

平成 2 9 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)

・ 総括研究報告書

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

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

研究要旨

カーボンナノチューブ (CNT) 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。このような繊維の有害作用/発がん性評価には長期吸入曝露試験が要求されているが、専用設備と高額な稼働費のために実施は困難である。我が国でラットにおいて、気管内投与法にて多層CNT (MWCNT) MWCNT-Nに肺と胸膜中皮に、吸入曝露試験にてMWCNT-7に肺に発がん性を報告した。世界でこれら2報のみである。本研究では、ラットを用いて短期気管内噴霧投与 (TIPS) 法を開発して長期吸入曝露試験に代替し得る低コスト、簡便なMWCNTの慢性毒性、発がん性の評価法の開発を目指した。本研究では、物性の異なる2種のMWCNTの発がん性と2層CNT (DWCNT) フラーレンウィスカー (FLW) について気管・肺・胸膜中皮への障害作用と発がん性の検出法について検討を加えた。検体の分散法とした一部の実験ではTaquann法による分散処理を行った。

①MWCNT-A (針状、直径 150nm、210-215 層) と MWCNT-B (綿菓子状、直径 15nm、15-18 層) では、①において肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種数では B の方がやや顕著であった。②の長期試験では肺胞上皮における腺腫と腺がんの合計発生が A、B の両投与群に、胸膜悪性中皮腫は B 群に 1 例見られ、合計の腫瘍発生頻度は B 群により高い有意差が認められた (論文投稿中)。さらに、MWCNT-B よりさらに細くて柔らかい 2 層壁の DWCNT (直径 2 nm) について①同様の解析を実施し、えられたデータでは肺組織、臓側胸膜、BALF、PLF の炎症関連あるいは発がん性と関連する諸因子の発現は、MWCNT-7 と比べて有意に軽度であった (解析中)。

②の 2 週 TIPS 投与-2 年無処置観察モデルは、2 年吸入曝露法に比べ圧倒的に低コストであり、MWCNT の有害・発がんリスク評価の加速化が可能となる。事実、発がん性において、MWCNT-7、MWCNT-N に新たに MWCNT-A と MWCNT-B 加えることになった。フルラーレンウィスカー (FLW) を①②において検証したところ、MWCNT-A と MWCNT-B は MWCNT-N および MWCNT-7 と類似した肺、胸膜毒性を有することが明らかとなり、発がん性を有する可能性が示された。

また発がん機序として、肺組織中で増加したラジカルはアルデヒド基やケトン基を持つことから、DNA に容易に付加反応するために、突然変異を誘導し、発がんにつながることを示唆されてきた。本研究ではさらに 4-HHE は IL-6 や iNOS、IL-12p40、*cis*-4-decenal は IL-12p40、IL-12p35、IL-23p19 の炎症関連遺伝子の発現を顕著に増加させたことから、発生したラジカルは直接的な DNA 傷害の他に、がん細胞が増殖しやすい環境作りにも関与している可能性が示唆された。

研究分担者

菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所
客員研究員
内木 綾 名古屋市立大学大学院医学研究科
実験病態病理学分野 講師

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

伴野 勸 静岡県立大学大学院食品栄養
環境科学研究院 食品環境研究セ
ンター 客員共同研究員

研究協力者

徐 結苟 名古屋市立大学特任教授・安徽省医

科大学免疫学教室教授

David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

沼野 琢旬 名古屋市立大学津田特任教授研究室
研究室 研究員

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

Mohamed Ahmed Mahmoud Abdelgied 名古屋市
立大学大学院医学研究科院生

Ahmed Maher Mahmoud Elgazzar 名古屋市立大学
大学院医学研究科研究員

大西 誠 日本バイオアッセイ研究センター
試験管理部分析技術専門
役

高橋 祐次 国立医薬品食品衛生研究所
安全性生物試験研究センター
毒性部 室長

神藤 秀基 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

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

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)のひとつであるMWCNT-7(H社製)は2年間吸入暴露試験によって肺発がん性を示すことが明らかにされたが、MWCNTは製造事業者によって形状・物性が異なるため、この結果を他の多くのMWCNTに適用できない。検討した範囲ではMWCNTは生体内で難分解性であり、投与されたMWCNTは肺・胸膜等に沈着して持続性異物炎症を誘発する。申請者らは、MWCNTの経気管肺内噴霧投与(TIPS)による安価な有害・発がん作用評価法(TIPS法)を開発し、それによって肺・胸腔の顕著な炎症と胸膜中皮増殖、活性化M()の分泌サイトカイン種の肺胞上皮と胸膜中皮増殖への関与(Cancer Sci, 2010)を見出した。これに基づき、MWCNT-7とは別社の製品のMWCNT-N

