

研究課題名：ナノマテリアルの物理化学的性状を考慮した肺、胸腔及び全身臓器における有害性の評価ならびに新規 *in vitro* 予測手法の開発に関する研究（20KD1003）

**分担研究課題名：経気管肺内噴霧投与（TIPS）法によるカーボンナノチューブ有害性の解析**

研究分担者：津田 洋幸 名古屋市立大学津田特任教授研究室・特任教授

研究協力者：David B. Alexander 名古屋市立大学特任教授

William T. Alexander 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

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

Sivagami Gunasekaran 名古屋市立大学大学院医学研究科研究生

Omnia Hosni Mohamed Ahmed 名古屋市立大学津田特任教授研究室研究員

**研究要旨**

15層以上の多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）およびチタン酸カリウム線維には肺または胸膜中皮に発がん性のあることを明らかにしてきた。それらは肺内では異物として体内に残留するが代謝分解はされない。一方、ニトロサミン類のような化学発癌物質は生体内で代謝活性化されて最終的にDNA障害をもたらす。MWCNTの発がんリスク評価について両者の発がんにおける遺伝子発現差異を明らかにする。方法はF344雄ラットに剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ線維型（Tangled）のMWCNT-B（肺に発癌性あり）を1回/週にて総投与量1.5mg/ラットをTIPS投与し、肺発がん機序についての比較対照として既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間（計4回）投与した。これらの処置による肺発がんについてRNAマイクロアレイ発現解析、病理所見に関連する遺伝子変化、とくに腫瘍病変における標的シグネチャーを詳細に解析する。結果は国際的に通用するAdverse Outcome Pathway（AOP）を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ（WPMN）に提案できる評価法開発に資するデータの提示をめざす。投与終了後無処置にて6ヶ月経過中でまだ腫瘍の発生には至っていない。

**A. 研究目的**

形状の異なるMWCNTに対する生体・細胞への障害作用と発がんとその機序を明らかにするために、剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）と、もつれ線維型（Tangled）のMWCNT-B（肺に発癌性あり）と、既知のニトロ化合物による急性期ならびに発がん過程における病変について、マイクロRNA、腫瘍については変異シグネチャーに注目した生物学的差異を明らかにする。これによってMWCNTや金属線維による発がん機序において、国際的に通用するAdverse Outcome Pathway（AOP）を構築し、OECDナノマテリアル作業グループ（WPMN）に提案で

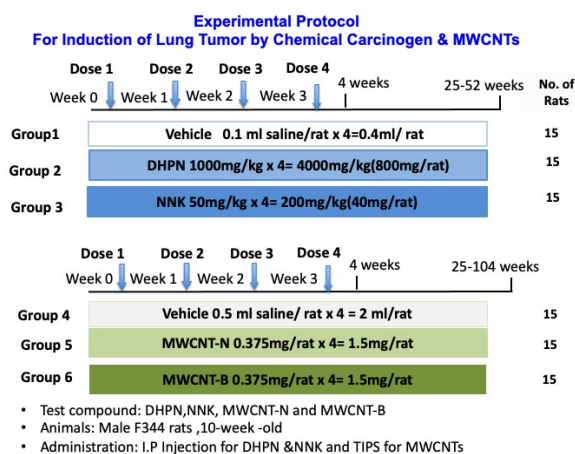
きる評価法を開発する事にある。

**B. 研究方法**

津田らが開発してきた経気管肺内噴霧投与（TIPS）法を用いてF344雄ラットにMWCNT-N、MWCNT-Bを4週間の総投与量1.5mg/ラットを、また発がんにおける比較対照として既知の発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamin)-1-(3-pyridyl)-1-butanone（NNK）を200mg/kgとなるように1回/週にて4週間投与した。投与終了後無処置にて観察中である。現在投与6ヶ月経過中である。

屠殺時には凍結組織から、RNAを精製・抽出する。GeneChip® Clariom D Assay, Rat(Affymetrix社)を用いたマイクロアレイ解析を行う。得られた遺伝子発現データについて、Ingenuity pathway analysis (IPA) software (Qiagen社)を用いて解析する。得られた腫瘍については変異シグネチャー解析を実施して原因物質による差異を比較して発癌機序の解析に役立つ。

#### 実験デザイン図



#### (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、当該法令の規程に基づく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する。ヒト組織から得た材料を用いる研究は行わない。

#### C. 研究結果

現在4週の結果について、病理組織学的ならびに増殖並びに発がん関連遺伝子等についてマイクロアレイ解析を実施中である。

#### D. 考察

まだ結果が得られていない。

#### E. 結論

まだ結果が得られていない。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

- Wang Q, Zhao Z, Alexander DB, Zhao D, Jiegou Xu, **Tsuda H**. Pleural translocation and lesions by pulmonary exposed multi-walled carbon nanotubes, J. Toxic. Pathol. 33:145-151, 2020.
- Saleh DM, Alexander WT, Numano T, Ahmed OHM, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-Gazzar AM, Takase H, Xu J, **Naiki-Ito A**, Takahashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. Comparative carcinogenicity study of a thick, straight-type and a thin, tangled-type multi-walled carbon nanotube administered by intratracheal instillation in the rat. Part Fibre Toxicol. 17:48, 2020.
- Sudo H, Tsuji AB, Sugyo A, Kurosawa G, Kurosawa Y, Alexander DB, **Tsuda H**, Saga T, Higashi T. Radiolabeled Human Monoclonal Antibody 067-213 has the Potential for Noninvasive Quantification of CD73 Expression. Int. J. Mol. Sci. 21: 2304, 2020.

##### 2. 学会発表

- Saleh D, Alexander TW, Numano T, Ahmed MH O, Gunasekaran S, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Takase H, **Naiki-ito A**, Takashi S, Hirose A, Ohnishi M, Kanno J, **Tsuda H**. SOT Annual Meeting & ToxExpo (2021年3月、Web開催)

#### G. 知的財産所有権の出願・登録状況

- 特許取得  
該当なし。
- 実用新案登録  
該当なし。
- その他  
該当なし。