

令和元年度 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: 気管内投与による化学物質の有害作用とくに発癌性の効率的評価手法の開発に関する研究
研究: 迅速化かつ国際化に向けて

分担研究課題名: 吸入曝露物質の有害性評価における経気管肺内噴霧投与法の有用性の解析

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 准教授

研究要旨

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。本研究の目的は、ナノサイズの繊維・粒子体の有害性試験法として開発した経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を、毒劇法指定物質の有害性評価に応用することにある。本年度はTIPS法による毒性評価指標の確立のため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラーレンウィスカー(FLW)と陽性対照のカーボンナノチューブ(MWCNT-7、N)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間(急性毒性)の肺に対する毒性を比較検討した。また既に吸入曝露試験が実施された1,4-dioxane(dxn)をモデル物質として選択し、そのLC50値51.3mg/L/4hを換算値481mg/300gラットとし、実施するモデル試験の用量範囲に入る様に試行実験を繰り返した。その結果、肺重量、マクロファージはFLW、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に増加し、いずれの物質も肺胞内に残留していた。一方で、肺胞内活性酸素種(ROS)や*Ccl2*、*Ccl3*、*Ccl9*などのサイトカイン発現は、MWCNT-7、MWCNT-N投与群で有意に増加したが、FLWでは明らかな変化を認めず、曝露物質により肺内酸化ストレスの誘発は異なり、有害性の指標になる可能性が示唆された。また、dxnについては、同様の変化について検討している。初日に1時間に1回、4時間で投与終了、その後一週間程度の観察が肺障害は軽微で、全身臓器における毒性評価にモデルとして最適であると考えられた。

A. 研究目的

生活環境には様々な化学物質が存在し、経気道的に体内に取り込まれる物質は多いため、吸入曝露による実用的な健康影響評価手法を開発することは極めて重要である。しかしながら毒物及び劇物取締法(毒劇法)によって指定された、空気中有害物質の多くは、経口、皮膚塗布や腹腔内投与など別経路の投与による動物試験により代替されている。この背景には、吸入曝露試験を実施するための特殊施設や高額な費用が関係している。

申請者らはこれまでに、ナノサイズの繊維・粒子

体の有害性試験法として、簡便な経気管肺内噴霧投与法(TIPS法)を用いた試験デザインを開発してきた。本研究では、毒劇法指定物質の有害性評価を高度化および迅速化するべく、TIPS法による評価を応用することにある。

今年度は、TIPS法による毒性評価指標の確立するため、経気道的曝露による有害性、特に発がん性が未知であるフラーレンウィスカー(FLW)と発がん性を含めた有害性を以前に証明している、カーボンナノチューブ(MWCNT-7、N)をF344ラットに2週間TIPS投与し、1週間(急性毒性)の肺に

対する毒性を比較検討した。また既に日本バイオアッセイ研究センター (JBRC) における吸入曝露試験にて LC50 (LC50 値 51.3mg/L/4h を、ラットの肺一回換気量、呼吸数、体重等を勘案して 481mg/300-350g ラットに換算) の得られている 1,4-dioxane (dxn) を選択し、F344 ラットを用いて TIPS 法による実験を行った。

B. 研究方法

① 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 TIPS 投与する。12 週齢雄性 F344 ラットに、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 62.5 μ g/0.5ml/ラットの用量で 2 週間に 8 回 (合計投与量 0.5mg/ラット) 気管内投与した。3 週間目 (投与終了後 1 週間) にイソフルラン深麻酔下に大動脈より採血屠殺した。肺の病理組織学的変化、増殖活性、炎症性サイトカイン発現レベルや ROS レベルを定量した。(各群 5 匹)

1) dxn を、11-12 週齢雄ラット (330-350g) 11 日間に 6 回 (合計投与量 60、150、300、450、600、750、1050、1200mg/ラット) を TIPS 投与し LD50 値の得られる投与量を探索した (各群 2 匹)。

2) 上記の結果に基づき急性肺障害による斃死が少なく、腎、肝に対する毒性の観察され得る用量と投与期間、回数を検討するために 4 回投与 (合計投与量 200、300 または 400mg/ラット) し、投与終了後 1 週間における肺、肝および腎障害を組織学的に解析した。

Group 1 (G1): 1 時間に 1 回、4 時間で投与終了

G2: 3 時間に 1 回、12 時間で投与終了

G3: 12 時間に 1 回、48 時間で投与終了

G4: 1 日 1 回、4 日で投与終了

(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、医動 19-35)、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

