

200839021A

別紙1

厚生労働科学研究費補助金

化学物質リスク研究事業

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究

平成20年度 総括・分担研究報告書

研究代表者 戸塚 ゆ加里

平成21(2009)年4月

目 次

| | |
|----------------------------------|----|
| I. 総括研究報告 | |
| ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析----- | 1 |
| 戸塚 ゆ加里 | |
| II. 分担研究報告 | |
| 1. ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析----- | 8 |
| 戸塚 ゆ加里 | |
| 2. ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究----- | 11 |
| 葛西 宏 | |
| 3. ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究----- | 14 |
| 渡邊 昌俊 | |
| 4. ナノマテリアルの発がん性----- | 16 |
| 市瀬 孝道 | |
| 5. ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究----- | 17 |
| 増田 修一 | |
| III. 研究成果の刊行に関する一覧表----- | 20 |
| IV. 研究成果の刊行物・別刷----- | 23 |

総括研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

主任研究者 戸塚 ゆ加里 国立がんセンター研究所 室長

研究要旨 化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている種々のナノマテリアル（フラーレン、カオリン、カーボンブラック、酸化チタン、マグネタイト等）および将来的に商業用品等への応用が期待されるナノマテリアル（カーボンナノチューブ）の遺伝毒性や発がん性について *in vitro* 及び *in vivo* 実験系を用いて検討した。前立腺癌細胞株 DU-145, 前立腺正常上皮細胞株 RWPE-1 に、ナノ粒子を曝露させ、生存細胞数を測定したところ、マグネタイト処理群においてのみ、濃度依存的に生細胞数が有意差を持って減少した。また、形態的变化を観察した結果、マグネタイトの濃度依存的に、細胞の萎縮、核の異型および細胞数の減少が認められた。一方、hOGG1 遺伝子の発現について調べたところ、DU-145 ではナノ粒子曝露群すべてにおいて、hOGG1 遺伝子の発現が抑制された。RWPE-1 では、酸化チタン、カーボンブラック曝露において hOGG1 遺伝子の発現亢進が認められた。更に、マグネタイトおよび酸化チタンで処理した培養細胞における DNA の酸化傷害を測定した結果、ナノマテリアルの用量依存的にそのレベルが上昇することがわかった。また、ナノマテリアルを気管内投与したマウス血清中の 8-OH-Gua レベルは、フラーレン、カオリンの投与では、変化がみられなかったが、青石綿の投与群において、血清中 8-OH-Gua の有意な増加がみられた。一方、マウス肺組織 DNA 中の 8-OH-dG 量は、青石綿とマグネタイト投与群で有意な増加がみられた。ICR マウスに青石綿、カーボンナノチューブ、フラーレンを気管内投与し、それらナノマテリアルの肺細胞の DNA に対する損傷性をコメットアッセイで検定した。いずれのナノマテリアルも用量依存的に tail moment 値の上昇がみられた。特に、青石綿においては、0.2 mg/mouse の投与濃度で 両肺で tail moment 値が 4.0 と強い DNA 損傷性を示した。一方、カーボンナノチューブとフラーレンにおいては両肺の tail moment 値が約 2.5 と、青石綿に比べると若干低い値を示したが、有意な DNA 損傷性を示した。化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、カーボンブラック、フラーレン及びカオリンの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、カオリン投与群では、gpt および Spi- の変異頻度ともにコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。フラーレン反復投与では、両肺の gpt 変異頻度はコントロールに比べて優位に上昇したが、Spi- 遺伝子の変異の上昇は認められなかった。一方、CB の反復投与では、gpt および Spi- 遺伝子変異がわずかに上昇したが、統計学的に有意ではなかった。また、変異スペクトラム解析の結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。ICR 系雄マウスを 1 群 50 匹として、カオリン、フラーレン、カーボンブラックの 3 種類の粒子を、1 回の投与量を 0.1 mg と 0.3 mg とし、2 週間間隔で 5 回を気管内投与し、投与を開始してから 15 ヶ月目にマウスを屠殺する予定である。

分担研究者

| | |
|-------|-------------------------------|
| 渡辺 昌俊 | 横浜国立大学大学院 工学研究院医工学 教授 |
| 葛西 宏 | 産業医科大学 職業性腫瘍学 教授 |
| 増田 修一 | 静岡県立大学 食品栄養科学部 助教 |
| 戸塚ゆかり | 国立がんセンター研究所 がん予防基礎研究プロジェクト |
| 市瀬 孝道 | 大分看護大学 看護学部 教授 |

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等にナノマテリアルが多用されている。それに伴い、私たちはこれらの微粒子に直接的または間接的に曝露する機会が多くなってきている。これら微粒子の粒径は非常に小さいことから、細胞内へ容易に取り込まれ、長期にわたってそこに留まり、慢性的なストレスを与える可能性がある。また、これら微粒子はその粒子径やコーティング、化学修飾等により大きく性質が変化することも知られている。同じナノマテリアルであるアスベストはヒトに中皮腫及び肺がんを誘発することが指摘されており、社会的に大きな問題となっている。一方、チタン、珪素、炭素などの他のナノマテリアルのヒト健康への影響については知見が乏しく、特に遺伝毒性および発がん性に関しては緊急に明らかにする必要がある。本研究では、化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている種々のナノマテリアル(フラーレン、カオリン、カーボンブラック、酸化チタン、マグネタイト等)および将来的に商業用品等への応用が期待されるナノマテリアル(カーボンナノチューブ)の遺伝毒性や発がん性について *in vitro* 及び *in vivo* 実験系を用いて検討する。すなわち、培養細胞を用いた細胞毒性および形態学的な変化の観察、8-OH-dG をマーカーとした酸化ストレス生成、野生型およびトランスジェニック (*gpt delta*) マウスを用いた DNA 損傷や変異の検出等を行う。更に、これらナノマテリアルの長期発がん実験に関しても検討を行なう。また、既に有害性が報告されているアスベスト(青石綿)の遺伝毒性、発がん性も上記手法で検討を行い、本研究で検討するナノマテリアルが誘発する遺伝毒性、発がん性と比較し、その共通性と差異について調査する。本研究を遂行することにより得られる基礎的研究資料はナノマテリアル製品への曝露による有害性、更に遺伝毒性の評価に利用可能な手法の開発に極めて有用なものになると考えられる。

B. 研究方法

研究目的に基づき、本年度は、以下の5項目に関して研究を行った。

①ナノマテリアルにより誘発される細胞毒性

および形態学的な変化の観察:

前立腺癌細胞株 DU-145, 前立腺正常上皮細胞株 RWPE-1 を播種 24 時間後, ナノ粒子(酸化チタン, フラーレン, カーボンブラック, マグネタイト)を 24, 48, 72 時間曝露させ, Alamar Blue Assay にて生存細胞数を測定した。各測定点で, セルブロックを作成し, HE 標本を作製し観察した。さらに, 酸化ストレスを受けることにより生じた DNA 傷害(8-OHdG など)を修復することが知られている酸化ストレス修復酵素 *hOGG1* 遺伝子の発現を Real-time PCR により解析した。

②ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスの解析:

培養細胞や実験動物組織由来のゲノム DNA 中 8-OH-dG 量の分析は, DNA エキストラクター WB キット(和光純薬)を用いて DNA を抽出。Nuclease P1 と alkaline phosphatase によりヌクレオシドに分解した後, ECD 検出器を備えた HPLC により行った。一方, マウス血清中に遊離される 8-OH-dG 量の分析は, プロテイナーズ K で処理後, 遠心した上清を試料とし, HPLC-ECD 自動分析装置により 8-OH-Gua を測定した。

③ナノマテリアルにより誘発される *in vivo* DNA 損傷に関する研究:

フラーレン, カーボンナノチューブ, 青石綿の各ナノマテリアルを 0.05% Tween 80 を含む生理食塩水に懸濁し, 0.05, 0.2 mg/mouse となるように ICR マウス(9 週齢, ♂)の気管内に投与した。投与 3 時間後に両肺を摘出し, 30 mM EDTA-0.9%KCl 溶液を加えてホモジナイズし, 細胞浮遊液を得た後, コメットアッセイを行った。1 スライドにつき 50 個の細胞の Tail moment を画像解析ソフト(comet analyzer)を用いて求めた。

④ナノマテリアルにより誘発される変異原性および変異スペクトラムの解析:

10 週齢の雄性 *gpt delta* マウスに, 被検物質(カオリン, フラーレン及びカーボンブラック)を 0.05% Tween 80 を含む生理食塩水に懸濁し, 0.2 mg/body の用量で気管内反復投与を行った。最終投与 2 ヶ月後にマウスを屠殺し, 肺を摘出し左右に分けた。3 匹は病理組織学的な診断に, 6-9 匹を突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子変異の解析は, 肺を左右に分けてゲノム DNA を抽出して行った。更に, 左肺における *Spi* 変異の解析も併せて行った。

⑤ナノマテリアルの発がん性の検討:

ICR 系雄マウスを 1 群 50 匹として, カオリン, フラーレン, カーボンブラックの 3 種類の粒子を, 1 回の投与量を 0.1 mg と 0.3 mg とし

て、2週間間隔で5回（総投与量としてマウス当り0.5mgと1.5mg量）を気管内投与した。投与を開始してから15ヶ月目にマウスを屠殺する予定である。

C. 研究結果

①ナノマテリアルにより誘発される細胞毒性および形態学的な変化の観察：

Alamar Blue Assayによる生存細胞数の測定結果、酸化チタン、フラーレン、カーボンブラックはいずれも曝露後日数において、極端に生細胞数が減少することはなく、増加を認めた。曝露濃度が上昇する事により減少傾向を認めしたが、有意差は認めなかった。前立腺癌細胞と正常上皮細胞との間に増殖変化に差は認められなかった。マグネタイトに関しては、濃度依存的に生細胞数が有意差を持って減少した。曝露細胞のセルブロックを作製し、HE標本を作製、形態学的変化を観察した結果、マグネタイトの濃度依存的に、細胞の萎縮、核の異型および細胞数の減少が認められた。一方、*hOGGI* 遺伝子の発現について、DU-145ではナノ粒子曝露群すべてにおいて、*hOGGI* 遺伝子の発現が抑制された。RWPE-1では、二酸化チタン、カーボンブラック曝露において *hOGGI* 遺伝子の発現亢進が認められた。

②ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスの解析：

前立腺癌細胞株 DU-145, 前立腺正常上皮細胞株 RWPE-1 に各種ナノ粒子（酸化チタン、フラーレン、カーボンブラック、マグネタイト）を曝露させ、DNA 酸化ストレスマーカーである 8-OH-dG レベルの測定を行った。その結果、酸化チタンおよびマグネタイト処理3日後に、8-OH-dG レベルが濃度依存的に増加した。特に、マグネタイトは強い酸化ストレス誘導作用を示した。一方、青石綿、フラーレン、カオリンの気管内投与後3ヶ月のマウス血清中 8-OH-Gua レベルは、青石綿投与群のみで有意に高い 8-OH-Gua レベルを示した。また、マウス肺組織 DNA 中の 8-OH-dG 量は、青石綿とマグネタイト投与群で有意な増加がみられた。

③ナノマテリアルにより誘発される *in vivo* DNA 損傷に関する研究：

ICR マウスに青石綿、カーボンナノチューブ、フラーレンを気管内投与し、それらナノマテリアルの肺細胞の DNA に対する損傷性をコメットアッセイで検定した。いずれのナノマテリアルも用量依存的に tail moment 値の上昇がみられた。特に、青石綿においては、0.2 mg/mouse の投与濃度で両肺で tail moment 値が 4.0 と強い DNA 損傷性を示した。一方、カーボンナノチューブとフラーレンにおいては両肺の tail moment 値が約 2.5 と、青石綿に比べると若干低い値を示したが、有意な DNA 損傷性を示した。

また、左右の肺間での DNA 損傷性の違いは、いずれのナノマテリアルの投与においても認められなかった。

④ナノマテリアルにより誘発される変異原性および変異スペクトラムの解析：

カオリン、フラーレン及びカーボンブラックを反復気管内投与し、投与後2ヶ月における肺の病理組織学的な診断を行ったところ、コントロール群に比べ、いずれのナノ粒子を投与した群においても、ナノ粒子を貪食したマクロファージの散見、及び肉芽組織の発現が認められた。カオリン、フラーレン、カーボンブラックの反復投与における左肺の *gpt* 変異頻度は、いずれもコントロール群と比べ上昇し、これらのうち、カオリン、フラーレン投与群ではコントロール群と比較して有意に変異頻度が上昇する事がわかった。一方、右肺においては、カオリン及びフラーレン反復投与群でコントロール群に比べて顕著に変異頻度が上昇した。また、左肺における *Spi* 変異を解析した所、カオリンおよびカーボンブラック投与群で *Spi* 変異頻度の上昇が認められたが、フラーレン投与群ではコントロール群とほぼ同程度の変異頻度であることがわかった。次に、左肺での変異スペクトラムを解析した結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。また、一部の微粒子投与群に A:T→T:A, G:C→A:T の増加も観察された。

⑤ナノマテリアルの発がん性の検討：

ナノ素材（粒子）の主に肺における発がん性を明らかにする目的で、本年度は発がん実験に用いるマウスの系統及び各種ナノマテリアルとその投与量を決定し、マウスの経気道への繰り返し投与による長期発がん実験を開始した。本実験に用いるマウスは自然肺腫瘍発生率がそれほど高くない ICR マウスとした。ナノマテリアルはカオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類とし、1回の投与量をマウス当り 0.1 mg と 0.3 mg とし、2週間間隔で5回、総投与量としてマウス当り 0.5mg と 1.5mg 量を気管内投与した。すでに気管内投与を終了し、現在、長期飼育を継続中であるが、途中死亡のマウスや健康不良のマウスを中途屠殺して肺、その他の臓器・器官の病理標本を作成して病理観察を行なっている。

D. 考察

①ナノマテリアルにより誘発される細胞毒性および形態学的な変化の観察：

これまでのバルク材や大きな粒子と異なり、ナノ粒子の細胞への透過能力の高さは、そのサイズ特異性のためと報告されている。*In vitro* における研究では、ナノサイズ、マイクロサイズのコバルト・クロム合金粒子をヒト繊維芽細胞に曝露した際、ナノサイズ粒子が DNA 損傷を多くおこすと報告されている。本研究では、マグネタイト以外、酸化チタン、フラーレン、カーボンブラック曝露では、細胞増殖に有意な影

響を与えなかった。しかし、*hOGGI* 遺伝子の発現については、DU-145 細胞では抑制、RWPE-1 細胞では酸化チタン、カーボンブラック曝露においては発現亢進と遺伝子レベルでの変化が誘導されている。短期曝露の結果であるので、これが長期的曝露ではどのような影響を与えるのか注意が必要である。遺伝子レベルの変化や形態より、酸化ストレスの可能性が予測されるが、8-OHdG 測定あるいは他の酸化ストレスに関わる遺伝子群の発現など総合的に判断する必要がある。

② ナノマテリアルにより誘発される酸化ストレスの解析：

マグネタイトおよび酸化チタンで処理した培養細胞において、ナノマテリアルの用量依存的に DNA に酸化傷害をもたらすことがわかった。また、マウス血清中の 8-OH-Gua レベルは、今回試験したフラーレン、カオリンの投与では、変化がみられなかったが、青石綿のマウス気管内投与で、血清中 8-OH-Gua の有意な増加がみられた。また、マウス肺組織 DNA 中の 8-OH-dG 量は、青石綿とマグネタイト投与群で有意な増加がみられた。これらの指標は、ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関与する生体内酸化ストレス誘導を評価するマーカーとして有用と考えられる。更に、他のナノマテリアル素材についても検討が必要であろう。

③ ナノマテリアルにより誘発される *in vivo* DNA 損傷に関する研究：

ナノ物質の DNA 損傷性の原因として考えられるものに活性酸素種の生成が考えられる。本研究では、DNA 鎖切断をコメットアッセイにより検出したが、活性酸素種による DNA 損傷が示唆されたため、今後は気管内投与時における肺細胞 DNA への損傷が活性酸素種によるものであるか否かを明らかにするため、FPG プロテイン処理を取り入れたコメットアッセイや、活性酸素種により形成される DNA 付加体の検出を行う必要がある。

④ ナノマテリアルにより誘発される変異原性および変異スペクトラムの解析：

gpt 変異の解析の結果、カオリン投与群及びフラーレン投与群ではコントロール群と比べ顕著に変異頻度が上昇することが分った。CB 投与群ではコントロール投与群に比べ、わずかに上昇したが、統計学的には有意ではなかった。変異スペクトルの解析では、カオリン及び CB では G:C→A:T、フラーレン及び CB では A:T→T:A の変異スペクトルが上昇していた。さらにカオリン、フラーレン及び CB の全ての投与群において G:C→C:G が共通してコントロール群よりも上昇していることが分った。カオリン

の構成成分は主に珪酸アルミニウム、フラーレン及び CB は炭素元素と構成成分が異なるにも関わらず、共通の変異スペクトルが上昇していることから、これら 3 種の微粒子に共通の DNA 傷害がこれらの変異を誘発していることが示唆された。

また、G:C→C:G の変異は、自然突然変異及び変異原・がん原物質により誘発される変異の中でも非常に稀であることが知られている。最近、この G:C→C:G の変異の誘発には 8-OH-dG のさらなる酸化によって生成するスピロイミノヒダントインやグアニジノヒダントインといった DNA 付加体が関与することが報告されている。このことから、本実験で用いた微粒子が *gpt delta* マウスの肺の中でこれらの酸化的損傷を DNA に起こし、G:C→C:G の変異を誘発しているのではないかと推測した。また、カオリン投与群では、*gpt* 変異に加え、*Spi* の変異頻度もコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。このことから、カオリンの気管内投与により点突然変異だけではなく欠失に係るような DNA 損傷が形成されていることが示唆された。

⑤ ナノマテリアルの発がん性の検討：

現在、フラーレン、カーボンブラックおよびカオリンの気管内投与を終了し、長期飼育を継続中である。投与を開始してから 15 ヶ月目にマウスを屠殺する予定であるが、途中死亡のマウスや健康不良のマウスを中途屠殺して肺、その他の臓器・器官の病理標本を作成して病理観察を行っている。

E. 結論

前立腺細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について細胞増殖能、形態および酸化ストレスの修復機構に関与する遺伝子発現について検討した。マグネタイト以外は短期曝露において、増殖能に関して影響を及ぼさなかったが、遺伝子レベルでは影響を与えていることを確認した。酸化ストレスを含めた細胞への影響を与えるメカニズム、長期曝露の影響などの必要性が明らかになった。

マグネタイトおよび酸化チタンを培養細胞に作用させた場合に、添加量に依存して細胞 DNA 中の 8-OH-dG の増加がみられた。また、マグネタイトのマウス気管内投与により、肺組織 DNA 中の 8-OH-dG が有意に上昇した。コントロール群及び多層カーボンナノチューブ、フラーレンでは有意な上昇はみられなかった。ナノマテリアルの中に、酸化的 DNA 傷害をもたらす素材が見つかったことから、発がん予防を目指して、遺伝毒性及び発がん性への関与を解明する必要がある。

化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、カーボンブラック、フラーレン及びカオリンの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、カオリン投与群では、*gpt* および *Spi* の変異頻度ともにコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。フラーレン反復投与では、両肺の *gpt* 変異頻度はコントロールに比べて優位に上昇したが、*Spi* の変異の上昇は認められなかった。一方、カーボンブラックの反復投与では、*gpt* および *Spi* 遺伝子変異がわずかに上昇したが、統計学的に有意ではなかった。また、変異スペクトラム解析の結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。これらのことから、今回用いた3種の微粒子は実験動物に対して変異原性を誘発する事が分かった。また、微粒子の構成成分に係らず、共通の DNA 損傷が誘発されていることが示唆された。

ナノマテリアルの肺組織細胞における DNA 損傷性を検討したところ、DNA 損傷性を示した。したがって、ヒトがこれらナノマテリアルに気管内暴露された場合、DNA 損傷が誘導され、最終的には発がんへと進展することが示唆された。今後は、DNA 損傷メカニズムの解明や暴露方法の検討、生体内における代謝や他臓器への影響を検討することが必要である。

ICR 系雄マウスにカオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類の粒子の 0.1 mg と 0.3 mg を2週間間隔で5回気管内投与して、15ヶ月後に肺の腫瘍発生率を調べた。投与を開始してから15ヶ月目にマウスを屠殺する予定である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katoh T, Yamano Y, Tsuji M, Watanabe M. Genetic polymorphisms of human cytosol glutathione S-transferases and prostate cancer. *Pharmacogenomics*. 9: 93-104, 2008.
2. Fukuta K, Kohri K, Fukuda H, Watanabe M, Sugimura T, Nakagama H. Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci*. 99: 1055-1062, 2008.
3. Onsory K, Sobti R.C, Al-Badran A.I, Watanabe M, Shiraishi T, Krishan A, Mohan H, Kaur P. Hormone receptor-related gene polymorphisms and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Cell Biochem*. 314: 25-35,

2008.

4. Watanabe M, Hirokawa Y, Tsuji M, Yanagawa, M, Murata T, Suzuki H, Ichikawa T, Katoh T, Sugimura Y, Shiraishi T. Lack of involvement of the *GNAS1* T393C polymorphism in prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res*. 28: 3711-3716, 2008.
5. 竹澤俊明, 竹内朋代, 落谷孝広, 柳原佳奈, 寺田聡, 鈴木尚真, 渡邊昌俊. 組織病理学用の切片を動物細胞の培養担体に利用した先端研究. *Organ Biology*. 15: 107-114, 2008.
6. Miyata M, Kasai H, Kawai K, Yamada N, Tokudome M, Ichikawa H, Goto C, Tokudome Y, Kuriki K, Hoshino H, Shibata K, Suzuki S, Kobayashi M, Goto H, Ikeda M, Otsuka T, Tokudome S. Changes of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels during a two-day ultramarathon race period in Japanese non-professional runners. *Int J Sports Med.*, 29: 27-33, 2008.
7. Nakashima T, Okada T, Asahi J, Yamashita A, Kawai K, Kasai H, Matsuno K, Gamou S, Hirano T. 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat Res.*, 654: 138-144, 2008.
8. Ikehata H, Kawai K, Komura JI, Sakatsume K, Wang L, Imai M, Higashi S, Nikaido O, Yamamoto K, Hieda K, Watanabe M, Kasai H, Ono T. UVA1 Genotoxicity Is Mediated Not by Oxidative Damage but by Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Normal Mouse Skin., *J Invest Dermatol.*, 128: 2289-2296, 2008.
9. Svoboda P, Ko SH, Cho B, Yoo SH, Choi SW, Ye SK, Kasai H, Chung MH. Neopterin, a marker of immune response, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress, correlate at high age as determined by automated simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of human urine. *Anal Biochem*. 383: 236-242, 2008.
10. Ishihara I, Nakano M, Ikushima M, Hara Y, Yoshimine T, Haraga M, Nakatani J, Kawamoto R, Kasai H. Effect of work conditions and work environments on the formation of 8-OH-dG in nurses and non-nurse female workers. *J UOEH*. 30: 293-308, 2008.
11. Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Shimamori A, Kasai H, Ohta H. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine

- (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health.* 50: 366-372, 2008.
12. Satou K, Hori M, Kawai K, Kasai H, Harashima H, Kamiya H. Involvement of specialized DNA polymerases in mutagenesis by 8-hydroxy-dGTP in human cells. *DNA Repair (Amst)*. 2009 Jan 27. [Epub ahead of print]
 13. Tamae K, Kawai K, Yamasaki S, Kawanami K, