

図 1. ミスト発生器と鼻部暴露チャンバー

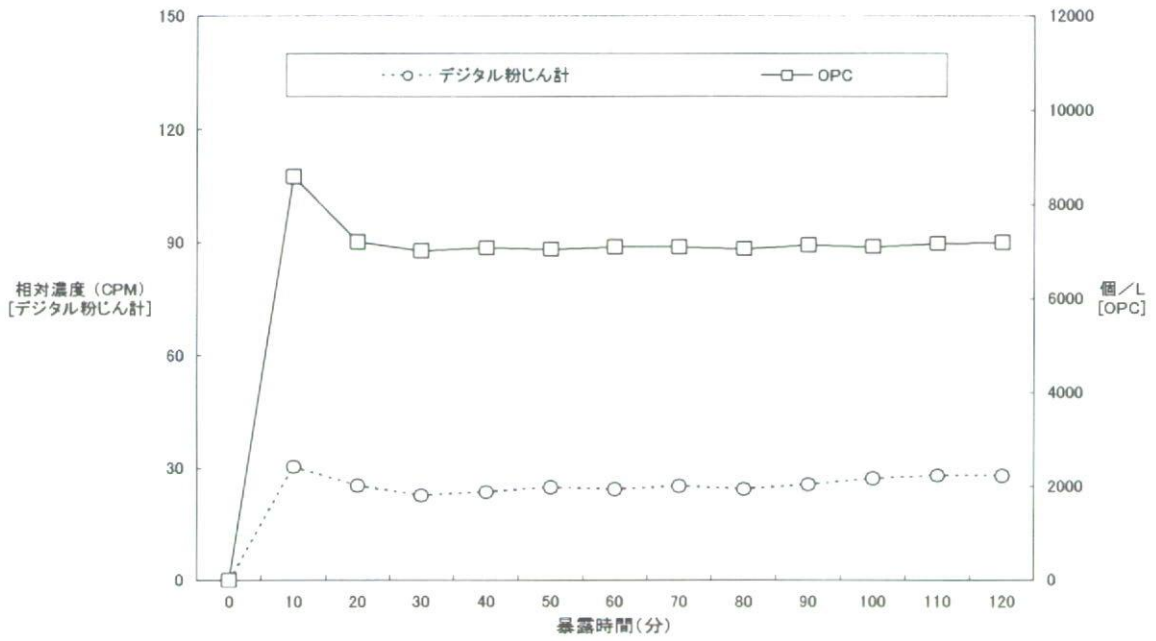


図 2. 溶媒対照群のデジタル粉じん計及び OPC 測定結果

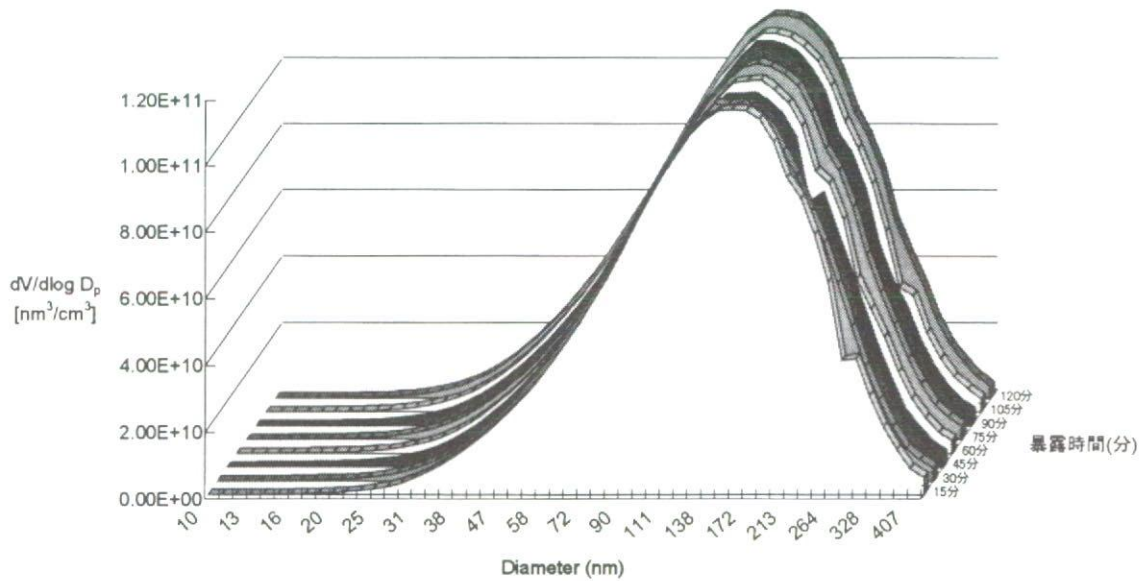


図 3. 溶媒対照群の SMPS による体積粒径分布の測定結果

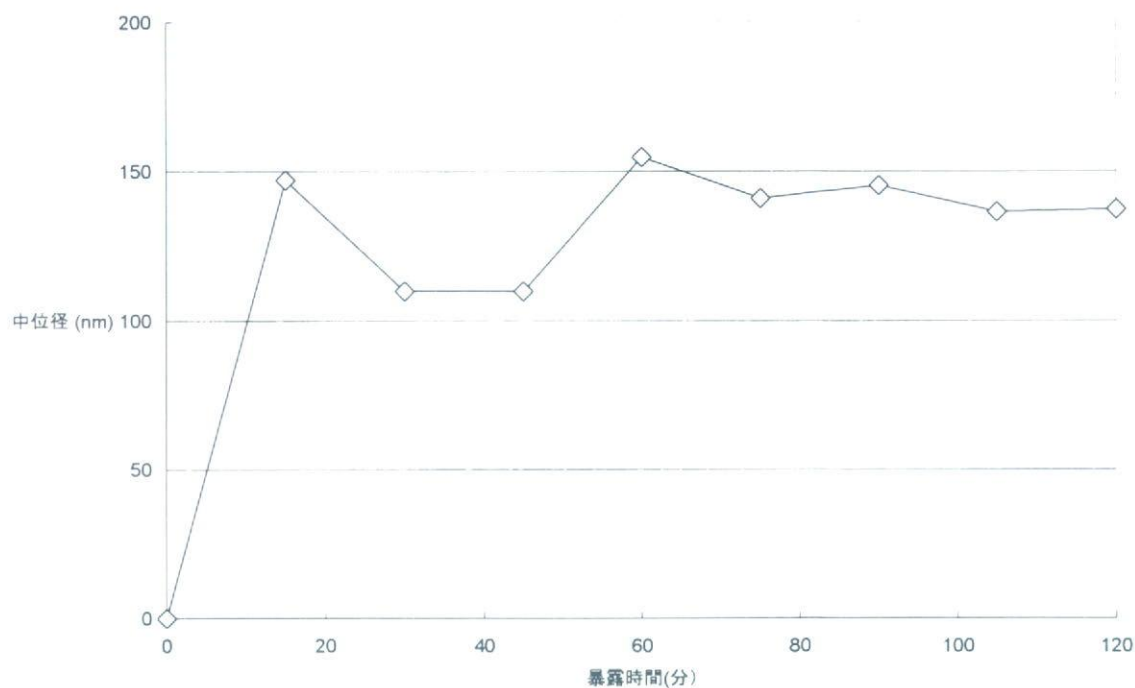


図 4. 溶媒対照群の SMPS による体積粒径分布の中位径の推移

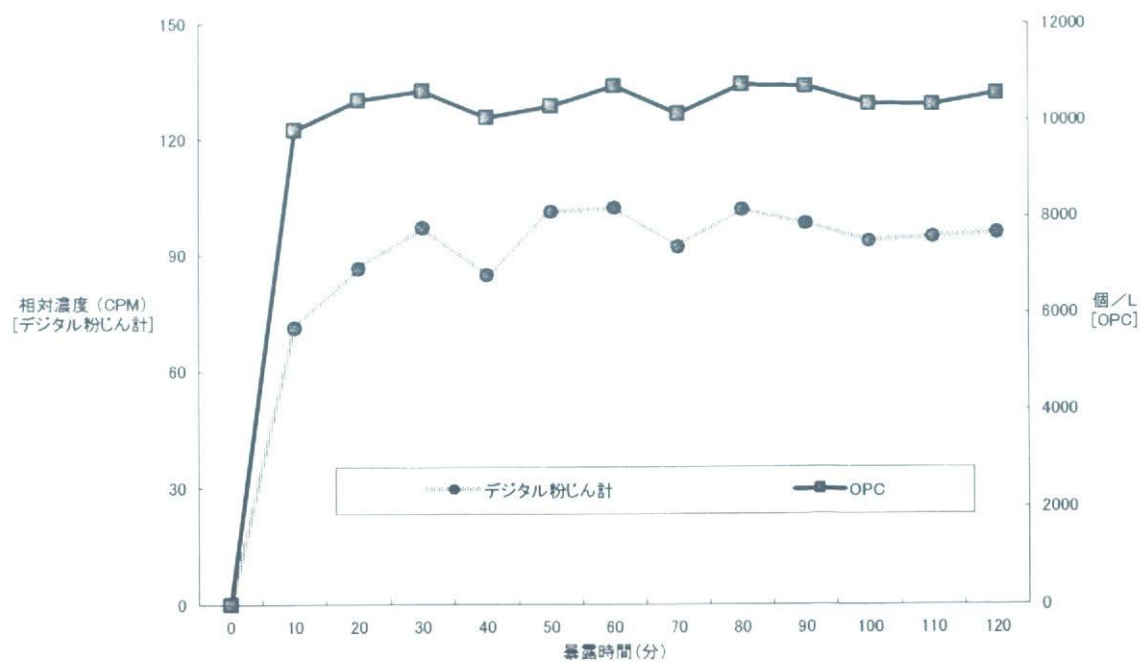