① 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 0.04g、相対重量 0.32 \pm 0.01g) と比較して、対照群 (絶対重量 1.34 \pm 0.03g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.47 \pm 0.01g、 $P < 0.001$)、FLW 群 (絶対重量 1.50 \pm 0.09g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.54 \pm 0.04g、 $P < 0.001$)、MWCNT-7 群 (絶対重量 1.60 \pm 0.07g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.56 \pm 0.03g、 $P < 0.001$)、MWCNT-N 群 (絶対重量 1.64 \pm 0.04g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.59 \pm 0.01g、 $P < 0.001$) で有意な上昇を認めた。また、対照群と比較して、FLW、MWCNT-7、MWCNT-N 投与により、有意に増加した (いずれも $P < 0.001$)。肺胞内 CD68 陽性マクロファージ量は、対照群と比較して各投与群で有意に増加した (FLW: $P < 0.01$ 、MWCNT-7、MWCNT-N: $P < 0.001$)。電子顕微鏡 (SEM、TEM) 観察では、肺胞内に各被検物質が確認された。一方肺における *Ccl2*、*Ccl3* および *Ccl9* mRNA 発現レベル及び ROS 量は、MWCNT-7、MWCNT-N のみ対照と比較して有意に上昇した (いずれも $P < 0.001$)。

1) dxn 投与量が 750mg では肺毒性 (肺胞内出血) が軽度～中程度に見られた。さらに高用量 (1050、1200mg) では、高度の急性びまん性肺出血のために実験中で死亡したため、腎、肝の障害はほとんど見られなかった。従って、合計投与量は 750mg 以下と算定され、以下の実験を実施した。

2) G1-G4 いずれも生存率は 100% を示した。G1 において、肺障害が軽微で、腎の近位尿細管上皮のアポトーシス誘導が最も顕著であった。従って、短期投与を終了し、1 週間程度の観察後に屠殺するモデルが最適と考えられた。すなわち、1 時間に 1 回、計 4 回で投与終了後、1 週間程度における全身臓器の毒性をみるのが急性毒性の評価に最適であることが確

認められた。

D. 考察

FLW、MWCNT-7 および MWCNT-N においては、対照群と比較して有意な肺重量や肺胞マクロファージの増加を認めた。一方で、炎症性サイトカイン発現や ROS 蓄積量は、MWCNT sのみで有意な上昇を伴っており、FLW ではそれらの酸化ストレス因子に変化はなかった。MWCNT-N については、TIPS 投与による肺、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 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)。これらのことから、TIPS 投与による被験物質の毒性評価の指標の一つとして、酸化ストレスが有用である可能性が示唆された。

また dxn をモデル物質として、TIPS 投与の普遍性を吸入曝露試験と比較検討した結果、dxn の LC50 に相当する 481mg/300-350g ラットをカバーできる総用量にて 1 時間ごとに 4 回投与後 8 日まで観察するのが最適であることがわかり、acrolein、1,2-dichloropropane、dichloromethane、N,N-dimethylformamide、tetrachloroethylene、glycidol、xyrol 等について、次年度以降に TIPS 法による有害性を検証する目処がついた。

E. 結論

ラット短期間気管内投与モデルを用いて、フラーレンウィスカーとカーボンナノチューブの肺毒性について比較検討した。その結果、酸化ストレスは物質によって異なることが分かり、急性毒性の指標に使用できる可能性が示唆された。また、比較的毒性の強い毒劇物の評価においての LC50 値に近い用量にて実施した気管内投与の実験では、意外に肺に対する直接毒性が顕著にみられ、それによる短期の斃死率が高いことにより肺を除く全身臓器における毒性評価は困難となることがわかった。この面での工夫とデータの集積を重ねつつ手法を構築する必要がある。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Yeewa R, **Nai ki-Ito A (Corresponding Author)**, Nai ki T, Kato H, Suzu ki S, Chewonarin T, Ta kaha shi S. Hexane Insoluble Fraction from

Purple Rice Extract Retard sCarcinogene s and Ca sration-Re s sistant Cancer Growth of Pro sstate Through Suppre s sion of Androgen Receptor Mediated Cell Proliferation and Metaboli sn. Nutrient s 12: pii: E558, 2020.

