

平成 20 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）

研究分担報告書

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

研究分担課題名：高生産量ナノマテリアルの有害性評価指標の開発に関する研究

研究分担者：菅野 純 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部長

研究協力者：高木 篤也 国立医薬品食品衛生研究所 毒性部室長

研究要旨

高生産量（HPV）ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、その安全性評価に必要な条件を探ることを目的に、繊維物質短期中皮腫発がんモデルとして雄p53(+/-)マウスを用いて長繊維型MWCNTの検討を、前回実施した試験より1/10、1/100あるいは1/1000用量に下げた実施したところ（最高用量は0.3mg/animal）、最低用量群まで用量相関性をもって中皮腫の発生が認められた。C57BL/6マウスを用いたフラーレンの単回腹腔内投与試験を実施し、48週間観察したところ、腎障害が認められた。アスベストのマウス腹膜中皮を対象としたマイクロアレイ解析で、細胞増殖、DNA複製、DNA障害に関連する遺伝子発現の増加が認められた。

A. 研究目的

ナノマテリアルの物理化学的性状は、同一組成を持つ大きな構造体とは著しく異なり、この違いが産業的に新しい用途への開発として期待されているところであるが、一方で生体に対して、特にヒト健康影響に対する有害性評価に対しては、新たな危惧として捉えられる可能性も含んでいる。これまでの通常の毒性試験は構造体そのものの大きさに対しては、アスベストや塵肺症原因物質などを除き、特別の考慮はされて来っていないことから、ナノマテリアルの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。化審法等これまでの化学物質の組成を対象にした安全性評価システムでは、生体内へ吸収されないと考えられる高分子ポリマーを除いて、物質の大きさを意識した評価システムとなっておらず、化学物質の行政的申請／認可体制における産業用ナノマテリアルの安全性評価においても、その大きさに依存した特性を評価するシステムの追加、あるいは新たな枠組みに基づく登録（レジストレーション）システム構築の必要性が想定されている。既存化学物質として評価済みの単一元素、或いは組成からで

きたナノマテリアル、例えば、炭素のみから成るカーボンナノチューブやフラーレンは、現行の化審法などでは新たな審査を必要とせず大量使用可能な状態である。また、酸化チタンなどの金属酸化物はすでに化粧品原料として広く使用されており、それらの安全性の評価は急務である。本研究では、これらの高生産量 (HPV) ナノマテリアルに対する安全性評価手法の開発検討を優先して行うことを通して、ナノマテリアルの安全性評価に必要な条件を探ることを目的とする。

B. 方法

実験 1.

長繊維型 MWCNT の p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与中皮腫誘発実験 (用量-反応試験)
動物：雄 C57BL/6 背景 (戻し交配 20 代以上) の p53 ヘテロ欠失 (p53(+/-)) マウス (9~11 週齢、一群 20 匹) を使用した。

検体及び調整：用量は前年度の試験の投与量 3mg/animal (繊維数として 1×10^9 本/animal) の 1/10 の用量の 0.3mg (10^8 本) を最高用量に、以下 10 の公比で、0.03 (1×10^7 本)、0.003 mg (1×10^6 本)/animal とし、それぞれ単回腹腔内投与した。対照群には溶媒を投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

実験 2.

フラーレンのマウス腹腔内投与慢性毒性実験

平成 18 年度中皮腫誘発モデル実験の陰性対照群に設定したフラーレン投与群に腎障害を示唆する所見を認めたため、新たに C57BL/6 マウスにフラーレンを投与し、腎への慢性影響を確認する実験を実施した。

動物には雄 C57BL/6 マウス (9 週齢、一群 30 匹) を、フラーレンはフロンティアカーボン社の最高純度の SUH (>99.9%、昇華精製品) を用いた。フラーレンは 0.5%MC に懸濁、オートクレーブ (121℃20 分) 後、Tween80 (最終濃度

1%) を加えた。対照群には検体を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。フラーレンは 3mg/animal の用量にて単回腹腔内投与し、観察期間は投与後 1 年とした。

実験 3.

アスベスト投与マウス中皮の遺伝子発現解析

アスベストによる中皮腫誘発メカニズムを明らかにするため、中皮反応モデルとして腸間膜を対象にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。

動物は雄 C57BL/6 マウス (12 週齢) を使用した。アスベストにはクロシドライトを用いた。アスベストは PBS に懸濁後、オートクレーブした。投与後、0、2、4、8、24、48、72 時間、7 日、及び 14 日目に小腸間膜を採取し、RNA を抽出、アフィメトリクス社の Gene Chip Mouse Genome 430 2.0 Array を用いて遺伝子発現解析を行った。その解析には定量的比較を高精度に行うために、我々の開発した Percellome 手法 (細胞 1 個当たりの mRNA 絶対量を得る遺伝子発現解析手法) を適用した。

(倫理面への配慮)

本実験は国立医薬品食品衛生研究所・動物実験委員会の規則及び承認のもとに人道的に実施された。ナノマテリアル類及びアスベストの実験に際しては、当研究所の専用特殊実験施設内で、その運用規則に従い実施しており、暴露・漏洩を防止する対策については万全を期して実施している。

C. 研究結果

実験 1.

長繊維型 MWCNT の p53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与中皮腫誘発実験 (用量-反応試験)

長繊維型 MWCNT の中皮腫誘発能の用量反応性を調べるため、雄 p53(+/-) マウスに 3 用量をそれぞれ単回腹腔内投与した。肉眼的に、MWCNT

の0.3mg/kg群で強い腹膜の癒着が観られた。また、0.03mg/kg群でも中程度の腹膜癒着が観られた。腹腔内腫瘍の発生頻度は0.003mg/kg群で3/20(15%)、0.03mg/kg群で5/20(25%)、0.3mg/kg群で15/20(75%)であった。なお、対照群にも死亡が2匹観られたが、p53欠失マウスに自然発生することが知られている胸腺腫によるものであり、腹腔内腫瘍は観られなかった。現在、病理組織学的検査を実施しているが、最低用量の0.003mg/kg群にも中皮腫の発生が確認された。

実験 2.

フラーレンのマウス腹腔内投与慢性毒性実験

フラーレン投与群で体重増加抑制が認められた。対照群、フラーレン投与群の動物を9ヶ月の時点での6匹ずつの途中解剖の結果、肉眼的にフラーレン投与群6匹中5匹の腎に退色を伴う巣状の癥痕様萎縮巣ないし、片側腎全体の高度萎縮を認めた。腎組織の巣状萎縮の肉眼的な程度(スコア化値)と体重増加抑制の程度には正の相関が認められた。組織学的に尿細管の高度の萎縮より成り、一部「甲状腺様変化」を伴う。一方、対照群には異常は認められなかった。そこで、最終解剖時期を早めて、投与46週に全ての動物を解剖した。その結果、フラーレン投与群の約2/3の動物に肉眼的に明らかな腎の萎縮を認めたが、対照群には認められず、フラーレンが腎障害を起こすことが確認された。なお、現在、組織学的検査を実施中である。

実験 3.

