

法)、再結晶法、誘導体化法、配位溶解法などがある。これら可溶化法により、結晶のサイズ、形態、表面の性質などが大きく変化することが多い。米国ライス大学の Colvin らのグループは、テトラヒドロフラン (THF) を用いて再結晶化法によって可溶化した C60 を用いて、細胞毒性試験等を行い、極めて強い毒性が観察されたことを報告している。しかしながら、この方法では、直径約 50nm の C60 粒子の表面が極めて反応性に富む酸化化合物で覆われることが知られており、ここで生じる毒性は C60 本体というよりもその高酸化化合物であるとの見方が強い。以前、我々のグループでは、界面活性剤である Tween 80 により単壁フラーレン C60 を可溶化したサンプル、(nanom) を用いて試験を行ったが、特に顕著な細胞毒性、遺伝子傷害性を示さなかった。

今回、C60 の細胞膜透過性を高めるためリポソーム法を用いた。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。リポソームによってどれだけの C60 が細胞内に取り込まれたかは不明である。西村らの報告によればリポソームで調整された C60 をラットに投与すると腎臓および腸管リンパ節において、蓄積が見られたことから、ある程度の膜透過性は期待できると考えられる。以前我々は電気穿孔法により直接 nanom を細胞内導入し、その影響を調べた。導入 nanom 量に依存して、細胞毒性の増加、小核の誘発が観察されたが、突然変異には影響を与えなかった。これらのことを考えると、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。

E. 結論

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。染色体の構造異常は観察されなかったが、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、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。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。以上のことから、C60 は細胞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。

F. 研究発表

1. 論文発表

Burlinson, B., Tice, RR., Speit, G., Agurell, E., Brendler-Schwaab, SY., Collins, AR., Escobar, P., Honma, M., Kumaravel, TS., Nakajima, M., Sasaki, YF., Thybaud, V., Uno, Y., Vasquez, M., and Hartmann, A. Fourth International Workgroup on Genotoxicity testing: Results of the *in vivo* Comet assay workgroup *Mutat. Res.*, 627, 31-35 (2007)

Moore, MM., Honma, M., Clements, J., Bolcsfoldi, J., Burlinson, B., Cifone, M., Clark, J., Clay, P., Doppalapudi, R., Fellows, M., Gollapudi, B., Hou, S., Jenkinson, J., Muster, W., Pant, K., Kidd, DA., Lorge,

- E., Lloyd, M., Myhr, B., O'Donovan, M., Riach, C., Stankowski, Jr. LF., Thakur, AK., and Van Goethem, F. Mouse lymphoma thymidine kinase gene mutation assay: Meeting of the International Workshop on Genotoxicity Testing, San Francisco, 2005, recommendations for 24-h treatment. *Mutat. Res.*, 627, 36-40 (2007)
- Ku, WW., Bigger, A., Brambilla, G., Glatt, H., Gocke, E., Guzzie, PJ., Hakura, A., Honma, M., Martus, H-J., Obach, RS., and Roberts, R. Strategy for genotoxicity testing—Metabolic considerations *Mutat. Res.*, 627, 59-77 (2007)
- Wang, J., Chen, T., Honma, M., Chen, L., Moore, M. 3'-Azido-3'-deoxythymidine induces deletions in L5178Y mouse lymphoma cells. *Environ. Mol. Mutagen.*, 48, 248-257 (2007)
- Honma, M., Sakuraba, M., Koizumi, T., Takashima, Y., Sakamoto, H., and Hayashi, M. Non-homologous end-joining for repairing I-SceI-induced DNA double strand breaks in human cells. *DNA Repair*, 6, 781-188 (2007)
- Luan Y, Suzuki T, Palanisamy R, Takashima Y, Sakamoto H, Sakuraba M, Koizumi T, Saito M, Matsufuji H, Yamagata K, Yamaguchi T, Hayashi M, Honma M. Potassium bromate treatment predominantly causes large deletions, but not GC>TA transversion in human cells. *Mutat. Res.*, 619, 113-123 (2007)
- Newwirth, E., Honma, M., and Grosovsky, A., Interchromosomal crossover in human cell is associated with long gene conversion tracts. *Mol. Cell Biol.*, 27, 5261-5274 (2007)
- Yatagai, F, Umabayashi, Y., Suzuki, M., Abe, T., Suzuki, H., Shimazu, T., Ishioka, N., Iwaki, M, and Honma, M. Influence of low-dose and low-dose-rate ionizing radiation on mutation induction in human cells. *Advan. Space Res.*, 40, 470-473 (2007)
- Yatagai, F, Umabayashi, Y., Honma, M., Sugasawa, K., Takayama, Y., and Hanaoka, F. Mutagenic radioadaptation in a human lymphoblastoid cell line. *Mutat. Res.*, 638, 48-55 (2008)
2. 学会発表
- 本間正充: 代謝物の遺伝毒性評価 第34回日本トキシコロジー学会学術年会(2007.6)
- Honma M.: DNA double strand breaks inducing genomic instability in human cells. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Yatagai F, Suzuki M., Ishioka N., Ohmori H., and Honma M.: Repair of dsb at a specific site of chromosome: influence of low-dose/low-dose-rate gamma-rays. 13th International Congress of Radiation Research (2007.7)
- Honma M.: Genotoxic assessment of drug metabolite and ICH guideline. Chinese National Conference on Drug Toxicology 2007 (2007.8)
- Honma M.: A multi-endpoints in vitro genotoxicity test system consisting of Comet, micronuclei, and gene mutation assays. 6th World Congress on Alternatives & Animal Use in the Life Sciences (2007.8)
- Honma M., Takashima Y., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Sugimoto K., and Hayashi M.: Tracing Micronuclei by Fluorescent Live Cell Imaging Analysis. 37th European Environmental Mutagen Society (2007.9)
- Honma M.: Genomic instability caused through

breakage-fusion-bridge (BFB) cycle in human cells. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Suzuki T., Luan Y., Praba D., Kogi M., Honma M., Koizumi T., Tanabe S., Sato Y., Suzuki K., and Yamaguchi T.: CGH and SNP arrays: as new tools for detailed analysis of chromosome. The 8th International Symposium on Chromosomal Aberrations (2007.10)

Honma M.: The new ICH guideline on Genotoxicity. 2007 Korean National Institute of Toxicological Research International Symposium (2007.10)

Honma M.: Validation of a humanized in vitro genotoxicity test system. 2007 Korean NTP Workshop (2007.10)

安井学、小山直己、高島良生、小泉朋子、櫻庭真弓、坂本浩子、杉本憲治、林 真、本間正充: ライブセルイメージングを用いた γ 線照射による小核形成と追跡 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

本間正充、櫻庭真弓、林 真: DNA マイクロアレイによる放射線損傷領域のゲノムマッピング 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

谷田貝文夫、鈴木雅雄、本間正充: 低線量・低線量率 γ 線照射によるヒトリンパ芽球細胞での変異誘発 日本放射線影響学会第 47 回大会 (2007.11)