2. Iida K, Nai ki T, **Nai ki-Ito A (Corresponding Author)**, Suzu ki S, Kato H, Noza ki S, Nagaya shi Y, Nagai T, Etani T, Ando R, Kawai N, Ya shi T, Ta kaha shi S. Luteolin s s s s s s bladder cancer growth via regulation of mechani s ic target of rapamycin (mTOR) pathway. Cancer Sci. 111:1165-1179, 2020.
3. **Nai ki-Ito A**, Nai ki T, Kato H, Iida K, Etani T, Nagaya shi Y, Suzu ki S, Yama shita Y, Inaguma S, Oni shi M, Tana ka Y, Ya shi T, Ta kaha shi S. Recruitment of miR-8080 by luteolin inhibit s androgen receptor s s l i c e variant 7 expre s sion in ca sration- re s sistant pro sstate cancer. Carcinogene s s in pre s s
4. Suzu ki S, Cohen SM, Arnold LL, Pennington KL, Kato H, Nai ki T, **Nai ki-Ito A**, Yama shita Y, Ta kaha shi S. Cotinine, a major nicotine metabolite, induce scell proliferation on urothelium in vitro and in vivo. Toxicology. in pre s s
5. Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander WT, Numano T, Iigou M, **Nai ki-Ito A**, Ta ka shi H, Hiro shi A, Taquaha shi Y, Kanno J, Abdelhamid M, Abdou KA, Ta kaha shi S, Alexander DB, T suda H. Carcinogenic effect of pota s s s u m octatitanate (POT) fiber sin the lung and pleura of male Fi ssher 344 rat safter intrapulmonary admini sration. Part Fibre Toxicol. 16:34, 2019.
6. Numano T, Higuchi H, Alexander DB, Alexander WT, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Saleh D, Ta ka shi H, Hiro shi A, **Nai ki-Ito A**, Suzu ki S, Ta kaha shi S, T suda H. MWCNT-7 admini stered to the lung by intratracheal in s s illation induce s development of pleural me s s thelioma in F344 rat s Cancer Sci. 110:2485-2492, 2019.

7. Suzu ki S, Toyoda T, Kato H, **Nai ki-Ito A**, Yama shita Y, A lagi J, Cho Y.M, Ogawa K, Ta laha shi S. Dimethylar snic acid may promote prostate carcinogene s sin rat s J Toxicol Pathol. 32:73-77, 2019.
8. Abdelgied M, El-Gazzar AM, Alexander DB, Alexander WT, Numano T, Iigou M, **Nai ki-Ito A**, Ta ka s H, Abdou KA, Hiro s A, Taquaha shi Y, Kanno J, Abdelhamid M, T suda H, Ta laha shi S. Pulmonary and pleural toxicity of pota ssum octatitanate fiber s rutile titanium dioxide nanoparticle s and MWCNT-7 in male Fisher 344 rat s Arch Toxicol. 93:909-920, 2019.
9. Etani T, Nai ki T, **Nai ki-Ito A**, Suzu ki T, Iida K, Noza ki S, Kato H, Nagaya shi Y, Suzu ki S, Kawai N, Ya shi T, Ta laha shi S. NCL1, A Highly Selective Ly sne-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Ca sration-Re sstant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apopto s and Autophagy. J Clin Med. 8, pii: E442, 2019.

2. 学会発表

1. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、山下依子、高橋智。Luteolin は RNA サイレンシングによる AR-V7 制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 108 回日本病理学会、千代田(2019 年 4 月)
2. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智。Luteolin は RNA サイレンシングによる AR-V7 制御により去勢抵抗性前立腺癌を抑制する、第 26 回日本がん予防学会総会、札幌(2019 年

6 月)

3. Aya Nai ki-Ito, Ta ku Nai ki, Hiroyuki Kato, Yori ko Yama shita, Satoru Ta laha shi. Chemotherapeutic effect of luteolin on ca sration-re sstant prostate cancer through inhibition of androgen receptor splice variant, 第 78 回日本癌学会学術総会、京都(2019 年 9 月)
4. 内木綾、加藤寛之、鈴木周五、高橋智。去勢抵抗性前立腺癌における androgen receptor splice variant の役割と microRNA による制御機構、第 36 回日本毒性病理学会、世田谷(2020 年 2 月)
5. 内木綾。非アルコール性脂肪肝炎・肝線維症に対する細胞間コミュニケーションの役割と予防剤の探索、第 93 回日本薬理学会年会、横浜(2020 年 3 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