

平成30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。またCNTは製品によって形状・物性が異なるためにこの製品についての安全性の評価が必要である。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現状では上市された全ての製品について試験を実施することは不可能である。我々はラットにおいて、気管内投与法にて多層CNT（MWCNT）MWCNT-Nにも肺と胸膜中皮に発がんさせることを世界で初めて報告し、次いで吸入曝露試験にてMWCNT-7に肺に発がん性のあることが報告された。MWCNTを肺内に投与した発がん試験は世界でこれら2報のみである。本研究では、ラットを用いて短期経気管肺内噴霧投与Trans-tracheal Intra-pulmonary Spraying・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、発がん性の評価法を開発を目指した。この目的で、物性の異なる2種のMWCNT（MWCNT-A、-B）、フラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）、MWCNT-N、MWCNT-7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。発がん試験では検体の分散法としてTaquann法による分散処理を行った。別の実験でMWCNT-7は超音波分散後投与した。

① MWCNT-A（針状凝集体を作る、直径150nm、210-215層）とMWCNT-B（綿菓子状凝集体を作る、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MWCNT-AとMWCNT-Bでは肺胞上皮における肺胞上皮過形成、腺腫、腺がんの合計発生がMWCNT-Aは14/40（ $p < 0.05$ ）、MWCNT-Bで12/40（ $p < 0.01$ ）、Crocidolite（CRO）（7/20）（ $p < 0.05$ ）であった（論文投稿中）。また、超音波分散MWCNT-7では18/19（95%）に悪性中皮腫が発生しており（肺腫瘍は0/19）、日本バイオアッセイ研究センターで実施された吸入曝露試験の結果（肺腫瘍のみ発生）とは異なった結果であった（論文投稿中）。FL、FLW、MWCNT-N、-7では肺では白色結節性病変が観察され、肺では白色結節性病変が観察され、発生頻度はそれぞれ無処置群（1/20）、対照群（0/17）、FL0.25群（1/19）、FL0.5群（1/19）、FLW0.25群（3/20匹）、FLW0.5群（1/18匹）、MWCNT-7 0.25群（3/20）、MWCNT-7 0.5群（8/20）、MWCNT-N 0.25群（2/20）、MWCNT-N 0.5群（7/20）でありMWCNT-7、-Nの高用量群（0.5mg）では対照群と比較して有意な増加を認めた。

以上から、②の2週TIPS投与後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。

また MWCNT-A, -B の発がん機序として、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
環境科学研究所 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

Dina Mohammed Saleh 名古屋市立大学大学院
医学研究科博士課程

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)は生体内で難分解性であるために肺・胸膜等に沈着して遷延性異物炎症を誘発する。またMWCNTは製品によって形状・物性が異なるためにこの製品についての安全性の評価が必要である。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現状では上市された全ての製品について試験を実施することは不可能である。我々はラットにおいて、気管内投与法にて多層CNT(MWCNT)MWCNT-Nに肺と胸膜中皮に発がんさせることを世界で初めて報告し、次いで吸入曝露試験にてMWCNT-7にも肺に発がん性のあることが報告された。肺に投与した試験は世界でこれら2報のみである。本研究では、ラットを用いて短期経気管肺内噴霧投与Trans-tracheal Intra-pulmonary Spraying・TIPS)法を開発して吸入曝露試験に代替し得る低コスト、簡便なMWCNTの急性・亜慢性・慢性毒性、発がん性の評価法の開発を目指した。この目的で、物性の異なる2種のMWCNT(MWCNT-A, -B)、フラーレン(FL)、フラーレンウィスカー(FLW)、MWCNT-N、MWCNT-7について①気管・肺・胸膜中皮への障害作用と②発がん性の検出法について検討を加えた。発がん試験では検体の分散法としてTaquan法に

よる分散処理を行った。MWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)、FL、FLWのTIPS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について、陽性コントロールとしてMWCNT-7、-N群を同時に設けることにより明らかにすることを目的とした。(津田・内木)

