

厚生労働科学研究費補助金研究報告書
化学物質リスク研究事業

**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**

平成 29 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

平成 30 年（2018 年）5 月

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

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
(H28-化学-一般-004)

平成 29 年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 津田 洋幸

平成 30 年 (2018 年) 5 月

目 次

・ 総括研究報告書	1
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 津田 洋幸	3
・ 研究分担報告書	12
1. カーボンナノチューブ等の全身臓器における毒性並びに発癌リスクの研究 津田 洋幸	14
2. フラーレンナノウィスカーの肺・胸膜毒性および発がん性に関する研究 内木 綾	18
3. 動物実験 遺伝子蛋白解析 菅野 純	22
4. カーボンナノチューブ吸入暴露による気道クリアランスと 細胞マクロファージへの影響 山村 寿男	28
5. MWCNTs 肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物とその生理活性に関 する研究 伴野 勸	31
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	33
・ 研究成果の刊行物・別冊	37

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、発がん性の評価法を開発を目指した。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变化の解析を行う。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 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)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:

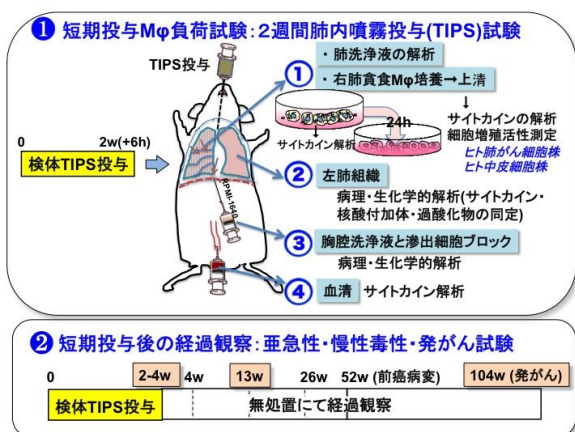
MWNT-7またはMWCNT-NをTaquann法によって高分散性の乾燥検体を用いた(高橋・菅野分担・研究協力者)。MWCNTの組織細胞内測定では、マーカー法によるMWCNTの微量定量法:カーボンナノチューブの表面に存在するグラフェン構造面に対して選択的に結合するBenzo[ghi]perylene (BgP)をマーカー分子としてMWCNTと混合した。過剰なBgPを洗浄除去後、BgPを抽出しHPLCにて定量して検量線を、MWCNTの質量に換算した(菅野)。

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 μ g/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 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 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±0.11, n=12, p>0.05 vs. 1.00±0.12 of vehicle, n=12; 2 h, 0.53±0.12, n=12, p>0.05 vs. 0.78±0.17, n=12; 1 d, 0.29±0.08, n=12, p<0.05 vs. 0.75±0.16, n=12; 7 d, 0.53±0.11, n=13, p<0.05 vs. 0.88±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±0.11, n=12, p>0.05 vs. vehicle; 2 h, 0.67±0.17, n=12, p>0.05; 1 d, 0.46±0.10, n=12, p>0.05; 7 d, 0.50±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±0.03, n=4, p>0.05 vs. 0.03±0.02 of vehicle, n=4; 1 d, 0.03±0.02, n=4, p>0.05 vs. 0.04±0.02, n=4; 7 d, 0.18±0.01, n=4, p<0.05 vs. 0.11±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±0.03, n=4, p>0.05 vs. vehicle; 1 d, 0.07±0.03, n=4, p>0.05; 7 d, 0.07±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±2.62%, n=4; MWCNT-B, 5.60±0.44% vs. 2.45±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

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)

. 研究分担報告書

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:カーボンナノチューブ等の全身臓器における毒性並びに発癌リスクの研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学特任教授

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博士課程

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

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さらなる実施は困難である。現状では我国で世界に先駆けて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、および長期吸入曝露試験にてMWCNT-7に肺に発がん性が報告されたのみである。本研究では、ラットを用いて短期気管内投与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)について障害作用について検討を加えた。

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2nm)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)。

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年間吸入曝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、活性化マクロファージ (M ϕ) 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、被検体の障害製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) にて大きな注目を得た。

