

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)
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り鉄を含有しないナノサイズ物質、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った。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肺を用いて、活性酸素種(ROS)の蓄積とマイクロアレイによる遺伝子発現変化を解析した。その結果、ROSはMWCNT-7およびN投与群で有意に増加したが、被検物質では明らかな変化を認めなかった。マイクロアレイおよびqRT-PCRでは、*Ccl9*、*Cstk*、*Serpin2*、*ApoE*や*Igf1*など、ROS蓄積と一致してMWCNT-7、N群で有意に発現上昇する遺伝子が同定された。さらに現在解析途中であるが、2年間の最終剖検では、肉眼的な肺腫瘍発生頻度は、MWCNT-7およびNの高用量群でのみ、有意な上昇を認めた。以上より、本試験では陽性コントロールには肺発がん性が認められ、FLWには見られない可能性が示唆された。

A. 研究目的

FLWの生体内動態は不明であるが、長さや形状からは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。本研究では、FL、FLW短期間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。本年度は、前年度剖検が終了した、投与後1週間(3週間目)の肺組織を用いて、活性酸素種(ROS)の蓄積や肺の遺伝子発現変化の解析を行った。

B. 研究方法

FLW、FLW、MWCNT-7、MWCNT-Nは、PFポリ

マー分散液に懸濁し、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、イソフルラン深麻酔下にて、それぞれ31.25、62.5 μ g/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する。

3週目の剖検時、肺重量、肺胞内好中球浸潤や

胸腔洗浄液中の Myeloperoxidase が、陽性コントロールである MWCNT-7, N とともに FLW 群においても有意に上昇し、FLW による肺野胸膜発がんリスクの可能性が示唆された。そこで、本年度はさらに、肺における酸化ストレスや遺伝子発現変化を解析することとした。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、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。

(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

3 週目の剖検時、肺における ROS 蓄積量は、FLW (38.4 ± 3.1 O.D.), MWCNT-7 (74.2 ± 0.4 O.D., $P < 0.001$), MWCNT-N (60.7 ± 3.8 O.D., $P < 0.001$) 群であり、MWCNT 群において、対照群 (25.2 ± 2.1 O.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を行った。対照群と比較して遺伝子変化を認めた数が多かった MWCNT-7 では、対照群と比較して 2 倍以上発現上昇した遺伝子は 152 個、2 倍以下に低下した遺伝子数は 70 個認めた。MWCNT-7 で発現上昇を認める遺伝子は、

MWCNT-N においても発現上昇しているものが散見された。それらの遺伝子群には、前年度に MWCNT-7, N で有意に発現上昇することを報告した、*Ccl2* も含まれていた。それ以外の遺伝子としては、*Ccl9*, *Cstk*, *Serpin2*, *ApoE* や *Igf1* が検出され、qRT-PCR において、いずれの遺伝子も対照群と比較して、MWCNT-7, N 群で有意な発現上昇を確認した。

最終剖検には各群 20 匹のラットを設定した。経過中に途中死亡動物が発生し、最終的に無処置群 (12 匹)、対照群 (13 匹)、FL0.25 群 (14 匹)、FL0.5 群 (12 匹)、FLW0.25 群 (15 匹)、FLW0.5 群 (13 匹)、MWCNT-70.25 群 (15 匹)、MWCNT-70.5 群 (15 匹)、MWCNT-N0.25 群 (17 匹)、MWCNT-N0.5 群 (12 匹) で実施した。途中死亡例では、MWCNT-7 高用量群において、1 匹肺癌の発生を認めたと、その他の死亡例は、肺や胸膜発がんを認めず、自然発生の白血病、皮下腫瘍や甲状腺腫瘍などが死因であった。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 ± 0.39 g, $P < 0.05$, $0.40 \pm 0.08\%$, $P < 0.05$) が、対照群 (1.35 ± 0.38 g, $0.31 \pm 0.08\%$) 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。

D. 考察

短期試験では、FLW、MWCNT-7, N で、肺好中球浸潤の誘導、有意な肺重量および肺泡マクロファージの増加を認めたが、電子顕微鏡による観察では、肺胞内に MWCNT-7, N のみが検出可能であった。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 群でのみ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 FL から構成されるナノウィスカーである 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。このような短期試験の結果は、2 年間の最終剖検における肉眼的肺結節が、MWCNT-7、N のそれぞれ高用量群でのみ有意な増加を示したことと、関連していることが示唆された。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。

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。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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., in press.

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.

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

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

El-Gazzar AM, Abdelgied M, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigo M, Naiki A, Takahashi S, Takase H, Hirose A, Kannno J, Elokke OS, Nazem AM, Tsuda H. Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats. Arch Toxicol. 93:49-59, 2019

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.

Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, Naiki-Ito A, Takase H, Abdou KA, 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. 109:2164-2177, 2018.

2. 学会発表

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)。

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)

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)

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 回前立腺シンポジウム、品川 (2018 年 8 月)

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)

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