TIPS投与試験に供する高分散MWCNT検体の調製、および肺負荷量の経時的变化の解析を実施した。TIPS投与試験に供するMWCNT検体(MWCNT-7、MWCNT-N)を独自に開発したTaquann法処理を行い、凝集体成分を除去し、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製し研究代表者に供給した。TIPS投与後は休薬して最長104週まで経時的な観察を行うため、その減衰を調べ病変と肺負荷量の関係を明らかにするために、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとして定量する方法(大西法)を開発して肺に於ける検体の測定を実施した(菅野)。

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の呼吸器に対する毒性および発がん機構を解明する上で、被検物暴露の初期における直接的な細胞障害性を明らかにするために、肺内の炎症反応に関与する肺胞マクロファージ(AM)に着目し、MWCNTが肺で炎症反応を誘導する機構の解明を目指した(山村)。

MWCNTsの発がん機序の解明を目的として、MWCNTsを肺内噴霧投与されたラット肺組織において、酸化ストレスによって生成・増加する活性カルボニル化合物(Reactive Carbonyl species: RCs)やそのDNA付加体の網羅的解析を行った(伴野)。

B. 研究方法

ラットを用いて短期経気管肺内噴霧投与(Trans-tracheal Intra-pulmonary Spraying・TIPS)法を用いてMWCNTの急性・亜慢性・慢性毒性、発がん性の評価法の開発を行った。この目的で、12週齢F344雄性ラットを用いて①気管・肺・胸膜中皮への障害作用と②発がん性について、Taquann法に

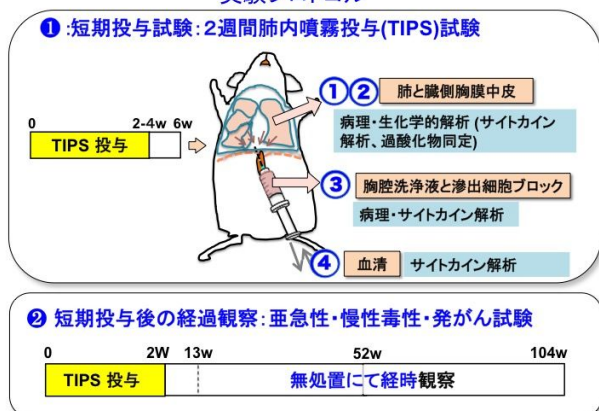
よる分散処理を行ったMWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)をそれぞれ総投与量が0.5及び1.0mg/ラットになるように2週間に8回投与した。これとは別にMWCNT-7をRaquann法を用いずに超音波分散にて1.5mg/ラットにてTIPS投与した。(津田)。

12週齢雄性F344ラットに、FW、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nをそれぞれ31.25、62.5µg/0.5ml/ラットの用量で(合計投与量0.25および0.5mg/ラット)同様にTaquann分散後TIPS投与した。対照群として、無処置および媒体投与(対照)群を設けた。①3週間目と②104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)とした。短期剖検で得られた肺を用いて、酸化ストレスや遺伝子発現変化を解析した。肺凍結組織を用いて、ROSに反応して蛍光発色するdihydroethidium(DHE)による染色を行い、核における蛍光シグナルを蛍光顕微鏡により検出・数値化し(蛍光輝度値)、肺組織におけるROSの定量を行った。cDNAマイクロアレイ解析により、肺組織における各物質による遺伝子発現変化を網羅的に解析した。マイクロアレイによる変化は、定量RT-PCR(qRT-PCR)により確認した(内木)。また、MWCNTの肺内残量の定量には大西法を用いた(菅野)。雄性ラットから気管および肺を摘出した。気管からカニューレを挿入してPBS(-)を注入し、回収して肺胞洗浄液を得た。肺胞洗浄液を遠心した後、上清を除いてAMを得た。単離したAMをMWCNTで暴露した後、Caspase-Glo 3/7 AssayとAnnexin V:FITC Assay Kitを用いてアポトーシスアッセイを行った。また、単離したAMをリポ多糖(LPS)で刺激した後にMWCNTで暴露し、上清のサイトカインを測定した。IL-1βの測定には、Rat IL-1β/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit、IL-1αの測定にはRat IL-1α/IL-1F1 Quantikine ELISA Kitを使用した(山村)。