(N社製)をTIPS法によって検討したところ短期に胸膜中皮の持続増殖が起こり、2年後に悪性中皮腫の発生することを見出した(Cancer Sci, 2016)。この知見に基づき、本研究では多種のMWCNTの壁の層数・直径・鉄含量と投与MWCNT沈着と気管・肺・胸膜への有害性と発がん性に与える影響を明らかにしつつ、TIPS法を用いた①②の方法によってシステムの検証を行いつつ、被検体の障害性と発がん性の検索を行っている。

① 検体のMWCNTを2週間TIPS投与後に無処置観察1~4週間を経たラットの肺胞上皮と胸膜中皮の増殖活性とその因子を把握する。さらに肺におけるDNA付加体量を測定して発癌機序を追究する。検体は生食(抗凝集剤0.5%PF68コポリマー添加、超音波懸濁)にて懸濁して投与した。

② ラットへの2週間TIPS投与後無処置観察試験にて、2年までの経時的観察を行い、13週、52週での中間屠殺によって発がんに関与する早期病変を把握して可能な限り試験期間の短縮を図る。TIPS法は、設備と費用の面から事実上実施困難な吸入曝露試験に代替でき得る可能性があり、8th International Symposium on nanotechnology Occupational and Environmental Health(May 29-June 1, 2017, Denmark)にて注目を得た。

検体としては、MWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)(津田)、二層カーボンナノチューブ(DWCNT)および鉄を全く含まないフラーレンウィスカ(FLW)を用いた。

ラットを用いた2週間のTIPS投与試験に供する分散性の高いMWCNT検体を調製すること(Taquann法)、及びMWCNTの肺負荷量の経時的変化の解析を行う。MWCNTには凝集成分が含まれており、これが気道末梢の比較的近位に捕捉され、それよりも末梢の肺胞レベルへの単離繊維の吸入を阻害する可能性があるため、高分散検体を用いる必要がある。TIPSは投与した検体の殆どが肺に負荷されるため初期負荷量の把握は容易であるが、投与後は休薬して最長104週間の経時的な観察を行うため、肺及び胸腔内の病変と肺負荷量の関係を明らかにするために

は、その減衰を調べる必要がある。既に技術は確立済みであるが、Taquann 法処理した MWCNT にはターシャルブタノールが重量比で 0.0306%吸着することが明らかとなっており、これが測定系に影響を与えることが想定されることから、Taquann 法処理検体について測定法の検討を行った(菅野)。

MWCNT の呼吸器に対する毒性および発がん機構を解明するにあたり、異物排除機構の中核を担う織毛細胞および肺胞 Mφ に注目して、機能解析を行っている。本年度は、ラットから単離した肺胞 Mφ を用いて、MWCNT の急性的な細胞障害による細胞死の様式とその分子メカニズムを解析した(山村)。

MWCNT による発がんメカニズムの解明を目的としてがん原性物質の探索を行った結果、これまでに MWCTNs 曝露ラット肺組織において、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)、その DNA 付加体が数、濃度ともに増加することがわかってきた。そこで本研究では MWCNT-B 曝露による発がん機構の解明を目的として、MWCNTs 肺内投与によって増加した RCs の生理活性を調べた(伴野)。

B . 研究方法

検体は、MWCNT-A (針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B (綿菓子状、直径15nm、15-18層) (C社製)およびDWCNT (直径 2nm、2層) (D社製)および鉄を全く含まないフラーレンウィスカー (FLW:直径 0.28 ± 0.32 micro-m)を用いた(津田)。

① のプロトコルにてMWCNT-A/-Bは総投与量が0.5mgおよび1.0mg/ラットとなるように0.1% Tween含有PF68コポリマーに懸濁して8週間に8回TIPS (1回/週)投与し、②の投与開始より104週後に屠殺し、肺・胸膜等の慢性炎症と腫瘍発生について解析した。

