

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 30 年度

総括・分担研究報告書

研究代表者 津田 洋幸

令和元年（2019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 30 年度 総括・分担研究報告書
研究代表者 津田 洋幸

令和元年(2019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	19
3 . 動物実験 遺伝子蛋白解析 菅野 純	23
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	30
5 . MWCNTs 肺内投与によって生成される活性カルボニル化合物および DNA 付加 体の網羅的解析 伴野 勸	34
・ 研究成果の刊行に関する一覧表	36
・ 研究成果の刊行物・別冊	38

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 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)、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

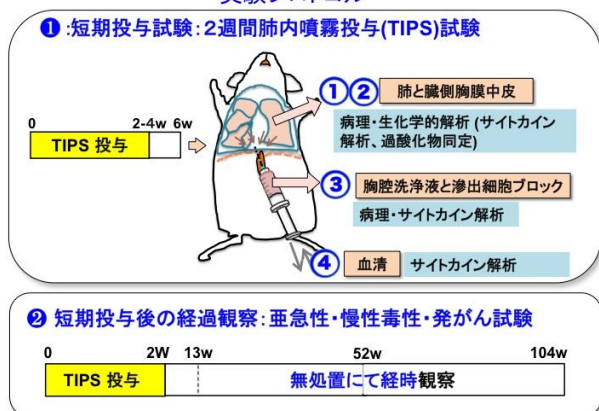
よる分散処理を行ったMWCNT-A(針状、直径150nm、210-215層)とMWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)をそれぞれ総投与量が0.5及び1.0mg/ラットになるように2週間に8回投与した。これとは別にMWCNT-7をRaquann法を用いずに超音波分散にて1.5mg/ラットにてTIPS投与した。(津田)。

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。実験を行わずの時間においても 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曝露の結果 (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

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)

・研究分担報告書

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: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

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

研究要旨

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。我々はそのMWCNT-7の発がん性が発表される以前に、ラットにおける気管内投与法を用いて多層CNT (MWCNT) MWCNT-Nに肺と胸膜中皮に発がん性のあることを報告した。本研究では、ラット経気管肺内噴霧投与法 (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なMWCNTの毒性・発がん性の評価法の開発を実施した。本研究では、壁の暑さの異なる2種のMWCNTおよびアスベスト Crocidolite (CRO) について、TIPS法投与における肺と胸膜中皮への障害作用と発がん性について検証し、TIPS法の有用性の検討を行った。

① 壁層の異なる MWCNT-A (針状、直径 150nm、210-215 層) と MWCNT-B (綿菓子状、直径 15nm、15-18 層) では、肺炎症の程度と誘導されたサイトカイン種数とその程度は 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 ($p < 0.01$)、CRO (7/20) ($p < 0.05$) であった。また、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)。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、炎症の程度、発がんに関与する DNA 障害性代謝物のかんよが示された。②の2週 TIPS 投与-2年無処置観察モデルは、さらに MWCNT-7 では新たに悪性中皮腫の発生すること (吸入曝露では肺腫瘍のみ) が発生することを明らかにした。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) 評価において圧倒的に低コストであり、リスク評価の加速化に十分に貢献できる。

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はラット・マウスへの腹腔内投与によって高率に腹腔悪性中皮腫を発生させることから、WHO国際癌研究機構(WHO/IARC)は「ヒト発がんの可能性のある物質(Group 2B)」と評価した。またMWCNT-7は日本バイオアッセイ研究センターにおける2年間吸入暴露試験では肺発がん性(悪性中皮腫は発生しない)を示すことが判ってきた。しかし、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。すなわち、新しく作られる個々のMWCNTについてリスク評価に資する吸入暴露発がん試験を実施する必要がある。しかし、その稼働費用・設備の面でほとんど実施は困難であり、MWCNT-7以外のMWCNTについて以後長期吸入暴露試験は実施されていない。本研究では、それに代替し得る簡便かつ低コストな気管内投与方法によってMWCNTの慢性毒性、発がん性の評価法を開発し、障害・発がん機序について明らかにすることを目的として以下の研究を実施している。

明らかにした範囲では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-N(N社製、MWCNT-7とは別社の製品)のTIPS投与後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, Chem Res Toxicol, 2018)。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、TIPS法を用いた①②の方法によってがん性の検索を行いつつシステムの検証を行ってきた(付図参照)。

① 検体のMWCNT(MWCNT-A、MWCNT-BおよびMWCNT-7)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。一部の実験

では検体はTaquann法にてエアロゾル分散したものを生食(抗凝集剤0.5% PF68 コポリマー添加)にて懸濁投与した。

② ラットへの2週間TIPS投与後無処置観察実験にて、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暴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)、MWCNT-B(綿菓子状、直径15nm、15-18層)、MWCNT-7(針状、直径100nm、40層)およびアスベストCrocidolite(UICC grade、針状、長さ24.4 \pm 0.5 μ m)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、MWCNT-7は1.5mg/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、moribundの個体は途中屠殺を行った。