10週齢の雄性F344ラットに0.5mL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3種のMWCNT(MWCNT-A、MWCNT-B、MWCNT-7)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20mgを取り、Reactive carbonyl species(RCs)を含む脂溶性画分およびDNAを抽出した。脂溶性画分はRCsと特異的に反応するdansyl hydrazine(DH)で誘導体化した。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RCs-DH誘導体、DNA加水分解物をLC/MS解析試料とした。RCs-DH誘導体は、DH誘導体に特徴的なフラグメントイオン m/z 236.1、DNA付加体においては、DNA付加体のデオキシリボースの脱離によって生じる[M+H-116]⁺という特徴的なフラグメントを利用したUHPLC/Triple TOF/MSにより網羅的解析を行った(伴野)。

実験プロトコル



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、「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、名古屋市立大学および分担研究者の所属する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。Crocidolite(CRO)群では有意差はなかった(論文執筆中)。さらに、MWCNT-7では②のTIPS投与後の長期試験において、高頻度(95%)に胸膜中皮種が早期に発生したが(平均生存週齢78.6週)肺腫瘍は1例のみ(溶媒群と同じ)であったCRO群には悪性中皮腫の発生はなかった(論文投稿中)(津田)。

3週目の剖検時、肺におけるROS蓄積量は(蛍光輝度値:O.D.)FLW(38.4±3.1O.D.)MWCNT-7(74.2±0.4O.D.,P<0.001)MWCNT-N(60.7±3.8O.D.,P<0.001)群であり、MWCNT群において、対照群(25.2±2.1O.D.)と比較して有意に上昇した。対照群、FL、MWCNT-7およびN群の肺組織から抽出したRNAによりマイクロアレイおよびqRT-PCRを行った結果、前年度にMWCNT-7、-N群で対象群と比較して、有意に発現上昇することを報告した*Ccl2*を含め、*Ccl9*、*Cstk*、*Serpin2*、*ApoE*や*Igf1*がMWCNT-7、-N群のみで有意な発現上昇を示す遺伝子として同定された。最終剖検では、体重、臓器重量(肺、肝、腎、脾、脳)については、MWCNT-N0.25群の全体肺重量、相対肺重量(1.74±0.39g,P<0.05、0.40±0.08%,P<0.05)が、対照群(1.35±0.38g、0.31±0.08%)と比較して有意に高値であった。その他には有意な変化は認めなかった。剖検時の肉眼所見では、胸郭の胸膜に明らかな腫瘍性変化は見られなかった。一方、肺では白色結節性病変が観察され、発生頻度はそれぞれ無処置群(1/20)対照群(0/17)FL0.25群(1/19)FL0.5群(1/19)FLW0.25群(3/20匹)FLW0.5群(1/18匹)MWCNT-70.25群(3/20)MWCNT-70.5群(8/20)MWCNT-N0.25群(2/20)MWCNT-N0.5群(7/20)でありMWCNT-7、-Nの高用量群で対照群と比較して有意な発生頻度の上昇を認めた(内木)。

TIPS投与後は無処置にて最長104週まで経時的な観察を行うため、その減衰を調べ病変と肺負荷量の関係を明らかにする必要がある。MWCNTを事例対象とし、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとして定量する方法(大西法)のMWCNTへの適用条件を

構築し、TIPS 投与された肺検体の測定を実施した。肺負荷量測定の結果、DWCNT 群のラット肺当りの肺負荷量は、低用量の投与2週後では64.4 □g/g、6週後では65.4 □g/g、中用量の投与2週後では137.0 □g/g、6週後では108.6 □g/g、高用量の投与2週後では248.8 □g/g、6週後では173.1 □g/gであった。MWCNT 群のラット肺当りの肺負荷量は、投与2週後では284.8 □g/g、6週後では398.5 □g/gであった。マーカー法は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性のある結合を示す低分子吸着マーカーを用いたMWCNTの極微量定量法であるが、カーボンナノチューブ一般に適用できる可能性が見いだされた(菅野)。

