

ナノマテリアルの有害性評価を迅速化・高度化する
短期経気管肺内噴霧暴露評価系および *in vitro* 予測手法の開発（23KD1002）

分担研究課題名：カーボンナノチューブによる肺内酸化ストレス解析

研究分担者 梯 アンナ 大阪公立大学大学院医学研究科 准教授

研究要旨

本研究では、ナノマテリアル（NM）の肺発がん性について検討し、発がんに関与する因子およびその機序を解明することを目的とした。

実験1では、F344 雄性ラット 200 匹を用い、フラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）、多層カーボンナノチューブ（MWCNT-7, MWCNT-N）を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で、簡便な経気管肺内噴霧投与（TIPS）法により投与した。投与開始 104 週間後に DNA 酸化的損傷マーカーである 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine（8-OHdG）の形成レベルを解析した結果、MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群の肺胞上皮細胞および過形成病変において、8-OHdG 形成レベルの有意な上昇が認められた。

実験2では、F344 雄性ラット 320 匹を用い、MWCNT-7、MWCNT-N および単層 CNT（SWCNT）を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 投与し、4、13、52 週間後に 8-OHdG および 8-nitroguanosine（8-NG）の形成レベルを測定した。MWCNT-7 および MWCNT-N 投与群では、全期間において、マクロファージ（Mφ）由来の活性酸素・窒素種（ROS/RNS）に起因する肺胞上皮細胞の 8-OHdG/8-NG 形成レベルが有意に上昇していた。一方、SWCNT 投与群では、4 週目から Mφ や好中球（Nφ）由来の 8-NG 形成レベルの有意な上昇、または 8-OHdG の増加傾向と iNOS の誘導が見出された。RNA-Seq および IPA シグナリングパスウェー解析の結果、4 週間投与後の全 CNT 投与群において、ROS/RNS 産生、炎症調節因子、酸化的ストレス抵抗性、細胞増殖およびオートファジーに関与する TNFα、NFκB、RELA、p38、Rac1、Nrf2 シグナリングの活性化が認められた。さらに、リン酸化 NFκB（p65, Ser536）の核内過剰発現が認められ、細胞増殖の誘導に関連していた。以上のことから、NFκB の活性化が CNT の発がんに関与していると考えられた。

実験3では、カーボンナノホーン（CNH）、カーボンナノブラシ（CNB）および MWCNT-7 を 0.5 および 1 mg/rat の濃度で TIPS 投与し、6 週間後の 8-OHdG/8-NG 形成を測定した。CNH および CNB は F344 ラット肺において有意な発がん性を示さなかった。高用量（1 mg/rat）の CNH、CNB および MWCNT-7 群で 8-OHdG の有意な上昇が認められたが、CNH、CNB 群の上昇レベルは MWCNT-7 群と比較して有意に低かった。また、8-NG の有意な上昇は MWCNT-7 群のみで認められた。

結論として、F344 ラット肺において、MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT の発がん機序には、Mφ・Nφ 由来の ROS/RNS による上皮細胞の DNA 損傷（8-OHdG/8-NG）、および NFκB、p38、Rac1、Nrf2 シグナリングを介した細胞増殖、オートファジー、酸化的ストレス抵抗性の活性化が関連していることが明らかとなった。

A. 研究目的

ナノマテリアルには有用な利益がある一方でリスクも存在し、その程度を正しく評価することが重要である。リスク評価には毒性の検出が不可欠であり、吸入暴露試験の代替法は効率的な検査に有用と考えられる。特にカーボンナノチューブ（CNT）など、将来的に発がん性が証明される可能性のある材料については、詳細なリスク評価研究が必要となる。

本研究では、F344 ラットを用いた *in vivo* 試験により、ナノマテリアルの発がん性メカニズムを検討し、肺における発がん関連因子およびその発がん機序を解明することを目的とした。

B. 研究方法

実験1. F344 雄性ラット 200 匹を用い、実験開始時にフラーレン（FL）、フラーレンウィスカー（FLW）、MWCNT-7、MWCNT-N を 0.25 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS

法により計 8 回肺内投与した。投与終了後、ラット肺における免疫染色法および ELISA 法を用いて、8-OHdG 形成レベルの変化を解析した。

実験2. F344 雄性ラット 320 匹を用い、実験開始時より MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT を 0.1 および 0.5 mg/rat の濃度で TIPS 法により計 8 回投与した。投与開始 4 週間および 13 週間後に、ラット肺の免疫組織学的解析を行い、DNA の 8-OHdG および 8-NG 形成レベルの変化を検討した。

実験3. F344 雄性ラット 142 匹を用い、実験開始時よりカーボンナノホーン（CNH）、カーボンナノブラシ（CNB）および MWCNT-7 を 0.5 および 1 mg/rat の濃度で TIPS 法により計 8 回投与した。投与開始 6 週間後に、ラット肺の免疫組織学的解析を用いて、8-OHdG および 8-NG 形成レベルの変化を調べた。

1. ラット肺からの DNA 抽出

ラット左肺サンプル（300 mg）からの DNA 抽出は、

既存の報告を一部改変して行った。

簡略に記載すると、核 DNA の抽出には、細胞内小器官を融解する抗酸化剤 NaI 液を含む「DNA Extractor WB kit」(和光純薬工業株式会社)を使用した。さらに、細胞溶解時の自己酸化を防止する目的で、溶解液に deferoxamine mesylate (Sigma Chemical, St. Louis, MO, USA) を添加した。得られた DNA は、nuclease P1 (ヤマサ醤油株式会社) およびアルカリフォスファターゼ (Sigma Chemical) を用いてデオキシヌクレオシドに断片化し、8-OHdG の形成レベルを ELISA 法により測定した。

2. 8-OHdG 形成の測定 (ELISA 法)

左肺から抽出した DNA サンプルにおける高感度 8-OHdG Check ELISA キット (日研ザイル株式会社 日本老化制御研究所、静岡、日本) を用いてメーカーの説明に従って 8-OHdG 形成レベルを測定した。