アスベスト投与マウス腸間膜のマイクロアレイ解析

アスベストによる中皮腫誘発メカニズムを解析するため、中皮反応モデルとして、腸間膜を対象にマイクロアレイを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った。その結果、細胞膜の水の通過に関わる蛋白のアクアポリンの増加、Wntシグナルに関連する遺伝子発現増加を始め、細胞増殖、DNA

複製、DNA修復関連遺伝子の増加が認められた。

D. 考察

本研究では、アスベスト中皮腫の短期発がんモデル系として知られているp53(+/-)マウスを用いて、ナノマテリアルの短期中皮腫発がん試験を実施した。MWCNTのバルク検体には形状がアスベストに類似した成分が含まれているため、アスベストと同様に中皮腫が発生することが予測された。病理組織学的検査の結果、MWCNT群に中皮腫が多発することが示され、その程度は投与検体の重量の比較ではアスベストと同等レベルである明らかとなった。この結果から、ヒトがMWCNTを吸入した場合に、アスベストと同様の発がん性を示す可能性が示唆された。ヒトへの本結果の外挿に際しては、第一に、ヒトにおいてMWCNTが吸入によりアスベストと同様に肺内の病変誘発部位に到達するか否か、アスベスト同様の体内滞留時間を示すか否か、等の要素を明らかにする必要があり、将来検討すべき課題である。しかし、動物実験でMWCNTにより、アスベストと類似したメカニズムにより中皮腫が発生することが示されたことから、新製品開発の際にはこのような特性を十分に考慮することが望まれる。また現時点では、MWCNTを扱うヒトは暴露を最小限にすることが重要であると思われた。

昨年度より新たに実施したMWCNTの用量反応性試験では各用量群とも用量依存的に中皮腫と思われる腫瘍が腹腔内に認められた。前回の試験でのMWCNTの投与量は3mg/animal (1×10^9 本/動物)であったが、今回、0.003mg/kg群 (1×10^6 本/動物)で腹膜の癒着が肉眼的に認められない条件下においても中皮腫発生が認められたことは、この長繊維型MWCNTによる発がんがアスベスト等の繊維状物質の中皮腫発がんに対して提唱される発がん機構仮説に矛盾しないことを示唆している。

フラーレンに関してはマウス単回腹腔内投与の結果、体重増加抑制の程度と概ね相関する

形での腎の高度の巣状萎縮が誘発され、組織学的に尿細管を主標的とする可能性が示唆された。現時点ではその発症機序は不明であるが、病理組織学的検査から、腎の糸球体障害に起因するものではないことが示唆された。

アスベスト投与マウスの腸間膜のマイクロアレイ解析の結果、Wnt シグナルなどの他、細胞増殖、DNA 複製、DNA 修復に関与する遺伝子発現に影響を支えることが示され、今後の解析によりメカニズムの解析が進むものと考えられた。

E. 結論

1. ナノマテリアルの短期中皮腫発がんモデルとして、雄p53(+/-)マウスに長繊維型MWCNTを単回腹腔内投与した結果、腹膜癒着の発生しない量から用量に依存した腹腔内腫瘍の発生が確認された。
2. フラーレンをC57BL/6マウスに単回腹腔内投与した試験で腎障害が確認された。
3. アスベストのマウス腸間膜を対象としたマイクロアレイ解析で、細胞増殖、DNA複製、DNA障害に関連する遺伝子発現の増加が認められた。

F. 健康危険情報

該当無し

G. 研究発表

1. 論文発表

Takagi A, Hirose A, Nishimura T, Fukumori N, Ogata A, Ohashi N, Kitajima S, Kanno J. Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J Toxicol Sci. 2008 Feb;33(1):105-16.

Tsuda H, Tokunaga H, Hirose A, Kanno J. (2008), Hazard identification of nanomaterials, Yakugaku Zasshi. 2008 Dec;128(12):1727-32.

2. 学会発表

津田洋幸、徐結苟、深町勝巳、井上義之、高月峰夫、徳永裕司、内野 正、西村哲治、広瀬明彦、菅野 純、発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原生早期検出の試み、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、東京、口演

北嶋 聡、菅野 純、トキシコゲノミクスによる毒性評価法の高精細化、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、口演

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、発生期ドーモイ酸暴露によるマウス脳微細構造異常と情動-認知行動障害、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、口演

平林容子、李光勲、尹 秉一、藤井義明、金子豊蔵、黒川雄二、菅野 純、井上 達、アリアルハイドロカーボン受容体の生物学とトキシコロジー、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、東京、口演
壺井 功、平林容子、原田智紀、児玉幸夫、菅野 純、井上 達、相澤 信、加齢に伴う造血微小環境の機能低下は抗癌剤投与後の B 細胞産制を遅延させる、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、口演

高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、菅野 純、p53+/-マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 26 日、東京、ポスター

種村健太郎、五十嵐勝秀、相崎健一、北嶋 聡、菅野 純、エストロゲン受容体 (α 型) ノックダウンマウスの神経行動解析、第 35 回日本トキシコロジー学会学術年会、2008 年 6 月 27 日、東京、ポスター

今井 清、坪井 優、向井大輔、山下 龍、関田清司、高木篤也、北嶋 聡、菅野 純、フタル

酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの比較毒性学的研究、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月27日、東京、ポスター

北嶋 聡、相崎健一、五十嵐勝秀、児玉幸夫、高木篤也、関田清司、今井 清、菅野 純、Percellome 手法を用いたフタル酸エステルDEHPとその活性代謝産物MEHPの腎に及ぼす遺伝子発現変動の比較、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月28日、東京、ポスター

五十嵐勝秀、小川幸男、笠井辰也、長野嘉介、北嶋 聡、相崎健一、菅野 純、シックハウス指針値レベルの経気道暴露による遺伝子発現変化のPercellome 解析、第35回日本トキシコロジー学会学術年会、2008年6月28日、東京、ポスター

菅野 純、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、ナノ社会受容研究会講演会、2008年8月5日、つくば、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第23回発癌病理研究会、2008年8月25日、鳥羽、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発－異物発癌としての若干の考察を副えて－、モロシヌス研究会、2008年9月12日、東京、口演

菅野 純、MWCNTに含まれるアスベスト様粒子が生体へ及ぼす影響、化学生物総合管理学会特別講演会、2008年9月26日、東京、口演

菅野 純、ナノ材料の有害性評価、第2回統合研究院 環境プロジェクト・ワークショップ、

2008年10月8日、東京、口演

菅野 純、カーボンナノチューブの生体影響、中央労働災害防止協会企画セミナー、2008年10月16日、東京、口演

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、西村哲治、福森信隆、小縣昭夫、大橋則雄、北嶋 聡、関田清司、多層カーボンナノチューブのp53ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発、第67回日本癌学会総会、2008年10月28日、名古屋

菅野 純、広瀬明彦、MHLW study projects on nanomaterial safety and some thoughts on the toxicity of nanomaterials including mesotheliomagenesis of MWCNT., Recent Progress on Environmental, Health and Safety Research on Manufactured Nanomaterials名古屋大学国際シンポジウム、2008年12月12日、名古屋