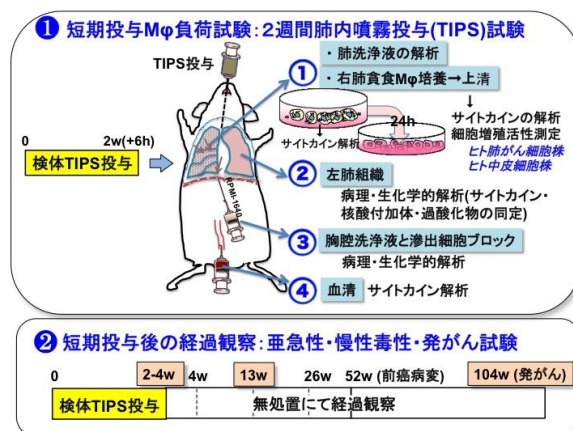
B. 研究方法

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) およびDWCNT (直径2nm) を用いた。

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材料、気管肺洗浄液 (BALF)、胸腔洗浄液 (PLF) 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。



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 群では有意差はなかった。

(論文執筆中)

DWCNTにおいて肺胞内のM ϕ 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。

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。

MWCNT-AとMWCNT-Bに発がん性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.TIPS投与法は従来の多くの腹腔内投与法に較べてヒトのリスク評価への外挿において合理性がある。

4.胸腔洗浄液の解析は線維状物質に特異的とも言える胸膜病変について多くの有用な情報が得られる。

5.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、今までに62物質が再評価され、そのうち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)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。

6.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いる。本法における経時観察によって前がん病変を把握できれば、中期検索法として評価アルゴリズ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。

7.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。

E. 結論

1.H28度の申請の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、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。

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., Iigo 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.

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

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, Hirotugu 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, Hirotugu 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, Hirotugu 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

H. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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。フラーレンウィスカー(FLW)は、C⁶⁰やC⁷⁰などのフラーレン分子(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。C⁶⁰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 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）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 ± 0.04 g、相対重量 0.32 ± 0.01 g）と比較して、対照群（絶対重量 1.34 ± 0.03 g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.47 ± 0.01 g、 $P < 0.001$ ）、FL群（絶対重量 1.40 ± 0.08 g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.50 ± 0.03 g、 $P < 0.001$ ）、FLW群（絶対重量 1.50 ± 0.09 g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.54 ± 0.04 g、 $P < 0.001$ ）、MWCNT-7群（絶対重量 1.60 ± 0.07 g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.56 ± 0.03 g、 $P < 0.001$ ）、MWCNT-N群（絶対重量 1.64 ± 0.04 g、 $P < 0.001$ 、相対重量 0.59 ± 0.01 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 ± 3.2 mg/dl、 31.7 ± 6.3 µg/ml）と比較してFLW（ 14.3 ± 3.4 mg/dl、 39.0 ± 7.6 µg/ml）、MWCNT-7（ 13.5 ± 3.3 mg/dl、 40.3 ± 8.9 µg/ml）、MWCNT-N（ 13.5 ± 4.9 mg/dl、 37.4 ± 13.4 µg/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、有意な肺重量や肺胞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 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

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

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

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(H28-化学-一般-004)

分担研究課題:動物実験 遺伝子蛋白解析

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 独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 所長
研究協力者	大西 誠	独立行政法人労働者健康安全機構 日本バイオアッセイ研究センター 試験管理部分析室 技術専門役
研究協力者	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

研究要旨

本研究の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧(TIPS)投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。本分担研究では、ラットを用いた2週間のTIPS投与試験に供するMWCNT検体について、単離繊維成分が豊富な分散性の高い検体を調製すること、及びMWCNTの肺負荷量の経時的変化の解析である。

高分散検体の供給では、研究分担者が独自に開発した凝集体・凝固体を除去し単繊維成分のみを高度に分散した乾燥検体を得る方法(Taquann法)により、MWNT-7及びMWCNT-Nについて処理を行い研究代表者に供給した。肺負荷量測定に関しては、測定のための準備を行った。TIPSでは投与した検体のほぼ全量が肺に負荷されるが、2週間の投与期間後に最長104週まで経過観察を行うため肺負荷量の減衰を把握する必要がある。研究分担者は、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとしてMWCNTを定量する方法(大西法)を開発している。今年度は、Taquann法処理したMWCNTに適応可能であるかを検討した。その結果、MWNT-7とマーカーの面積値は、相関係数0.9997であり、MWNT-7を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、MWNT-7は0.2~2.0 µg/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。

A. 研究目的

本研究の目的は、ナノマテリアルの中でも生産量の最も多い多層カーボンナノチューブ（MWCNT）の有害作用/発癌性評価の加速化を可能にする普遍性と信頼性のある新たな高効率評価手法の確立を行うことにある。具体的には、ラットを用いて吸入曝露実験の簡便法として経気管肺内噴霧（TIPS）投与方法により、有害作用/発癌性の発生機序に基づく高効率な評価方法の開発を行う。本分担研究では、ラットを用いた2週間のTIPS投与試験に供するMWCNT検体について、独自に開発したTaquann法により処理を行い、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すること、及びMWCNTの肺負荷量の経時的变化の解析である。