① 2週間TIPS投与ラット肺胞と胸膜中皮由来の細胞等に対する増殖活性因子の把握：
物性と層数の異なる上記の15-150層MWCNT(発がん性未知のMWCNT-AとMWCNT-Bおよび暴露吸入試験で肺発がん性の報告されたMWCNT-7及びCrocidolite)をTaquann法にてエアロゾル分散後に加温tert-butylalcohol(室温で凍結する)に懸濁させて、投与直前に凍結乾燥して凝集体形成を最小限にして0.1%Tween含有PF68コポリマー溶液に懸濁した。これを0.25mg~1.5mg/ラットになるように2週間位8回TIPS法投与した。肺と縦隔リンパ節を摘出後、病理組織標本にて炎症像の観察を光顕、走査及び透過電顕観察を行い、凍結肺は炎症サイトカイン、ケモカイン種についてELISA計測した。

さらに、炎症と発がん機序の解析として、アルデヒドやケトンなどのタンパクアレイ解析や活性カルボニル化合物(RCs)の同定とRCs-DNA付加体についてLC/ESI-MS/MS(SRM)による網羅的解析を実施した。候補物質について不死化M ϕ を用いて

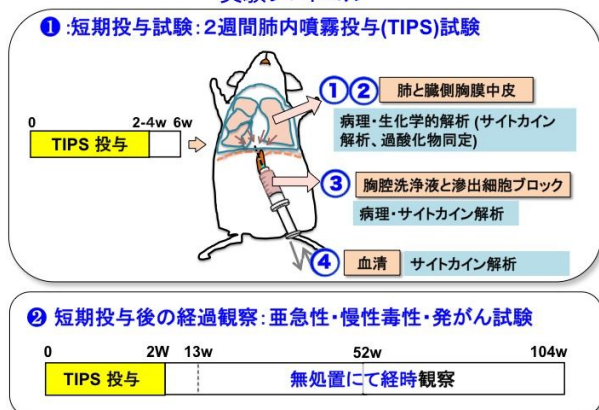
サイトカインの産生の把握を行っている。また、肺気管支洗浄液についても4°C、1000 rpm、5分間遠心して上清を除き、肺胞マクロファージを得て肺気管支の炎症と障害について解析した。

検体の凝集体成分を可能な限り減少させるために独自に開発した Taquann 法によって、気管内投与に適した検体を随時班員に供給している。Benzo(ghi)perylene 吸着法による投与前及び投与肺の MWCNT の定量測定(日本バイオアッセイ研究センター・大西氏法)を行い沈着量と所見との相関を明らかにする。

② 2週間TIPS投与後の長期経時観察：

① における検体投与ラットについて、投与終了後1週と52週での中間屠殺および104週における最終屠殺による慢性炎症の程度と発がん性の評価を行った。各屠殺群におけるMWCNTの量は、MWCNT計測のためのHPLC、透過型・走査型電子顕微鏡は主任研究者の施設の共同研究施設に設置されている。胸腔洗浄液の遠心沈渣は病理標本にして、炎症細胞の分画、偏光顕微鏡によるMWCNT数の算定を行った。胸膜等の慢性炎症と腫瘍発生について解析した。

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。crocitolite 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%)に胸膜中皮腫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。Crocitolite 群には悪性中皮腫の発生はなかった(論文投稿中)。

D. 考察

1) MWCNT-A と MWCNT-B では肺腫瘍の発生は MWCNT-B におおく、短期試験における炎症の程度の強さと相関する傾向が見られた。

2) MWCNT-7 では 95%の動物に悪性中皮腫の発生を見た。この結果は、日本バ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)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ことが明らかとなった。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が一因と考えられる。また CRO はこれらの MWCNT と比べて、肺と胸膜中皮に対する発がん性は検索した MWCNT より遥かに弱い。

3) 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、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)。さらにまた実際の曝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。

4) TIPS投与法は従来の多くの腹腔内投与法に比べてヒトのリスク評価への外挿において合理性がある。

5) 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。

6) 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。

7) 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。

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投与後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。事実、発がん性において、新たにMWCNT-AとMWCNT-Bの肺発がん性およびMWCNT-7の胸膜中皮発がん性を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. 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

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回日本毒性学会学術年会 大阪 2018年7月

- | | |
|---|---|
| <p>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</p> | <p>toxicology (EUROTOX2018) Brussels,
Belgium, Sept. 2018</p> |
| <p>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</p> | <p>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</p> |