DWCNT は①と同様の2週間に8回投与としたプロトコルにて、投与用量は0.25および0.5mg/ラットとなるように投与し、3週(投与終了後1週)および投与開始8週(投与終了後6週)に屠殺した各個体の肺組織の病理と生化学的試料、気管肺

洗浄液 (BALF)、胸腔洗浄液 (PLF) の上清と細胞ペレットにおける炎症性マーカーについて解析した(津田)。

FLW (物質・材料研究機構・宮澤薫一博士・若原孝次博士提供) および発がん陽性対照の MWCNT-7 (Mitsui) MWCNT-N (Nikkiso) は、12週齢雄性 F344 ラットに、①②の方法で、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)PFポリマー分散液に懸濁し、TIPS法にて投与した。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週間目と104週間目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、胸腔洗浄液における炎症関連サイトカイン遺伝子発現や酸化ストレスを解析している(内木)。

Taquann 法による高分散検体の調製方法:

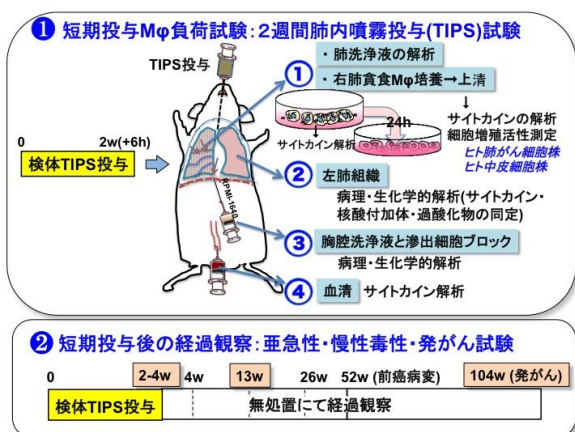
MWNT-7またはMWCNT-NをTaquann法によって高分散性の乾燥検体を用いた(高橋・菅野分担・研究協力者)。MWCNTの組織細胞内測定では、マーカー法によるMWCNTの微量定量法:カーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して選択的に結合するBenzo[ghi]perylene (BgP)をマーカー分子としてMWCNTと混合した。過剰なBgPを洗浄除去後、BgPを抽出しHPLCにて定量して検量線を、MWCNTの質量に換算した(菅野)。

ラット(雄、Wistar/ST、8~12週齢、日本SLC)からイソフルラン深麻酔下に気管と肺を摘出し、気管からカニューレを挿入してPBS(-)を注入し、肺洗浄液とした。肺洗浄液を4°C、1000rpm、5分間遠心して上清を除き、肺胞Mφを得た。単離した肺胞MφをRPMI 1640培地で24時間培養後、10000 cells/wellになるように96穴プレートに播種する。次に、カーボンナノチューブ(MWCNT-BまたはMWCNT-Aを10 μg/ml添加し、2時間、1日、7日後での細胞生存率をMTT法で測定した。対照群には溶媒のみ(0.5% PF68含有生理食塩水)を添加した。細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイには、Cytotoxic LDH Assay

Kit-WST(同仁化学)を用いた。また、アポトーシスの検出には Caspase-Glo 3/7 Assay(Promega)を用いた。ラット(雄性、Wistar/ST、8~12 週齢、日本 SLC)から気管と肺を摘出し、気管からカニューレを挿入して PBS(-)を注入し、肺洗浄液とした。肺洗浄液を 4°C、1000 rpm、5 分間遠心して上清を除き、肺胞 Mφ を得た。単離した肺胞 Mφ を RPMI 1640 培地で 24 時間培養後、10000 cells/well になるように 96 穴プレートに播種する。次に、カーボンナノチューブ(MWCNT-B または MWCNT-L を 10 μg/ml 添加し、2 時間、1 日、7 日後での細胞生存率を MTT 法で測定した。対照群には溶媒のみ(0.5% PF68 含有生理食塩水)を添加した。細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素(LDH)アッセイには、Cytotoxic LDH Assay Kit-WST(同仁化学)を用いた。また、アポトーシスの検出には Caspase-Glo 3/7 Assay(Promega)を用いた(山村)。