MWCNTには製造過程で共有結合により分岐あるいは凝集状態を示す成分（以下、凝集成分）が含まれている。この凝集成分が気道末梢の比較的近位に捕捉されるため、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。ヒトに比較して細い気道径を有するマウスを用いた動物実験では、凝集成分によるこのような影響が大きいことが推察されるため、実験動物を使用してヒトへの外挿性の高いデータを得るためには、凝集成分を除去した上で分散性に優れた検体を使用する必要がある。

TIPSは吸入曝露とは異なり、投与した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、投与後の2週間は休薬して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。本分担研究では、Benzo[ghi]peryleneをマーカーとしてMWCNTを定量する方法（大西法）を用い、Taquann法処理したMWCNTに適応可能であるかを検討した。

B. 研究方法

B-1 MWNT-7 Taquann 処理検体(図 1)

MWNT-7の原末500 mgをビーカーに入れ、35℃に加熱して溶解したターシャルブタノール（以下、TB、融点；25.69℃）約250 mLを加えてステンレス製のスパーテルで攪拌して混合した。次に、混合液を氷冷しながらスパーテルで攪拌しTBがシャーベット状になった状態でMWNT-7とTBを十分に混和し、1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃で一晩凍結した。約60℃に加熱したTBを添加し全量を1,000 mLとした（凍結再融解処理）。凍結再融解したMWNT-7のTB懸濁液を超音波洗浄器（SU-3TH、柴田科学株式会社、出力40W）により15分間の処理を行い、高分散性の懸濁液を得た。

MWNT-7の懸濁液を約50℃に加熱し、金属製フィルター（セイシン企業、目開き25 μm）にてろ過し大型の凝集体を除去した。金属製フィルターには携帯電話に使用されている振動モーター（FM34F T.P.C. DC MOTOR、振動量：17.6m/s²）をリムに4個装着し、フィルターを振動させながらろ過を行った。得られたろ液を直ちに液体窒素で凍結・固化させた。固化した状態のMWNT-7懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプ（Vacuubrand、MD4C NT+AK+EK）でTBを液相を介さずに蒸散（昇華）させ分離除去し、MWNT-7の高分散性の乾燥検体を得た。

B-2 MWCNT-N Taquann 処理検体

MWCNT-Nの原末は、肉眼観察ではフレーク状を呈し、走査型電子顕微鏡による観察では、繊維が絡みあって不織布状の様相と呈している。粉末～繭状凝集体の外観を呈するMWNT-7とは大きく異なる。

MWCNT-Nの原末500 mgをビーカーに

とり、35℃ に加温して溶解したTB約250mLを加えてステンレス製の小型ホイッパーで攪拌し懸濁した。次に、懸濁液を氷冷しながらホイッパーで攪拌しシャーベット状になった状態で均一な懸濁を得るまで十分に攪拌し1,000 mL容量のメディウム瓶に移し、-25℃ で一晩、凍結状態で静置した。次いで、これに約60℃ に加温したTBを添加し融解して全量1,000mLの懸濁液とした。

この、凍結再融解したMWCNT-NのTB懸濁液に対しサンプル密閉式超音波破砕装置 BIORUPTOR®UCD-250HSA (コスモ・バイオ株式会社)にて、出力160W、30秒間の超音波照射を6回繰り返し、MWCNT-Nが十分に分散した懸濁液を得た。以降、MWNT-7と同様に濾過、凍結・固化、TBの分離を行い、分散性の高い乾燥検体を得た。

B-3 MWNT-7 Taquann処理検体のマーカー法による測定方法の検討

低分子化合物の体内動態は、mass spectroscopyあるいはisotopeを用いて定量することが一般に行われている。カーボンナノチューブ(CNT)の体内動態の測定にもこれに準じた方法が適用され、isotopeとmass spectroscopyを使用する方法、Raman分光を使用する方法、組織を灰化して除去後更に高温でCNTをメタンとして定量する方法が報告されている。一方、研究分担者ら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、グラファイト積層と同様の選択制のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いた、MWCNTの極微量定量法を開発している(図2)。具体的には、マーカー分子としてBenzo[ghi]perylene (BgP)を用い、MWCNTと混合してBgPをMWCNTの表面に吸着させる。過剰なBgPを洗浄除去後、MWCNT表面からBgPを抽出しHPLCにて定量し、MWCNTの質量に換算する(個々のMWCNT検