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

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

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

本研究班の目的は、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。

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、投与後は休薬して最長104週まで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。H30年度の本分担研究では、DWCNTおよびMWCNTの肺負荷量の経時的变化の解析である。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。MWCNTを対象として開発した方法であるが、昨年度、DWCNTへの適用条件を構築し、今年度、TIPS投与された肺検体の測定を実施した。測定試料は、研究代表者から送付されたTIPS投与されたラットから経時的に採材した肺試料を用いた。投与検体は何れもTaquann法処理を行っている。その結果、検体の濃度とマーカーのHPLC測定における面積値の相関係数は、DWCNT、MWCNTそれぞれ0.9949、0.9961と良好な直線性を示し、0.2~1.0 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。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 µg/g、6週後では65.4 µg/g、中用量の投与2週後では137.0 µg/g、6週後では108.6 µg/g、高用量の投与2週後では248.8 µg/g、6週後では173.1 µg/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 µg/g、6週後では398.5 µg/gであった。非投与群および媒体対照群のラット肺には計測されなかった。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、グラファイト積層と同様の選択性のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いたMWCNTの極微量定量法である。本分担研究により、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。

A. 研究目的

本研究班の目的は、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。

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、投与後は休薬して最長104週まで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。

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性のある結合を示す、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1)。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、過剰なBgPを洗浄除去、MWCNT表面からBgPを抽出しHPLCにて定量してMWCNTの質量に換算する。MWCNT(MWNT-7、原末およびTaquann法処理検体)に関しては既に技術を確立済みであるが、DWCNTについては未検討であるため、肺からの抽出方法、測定方法について検討を行い、分析を行った。

B. 研究方法

B-1 測定試料

測定試料は、研究代表者から送付されたTIPS投与されたラットから経時的に採材した肺試料を用いた。何れも、投与2週後、6週後のサンプルを使用した。投与された検体はTaquann法処理を行っている。

G1:非投与群

G2:媒体対照群(Saline + 0.5%PF68)

G3:DWCNT低用量群(125 µg/rat)

G4:DWCNT中用量群(250 µg/rat)

G5:DWCNT高用量群(500 µg/rat)

G6:MWCNT(500 µg/rat)

B-2 DWCNTおよびMWNT-7のマーカー法による測定

(1) 装置、器具及び試薬

高速液体クロマトグラフ(HPLC、Acquity UPLC、ウォーターズ)

電子天秤(AE163、日本シベルワーグナー)

振とう機(TS-100、サーマル化学産業株式会社)

遠心分離機(Microfuge® 22R Centrifuge、ベッ

クマンコールター)
超音波分散機(VP-30S、タイテック)

(2) 試薬

アセトニトリル(HPLC用、富士フイルム和光純薬)
メタノール(HPLC用、富士フイルム和光純薬)
Benzo[ghi]perylene(BgP、試薬特級、富士フイルム和光純薬)
TWEEN 80(富士フイルム和光純薬)

(3) 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

(4) 肺溶解液の調製

あらかじめ80℃に加熱した超純水1400mLに100gのKOHを加えた。その溶液に1%SDS水溶液を200mL及び1%EDTA2Naを200mLを加えた。その後、アスコルビン酸40g添加し、超純水で2000mLにメスアップし、80℃で加熱することにより溶解状態とし、肺溶解液を調製した。

(5) 検量線原液の調製

DWCNTまたはMWCNTを各約5 mgを10 mL容のフタ無しガラス試験管に精密に秤量し、0.1% Tween水溶液(Tw-sol)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Tw-solで100 mLにメスアップした。その溶液を超音波分散機により1分間、超音波分散した。(以下用いる周波数と強度は20 kHz、

300 Wで共通、DWCNTまたはMWCNT各原液：50 μg/mL)

(6) 検量線溶液 C5 の調製

(5)項で調製したDWCNTまたはMWCNTの各原液0.2 mLを15 mL容のフタ・メモリ付のPPチューブに採取し、Tw-solにより10 mLにメスアップし、1分間超音波分散した。(検量線溶液C5：1 μg/mL)

(7) 検量線溶液 (C1～C5)の調製

(6)調製した検量線溶液C5を採取し、2mL容の遠心分離用チューブに入れ、さらにTw-solをそれぞれの量を添加して検量線溶液(C1～C5)を作成した(表1)。

表1

試料名	C5採取量 (mL)	Tw-sol添加量 (mL)	濃度 (μg/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

(8) マーカー溶液の調製

200mL容のメスフラスコにBenzo[ghi]perylene(BgP)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マーカー原液(5.0 μg/mL)とした(冷暗所に保存)。その溶液0.8 mLにアセトニトリル2 mL加え混合攪拌した溶液2.5 mLをTw-sol 50 mLに加え混合攪拌し、マーカー溶液とした。

(9) 肺試料からDWCNTおよびMWNT-7の抽出とサンプル調製

10%中性リン酸緩衝ホルマリン液に1か月以上

浸透した試料の肺を 50 mL の肺溶解液 (B-5-1) で 60 °C で 24 時間かけて溶解した。なお、操作開始前に気相部分は窒素ガスで置換した。溶解した肺溶液は 60 秒間超音波分散した。その溶液中の DWCNT または MWCNT の量が検量線の範囲に入るように Tw-sol で希釈し、60 秒間超音波分散した。