菅野 純、ナノマテリアルの毒性予測－発癌性を中心に、学術会議シンポジウム、2008年12月26日、東京

菅野 純、Percellome 遺伝子発現解析標準化及び解析手法、第11回癌治療増感研究シンポジウム、2009年2月14日、奈良

菅野 純、ナノ材料粒子の有害性について、色材セミナー「ナノ粒子の安全性と応用」、2009年3月12日、名古屋

H. 知的財産所有権の出願・登録状況（予定も含む）

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

研究分担課題名: ナノマテリアルの発ガン性評価手法の開発に関する研究

研究分担者: 津田 洋幸 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 教授

研究協力者: 深町 勝巳 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 助教

徐 結荷 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座 分子毒性学 研究員

David B. Alexander 名古屋市立大学大学院医学研究科 分子医学講座

分子毒性学 客員教授

研究要旨

ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスク評価を行う目的で、無コーティングルチル型粒径 20nm 二酸化チタニウム (TiO_2) の肺と乳腺に対する発がんプロモーション作用およびその発がんメカニズムを追究した。乳腺発がん高感受性雌ヒト正常型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットを用いてニトロサミンの DHPN による発がんイニシエーション後にナノ TiO_2 粒子を投与して肺と乳腺の発がんプロモーション作用を検討した。その結果、ナノ TiO_2 の肺内噴霧試験法によって肺および乳腺において発がんプロモーション作用を示すことが明らかとなった。そのメカニズムとして、n TiO_2 を食食した肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α が肺の上皮細胞に作用し細胞増殖を促進すること、さらに肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α は血中に移行し、乳腺の細胞増殖を促進した結果、乳癌の促進作用も示すことを明らかにした。このように、我々は、ナノ TiO_2 粒子を用いて、経気管肺内噴霧法により肺発がんのプロモーション作用および肺胞マクロファージが関与する発がんメカニズムを明らかにした。今後、フラーレンや多層カーボンナノチューブといった他のナノ粒子の発がん性およびその発がんメカニズムの検索を行う予定である。

A. 研究目的

ナノ粒子はその新機能や優れた物理化学的特性から多分野における全く新しい素材として世界中で開発が進められている。このうち、ナノ粒子二酸化チタン (n TiO_2) は、化粧品や歯磨き粉、白色塗料の材料として既に市場に出回っている。しかし、今までに無い素材であるために生体影響についての知見は乏しかった。

これまでに、n TiO_2 は吸入曝露試験において、雌ラットの肺に発がん性を示すことが分かってきた。しかし、吸入曝露試験を行うには、膨大な設備を要するため、n TiO_2 のハザード評価、リスク評価、発がんメカニズムの解析のいずれも十分なデータは得られていない。我々は、専用の吸入設備を要しない試験法として、簡便で実験者に安全な経気管肺内噴霧法を開発した。

本研究では、nTiO₂ 経気管肺内噴霧法によるラット肺発がんおよび乳腺発がんプロモーション作用を検索し、発がん性評価法の基礎的知見を得ること、さらに nTiO₂ の肺発がんおよび乳腺発がんのプロモーションのメカニズムを追究し、ハザード評価、リスク評価の基礎的知見を得ることを目的とした。

B. 研究方法

TiO₂ は、ルチル型、無コーティング、平均粒子径 20 nm のものを試料とした。生理食塩水を用いて 250 ppm または 500 ppm の濃度で nTiO₂ 粒子を懸濁し、オートクレーブ滅菌後、使用 20 分前まで超音波処理を行った。イソフルレン麻酔下のラットに、nTiO₂ をマイクロスプレーヤーを用いて経気管的に肺内に噴霧した。

1) nTiO₂ 長期投与実験

33 匹の 6 週齢の雌 Hras128 ラットに肺発がん物質 DHPN を 0.2% の濃度で 2 週間飲水投与した。2 週間の休薬後、対照群、250 ppm nTiO₂ 投与群及び 500 ppm nTiO₂ 投与群の 3 群にラットをわけた。nTiO₂ は、2 週間に 1 回、第 4 週から 16 週まで合計 7 回投与した。最終投与から 3 日後に屠殺剖検を行い、脳、肺、肝、腎、脾、乳腺、卵巣、頸部リンパ節を採取した。4% パラホルム固定液で固定した後、病理組織学的に解析した。

2) nTiO₂ 短期投与実験

10 週齢の雌 SD ラット (Hras128 の野生型に相当) 20 匹に対し、500 ppm nTiO₂ あるいは生食のみを 8 日間に 5 回、気管内噴霧した。最終噴霧から 6 時間後に屠殺剖検し、肺および乳腺を採取し、組織学的に検索した。8-OHdG の測定は、ゲノム DNA を抽出し、HPLC 法にて行った。肺および乳腺組織中の IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、GM-CSF、G-CSF、TNF α 、IFN γ 、IL-18、MCP1、MIP1 α 、GRO/KC、および VEGF の濃度の測定には、蛋白を抽出した後、Multiplex Suspension array を用いた。

3) 初代培養肺胞マクロファージの樹立と培養上清の回収

野生型の雌 SD ラットを用い、0.5 ml の 6% チオグリコール酸を 4 日間に 3 回、気管内に噴霧した。最終投与から 6 時間後に屠殺剖検し、肺組織を細かく刻み、10% FBS 含有 RPMI 1640 で懸濁した。2 回洗浄した後 6cm のディッシュに細胞を播種し 2 時間培養した後、接着しなかった細胞を取り除いた。接着した細胞がマクロファージであることを CD68 抗体免疫染色にて確認した (約 98% が陽性であった)。初代培養肺胞マクロファージに対して、nTiO₂ の最終濃度が 100 ppm となるように曝露し、24 時間インキュベートした。その後培養上清を回収し、5 倍に希釈した後、96 ウェルプレート上に播種したヒト肺がん培養細胞 (A549, 5 $\times$ 10³ 個) の培養上清に加え (FBS の最終濃度は、2%)、72 時間培養し、細胞数を計測した。次に、培養液に 0、5、10、20 μ g/ml の抗 MIP1 α 中和抗体または 20 μ g/ml の IgG を添加し、インキュベートした。A549 細胞の相対数は、Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。

(倫理面への配慮)

動物の飼育は、名古屋市立大学医学部実験動物教育センターで行った。実験計画書は、名古屋市立大学大学院医学研究科 実験動物教育センターでの動物の愛護と使用のガイドラインに則り、動物運営委員会の承認を経て行った (H17-28)。

C. 研究結果

1) 肺では異物性の炎症反応は弱く観察されたのみであった。nTiO₂ の凝集塊が肺胞マクロファージに貪食されていた。肺には肺胞過形成および肺腺腫が観察され、対照群ではそれらの平均発生個数はそれぞれ 5.9 個および 0 個であったが、TiO₂ 500ppm 群ではそれぞれ 11.1 個および 0.46 個と、有意な増加 (P<0.01 および P<0.05) がみられた。また対照群では平均 3.0 個/匹の乳癌が発生したのに対し、nTiO₂ 500ppm 群では平均 6.6 個と有意な増加 (P<0.05) がみられた。

2) 野生型雌 SD ラットを用い nTiO₂ を 8 日間に 5 回気管内噴霧した促進機序の解析実験において、肺では SOD 活性および 8-OHdG レベルの有意な増加 (P< 0.01, 0.001) がみられた。肺組織を用いたサイトカインアレイによる解析では、nTiO₂ 群で MIP1 α および GRO/KC の発現が、対照群に比べそれぞれ 1.44 倍および 1.48 倍と有意に増加した。異物炎症の指標となる炎症性サイトカイン

(GM-CSF 等) の有意な上昇は認められなかった。一方、nTiO₂ を貪食する肺胞マクロファージが MIP1 α の免疫染色で陽性を示した。

3) 初代培養肺胞マクロファージに nTiO₂ を処置すると、上清中の MIP1 α の発現が増加しており、その培養上清は、ヒト肺がん細胞 (A549) に対して増殖促進作用を示した (対照の 142%)。培養上清による増殖促進作用は、MIP1 α 中和抗体処理により濃度依存的に減弱した。さらに組み替え MIP1 α にも、ヒト肺がん細胞 (A549) に対して増殖促進作用がみられた。MIP1 α タンパクは血中にも検出された。また、乳腺での発現を調べたところ、nTiO₂ を曝露した場合には腫瘍部に MIP1 α の強い発現を認めた。一方、nTiO₂ を曝露した Hras128 ラットでは血清中に MIP1 α が検出された。