3. 免疫組織化学的 8-OHdG 検査

実験1および実験3において、右肺を4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、免疫染色ABC法を用いて8-OHdG の形成レベルを解析した。固定した肺組織はパラフィン包埋後、厚さ (3 μ m) の薄切切片を作製した。内因性ペルオキシダーゼをブロックするため、切片を0.3%過酸化水素水で処理した。馬血清にて非特異的応答をブロッキングした後、一次抗体として抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体 (1:100、日本老化制御研究所、静岡、日本) を適用し、4℃で一晩反応させた。検出には免疫染色キット (VECTASTAIN Elite ABC kit、Vector Laboratories, Burlingame, CA, USA) を用い、DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride; 同仁化学研究所、熊本、日本) およびヘマトキシリンによる対比染色を実施した。

実験2では、右肺をブアン液 (Bouin's solution) で固定した。その後、実験1と同様の免疫染色法 (抗8-OHdGマウスモノクローナル抗体、1:500) にて8-OHdGの形成レベルを検討した。

4. 免疫組織化学的8-nitroguanosine (8-NG) 染色

実験2では、摘出した右肺をブアン液を用いて固定した。8-NGの形成レベルは、ABC法 (avidin-biotinylated peroxidase complex method) を用いた免疫組織化学染色により解析した。切片は抗8-NGウサギポリクローナル抗体 (1:20、10 μ g/mL、KMU-P01、コスモ・バイオ株式会社、東京、日本) を用いて4℃で一晩反応させた。

実験3では、右肺を4%緩衝パラホルムアルデヒドで固定し、実験2と同様の条件 (ABC法) で免疫組織化学染色を行い、8-NGの形成レベルを解析した。

5. 免疫組織化学的検討

ラット肺の4%パラホルムアルデヒド緩衝液固定パラフィン包埋切片を用い、ABC法による免疫組織化学染色を実施した。クエン酸緩衝液 (pH 6.0) を用いたマイクロウェーブ照射による抗原賦活化、および3%過酸化水素水による内因性ペルオキシダーゼの不活

化処理を行った。

一次抗体には、anti-phospho-p38 (T180/Y182) (1:100, ab4822, Abcam, 東京)、anti-phospho-Nrf2 (S40) (1:100, ab76026, Abcam, 東京)、anti-phospho-NF- κ B p65 (S536) (1:100, #3031, Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-p62/SQSTM1 (1:300, PM045, MBL, 名古屋)、anti-iNOS/NOS2 (1:100, No. 610329, BD Transduction Laboratories, 東京)、anti-COX2 (1:200, aa 584-598, No. 160126, Cayman Chemical, MI, USA)、anti-phospho-PERK (T982) (1:100, ab192559, Abcam, 東京)、anti-phospho-Rac1/Cdc42 (S71) (1:100, #2461, Cell Signaling Technology, MA, USA)、anti-OGG1 (1:50, sc-12075, Santa Cruz Biotechnology, CA, USA)、およびanti-PCNA マウスモノクローナル抗体 (1:500, M0879, DAKO, 京都) を用い、4℃で一晩反応させた。

6. RNA シークエンシング (RNA-Seq) およびシグナリング解析

投与開始4週間後のMWCNT-7, MWCNT-N, SWCNTおよび対処群の凍結したラット肺凍結サンプルを用いて、RNA シークエンシング解析 (Macrogen Japan Corp., 日本) を行い、トランスクリプトームの変化を調べた。ラットの肺の凍結サンプルを用いた。

RNA-seq解析によって対処群のラット肺に比して、過剰発現が確認された蛋白から、IPA (Ingenuity Systems, Mountain View, CA, USA)、またはKEGG Pathway Analysisを用いて機能解析、上流転写制御因子やシグナリング解析を行った。

7. ウェスタンブロットを用いた蛋白の発現解析

RIPA buffer (1 $\times$) を用いてラット肺から蛋白を回収した。回収した蛋白は Bradford法を用いて濃度を測定した。測定は各サンプルを Duplicate で行い、各サンプルの蛋白濃度は濃度の異なるウシ血清アルブミン (Bovine Serum Albumin: BSA) (Sigma-Aldrich) の吸光度から作成した回帰式より算出した。

蛋白濃度測定後にウェスタンブロットを行った。方法は、回収した蛋白をポリアクリルアミドゲルにて分離後、メンブレンに転写し抗体と反応させ目的とする蛋白を検出した。ポリアクリルアミドゲルは目的の蛋白の分子量に応じた 7~15%の分離ゲルに 4.5%の濃縮ゲルを重ねたものを使用し、蛋白は各サンプルを 40 μ gロードして電気泳動した。また、分子量マーカーとして 3-Color Prestained XL-Ladder (APRO Co. 徳島、日本) もロードした。電気泳動終了後、分離した蛋白を PVDF Hybond P 0.45 メンブレン (Amersham, Germany) に転写した。転写確認後、メンブレンを蒸留水および 0.1%の Tween 20 を含む Tris-buffered saline (1 $\times$ TBS) (TBST) にて洗浄した。洗浄後、メンブレンは 5%のスキムミルクを含有した PBST で 1 時間室温にて緩やかに振盪を行い、抗体の非特異的な結合を回避した。その後、目的とする蛋白に結合する一次抗体と 4℃で一晩反応させた。使用した一次抗体と希釈倍率は以下の通りである。Rabbit anti-Nrf2 phospho S40 (SA B5701902, Sigma-Aldrich, 1:1000); rabbit anti-p62 (1:1000, ab91526, Abcam, 東京、日本); anti-iNOS/NOS mouse 抗体 (1:2000, No. 610329, BD Transduc

tion Laboratories, 東京, 日本); anti- NFkB mouse mAb (p65) (1:800, #6956, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-NFkB p65 (phospho-S536) rabbit mAb (1:700, #3031, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-STAT3 (phospho-Tyr705) rabbit mAb (1: 1000, #9145, Cell Signaling Technology, MA, USA); anti-Stat3 rabbit mAb (1: 1000, #30835, Cell Signaling Technology, MA, USA); β -actin (1:100,000, ab49900, Abcam, Japan)。