(10) 試料の前処理とHPLCによる測定

図 2 に DWCNT または MWCNT の前処理について示した。B-5-3 及び B-7 項で調製した各溶液 1 mL は 12000 rpm で 10 分間遠心分離する。その上澄み液を除去し、TW-mixture を 1 mL 加え、12000 rpm で 10 分間遠心分離した。その上澄み液を除去し、それぞれに濃塩酸 0.2mL を加えタッチミキサーで 10 秒間攪拌し、12000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液を除去し濃硫酸 0.2mL を加え、残渣を分解し、タッチミキサーで 10 秒間攪拌した。その後、12.4. 項で調製したマーカー溶液 1 mL をそれぞれに添加し、10 秒間超音波分散し、振とう機で 15 分間攪拌させた後、0.4 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 DWCNT または MWCNT をポンチ (8 mm) 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 秒間攪拌・抽出し、その溶液を HPLC で測定した。

(11) 肺内の DWCNT または MWCNT の沈着量の計算方

DWCNT または MWCNT の検量線で設定された濃度と面積値から、最小自乗法により検量線の傾きと切片より直線回帰式を求めた。肺及び縦隔の HPLC で測定した面積値を直線回帰式に代入し、DWCNT または MWCNT の測定値を求め、希釈倍率を乗じることにより、DWCNT または MWCNT の肺個体当りの沈着量 (単位 : µg) と、それらの 2 匹当りの平均値を求めた。また、各肺の重量で除することにより g 当りの値 (単位 : µg/g) とそれらの平均値を求めた。

C. 研究結果及び考察

(1) 検量線

DWCNT および MWCNT の濃度とマーカーの HPLC 測定による面積値の相関係数は、DWCNT:0.9949、MWCNT : 0.9961 であり良好な直線性を示した。DWCNT および MWCNT は 0.2 ~ 1.0 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。

(2) ラット肺内の DWCNT 及び MWCNT の肺の負荷量

表 2 に、DWCNT 及び MWCNT を TIPS 投与したラット肺内の DWCNT 及び MWCNT の肺負荷量の結果を示した。

DWCNT 群 (G3, G4, G5) 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 µg/g (肺中含量 : 96.8 µg) 6 週後では 65.4 µg/g (肺中含量 : 96.3 µg) 中用量の投与 2 週後では 137.0 µg/g (肺中含量 : 207.0 µg) 6 週後では 108.6 µg/g (肺中含量 : 182.1 µg) 高用量の投与 2 週後では 248.8 µg/g (肺中含量 : 435.8 µg) 6 週後では 173.1 µg/g (肺中含量 : 358.2 µg) であった。

MWCNT 群 (G5) のラット肺当りの肺負荷量は、投与 2 週後では 284.8 µg/g (肺中含量 : 470.1 µg) 6 週後では 398.5 µg/g (肺中含量 : 254.2 µg) であった。

非投与群 (G1) および媒体対照群 (G2) のラット肺には計測されなかった。

D. 結論

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、グラファイト積層と同様の選択性のある結合を示す、低分子吸着マーカー分子を用いた MWCNT の極微量定量法である。本分担研究により、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。

E. 健康危機情報

なし

F. 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. 2019 Feb 13.

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.

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. 2018 Jul;109(7):2164-2177.

2. 学会発表

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)

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)

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.

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

G. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む)

1. 特許取得

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 吸入曝露試験用カートリッジ、試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81836、2018.4.20