D. 考察

これまでに TiO₂ の発がん性に関しては WHO/IARC により pigment grade やアナターゼ 型の TiO₂ に肺発がん性があると報告されており、ヒトに対して発がん性が疑われる group 2B に分類されている。本研究では、ルチル型の TiO₂ の発がん性促進作用を、雌ラットを用いたイニシエーション・プロモーション実験プロトコルを用いて明らかにした。さらに、nTiO₂ の発がん性を示すには、nTiO₂ を貪食した肺胞マクロファージが重要であることを示した。長期間の吸入曝露によっても同様のメカニズムが起こっていると考えられ、本研究における nTiO₂ の発がん促進作用は、IARC の結果と一致する。従って、本研究で用いた気管内噴霧による発がん性試験法は、長期吸

入曝露試験の結果を予測することが可能であることが示唆された。

本研究では、nTiO₂ 気管内噴霧により nTiO₂ は肺胞マクロファージに貪食されている組織像が観察された。肺胞マクロファージは、金属粒子や繊維の除去に重要であることが知られている。しかし、nTiO₂ は非常に安定であるために、肺胞マクロファージは nTiO₂ を完全に消化することができず、“Frustrated” の状態となる。このようなマクロファージは、reactive oxygen species (ROS) の上昇や細胞障害と関連することが報告されており、本研究で観察された 8-OHdG の上昇、肺発がん性の促進作用との関連が示唆される。

サイトカインアレイによる解析の結果 MIP1 α の発現上昇に着目した。MIP1 α はマクロファージが分泌するケモカインであり (CCL3)、骨髄腫の接着、増殖、生存に関することが報告されており、我々の検索でもヒト肺がん細胞 A549 とラット乳腺腫瘍由来の C3 の細胞増殖を促進した。さらに MIP1 α は、肺のみならず血液や乳腺組織においてもその発現が上昇していたことから、MIP1 α が肺のみならず、血液を介して乳腺の細胞増殖を促進した結果、ルチル型 nTiO₂ によるラット乳腺発がんの促進作用も示したと考えた。

E. 結論

本研究によって、以下の 3 点が明らかとなった。

(1) nTiO₂ を気管内に噴霧したイニシエーション・プロモーション実験プロトコルに基づいた中期試験法により、TiO₂ の肺がん促進作用が確認された。(2) 肺発がん促進メカニズムは、nTiO₂ を貪食した肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α が肺の上皮細胞に作用し、細胞増殖を促進した(3) 肺胞マクロファージが分泌した MIP1 α は血中に移行し、乳腺の細胞増殖を促進した結果、nTiO₂ の吸入曝露により肺癌のみならず乳癌の促進作用も示した。

F. 健康危機情報

なし

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Matsuoka, M., Fukamachi, K., Uehara, N., Tsuda, H. and Tsubura, A. Induction of a novel histone deacetylase 1/c-Myc/Mnt/Max complex formation is implicated in parity-induced refractoriness to mammary carcinogenesis. *Cancer Sci* 99:309-315, 2008.
2. Kurosawa, G., Akahori, Y., Morita, M., Sumitomo, M., Sato, N., Muramatsu, C., Eguchi, K., Matsuda, K., Takasaki, A., Tanaka, M., Iba, Y., Hamada-Tsutsumi, S., Ukai, Y., Shiraishi, M., Suzuki, K., Kurosawa, M., Fujiyama, S., Takahashi, N., Kato, Ryoichi., Mizoguchi, Y., Shamoto, M., Tsuda, H., Sugiura, M., Hattori, Y., Miyakawa, S., Shiroki, R., Hoshinaga, K., Hayashi, N., Sugioka, A. and Kurosawa, Y. Comprehensive screening for antigens overexpressed on carcinomas via isolation of human mAbs that may be therapeutic. *PNAS* 105:7287-7292.2008
3. Matsuoka, Y., Kawaguchi, H., Yoshida, H., Tsuda, H. and Tsubura, A. Rat mammary preneoplasia and neoplasia: a model for human breast cancer research. *Trends in Cancer Research*.3, 1-13, 2007.
4. Fukamachi, K., Imada, T., Ohshima, Y., Xu, Jiegou. and Tsuda, H. Purple corn color suppresses Ras protein level and inhibits 7,12-dimethylbenz[a]anthracene-induced mammary carcinogenesis in the rat. *Cancer Sci* 99:1841-1846. 2008
5. Tamano, S., Sekine, K., Takase, M., Yamauchi, K., Iigo, M. and Tsuda, H. Lack of Chronic Oral Tpxicity of Chemopreventive Bovine Lactoferrin in F344/DuCrj Rats. *Asian Pacific J Cancer Prev*, 9, 313-316, 2008
6. Iigo, M., Alexander, D. B., Long, N., Xu, J., Fukamachi, K., Futakuchi, M., Takase, H. and

Tsuda, H. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactferrin in the murine small intestine. *Biochimie* 91:86-101,2009

2. 学会発表

1. 発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原性早期検出の試み、第35回日本トキシコロジー学会、2008年6月26-28日、東京
2. Lessons from possible carcinogenic mechanism of asbestos, 67th Annual Meeting of the Japanesse Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
3. Promotion of Nano-sized TiO₂ on lung and mammary gland carcinogenesis in female human H-ras gene Transgenic Rats, 67th Annual Meeting of the Japanesse Cancer Association, Oct28-30, 2008, Nagoya
4. ナノサイズ二酸化チタニウムおよびフラーレン(C60)の肺発がん促進作用とその機序の解析、第23回発がん病理研究会、2008年8月25-27日、鳥羽
5. ナノサイズ二酸化チタニウムの肺と乳腺発がん促進作用とその機序の解析、第25回日本毒性病理学会、2009年1月27-28日、浜松

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む）

1. 特許取得（出願中）

発明の名称：ナノ粒子の吸入曝露による発がんリスクマーカーおよびその用途

出願日：平成21年3月24日

出願番号：特願2009-071951

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苛

特許出願人：公立大学法人名古屋市立大学

2. 実用新案登録

該当なし。

3. その他

該当なし。

平成 20 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)
研究分担報告書

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

研究分担課題名: ナノマテリアルの生体内分析法の確立と体内動態の評価法
に関する研究

研究分担者: 西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
研究協力者: 小縣 昭夫 東京都健康安全研究センター 環境保健部
大橋 則雄 東京都健康安全研究センター 環境保健部
福森 信隆 東京都健康安全研究センター 環境保健部
久保田領志 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 環境衛生化学部

多層ナノカーボンチューブ (MWCNT) を曝露したマウスの肺組織を、透過型電子顕微鏡により観察した結果、曝露 3 日後の 3 匹および曝露 7 日後の 1 匹で MWCNT の存在が観察された。曝露 14 日後および 28 日後の観察においては MWCNT の存在は現在まで確認できていない。曝露 3 日後では、MWCNT が束状に観察され、短い単繊維の MWCNT も数本観察された。曝露 7 日後では、MWCNT が数本集合して観察された。曝露 3 日後と 7 日後で認められた MWCNT の数は、曝露後 3 日が多く観察された。