8. 統計処理—試験実施施設

対照群と各投与群との間の統計的有意差検定を行い、危険率5% ($P<0.05$) 又は1% ($P<0.01$) を基準とした。8-OHdG及び8-NG形成レベルの平均値について、まず5%有意水準でBartlett法による等分散性の検定を行った。その結果、等分散の場合はパラメトリックなDunnettの多重比較検定を、不等分散の場合はノンパラメトリックなSteelの検定を用いた。

C. 研究結果

1. 実験1

1-1. ラット肺における8-OHdGの形成 (ELISA法で測定)
DNAの8-OHdG形成レベルの分析結果を図1に示した。ラット肺より抽出したDNAにおける8-OHdGは、0.5 mg/rat MWCNT-N群においてのみ、対照群値と比較して統計的に有意な増加がみられた。他のナノマテリアルの投与群では8-OHdG形成の上昇が見られなかった。

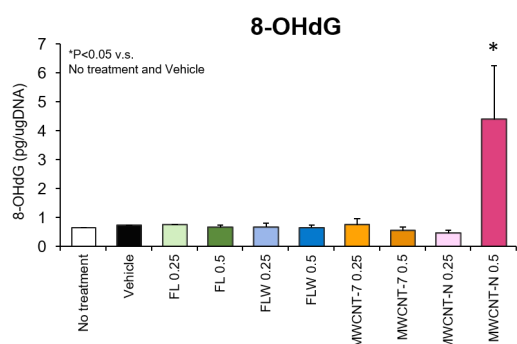


図1. ラット肺DNAにおける8-OHdG形成レベルの測定 (ELISA法)

1-2. ラット肺における8-OHdGの免疫組織学的検索

免疫染色の解析結果を図2および3に示す。MWCNT-7およびMWCNT-Nを0.25および0.5 mg/rat投与した群では、ラットの肺胞上皮細胞において8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が認められた。一方、FLの0.25および0.5 mg/rat投与群における8-OHdG陽性細胞数は対照群と同等であったが、FLWの0.25および0.5 mg/rat投与群では増加傾向が見られた (図2, 3)。

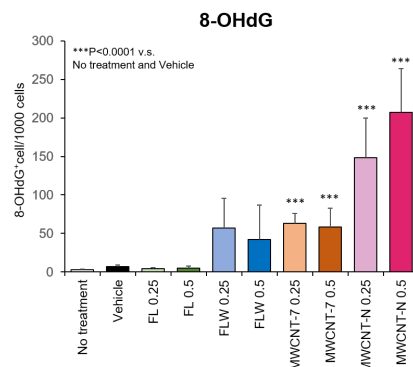


図2. 免疫染色により観察されたラット肺の8-OHdG形成レベル

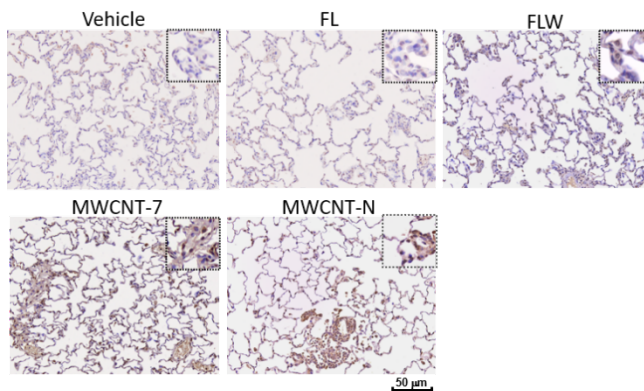


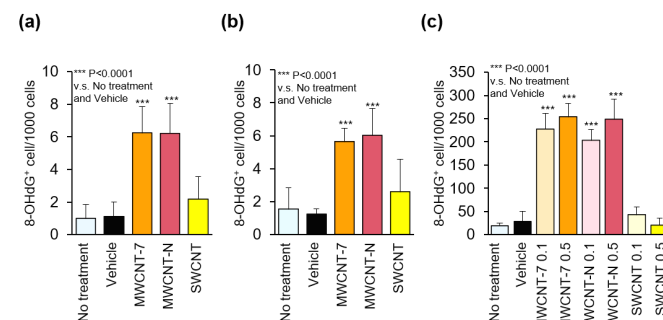
図3. 実験1における8-OHdG免疫染色の代表的な写真

2. 実験2

2-1. ラット肺における8-OHdG形成レベル (免疫染色)

8-OHdG免疫染色を用いた解析結果を図4および図5に示す。0.5 mg/ratのMWCNT-7およびMWCNT-N投与群のラット肺胞上皮細胞において、投与開始4、13および52週間後に8-OHdG陽性細胞数の有意な増加が認められた (図4(a, b, c)、図5)。

一方、SWCNT 0.5 mg/rat投与群では第4、13週において8-OHdG陽性細胞数の上昇傾向が見られたが、第52週では無処置群および対照群と比較して有意な増加は



認められなかった (図4(a, b, c)、図5)

図4. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間 (a)、13週間 (b) および52週間後 (c) ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

また、0.1 mg/ratのMWCNT-7およびMWCNT-Nを投与した52週間後において、ラット肺胞上皮細胞の8-OHdG陽性率は、無処置および対照群に対し有意に増加した。

一方、SWCNT群では有意な上昇は認められなかった(図4)。

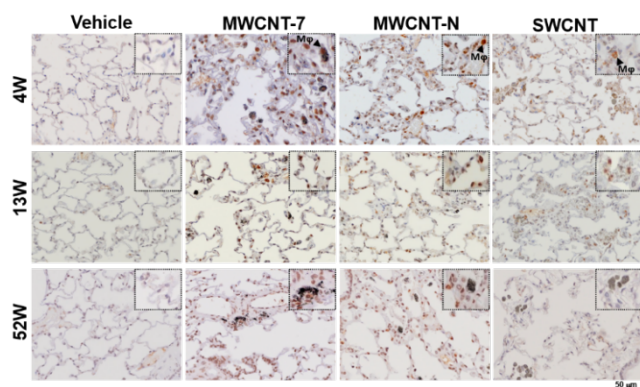


図5. 実験2における8-OHdG免疫染色の代表像(投与4、13、52週後)