MWCNT 暴露における肺胞マクロファージ (AM) のアポトーシス解析 (caspase-3/7 活性) : アポトーシスに關与する caspase-3/7 の活性を測定した結果、MWCNT 暴露による caspase-3/7 活性の増加は検出されなかった。MWCNT 暴露における AM のアポトーシス解析 (Annexin V/PI 染色) : MWCNT-L に 5 h 暴露することで、Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が、MWCNT-S 暴露群に対して有意に減少した。溶媒群に対しては減少傾向にあった。MWCNT-L に 1 d 暴露することで、Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が溶媒群に対しても有意に減少し、Annexin V(+)/PI(+)の細胞の割合は残りの群に対して有意に増加した。MWCNT-S については、3 d 暴露することで Annexin V(-)/PI(-)の細胞の割合が溶媒群に対して有意に減少し、Annexin V(+)/PI(+)の細胞の割合が溶媒群に対して有意に増加した。実験を行ったいづれの時間においても Annexin V(+)/PI(-)の早期アポトーシスを示す細胞の割合は増加しなかった。MWCNT 暴露における AM のサイトカイン発現解析 : パイロトーシスに關与するインフラマソームが制御する IL-1 β 分泌について ELISA 法で測定した。IL-1 β の分泌は、LPS 刺激群において MWCNT 暴露 3 日後と 7 日後に溶媒群に対して有意に上昇した(山村)

形状の異なる 3 種類の MWCNT s (MWCNT-A、-B、

-7) を 2 週間肺内噴霧投与したラットおよびその対照群の肺組織中の Reactive carbonyl species (RCs)、その DNA 付加体の網羅的解析を行った。その結果、肺組織中の RCs は対照群 158 peaks、MWCNT-A 168 peaks、MWCNT-B 186 peaks、MWCNT-7 160 peaks 検出された。また、MWCNT 投与群と対照群を比較すると MWCNT-A では 168 peaks 中 75 peaks、MWCNT-B では 186 peaks 中 129 peaks、MWCNT-7 では 160 peaks 中 69 peaks 高値を示していた。対照群と比較して高値を示した RCs には、強い細胞傷害性が報告されている formaldehyde や glyoxal、4-hydroxy-nonenal (4-HNE)、4-hydroxy-hexenal (4-HHE) が含まれていた。これら高値を示した RCs に着目して肺組織中の DNA 付加体量を測定すると、4-HNE-dG や 4-HNE-dC 付加体が対照群ではほとんどの個体で検出限界に近いピーク強度であったが、MWCNTs 曝露群では高値を示し、特に MWCNT-A、MWCNT-7 で対照群と比較して約 100 倍のピーク強度を示した。その他にも MWCNTs 曝露群において対照群ではみられない未知の DNA 付加体が検出された(伴野)。

D. 考察

1) MWCNT-A と MWCNT-B における肺腫瘍 (腺腫 + 腺癌) の発生は MWCNT-B に多く、短期試験における炎症の程の強さと反映する傾向が見られた。MWCNT-7 (1.5mg/ラット) では 95%の動物に悪性中皮腫の発生を見た。この結果は、日本パイオアッセイ研究センターで実施された吸入暴露の結果 (肺腫瘍のみ発生) とは異なっており、曝露経路によって標的臓器に差異があるが、その機序については悪性中皮腫が発生して早期に死亡してしまったために肺腫瘍の発生に至らなかったことが一因と考えられる。また CRO はこれらの MWCNT と比べて発がん性は MWCNT より遥かに弱く、このことは腹腔内投与を含めた他の実験でも明らかになってきた(津田)。

2) TIPS 投与では一定量の検体を末梢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、a) 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、c)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によって、62物質のうち5物質はG2A(おそらくヒト発がん物質)からG1(ヒト発がん物質)への再評価になった。こうした意味でも本法によるM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。