体毎に、検量線が得られることを確認して実施する)。既に技術は確立済みであるが、Taquann法処理したMWCNTにはTB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。

(1) HPLC測定条件

HPLC：ウォータース Acquity UPLC

カラム：Acquity BEH C18 (ウォータース)

カラム粒径、長さ × 内径：1.7 μm、100 mm × 2.1 mm

カラム温度：40

検出器：蛍光検出器(励起波長：294 nm、蛍光波長：410 nm)

試料注入量：5 μL

移動相組成：アセトニトリル：メタノール：蒸留水 =75：20：5

移動相流量：0.5 mL/min

(2) Taquann法処理MWNT-7原液の調製

Taquann法処理MWNT-7(T-CNT) 約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、アルカリ性次亜塩素酸洗浄剤(Clean 99-K200、以下C99、クリーンケミカル株式会社)を2 mL加えてタッチミキサーで分散させ、100 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブへ移し、この操作を4回繰り返し、最後にC99で100 mLにメスアップした。その溶液を超音波分散機(VP-30S、タイテック)により、発振周波数20 kHz、出力300Wの条件で1分間超音波を照射し検体を分散させた。

(3) 検量線溶液の調製

所定量のT-CNT原液をPPチューブに採取し、C99にてメスアップし、1分間超音波を照射して分散させ、下記の検量線液C1～C6を調製した。

試料名	C5採取量 (mL)	C99添加量 (mL)	濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)
溶液C1	0.1	0.9	0.2
溶液C2	0.2	0.8	0.4
溶液C3	0.4	0.6	0.8
溶液C4	0.6	0.4	1.2
溶液C5	0.8	0.2	1.6
溶液C6	1.0	0.0	2.0

(4) マーカー溶液の調製

200mL 容 の メ ス フ ラ ス コ に Benzo[ghi]perylene(マーカー)約1mgを秤量し、アセトニトリルを加え十分に溶解し、アセトニトリルでメスアップしてBgPのマーカー原液(5.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$)とした(冷暗所に保存)。マーカー原液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合撹拌した溶液2.5 mLを9.6%PBS水溶液+ 0.1% Tween水溶液 (TW-mixture) 50 mLに加え混合撹拌し、マーカー溶液とした。

(4) 試料の前処理とHPLCによる測定

各検量線溶液1 mLに沈殿硬化液(バイオアッセイ研究センターにて開発)をそれぞれ60 μL ずつ添加した。10秒間超音波を照射して分散し、遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベックマンコールター)にて12000 rpm、10分間の条件で遠心分離した。上清を除去し、TW-mixtureを1 mL加え、再度12000 rpmで10分間遠心分離した。上清を除去し、それぞれに濃硫酸(和光純薬工業株式会社)0.2mLを加え、残渣を分解し、タッチミキサーで10秒間撹拌した。その後、マーカー溶液1 mLをそれぞれに添加し、10秒間超音波分散し、振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)で15分間撹拌させた後、0.8 μm のフィルター(ワットマン: GE Healthcare UK Ltd)でろ過したフィルター上のMWNT-7をポンチ(8 mm ϕ)でくり抜き、PP試験管に入れ、アセトニトリル1 mLを加え、タッチミキサーで10秒間撹拌・抽出し、その溶

液をHPLCで測定した。

C. 研究結果及び考察

C-1 Taquann法処理検体の調製

Taquann法処理により、MWNT-7 210 mg、MWCNT-N 166mgを調製した。

C-2 マーカー法によるT-CNTの検量線

Taquann処理されたT-CNTの検量線を図3に示した。T-CNT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。これらのことから、T-CNTは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。尚、Taquann処理の有無は、少なくともMWNT-7の測定に対しては影響しなかった。

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。

D. 結論

Taquann法にて分散処理を施したMWNT-7、及びMWCNT-Nについては、マーカー法にて測定が可能であることが示された。また、Taquann処理が測定に影響する可能性は低いことが確認された。

E. 健康危機情報

なし

F. 研究発表

1. 論文発表

Take M, Takeuchi T, Hirai S, Takano 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

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)