MWCNT-7、MWCNT-N および SWCNT の4、13、52、104週間後、浸潤した多くの8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)(細胞質や核)や好中球(Nφ)(核)が観察され、その数が有意に増加していた(図5、6)。特に、MWCNT-7およびMWCNT-N投与後のラット肺に多くの8-OHdG陽性のMφが観察された。SWCNT投与群では8-OHdG陽性MφやNφが多く見られた(図5)。

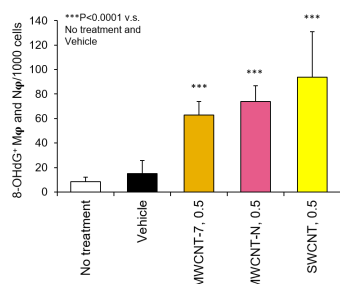


図6. 実験2におけるCNT 13週間投与後ラット肺の8-OHdG陽性マクロファージ(Mφ)と好中球(Nφ)数の上昇

2-2. ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/NOSとCOX2の発現(免疫染色)

肺に浸潤した多くの8-NG陽性MφやNφ(核と細胞質)が観察された(図7)。また、13週目からMWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群のラット8-NG陽性肺上皮細胞の数が増加していた(図7、8)。

ラット肺における8-NG形成レベルおよびiNOS/COX-2の発現(免疫組織化学染色)解析結果を図7、図8および図9に示す。SWCNT投与群では、投与開始4、13、52週後の各時点において、ラットの8-NG陽性肺上皮細胞、マクロファージ(Mφ)および好中球(Nφ)数に有意な上昇が認められた(図7(a、b、c)、図8)。肺へ浸潤したMφおよびNφの核と細胞質において、顕著な8-NG陽性所見が観察された(図8)。また、13週目以降、MWCNT-7およびMWCNT-N 0.5 mg/rat投与群においても、8-NG陽性肺上皮細胞数の有意な増加が確認された(図7、8)

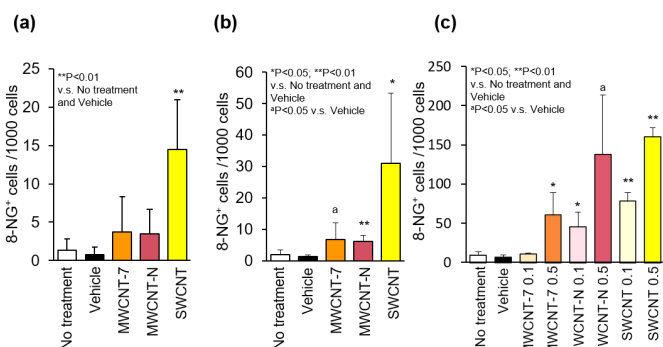


図7. 免疫染色で観察されたCNT投与4週間(a)、13週間(b)および52週間後(c)ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

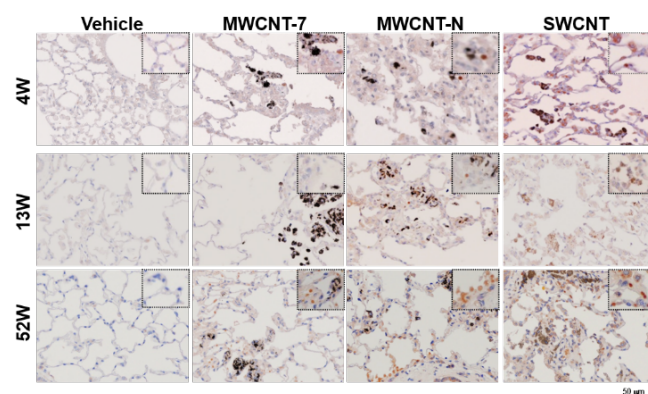


図8. 実験2における8-NG免疫染色の代表像(投与4、13、52週後)

実験2では、MWCNT-7、MWCNT-N、またはSWCNT(0.1 mg/ratまたは0.5 mg/rat)を投与したラットにおいて、投与開始4~52週間後、肺上皮細胞、マクロファージ(Mφ)、および好中球(Nφ)で8-NGの発現上昇が認められた。これは免疫染色およびウェスタンブロット(WB)解析により(4週)、NO産生酵素iNOS/NOSおよび炎症マーカーCOX2の発現増加と連動していた(図9)。

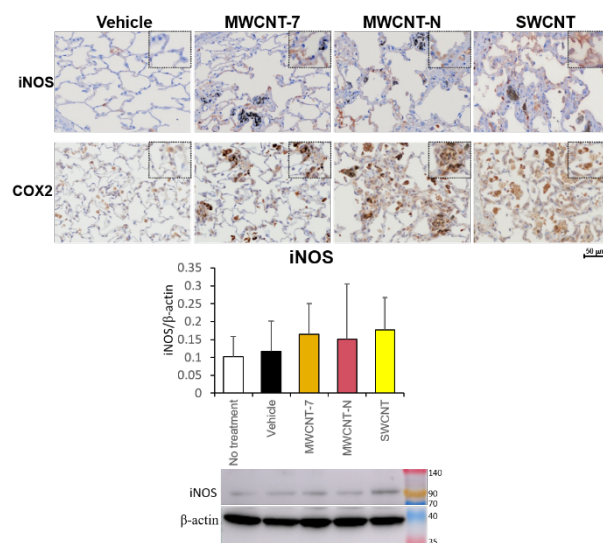


図9. ラット肺におけるiNOSおよびCOX-2の発現上昇(上段:13週間投与後の免疫染色、下段:4週間投与後のウェスタンブロット、n=5)