図 5. MWNT 投与群のデジタル粉じん計及び OPC 測定結果

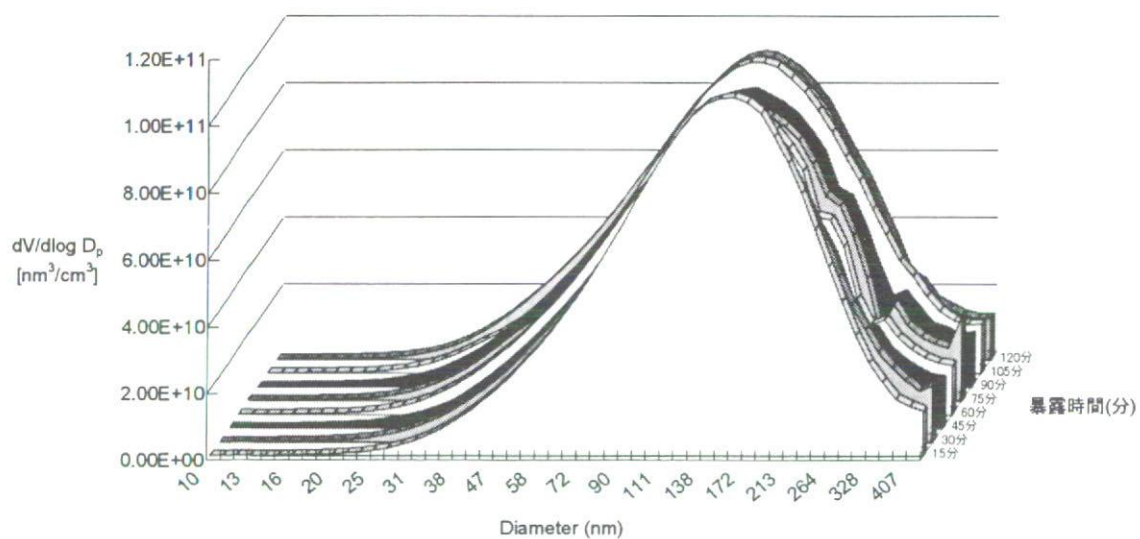


図 6. MWNT 投与群の SMPS による体積粒径分布の測定結果

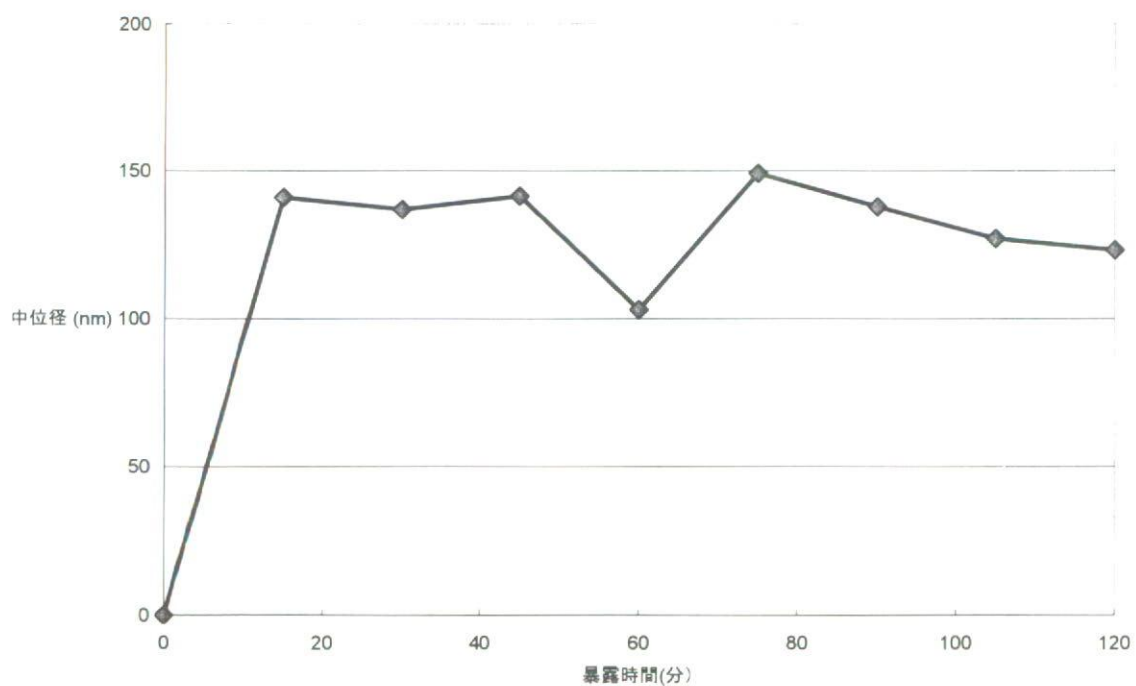


図 7. MWNT 投与群の SMPS による体積粒径分布の中位径の推移

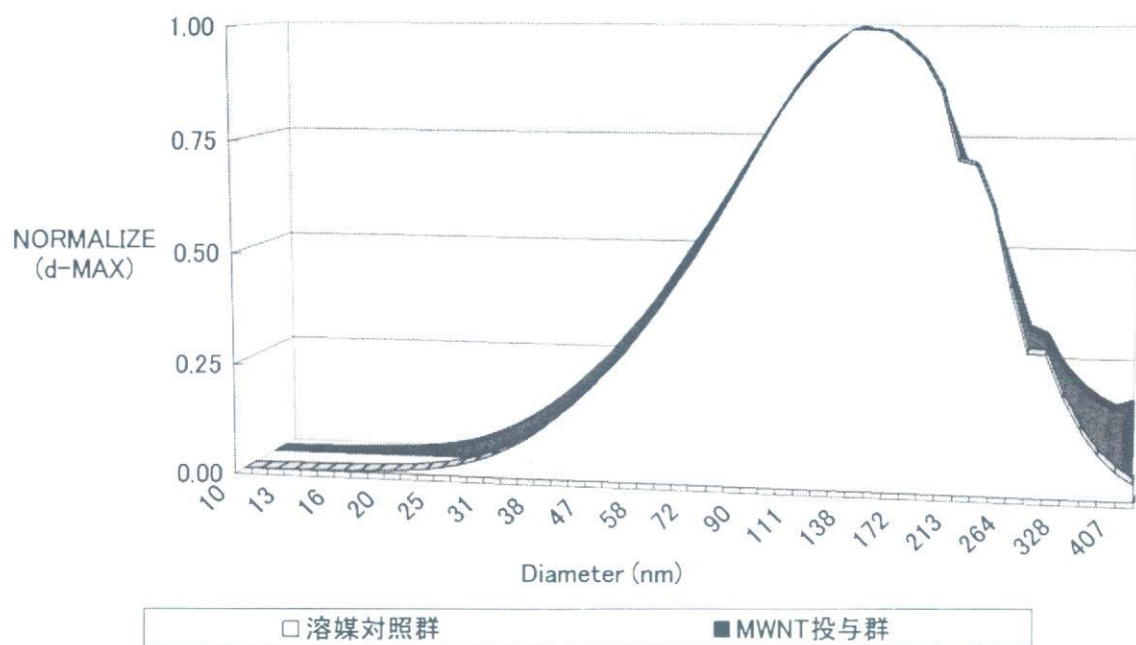


図 8. 体積粒径分布の 2 時間平均値の溶媒対照群と MWNT 投与群の比較 (MODE 径で正規化)

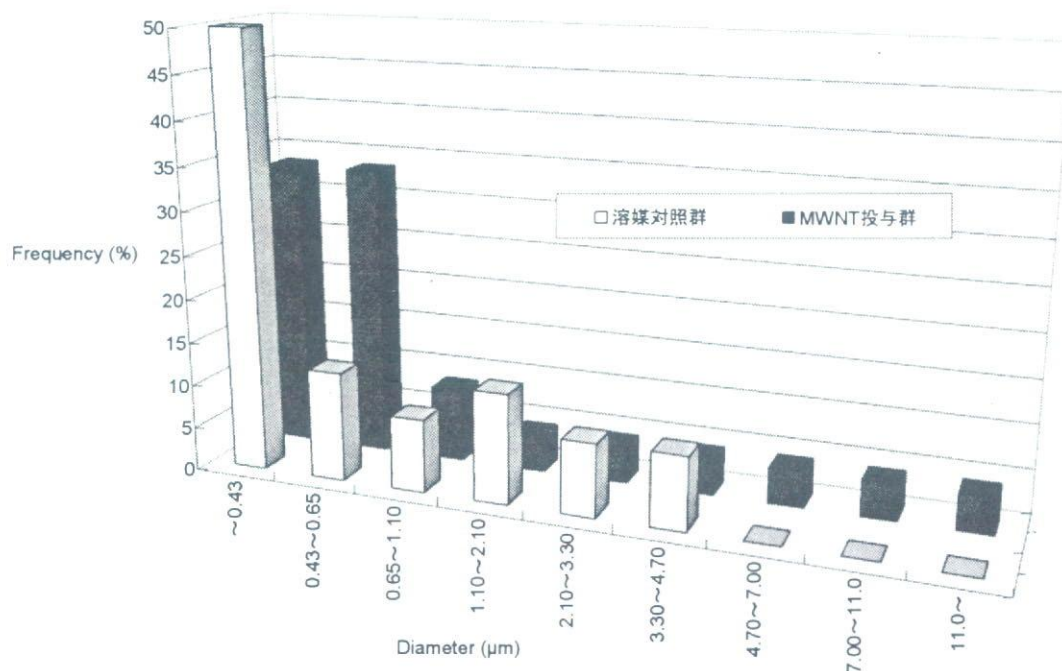


図 9. アンダーセンサンプラーによる粒径分布の溶媒対照群と MWNT 投与群の比較

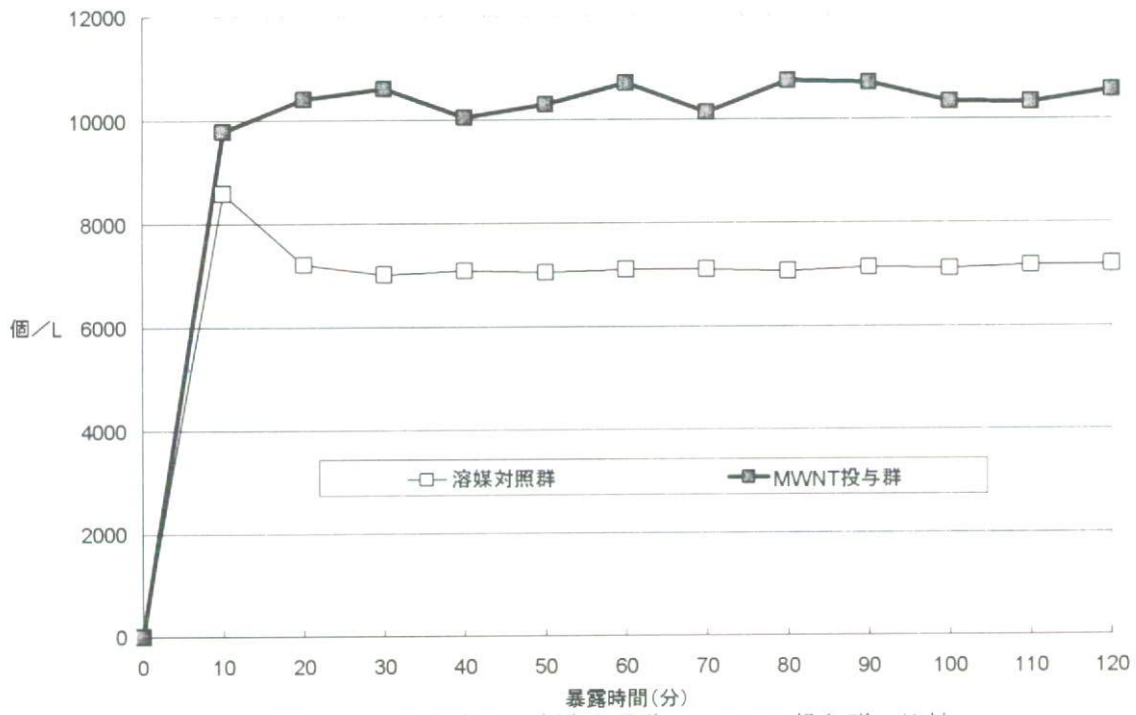


図 10. OPC 測定結果の溶媒対照群と MWNT 投与群の比較

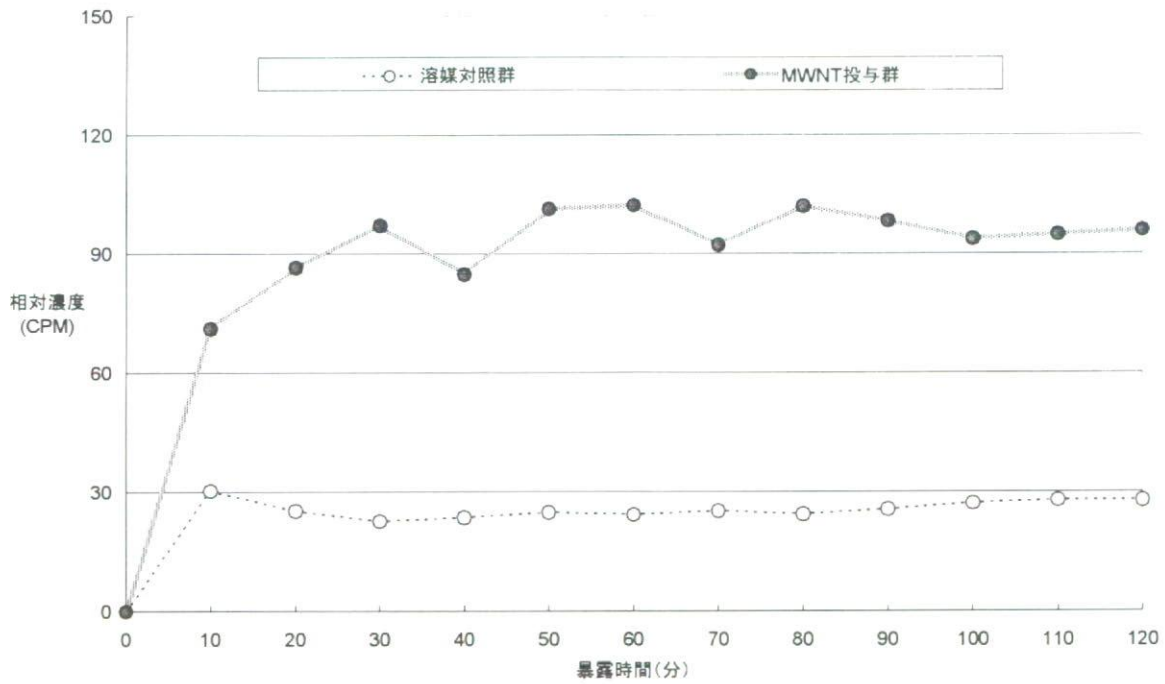


図 11. デジタル粉じん計測定結果の溶媒対照群と MWNT 投与群の比較

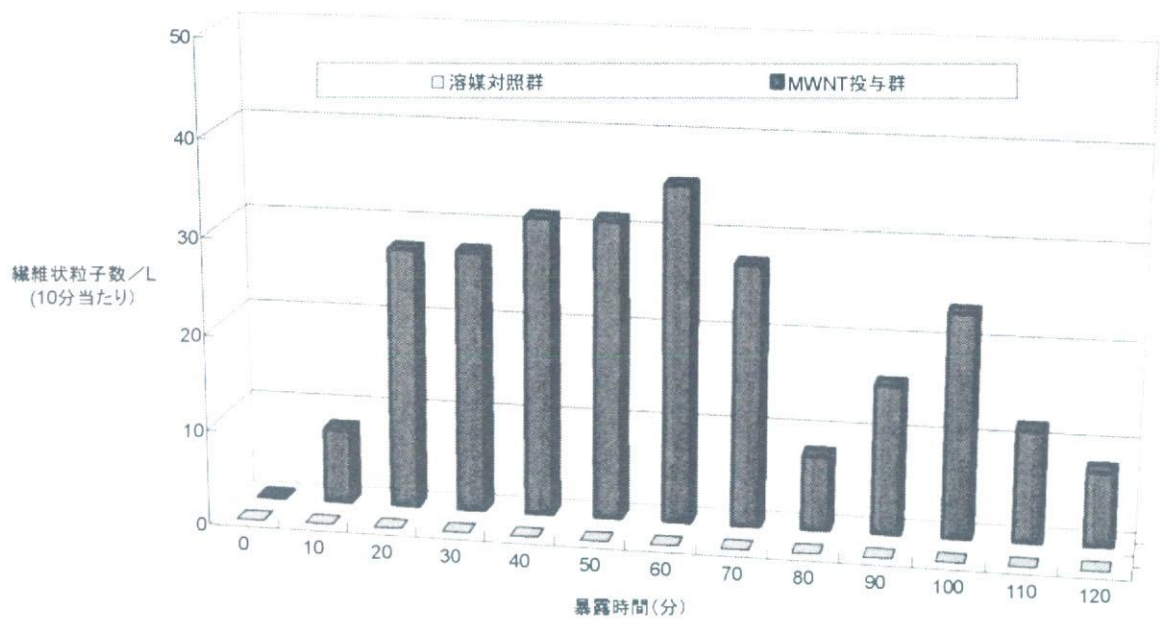


図 12. 繊維状粒子計測器の測定結果の溶媒対照群と MWNT 投与群の比較

研究課題名: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: 高生産量ナノマテリアルの環境中での分解代謝等に関する研究

