

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（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 名古屋市立大学大学院医学研究科 特任教授

研究要旨

壁数が2～数十層以上の5種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内投与によって、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。それらの大部分は異物として体内に長く肺内に残留するが代謝分解されることはない。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をにおいて両者の発がん分子機序の差異を明らかにすることを目的とした。方法はF344雄ラットに剛質線維型（Rigid fibrous）のMWCNT-N（肺・胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ線維型（Tangled）のMWCNT-B（肺のみに発癌性あり）を1回/週にて総投与量1.5mg/ラットを投与し、肺発がん機序についての比較対照として既知の肺発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kgおよびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamino)-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の開発に資するデータの提示をめざす。現在DHPN、NNK、MWCNT-N、MWCNT-Bの肺胞上皮がんの発生が得られ、現在腫瘍におけるマイクロアレイ解析およびDNAシグネチャー解析を実施中である。

A. 研究目的

2層以上の多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）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産物がDNA障害をもたらす。MWCNTの発がんリスク評価をについて両者の発がん機序における遺伝子発現の差異を明らかにして、MWCNTの発がんの分子機序を明らかにする。

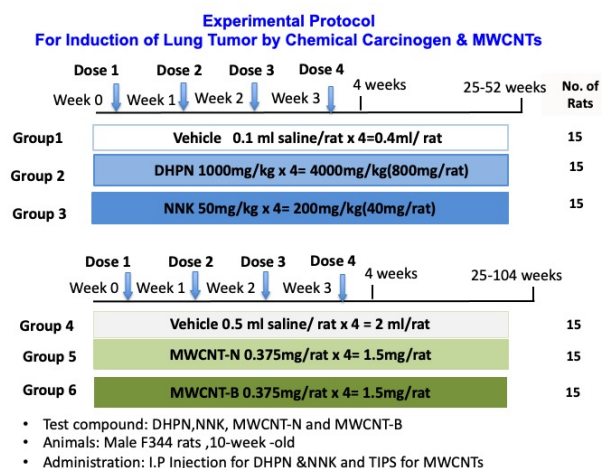
B. 研究方法

F344雄ラットを用いて肺に発がん標的性を示す2種のニトロソアミンと2種のMWCNTを経気管肺内噴霧投与（TIPS）したがんのDNA Signature解析剛質を含む形質特製（Phenotypic characteristics）について解析

する事を目的としている。MWCNTは、剛質針状（Rigid fiber）型のMWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）（Suzui, M, et al, 2016）と柔軟もつれ型線維（Tangled fiber）のMWCNT-B（肺発癌性あり）（Saleh, DM, 2020）を用いた。投与は、1回/週にて総投与量1.5mg/ラットを投与した。比較対照として既知の肺発癌物質N-bis(2-hydroxypropyl)nitrosamine（DHPN）を4000mg/kg、およびタバコ煙発癌物質4-(methyl-nitrosamine)-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目差した。

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 100 週を経過した状態で全ての群において肺腫瘍が得られている。

- 1) DHPN による腫瘍 6 例
Adenocarcinoma 3 例
Squamous cell carcinoma 2 例
Adeno-squamous carcinoma 1 例
- 2) NNK による腫瘍 3 例
全て Adenocarcinoma
- 3) MWCNT-N(straight aggregates)による腫瘍 4 例
Adenocarcinoma 1 例
Mesothelioma 3 例
- 4) MWCNT-B(tangled aggregates)による腫瘍 2 例
Adenocarcinoma 1 例
Not identified 1 例

以下の試料についてシグネチャー解析が進行中であり、近々結果が得られる。

| | Rat number | Pathologic diagnose (tube labeling) | Control tissue (tube labeling) |
|---------|------------|--|--------------------------------|
| DHPN | 32 | Squamous Cell Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| | 40 | Adeno - Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| | 49 | S. C. Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| | 51 | Combined S. C. Carcinoma+ Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| | 59 | Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| | 60 | Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) |
| NNK | 64 | Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) & Diaphragm (D) |
| | 77 | Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) & Diaphragm (D) |
| | 79 | Ad. Carcinoma (T1) | Lung (2) & Diaphragm (D) |
| MWCNT-N | 118 | Mesothelioma (T1) | Liver (L) |
| | 119 | Ad. Carcinoma (T1) | Liver (L) |
| | 124 | Mesothelioma (T2) | Liver (L) |
| | 129 | Mesothelioma (2) | Diaphragm (D) |
| MWCNT-B | 139 | Adeno - Carcinoma (T1, T2) | Liver (L) |
| | 156 | not identified yet (T1) | Liver (L) |

D. 考察

MWCNT はそれ自体では殆ど分解される事はなく、肺胞内で主として Macrophage の phagocytosis 反応を主体とする異物反応誘引する。一方、ニトロサミンはそれら自体の代謝解毒反応物による DNA 障害が誘導されて起る発がん機序が明らかにされている。進行中のシグネチャー解析によって、MWCNT による DNA 傷害の解析によって、発がん機序の一端が明らかにされる。

E. 結論

MWCNT 自体は化学的に安定した物質なので生体内で代謝による活性化が行われて DNA 傷害物質となって発がんさせるニトロサミンとは別の発がん機序が明らかとなる可能性が期待される。従って、進行中の腫瘍における DNA シグネチャー解析、さらに初期における肺組織におけるマイクロアレイ解析による遺伝子レベルの変化の差異から新しい所見が期待される。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Aoyama Y, Naiki-Ito A (Corresponding), Xiaochen K, Komura M, Kato H, Nagayasu Y, Inaguma S, **Tsuda H**, Tomita M, Matsuo Y, Takiguchi S, Takahashi S. Lactoferrin prevents hepatic injury

and fibrosis via the inhibition of NF- κ B signaling in a rat non-alcoholic steatohepatitis model. *Nutrients*. 14: 42, 2022.

2. Saleh DM, Luo S, Ahmed HM Omnia, Alexander DB, Alexander TW, Gunasekaran S, El-gazzar AM, Abdelgied M, Numano T, Takase H, Ohnishi M, Tomono S, El Hadi RHA, Fukamachi K, Kanno J, Hirose A, Jiegou Xu, Suzuki S, Naiki-ito A, Takashi S, **Tsuda H**. Assessment of the toxicity and carcinogenicity of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation: a two-year study. *Part Fibre Toxicol*. 19:30, 2022.

2. 学会発表

1. Saleh D, Alexander TW, Alexander DB, Abdelgied M, El-gazzar AM, Ahmed HM Omnia, Gunasekaran S, Takase H, Naiki-Ito A, Suzuki S, Gi M, Taquahashi, Y, Hirose A, Kanno J, Tsuruoka S, **Tsuda H**. The toxic and carcinogenic potential of three different sizes of double-walled carbon nanotubes in the rat lung after intratracheal instillation, ICT 2022 THE XVITH INTERNATIONAL CONGRESS OF TOXICOLOGY (2022年9月、マーストリヒト・オランダ)

G. 知的財産所有権の出願・登録状況

1. 特許取得
該当なし。
2. 実用新案登録
該当なし。
3. その他
該当なし。