2-3. RNA シークエンシング (RNA-Seq) およびシグナリング解析

実験2におけるナノマテリアル4週間投与後のラット肺組織についてRNA-Seq解析を行い、IPAやKEGGを用いてシグナリングパスウェー解析を実施した。その結果、0.5 mg/ratのMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNT投与群では、ファゴソーム形成、オートファジー、G protein-coupled受容体 (GPCR) およびFAKシグナリングの活性化が認められた。また、MWCNT-7およびMWCNT-N投与群においてのみ、活性酸素 (ROS) 産生に起因するp38およびRacシグナリングの有意な活性化が予測された (表1)。

表 1. RNA-Seq 解析および IPA を用いたナノマテリアル投与ラット肺における活性化シグナルパスウェイの解析

Canonical Pathways	MWCNT-7 0.5/ Vehicle	MWCNT-N 0.5 Vehicle	SWCNT 0.5/ Vehicle
Phagosome formation	4.56	4.59	4.59
G protein-coupled receptor signaling	1.83	2.08	2.32
p38 MAPK Signaling	3.53	2.03	1.77
RAC Signaling	2.29	2.19	1.47
FAK signaling	2.99	3.26	3.26
Autophagy	1.41	1.72	2.06

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2025 QIAGEN. All rights reserved.

表2. RNA-SeqおよびIPAを用いたナノマテリアル曝露ラット肺における活性化上流因子の解析

Regulators	MWCNT-7	MWCNT-N	SWCNT
Immune response			
TNF α	8.05	8.24	8.28
CSF2	8.00	8.16	8.16
CSF3	3.45	3.47	4.57
IL1A	5.55	5.85	5.85
IL1B	5.09	5.61	5.85
IL2	5.42	5.81	5.50
IL6	5.50	5.86	5.86
IL17A	3.90	4.11	4.11
IFNA4	1.94	2.36	3.16
IFNL1	3.65	5.22	5.70
IFNA2	4.00	5.51	5.92
IFNA8	N/A	2.43	2.61
IFNA21	N/A	2.41	2.59
IFNB1	0.64	2.79	2.50
IFNG	7.02	7.42	7.74
IRF3	2.35	4.34	4.61
IRF7	3.71	6.24	6.14
STAT1	3.26	4.23	3.87
STAT2	2.07	3.27	3.73
STAT3	3.94	3.94	4.22
TLR7	4.86	5.13	5.13
TLR4	4.72	4.92	4.92
EIF2AK2	2.81	4.29	4.79
TICAM1	5.03	5.48	5.75
MAVS	5.12	6.04	6.35
Cell proliferation, autophagy			
NFkB	5.33	5.87	6.20
RELA	3.25	3.98	4.27
IKBKE	2.93	3.23	3.51

Data are z-score (z-score>2: activation)
© 2000-2025 QIAGEN. All rights reserved.

実験2におけるIPAの上流調節因子解析により、0.5 mg/ratのMWCNT-7、MWCNT-NおよびSWCNTの4週間投与

群において、免疫反応関連因子 (TNF α 、CSF2、CSF3、interleukins (ILs)、interferons (INFs)、INF調節因子 (IRF3, 7)、Toll-like receptor 4, 7 (TLR4, TLR7)、転写因子STAT1, 2, 3、TICAM1、MAVS、EIF2AK2) の活性化が予測された (表1)。さらに、細胞増殖やオートファジーの調節因子であるNFkB、RELA、IKBKEの活性化も認められた。

2-4. ラット肺におけるP-p38、P-Rac1/Cdc42、P-NF κ B、PCNA、P-Nrf2およびp62の発現

実験2では0.5 mg/ratの量では肺中皮腫が発生したMWCNT-7、MWCNT-N投与群では、投与開始4および13週間後、ラット肺上皮細胞において高い8-OHdGの発現上昇とともに、細胞増殖調節因子 (リン酸化 p38 (P-p38)、リン酸化 Rac1/cdc42 (P-Rac1/cdc42)) が見られた (図10)。

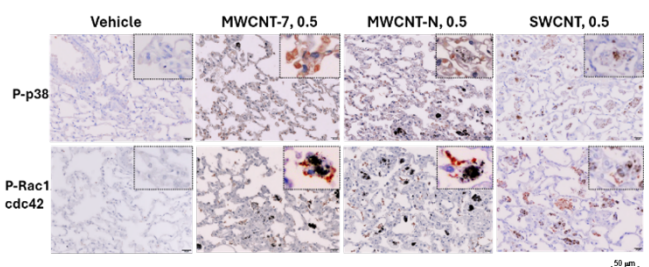


図 10. 実験2におけるCNT投与後ラット肺におけるP-p38およびP-Rac1の発現上昇

さらに、すべてのCNT投与群において、肺上皮細胞、過形成 (HPL)、腺癌 (AdCa)、および中皮腫 (Mesothelioma) 細胞の核におけるリン酸化NFkB (P-NFkB, p65, S536) および細胞増殖マーカーPCNAの発現が高いことが確認された (図11)。

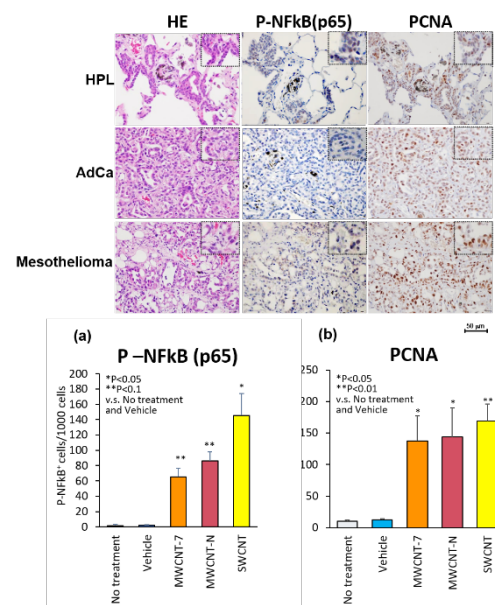


図 11. 実験2において、CNTを投与したラット肺上皮、過形成および腫瘍におけるP-NFkB (p65, S536) (a)およびPCNA (b)の発現

SWCNT短期や中期投与後、ラット肺上皮細胞においてP-NFkB、PCNA、p62発現の有意な上昇が観察された

(図11, 12)。ウェスタン・ブロットを用いた解析では、MWCNT-7投与群のラット肺組織においてNF- κ B (p65)の有意な発現上昇がみられ、MWCNT-N投与群においても同様の上昇傾向が示された(図12)。また、MWCNT投与群ではp-STAT3の発現が上昇傾向を示した。

