラット肺・胸膜における細胞障害および発がん性に対する影響を明らかにすることを目的としている。また FLW は鉄を含有しないため、鉄を含有し発がん性がある MWCNT-7 (3,000 ppm) と MWCNT-N (300 ppm) の投与群も同時に設けることにより、ナノマテリアル発がんや酸化ストレスに対する鉄の役割についても明確化する。

B. 研究方法

本研究の被検物質である FW、FLW および陽性対照の MWCNT-7、MWCNT-N は、PF ポリマー分散液 (0.5% Pluronic F68 含有生理食塩水) に懸濁し、肺内噴霧ゾンデにより経気道的に投与する。12 週齢雄性 F344 ラットに、FW、FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N を、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ 31.25、62.5 µg/0.5ml/ラットの用量で 2 週間に 8 回 (合計投与量 0.25 および 0.5mg/ラット) 気管内投与する。対照群として、無処置および PF ポリマー液投与 (対照) 群を設ける。3 週間目 (投

与終了後1週間)と104週間目にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺(3週目は無処置群、対照群およびFL、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nの高用量群から各群5匹、104週目は各群20匹)して、肺・胸膜の急性と慢性病変について、肺・胸膜の病理組織学的変化、胸膜洗浄液・血清における炎症関連サイトカイン、細胞増殖関連遺伝子の発現を解析する。今年度は、実験計画の申請、審査後承認、動物および検体の準備を完了し、気管内投与および3週間目の剖検を実施した。3週間目では、肺、胸膜における早期毒性、増殖活性とタンパク・遺伝子発現レベルの関連を解析することにより、慢性毒性、発がん性の早期指標となりうる因子を検索する。また、肝、腎、副腎、脾、膵、精巣と脳を病理組織学的に解析し、投与物質の全身分布を観察する。

(倫理面への配慮)

動物実験については、平成18年4月28日環境省告示第88号「実験動物の飼養及び保管並びに苦痛の軽減に関する基準」に従った。本研究では、薬物投与を行い、その変化を検証するとともに、動物を安楽死させて組織を摘出し、標本作製に用いた。実験の範囲を研究目的に必要な最小限度として、動物の福祉に十分配慮した。今回行った動物実験は全て、名古屋市立大学内の医学研究科実験動物研究教育センターのコンベンショナルエリアで行い、当該施設の動物実験指針に基づいた、倫理審査および遺伝子組み換え実験の審査を受け、承認されたうえで実施しており(H28M-45)、当施設での動物実験規程を遵守し、生命の尊厳に十分配慮した方法で動物実験を行った。

C. 研究結果

気管内投与中および投与後において、無処置群と比較して、その他の処置群では摂餌量の減少および体重の減少傾向が軽微に観察されたが、有意な差は認めなかった。また対照群と比較して、被検物質および陽性対照群において摂餌量変化や体重増加に影響は見られなかった。

3週目の剖検時、体重および肝、腎、肝、腎、

脾、膵、脳の重量に群間差は認めなかった。肺重量は、無処置群(絶対重量 $0.96 \pm 0.04\text{g}$ 、相対重量 $0.32 \pm 0.01\text{g}$)と比較して、対照群(絶対重量 $1.34 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.47 \pm 0.01\text{g}$ 、 $P < 0.001$)、FL群(絶対重量 $1.40 \pm 0.08\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.50 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$)、FLW群(絶対重量 $1.50 \pm 0.09\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.54 \pm 0.04\text{g}$ 、 $P < 0.001$)、MWCNT-7群(絶対重量 $1.60 \pm 0.07\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.56 \pm 0.03\text{g}$ 、 $P < 0.001$)、MWCNT-N群(絶対重量 $1.64 \pm 0.04\text{g}$ 、 $P < 0.001$ 、相対重量 $0.59 \pm 0.01\text{g}$ 、 $P < 0.001$)で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、FL群では肺の絶対および相対重量に有意な変化はなかったが、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与により、有意に増加した(いずれも $P < 0.001$)。