MWCNTs 肺内投与で増加が確認された

4-hydroxy-2-nonenal(4-HNE)、4-hydroxy-2-hexenal(4-HHE)、cis-4-decenal などの RCs をマウス M 様細胞である RAW264.7 に肺組織で確認された濃度で曝露し、IL-6、IL-12p40、TNF-α、COX-2、iNOS など炎症関連遺伝子群の mRNA 発現量を Real Time qPCR で調べた。また、cis-4-decenal に関しては、NF-κB luciferase assay を行った(伴野)。



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、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

った計画を立て、各施設の実験倫理委員会の審査を経た上で研究を実施した。

C. 研究結果

MWCNT-A と MWCNT-B は、①において TIPS 投与後に肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種では B の方がやや顕著であった。②の TIPS 投与後の長期試験では MWCNT-A と MWCNT-B において 1.0mg と 0.5mg/ラットの頻度の合計において、肺胞上皮における腺腫と腺がんの合計(肺腫瘍)の発生が、溶媒対照群と比較して有意の増加、胸膜悪性中皮腫は B 群に 1 例見られ、腺腫 + 腺がん + 悪性中皮腫 3 種合計の腫瘍発生頻度には有意差が認められた。クロシドライト 群では肺腫瘍の増加は見られたが、有意差はなかった(論文執筆中)。

MWCNT において肺胞内の M 数(/cm²)、PCNA 値、8-OHdG、MDA(Malondialdehyde:oxidative stress marker)、炎症性サイトカイン(CCL 種)は陽性対照 MWCNT-7(0.25mg、0.5mg)より低値であった。現在、胸膜中皮の増殖、胸腔洗浄液(PLF)、気管肺洗浄液(BALF)について解析である(津田)。

TIPS 投与中に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なかった。3 週目の剖検時、体重および肝、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 ± 0.04g)と比較して、対照群(1.34 ± 0.03g)、FL 群(1.40 ± 0.08g)、FLW 群(1.50 ± 0.09g)、MWCNT-7 群(1.60 ± 0.07g)、MWCNT-N 群(1.64 ± 0.04g)で有意な上昇を認めた。FLW、MWCNT-7、N 投与群では、肺胞内に好中球浸潤が見られ、肺胞 M φ が有意に増加した。肺における Cc12、Cc13 mRNA 発現は、MWCNT-7、N により有意に上昇した。偏光顕微鏡および電子顕微鏡観察により、肺胞 M φ による MWCNT-7、N 貪食像が確認された。

臓側胸膜の中皮細胞における Ki67 標識率は、MWCNT-N 投与群で有意に上昇した。胸腔洗浄液における総タンパクおよびアルブミン値は、対照群と比較して FLW、MWCNT-7、MWCNT-N で上昇傾向

を示したが有意差は見られなかった。胸腔洗浄液中の Myeloperoxidase レベルは、FLW および MWCNT-N で上昇傾向があり、FLW では有意であった。胸腔洗浄液中の M ϕ は、投与群いずれにおいても有意に増加した(内木)。

Taquann法による高分散検体の調製方法:
Taquann法処理により、MWNT-7 210 mg、MWCNT-N 166mgを調製した。
マーカー法によるMWCNTの微量定量法:
Taquann処理されたMWNT-7とマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、良好な直線性を示した(菅野)。

1) MWCNT 暴露による肺胞 M ϕ の生存率低下

MWCNT 暴露下における肺胞 M ϕ の細胞生存率を測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞 M ϕ の生存率は、2 時間後から時間依存的に減少した(0 h, 0.83 \pm 0.11, n=12, p>0.05 vs. 1.00 \pm 0.12 of vehicle, n=12; 2 h, 0.53 \pm 0.12, n=12, p>0.05 vs. 0.78 \pm 0.17, n=12; 1 d, 0.29 \pm 0.08, n=12, p<0.05 vs. 0.75 \pm 0.16, n=12; 7 d, 0.53 \pm 0.11, n=13, p<0.05 vs. 0.88 \pm 0.08, n=13)。一方、MWCNT-B も肺胞 M ϕ の生存率を低下させた(0 h, 0.86 \pm 0.11, n=12, p>0.05 vs. vehicle; 2 h, 0.67 \pm 0.17, n=12, p>0.05; 1 d, 0.46 \pm 0.10, n=12, p>0.05; 7 d, 0.50 \pm 0.06, n=13, p<0.05)。しかし、その効果は、MWCNT-L と比較して弱いことが分かった。