Koyama N., Yasui M., Sakamoto H., Sakuraba M., Masuda S., Kinai N., Matsuda T., Hayashi M., and Honma M.: Genotoxicity of acrylamide expressed via metabolic activation in CYP over-expressing human cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., and Honma M.: Translesion synthesis past 2'-deoxyinosine, a major nitric oxide-induced DNA adduct, by human DNA polymerase η and κ . 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Yatagai F., Matsumoto H., Honma M.: A possible involvement of bystander effects in the repression of spontaneous mutation induction. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Saito M., Matsufuji H., Chino M., Hyashi M., Honma M., and Yamagata K.: Antioxidant activity and potential genotoxicity of flavonoid by using human lymphoblastoid TK6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Arai S., Saito M., Takashima Y., Honma M., and Kojima H.: A new trial for in vitro Comet assay using 3-dimensional human epidermal model. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Kimura A., Sakamoto H., Hayashi M., Saigo K., Tokado H., and Honma M.: Establishment of a robust in vitro Comet protocol using human lymphoblastoid TL6 cells. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Honma M.: Visualization of micronuclei by fluorescent cell imaging analysis. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Suzuki T., Koizumi T., Prabha D., Luan Y., Honma M., Hamada S., Nakajima M., Watanabe T., and Furihata C.: Collaborative study on the toxicogenomics in JEMS/MMS II: High-throughput qPCR analysis by TaqMan low density array. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society (2007.11)

Honma M.: Background issues initiating a revision of the current ICH genotoxicity guidance. 1st Asian Conference on Environmental Mutagens & 36th Annual Meeting of the Japanese Environmental Mutagen Society) (2007.11)

村田香織、森山英樹、高島良生、本間正充、岡茂範、杉本憲治：マルチカラーライブセルイメージングにより明らかとなった Aurora-B キナーゼ阻害剤 VX-680 の染色体分配ダイナミズムに及ぼす影響 第30回日本分子生物学会年会(2007.12)

Honma M., Yasui M., Koyama N., Koizumi T., Sakuraba M., Sakamoto H., Takashima Y., Sugimoto K., and Hayashi M.: Genotoxic Responses by Live Cell Imaging Analysis International Conference on Toxic Exposure Related Biomarker, Genome and Health Effects (2008.1)

Honma M., Takashima Y., Sakuraba M., Koizumi T., Sakamoto H., and Hayashi M. Inter-allelic homologous recombination and target integration induced by DNA double strand break Key Stone Symposium” DNA Repair and Recombination” (2008.2)

G. 知的所有権の取得状況

なし

Table 1 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with fullerene for 6 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ¹⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend -gap
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		
Negative ¹⁾	0	-	6-(18)	100	NA	100	0	3	0	0	0	0	3	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	NA
						100	0	2	0	0	0	2	0	2 (2.0)	2 (2.0)	0 (0.0)		
						200	0	5	0	0	0	5	0	4 (2.0)	4 (2.0)	0 (0.0)		
Fullerene	0.16	-	6-(18)	93	NA	not observed												
Fullerene	0.31	-	6-(18)	84	NA	not observed												
Fullerene	0.63	-	6-(18)	85	NA	not observed												
Fullerene	1.3	-	6-(18)	79	NA	100	1	1	1	0	0	0	3	0	3 (3.0)	2 (2.0)	0 (0.0)	NA
						100	1	0	0	1	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	2 (0.5)	
						200	2	1	1	1	0	0	5	0	5 (2.5)	3 (1.5)	2 (0.3)	
Fullerene	2.5	-	6-(18)	69	NA	100	1	2	1	0	0	0	4	1	4 (4.0)	3 (3.0)	7 (1.8)	NA
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)	
						200	1	2	1	0	0	0	4	1	4 (2.0)	3 (1.5)	12 *(1.5)	
Fullerene	5.0	-	6-(18)	67	4.4, 2.0	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)	NA
						100	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.8)	
						200	0	0	0	0	0	0	0	1	0 (0.0)	0 (0.0)	8 *(1.0)	
MMC	0.18g/mL	-	6-(18)	NA	NA	100	1	38	75	0	0	0	114	1	59 (59.0)	58 (58.0)	0 (0.0)	NA
						100	1	34	70	5	0	0	110	1	57 (57.0)	57 (57.0)	0 (0.0)	
						200	2	72	145	5	0	0	224	2	116 (58.0)	115 *(57.5)	0 (0.0)	

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap, ctb, chromatid break, cte, chromatid exchange, csb, chromosome break, cse, chromosome exchange (dicentric and ring), mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin NA, not analyzed

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 2 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells treated with fullerene for 6 hours with S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	S9 mix	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ¹⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend -gap
							gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		
Negative ¹⁾	0	+	6-(18)	100	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	0 (0.0)	NA
						100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)	
						200	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (0.5)	1 (0.5)	0 (0.0)	
Fullerene	0.16	+	6-(18)	98	NA	not observed												
Fullerene	0.31	+	6-(18)	97	NA	not observed												
Fullerene	0.63	+	6-(18)	94	NA	not observed												
Fullerene	1.3	+	6-(18)	87	NA	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	1 (0.3)	NA
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (1.3)	
						200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	6 (0.8)	
Fullerene	2.5	+	6-(18)	83	NA	100	0	0	1	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	5 (1.7)	NA
						100	0	1	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	1 (1.0)	13 (3.3)	
						200	0	1	1	0	0	0	2	0	2 (1.0)	2 (1.0)	18 *(2.6)	
Fullerene	5.0	+	6-(18)	73	5.8, 5.2	100	0	0	4	0	0	0	4	0	3 (3.0)	3 (3.0)	4 (1.0)	NA
						100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	11 (2.8)	
						200	0	0	4	0	0	0	4	0	3 (1.5)	3 (1.5)	15 *(1.9)	
CP	8-8g/mL	+	6-(18)	NA	NA	100	1	7	17	1	0	0	26	2	23 (23.0)	22 (22.0)	0 (0.0)	NA
						100	0	15	27	0	0	0	42	1	29 (29.0)	29 (29.0)	0 (0.0)	
						200	1	22	44	1	0	0	68	3	52 (26.0)	51 *(25.5)	0 (0.0)	

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap, ctb, chromatid break, cte, chromatid exchange, csb, chromosome break, cse, chromosome exchange (dicentric and ring), mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; CP, cyclophosphamide; NA, not analyzed

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side)

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table 3 Chromosome analysis of Chinese hamster lung (CHL/IU) cells continuously treated with fullerene for 24 hours without S9 mix

Group	Concentration (mg/mL)	Time of exposure (hrs)	Concurrent ²⁾ cell growth (%)	Mitotic ³⁾ index (%)	Number of cells analyzed	Number of structural aberrations							Others ⁵⁾	Number of cells with aberrations		Number ⁶⁾ of polyploid cells (%)	Trend test ⁷⁾			
						gap	ctb	cte	csb	cse	mul ⁴⁾	total		+gap (%)	-gap (%)		-gap	POL		
Negative ¹⁾	0	24	100	NA	100	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)			
					100	1	0	0	0	0	0	1	0	1 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
					200	2	0	0	0	0	0	2	0	2 (1.0)	0 (0.0)	0 (0.0)				
Fullerene	0.16	24	89	NA	not observed															
Fullerene	0.31	24	79	NA	100	0	1	0	0	0	0	0	1	1	1 (1.0)	1 (1.0)	0 (0.0)			
					100	1	0	1	0	0	0	2	0	2 (2.0)	1 (1.0)	0 (0.0)				
					200	1	1	1	0	0	0	3	1	3 (1.5)	2 (1.0)	0 (0.0)				
Fullerene	0.63	24	71	NA	100	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (3.0)	3 (3.0)	0 (0.0)				
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)				
					200	0	3	0	0	0	0	3	0	3 (1.5)	3 (1.5)	2 (0.3)				
Fullerene	1.3	24	55	4.3, 3.2	100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	2 (0.5)	NA	NA		
					100	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	3 (0.9)				
					200	0	0	0	0	0	0	0	0	0 (0.0)	0 (0.0)	5 (0.7)				
Fullerene	2.5	24	41	1.6, 0.6	the small number of analyzable metaphase cells															
Fullerene	5.0	24	38	1.2, 0.4	not observed because of severe cytotoxicity															
MMC	0.05 μg/mL	24	NA	NA	100	4	35	61	1	0	10	111	1	60 (60.0)	59 (59.0)	1 (0.3)				
					100	0	42	57	2	0	0	101	0	54 (54.0)	54 (54.0)	0 (0.0)				
					200	4	77	118	3	0	10	212	1	114 (57.0)	113* (56.5)	1 (0.1)				