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

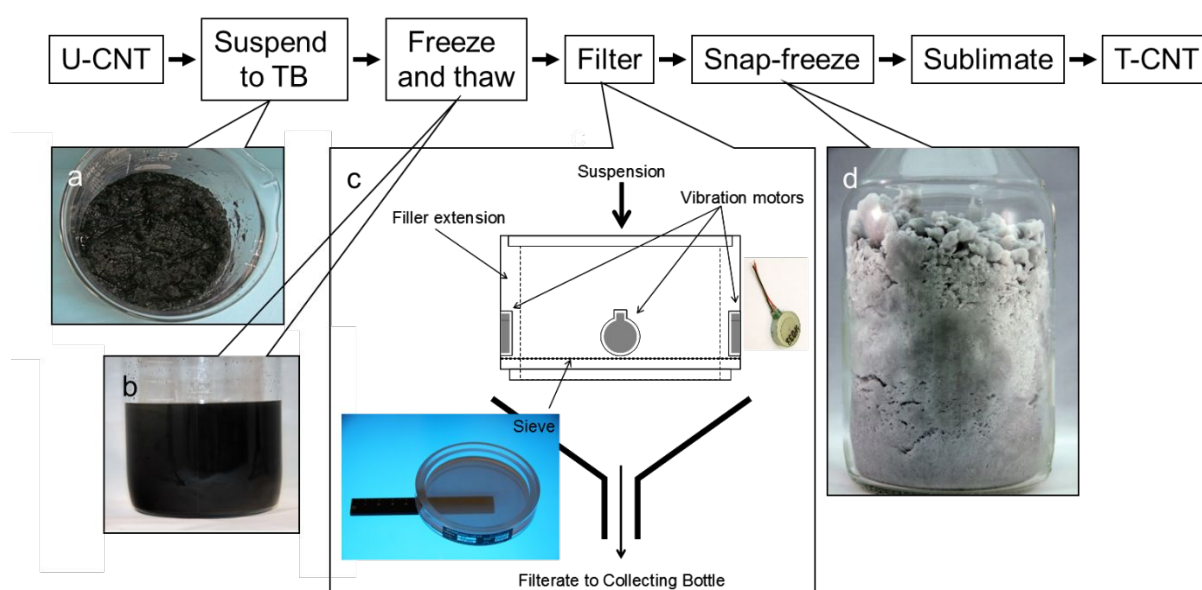


図 1 Taquann 法の概要

MWCNT 原末をターシャルブタノール (TB) に混合する。氷冷下でスパーテルを用いて攪拌し TB をシャーベット状にして十分に混和する (a)。TB への分散性を向上させることを目的として、 -25°C で一晩凍結したのち 60°C に加温した TB を加え凍結再融解を行う (b)。金属製フィルター (目開き $25\ \mu\text{m}$) でろ過し大型の凝集体を除く (c)。ろ液は直ちに液体窒素で凍結・固化させる (d)。固化した状態の MWCNT 懸濁液を固相のまま溶媒回収型真空ポンプで液相を介さずに乾燥させ、TB を分離除去することで、分散性の高い乾燥状態の MWCNT を得る (Taquahashi et al., JTS, 2013)。