2) MWCNT 暴露による肺胞 M ϕ の細胞障害

肺胞 M ϕ に対する MWCNT の細胞障害性を測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞 M ϕ は障害された(2 h, 0.04 \pm 0.03, n=4, p>0.05 vs. 0.03 \pm 0.02 of vehicle, n=4; 1 d, 0.03 \pm 0.02, n=4, p>0.05 vs. 0.04 \pm 0.02, n=4; 7 d, 0.18 \pm 0.01, n=4, p<0.05 vs. 0.11 \pm 0.01, n=4)。一方、MWCNT-B による肺胞 M ϕ への細胞障害性は高くなかった(2 h, 0.09 \pm 0.03, n=4, p>0.05 vs. vehicle; 1 d, 0.07 \pm 0.03, n=4, p>0.05; 7 d, 0.07 \pm 0.02, n=4, p>0.05)。

3) MWCNT 暴露による肺胞 M ϕ のアポトーシス解析

MWCNT 暴露による肺胞 M ϕ の細胞死におけるアポトーシスの関与を解析した。スタウロスポリンによって誘導されるアポトーシスを陽性対照群とした(100%, n=3)。一方、MWCNT-L および MWCNT-B の 7 日間暴露によっては、顕著なアポトーシスは検出されな

った(MWCNT-L, 3.53 \pm 2.62%, n=4; MWCNT-B, 5.60 \pm 0.44% vs. 2.45 \pm 2.75% of vehicle, n=4) (山村)。

マウス M ϕ 様細胞である RAW264.7 に 4-HHE を曝露した結果、対照群と比較して IL-6 は 4.7 倍、iNOS は 13.8 倍、IL-12p40 は 36.9 倍に増加していた。cis-4-Decenal に関しては、IL-6 や TNF- α 、COX-2、iNOS の発現の増加は確認できなかったが、IL-12p40 や IL-12p35、IL-23p19 の発現はそれぞれ曝露濃度依存的に増加していた。また、これまでに COX-2 の発現増加などが報告されている 4-HNE では、IL-6 が 2.7 倍、iNOS が 1.4 倍、COX-2 が 2.4 倍の発現増加が確認されたが、IL-12p40 に関しては、発現増加は認められなかった。

次に cis-4-decenal による IL-12p40 や IL-12p35 など発現誘導メカニズムの解明を目的に NF- κ B luciferase assay を行ったが、cis-4-decenal の曝露による NF- κ B シグナルが誘導されなかった。現在、他の IL-12p40、IL-12p35、IL-23p19 発現に関与する MAP kinase や CREB のシグナルパスウェイについて検討している(伴野)。

D. 考察

1. MWCNT-A (針状、直径 150nm、210-215 層) と MWCNT-B (綿菓子状、直径 15nm、15-18 層) および DWCNT (直径 2nm) について TIPS 法にて投与して、MWCNT-A と MWCNT-B において、投与開始後 104 週にて有意の肺腫瘍の発生が確認されたが、頻度に大きな差異はなかった。DWCNT において、短期屠殺群では起炎症性変化は陽性対照 MWCNT-7 (0.25mg、0.5mg) より低値であったことから、肺障害性は弱い可能性が考えられた。現在、胸膜中皮の増殖、胸腔洗浄液 (PLF)、気管肺洗浄液 (BALF) について解析である。

2. TIPS 投与では一定量の検体を抹消肺胞腔まで確実に送達できる。実際に、気管内投与の優位性について、吸入曝露法と較べて、1) 投与用量が明確なので、リスク評価に適している。2) 発がん性試験における検出感度が高い 3) 設備費用が格段に安い、ということは明言されている (Mohr U, Heinrich Ernst, Markus Roller, Friedrich Pott,