フラレーン C60 の単回尾静脈投与では、3 個体中 1 個体の肝臓と肺からのみ検出された。腎臓、脾臓、腸管リンパ節、脳および血液からは検出できなかった。フラレーン C60 の反復尾静脈投与では、投与後 1 日目および 4 日目の投与個体全て (5/5) の肝臓、肺、脾臓、腎臓から検出された。脳および血液からは検出できなかった。肝臓、肺および脾臓の検出濃度は同程度 (7.89 ~ 64.5 $\mu\text{g/g}$, wet wt.) であった。腎臓の検出濃度は、他の 3 臓器に比べ低濃度 (0.120 ~ 0.944 $\mu\text{g/g}$, wet wt.) であった。脳および血液からは検出できなかった。

4 回の反復投与後、組織分布を 1 日後、11 日後、18 日後に調べた結果、脾臓および肺では大きな変化は認められなかったが、肝臓では経時的な減少が認められた。また、腎臓では、投与 1 日後に検出されたが 11 日以後には定量下限値未満であった。

体内に吸収された後の体内動態を調べるために、フラレーン C60 の反復尾静脈内投与を行った結果、肝臓、肺および脾臓に優先的に蓄積し、3 臓器に比べ低濃度ではあるが腎臓にも蓄積することが明らかとなった。血液から検出できなかったことから、体内に取り込まれたフラレーン C60 の体内循環量は多くはないが、時間とともに肝臓から血中への放出もしくは代謝されて、フラレーン C60 の原体濃度としては減少していくことが推測された。また、腎臓に一時的に貯留したフラレーン C60 は、速やかに尿中排泄されるか、もしくは代謝産物に変化して検出できない濃度に低下していると考えられた。

A. 研究目的

ナノマテリアルである多層ナノカーボンチューブ (MWCNT) は産業用材として適用が考慮されているが、ヒトが曝露した場合の健康影響、体内動態等についての情報はほとんどない。曝露された MWCNT の体内分布と挙動を明らかにするため、透過型電子顕微鏡による同定・定量のための手法を開発し、実験動物の組織内分布の評価に適用した。

ナノマテリアルであるフラーレン類は様々な産業用材としてすでに利用されているが、ヒトが曝露した場合の健康影響、体内動態等についての情報は極めて少なく、評価が急務となっている。フラーレン C60 のマウスへの強制経口投与において、単回投与では一個体の腸管リンパ節から $1.5\mu\text{g/g wet wt.}$ で、4 回の反復投与では一個体の肝臓および腎臓からそれぞれ $0.16\mu\text{g/g wet wt.}$ 、 $0.23\mu\text{g/g wet wt.}$ の濃度で検出された。それぞれの投与において一個体から検出されたのみであることから、経口摂取による腸管からのフラーレン C60 の吸収は極めて低いと示唆された。本研究では、腸管からの吸収された後の体内挙動について検討するため、ラットの尾静脈からフラーレン C60 を投与し、組織分布を調べた。

B. 研究方法

1. マウス組織からの MWCNT の分離

MWCNT を気管内強制投与したマウスより測定対象臓器を採取し、分析用試料の調整時まで -80°C で凍結保存した。各臓器より約 0.2g を分取し、ハサミで細片した後、ジムロート冷却器を装着した 100mL 丸底フラスコに移した。 10mL の $5\%\text{KOH}$ - 50% エタノール水溶液を加え、約 80°C で 1 時間、加熱溶解した。溶解液 1.6mL に脱イオン水 6.4mL を加え、超遠心分離機 (Beckman, Optima LE 80K) で $40,000\text{rpm}$ (約 $100,000 \times$

g)、90 分間遠心した。上清を除いた沈殿に脱イオン水 10mL を加え、ソニケーターで懸濁後、再度同条件で遠心分離した。最終的に得られた沈殿物を電子顕微鏡試料とした。

2. MWCNT の電子顕微鏡標本作製

電子顕微鏡の試料は、沈殿物に 0.5mL の蒸留水を加え、ソニケーターで懸濁した後、 $10\mu\text{L}$ を親水処理したフォルムバル支持膜を張ったニッケル製のグリッドに載せ、十分に乾燥させてから、加速電圧 75kV の透過型電子顕微鏡 (TEM, H-7000) で観察した。観察は、 $5,000$ 倍でスクリーニングを行い、MWCNT の確認として中空構造および黒色の沈着点、先端部構造を $10,000$ 倍の倍率で識別した。

3. フラーレン C60 の投与方法

ホスファチジルコリン、ホスファチジルセリンおよびホスファチジルグリセロールのクロロホルム溶液をそれぞれ重量比で $2:1:1$ の割合に混合した溶液 1mL に、 2.5mg/mL のフラーレン C60 トルエン溶液を 0.4mL 加え、十分攪拌した後、窒素気流下でクロロホルムを穏やかに揮発させて脂質膜を作製した。 1mL の PBS(-) を加え、攪拌してリポソーム懸濁液を作製した。リポソームの粒子径を均一にするためには、 100nm の濾紙でろ過した。リポソームの粒径を調整した溶液および調整をしない溶液、それぞれを投与に使用した。

Wistar ラット雄 6 週齢を日本エスエルシーから購入し、3 日間の馴化期間を経た後、フラーレン C60 リポソーム溶液を 5mL/kg body wt で、単回もしくは反復尾静脈投与した。単回投与では、各群 3 匹とした。反復投与では、各群 5 匹用い、フラーレン C60/リポソーム溶液を 5mL/kg body wt で 1 日 1 回、連続 4 回、反復尾静脈投与した。単回投与では投与 1 日後、反復投与では投与 1 日後、4 日後、11 日後および 18 日後に、

肝臓、腎臓、脾臓、肺、腸管リンパ節、脳、および血液を採取した。採取した臓器組織および血液は、分析まで -80°C で保存した。

細片化した各組織から 50~150mg を分取し、0.01M ドデシル硫酸ナトリウムを 0.5mL 加え、回収率補正のためのサロゲート物質としてフラーレン C70 トルエン溶液を 0.5mL 加えた後、ホモジナイズした。ホモジネートを遠沈管に移し、トルエン 5mL、酢酸 0.5mL を順次加え、遮光下、室温、230rpm で 5 時間振とう抽出した。3500rpm で遠心し、トルエン層を分取し、窒素気流下で 5 倍に濃縮した。血液についても同様の操作に従い抽出した。

4. フラーレン C60 の定量

液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析計 (LC-MS/MS) により、大気圧化学イオン化法 (APCI) のネガティブイオンモードでフラーレン C60 の定量を行った、モニターするプレカーサイオンおよびプロダクトイオンは、フラーレン C60 はともに $m/z=720$ 、フラーレン C70 はともに $m/z=840$ を用いた。HPLC の分離は、C30 系逆相カラムの Devesil RPFULLERENE を用い、移動相はトルエン : アセトニトリル = 70% : 30%、流速 1mL/min で行った。

C. 研究結果

1. マウス肺からの MWCNT の検出

吸入曝露させたマウスの肺組織中の MWCNT 存在と挙動について、開発した試験法を用いて検討した。

マウスに MWCNT を曝露した 3 日後及び 7 日後は各々 3 匹、14 日後及び 28 日後は各々 2 匹の肺組織について、透過型電子顕微鏡により検出した。

MWCNT は曝露 3 日後の 3 匹及び曝露 7 日後の 1 匹で MWCNT の存在が観察された。曝露 3 日後では、MWCNT が束状に観察され、短い単繊維の MWCNT も数本観察

された。曝露 7 日後においては MWCNT が数本集合した像が観察された。曝露 7 日後に比べ、3 日後には MWCNT の本数が多く観察された。しかし、曝露 14 日後および 28 日後の試料からは観察した限りでは MWCNT の存在は確認できなかった。