分担研究者: 屋形 直明 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第三課 課長

研究協力者: 井上 義之 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第二課 副長

研究要旨

自然環境中での環境条件の変化による分解・代謝物の解析を行うため、18 年度に微生物を用いたフラーレン本体での分解度試験を実施した。その結果、フラーレン本体は微生物により分解されなかった。この原因の一つとして、フラーレン本体は、炭素のみで構成されているうえ、平均粒子径が約 21 μm の凝集体であり、微生物によるアタック部位との接触が少ないことが考えられた。そこで、今年度、フラーレンを水に分散させて得られた、粒子径及び水中存在形態の異なるフラーレン溶液(フラーレン水分散液)を用い、微生物による分解度試験を実施した。その結果、フラーレン水分散液は、フラーレン本体と同様に微生物による分解は認められなかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルはナノサイズで構造が制御された物質であり、特有の電気的・磁氣的・光学的・力学的特性を有する。これらの性質を利用し、優れた性能および機能性を兼ね備えた材料の研究開発が行われており、21 世紀の技術革新を担う新機能材料として、ナノマテリアルへの期待はどんどん大きくなっている。

しかしながら、ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については、現時点では不明な点が多い。環境経路の暴露を想定した場合には、酸化チタンやフラーレン、MWCNT の環境中での分解・代謝物の同定が必要である。

そこで、フラーレン(C60)を用いて、環境条件の変化(酸化、紫外線、微生物など)による分解・代謝物の解析を行うことを目的とし、微生物による分解度試験を OECD テストガイドライン 301C に準拠して実施したので報告する。

B. 研究方法

B-1 実験材料

被験物質として使用したフラーレン(C60)は、次の名称等を有するものを使用した。

CAS 番号	99685-96-8
供給者	フロンティアカーボン株式会社
商品名	nanom purple N60 -S
ロット番号	5A0184-A
純度	99%

試験の実施には汚泥が十分な活性度を有することを確認するため、対照物質としてアニリン(和光純薬工業製 試薬特級 ロット番号 TSM1103)を用いた。

B-2 活性汚泥の調製

本試験における活性汚泥は、以下のとおり調製したものをを使用した。

(1) 採集場所

以下の全国 10 ヲ所から採集した。

伏古川処理場(北海道札幌市)

深芝処理場(茨城県神栖市)

落合水再生センター(東京都新宿区)

中浜下水処理場(大阪府大阪市)

北上川(宮城県石巻市)
信濃川(新潟県新潟市)
吉野川(徳島県徳島市)
琵琶湖(滋賀県大津市)
広島湾(広島県広島市)
洞海湾(福岡県北九州市)

(2) 採集方法

2007年9月に下水処理場では、返送汚泥を採集し、河川、湖沼及び海では、表層水及び大気と接触している波打際の表土を採集した。

(3) 調製方法

活性汚泥の均一性を保つため、上記で採集してきた各地の汚泥混合液のろ液5Lと、約3ヶ月間培養した活性汚泥のろ液5Lとを混合して10Lとし、pHを7.0±1.0に調整して培養槽でばっ気した。

(4) 培養

培養槽へのばっ気を約30分間止めた後、全量の約1/3量の上澄液を除去した。これに脱塩素水道水を加え全量を10Lにして再びばっ気し(30分以上)、添加した脱塩素水道水中での合成下水濃度が0.1%になるように50g/L合成下水を添加した。この操作を毎日1回繰り返し、培養して活性汚泥とした。培養温度は25±2℃とした。

(5) 管理及び使用

活性汚泥の正常な状態を維持するため、培養中、上澄液の外観及び活性汚泥の生成状態を観察するとともに、活性汚泥の沈でん性、pH、温度及び溶存酸素濃度を測定し、管理基準(「新規化学物質等に係る試験の方法について」参照)の範囲内であることを確認した。この結果を生データとして保管した。活性汚泥の生物相は適宜光学顕微鏡を用いて観察し、異常のないことを確認した上で試験に供した。また、合成下水を添加してから18.5時間後の活性汚泥を使用した。

(6) 活性汚泥の活性度の点検

標準物質を用いて活性汚泥使用開始前に活性度を点検した。なお、活性汚泥使用開始日は、2007年10月16日であった。

B-3 試験の実施

(1) 活性汚泥の懸濁物質濃度の測定

活性汚泥の添加量を決定するために、「工場排水試験方法、懸濁物質」(JIS K 0102-1998 の14.1)に準じて懸濁物質濃度を2007年12月25日に測定したところ、活性汚泥の懸濁物質濃度は3540mg/Lであった。

(2) 基礎培養基の調製

「工場排水試験方法、生物化学的酸素消費量」(JIS K 0102-1998 の21.)に定められた組成のA液、B液、C液及びD液それぞれ3mLに精製水(高杉製薬製 日本薬局方)を加えて1Lとし、pHを7.0に調整した。

(3) フラーレン水分散液の調製

フルーレンに氷砂糖(鳳冰糖製)をらいかい後、HCO-40(日光ケミカルズ製)を加え、さらにらいかいした。これにイオン交換水或いは基礎培養基を加えフルーレン水分散液とした(図1及び2参照)。

(4) 試験液の調製

フルーレン水分散液

試験容器を7個用意し、試験液を下記の方法で調製した。これらの試験液について、(4)の条件で培養を行った。

(a) (水+被験物質)系(1個, 試験容器[0])

イオン交換水で調製したフルーレン水分散液とした。被験物質濃度は100mg/Lとした。

(b) (汚泥+被験物質)系(2個, 試験容器[1][2])

基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量(2.54mL)を差し引いた量]で調製したフルーレン水分散液に活性汚泥を添加した。被験物質濃度は100mg/Lとした。

(c) (汚泥+アニリン)系(1個, 試験容器[3])

アニリンの濃度が100mg/Lになるように、試験容器に基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量(2.49mL)を差し引いた量]及びアニリン29.5μL[添加量30mg=29.5μL×1.022g/cm³(密度)]を入れた。

(d) 汚泥ブランク系(1個, 試験容器[4])

基礎培養基[300mLから活性汚泥添加液量

(2.49mL)を差し引いた量]に活性汚泥を添加した。試験液(a)の対照区とした。

(e) 汚泥ブランク系 2(2 個, 試験容器[5][6])

試験液(b)と等量の氷砂糖及び HCO-40 を基礎培養基[300mL から活性汚泥添加液量(2.49mL)を差し引いた量]に溶解させ、これに活性汚泥を添加した。試験液(b)の対照区とした。

(5) 活性汚泥の接種

試験液(b)、(c)、(d) 及び(e)の試験液に B-2.の条件で調製した活性汚泥を懸濁物質濃度として 30mg/L になるように接種した。

(6) 試験液培養装置及び環境条件

・試験液(a)

300mL 用培養瓶(改良型培養瓶)を使用し、試験液培養温度は 25±1℃の範囲となるように調整し、試験液培養はマグネティックスターラーによる回転攪拌を行いながら遮光下で 28 日間行った。

・試験液(b)、(c)、(d) 及び(e)

試験液培養装置には、閉鎖系酸素消費量測定装置(恒温槽及び測定ユニット:大倉電気製、データ処理装置:旭テクネイオン製)を使用した。試験容器には、炭酸ガス吸収剤としてソーダライム, No.1(和光純薬工業製 二酸化炭素吸収用)を装着した 300mL 用培養瓶(改良型培養瓶)を使用した。

試験液培養温度は 25±1℃の範囲となるように調整し、試験液培養はマグネティックスターラーによる回転攪拌を行いながら遮光下で 28 日間行った。

(7) 観察及び測定

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察し、装置の作動状況を適宜点検した。また、生物化学的酸素消費量(BOD)の変化を連続的にデータ処理装置で自動記録して測定した。槽内温度は毎日測定記録した。

B-4 試験液の分析

HPLC による定量分析

試験液をメタノール又はトルエンで希釈し、下記の定量条件に基づき被験物質を分析した。HPLC 試料中の被験物質の濃度は、クロマトグラム上で得られた

標準溶液 1.00mg/L のピーク面積と HPLC 試料のピーク面積とを比較し、比例計算して求めた。ピーク面積の定量下限は、ノイズレベルを考慮して 1000µV・sec(被験物質濃度 4.9µg/L)とした。