特許出願; 柴田眞利、菅野 純、生田達也、鶴田祐吾、高橋祐次: 試験物質供給装置及び吸入曝露試験装置 特願 2018-81837、2018.4.20

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし

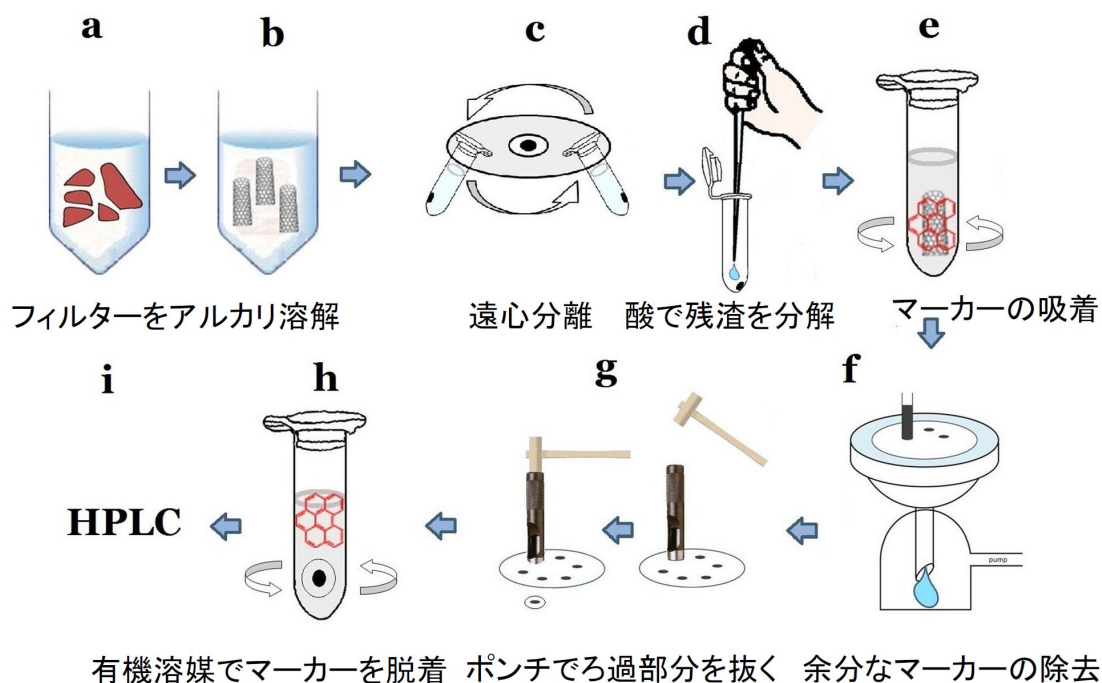


図 1 マーカーを用いた MWCNT 微量定量法（大西法）の概要

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。

表2 DWCNT 及び MWCNT の肺中沈着量

CNT	投与総量 (μg)	肺中含量 (μg)	肺重量 (g)	肺 g 当り ($\mu\text{g/g}$)	肺中含量平均 (μg)	肺 g 当り平均 ($\mu\text{g/g}$)
投与 2 週後						
No treatment	0	0	1.06	0	0	0
No treatment	0	0	1.06	0		
投与 6 週後						
No treatment	0	0	1.02	0	0	0
No treatment	0	0	1.05	0		
投与 2 週後						
Vehicle	0	0	1.45	0	0	0
Vehicle	0	0	1.46	0		
投与 6 週後						
Vehicle	0	0	1.06	0	0	0
Vehicle	0	0	1.01	0		
低用量投与 2 週後						
DWCNT	125	96.6	1.60	60.4	96.8	64.4
DWCNT	125	97.0	1.42	68.3		
低用量投与 6 週後						
DWCNT	125	105.2	1.53	68.8	96.3	65.4
DWCNT	125	87.4	1.41	62.0		
中用量投与 2 週後						
DWCNT	250	226.0	1.48	152.7	207.0	137.0
DWCNT	250	188.0	1.55	121.3		
中用量投与 6 週後						
DWCNT	250	172.7	1.80	95.9	182.1	108.6
DWCNT	250	191.5	1.58	121.2		
高用量投与 2 週後						
DWCNT	500	408.9	1.69	242.0	435.8	248.8
DWCNT	500	462.7	1.81	255.6		
高用量投与 6 週後						
DWCNT	500	377.9	2.06	183.4	358.2	173.1
DWCNT	500	338.5	2.08	162.7		
投与 2 週後						
MWNT-7	500	453.5	1.62	280.0	470.1	284.8
MWNT-7	500	486.6	1.68	289.6		
投与 6 週後						
MWNT-7	500	403.3	1.52	265.3	398.5	254.2
MWNT-7	500	393.6	1.62	243.0		

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: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 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博士前期課程
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 講師
今泉祐治 名古屋市立大学大学院薬学研究科 特任教授

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。本年度は、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。MWCNT暴露によるAMの細胞死機構を明らかにするため、アポトーシスが生じるか調べた。Caspase-3/7活性測定とAnnexin V/PI染色の結果、MWCNT暴露によるAMの細胞死機構は、アポトーシスではないことが推測された。次に、ネクロトーシスの一種であるパイロトーシスが生じるか調べた。パイロトーシスに関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法で測定した結果、MWCNT暴露によるAMの細胞死機構は、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。パイロトーシスを起こしたAMからは、IL-1 β が放出され、肺の慢性的な炎症が起き、中皮腫が発生することが考えられる。

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)は、導電性や強度、化学反応性に優れているため、電池や半導体など様々な分野に応用されており、今後も使用量や応用分野は拡大すると考えられる。しかし、MWCNTの形状がアスベストと類似していることから、発がん性が懸念され、安全性研究が喫緊の課題である。

本研究では、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による細胞障害を解析することで、MWCNTが肺で炎症反応を誘導する機構の解明を目指した。

B. 研究方法

1)AMの単離法

雄性ラット(Wistar/ST、8~10週齢)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、5 mLのPBS(-)を注入し、回収した。これを6回繰り返し、肺胞洗浄液を得た。肺胞洗浄液を4°C、500 \times g、10 minで遠心した後、上清を除いてAMを得た。