また、強制経気管曝露したラットの肺の電子顕微鏡の観察では、加熱アルカリ性溶液中で溶解せず、中空構造が観察されない均質な電子密度の高い繊維状の形状をした構造物が、対照動物も含め観察され、曝露後の時間の経過に伴って増加する傾向が見られた。この物質は標本作製上での混入物とは考えられないことから、強制経気管曝露操作等による要因が生成に影響していると考えられる。

2. フラーレン C60 の単回尾静脈投与

Wistar ラットに、100nm で均一化したフラーレン C60/リポソーム溶液を単回尾静脈投与した投与群では、3 個体全ての肝臓、腎臓、肺、脾臓、腸管リンパ節、脳、および血液において定量下限値未満であった。一方、ろ過しなかったフラーレン C60/リポソーム溶液投与群では、一個体の肝臓および肺から $0.75\mu\text{g/g wet wt.}$ 、 $0.69\mu\text{g/g wet wt.}$ の濃度で検出された。

3. フラーレン C60 の反復尾静脈投与

未ろ過のフラーレン C60/リポソーム溶液を Wistar ラットに反復尾静脈投与した、投与 1 日後および 4 日後の肝臓、肺、脾臓、腎臓から検出された。投与 1 日後の肺で $32.8 \pm 24.7\mu\text{g/g wet wt.}$ (平均値 $\pm$ SD ; 以下同様)、肝臓で $25.4 \pm 11.1\mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $26.5 \pm 15.4\mu\text{g/g wet wt.}$ 、腎臓で $0.465 \pm 0.295\mu\text{g/g wet wt.}$ 、投与 4 日後の肺で $27.6 \pm 8.82\mu\text{g/g wet wt.}$ 、肝臓で $32.3 \pm 14.6\mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $27.2 \pm 8.88\mu\text{g/g wet wt.}$ 、腎臓で $0.178 \pm 0.064\mu\text{g/g wet wt.}$ あった。脳および血液は、全ての試料において定量下限値未満であった。

4回の連続静脈投与1日後の肺で $56.8 \pm 6.40 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、肝臓で $27.0 \pm 3.10 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $23.2 \pm 3.63 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、腎臓で $0.557 \pm 0.064 \mu\text{g/g wet wt.}$ であり、投与11日後の肺で $55.4 \pm 29.4 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、肝臓で $15.3 \pm 3.94 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $26.6 \pm 6.00 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、投与18日後の肺で $41.9 \pm 13.0 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、肝臓で $8.39 \pm 2.76 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $14.4 \pm 3.64 \mu\text{g/g wet wt.}$ で検出された。脳および血液は、全ての試料において定量下限値未満であった。

3日間の馴化期間を経た Wistar ラット雌13週齢妊娠9日目5匹用い、フラレン C60/リポソーム溶液を 5mL/kg body wt で1日1回の計4回反復尾静脈投与した結果、肺で $44.3 \pm 14.8 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、肝臓で $34.0 \pm 3.34 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、脾臓で $24.1 \pm 3.74 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、腎臓で $0.730 \pm 0.340 \mu\text{g/g wet wt.}$ の濃度で検出され、各臓器共に雌雄でほぼ同程度の蓄積量であった。用いたラットは雄が6週齢、雌が13週齢でかつ妊娠しているが、フラレン C60 の各臓器への蓄積には大きな差は認められなかった。

D. 考察

1. フラレン C60 の単回尾静脈投与

未ろ過のフラレン C60/リポソーム溶液投与群の一個体の肝臓および肺からフラレン C60 が検出されたことより、尾静脈から投与されたフラレン C60 が血流に乗って、まず肺に達して捕捉され、通過したフラレン C60 がさらに肝臓で捕捉されたと推測された。100nm で均一化したフラレン C60/リポソーム溶液投与群では、10nm 以上のリポソーム中のフラレン C60 が除去され、投与溶液中の C60 濃度が減少したため、定量下限値未満となったと考えられた。フラレン C60/リポソーム溶液投与による致死等、観察上では有害影響は認められなかった。

2. フラレン C60 の反復尾静脈投与

未ろ過のフラレン C60/リポソーム溶液を Wistar ラットに反復尾静脈投与した結果、全ての投与個体の肝臓、腎臓、脾臓、肺からフラレン C60 が検出された。検出された最高濃度は、投与1日後の肺で $64.5 \mu\text{g/g wet wt.}$ であったが、濃度範囲は $7.89 \sim 64.5 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、平均濃度が $32.8 \pm 24.7 \mu\text{g/g wet wt.}$ と個体間の濃度差は大きかった。肝臓、脾臓についても肺と同程度の濃度で、同様の傾向が見られた。一方、腎臓では、投与1日後で $0.464 \pm 0.295 \mu\text{g/g wet wt.}$ 、投与4日後で $0.178 \pm 0.06 \mu\text{g/g wet wt.}$ と他の3臓器に比べ極めて低濃度であった。さらに、肝臓、脾臓および肺においては1日後と7日後の濃度差は認められなかったが、腎臓においては、投与1日後に比べ投与4日後には有意に低濃度となった (Mann-whitney's U-test, $p=0.016$)。以上の結果から、吸収されたフラレン C60 は血液を介して全身に分布した結果、肺、肝臓、脾臓に優先的に貯留し、7日間の期間では投与直後の濃度からほとんど変化しないと推測された。一方、腎臓にも低濃度で分布するが、7日間の期間内に有意な濃度低下が認められ、尿を通して排泄されているか、代謝産物に変化して検出できない濃度に低下している可能性が示唆された。

別の投与実験においても、投与1日後、他の臓器に比べて低濃度ではあるが、腎臓で検出されていたが、投与11日後、18日後ではそれぞれ定量下限値未満となった。他の臓器については、肺では明確な減少傾向は確認されなかったが、肝臓では明確に経時的な減少の傾向、脾臓においては経時的に緩やかな減少の傾向が認められた。一時的に蓄積されたフラレン C60 が酸化や抱合等の代謝をうけ検出対象以外の物質に変化したか、血流を介して他の組織に分散したか、もしくは腎臓を通して排泄された

可能性が考えられた。

E. 結論

体内に吸収された後の体内動態を調べるために、フラーレン C60 の反復尾静脈内投与を行った結果、肝臓、肺および脾臓に優先的に蓄積し、7.89~64.5 μ g/g wet wt.の範囲で同程度の濃度で検出された。3 臓器に比べ低濃度ではあるが、0.120~0.944 μ g/g wet wt.の濃度範囲で腎臓にも蓄積することが明らかとなった。血液から検出できなかったことから、体内に取り込まれたフラーレン C60 の体内循環量は多くはないが、時間とともに肝臓から血中への放出もしくは代謝されて減少していくことが推測された。また、腎臓に一時的に貯留したフラーレン C60 は、速やかに尿中排泄されるか、もしくは代謝産物に変化して検出できない濃度に低下していると考えられた。

体内分布の経時変化を評価した結果、顕著な減少傾向が認められたのは腎臓および肝臓で、腎臓では投与 11 日後で定量下限値未満に、肝臓では投与 11 日後、18 日後と経時的に減少していた。また、脾臓においては、投与 11 日後では投与 1 日後と同程度であったが、投与 18 日後では減少が認められ、他の臓器に比べて移動しにくいことが推測された。一方、肺においては明確な減少傾向は認められず、血液を介して肺に取り込まれたフラーレン C60 がその後他の臓器に比べ長時間フラーレンを蓄積する可能性が示唆された。