Abbreviations: gap, chromatid gap and chromosome gap; ctb, chromatid break; cte, chromatid exchange; csb, chromosome break; cse, chromosome exchange (dicentric and ring); mul, multiple aberrations; +gap, total number of cells with aberrations including gaps; -gap, total number of cells with aberrations excluding gaps; POL, polyploid; MMC, mitomycin C; NA, not analyzed

1) Carboxymethyl cellulose sodium solution (0.5 w/v%) was used as a vehicle and added at the level of 10 vol% per dish. 2) Cell number, representing cytotoxicity, was measured with a Coulter Counter. 3) Metaphase frequency was calculated by counting 500 cells in each dish. 4) When the number of aberrations in a cell was more than 9, the cell was scored as having 10 aberrations. 5) Others, such as attenuation and premature chromosome condensation, were excluded from the number of structural aberrations. 6) Eight hundred cells were analyzed in each group. 7) Cochran-Armitage's trend test was done at p<0.01 (one-side).

*, Significantly different from the negative control at p<0.01 (one-side) by Fisher's exact probability test.

Table4
リボソームC60 ①

処理 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント 細胞数	細胞毒性
0	6	2	8	1000	100
1.875	12	3	15	1000	53
3.75	10	3	13	1000	62
7.5	9	2	11	1000	73
15	10	3	13	1000	62
30	12	0	12	1000	67

リボソームのみ①

処理 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント 細胞数	細胞毒性
0	6	2	8	1000	100
3.75	12	3	15	1000	53
7.5	9	2	11	1000	73
15	8	2	10	1000	80
30	5	0	5	1000	160

Table 5
リボソームC60 ②

処理 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント 細胞数	細胞毒性
0	6	2	8	1000	100
1.875	8	3	11	1000	73
3.75	15	1	16	1000	50
7.5	15	0	15	1000	53
15	17	1	18	1000	44
30	11	2	13	1000	62

リボソームCのみ ②

処理 ($\mu\text{g}/\text{ml}$)	~1/3	Multi-MN	total MN	カウント 細胞数	細胞毒性
0	6	2	8	1000	100
3.75	8	3	11	1000	73
7.5	14	1	15	1000	53
15	11	0	11	1000	73
30	13	2	15	1000	53

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: ナノマテリアルの神経細胞機能影響における基礎的研究

分担研究者: 中澤 憲一 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部長

研究協力者: 佐藤 薫 国立医薬品食品衛生研究所・薬理部・第一室長

研究要旨

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経細胞等の機能蛋白質に対する潜在的影響について評価する方法を検討した。リポソームにより可溶化した C60 を用いて、アフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた ATP 受容体 (P2X2 受容体) ならびに培養アストロサイトに発現しているグルタミン酸トランスポーター (GLAST) の機能に対する影響の評価を試みた結果、これらの実験系が評価系として使用しうることが示された。しかし一方、リポソームを用いてナノマテリアルを可溶化する場合にはリポソーム単独作用を除外できる条件を設定する必要があることも示された。

A. 研究目的

本研究はナノマテリアルの健康影響評価の一環として、神経細胞等の機能蛋白質に対する潜在的影響を評価する系について検討を加えることを目的とする。ナノマテリアルは分子量が大きく、通常の方法では水溶化することが困難であるため、本年度はリポソームにより可溶化した C60 を用いて神経系機能蛋白質への潜在的な影響評価に適した実験系について検討した。検討に用いた神経系機能蛋白質はアフリカツメガエル卵母細胞発現系に強制発現させた ATP 受容体 (P2X2 受容体) と培養アストロサイトに発現しているグルタミン酸トランスポーター (GLAST) である。

B. 研究方法

リポソームによる C60 可溶化

リポソームにより可溶化された C60 は、本事業西村班および最上班により調整、供与された。西村班のサンプルストックは C60 濃度: 2.5 mg/ml、脂質

(PS:PC=1:1) 濃度: 1 mg/mL (サンプル A)、最上班のサンプルストックは C60 濃度: 約 40 µg/ml、脂質 (PS:PC=1:1) 濃度: 7.8 mg/ml (サンプル B) であった。

P2X2 受容体機能に対する影響評価系の検討

ATP 受容体チャネル (P2X2 受容体) の cDNA を pcBluescript II SK(-) にサブクローニングしたプラスミドを大腸菌を用いて増幅した。増幅したプラスミドを抽出し、これを NotI で直鎖化した。直鎖化した DNA を鋳型として、RNA (cRNA) をインビトロ合成した。コラゲナーゼ処理により濾胞細胞を除去したアフリカツメガエル卵母細胞に、実体顕微鏡下、cRNA を注入し、18°C で 3 - 6 日インキュベートすることにより、受容体を発現させた。この卵母細胞に双ガラス電極膜電位固定法を適用し膜電流測定を行なった。リポソームにより可溶化した C60 に加え、以下の方法により試薬の調製を行った。C60 の γ -シクロデキストリンによる可溶化は昨年度の方法に従った。C60 と γ -シクロデキストリンをモル比で 1:2 となるよう量り取り、これを乳鉢

ですりつぶした。水溶液を加え、1,500rpm で 10 分間遠心し、上清を採取した。この上清を孔径 0.8 μm のフィルターで濾過し、ろ液をさらに 0.22 μm のフィルターで濾過した。このろ液を吸光度測定したところ、C60 とされる 259 nm の吸光が認められた。これが C60 のモノマー(の錯体)であると仮定するとその濃度は約 10 μM であった。C60 の誘導体は DMSO に溶解した後、細胞外液で希釈した。DMSO の最終濃度は 1% 以下である。

GLAST に対する影響評価系の検討

生後 3 日令ラット脳大脳皮質を 0.25% トリプシン及び 0.01% DNase 処理し、得られた細胞を 10% FBS 含有改変 DMEM 培地でコンフルエントになるまで 10-15 日間培養した。フラスコを振とうし、培養細胞からアストロサイト以外の細胞を除去し、再度コンフルエントになるまで 7 日間培養した。0.1% トリプシン 1 mM EDTA を用いてアストロサイトを 96 穴プレートに再播種しさらに 7 日間培養した。25 (4.88), 250 (48.8), 2500 (488) ng/ml の C60 (括弧内はリポソーム濃度)をサンプル A より、25 (10), 250 (100), 2500 (1000) ng/ml の C60 をサンプル B より調整し培養アストロサイトを 24 時間処理し、リポソーム単独および C60 の GLAST に対する影響を検討した。L-glu 取り込み量は、培地に 100 μM の L-glu を添加し、1 時間後の培地中グルタミン酸残存量により算出した。このとき、MTT/LDH 同時測定法により被験物質の細胞毒性についても検討した。

(倫理面への配慮)

動物実験においては国立医薬品食品衛生研究所「動物実験の適正な実施に関する規程」に従い、動物愛護の精神に則って実験を進めた。ウイルスおよび遺伝子組み換え動物の取り扱い「遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律」(所謂カルタヘナ法)および国立医薬品食品衛生研究所「遺伝子組換え実験安全管理規則」に準拠して取り扱った。