ポンプ 島津製作所製 LC-10ADVP

検出器 島津製作所製 SPD-10ADVP

カラム L-column ODS(15cm×2.1mmI.D., 化学物質評価研究機構製)

カラム温度 40℃

溶離液 トルエン/メタノール(50/50 V/V)

流量 0.2mL/min

測定波長 335nm

注入量 10µL

検出器出力 2V/AU

分析試料中の被験物質濃度を求めるための標準溶液の調製は次のように行った。被験物質 100mg を正確にはかりとり、トルエンに溶解して 1000mg/L の被験物質溶液を調製した。これをトルエン/メタノール(1/1 v/v)で希釈し 1.00mg/L の標準溶液とした。標準溶液の調製と同様にして 0.500、1.00 及び 2.00mg/L の標準溶液を調製した。これらを HPLC の定量条件に従って分析し、得られたそれぞれのクロマトグラム上のピーク面積と濃度により検量線を作成した。

B-5 分解度の算出法

被験物質分解度

$$\text{分解度}(\%) = \frac{S_w - S_s}{S_w} \times 100$$

Ss: (汚泥+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値)(mg)

Sw: (水+被験物質)系における被験物質の残留量(測定値)(mg)

C. 研究結果

C-1 観察

培養期間中、試験液の状況を毎日目視観察した結果、装置の作動状況に異常はなかった。槽内温度は 25±1℃の範囲であった。

C-2 試験液の状況

試験液の状況は下記のとおりであった。

培養開始時では、フラーレン水分散液にアグリゲートは認められず、試験液は茶色であった。培養終了時では、(水+被験物質)系にはアグリゲート及び不溶物が認められず、試験液は茶色のままであった。pHは5.0であった。(汚泥+被験物質)系についても、(水+被験物質)系と同様に、試験液の変化は認められなかった。pHは5.2及び5.1であった。

C-3 分析結果

28日後の分析結果は下記のとおりであった。

なお、(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に被験物質はほぼ理論量残留し、HPLCクロマトグラム上に被験物質以外のピークは認められなかった。よって、変化物は生成しなかったと判断した(図3参照)。

C-4 分解度

28日後の分解度は下記のとおりであった。

HPLCによる被験物質の分解度は、-1%、2%(平均0%)であった。

D. 考察

本試験条件は、OECDテストガイドライン301Cに準拠したものであり、通常、被験物質の分解度は、BOD及び被験物質の定量分析により算出する。本試験ではフラーレンを水分散させるために、氷砂糖及びHCO-40を使用した。従って、これら助剤の微生物分解がBODに影響を与えるため、「フラーレン分解に寄与した真のBOD」を測定することはできなかった(図4参照)。しかしながら、被験物質の定量分析では、フラーレンは理論量残留し、変化物も認められなかったことから、本水分散液中のフラーレンは微生物により分解されないと結論付けた。

フラーレン水分散液は、糖類をフラーレンにいったん配位・溶解して再結晶化させることにより、フラーレンの水分散化を可能にしている。従って、粒子径(本水分散液は平均粒径174 μm)及び水中存在形態の

異なるフラーレン溶液が微生物により分解されることが期待されたが、その成果は認められなかった。

使用した活性汚泥は、国内の限定された地域の環境条件を均質にしたものであり、処理場汚泥などを使用した場合の本質的な生分解の有無を結論付けるものではないと考えられる。よって、更に異なる環境条件での試験を実施し、確認することが望まれる。特に、光による変化の有無についても調査する必要があるであろう。

E. 結論

本試験条件下において、フラーレン(C60)は微生物により分解されなかった。今後、他の環境条件を考慮した試験や他のナノマテリアルについて体系的な環境運命調査が必要となる。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

G. 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

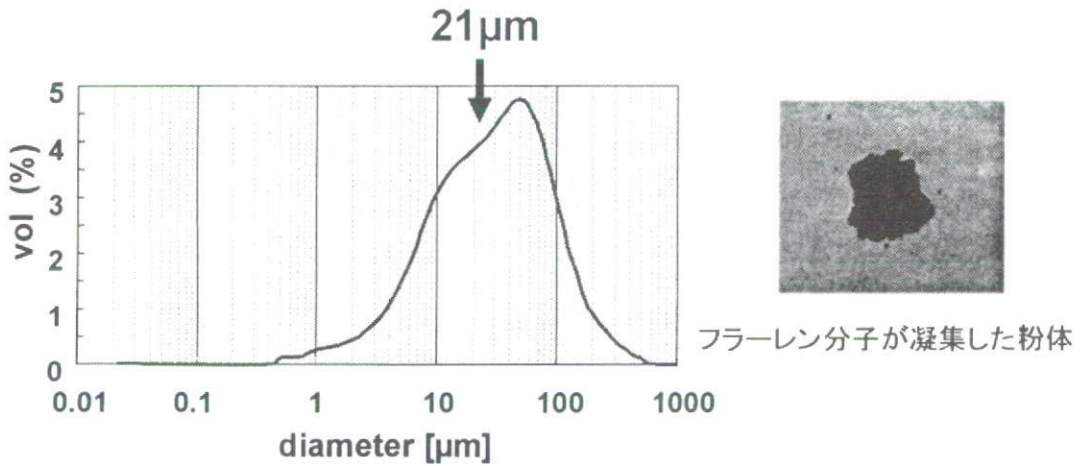


図1 本試験に用いたフラーレンの平均粒子径と粒度分布:平均粒子径が約21 μ mの凝集体であり、微生物によるアタック部位との接触が少ないと考えられる。

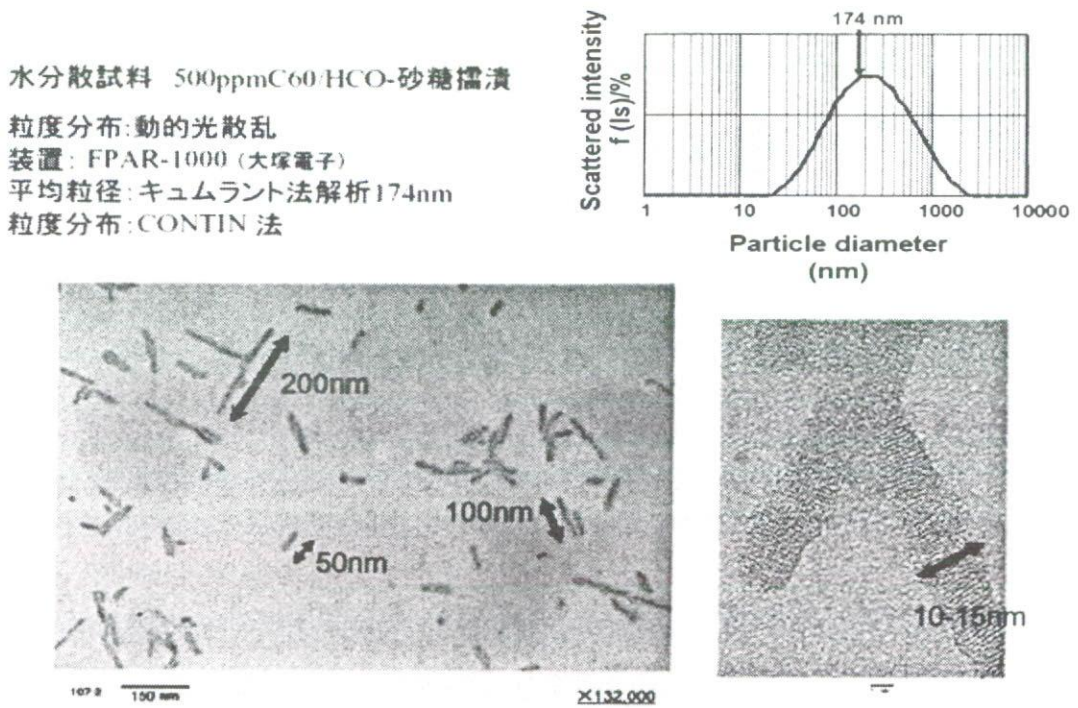
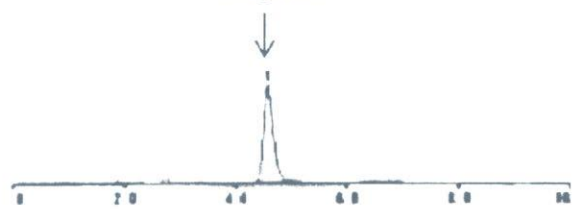