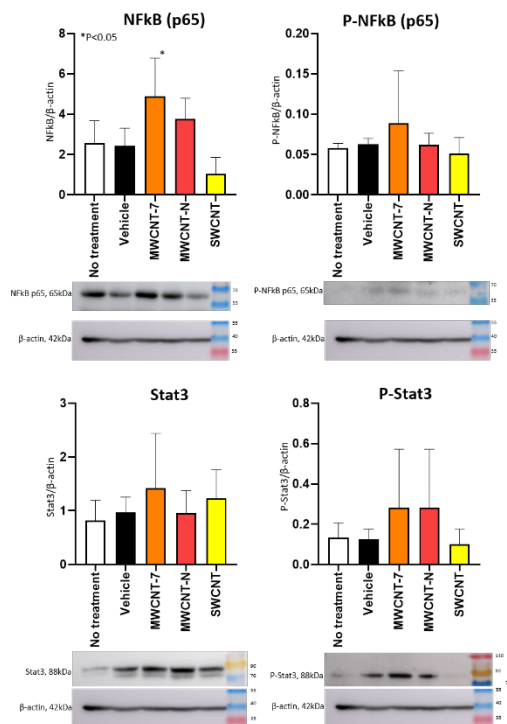


図12. 実験2ラット肺におけるNF- κ B (p65), P-NF κ B (p65), Stat3 およびP-Stat3 (S40)の発現 (WB, 4週間投与後, n=5)

ウェスタン・ブロット解析の結果、0.5 mg/ml のMWCNT-7, MWCNT-N, およびSWCNT投与群のラット肺組織において、p62の発現が有意に上昇した(図13)。また、MWCNT投与群ではP-Nrf2の発現もp62と同様に上昇した。

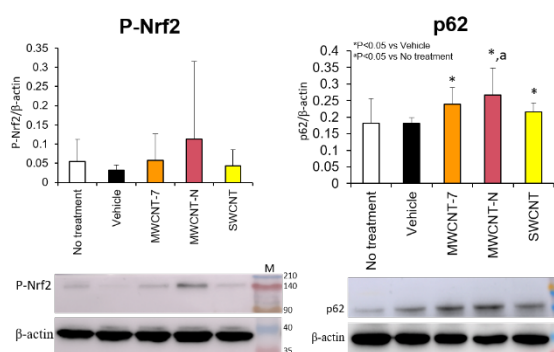


図13. ラット肺におけるP-Nrf2 (S40)およびp62の発現 (WB, 4週間投与後, n=5) (実験2)

また、8-OHdG修復酵素である oxoguanine glycosylase 1 (Ogg1)、P-PERK およびGRP78の免疫染色を行ったところ、全群のラット肺上皮において染色が観察されたが、CNTs群では対照群に比べて有意な変化は認められなかった。

3. 実験3

3-1. ラット肺におけるCNH, CNBおよびMWCNT-7投与

後の8-OHdG形成レベル (免疫染色)

8-OHdG および8-NG免疫染色の解析結果を図14および図16に示す。MWCNT-7 1mg/ratを投与して6週間後のラット肺上皮細胞において、無処置群およびVehicle群と比較して8-OHdG陽性細胞数の有意な上昇が認められた(図13, 16)。

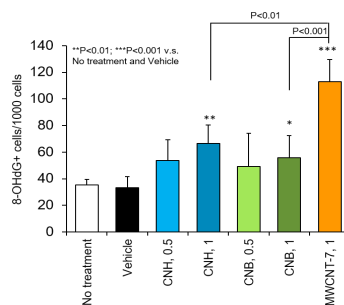


図14. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-OHdG形成レベル

CNHおよびCNB高容量(1 mg/rat)投与群ではラット肺上皮細胞において8-OHdG陽性細胞の数が有意に増加した(図14)。また、MWCNT-7投与群では8-OHdG形成レベルの上昇がCNHおよびCNB 1mg/rat投与群に比べて、有意に高い値を示した。

3-2. ラット肺における8-NG形成レベル (免疫染色)

8-NG免疫染色を用いた解析結果を図15および図16に示した。ラットの肺胞および気管支上皮細胞において、MWCNT-7を1 mg/ratで投与してから6週間後、無処置群およびVehicle群と比較して8-NG陽性細胞数が有意に増加していることが確認された(図15, 図16)。

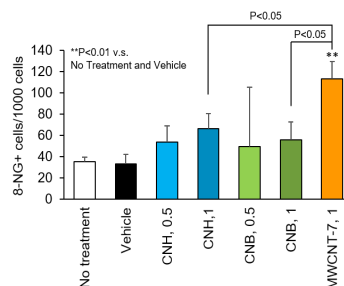


図15. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル

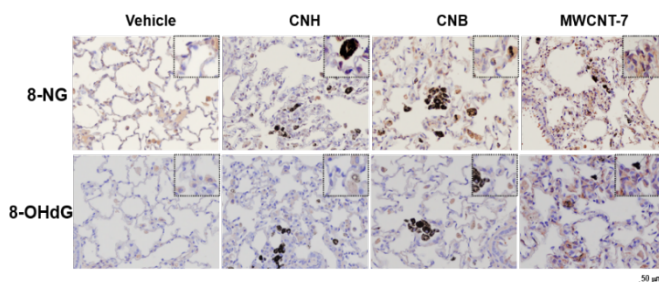


図16. 免疫染色で観察されたCNH, CNBおよびMWCNT投与6週間ラット肺上皮細胞の8-NG形成レベル
CNHおよびCNB投与群ではラット肺胞および気

管支上皮細胞において8-NG形成レベルの変化は見られなかった。MWCNT-7投与群では8-NG形成レベルの上昇がCNHおよびCNB 1 mg/rat投与群に比べて、有意上昇していた。