C. 研究結果

P2X 受容体機能に対する影響評価系の検討

アフリカツメガエル卵母細胞に発現させた ATP 受容

体チャンネルを介するイオン電流を 30 μM ATP で誘発した場合、 γ -シクロデキストリンを用いて可溶化した C60 は、約 20% 抑制した。100 μM ATP で誘発した電流に対してはこのような抑制は認められず、C60 の抑制作用は ATP 濃度に依存すると考えられた。C60 の 3 種の誘導体は、ATP 30 μM により誘発する電流を 0.3 - 10 μM の範囲で濃度依存的に抑制し、3 および 10 μM では電流はほぼ消失した。これらの誘導体 1 または 2 μM による電流抑制は、 γ -シクロデキストリンで可溶化した C60 の場合と同様に、ATP 濃度を 30 μM から 100 μM に増加させることにより減弱した。以上の C60 およびその誘導体による抑制の度合は -50 mV と -80 mV とで差がなかった。リポソームで可溶化した C60 では、試みた 25, 250, 2500 ng/ml (約 0.04, 0.4, 4 μM) のうち 250 ng/ml の溶液で ATP 誘発電流に対して約 30% の抑制作用が認められたが、この作用は C60 の溶解に用いた濃度のリポソーム単独の場合と変わらなかった。

L-glu トランスポーターに対する影響評価系の検討

サンプル A リポソーム、サンプル B リポソームは単独で培養アストロサイトの MTT reduction を減少させる傾向、LDH leakage を増加させる傾向を示したが有意な差には至らなかった。これらのリポソームによって可溶化された C60 は MTT reduction, LDH leakage にさらなる影響を与えなかった。また、サンプル A リポソームは単独で L-glu 取り込みを阻害する傾向が見受けられたが有意な差ではなかった。このリポソームで可溶化された C60 は L-glu 取り込みに対してさらなる影響を与えなかった。サンプル B リポソーム、このリポソームで可溶化された C60 は L-glu 取り込みに何ら影響を与えなかった。

D. 考察

アフリカツメガエル卵母細胞および培養アストロサイトは、リポソームで可溶化された C60 で 24 時間処理した。これは、リポソームがスカベンジャー受容体を介したエンドサイトーシスによってとりこまれるメカニズムを考慮したためである。しかし、アフリカツメガエル卵母細胞の P2X2 イオン電流はリポソーム単独処理により減少した。よって、リポソームによって可溶化し

た C60 でアフリカツメガエル卵母細胞を処理する場合は処理時間を 24 時間より短く設定する必要があると考えられる。サンプル A リポソーム、サンプル B リポソームが単独で培養アストロサイトの MTT reduction を減少させる傾向、LDH leakage を増加させる傾向を示した。また、サンプル A リポソームは L-glu 取り込みを阻害する傾向を示した。これらの結果は、使用したリポソームに微弱な細胞毒性がある可能性を示している。よって、培養アストロサイトを評価系に用いる場合も処理時間は 24 時間より短く設定するのが望ましいと考えられる。

P2X2 イオン電流に対して C60 はさらなる影響を与えなかった。これは、C60 に P2X2 イオン電流に対する影響がないか、あってもリポソームの単独作用でマスクされる程度の微弱な作用であることが示唆される。GLAST を介した L-glu 取り込みに対して C60 がさらなる影響を与えなかったことから、C60 は GLAST に対する影響がないか、あってもリポソームの単独作用でマスクされる程度の微弱な作用であることが示唆される。

γ -シクロデキストリンで可溶化した C60 は ATP 受容体チャネルを阻害し、その阻害作用は ATP 濃度を上昇させることにより減弱した。このことは、C60 の作用に ATP の結合が関わることを示唆している。このことの最も単純な解釈は C60 の ATP に対する競合阻害作用であり、電流抑制に電位依存性が認められなかったこともこの予想と矛盾しない。しかし、分子構造を考えた場合、強い陰イオンでかつ極性分子である ATP と二重結合を多く含むものの電荷あるいは分子としての極性を有しない C60 が受容体タンパク質上で同一の結合部位を争うとは考えにくい。このような“見かけ上の競合”は 3 価の陽イオンであるランタンでも認められる。人為的変異導入によるチャネル機能変化の研究より、ATP 分子の陰イオン部分はチャネル開口部に結合すると考えられている。よって、ATP の結合とチャネル開口とは物理的にリンクしている可能性が高く、このことが C60 あるいはランタンによる抑制の ATP 依存性の一因であるかも知れない。ランタンのような陽イオンは、カチオン透過型である ATP 受

容体チャネルのチャネル孔の負の極性部位のいずれかとの相互作用により抑制作用を示すと予想される。一方、C60 は電氣的に中性であるが、直径が約 7 オングストロームの球形であり、チャネル孔の直径より多少小さいため、均等に分布する二重結合の電子がチャネル孔の壁に対して均等に相互作用し抑制する様式が考えられる。

C60 に官能基を施し、水溶性(極性)を高めた誘導体では C60 より強い抑制作用が認められた。このことは C60 およびその誘導体が水相より受容体タンパク質に接近して作用することを示唆している。この推察はリポソームで包含した C60 が作用を示さなかったことから支持される。C60 類縁物質に限らず、ナノマテリアル分子、特に極性を有する分子では、同様の抑制作用を示し、神経、あるいは筋などの興奮性細胞、あるいは、イオン・チャネルを有する非興奮性細胞に影響を与える可能性が考えられる。

E. 結論

アフリカツメガエル卵母細胞発現系および培養アストロサイトを用いてナノマテリアルの神経細胞機能蛋白質に対する影響が評価可能であることが示された。これらの実験系を用いて、C60 が P2X2 受容体、GLAST の機能にほとんど影響を及ぼさないことが示された。しかし、リポソームを用いてナノマテリアルを可溶化する場合にはリポソーム単独作用を除外できる条件を設定する必要があることが示された。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 研究発表

1. 論文発表

Sato K, Akaishi T, Matsuki N, Ohno Y, Nakazawa K, β -Estradiol induces synaptogenesis in the hippocampus by enhancing brain-derived neurotrophic factor release from dentate gyrus granule cells. *Brain Res.*, 1150 108-120 (2007)

Sato K, Saito Y, Oka J, Ohwada T, Nakazawa K, Effects of tamoxifen on L-glu transporters of astrocytes. (Submitted)

Usami, M., Mitsunaga, K. and Nakazawa, K. Two-dimensional electrophoresis of protein from cultured postimplantation rat embryos for developmental toxicity studies. *Toxicol. In Vitro* 21, 521-526 (2007)

Nakajima, M., Takahashi, H., Nakazawa, K., and Usami, M. Fetal cartilage malformation by intravenous administration of indium trichloride to pregnant rats. *Reproduct. Toxicol.* 24, 409-413 (2007)

Usami, M., Mitsunaga, K., and Nakazawa, K. Comparative proteome analysis of the embryo proper and yolk sac membrane of day 11.5 cultured embryos. *Birth Defects Res. B* 80, 383-395 (2007)

2. 学会発表

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, hGFAP プロモーター下流に DsRed をもつレンチウイルスを用いたアストロサイト特異的標識法の確立 第 30 回日本神経科学大会 (2007, 9)

Sato K, Ventura RE, Goldman JE, Nakazawa K, Astrocyte-specific labeling with a recombinant lentiviral vector carrying DsRed protein driven by a human glial fibrillary acidic protein promoter. 2007 Annual Meeting of Society for Neuroscience (2007, 10)

佐藤 薫, Cui Yong-Mei, Sha Yu, 大和田智彦, 中澤憲一, タモキシフェンと類縁化合物のアストロサイトグルタミン酸トランスポーターに対する作用 第 81 回日本薬理学会年会 (2008, 3)