短期試験において、投与した物質は、MWCNT-7、-Nのみが肺胞内に検出された。さらに肺におけるROS蓄積や*Ccl2*、*Ccl3* mRNA発現上昇は、陽性コントロールであるMWCNT-7、-N群で有意な上昇を認めた。またマイクロアレイによる遺伝子発現解析では、MWCNT-7、-N群において、有意に発現上昇する遺伝子群を検出したが、これらの遺伝子はFLやFLW群では有意な発現変化を示さなかった。これらの結果から、FLおよびFLWは、MWCNTと異なる肺毒性を示し、肺発がん性を有さない可能性が示唆された。2年間の最終剖検における肉眼的肺結節は、MWCNT-7、-Nのそれぞれ高用量群でのみ有意な増加を示し、短期試験の毒性変化は肺発がん性を予測しうる結果といえる。今後、組織学的な腫瘍性病変の解析とともに、肺および胸腔におけるナノチューブの定量、長さを明らかにし、両者の関連を解明していく予定である (内木)。

MWCNTの検出法として、本研究で開発したマーカー法は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性のある結合を示す低分子吸着マーカーを用いたMWCNTの極微量定量法であるが、カーボンナノチューブ一般に適用できる可能性が見いだされた。今後各種のMWCNTでの検証によっていっそうのvalidationが得られる (菅野)。

MWCNTの暴露によるAMの細胞死機構は、caspase-3/7活性測定とAnnexin V/PI染色の結果からアポトーシスではないことが推測されたが、MWCNT暴露によりIL-1 β 分泌が増加したことから、インフラマソーム形成を伴うパイロトーシスであることが示唆された。これまでに、MWCNT-Aの方が、MWCNT-Bよりも人体への毒性が高いことを示しているが、本研究では、MWCNT-Sにおいても暴露時間を長くすることで細胞障害が生じた上に、IL-1 β の分泌はMWCNT-Lと同程度であった。そのため、他の形状を有するMWCNTの細胞障害についても解析することで、細胞障害が最も抑えられ、安全性が高い形状を解明できると考えられる (山村)。MWCNTs肺内投与ラットの肺組織において、MWCNTsを貪食して活性化した肺胞マクロファージが活性酸素を過剰に産生することで脂質過酸化分解物であるRCs量が増加したと考えられた。また、RCsは化学構造にアルデヒド基やケトン基などDNAのアミノ基に容易に付加反応することが知られている。その特徴からDNA付加体量が増加したと考えられ、全く手がかりのなかったMWCNTによる発がん機構の一部が見えてきた (伴野)。

E. 結論

提案の主題である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、吸入曝露法に比べ急性毒性、亜急性毒性および慢性毒性(発がん性)評価においての圧倒的に低コストであり、リスク評価の加速化に充分貢献できるとなる。事実、発がん性において、新たにMWCNT-AとMWCNT-BおよびMWCNT-7の胸膜中皮に対する発がん性を新たに加えることになった。フラーレンおよびフラー

レンウィスカーの肺・胸膜毒性について検討した。短期剖検では、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一部異なる肺、胸膜毒性を示し、最終剖検の肉眼所見では明らかな腫瘍性病変の増加を認めなかった。このことから、フラレンウィスカーは、肺癌や中皮腫のリスク増加に関与しない可能性が示唆された。また、短期試験の結果からも長期発がん性を予測できる可能性が示唆され、気管内投与による短期肺・胸膜発がん検出系に応用できることが期待された(津田・内木)。マーカー法は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性のある結合を示す低分子吸着マーカーを用いた MWCNT の極微量定量法であるが、カーボンナノチューブ一般に適用できる可能性が見いだされた(菅野)。本研究により、MWCNT 曝露における AM の細胞死機構は、アポトーシスではなくパイロトーシスであることが示唆された。肺内に吸入された MWCNT は、AM に貪食され、AM にパイロトーシスを誘導する。パイロトーシスを起こした AM からは、IL-1 β などが放出され、さらなる炎症反応を引き起こす。したがって、肺において慢性的な炎症が起き、活性酸素種による DNA 障害や中皮細胞の増殖亢進を引き起こすことで、中皮腫が発生することが考えられる(山村)。MWCNTs 曝露によって生成・増加した 4-HNE はこれまでがん抑制遺伝子 p53 の codon 249 の dG 残基に優先的に付加することで突然変異を誘導することが知られている。MWCNT s 曝露による発がん機構として、4-HNE に代表される種々の RCs による DNA 傷害や炎症性サイトカイン産生亢進によって発がんを誘導する可能性が示唆された(伴野)。以上から、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、吸入曝露法に比べ急性毒性、亜急性毒性および慢性毒性(発がん性)評価においての圧倒的に低コストであり、リスク評価の加速化に充分貢献できる。発がん機序として、MWCNT の長期残存による慢性異物炎症によって 4-HNE に代表される種々の Reactive carbonyl species (RCs) による DNA 傷害や炎症性サイトカイン産生亢進によって発がんを誘導する可能性が示唆された。