D. 考察

DNAとROS/RNS（活性酸素/窒素種）の反応により形成される付加体である8-OHdGおよび8-NGは、酸化的/炎症的DNA損傷の指標として知られ、多くの実験モデルにおいて発がんに関与している。これらは突然変異、特にGからTへの塩基置換の原因となる。組織中における8-OHdGレベルは、ROSの産生と修復のバランスによって決定される。

実験1では、0.25および0.5 mg/ratのMWCNT-7またはMWCNT-Nを投与した群において、投与104週間後に肺腺がんの有意な発生が認められ、これは肺胞上皮DNA中における8-OHdGの蓄積に関連していると考えられる。

実験2では、0.1および0.5 mg/ratのMWCNT-7またはMWCNT-N投与群において、投与開始4、13および52週間後に8-OHdG陽性肺胞上皮細胞の大幅な増加と、8-OHdG陽性マクロファージ数の上昇が認められた。このことから、肺胞上皮細胞における酸化的ストレスの産生とDNA損傷は、主にMφの増加に伴うROS放出の誘導に関連していると考えられる。さらに、MWCNT-7、MWCNT-N、またはSWCNT投与後のラット肺上皮や腫瘍細胞では、細胞増殖調節因子P-NFκBの核内過剰発現が観察された。また、MWCNT投与群では酸化的ストレス・小胞体ストレスマーカーやP-Nrf2、p62、P-p38、P-Rac1/cdc42の誘導が8-OHdG形成レベルと相関し、高い値を示した。SWCNTの短期投与ではp38およびP-Rac1の有意な活性化は認められなかったが、13週目以降は上昇した。一方、iNOSおよびCOX2の発現は、全CNT投与群のマクロファージや好中球において上昇していた。SWCNT投与群では有意な8-NG陽性細胞が観察され、強い炎症を伴う8-NGの形成が誘導された。また、同群では肺上皮細胞においてiNOSの発現上昇が認められた。全CNT投与群においてNFκBの活性化が認められ、細胞増殖との関連が示唆された。したがって、肺上皮細胞における8-NGの形成が、SWCNTの肺発がん性に関与していると考えられる。

実験3では、CNHとCNB(1mg/rat)において8-OHdG形成レベルの増加が認められたが、8-NGレベルの有意な上昇は見られなかった。また、MWCNT-7投与群の8-OHdG/8-NG形成レベルの上昇と比較して、CNH/CNB投与群のレベルは有意に低く、強い変化は観察されなかった。今後、CNH/CNBとSWCNT、MWCNTの発がん性とそのメカニズムについてさらなる検討が必要である。

E. 結論

F344ラットに対するMWCNT-7およびMWCNT-Nの投与群では、肺胞上皮細胞において、核DNAの8-OHdG形成レベルの強い上昇とともに、NFκB、p38/Rac1、Nrf2シグナル経路の活性化が認められた。また、SWCNT投与群では、ラット肺上皮細胞にて有意な8-NGの上昇を伴うNFκBの活性化が示された。これらCNT投与104週間後に発がんが見られたことから、その機序として、炎症細胞（マクロファージ、好中球）由来の活性酸素・窒素ラジカル（ROS/RNS）によるDNA損傷（8-OHdGおよび8-NGの形成）の誘導が関与していると考えられる。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. O Gi M., Suzuki S., Saleh D. M., Ahmed O. H. M., Alexander W. T., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Guo R., Qiu G., Noura I., **Kakehashi A.**, Xie X. L., Tsuruoka S., Hirose A., Naiki-Ito A., Tsuda H., and Wanibuchi H. Comparative Gene Expression Analysis of Malignant Mesothelioma and Lung Adenocarcinomas Induced by Multi-Walled Carbon Nanotube-7 and Double-Walled Carbon Nanotubes in Rats: Distinct Molecular Signatures and Canonical Pathways. *Nanomaterials*, 15(23):1806, 2025.
2. **Kakehashi A.**, Suzuki S., Nishidoi Y., Hagihara A., Ikenaga H., Shiota M., Qiu G., Noura I., Kuwae Y., Vachiraarunwong A., Fujioka M., Gi M., Kawada N., and Wanibuchi H. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Molecular Testing, Diagnosis, and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. *Cancers*, 17(13):2212, 2025.
3. Suzuki S., Gi M., Yanagiba Y., Yoneda N., Uehara S., Yokota Y., Noura I., Fujioka M., Vachiraarunwong A., **Kakehashi A.**, Koda S., Suemizu H., and Wanibuchi H. (2025) Metabolism and effects of acetoaceto-otoluidine in the urinary bladder of humanized-liver mice. *J Toxicol Pathol*, 38:59-67, 2025.
4. Noura I., Suzuki S., Gi M., Fujioka M., Matsue T., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi H. Comparative analysis of the toxic effects on the mouse lung of 4 weeks exposure to the heated tobacco product Ploom TECH+ and 3R4F reference cigarettes. *J Toxicol Pathol*, 38(2): 147-154, 2025.
5. Fujioka M., Suzuki S., Gi M., Noura I., Vachiraarunwong A., **Kakehashi A.**, and Wanibuchi H. Nicotine promotes the development of invasive bladder carcinoma in rats. *J Toxicol Pathol*, 38(2):161-165, 2025.
6. Guo R., Gi M., Kiyono T., Vachiraarunwong A., Suzuki S., Fujioka M., Qiu G., Praseatsook K., Kawamura Y., **Kakehashi A.**, Noura I., Xie X., and Wanibuchi H. Construction of a Novel 3D Urinary Bladder Mucosa Model and Its Application in Toxicity Assessment of Arsenicals. *Toxics*, 13(10):828, 2025.