Sato K, Matsuki N, Nakazawa K, Estrogens inhibit L-glutamate uptake by astrocytes by membrane estrogen receptor alpha. US-Japan joint meeting for glia research (2008, 3)

3. 知的財産権の出願・登録状況

1. 特許取得
なし
2. 実用新案登録
なし
3. その他
なし

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：ナノマテリアルの血漿リポタンパク質や細胞との相互作用に関する基礎的研究

分担研究者：	最上 知子	国立医薬品食品衛生研究所	機能生化学部	室長
協力研究者：	重本・最上由香里	国立医薬品食品衛生研究所	機能生化学部	
	： 奥平 桂一郎	国立医薬品食品衛生研究所	機能生化学部	
	： 久保田 領志	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	
	： 西村 哲治	国立医薬品食品衛生研究所	環境衛生化学部	

研究要旨

フラーレンを含む平均粒子径 280 nm の PS/PC リポソームを調製した。フラーレンは PS/PC リポソームに分散、凝集塊を含む懸濁液のどちらの状態でも、腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜の安定性や蛍光デキストランのトランスサイトーシスには影響を与えなかったが、フラーレンの細胞単層膜の透過は検出されなかった。

マクロファージ RAW264 細胞からのサイトカイン放出に及ぼす影響を検討したところ、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、INF- γ 分泌は PS/PC リポソーム封入、懸濁液どちらのフラーレンによっても惹起されなかった。炎症性サイトカイン TNF α や GM-CSF の分泌は高濃度の PS/PC リポソーム自体により促進されたが、フラーレンがリポソームに含まれると、GM-CSF 産生はむしろ抑制された。

A. 研究目的

ナノテクノロジーの根幹をなす産業用ナノマテリアルについては、粒径に基づく物理化学的特性を考慮した毒性試験法や有害性評価手法の開発が急務となっている。ナノマテリアルの多くは難溶性で凝集しやすい性質を持ち、生体影響は投与経路・形態や分散方法により大きく異なることが予想される。また、体内に取り込まれた後には、血漿タンパクなどとの相互作用が、体内動態や生理機能に大きく影響していると考えられる。本研究では、ナノマテリアルの分散方法や血漿リポタンパクとの相互作用が細胞機能や体内動態に及ぼす影響を探ることを目的とする。

昨年度の研究では、腸管からの酸化チタン粒子

の吸収について、*in vitro* での評価系である Caco-2 細胞単層膜を用いて検討を行った。ナノ粒子はリンパ組織であるパイエル板を通して吸収されるが、腸管細胞からの吸収も知られている。Caco-2 細胞はヒト結腸癌由来細胞株であり、自発的に分化して小腸上皮細胞様の形態機能を示し、薬物等の吸収評価に広く使用される。平均一時粒径 20nm および 250nm の酸化チタン粒子の懸濁液を用い、粒子が Caco-2 細胞単層膜の安定性や細胞のトランスサイトーシス活性には影響を与えずに、*apical* 側から *basolateral* 側に透過することを見いだした。本年度は、フラーレンの分散方法が吸収透過に及ぼす影響を検討した。また、マクロファージ様細胞からのサイトカイン放出

について、フラーレン懸濁液の及ぼす影響を検討した。

B. 研究方法

1. 実験材料および試薬

フラーレン (C60) はフロンティアカーボン社 (nanom purple SUH, >99.9%)、phosphatidylcholine は Avanti 社 (Egg 由来、#840051P)、phosphatidylserine は Sigma 社 (#P5660)、MTT (3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyltetrazolium Bromide) 試薬は Chemicon 社のものを用いた。サイトカイン測定には Bio-Rad 社の Bio-Plex マウスサイトカイン 8-Plex アッセイキットおよび Bio-Plex サイトカインリージェントキットを用いた。

2. フラーレンの分散方法および C60 含有 PS/PC リポソームの調製

懸濁フラーレンは PBS を溶媒に用い、10 分間 Vortex で混合後さらに 10 分間超音波処理し、調製した。リポソームは以下のように調製した。Phosphatidylcholine(PC, in chloroform)、Phosphatidylserine(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。

3. フラーレンの細胞毒性評価

ヒト結腸癌由来 Caco-2 細胞およびマウスマク

ロファージ系細胞株 RAW264 細胞は 5×10^5 cells/ml を 96 ウェルマイクロプレートに 0.1 ml ずつ播種し、37 °C 1 日培養した後、懸濁フラーレン、PS/PC リポソーム封入フラーレンおよびコントロール PS/PC リポソームを分散した培地 (DMEM 10 %FBS) 0.1 ml を添加し 24、48 時間培養した。その後上清を取り除き PBS (-) で 2 回洗浄した後 MTT 反応試薬および DMEM 0.1 ml を加え、4 時間反応した。反応停止液を加え混和後 550 nm の吸光度を測定した。

4. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) の形成

Caco-2 細胞による腸管膜透過モデルは Becton Dickson and Company の BioCoat HTS Caco-2 Assay System を用いて、プロトコールどおりに作成した。Caco-2 細胞は Basal Seeding Medium 中で 4×10^5 cells/ml に調整し、上部インサートに播種する。下部ウェルに 35 ml の Basal Seeding Medium を加えて 20–24 時間培養する。その後培地を分化誘導メディウム (Enterostim Medium) に切り替えさらに 44–48 時間培養する。培養後の細胞を上部インサートごと Falcon の 24 ウェルプレートに移し、アッセイに用いた。単層膜形成は、apical 側の DMEM に含まれるフェノールレッドが basolateral 側に漏出しないことを確認し判定した。Basolateral 側にはフェノールレッド無しの DMEM (PR (-) DMEM) を添加し、フェノールレッドの漏出を 550nm の吸光度で測定した。

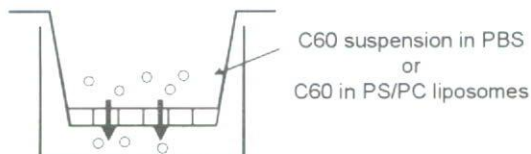
5. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) でのトランスサイトーシスに及ぼす懸濁およびリポソーム封入フラーレンの影響

Caco-2 細胞単層膜におけるトランスサイトーシスの測定は、Texas Red 蛍光標識デキストラン (MW 3000; 0.04 %溶液) の basolateral 側 (下部ウェル) への透過を測定した。Apical 側 (上部ウェル) には懸濁フラーレンおよびリポソーム封入フラーレンを分散した Texas Red 蛍光標識デキ

ストラン入りの DMEM を処理し、一定時間後に basolateral 側 (下部ウェル) の培養液を採取し、蛍光プレートリーダーで Ex: 560 nm Em, 590 nm の蛍光値を測定した。

6. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) における懸濁およびリポソーム封入フラージェンの透過実験

懸濁およびリポソーム封入フラージェンをフェノールレッド入りの DMEM (PR (+) DMEM) に 0.33~33 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に分散し、Caco-2 細胞単層膜の apical 側 (上部インサート) に 0.5ml 添加し、basolateral 側 (下部ウェル) 1.0ml への透過を検討した。37 $^{\circ}\text{C}$ で培養を開始し、一定時間ごとに basolateral 側 (下部ウェル) の培養液を採取した。採取した培養液をトルエン抽出し、培養液中のフラージェン濃度を定量した。フラージェンの定量は液体クロマトグラフィータンデム質量分析計 (LC-MS/MS) を用いた。



7. 懸濁フラージェン、PS/PC リポソーム封入フラージェンおよびコントロール PS/PC リポソームの顕微鏡観察

懸濁フラージェン、PS/PC リポソーム封入フラージェンおよびコントロール PS/PC リポソームはスライドガラスに封入しプレパレートを作成した。観察は共焦点顕微鏡 (LSM5 Pascal, Carl Zeiss) で行った。