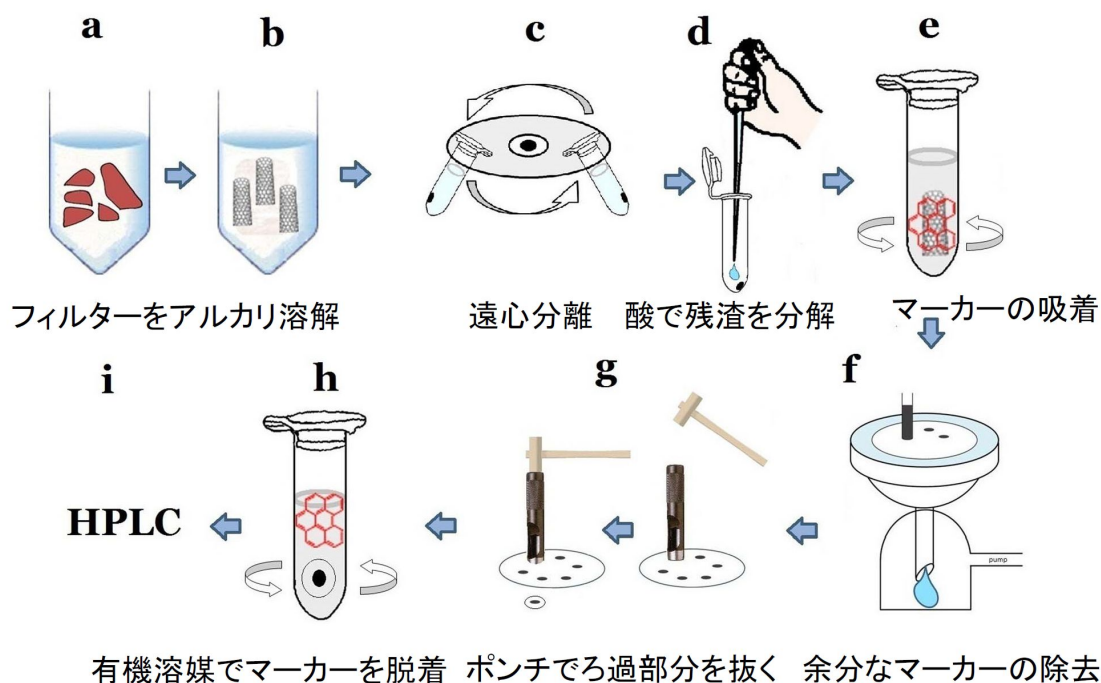


図 2 マーカーを用いた MWCNT 微量定量法（大西法）の概要

MWCNT の質量に比例して吸着するマーカーを用いた極微量定量法（大西法）。マーカーとして Benzo[ghi]perylene (BgP) を用い、MWCNT と混合して BgP を MWCNT の表面に吸着させる。過剰な BgP を洗浄して除去後、MWCNT 表面から BgP を抽出して HPLC にて定量し MWCNT の質量に換算する。

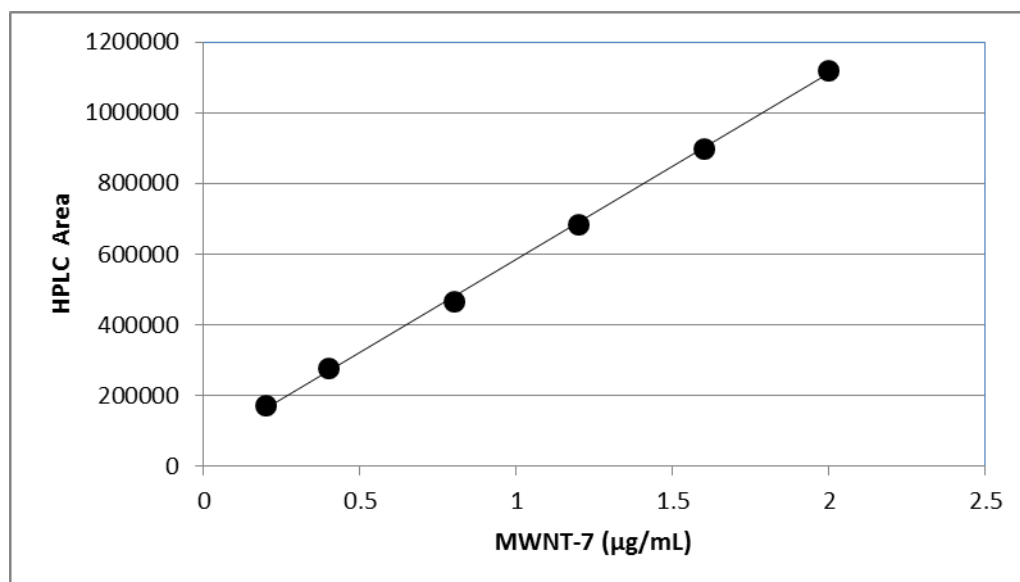


図 3 Taquann 処理 MWNT-7 (T-CNT) の大西法による検量線

T-CNT とマーカーの面積値は、相関係数 0.9997 であり、T-CNT を測定するために、良好な直線性を示した。これらのことから、MWNT-7 は 0.2~2.0 µg/mL の範囲内で、正確な定量が可能であることが示された。

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:カーボンナノチューブ吸入暴露による気道クリアランスと
肺胞マクロファージへの影響

分担研究者	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
研究協力者	神藤秀基	名古屋市立大学薬学部薬学研究科	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

研究要旨

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ことは重要である。そのため、気道および肺での異物排除機構の中核を担う気道上皮繊毛細胞と肺胞マクロファージに注目し、機能解析を進めている。本年度は、ラットから単離した肺胞マクロファージを用いて、カーボンナノチューブの急性的な細胞障害による細胞死の様式を解析した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は時間依存的に減少した。一方、MWCNT-Sの肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-L と比較して弱かった。MWCNT の大きさや形状が、呼吸器系細胞の障害性に影響することが分かった。ただし、MWCNT 暴露による肺胞マクロファージの細胞死は、アポトーシスによらないことが推測された。以上より、MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージの機能障害は、アポトーシス以外の細胞死の様式が関与することが示唆された。