Exp Toxicol Pathol, 2006)。さらにまた実際の暴露経路を考えるとラット・マウスではMWCNT等の固形物は複雑な構造の鼻腔を通過するときにトラップされるので、必ずしも人に近似するルートではない。ヒトはげっ歯類と異なって口から直接肺に吸気が入る場合が多々あるので(タバコ等)、気管内投与が人工的であるとは言い切れない。その意味で、TIPS投与にはリスク評価を行う上で妥当性がある。

3. MWCNTに対するM ϕ の動態に注目した解析法では、肺胞上皮細胞と胸膜中皮の増殖の機序の解析として有効であり、早期病変の検出につながると考える。WHO/IARC発がん性モノグラフでは、発がん機序が動物とヒトで共通して作動するという知見を重要視するようになった。その意味で本法によるM ϕ 活性の解析を重視した発がん機序解析手法は有用である。

4. 厚生労働省の有害物質リスク対策における「職場で使用される化学物質の発がん性評価の加速化」作業では「前がん病変を指標とした中期発がん性試験」が代替法として採用されて、中期検索法として評価スキームに組み込むことによって、発がん性リスク評価の高速化に大いに貢献できる。

5. 酸化ストレス下で生成・増加する活性カルボニル化合物(RCs)は、アルデヒド基やケトン基を有する特徴的な化学構造から、DNAと容易に付加反応し、DNAを傷害することで発癌に関与すると考えられている。RCsおよびRCs-DNA付加体の質的・量的変化(MWCNT曝露群>対照群)を解析することで、発癌機序の一端が明らかになる。

6. 鉄含量のないFLWの発がん性の有無と、MWCNT-7、MWCNT-Nの発がんの強度、標的臓器とその機序についての情報が得られる。

7. Taquann処理されたMWNT-7はマーカー法による微量定量法によって0.2~2.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。次年度は、TIPSにより検体を投与した肺サンプルを用いた測定を実施する計画である(菅野)。

8. MWCNT-Lは肺胞M ϕ の生存率を顕著に抑制す

ることが示された。一方、MWCNT-Bの肺胞M ϕ に対する毒性は、MWCNT-Lと比較して弱かった。細胞障害性アッセイでも同様の結果が認められた。したがって、MWCNTの大きさや形状は、呼吸器系細胞の障害性およびその程度を決定する因子であることが明らかになった。ただし、MWCNTによる肺胞M ϕ の細胞死の様式は、カスパーゼ3/7アッセイの結果、アポトーシスによらないことが示唆された。今後、アネキシンV/PI染色などを行うなど、カーボンナノチューブによる肺胞M ϕ の細胞死の様式については、様々な観点からの検討が必要であると考えられる(山村)。

9. 4-HHEやcis-4-decenalの曝露によってmRNA発現が増加していたIL-12p40はタンパク質としてはIL-12p35やIL-23p19とヘテロダイマーを形成し、IL-12やIL-23として働くことが知られている。これらのタンパク質はM ϕ において炎症シグナルによって発現増加し、T細胞の分化に関与することで、免疫反応に重要な役割を担っている。特にIL-23は、発がんの促進および増殖を促す環境づくりに関与することが分かっている。これらのことからMWCNT-Bの曝露によって生じる4-HHEやcis-4-decenalはDNA傷害のみならず、発がんや進行に関与することが示唆された(伴野)。

E. 結論

①のラットへ短期TIPS投与における肺、気管、胸腔、胸腔洗浄液等の炎症/毒性の増殖病変の把握が可能である。②の2週TIPS投与-2年無処置観察モデルは、事実、発がん性において、この方法で、MWCNT-N(針状、直径20nm、30層)MWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)(参考：吸入暴露で発がん性の報告されているMWCNT-7は針状、直径50-60nm、40層)、について、2年吸入曝露法に比べ圧倒的に低コストで発がん性が把握できた。MWCNT-7、MWCNT-Nに新たにMWCNT-AとMWCNT-B加えることになった。柔らかいDWCNT(綿菓子状、直径2nm、2層)については30年度中に目処がつかうと思われる。

また FLW の発がん性の有無によって、カーボン線維の鉄含量と発がん性の相関が明らかになる。現状では、短期(3週間目)において、FLW は陽性対照であるカーボンナノチューブと類似した肺、胸膜毒性を有することが明らかとなり、発がん性を有する可能性が示唆された。