8. マウスマクロファージ系細胞のサイトカイン

産生に及ぼす懸濁フラージェンおよび PS/PC リポソーム封入フラージェンの影響

マウスマクロファージ系細胞株 RAW264 細胞は 5×10^5 cells/ml を 96 ウェルマイクロプレートに 0.1 ml ずつ播種し、37 $^{\circ}\text{C}$ 1 日培養した後、懸濁フラージェン、PS/PC リポソーム封入フラージェンおよび、コントロール PS/PC リポソームを分散した培地 (DMEM 10% FBS) 0.1 ml を添加し 24 時間培養した。ポジティブコントロールとして、リポポリサッカロイド (LPS) 50 ng/ml を添加し 24 時間培養した。培養上清を回収し、Bio-Plex Suspension Array System を用いてサイトカイン濃度の測定を行った。

C. 研究結果

1. 懸濁およびリポソーム封入フラージェンの観察および粒度分布測定

懸濁およびリポソーム封入フラージェンを調製し、共焦点顕微鏡 (LSM5 Pascal, Carl Zeiss) で観察すると図 1A (1) に示すように、PBS 懸濁フラージェンの顕微鏡画像では 20 μm 程度の様々な大きさのフラージェン塊が観察され、フラージェンが分散されていない様子がわかる。PS/PC リポソームにフラージェンを分散すると、フラージェンの凝集塊は観測されなかった。粒度分布を測定すると、図 1B に示すように、PS/PC リポソームは平均粒子径が 160 nm、フラージェンを含有するリポソームは 280 nm であった。リポソームからフラージェンをトルエン抽出し測定したところ、フラージェンは 10 mM の PS/PC リポソーム中に 40 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で分散されていることが確認された。

2. Caco-2 細胞および RAW264 細胞におけるフラージェンの細胞毒性の検討

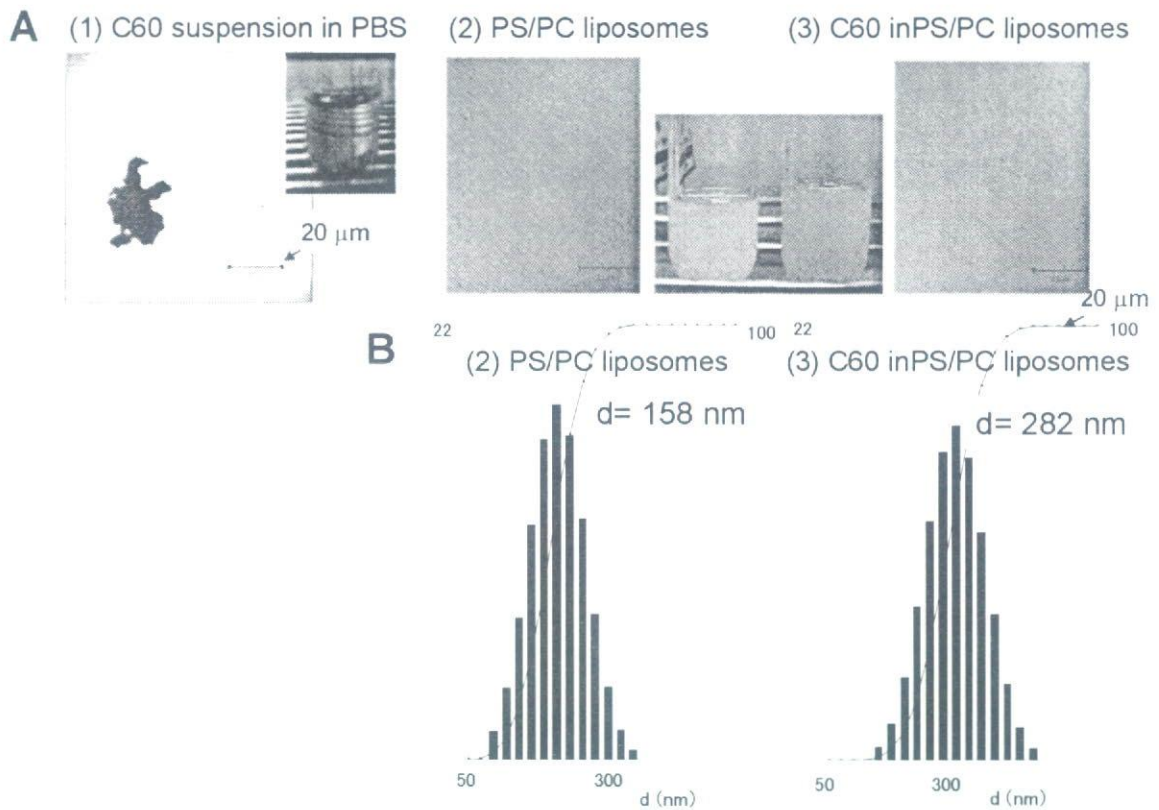


図1. フラーレン(C60)含有 PS/PC リポソームの調製

懸濁フラーレン、PS/PC リポソーム封入フラーレンが Caco-2 細胞および RAW264 細胞に毒性を及ぼすか否か検討を行った。MTT 試薬は細胞中の脱水素酵素により還元されると青色の不溶性ホルマザンを生成し、青色ホルマザン濃度は生細胞数の指標となることが知られる。図 2 に示すように Caco-2 細胞において懸濁フラーレンあるいは PS/PC リポソーム封入フラーレンを培地に添加すると、4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度まで生細胞数を減少させず、明確な毒性を示さなかった。一方 RAW264

細胞においては、4 $\mu\text{g/ml}$ の濃度において 48 時間後に PS/PC リポソーム封入フラーレンおよび対照の PS/PC リポソームのどちらにも弱い細胞毒性が認められた。高濃度、長時間処置ではリポソーム自体に細胞毒性があることが示された。