F . 健康危険情報

なし(現状として人に対する MWCNT の曝露は観察されていない)。

G 研究発表

1. 論文発表

- 1) Liao D., Wang Q., Alexander D., Abdelgied M., Elgazzar AM., Futakuchi M., Suzui, M., Kannno J., Hirose A., Xu J., Tsuda H. Persistent Pleural Lesions and Inflammation by Pulmonary Exposure of Multiwalled Carbon Nanotubes, Chem. Res. Toxicol., 31(10):1025-1031. 2018.
- 2) Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Elokke OM., Nasem AM., Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats, Arch. Toxicol., 93: 43-59, 2019
- 3) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers induce persistent lung and pleural injury and are possibly carcinogenic in male Fischer 344 rats, Cancer Sci., 109(7):2164-2177. 2018
- 4) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Takase H., Abdou KB., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Abdelhamid M., Tsuda H., Takahashi S. Pulmonary and pleural toxicity of potassium octatitanate fibers, rutile titanium dioxide nanoparticles, and MWCNT-7 in male Fischer 344 rats, Arch. Toxicol., 93(4):

909-920, 2019

- 5) Suzuki S, Toyoda T, Kato H, Naiki-Ito A., Yamashita Y, Akagi J, Cho Y.M, Ogawa K, Takahashi S. Dimethylarsinic acid may promote prostate carcinogenesis in rats. *J Toxicol Pathol*, in press.
 - 6) Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi S. NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy. *J Clin Med*. 8, pii: E442, 2019
 - 7) Mapoung S, Suzuki S, Fuji S, Naiki-Ito A, Kato H, Yodkeeree S, Ovatlarnporn C, Takahashi S, Limtrakul Dejkriengkraikul P. Cyclohexanone curcumin analogs inhibit progression of castration-resistant prostate cancer in vitro and in vivo. *Cancer Sci*. 110:596-607, 2019
 - 8) Suzuki S, Kato H, Fuji S, Naiki T, Naiki-Ito A, Yamashita Y, Takahashi S. Early detection of prostate carcinogens by immunohistochemistry of HMGB2. *J Toxicol Sci*. 43:359-367, 2018.
 - 9) Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunematsu T, Kudo Y, Kanno J, Ishimaru N. Long-term polarization of alveolar macrophages to a profibrotic phenotype after inhalation exposure to multi-wall carbon nanotubes. *PLoS One*. 2018 Oct 29;13(10):e0205702.
- 2) 津田洋幸,徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬,広瀬昭彦,菅野純 ナノマテリアル特にカーボンナノチューブによる肺・胸膜中皮障害と発がん性の経気管肺内噴霧投与 (TIPS)試験法の開発 第45回日本毒性学会学術年会 大阪 2018年7月
 - 3) Abdelgied M., Elgazzar AM., Alexander D., Alexander W., Numano T., Iigo M., Naiki-Ito A., Abdelhamed M., Takase H., Hirose A., Taquahashi Y., Kanno J., Takahashi S., Tsuda H. Potassium octatitanate fibers are possibly carcinogenic in male Fisher 344 rats. 54th congress of the European societies of toxicology (EUROTOX2018) Brussels, Belgium, Sept. 2018
 - 4) Aya Naiki-Ito. The roles of gap junctional intercellular communication in non-alcoholic steatohepatitis (NASH) and hepatocarcinogenesis -Establishment a model of NASH-,(英国病理学会招待講演) Maastricht Pathology 2018、オランダ、マーストリヒト (2018年6月).
 - 5) 内木綾、内木拓、加藤寛之、鈴木周五、高橋智. 前立腺発がんおよび去勢抵抗性細胞増殖に対する luteolin の抑制効果、第35回発癌病理研究会、御殿場 (2018年8月)
 - 6) Aya Naiki-Ito, Hiroyuki Kato, Shugo Suzuki, Yoriko Yamashita, Satoru Takahashi. Connexin 32 prevents the development of insulin resistance and hepatocarcinogenesis in non-alcoholic steatohepatitis, 第77回日本癌学会学術総会、大阪 (2018年9月)
 - 7) 内木綾、内木拓、加藤寛之、飯田啓太郎、鈴木周五、安井孝周、高橋智. 去勢抵抗性前立腺癌に対する luteolin の治療効果と androgen receptor splice variant の役割、第33回前

