

厚生労働科学研究費補助金（化学物質リスク研究事業）
令和7年度 分担研究報告書

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および化学発癌物質誘発腫瘍モデルの作製

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

カーボンナノチューブ（CNT）の発がん機序を解明するため、CNT 誘発腫瘍と化学発癌物質誘発腫瘍を作製し、変異シグネチャーを比較した。F344 雄ラットに異なった DNA 障害をもたらすと考えられる 4 種類の発がん物質 MWCNT-N、MWCNT-B、DHPN、NNK を 4 週間 TIPS 投与し、2 年まで観察して発生した肺腫瘍および胸膜中皮腫を採取した。得られた腫瘍組織および同一個体の非腫瘍部組織は、病理組織学的に確認したうえで、DNA 抽出および変異シグネチャー解析に供した。解析の結果、CNT 誘発腫瘍では CNT 種に関連した SBS 変異シグネチャーの違いが認められた一方、明確なストランドバイアスは観察されなかった。また、CNT 誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。これらの結果から、CNT 発がんは DHPN/NNK などの化学発癌物質による直接的 DNA 損傷を主因とする発がんとは異なる特徴を有する可能性が示された。

A. 研究目的

多層壁カーボンナノチューブ（MWCNT）は、肺および/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。それらは体内に入ると分解されることなく異物として長期に残留するため、沈着部位の組織に持続的な影響を及ぼし、腫瘍形成に関与すると考えられる。このことは発がん性ニトロサミン類のように、生体内で代謝分解または活性化されて最終的に DNA 障害をもたらすという従来の発がん物質とは全く異なる。したがって、CNT 誘発腫瘍と化学発癌物質誘発腫瘍を比較・解析することにより、MWCNT の発がん機序の解明や、発がん予測法の開発に寄与できる。本研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発される肺腫瘍・胸膜中皮腫モデルを作製し、CNT 発がん機序の解析および予測法検討に用いる腫瘍・非腫瘍組織試料を整備することを目的とした。

B. 研究方法

F344 雄ラットに剛質線維（Rigid fiber）型の MWCNT-N（肺と胸膜中皮に発癌性あり）ともつれ型線維（Tangled fiber）の MWCNT-B（肺発癌性あり）を経気管内肺内噴霧（TIPS）投与し、比較対照として既知の肺発がんニトロサミン N-bis(2-hydroxypropyl) nitrosamine (DHPN) を 4000mg/kg および環境タバコ煙発癌物質 4-(methyl-nitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone (NNK) を 200mg/kg となるように週 1 回にて 4 週間（計 4 回）投与し（図 1）、生体内での動態、代謝機序の全く異なった物質による肺発がん機序の差異の有無について、発生した肺がんの DNA シグネチャー解析を実施した。

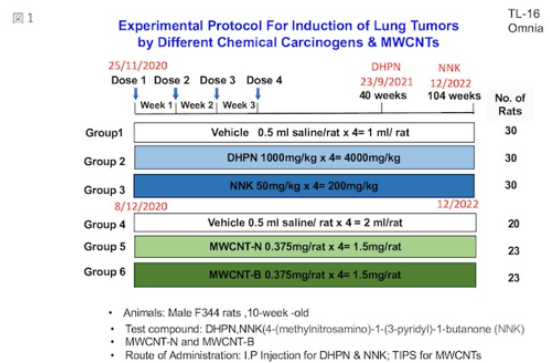


図 1. CNT および化学発癌物質による肺腫瘍・胸膜中皮腫誘発実験プロトコル

	Rat number	Pathologic diagnosis (tube labelling)	Control tissue (tube labelling)
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)

表 1. 変異シグネチャー解析対象とした肺腫瘍・中皮腫サンプル

(倫理面の配慮)

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

本分担研究では、MWCNT-N、MWCNT-B、DHPNおよびNNKを投与したラットを2年まで観察し、発生した肺腫瘍および胸膜中皮腫を採取した。得られた腫瘍組織および同一個体の非腫瘍部組織は、病理組織学的に確認したうえで、DNA抽出および変異シグネチャー解析に供した。解析対象とした肺腫瘍・中皮腫サンプルの概要(津田担当分)を表1に示す。

化学発癌物質投与群では、DHPN投与群から肺腺癌、扁平上皮癌検体が、NNK投与群からは肺腺癌が得られた。CNT投与群では、MWCNT-N投与群から中皮腫、肺腺癌が、MWCNT-B投与群からは肺腺癌が得られた。

班全体で得られたCNT誘発腫瘍を含む一塩基置換(SBS)変異シグネチャー解析では、複数のラットSBSシグネチャーが抽出された。これらのシグネチャーはCNT誘発腫瘍に共通して検出されたが、その寄与割合はCNT種により異なっていた。SWCNT関連腫瘍、MWCNT-7関連腫瘍、MWCNT-N関連腫瘍では、それぞれ優位となるSBSシグネチャーが異なる傾向を示し、肺腺癌と胸膜中皮腫という組織型の違いよりも、誘発に用いたCNT種との関連が強い傾向が認められた。

当初、CNTは生体内に長期残留し、慢性炎症や酸化ストレスを介して発がんに関与する可能性が想定されたため、酸化ストレスに直接対応する変異シグネチャーが主要な特徴として抽出されるかを検討した。しかし、CNT誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。一方、MWCNT-7関連シグネチャーでは酸化塩基修復や細胞増殖・内因性DNA損傷と関連し得る成分が含まれ、SWCNT関連シグネチャーでは8-NG形成に伴う塩基置換と整合し得る変異傾向がみられた。