3. Caco-2 細胞単層膜 (in vitro 腸管膜透過モデル) におけるトランスサイトーシスに及ぼすフラーレンの影響

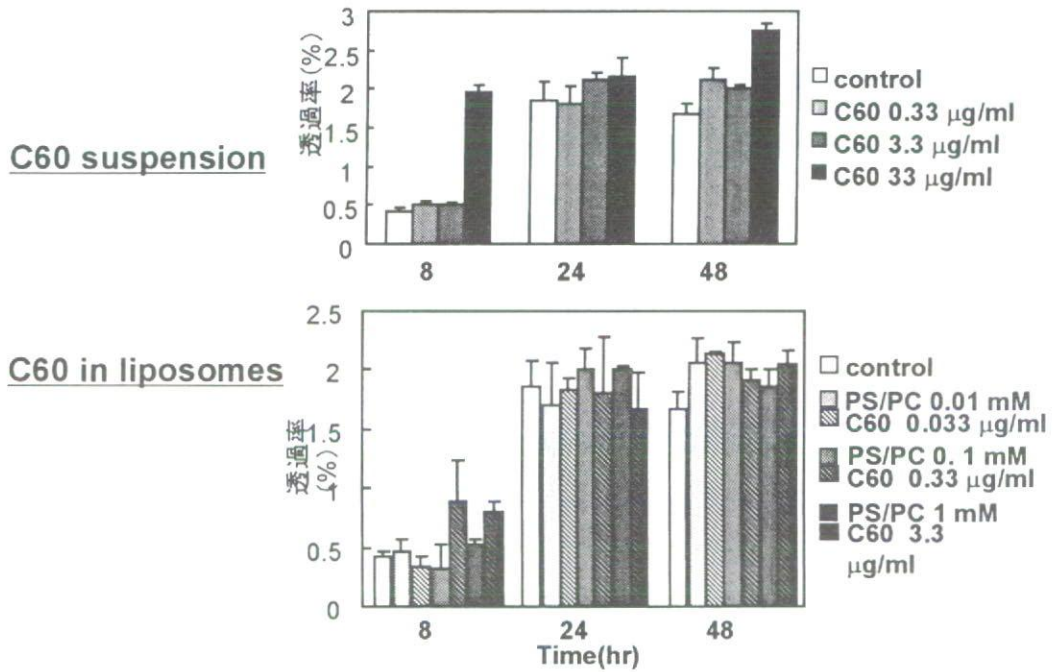


図3. Caco-2細胞のトランスサイトーシス機能へのフラレン(C60)の影響

In vitro 腸管膜透過モデルとなる Caco-2 細胞単層膜を構築し、単層膜機能へのフラレンの影響を検討した。懸濁フラレン、PS/PC リポソーム封入フラレンを 0.33~4 $\mu\text{g/ml}$ の範囲で 24、48 時間処置しても、basolateral 側へのフェノールレッド漏出は認められず、フラレンによる単層膜の破状は認められなかった。

フラレン粒子は細胞表面上を被覆し、腸上皮

細胞の機能を阻害する可能性が考えられる。そこで我々はトランスサイトーシスによる物質輸送に及ぼす懸濁フラレン、PS/PC リポソーム封入フラレンの影響を解析した。単層腸上皮細胞トランスサイトーシスの指標としてテキサスレッド蛍光デキストラン (分子量 3,000) の apical 側 (上部) から basolateral 側 (下部) への透過を測定した。図 3 に示すように、37 $^{\circ}\text{C}$ で培養す

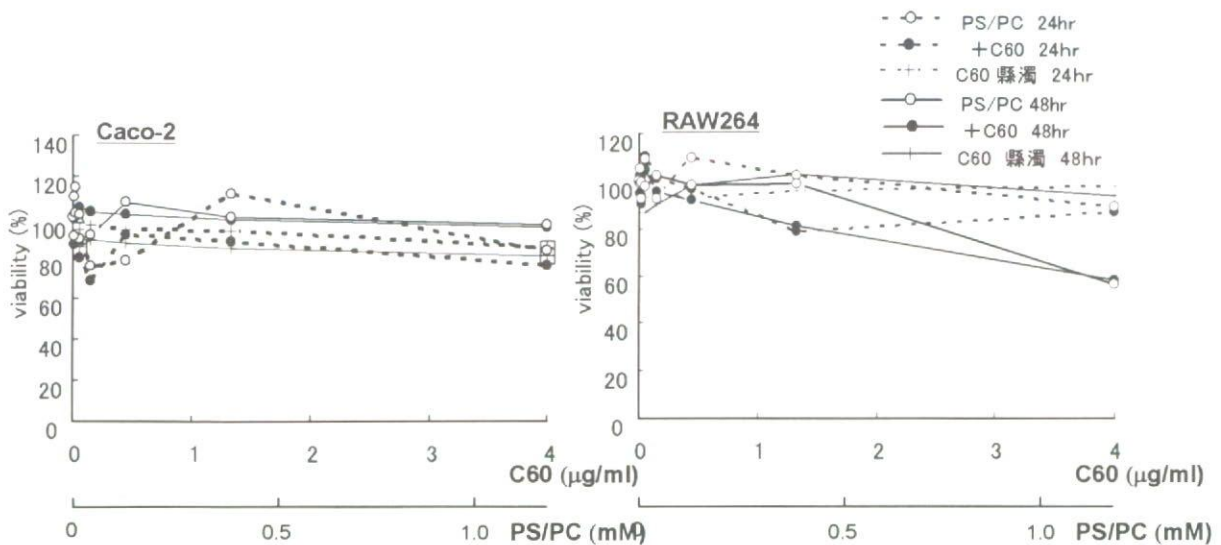


図2. 懸濁およびリポソーム封入フラレン(C60)の細胞生存率への影響

ると、白いカラムで示すコントロールでは蛍光デキストランの basolateral 側（下部）への経時的な透過が認められる。この条件下、懸濁フラレンならびに PS/PC リポソーム封入フラレンを 0.33~3.3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度で混在させ、蛍光デキストランの透過に及ぼす効果を検討した。懸濁フラレン、PS/PC リポソーム封入フラレン共に蛍光デキストランの透過を抑制しなかった。8 時間後にはやや促進する傾向を示したが、24 時間後の透過量はコントロールと同程度であった。以上の結果より、フラレンは Caco-2 細胞におけるトランスサイトーシス機能を妨害しないことが示された。

4. Caco-2 細胞単層膜におけるフラレン の細胞透過実験

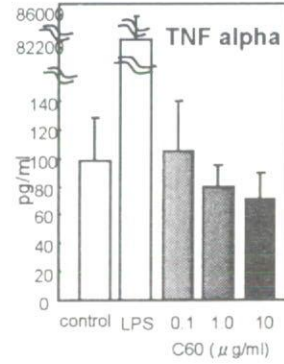
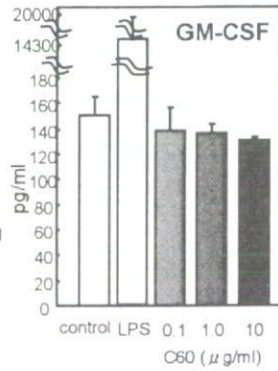
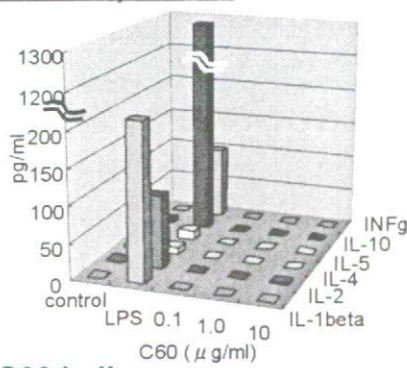
フラレン が Caco-2 細胞単層膜を透過するか否か検討を行った。Apical 側（上部インサート）に懸濁フラレンあるいは PS/PC リポソーム封入フラレンを 0.33~3.3 $\mu\text{g/ml}$ の濃度に分散した培地を添加し、basolateral 側（下部ウェル）への透過を検討した。LC-MS によるフラレンの定量下限値は 20 ng/ml であるが、懸濁フラレンあるいは PS/PC リポソーム封入フラレン

どちらを用いた場合も、basolateral 側（下部ウェル）の培地からフラレンは検出されなかった。

5. RAW264 細胞のサイトカイン産生に及ぼすフラレンの影響

フラレン がマウスマクロファージ系細胞においてサイトカイン分泌を引き起こすか否か検討を行った。RAW264 細胞を培養したプレートに懸濁フラレン、PS/PC リポソーム封入フラレンを分散した培地を添加した。37°C で 24 時間培養し、上清中のサイトカイン濃度を Bio Plex サイトカインアッセイシステムを用いて、測定した。図 4 に示すようにサイトカイン IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、INF- γ に関しては、懸濁フラレン、PS/PC リポソーム封入フラレンのどちらによっても LPS 刺激で認められるような産生は観察されなかった。GM-CSF 分泌は 333 μM の PS/PC リポソームで促進されたが、フラレンが 1 $\mu\text{g/ml}$ 封入されていると抑制された。TNF- α 分泌はフラレンの有無にかかわらず PS/PC リポソームにより促進されたが、LPS 刺激の 0.6% 程度のわずかな量であった。懸濁フラレンは全く効果を示さなかった。