A. 研究目的

各種ナノマテリアル、特にカーボンナノチューブは異物として排泄されにくいいため、長期的に気道や肺などの呼吸器官に貯留し、組織障害や発がんを引き起こす。そのため、カーボンナノチューブ暴露の初期における直接的な呼吸器細胞障害を解析することは、その病態分子機構の解明につながると考えられる。

これまでに我々は、異物の口腔側への輸送を直接的に担う気道上皮繊毛細胞に着目し、その細胞障害性を定量的に評価できる簡便な気道クリアランス評価系を確立し、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)を気管内噴霧した際の気道クリアランス評価法として活

用した。

本研究では、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージに注目して、機能解析を進めている。本年度は、ラットから単離した肺胞マクロファージを用いて、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。

B. 研究方法

1) 肺胞マクロファージの生存率測定

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、肺胞マクロファージを得た。単離した肺胞マクロファージを RPMI 1640 培地で 24 時間培養後、10000 細胞/ウェルになるように 96 穴プレートに播種した。次に、カーボンナノチューブである MWCNT-S(直径 15 nm、長さ 3 μ m、250 ppm、昭和電工)または MWCNT-L(直径 150 nm、長さ 10 μ m、250 ppm、昭和電工)を 10 μ g/ml 添加し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を MTT 法 (Sigma-Aldrich) を用いて測定した。対照群には、溶媒である 0.5% PF68 を含有する生理食塩水を添加した。

2) 肺胞マクロファージの細胞障害性解析

細胞障害性を測定する乳酸脱水素酵素 (LDH) アッセイは、MWCNT を添加した 2 時間、1 日、7 日後に Cytotoxic LDH Assay Kit-WST (同仁化学) を用いて行った。

3) 肺胞マクロファージのアポトーシス解析

アポトーシスを検出するカスパーゼ 3/7 アッセイは、MWCNT を添加した 2 時間、1 日、7 日後に Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いて行った。

(倫理面への配慮)

本研究における動物実験は、名古屋市立大学の動物実験指針に基づき適正に行った。本実験は、名古屋市立大学・動物バイオ倫理委員会で承認済である(承認番号:H24-P-13)。

C. 研究結果

1) MWCNT 暴露による肺胞マクロファージの生存率低下

ラットから単離した肺胞マクロファージに MWCNT-L、MWCNT-S、PF68(溶媒対照群)をそれぞれ暴露し、2 時間、1 日、7 日後の細胞生存率を MTT 法で測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージの生存率は、2 時間後から時間依存的に減少した (0 h, 0.83 ± 0.11 , $n=12$, $p>0.05$ vs. 1.00 ± 0.12 of vehicle, $n=12$; 2 h, 0.53 ± 0.12 , $n=12$, $p>0.05$ vs. 0.78 ± 0.17 , $n=12$; 1 d, 0.29 ± 0.08 , $n=12$,

$p<0.05$ vs. 0.75 ± 0.16 , $n=12$; 7 d, 0.53 ± 0.11 , $n=13$, $p<0.05$ vs. 0.88 ± 0.08 , $n=13$)。一方、MWCNT-S も肺胞マクロファージの生存率を低下させた (0 h, 0.86 ± 0.11 , $n=12$, $p>0.05$ vs. vehicle; 2 h, 0.67 ± 0.17 , $n=12$, $p>0.05$; 1 d, 0.46 ± 0.10 , $n=12$, $p>0.05$; 7 d, 0.50 ± 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 暴露による肺胞マクロファージの細胞障害

ラットから単離した肺胞マクロファージに MWCNT-L、MWCNT-S、PF68(溶媒対照群)をそれぞれ暴露し、2 時間、1 日、7 日後の細胞障害性を LDH アッセイで測定した。MWCNT-L 暴露によって、肺胞マクロファージは障害された (2 h, 0.04 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$ vs. 0.03 ± 0.02 of vehicle, $n=4$; 1 d, 0.03 ± 0.02 , $n=4$, $p>0.05$ vs. 0.04 ± 0.02 , $n=4$; 7 d, 0.18 ± 0.01 , $n=4$, $p<0.05$ vs. 0.11 ± 0.01 , $n=4$)。一方、MWCNT-S による肺胞マクロファージへの細胞障害性は高くなかった (2 h, 0.09 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$ vs. vehicle; 1 d, 0.07 ± 0.03 , $n=4$, $p>0.05$; 7 d, 0.07 ± 0.02 , $n=4$, $p>0.05$)。