図2 フラーレン水分散液の粒度分布及び水中存在形態:フラーレンは良好に水に分散された。平均粒径174 μ mであり、針状の凝集体として水中に存在した。

Standard solution 1.00mg/L

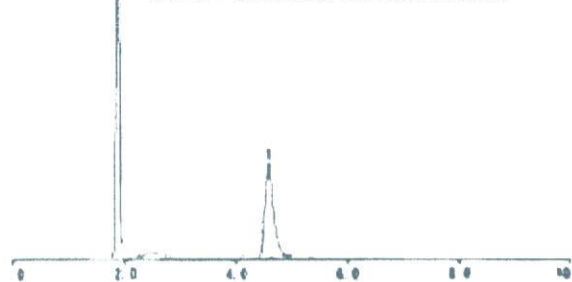
Standard solution 1.00 mg/L

Peak position



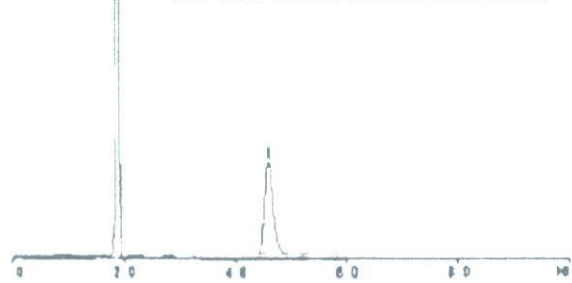
Sample A

(a)(水+被験物質)系(試験容器[0])



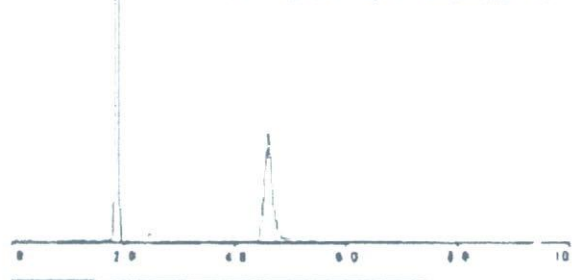
Sample B-1

(b)(汚泥+被験物質)系(試験容器[1])



Sample B-2

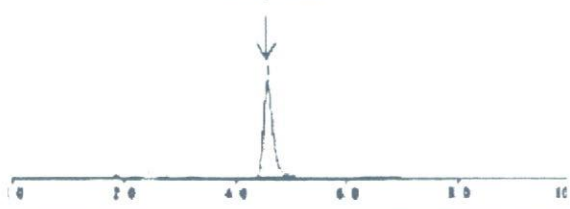
(b)(汚泥+被験物質)系(試験容器[2])



Standard solution 1.00mg/L

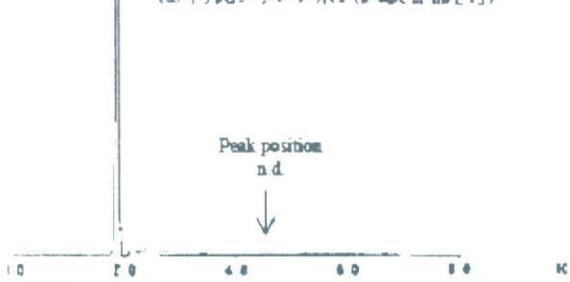
Standard solution 1.00 mg/L

Peak position



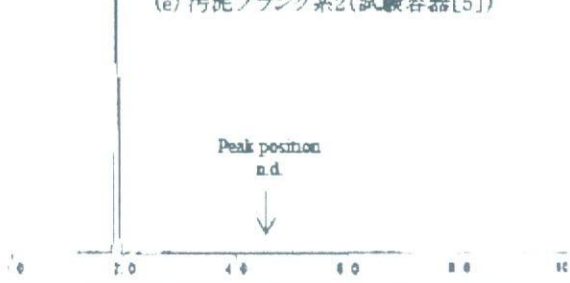
Sample D

(d) 汚泥ブランク系1(試験容器[4])



Sample E-1

(e) 汚泥ブランク系2(試験容器[5])



Sample E-2

(e) 汚泥ブランク系2(試験容器[6])



図 3 HPLC による被験物質分析:(水+被験物質)系、(汚泥+被験物質)系共に被験物質はほぼ理論量残留し、HPLC クロマトグラム上に被験物質以外のピークは認められなかった。

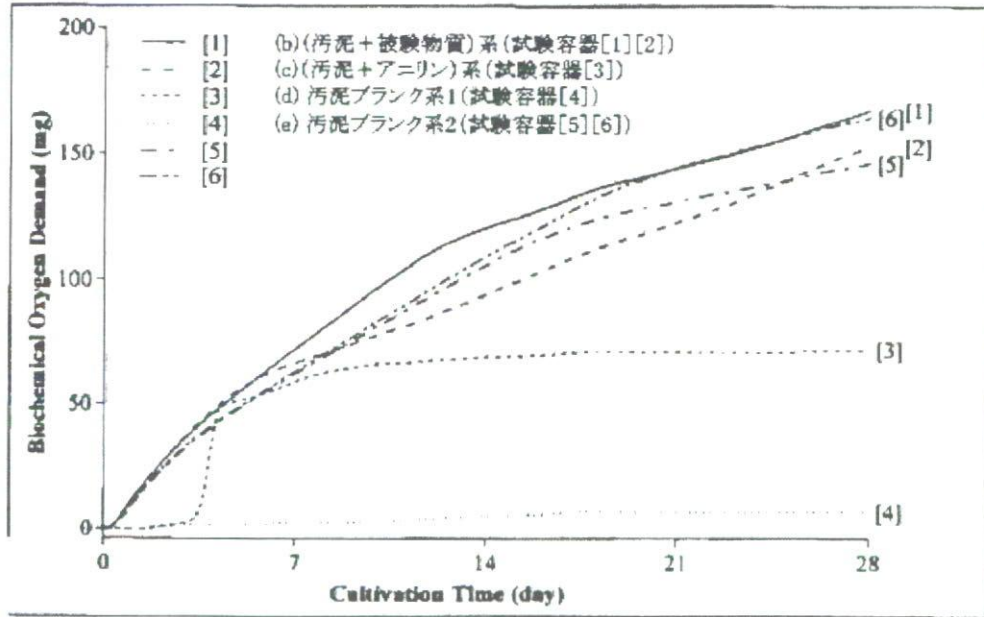


図 4 BOD チャート:分散剤として使用した氷砂糖及び HCO-40 の微生物による分解のため、試験容器[1]、[2]、[5] 及び[6]の BOD 曲線は上昇した。したがって、フラーレン分解に寄与した真の BOD を測定することはできなかった。なお、試験容器[3]はアニリンの BOD 曲線である。本試験のアニリンの BOD 分解度は 72%あり、試験の有効性の基準値(60%以上)を満たしたことから、本試験は有効であった。

平成 19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: ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名: ナノマテリアルの脂質二重膜との相互作用および
細胞内導入に関する基礎的研究

分担研究者 新井 洋由 東京大学大学院薬学系研究科 衛生化学 教授

研究要旨

ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については不明な点が多く、その解明が重要な課題となっている。本年度は、人体への影響を評価するモデルとして、リポソームにフラナーレンを取り込み、マウス腹腔マクロファージに投与させた際の効果について解析を行った。フラナーレンを内包したリポソームをマクロファージに添加した結果、マクロファージ内にフラナーレンが取り込まれる様子が観察されたが、これらフラナーレンを取り込んだマクロファージの TNF α 産生に対する影響は特に見られなかった。また、生態系への影響を評価するため、土壌環境のバロメーターといわれる線虫 *C. elegans* を用い、フラナーレンの影響を検討した。氷砂糖を使用して分散したフラナーレン分散水溶液を用いた結果、いずれのフラナーレン濃度(15~250mg/L)においても、線虫の成長速度、運動性、形態など、実体顕微鏡で判別可能な変化は見られなかった。

A. 研究目的

ナノマテリアルはナノサイズで構造が制御された物質であり、優れた性能および機能性を兼ね備えた新機能材料として注目を集めている。しかしながら、ナノマテリアルの人の健康や環境中の生物への影響については不明な点が多く、その解明が重要な課題となっている。

本年度は、人体への影響を評価するモデルとして、リポソームにフラナーレンを取り込み、マウス腹腔マクロファージに投与させた際の効果について解析を行った。また、生態系への影響を評価するため、土壌環境のバロメーターといわれ、かつモデル生物としても注目されている線虫 *C. elegans* を用い、フラナーレンの影響を検討した。線虫へのフラナーレンの投与方法としては、「財団法人化学物質評価研究機構」において

開発された、水溶性のフラナーレン水分散液を用いた。

1. マウス腹腔マクロファージに対するフラナーレンの影響(C60 リポソームによる投与)

【方法】

フラナーレンサンプル Nanom purple KN 100mg をキシレン 10ml に溶解したところ、30-40 %程度が溶解した。クロロホルム、ベンゼンではほとんど溶解性を示さなかった。キシレン溶解液を濾過し、-20℃保存したものを以下の実験に用いた。

マウスの腹腔から採取したレジデント腹腔マクロファージを培養し、リポソーム添加によるフラナーレンの細胞内導入を試みた。PC、PS、フラナーレン(C60)、コレステロール(Chol)を用いてリポソームを調整した。リ