体内分布については、雌においても雄と同様に肝臓、肺、脾臓に主に蓄積しており、腎臓においても低濃度ではあるが蓄積が観察され、蓄積濃度については雌雄差が少ないものと考えられた。

F. 健康危機情報

なし。

G. 研究発表

1. 論文発表

- 1) Takagi, A., Hirose, A., Nishimura, T., Fukumori, N., Ogata, A., Kitajima, S., Kanno, J.: Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by intraperitoneal application of multi-wall carbon nanotube. J. Toxicol. Sci. 33, 105-116 (2008)

2. 学会発表

- 1) 坂本義光, 福森信隆, 上原眞一, 広瀬明彦, 西村哲治, 前川昭彦, 今井清, 小縣昭夫, 中江大: ラットにおける多層カーボンナノチューブ(MWCNT)の陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, O-35, (2008.6)
- 2) 津田洋幸, 徐結苟, 深町勝巳, 井上義之, 高月峰夫, 徳永裕司, 内野正, 西村哲治, 広瀬明彦, 菅野純: 発がんプロモーション試験によるナノ粒子のがん原性早期検出の試み. 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, NS2-4, (2008.6)
- 3) 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣昭夫, 大橋則雄, 北嶋聡, 菅野純: p53+/-マウス腹腔内投与による多層型カーボンナノチューブの中皮腫誘発作用について, 第35回日本トキシコロジー学会学術年会, P-001, (2008.6)
- 4) 西村哲治, 清水久美子, 田原麻衣子, 久保田領志, 広瀬明彦: フラーレン(C60)の培養細胞への取り込みと影響, 第14回バイオアッセイ研究会・日本環境毒性学会合同研究発表会 p79 (2008.8)
- 5) Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Tahara, M., Hirata-Koizumi, M. and Hirose, A. : Biological Effects of Fullerene

- (C60) Exposed Using Liposome in HepG2 Cells, 45th Eurotox 2008 (2008.10)
- 6) Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, Hirose, A., Shimizu, K., Oku, N., Nishimura, T.: Tissue distribution of fullurene C60 in rat after oral and tail-vein administration by LC-MS/MS, 45th Eurotox 2008 (2008.10)
- 7) Uchino, T., Ikarashi, Y., Nishimura, T., Tokunaga, H.: Studies for effect of surface containg on cytotoxicity of nano-size titanium dioxide for the culture cell lines, 45th Eurotox 2008 (2008.10)
- 8) 管野純, 高木篤也, 広瀬明彦, 西村哲治, 福森信隆, 小縣昭夫, 大橋則雄, 北嶋聡: 多層カーボンナノチューブの p53 ヘテロ欠失マウス腹腔内投与による中皮腫の誘発, 第67回日本癌学会学術総会, 0-008 (2008.10)
- 9) 徐結句, 二口充, 飯郷正明, 深町勝巳, アレクサンダーダビッド, 内野正, 徳永裕司, 西村哲治, 広瀬明彦, 管野純, 津田洋幸: H-ras トランスジェニックラットにおける肺及び乳腺発ガンに対するナノ TiO₂ の促進作用, 第67回日本癌学会学術総会, P-1019 (2008.10)
- 10) 中江大, 坂本義光, 前川昭彦, 今井清, 西村哲治, 広瀬明彦, 小縣昭夫: ラットにおける多層カーボンナノチューブの陰嚢腔内投与による中皮腫の誘発, 第67回日本癌学会学術総会, P-1025 (2008.10)
- 11) 小濱とも子, 徳永裕司, 五十嵐良明, 内野正, 西村哲治: ナノマテリアル酸化チタンの経皮的な吸収及び体内分布, 第45回全国衛生化学技術協議会年会, p181-182 (2008.11)

H. 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。

平成 20 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)
研究分担報告書

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

研究分担課題名:ナノ粒子の繊維状形態に関わる生体反応マーカーの開発研究

研究分担者:樋野 興夫 順天堂大学 医学部 病理・腫瘍学 教授

研究要旨

ごく最近、マウス疾患モデル(カーボンナノチューブによる中皮腫発生)の存在が報告された。「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」において、中皮腫マーカーになりうるマウス ELISAの開発は緊急性の課題である。

そこで、本研究では、マウス ERC ELISA 系の開発を行った。

A. 研究目的

樋野らは、遺伝性ラット腎臓がんの進行過程で高発現してくる遺伝子(Erc)を以前に見つけた。このErc遺伝子産物は、血中に分泌され、遺伝性ラット腎臓がんの血液診断に使用できることが判明した。正常ではラットも、ヒトも胸膜や腹膜の中皮に存在することから、中皮腫になれば同蛋白が増加し、ヒト中皮腫においては腫瘍マーカーになりうることを予測された。そこで、ELISA系を(株)免疫生物研究所と共同で中皮腫を血液で診断するキットの開発を行ってきた。

ERCは別名 Mesothelin/MPF の総称でもあり、肺、心臓、胃腸、肝臓などの臓器を包む胸膜・腹膜・心膜などの膜の表面をおおっている中皮細胞や、中皮腫、卵巣癌、などのがん細胞が作り出す、糖タンパク質である。このERCタンパク質は、全長622アミノ酸、分子量が約71 kDa となる GPI アンカー型膜タンパク質として発現した後、分解酵

素によって、31 kDa (N-ERC/mesothelin)

と40 kDa (C-ERC/mesothelin) の断片に分解されることが知られている。切断された40kDaのC末側領域はそのC末端にGPIアンカー領域を含むことから細胞膜に結合した形で残るが、一方、N末側の31 kDa断片は可溶性タンパク質として細胞外に分泌される。

興味あることに、本遺伝子は種間の相同性が低く、ラットELISAはラットのみ、ヒトELISAはヒトのみにしか適用されないという問題がある。ごく最近、マウス疾患モデル(カーボンナノチューブによる中皮腫発生)の存在が報告され、マウスELISAの開発は「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」において緊急性の課題である。

B 研究計画・方法

腫瘍マーカーとして中皮腫等に特異的に発現するERC遺伝子を検出するために、5種のマウスERC抗体を作製してマウスELISA系の構築・開発を行う。

(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、倫理審査委員会の承認を得る。

C. 研究結果

Recombinant Mouse ERCの発現確認が終了し、各抗体(5種)のWB解析を行いN-ERC、C-ERCともに反応性する事が判明した。予定通りマウス抗体の作成に成功した。まず、この31kDa断片に着目し、これを検出するマウスELISA測定キットの開発を行っている。すなわち、31kDa断片に結合する2種類の抗体を作製し、いわゆるサンドイッチELISA法に基づいた測定キットを開発を進めることである。これは、一方の抗体を試験用マイクロプレートに固定化し、そこへマウス血清などの検体を反応させ、結合した標的分子(ERC)をさらにもう一方の抗体で挟み込むようにして検出する方法である。

さらに40kDaに対する特異的な抗体も作製しており、それらを用いたELISA系も構築しているところである。

D. 考察

マウス疾患モデル(カーボンナノチューブによる中皮腫発生)が報告され、マウスELISAの開発は「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」於いて緊急性の課題である。今後、マウスモデルを用いてELISA試験を実施する。