3) MWCNT 暴露による肺胞マクロファージのアポトーシス解析

ラットから単離した肺胞マクロファージに MWCNT-L、MWCNT-S、PF68(溶媒対照群)をそれぞれ暴露し、2 時間、1 日、7 日後の細胞死を観察した。アポトーシス解析には、カスパーゼ 3/7 アッセイを用いた。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-S 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かった (MWCNT-L, $3.53 \pm 2.62\%$, $n=4$; MWCNT-S, $5.60 \pm 0.44\%$ vs. $2.45 \pm 2.75\%$ of vehicle, $n=4$)。

D. 考察

本年度は、肺の異物排除機構の中核を担う肺胞マクロファージに注目し、それに対するカーボンナノチューブの毒性や障害性を評価し、肺クリアランスの指

標とすることを目指した。MTT 法の結果、MWCNT-L は肺胞マクロファージの生存率を顕著に抑制することが示された。一方、MWCNT-S の肺胞マクロファージに対する毒性は、MWCNT-L と比較して弱かった。同様の結果が、細胞障害性の指標である LDH アッセイによっても認められた。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の一つであることが明らかになった。

また、カーボンナノチューブによる肺胞マクロファージの細胞死の様式は、当初アポトーシスであることが推測された。しかし、本研究によるカスパーゼ 3/7 アッセイの結果、その細胞死は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マクロファージ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。

E. 結論

MWCNT が肺胞マクロファージに直接的に細胞障害を与えることが明らかになった。また、その障害の程度は、MWCNT-SよりもMWCNT-Lの方が高いことも分かった。さらに、カーボンナノチューブによる肺胞マクロファージの細胞死には、アポトーシス以外の細胞死の様式が関与していることが示唆された。以上より、MWCNT 吸入暴露による肺胞マクロファージの機能障害は、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ればと考えられる。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 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 Ca^{2+} 活性化 K^+ チャンネル新規修

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。

- 2) 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} チャン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。
- 3) 前田和輝、鈴木良明、山村寿男、今泉祐治。マウス骨髄マクロファージ機能に対する 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。

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。

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: MWCNTs 肺内投与によって生じる活性カルボニル化合物とその生理活性
に関する研究

分担研究者 伴野 勸 静岡県立大学 食品環境研究センター

研究要旨

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露による発がんメカニズムの解明を目的として、がん原性物質であることが示唆されている活性カルボニル化合物(RCs)の網羅的解析を MWCNTs 肺内投与ラット肺組織を用いて行った結果、*cis*-4-decenal や 4-hydroxy-2-nonenal、4-hydroxy-2-hexenal(4-HHE)など種々の RCsが増加していた。また、RCsのDNA付加体が増加していることを確認した。さらに増加していた RCsの慢性炎症への関与について、マウスマクロファージ様細胞RAW264.7を用いて調べた結果、4-HHEはIL-6やiNOS、IL-12p40のmRNA発現増加が、*cis*-4-decenalはIL-12p40やIL-23p19など炎症関連遺伝子群の有意な発現増加が確認された。これらのことから、MWCNTs肺内投与によって生じるRCsはDNA付加体の形成など直接的な傷害性の他に炎症性サイトカインの産生増加を惹起することでMWCNTsの慢性炎症にも関与していることが示唆された。

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)曝露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MWCNTs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、MWCNTs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の生理活性を調べることにした。

B. 研究方法

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をマウスマクロファージ様細胞である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- κ B luciferase assayを行った。

(倫理面への配慮)

本研究では、マウス由来培養細胞を用いており、倫理面で配慮が必要となるヒト由来細胞や動物等は使用していない。

C. 研究結果

マウスマクロファージ様細胞であるRAW264.7に4-HHEを曝露した結果、炎症関連遺伝子である対照群と比較して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 シグナルは誘導されなかった。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。

D. 考察

本研究で 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マクロファージ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、MWCNTs 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。

E. 結論

MWCNTs 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。

F. 健康危機情報

G. 研究発表

1. 論文発表
なし

2. 学会発表
なし

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

・ 研究成果の刊行に関する一覧表

研究成果の刊行に関する一覧表

書籍

著者氏名	論文タイトル名	書籍全体の 編集者名	書 籍 名	出版社名	出版地	出版年	ページ

雑誌

発表者氏名	論文タイトル名	発表誌名	巻号	ページ	出版年
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.		in press	2018
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	30	145-152	2017
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
Naiki T, Naiki-Ito A, 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, Kato H, Suzuki S, Kitano 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(17)	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, <u>Naiki-Ito A</u> , 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
Fuji S, Suzuki S, <u>Naiki-Ito A</u> , 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
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.	42(2)	121-128	2017

・ 研究成果の刊行物・別冊