2. 学会発表

1. 梯 アンナ、西土井 悠作、野浦 郁恵、邱 桂 鈺、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡 正 喜、魏 民、鰐淵 英機、鈴木 周五. 膀胱癌にお

- ける新規診断及び予後マーカーとして
 Peroxiredoxin 3 の検討. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-40、ウインクあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
2. 藤岡 正喜、鈴木 周五、魏 民、ワシラアルンウオン アルパマス、野浦 郁恵、邱 桂鈺、河村 百合菜、大石 裕司、山口 貴嗣、梯 アンナ、鰐渕 英機有機ヒ素化合物ジメチルアルシン酸の経胎盤ばく露による雄性仔 CD-1 マウスにおける肝発がん機序には DNA メチル化異常が関与する. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-42、ウインクあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 3. 河村 百合菜、ワチラアルンウオン アルパマス、藤岡 正喜、鈴木 周五、邱 桂鈺、郭 潤傑、野浦 郁恵、梯 アンナ、山口 貴嗣、鰐渕 英機、魏 民. 加熱タバコ製品 Ploom TECH+と 3R4F 標準タバコに 4 週間曝露したマウスの肺に対する毒性影響の比較分析. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-17、ウインクあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 4. 野浦 郁恵、鈴木 周五、魏 民、藤岡 正喜、松江 泰佑、梯 アンナ、鰐渕 英機. 加熱タバコ製品 Ploom TECH+と 3R4F 標準タバコに 4 週間曝露したマウスの肺に対する毒性影響の比較分析. 第 42 回日本毒性病理学会総会及び学術集会、P-16、ウインクあいち、愛知県産業労働センター (2026 年 1 月 22~23 日)
 5. Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Suzuki, S., Guo, R., Qiu, G., Kawamura, Y., Noura, I., Kakehashi, A., Gi, M., Wanibuchi, H. Comparative evaluation of inorganic arsenicals and their metabolites in immortalized human bladder epithelial cells. 第 30 回ヒ素シンポジウム、演題 7、大阪公立大学大学院医学研究科 (2025 年 12 月 6~7 日).
 6. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、梯アンナ、鰐渕英機. 動物モデルを用いた職業性膀胱がんの研究について. 大阪、日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会(2025 年 10 月 24~25 日)
 7. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Comparative hepatotoxicity of carboxylate and sulfonate per- and polyfluoroalkyl substances in immortalized human hepatocytes. 大阪、日本産業衛生学会第 52 回産業中毒・生物学的モニタリング研究会 (2025 年 10 月 24~25 日)
 8. 邱桂鈺、魏民、鈴木周五、藤岡正喜、梯アンナ、ワシラアルンウオン アルパマス、野浦郁恵、郭潤傑、鰐渕英機. 有機ヒ素化合物ジフェニルアルシン酸の発達期ばく露によるラット海馬に及ぼす影響. メタルバイオサイエンス研究会 2025、東京 (2025 年 10 月 22~23)
 9. Kakehashi, A., Nishidoi, Y., Noura, I., Qiu, G., Vachiraarunwong, A., Fujioka, M., Gi, M., Wanibuchi, H., Suzuki, S. The Impact of Peroxiredoxin 3 on Diagnosis and Prognosis in Human Pancreatic Ductal Adenocarcinoma. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-3245, 金沢 (2025 年 9 月 25~27 日)
 10. Noura, I., Suzuki, S., Inoue, T., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Role of brain abundant membrane attached signal protein 1 (BASP1) in large cell neuroendocrine carcinoma of the lung, 第 84 回日本癌学会学術総会、P-3316, 金沢 (2025 年 9 月 25~27 日)
 11. Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Guo, R., Qiu, G., Noura, I., Kawamura Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Structure-Dependent Hepatotoxicity and Carcinogenic Potential of PFASs in Immortalized Human Liver Cell. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-2005, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 12. Guo, R., Vachiraarunwong, A., Suzuki, S., Fujioka, M., Qiu, G., Kawamura, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H., Gi, M. Early Gene Expression Alterations in DMH-Induced Rat Colon Carcinogenesis. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-1009, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 13. Fujioka, M., Suzuki, S., Gi, M., Vachiraarunwong, A., Guo, R., Kawamura, Y., Oishi, Y., Kakehashi, A., Wanibuchi, H. Study of carcinogenesis by transplacental exposure to dimethylarsinic acid in F1 mice. 第 84 回日本癌学会学術総会、P-1037, 金沢 (2025 年 9 月 25-27 日)
 14. Vachiraarunwong, A., Praseatsook, K., Wongpoomchai, R., Suzuki, S., Kakehashi, A., Fujioka, M., Wanibuchi, H., Yodkeree, S., Gi, M. Chemopreventive Potential of Bioactive Peptides Derived from Black Soldier Fly Larvae. P-30, 名古屋市立大学桜山キャンパス (2025 年 9 月 12~13 日)
 15. 梯アンナ、西土井悠作、邱桂鈺、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五、ヒト浸潤性膵管癌における新規早期診断マーカーとしての PRDX3 の検討及び発がん機序解明. P-7, 名古屋市立大学桜山キャンパス (2025 年 9 月 12~13 日)
 16. 梯アンナ、ワチラアルンウオンアルパマス、藤岡正喜、魏民、鰐渕英機、鈴木周五. MAFLD/MASH 肝発がんマーカーや分子機序への最近の洞察.第 38 回発癌病理研究会、演題 2, 国民宿舎サンライズ九十九里、千葉 (2025 年 8 月 20~22 日)
 17. Vachiraarunwong Arpamas、魏民、藤岡正喜、鈴木周五、邱桂ギョク、郭潤傑、野浦郁恵、梯アンナ、Praseatsook Kwanchanok、鰐渕 英機. ラットの急性吸入毒性を予測する新規 in vitro 毒性試験系の開発. 宜野湾市、第 52 回日本毒性学会学術年会 (2025 年 7 月 2~4 日)
 18. 鈴木周五、魏民、藤岡正喜、Arpamas Vachiraarunwong、梯アンナ、鰐渕英機.芳香族アミンによる職業性膀胱がん, Occupational bladder cancer associated with aromatic amines exposure. SY6-3、第 114 回日本病理学会総会、宮城県 仙台市、仙台国際センター (2025 年 4 月 17~19

日)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

該当なし

2. 実用新案登録

該当なし

3. その他