また、CNT誘発腫瘍で観察された変異シグネチャーには明確なストランドバイアスは認められなかった。

D. 考察

本分担研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発された肺腫瘍・胸膜中皮腫を採取し、変異シグネチャー解析に供する腫瘍・非腫瘍組織試料として用いた。これにより、CNT 誘発腫瘍と、DHPN および NNK に代表される化学発癌物質誘発腫瘍を比較するための動物実験基盤が得られた。

SBS 変異シグネチャー解析では、CNT 誘発腫瘍において、肺腺癌と胸膜中皮腫という組織型の違いよりも、誘発に用いた CNT 種との関連が強い傾向が認められた。このことは、CNT の物性や形状の違いが、腫瘍の発生部位だけでなく、腫瘍形成過程における DNA 損傷応答や炎症性微小環境の違いにも反映される可能性を示している。

一方、CNT 誘発腫瘍に共通する明瞭な酸化ストレス由来の主要シグネチャーは認められなかった。この結果は、酸化ストレスや炎症が CNT 発がんに関与しないことを意味するものではない。腫瘍組織で検出される変異シグネチャーは、腫瘍形成過程を経て残存した最終的なゲノム変化を反映するため、投与後早期に生じる炎症、酸化・炎症関連 DNA 損傷、細胞増殖、組織傷害・修復反応が、単一の明瞭な酸化ストレス由来シグネチャーとして検出されない可能性がある。したがって、CNT 発がん機序を理解するためには、腫瘍組織の変異シグネチャー解析に加え、投与後早期の非腫瘍組織における病理学的変化、DNA 損傷指標、炎症性遺伝子発現を統合して評価する必要があると考えられる。

また、CNT 誘発腫瘍では明確なストランドバイアスが認められなかったことから、DHPN や NNK のように DNA 付加体形成を介する直接的遺伝毒性を主因とする発がんとは異なる機序が関与すると考えられた。すなわち、CNT 発がんでは、沈着部位における長期残留、異物応答、炎症の持続化、DNA 損傷応答、組織傷害・修復反応の反復などが、腫瘍形成に関与している可能性がある。以上の結果は、腫瘍組織を用いた変異シグネチャー解析が、CNT 発がん機序を理解するための有用な手がかりとなることを示している。さらに、得られた知見を投与後早期の非腫瘍組織における DNA 損傷、炎症性応答、細胞増殖および遺伝子発現変化の解析と組み合わせることで、腫瘍発生前段階における発がん機序の推定や、有害性予測指標の検討に応用できる可能性がある。

E. 結論

本分担研究では、MWCNT および化学発癌物質により誘発される肺腫瘍・胸膜中皮腫を作製し、変異シグネチャー解析に供する腫瘍・非腫瘍組織試料として用いた。CNT 誘発腫瘍では、CNT 種に関連した SBS 変異シグネチャーの違いが認められた一方、明確なストランドバイアスは観察されなかった。これらの結果から、CNT 発がんは DHPN/NNK などの化学発癌物質による直接的 DNA 損傷を主因とする発がんとは異なる特徴を有する可能性が示された。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Ahmed HM Omnia, Naiki-Ito A., Takahashi S., Alexander TW., Alexander DB., **Tsuda H.** A Review of the Carcinogenic Potential of Thick Rigid and Thin Flexible Multi-Walled Carbon Nanotubes in the Lung, *Nanomaterials* 15, 168 (2025) <https://doi.org/10.3390/nano15030168>.
2. Ahmed HM Omnia, Dina M. Saleh., Alexander TW., Takase H., Taquahashi Y., Hojo M., Maeno A.,

- Fukamachi K., Gi M., Hirose A., Tsuruoka S., Takahashi S., **Tsuda H.**, Naiki-Ito A. Comparative Carcinogenicity of Double-Walled Carbon Nanotubes of Different Lengths Administered by Intratracheal Installation into Rat Lungs, *Nanomaterials*, 2025, 15(18), 1402.
3. Dina M. Saleh., Ahmed HM Omnia, Alexander DB., Alexander TW., Ogawa K., Gi M., Naiki-Ito A., Abdallah S., **Tsuda H.** Use of the TIPS Technique as a Possible Method of Acute Inhalation Toxicity Assessment. *Journal of Applied Toxicology*, 2025; 0:1–14
 4. Gi M., Suzuki S., Dina M. Saleh., Ahmed HM Omnia, Alexander TW., Fujioka M., Vachiraarunwong A., Guo R., Qiu G., Noura I., Kakehashi A., Xie XL, Tsuruoka S., Hirose A., Naiki-Ito A., **Tsuda H.**, 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* 2025, 15(23), 1806.

2. 学会発表

1. Ahmed HM Omnia., Naiki-Ito A., Alexander DB., Takahashi S., **Tsuda H.** Comparative analysis of early pulmonary gene expression changes induced by carbon nanotubes and chemical carcinogens in rat lungs (第 42 回日本毒性病理学会学術集会 令和 8 年 1 月 21-22 日 名古屋)

G. 知的所有権の取得状況

1. 特許取得

なし

2. 実用新案登録

なし

3. その他

なし