

平成29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:フラレンウィスカーの肺・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、炭素繊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、フラレン分子(FL)およびフラレンから成り鉄を含有しないナノサイズ物質、フラレンウィスカー(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、F344ラットに対し被検物質である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2週間経気管内噴霧(TIPS)投与を実施し、3週間目の途中剖検を行った。その結果、肺重量、肺胞内マクロファージはFLW、MWCNT-7,N投与群で有意に増加した。また胸腔洗浄液中マクロファージはFL、FLW、MWCNT-7,Nにより増加しFLWおよびMWCNT-Nではタンパク濃度および酸化ストレスの上昇傾向を認めた。以上より、CNTと同様にFLWも肺、胸腔に炎症や酸化ストレスを誘発し、発癌リスクを高める可能性が示唆された。

#### A. 研究目的

炭素繊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。フラレンウィスカー(FLW)は、C<sup>60</sup>やC<sup>70</sup>などのフラレン分子(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。C<sup>60</sup>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ことができると考える。

#### 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  $\mu\text{g}/0.5\text{ml}$ /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）する。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、増殖活性胸膜洗浄液・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。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。今年度は、実験動物に対する気管内投与および3週間目の剖検を実施した。肺、胸膜における早期毒性、増殖活性を検討するため、肺、胸膜の組織学的およびKi67、CD68免疫組織学的解析を行った。また肺の炎症性サイトカイン発現レベルや胸腔洗浄液中の酸化ストレスレベルを定量した。

（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）、当該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、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 $P < 0.001$ ）。FLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与群では、肺胞内に好中球浸潤が見られ、CD68陽性マクロファージが、対照群と比較して有意に増加した（FLW： $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N： $P < 0.001$ ）。肺における*Cc12*および*Cc13* mRNA発現レベルは、MWCNT-7、MWCNT-Nの投与により対照と比較して有意に上昇した（いずれも $P < 0.001$ ）。偏光顕微鏡および電子顕微鏡（SEM、TEM）観察により、肺胞マクロファージによるMWCNT-7、MWCNT-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、対照群と比較してMWCNT-N投与群で有意に上昇した（ $P < 0.001$ ）。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（それぞれ $9.9 \pm 3.2\text{mg/dl}$ 、 $31.7 \pm 6.3\mu\text{g/ml}$ ）と比較してFLW（ $14.3 \pm 3.4\text{mg/dl}$ 、 $39.0 \pm 7.6\mu\text{g/ml}$ ）、MWCNT-7（ $13.5 \pm 3.3\text{mg/dl}$ 、 $40.3 \pm 8.9\mu\text{g/ml}$ ）、MWCNT-N（ $13.5 \pm 4.9\text{mg/dl}$ 、 $37.4 \pm 13.4\mu\text{g/ml}$ ）で上昇傾向を示し

たが有意差は見られなかった。また胸腔洗浄液中の 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 ( $P < 0.05$ )。胸腔洗浄液中のマクロファージは、対照群と比較して投与群いずれにおいても有意に増加した (FL :  $P < 0.01$ 、FLW、MWCNT-N :  $P < 0.001$ 、MWCNT-7 :  $P < 0.001$ )。

#### 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。

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。FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N においては、対照群と比較して好中球浸潤の誘導、有意な肺重量や肺マクロファージの増加を認めた。またこれらの3剤では、胸腔におけるマクロファージの有意な増加や酸化ストレス上昇傾向を伴っていた。MWCNT-N については、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 と類似した肺、胸膜における毒性変化を認めていることから、鉄の有無に関わらず長期観察による発がん性を有する可能性が考慮された。現在、実験期間は55週目を経過しているが、実験動物に明らかな体重差は見られず順調に経過している。今後は短期試験における遺伝子発現解析を進めるとともに、長期観察群の解析準備を行っていく。

#### 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

ーブと類似した肺、胸膜毒性を有することが明らかとなった。このことから、フラレンウィスカーは鉄の有無に関わらず、発がん性を有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

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.

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.

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

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  $\beta$ -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

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.

## 2. 学会発表

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)

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)

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)

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 モデルの樹立、第 34 回日本毒性病理  
学会、沖縄 (2018 年 1 月)

## 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