2. 学会発表

- 1) 津田洋幸, 徐結苟, Alexander WT., Alexander DB., Abdelgied M., Elgazzar A., 沼野琢旬, 広瀬昭彦, 菅野純 ナノマテリアルの気管支内投与による毒性と発がん性の簡易検出システムの開発 第45回日本毒性

- 立腺シンポジウム、品川（2018年8月）
- 8) 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智. Luteolin の去勢抵抗性前立腺癌に対する抑制効果と androgen receptor splice variant の役割、第35回日本毒性病理学会、江戸川（2019年1月）
- 9) 菅野 純、ナノマテリアルの吸入曝露による発がん性研究第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)
- 10) 高橋祐次、相磯 成敏、大西 誠、石丸 直澄、菅野 純、マクロファージの機能に着目したナノマテリアルのマウス吸入ばく露による慢性影響評価、第45回日本毒性学会学術年会、シンポジウム、2018.7.18(大阪)
- 11) Jun Kanno, Chuen-Jinn Tsai, Plenary Session 4: Improvement of Inhalation Toxicity Testing for Nanomaterials and Compliance Monitoring for Ambient PM., Plenary Lectures, Xth International Aerosol Conference (IAC 2018) ,Invited, 2019.9.6,St. Louis.
- 12) Yuhji Taquahashi, Satoshi Yokota, Koichi Morita, Masaki Tsuji, Yoko Hirabayashi, Akihiko Hirose and Jun Kanno, Development of Whole Body Inhalation System for Well-Dispersed Nanomaterials Toxicity Testing -Taquann Direct-Injection Whole Body Inhalation System-, Poster, 58th Annual Meeting of the Society of Toxicology, 2019.3.12., Baltimore
- 13) Sayuri Noda, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi. LRRC26 is functional as an Auxiliary subunit of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ (BK) channel and regulates BK channel activity in bronchial smooth muscle cells. Experimental Biology 2018, Apr. 22, 2018 (San Diego, USA).
- 14) 澤井優輝、鈴木良明、今泉祐治、山村寿男。マクロファージにおいてカベオリン 1 は ATP シグナルを制御する。第64回日本薬学会東海支部大会、2018年6月30日(名古屋)。
- 15) Sayuri Noda, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura, Yuji Imaizumi. Essential roles of the auxiliary γ -subunit of large-conductance Ca²⁺-activated K⁺ channel in bronchial smooth muscle cells. The 49th NIPS International Symposium Ion channels: looking back, seeing ahead. Dec. 5-8, 2018 (Okazaki).
- 16) Yuuki Sawai, Yoshiaki Suzuki, Yuji Imaizumi, Hisao Yamamura. Caveolin-1 regulates ATP signaling in macrophages. Nagoya Immunology Network in NCU the first international symposium. Mar. 11, 2019 (Nagoya).

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