MWCNT の M_φ の障害性において、MWCNT が肺胞 M_φ に直接的に細胞障害を与えることが分かった。その程度は、MWCNT-B よりも MWCNT-A の方が高かった。MWCNT 吸入暴露による肺胞 M_φ の機能障害は、MWCNT の肺内の沈着を維持することが予想される。この結果、さらに吸入した異物により、さらなる炎症の促進や感染症の発症が起こると考えられる。

発がん機序として、MWCNTs の肺内投与によって肺組織中で増加した RCs はアルデヒド基やケトン基を持つという特徴的な化学構造から、DNA に容易に付加反応することで、突然変異を誘導し、発がんにつながることを示唆されてきた。本研究ではさらに 4-HHE は IL-6 や iNOS、IL-12p40、*cis*-4-decenal は IL-12p40、IL-12p35、IL-23p19 の炎症関連遺伝子の発現を顕著に増加させたことから、MWCNTs 曝露によって生じる様々な RCs は直接的な DNA 傷害の他にがん細胞が増殖しやすい環境作りにも関与している可能性が示唆された。

すなわち、肺内に発生する脂質過酸化産物はいくつかの炎症関連因子 IL 種の遺伝子発現と DNA 付加体を形成する可能性があり、がん細胞が増殖しやすい環境を作出し、検体の沈着によって持続遷延する炎症反応は細胞回転を押し上げて発がんを促進している可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

なし

G . 研究発表

1 . 論文発表

- 1 . Abdelgied M., El-Gazzar A., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigou M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou K. A.,

Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H., Takahashi S. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats. *Cancer Sci.*, 2018 in press.

- 2 . Magaki M, Ishii H, Yamasaki A, Kitai Y, Kametani S, Nakai R, Alexander DB, Tsuda H, Ohnishi T A high-fat diet increases the incidence of mammary cancer in c-Ha-ras proto-oncogene transgenic rats, *J Toxicol Pathol* 2017; 30: 145–152
- 3 . Alexander D., Iigo M., Abdelgied M., Ozeki K., Tanida S., Joh T., Takahashi S., Tsuda H. Bovine lactoferrin and Crohn's disease: a case study, *Biochemistry and Cell Biology*, 95(1): 133-141, 2017.
- 4 . Naiki T, Naiki-Ito A (Corresponding Author), Iida K, Etani T, Kato H, Suzuki S, Yamashita Y, Kawai N. Yasui T, Takahashi S. GPX2 promotes development of bladder cancer with squamous cell differentiation through the control of apoptosis. *Oncotarget*. 9:15847-15859, 2018.
- 5 . Ito Y, Naiki-Ito A (Cofirst Author), Kato H, Suzuki S, Kuno T, Ishiguro Y, Takahashi S, Uemura H. Chemopreventive effects of angiotensin II receptor type 2 agonist on prostate carcinogenesis by the down-regulation of the androgen receptor. *Oncotarget*. 9:13859-13869, 2018.
- 6 . Suzuki S, Cohen SM, Arnold LL, Kato H, Fuji S, Pennington KL, Nagayasu Y, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Orally administered nicotine effects on rat urinary bladder proliferation and carcinogenesis. *Toxicology*. 398-399:31-40. 2018
- 7 . Kato A, Naiki-Ito A (Cofirst Author), Naitoh I, Hayashi K, Nakazawa T, Shimizu S,

Nishi Y, Okumura F, Tadahisa I, Takada H, Kondo H, Yoshida M, Takahashi S, Joh T. The absence of class III β -tubulin is predictive of a favorable response to nab-paclitaxel and gemcitabine in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma. *Hum Pathol.* 74: 92-98. 2018

8. Fuji S, Suzuki S, Naiki-Ito A, Kato H, Hayakawa M, Yamashita Y, Kuno T, Takahashi S. The NADPH Oxidase Inhibitor Apocynin Suppresses Preneoplastic Liver Foci of Rats. *Toxicol Pathol.* 45:544-550, 2017.
9. Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takanobu K, Matsumoto M, Fukushima S, Kanno J., Distribution of 1,2-dichloropropane in blood and other tissues of rats after oral administration. *J Toxicol Sci.* 2017;42(2):121-128