E. 結論

Recombinant Mouse ERCの発現確認が終了し、N-ERC、C-ERCともに反応性する各抗体

(5種)を作成した。31kDa断片に結合する抗体によるサンドイッチELISA法に基づいた測定キットを開発を進めている。

F. 研究発表

1. 論文発表

1. Shiomi K., Hagiwara Y., Sonoue K., Segawa T., Miyashita K., Maeda M., Izumi H., Masuda K., Hirabayashi M., Moroboshi T., Yoshiyama T., Ishida A., Natori Y., Inoue A., Kobayashi M., Sakao Y., Miyamoto H., Takahashi K. and Hino O.: Sensitive and specific new enzyme-linked immunosorbent assay for N-ERC/mesothelin increases its potential as a useful serum tumor marker for mesothelioma. *Clinical Cancer Res.*, 14: 1431-1437, 2008
2. Segawa T., Hagiwara Y., Ishikawa K., Aoki N., Maeda M., Shiomi K. and Hino O.: Mesomark kit detects C-ERC/mesothelin, but not SMRP with C-terminus. *BBRC*, 369: 915-918, 2008
3. Imamura O., Okada H., Takashima Y., Zhang D., Kobayashi T. and Hino O.: siRNA-mediated *Erc* gene silencing suppresses tumor growth in *Tsc2* mutant renal carcinoma model. *Cancer Letters*, 268: 278-285, 2008
4. Inami K., Kajino K., Abe M., Hagiwara Y., Maeda M., Suyama M., Watanabe Su. And Hino O.: Secretion of N-ERC/mesothelin and expression of C-ERC/mesothelin in human pancreatic ductal carcinoma.

Oncology Reports 20: 1375-1380,
2008

5. Hagiwara Y., Hamada Y., Kuwahara M.,
Maeda M., Segawa T., Ishikawa K.
and Hino O.: Establishment of a
Novel Specific ELISA system for rat
N- and C-ERC/Mesothelin.-Rat
ERC/Mesothelin in the body fluids
of mice bearing mesothelioma-.
Cancer Science, 99:666-670, 2008.
6. Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y.,
Maeda M., Abe M., Hino O.:
Establishment of novel monoclonal
anteibody to human ERC/mesothelin
useful for study and diagnosis of
ERC/mesothelin-expressing cancers.
Pathol. Int. 59:161-166, 2009

G. 知的財産権の出願・登録状況(予定を含む)

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。

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

研究分担課題名: 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

研究分担者: 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

石田 和也 (財)化学物質評価研究機構 久留米事業所 試験第二課

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 及び 19 年度に微生物を用いたフラーレンの分解度試験を実施した。その結果、フラーレンはその形態に関わらず、微生物により分解されなかった。そこで、環境中に放出されたフラーレンの環境動態として、水生貧毛類蓄積性試験を実施し、土壌中のフラーレン動態及び底生生物であるイトミミズ (*Tubifex tubifex*) への濃縮性の有無を調べた。その結果、土壌中に吸着させたフラーレンは、試験開始前は土壌中に安定に存在したが、試験終了時には濃度低下が認められ、その原因については不明であった。また、土壌中に吸着させたフラーレンの一部は水中に浮遊した。さらに、イトミミズへの取込みが確認されたが、腸管等への土壌の残留が疑われるため、排泄試験等により更なる詳細を調べる必要がある。

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、特有の電氣的・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ますます大きくなっている。

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。環境経路によるナノマテリアルの暴露を想定した場合、酸化チタンやフラーレン、MWCNT 等の環境中での分解・代謝物の同定が必要であるが、平成 18 及び 19 年度実施した微生物を用いたフラーレンの分解度試験では、フラーレンはその形態に関わらず、微生物により分解されなかった。従って、環境中に放出されたフラーレンは環境中に残留することが懸念される。そこで、本研究ではフラーレンの環境動態として、土壌中でのフラーレンの動態解析を行うこ

とを目的とした。さらに、今日までに報告例のない、土壌中の底生生物へのフラーレンの蓄積性を評価するため、水生貧毛類蓄積性試験を実施したので報告する。

B. 研究方法

B-1 実験材料

(1)被験物質

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%

(2)試験生物

OECD テストガイドライン(TG)315 で推奨されている 3 種類の生物のうち、国内品種で入手可能であった

イトミミズ(*Tubifex tubifex*)を用いた(入手先 独立行政法人 国立環境研究所)(写真 1 参照)。

B-2 試験底質の調製

(1) 底質の組成

OECD TG315 に記載されている底質調製方法に従って調製した。ただし、石英砂については、粒子径が指定サイズ(粒子径 50~200 μm を 50%以上含む)のものを国内で入手することが困難であったため、OECD TG218(ユスリカを用いた底質急性毒性試験)で使用されている石英砂(粒子径 200~800 μm を 40%以上含む)を用いた。底質の組成については表 1 に示した。

(2) 試験底質の調製

ピートモス(6 g)に徐々に脱塩素水道水を加え、水になじませた後、炭酸カルシウムで $\text{pH}=6.0\pm0.5$ に調製し、2 日間ゆっくりと攪拌した。2 日後、懸濁液を 10,000 $\times g$ 、30 分間遠心分離し、上澄液を除去後、カオリン(63 g)、ほうれん草粉末(2 g)及び石英砂(78 g)と混合した(混合物 A)。

次に、フラーレンをトルエンに溶解させ 1000 mg/L に調製し、トルエンに浸漬した 150 g の石英砂に 30 mL 添加し、攪拌した後、風乾して石英砂にフラーレンを吸着させた。さらに混合物 A とその石英砂を混ぜ合わせ、よく練り合わせた後、底質:被覆水=1:4 となるよう脱塩素水道水を静注し、 $20\pm2^\circ\text{C}$ で 1 週間順化を行い、試験底質とした。試験底質中のフラーレンの設定濃度は $1.00\times10^{-1}\text{ mg/g-dry}$ とした。

B-3 試験の実施

試験底質 100 g に被覆水として脱塩素水道水を 250 mL 加えた試験水槽に試験生物(体長 約 20~40 mm 湿重量 約 4 mg)を約 1.5 g(湿重量)投入した。試験温度は $20\pm2^\circ\text{C}$ 、試験期間は 7 日間とした。試験連数は $n=3$ とした。試験期間中は僅かにエアレーションを実施した。給餌は試験開始 1 日後に、コイ用の餌を 0.02 g 与えた。試験期間中の被覆水の換水は行わなかった。

B-4 試料の前処理

(1) 被覆水

被覆水の中層を分取し、トルエン抽出後 HPLC 分析試料とした。

(2) 試験底質

可能な限り試験生物を取り除き、被覆水を除去後、よく攪拌して適量採取した。これを送風乾燥機(50°C)で 1 昼夜加温し乾燥させ、トルエン抽出後、HPLC 分析試料とした。

(3) 試験生物

脱塩素水道水で洗浄後、体表に付着した試験底質や粘膜巣を取り除き、湿らせたろ紙の上に移して余分な水分を取り除き、トルエンでホモジナイズ抽出後、HPLC 分析試料とした。

(4) 観察及び測定

試験期間中、試験生物の状況を毎日、目視観察した。また、試験水槽内温度は毎日記録し、pH 測定をばく露開始前に行った。

B-5 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 1000 $\mu\text{V}\cdot\text{sec}$ (被験物質濃度 4.9 $\mu\text{g/L}$)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(15 cm $\times$ 2.1 mm I.D., 化学物質評価研究機構製)

カラム温度 40°C

溶離液 トルエン/メタノール(50/50 v/v)

流量 0.2 mL/min

測定波長 335 nm

注入量 10 μL

検出器出力 2 V/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 100 mg を正確にはかりとり、トルエンに溶解して 1000 mg/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)で適宜希釈し、標準溶液とした。