2)Caspase-3/7試験

単離したAMを10⁴ cells/wellで96穴プレートに播種し、10 μ g/mL MWCNTを添加した。溶媒群では

0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。2 h、1 d、7 d 培養後、Caspase-Glo 3/7 Assay (Promega) を用いてアポトーシスアッセイを行った。ポジティブコントロールとして、5 μ M staurosporine で 4 h 処理することでアポトーシスを誘導した。

3) Annexin V/PI 染色法

単離した AM を 10^5 細胞ずつシャーレに播種し、10 μ g/mL MWCNT を添加した。溶媒群では 0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。5 h、1 d、3 d 培養後、Annexin V:FITC Assay Kit (Bio-Rad Laboratories) を用いてアポトーシスアッセイを行った。蛍光の測定には BD FACS Verse (BD Biosciences) を用いた。

4) ELISA 法

単離した AM を 2×10^4 cells/well で 96 well プレートに播種した。リポ多糖(LPS) 刺激群は、1 μ g/mL LPS で 2 h 刺激した。洗浄後、10 μ g/mL MWCNT を添加した。溶媒群では 0.5% PF68 含有生理食塩水を添加した。5 h、1 d、3 d、7 d 培養後、プレートを 1800 rpm で 3 min 遠心してから上清を採取し、サンプルとした。IL-1 β の測定には、Rat IL-1 β /IL-1F2 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を使用した。IL-1 α の測定には Rat IL-1 α /IL-1F1 Quantikine ELISA Kit (R&D Systems) を使用した。サンプルの吸光度は 1420 ARVO マルチラベルカウンター (Perkin Elmer) を用いて測定した。

(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:H30-P-1)。

C. 研究結果

1) MWCNT 暴露における AM のアポトーシス解析 (caspase-3/7 活性)

MWCNT 暴露による AM の細胞死機構を明らかにするために、まずアポトーシスが生じるか調べた。

アポトーシスに関する 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

(2 h, Vehicle= $21.4 \pm 0.8 \times 10^2$, n=3, MWCNT-L= $15.7 \pm 1.6 \times 10^2$, n=3, MWCNT-S= $17.0 \pm 0.8 \times 10^2$, n=3; 1 d, Vehicle= $25.5 \pm 13.3 \times 10^2$, n=3, MWCNT-L= $7.8 \pm 2.8 \times 10^2$, n=3, MWCNT-S= $5.7 \pm 0.9 \times 10^2$, n=3; 7 d, Vehicle= $10.6 \pm 1.1 \times 10^2$, n=3, MWCNT-L= $12.6 \pm 0.2 \times 10^2$, n=3, MWCNT-S= $11.3 \pm 1.3 \times 10^2$, n=3; Staurosporine= $204.5 \pm 80.0 \times 10^2$, n=3)。

2) MWCNT 暴露における AM のアポトーシス解析 (Annexin V/PI 染色)

Annexin V/PI 染色によってもアポトーシスが生じるか調べた。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 (Vehicle= $96.2 \pm 1.6\%$, n=4, MWCNT-L= $93.1 \pm 0.7\%$, n=4, MWCNT-S= $97.9 \pm 0.2\%$, n=4)。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 (Vehicle= $97.0 \pm 0.2\%$, n=5, MWCNT-L= $82.2 \pm 2.7\%$, n=5, MWCNT-S= $95.2 \pm 0.6\%$, n=5)、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 (Vehicle= $1.0 \pm 0.2\%$, n=5, MWCNT-L= $5.3 \pm 0.9\%$, n=5, MWCNT-S= $2.1 \pm 0.4\%$, n=5)。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 (Vehicle= $80.4 \pm 2.4\%$, n=7, MWCNT-L= $59.0 \pm 2.7\%$, n=7, MWCNT-S= $67.9 \pm 4.4\%$, n=7)、Annexin V(+)/PI(+)の細胞の割合が溶媒群に対して有意に増加した (Vehicle= $5.6 \pm 1.4\%$, n=7, MWCNT-L= $18.7 \pm 1.9\%$, n=7, MWCNT-S= $13.2 \pm 1.8\%$, n=7)。実験を行ったいず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 (5 h, Vehicle= $1.6 \pm 0.5\%$, n=4, MWCNT-L= $1.0 \pm 0.4\%$, n=4,

MWCNT-S=0.9±0.4%、n=4; 1 d、Vehicle=1.7±0.1%、n=5、MWCNT-L=4.2±1.2%、n=5、
MWCNT-S=1.8±0.2%、n=5; 3 d、Vehicle=12.5±2.5%、n=7、MWCNT-L=12.1±2.9%、n=7、
MWCNT-S=4.9±1.2%、n=7)。

3) MWCNT 暴露における AM のサイトカイン発現解析

ネクローシスの一種であるパイロトーシスが生じるか調べた。パイロトーシスに関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 d 後と 7 d 後に溶媒群に対して有意に上昇した (3 d LPS(+), Vehicle=-2.6±8.4 pg/mL、n=3、MWCNT-L=88.8±25.1 pg/mL、n=3、MWCNT-S=83.5±12.0 pg/mL、n=3; 7 d LPS(+), Vehicle=54.7±12.3 pg/mL、n=3、MWCNT-L=367.9±34.3 pg/mL、n=3、MWCNT-S=477.2±70.0 pg/mL、n=3)。

IL-1 α の分泌は、MWCNT-S 暴露 3 d において、溶媒群と MWCNT-L 群に対して有意に上昇した (3 d、Vehicle=67.9±9.3×10⁻² pg/mL、n=4、MWCNT-L=57.6±9.7×10⁻² pg/mL、n=4、MWCNT-S=268.2±2.23×10⁻² pg/mL、n=4)。

D. 考察

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。しかし、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。一方、IL-1 α は、炎症性サイトカインの一種であるが、細胞からの分泌に必要なシグナルペプチド配列を持たないため、ネクローシスを起こした細胞から受動的に分泌されることが知られている。本実験では、MWCNT 暴露による AM からの IL-1 α 分泌の増加は確認されなかった。

これまでに、MWCNT-L の方が MWCNT-S よりも早期に AM への細胞障害が現れることを示しているため、MWCNT の毒性は形状によって異なることが

明らかとなっている。つまり MWCNT-L の方が、MWCNT-S よりも人体への毒性が高いと考えられる。しかし、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。

E. 結論

本研究により、MWCNT 暴露における 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。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

なし。

2. 学会発表

- 1) 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).
- 2) 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)。
- 3) Sayuri Noda, Yoshiaki Suzuki, Hisao Yamamura,

Yuji Imaizumi. Essential roles of the auxiliary γ -subunit of large-conductance Ca^{2+} -activated K^+ channel in bronchial smooth muscle cells. The 49th NIPS International Symposium Ion channels: looking back, seeing ahead. Dec. 5-8, 2018 (Okazaki).

- 4) 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。

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:MWCNTs 肺内投与によって生成される活性カルボニル化合物および DNA
付加体の網羅的解析

分担研究者 伴野 勸 愛知医科大学・医学部感染・免疫学講座・助教

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、MWCNT 肺内投与されたラット肺組織中の活性カルボニル化合物(RCs)およびDNA付加体の網羅的解析を高解像質量分析計UHPLC/Triple TOF/MSを用いて行った。その結果、対照群と比較して形状の異なる3種のMWCNTを曝露した群で、既知、未知を含めてRCs、DNA付加体の数、濃度が増加することがわかった。そのうち、glyoxalや4-hydroxy-2-nonenalなど脂質過酸化由来の活性カルボニル化合物(RCs)、およびそのDNA付加体が有意に増加していることを確認した。これらのRCsは強い細胞傷害性を有することから、MWCNT曝露による発がん要因の一つである可能性が示唆された。

A. 研究目的

多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の発がん機構については、慢性炎症に伴う酸化ストレスや炎症関連遺伝子群の発現変動の関与が示唆されているが詳細な機序は明らかとなっていない。本研究では、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。

B. 研究方法

10週齢の雄性F344ラットに0.5mLの0.5%PF68salineまたは、250mg/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-L、MWCNT-S、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、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付加体の分子イオンピーク $[M+H]^+$ から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。

(倫理面への配慮)

動物実験は名古屋市立大学動物実験委員会の承認を受け、規定に則り、適切に行われた。

C. 研究結果

形状の異なる3種類のMWCNTs (MWCNT-L、-S、-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-L 168 peaks、MWCNT-S 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-Lでは168 peaks中75 peaks、MWCNT-S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-L、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。

D. 考察

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た。

E. 結論

MWCNTs曝露によって生成・増加した4-HNEはこれまでにp53遺伝子の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。MWCNTs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。

F. 健康危機情報

MWCNTsを曝露することで、肺組織での酸化ストレスが増悪し、DNA傷害、炎症を惹起することが考えられる。

G. 研究発表

1. 論文発表
該当項目なし
2. 学会発表
該当項目なし

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得
該当項目なし
2. 実用新案登録
該当項目なし
3. その他
該当項目なし

・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
Liao D., Wang Q., Alexander D., Abdelgied M., Elgazzar AM., Futakuchi M., Suzui, M., Kanno 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
Elgazzar AM., Abdelgied M., Alexander D., Alexaander W., Numano T., Iigo M., Naiki A., Takahashi S., Takase H., Hirose A., Kanno J., Eloklem OM., Nasem AM., Tsuda H.	Comparative pulmonary toxicity of a DWCNT and MWCNT-7 in rats	Arch. Toxicol.	93	43-59	2019
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
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	909-920	2019
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	32	73-77	2019

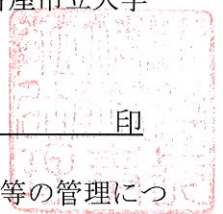
Etani T, Naiki T, Naiki-Ito A, Suzuki T, Iida K, Nozaki S, Kato H, Nagayasu Y, Suzuki S, Kawai N, Yasui T, Takahashi	NCL1, A Highly Selective Lysine-Specific Demethylase 1 Inhibitor, Suppresses Castration-Resistant Prostate Cancer Growth via Regulation of Apoptosis and Autophagy.	J Clin Med.	8	pii: E442	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
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
Otsuka K, Yamada K, Taquahashi Y, Arakaki R, Ushio A, Saito M, Yamada A, Tsunemitsu 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.	13 (10)	e0205702.	2018

・ 研究成果の刊行物・別冊

31年 3月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人 名古屋市立大学
所属研究機関長 職名 理事長
氏名 郡 健二郎 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 津田特任教授研究室・特任教授
(氏名・フリガナ) 津田 洋幸 (ツダ ヒロユキ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

年 月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 名古屋市立大学 高度医療教育研究センター 講師
(氏名・フリガナ) 内木 綾 (ナイキ アヤ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について


研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口チェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

厚生労働大臣
~~(国立医薬品食品衛生研究所長)~~ 殿
~~(国立保健医療科学院長)~~

機関名 (独) 労働者健康安全機構
 日本バイオアッセイ研究センター


所属研究機関長 職 名 所長

氏 名 菅野 純

次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 厚生労働科学研究費補助金 (化学物質リスク研究事業)
2. 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)
3. 研究者名 (所属部局・職名) (独) 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
 (氏名・フリガナ) 菅野 純 (カンノ ジュン)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査の場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。
 ・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

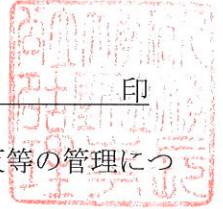
年 月 日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 公立大学法人名古屋市立大学

所属研究機関長 職名 理事長

氏名 郡 健二郎 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

- 研究事業名 化学物質リスク研究事業
- 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
- 研究者名 (所属部局・職名) 大学院薬学研究科 教授
(氏名・フリガナ) 山村 寿男 (ヤマムラ ヒサオ)

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入 (※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査 (※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針 (※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	名古屋市立大学	<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他 (特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する口にチェックを入れること。
・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。

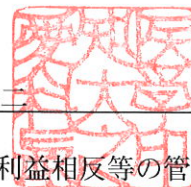
2019年3月26日

国立医薬品食品衛生研究所長 殿

機関名 愛知医科大学

所属研究機関長 職名 学長

氏名 佐藤 啓二 印



次の職員の平成30年度厚生労働科学研究費の調査研究における、倫理審査状況及び利益相反等の管理については以下のとおりです。

1. 研究事業名 化学物質リスク研究事業
2. 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
3. 研究者名 (所属部局・職名) 医学部・助教
(氏名・フリガナ) 伴野 勸・トモノ ススム

4. 倫理審査の状況

	該当性の有無		左記で該当がある場合のみ記入(※1)		
	有	無	審査済み	審査した機関	未審査(※2)
ヒトゲノム・遺伝子解析研究に関する倫理指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
遺伝子治療等臨床研究に関する指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
人を対象とする医学系研究に関する倫理指針(※3)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
厚生労働省の所管する実施機関における動物実験等の実施に関する基本指針	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>
その他、該当する倫理指針があれば記入すること (指針の名称:)	<input type="checkbox"/>	<input checked="" type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>		<input type="checkbox"/>

(※1) 当該研究者が当該研究を実施するに当たり遵守すべき倫理指針に関する倫理委員会の審査が済んでいる場合は、「審査済み」にチェックし一部若しくは全部の審査が完了していない場合は、「未審査」にチェックすること。

その他(特記事項)

(※2) 未審査に場合は、その理由を記載すること。

(※3) 廃止前の「疫学研究に関する倫理指針」や「臨床研究に関する倫理指針」に準拠する場合は、当該項目に記入すること。

5. 厚生労働分野の研究活動における不正行為への対応について

研究倫理教育の受講状況	受講 <input checked="" type="checkbox"/> 未受講 <input type="checkbox"/>
-------------	---

6. 利益相反の管理

当研究機関におけるCOIの管理に関する規定の策定	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究機関におけるCOI委員会設置の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合は委託先機関:)
当研究に係るCOIについての報告・審査の有無	有 <input checked="" type="checkbox"/> 無 <input type="checkbox"/> (無の場合はその理由:)
当研究に係るCOIについての指導・管理の有無	有 <input type="checkbox"/> 無 <input checked="" type="checkbox"/> (有の場合はその内容:)

(留意事項) ・該当する□にチェックを入れること。

・分担研究者の所属する機関の長も作成すること。