C60 suspension



C60 in liposomes

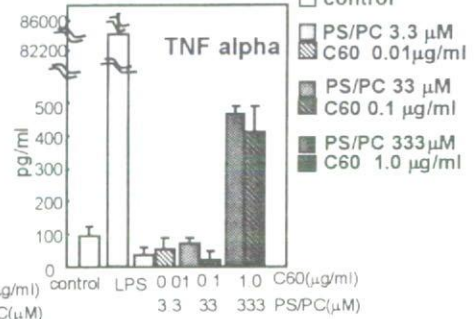
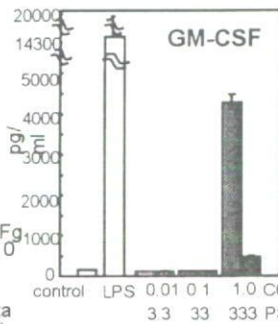
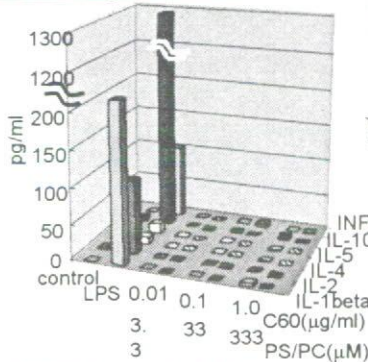


図4 懸濁およびリポソーム封入フラレン(C60)の炎症性サイトカイン分泌への影響

D. 考察

ナノ材料の生体影響は投与経路や分散方法により大きく異なると予想される。本年度の研究において、リポソームを用いてフラレンを分散する方法を検討するとともに、リポソーム分散フラレンおよび懸濁フラレンが腸管吸収モデルである Caco-2 細胞単層膜を透過できるか、マクロファージ様細胞 RAW264 でサイトカイン産生に影響を及ぼすかどうか検討を行った。

本研究では、有機溶媒に溶解したリン脂質とフラレンを混合し、溶媒を留去し水和する方法によりフラレン含有リポソームを調製した(図1)。生成するフラレン含有 PS/PC リポソームは平均粒子径 280 nm であり、対照として調製した PS/PC リポソーム 160 nm に比較しやや大きいものの、フラレン凝集塊は認められない。最近、フラレン含有リポソームを効率良く調製する方法として、 γ シクロデキストリン分散フラレンとリポソームリン脂質の交換反応を利用する手法が報告されている(Ikeda et al., Org. Biomol.

Chem. 3:2907-2909, 2005)。この方法によれば、リポソーム中のフラレン濃度を本研究の方法の 20 倍程度高めることが可能であるが、 γ シクロデキストリンはそのまま最終調整液に残留し、生体影響を及ぼす可能性がある。本研究の調整方法は、そのような影響を回避する利点がある。

PS は細胞膜リン脂質二重層の細胞質側に局在しており、アポトーシスにより細胞表面に露出する。PS などの陰性荷電を持つリポソームはスキャベンジャー受容体などを介して積極的に細胞に取り込まれることが知られており、この現象はマクロファージが酸化 LDL やアポトーシス細胞を貪食する機構のモデルと考えられている。したがって、PS/PC リポソームを用いた分散方法は、ナノ材料の体内動態を評価する上で、有用なモデルになると考えられる。

PS/PC リポソームに封入したフラレン、懸濁フラレンのどちらも Caco-2 細胞単層膜を透過しなかった。昨年度の研究において、平均粒子径 20 nm および 250 nm の酸化チタン粒子が単層膜の安定性に影響することなく透過することを見

いだしている。しかしその透過量は 0.1~0.2%であったことから、LC-MS によるフラーレンの定量では、このレベルの透過が検出されなかった可能性も考えられる。

フラーレンはまた、どちらの分散方法を採用した場合でも、Caco-2 細胞単層膜の安定性には影響せず、トランスサイトーシスと呼ばれるエンドサイトーシス・エキソサイトーシスによる積極的な物質輸送を抑制することもなかった。また、マクロファージ様 RAW264 細胞からのサイトカイン放出を惹起しなかった。

高濃度 (4 $\mu\text{g/ml}$) の PS/PC 封入フラーレンは RAW264 細胞に弱い細胞毒性を示したが、これは 1.33 mM の PS/PC リポソーム自体の毒性と推定される。また、PS/PC リポソームは 0.33 mM で GM-CSF および TNF α の産生を促進した。GM-CSF 産生はリポソームに C60 が封入されるとむしろ抑制された。TNF α は炎症性サイトカインであり、血球分化誘導因子である GM-CSF も単球マクロファージ系の TNF α 産生を亢進させる作用を示すことが知られている。脂肪酸分子種の異なる PS や PC を用いることにより、リポソーム自体の生理活性を抑える改良が可能かもしれない。

E. 結論

フラーレンを含む平均粒子径 280 nm の PS/PC リポソームを調製する方法を確立した。フラーレンは PS/PC リポソームに分散した場合にも、凝集塊を含む懸濁液の状態でも、腸管吸収評価モデルである Caco-2 細胞単層膜の安定性やトランスサイトーシス機能には影響を与えず、basolateral 側への透過も検出されなかった。また、マクロファージ RAW264 細胞からのサイトカイン放出にも影響しなかった。高濃度の PS/PC リポソーム自体が細胞毒性や炎症性サイトカイン産生を促進したが、リポソームに含まれるフラーレンは GM-CSF 産生をむしろ抑制した。

F. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

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：産業用ナノマテリアルの経気道投与および
粉体暴露手法に関する基礎研究

研究分担者： 涌生聖 ㈱三菱化学安全科学研究所 鹿島研究所 副主任研究員

研究要旨

産業用ナノマテリアルである多層カーボンナノチューブ（MWCNT）は、機能性が高く、生産量の増加が予想される物質である。ヒトへは、経皮および経気道による暴露が危惧されている。この物質の経気道暴露についての健康影響に関する調査報告は少なく、さらに MWCNT が有する易凝集性のため、単離した MWCNT の経気道暴露による健康影響評価報告は殆ど見当たらない。本研究では、単離した MWCNT を多く含むことが判明している媒体である人造肺サーファクタントに MWCNT を懸濁させ、乳鉢粉碎の有無により、異なる分散状態の懸濁液を調製し、それぞれをラットに気管内投与し、懸濁状態の違いが毒性に及ぼす影響について検討した。

A. 研究目的

産業用ナノマテリアルである MCNT はその高機能性から国内における生産量の増加が見込まれている。しかし、その健康影響については報告が少なく、標準化された投与液の評価、確認すべき生物学的指標はない。さらに入手可能な報告でも、気管内投与における投与液調製において MWCNT の有する易凝集性から、凝集した MWCNT を気管内投与しており、ナノサイズを有する MWCNT 自体の健康影響を評価した報告は少ない。このため、本研究では懸濁液中の MWCNT の凝集塊が多い状態および単離した MWCNT が比較的多い状態の MWCNT 懸濁液をそれぞれラットに投与し、発現する生体影響を比

較した。さらに評価すべき生物学的指標の選択のため、候補となる指標について情報を収集した。

B. 研究方法

(1) 投与液の調製法

人造肺サーファクタントであるサーファクテン®にそれぞれ 5 mg/mL の濃度で MCNT を懸濁させ、メノウ乳鉢による粉碎の有無により異なる状態、すなわち MWCNT の凝集塊が多い状態および単離した MWCNT が比較的多い状態のそれぞれの懸濁液を調製した。懸濁状態については、光学顕微鏡、透過電子顕微鏡（TEM）および走査電子顕微鏡（SEM）のそれぞれで確認した。

(2) 気管内投与実験