2. 学会発表

1. 津田洋幸、徐結荀、William Alexander, David Alexander, Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, 沼野琢旬、酒々井真澄、二口充、深町勝美、広瀬昭彦、菅野純 気管内噴霧投与法による各種の MWCNT の毒性と発がん性試験結果の比較, 第 44 回日本毒性学会学術年会、7 月 10-12 日、横浜
2. Mohamed Abdelgied, Ahmed Elgazzar, David Alexander, William Alexander, Takamasa Numano, Satoru Takahashi, Hirotsugu Takase, Akihiro Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kanno, Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate($K_2O \cdot 8TiO_2$)fiber is a potent inducer of lung and pleural injury – A comparative study to titanium dioxide nano particles. 第 44 回日本毒性学会学術年会、7 月 10-12 日、横浜
3. Ahmed M. El-Gazzar¹, Mohamed Abdelgied,

David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi, Ashraf Mohamed Nazem, Osama Saeid Elokke and Hiroyuki Tsuda Comparative Pulmonary toxicity of DWCNT and MWCNT-7 in Rats 第 34 回日本毒性病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄

4. Mohamed Abdelgied, Ahmed M. El-Gazzar, David B. Alexander, William T. Alexander, Takamasa Numano, Masaaki Iigo, Aya Naiki, Hirotsugu Takase, Khaled Abbas Abdou, Akihiko Hirose, Yuhji Taquahashi, Jun Kannno, Satoru Takahashi and Hiroyuki Tsuda Potassium octatitanate fiber ($K_2O \cdot 8TiO_2$) fiber is a potent inducer of lung and pleural injury in male Fischer 344 rats: A comparative study of titanium dioxide nano particles 第 34 回日本毒性病理学会総会、1 月 25-26 日、沖縄
5. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、山下依子、高橋智. Angiotensin II receptor type 2 アゴニストによるラット前立腺発がん化学予防効果、第 106 回日本病理学会総会、新宿 (2017 年 4 月)
6. 内木綾. The Role of Gap Junctional Intercellular Communication in Hepatotoxicity and Hepatocarcinogenesis (学術奨励賞受賞講演)、第 106 回日本病理学会総会、新宿 (2017 年 4 月)
7. Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi. Establishment a model of non-alcoholic steatohepatitis-related hepatocarcinogenesis, 第 76 回日本癌学会学術総会、横浜 (2017 年 9 月)
8. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智. Connexin 32 ドミナントネガティブトランスジェニックラットを用いたメタボリックシンドローム随伴 NASH モデルの樹

- | | |
|--|--|
| <p>立、第 34 回日本毒性病理学会、沖縄（2018 年 1 月）</p> <p>9. 大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純 N-SHOt Cyclone による多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第 44 回日本毒性学会学術年会(2017.7)</p> <p>10. 大西誠、三角恭兵、笠井辰也、山本正弘、鈴木正明、佐々木俊明、浅倉眞澄、平井繁行、福島昭治、菅野純 N-SHOt Cyclone による多層カーボンナノチューブの浮遊係数の比較、第 44 回日本毒性学会学術年会(2017.7)</p> <p>11. Yuhji Taquahashi, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, A short-term whole-body inhalation study of potassium titanate whisker in mice with an improved dispersion and inhalation system, The 57th Society of Toxicology, Henry B. Gonzalez Convention Center, San Antonio, Texas, USA, 12 March, 2018., Poster</p> <p>12. 鈴木良明、野田さゆり、山村寿男、今泉祐治。大コンダクタンス Ca²⁺活性化 K⁺チャネル新規修飾サブユニットによる気管支平滑筋機能の制御。第 59 回日本平滑筋学会総会、2017 年 8 月 25 日、福岡。</p> <p>13. 野田さゆり、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。気管支平滑筋におけるγサブユニットによる BK_{Ca} チャネル活性制御機構の解明。次世代を担う創薬・医療薬理シンポジウム 2017、2017 年 8 月 26 日、京都。</p> <p>14. 前田和輝、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス骨髄 Mφ 機能に対する Kir2.1 の役割。第 132 回日本薬理学会近畿部会、2017 年 11 月 24 日、大阪。</p> | <p>2. 実用新案登録
なし</p> <p>3. その他
なし</p> |
|--|--|

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