D. 考察

気管内投与処置による摂餌量および体重の変化は認めなかったことから、処置操作自体による動物への侵襲はないと考えられた。3週間解剖時の肺重量は、気管内投与により有意に上昇していた。このことから、噴霧されたPluronic F68含有生理食塩水(総量4ml)はほとんど吸収されているものの、軽度の炎症反応あるいは肺水腫が発生している可能性が推察された。

MWCNTは黒色物質で、投与群において肺両葉にびまん性の黒色色素沈着を認めた。このことから、検体が肺全体に均一に投与できていることが確認された。また、FL、FLW、MWCNT-7およびMWCNT-Nにおいては、対照群と比較してさらに肺重量が増加し、後者3剤では有意差を認めた。MWCNT-Nについては、本研究と同様の短期間経気道的肺内投与による肺、胸膜における炎症の持続(Cancer Sci、105:763-769、2014)および長期観察による肺、胸膜発がん性(Cancer Sci、107:924-935、2016)を津田らが報告している。またMWCNT-7についても2年間吸入試験による肺発がん性が示されている(Part Fibre Toxicol、13:53、2016)。FLWはMWCNTと異なり、鉄を含有しないが、本研究ではMWCNTと同様に、FLWでは肺重量の増加を認めていることから、鉄の有無に関

ならず肺炎が誘発されている可能性が考えられ、長期観察による発がん性を有する可能性が考慮される。現在病理組織標本の作製中であり、今後は組織学的とともに、発現解析を進め、肺、胸膜の炎症、酸化ストレスや増殖活性について、明らかにしていく。

E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラレンおよびフラレンウィスカーの肺・胸膜毒性について検討した。短期(3週間目)の剖検が終了し、フラレンウィスカーは、陽性対照であるカーボンナノチューブと同様に、有意に肺重量の増加を誘発した。このことから、フラレンウィスカーは肺、胸膜毒性を有することが明らかとなり、長期観察による発がん性の可能性が示唆された。

F. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Suzuki S, Mori Y, Nagano A, Naiki-Ito A, Kato H, Nagayasu Y, Kobayashi M, Kuno T, Takahashi S. Pioglitazone, a Peroxisome Proliferator-Activated Receptor Agonist, Suppresses Rat Prostate Carcinogenesis. Int J Mol Sci. 17:pii: E2071, 2016

Kuno T, Nagano A, Mori Y, Kato H, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Suzuki S, Mori H, Takahashi S. Preventive effects of fermented brown rice and rice bran against prostate carcinogenesis in TRAP rats. Nutrients. 8:421, 2016.

Sato S, Katsushima K, Shinjo K, Hatanaka A, Ohka F, Suzuki S, Naiki-Ito A, Soga N, Takahashi S, Kondo Y. Histone deacetylase inhibition in prostate cancer triggers miR-320-mediated suppression of the androgen receptor. Cancer Res. 76:4192-4204, 2016

Naiki-Ito A, Kato H, Sato S, Suzuki S,

Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. Dysfunction of gap-junctional intercellular communication promotes hepatocarcinogenesis. 現代医学, 64:103-108, 2016

2. 学会発表

内木綾、加藤寛之、佐藤慎哉、鈴木周五、山下依子、久野壽也、高橋智. 去勢抵抗性前立腺癌に対する luteolin の治療効果、第 105 回日本病理学会総会、仙台(2016年5月)

Aya Naiki-Ito, Taku Naiki, Hiroyuki Kato, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Toshiya Kuno, Satoru Takahashi. Chemotherapeutic effect of luteolin on castration-resistant prostate cancer, 第 75 回日本癌学会学術総会、横浜(2016年10月)

内木綾、加藤寛之、久野壽也、高橋智. ラット前立腺発がんに対する angiotensin II receptor type 2 アゴニストの化学予防効果、第 33 回日本毒性病理学会、大阪(2017年1月)

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