ポソームは、まず、PC、PS、C60、Chol 溶液をエバポレーションしてリピッドフィルムを作る。その後、DMEM を添加し超音波処理することでリポソームを調整する。この段階で白濁したリポソーム溶液が出来上がる。C60 を含ませたリポソーム溶液を顕微鏡で観察すると大きな針状の不溶性沈殿物が見られた。そのため、調整したリポソームを内径 0.2 μ m のフィルターを通してマクロファージに添加した。コントロールを含め、1:DMEM のみ、2: PC/PS/Chol リポソーム、3:PC/PS/Chol/C60 リポソームをマクロファージに添加し、細胞形態を観察した。

【結果および考察】

1日後、1 の添加条件では泡沫化は観察されず目立った変化はなかった。一方、2、3 の添加条件では細胞内に脂肪滴が観察され泡沫化が見られた。その後2日、3日と培養時間を長くしてみたが、2、3 の添加条件でともに泡沫化は進行するもののC60の有無で特に差は見られなかった。

また、上記と同様の条件にさらにバクテリア由来のリポ多糖(LPS)を添加して、マクロファージを培養し、LPSによる炎症性サイトカインの産生に対するフラレンの影響を調べた。炎症性サイトカインはTNF α ELISA Kit (BD Biosciences)を用いてTNF α の産生量を経時的に評価した。リポソーム添加後、1-3日後までのTNF α を調べたところ、上記いずれの添加条件でほとんど差は見られなかった。

今回、フラレンを内包したリポソームをマクロファージに添加した結果、マクロファージ内にフラレンが取り込まれる様子が観察された。しかしこれらフラレンを取り込んだマクロファージのTNF α 産生に対する影響は特に見られなかった。3の条件下で泡沫化させたマクロファージを顕微鏡下で観察しても脂肪滴が紫に染まるということは見られず、マクロファージに取り込まれたフラレンの量が明らかでない。今後LC-MSなどを用いたフラレンの定量系を構築し、調整したリポソームにおけるフラレン、マクロファージに取り込まれたフラレンを定量する必要がある。

2. 線虫 *C. elegans* に対するフラレンの影響(C60水分散液による投与)

【方法】

被験物質として使用したフラレン(C60)は、次の名称等を有するものを使用した。

CAS 番号:99685-96-8

供給者: フロンティアカーボン株式会社

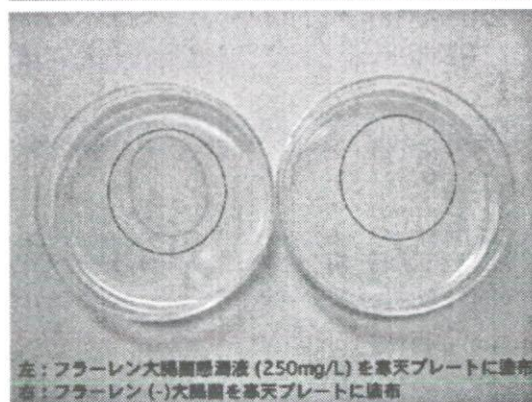
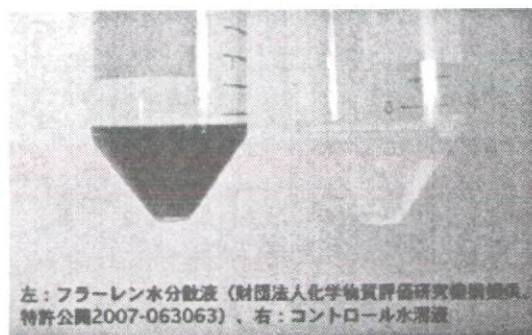
商品名: nanom purple N60 -S

ロット番号:5A0184-A

純度: 99%

フラレン水分散液の調製:フラレンに氷砂糖(鳳水糖製)をらいかい後、HCO-40(日光ケミカルズ製)を加え、さらにらいかいした。これにイオン交換水或いは基礎培養基を加えフラレン水分散液とした(財団法人化学物質評価研究機構提供、特許公開2007-063063、右上図:左チューブを参照。写真は500 mg/L フラレン水分散液)。

フラレン大腸菌プレートの作製:線虫は大腸菌(OP50)をエサとして生育する。LB 培地で一晚培養した大腸菌培養液にフラレン水分散液を混ぜ、250mg/L、120mg/L、60mg/L、30mg/L、15mg/Lのフラレン大腸菌懸濁液を調製した。さらに、これを寒天培地に播き、24時間室温で培養し、フラレン(C60)大腸菌プレートとした(右下図:左プレート。青線内に大腸菌を塗布)。コントロールとして、上記操作においてフラレンを加えないものを準備した。

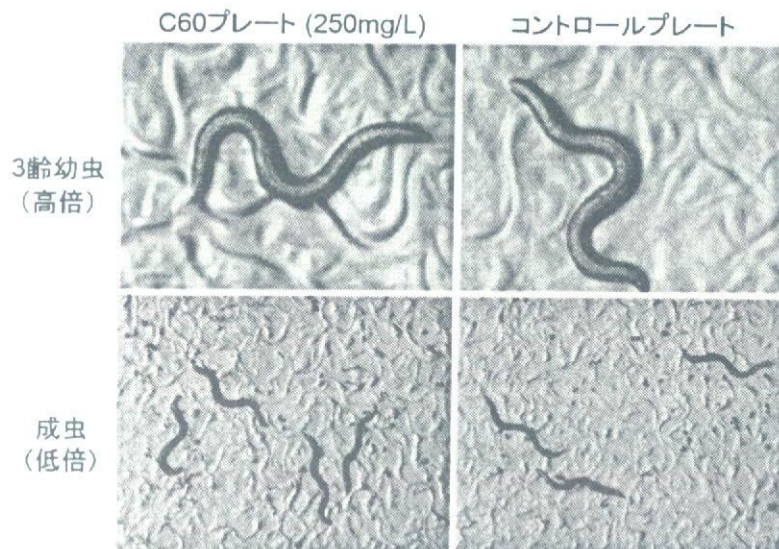


線虫の培養および解析:野生型(Bristol N2 株)の雌雄同体の成虫を C60 プレートおよびコントロールプレートにおき、約 3 時間産卵させた。その後、各プレート上で培養を続け、孵化した幼虫が成虫になるまで培養した(約 3 日)。さらに、成虫になった後、2 日培養を続け成虫期における影響を調べた。

【結果および考察】

いずれのフラーレン濃度においても、線虫の成長速度、運動性、形態など、実体顕微鏡で判別可能な変化は見られなかった(右図上段:幼虫期における成長速度、形態に全く変化は見られない)。また成虫期における生殖能にも全く影響が見られず、次世代の子孫も同様に得られた(右図下段:C60 プレートに 4 匹、コントロールプレートに 3 匹の成虫があり、プレート上に点在する黒い点状のものが次世代の卵である)。正立型微分干渉顕微鏡を用いて、体内の詳細を調べたところ、全く異常は認められなかった。

水分散フラーレンを含む大腸菌プレートは茶色に着色して見えるが(前ページ写真)、線虫腸内にフラーレン様の物質は観察されなかった。顕微鏡の解像度の問題も考えられるので、上述のマクロファージと同様、何らかの定量系が必要である。取り込まれていないと仮定すると、自然環境下においても、線虫の体内にはフラーレン自体取り込まれず、無害と考えられる。



平成 19 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：ナノマテリアルのヒト健康影響の評価手法の開発のための有害性評価および
体内動態評価に関する基盤研究

分担研究課題名：ナノマテリアルの遺伝毒性評価系における基礎的研究

分担研究者： 本間正充 国立医薬品食品衛生研究所 変異遺伝部第一室 室長

研究要旨

ナノ物質の一つであるフラーレン(C60)について、その *in vitro* 遺伝毒性を評価した。C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞を用いて定法に従って染色体異常試験を行った。5mg/ml の最高濃度まで試験した結果、染色体の構造異常は観察されなかったが、S9 存在、非存在下の両条件において、2.5mg/ml 以上で倍数体細胞の有意な増加が観察された。この理由として物理的要因による細胞質分裂阻害の可能性が考えられる。また、C60 の細胞膜透過性を高めるため、フォスファチジルコリン(PC)、およびフォスファチジルセリン(PS)により C60 リポソームを作成し、その *in vitro* での遺伝毒性を評価した。2 種類の方法（①フィルター非濾過、②フィルター濾過）で C60 を作成し、CHL 細胞に対する細胞毒性、小核誘発性を検討した。両試験検体を CHL 細胞で、48 時間、30ul/ml（調整可能最高濃度）まで処理したが、両者に有意な小核の誘発は認められなかった。また、細胞毒性は②の試験検体で用量依存的に増加したが、同時に作成した C60 不含のリポソームでも同程度の細胞毒性が観察されたことから C60 の影響によるものではないと判断された。

以上のことから、C60 は細胞に取り込まれにくく、仮に取り込まれたとしてもその遺伝毒性は極めて軽微であると考えられる。一方、細胞表面に接触する C60 は細胞質の分裂を阻害し、染色体の倍数性を誘発する可能性が示唆された。この細胞表面反応に対する光の影響が今後の課題である。

キーワード；ナノ粒子、フラーレン(C60)、遺伝毒性、染色体異常、倍数性

A. 研究目的

ナノテクノロジーの中心的役割を担い、且つ今後その利用が広範になると思われるナノサイズ物質が、生体内に侵入した場合の有害性を予測・評価する一環として、その遺伝毒性、細胞毒性に着目して研究をおこなう。本年度は、

超微粒子フラーレン(C60)について、その *in vitro* 遺伝毒性を評価した。

B. 研究方法

1) 試験化合物

フラーレン (C60) はフロンティアカーボン社

(nanom purple SUH, >99.9%)を用いた。

2) リボソームの調製

調整法①(西村法：フィルター非濾過)：L- α -フォスファチジルコリンおよび 3-sn-フォスファチジル-L-セリンをクロロホルムで溶解し、それぞれの脂質の同一重量相当分に当たる容量を、総容量が 0.5~1ml となるようにガラスチューブに移した。1mg/ml C₆₀ のトルエン溶液を加え、攪拌して十分に混和した。窒素ガスでクロロホルムを穏やかにとぼして脂質膜を作成した。両脂質の合計最終濃度が 1mg/ml となるように PBS(-)を加え、攪拌してリボソーム懸濁液とした。

調整法②(最上法：フィルター濾過)：L- α -フォスファチジルコリン(PC, in chloroform)、および 3-sn-フォスファチジル-L-セリン(PS, in chloroform/ methanol (95/5, v/v))、フラーレン(in toluene)のそれぞれのストック溶液より、ナス型フラスコに、PC:PS:フラーレンを 5:5:0.5 のモル比で混合し、ロータリーエバポレーターにより溶媒を蒸発させ、真空乾燥機で一晩乾燥させた。PBS を加えて 10mM に調整、攪拌し、液体窒素を用いて凍結融解を 3 回繰り返した。試料はバス型超音波発生装置で 30 分、カップホーン型超音波発生装置で 1 分×5 回の処理を行ったのち、0.45mm の PVDF 膜フィルターで濾過した。濾液を採取し、DLS7000 (大塚電子)により粒子径を測定した。濾液の PC 濃度はリン脂質定量キット(和光純薬)を用いて、フラーレン濃度はトルエン抽出後に 331nm での吸光度を測定することにより決定した。PS/PC リボソームは平均粒子径が 160 nm、フラーレンを含有するリボソームは 280 nm であった。リボソームからフラーレンをトルエン抽出し測定したところ、フラーレンは 10 mM の PS/PC リボソーム中に 40 μ g/ml の濃度で分散されていることが確認された。

1) CHL 細胞による遺伝毒性試験

染色体異常試験：C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞を用いて定法に従って染色体異常試験を行った。試験は、S9mix 非存在下、

存在下での 6 時間処理試験、S9mix 非存在下での 24 時間処理試験を行った。処理終了(染色体標本作製)の 2 時間前に、最終濃度 0.2 μ g/ml となるようコロセミド溶液 (Invitrogen Corp.) を添加し、細胞分裂を中期で停止させた。次いで、培養液を遠心管に全量移した後、0.25%トリプシン溶液 (Invitrogen Corp.) を用いてプレートより細胞を剥離し、遠心管内の培養液に加えた。細胞懸濁液を 1000 r/min で 5 分間遠心分離して培養液を除いた後、37°C に保温しておいた 75 mmol/L 塩化カリウム水溶液を約 5 mL 加え、37°C 中で 16 分間低張処理を行った。遠心分離により低張液を除いた後、氷冷した固定液(メタノール 3 容：酢酸 1 容)で細胞を固定した。固定液を 2 回交換した後、新しい固定液を適量加え細胞浮遊液とし、脱脂洗浄したスライドガラス上に 1~2 滴ずつ滴下した。スライド標本を十分に乾燥させ、1/100 mol/L ナトリウム・リン酸緩衝液(pH 6.8: Merck KGaA)を用いて希釈した 1.2%ギムザ染色液

(Merck KGaA) で 12 分間程度染色し、乾燥させた。各プレート当たり 100 個、すなわち 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を顕微鏡下(\times 600 程度)で観察し、染色体の形態的变化としてギャップ(gap)、染色分体切断(ctb)、染色体切断(csb)、染色分体交換(cte)、染色体交換(cse)およびその他(oth)の構造異常に分類した。また、数的異常として 1 用量当たり 200 個の分裂中期像を観察し、倍数体等の出現数についても計数した。

小核試験：供給されたリボソーム C60 を直接増殖期の CHL 細胞に添加し、48 時間培養し小核の標本作製した。培養細胞液を遠心して上澄を捨て、0.075 M KCl 水溶液を加えて室温で低張処理を行い、固定液(メタノール：氷酢酸=3:1, v/v)を静かに加えた。遠心(1000~1500 rpm、約 5 分)による固定液の更新を 2 回繰り返したのち、細胞を少量の固定液に浮遊させ、その懸濁液を伸展器上であらかじめ約 30°C に暖めてあるスライドクラスに滴下し、小核標本作製した。観察直前に 20 μ g/ml のアクリジンオレンジ溶液をスライドガラス上に滴下して染色し、B 励起による蛍光顕微鏡

下で 1000~2000 細胞あたりの小核を有する細胞の数を計数した。細胞毒性は、48 時間処理時の相対細胞増殖率により求めた。

(倫理面への配慮)

本研究ではいかなるヒト生物材料を使用しておらず、また実験動物も使用していないため倫理上問題はない。また、全ての実験は本研究所倫理規定に準拠して行った。

C. 研究結果

1) CHL 細胞による染色体異常試験

C60 を 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、チャイニーズハムスター由来 CHL 細胞を用いて定法に従って染色体異常試験を行った。試験は、S9mix 非存在下、存在下での 6 時間処理試験、S9mix 非存在下での 24 時間処理試験を行った。

S9mix 非存在下、存在下での 6 時間処理試験、S9mix 非存在下での 24 時間処理試験の結果をそれぞれ Table1、2、3 に示す。最高量 5 mg/ml までの試験した結果、それぞれの処理で用量依存的に細胞毒性が現れた。細胞毒性は 24 時間処理群で顕著であり、2.5mg/ml 以上では細胞毒性のため染色体の観察は不可能であった。細胞毒性にもかかわらず染色体の構造的以上は全ての処理群で観察されなかった。一方、S9mix 非存在下、存在下での 6 時間処理群では 2.5mg/ml 以上で倍数体細胞の有意な増加が観察された。

2) CHL 細胞による小核試験

C60 の哺乳類培養細胞に対する遺伝毒性評価として、CHL 細胞による小核試験も行った。ここでは、細胞膜透過性を高めるため、フォスファチジルコリン(PC)、およびフォスファチジルセリン(PS)により C60 リポソームを作成し、その *in vitro* での遺伝毒性を評価した。2 種類の方法 (①フィルター非濾過、②フィルター濾過) で C60 を作成し、CHL 細胞に対する細胞毒性、小核誘発性を検討した。両試験検体を CHL 細胞で、48 時

間、30ul/ml (調整可能最高濃度) まで処理し、細胞毒性と小核誘発性を検討した。

①の試験サンプルではわずかな小核の誘発が見られたが、有意ではなく、また用量依存性も観察されなかった。細胞毒性に関しても変化が見られなかった (Table 4)。②のサンプルでも同様に有意な小核の誘発は見られなかった。細胞毒性の発現には用量相関性が観察されたが、C60 不含のリポソームでも同様の反応が見られたことから、C60 による影響ではないと判断された (Table 5)。

D. 考察

ナノマテリアルは、その大きさや形状が、アスベストと類似していることから生体毒性、特に発がん性が懸念されている。しかしながら、ナノマテリアルの多くは不溶性であり、その生体影響に関する試験が極めて困難である。今回 0.5%カルボキシメチルセルロース溶液で懸濁調整し、染色体異常試験を行ったが、顕微鏡観察下で形状は主として μm であり、ナノに相当する成分は数%程度と考えられた。

この C60 懸濁物を CHL 細胞と共に培養すると、用量依存的に細胞毒性が観察された。また、構造異常の誘発は認められなかったが、倍数体細胞の有意な増加が観察された。Mori らも同様に CHL 細胞を用いて C60 の染色体異常試験を行っている

(Tox. Let., 225, 48-54, 2006)。結果は陰性であるが、倍数性の増加は有意ではないが、わずかに観察されている。C60 の倍数性誘発機構として物理的要因による細胞質分裂阻害の可能性が考えられるため、C60 の調整法、分散法により倍数性の誘発の程度が異なるのかもしれない。いずれにせよ細胞表面との接触が何らかの細胞機能を変化させる可能性が指摘される。

細胞中にできるだけ C60 を取り込ませ、その影響を検討するため様々な可溶化、修飾が試みられている。ナノマテリアルの毒性に関しては、いくつかの報告があるが、その結論はナノマテリアルの形態に依存することが多い。ナノマテリアルの可溶化には界面活性剤を用いる方法 (湿式粉碎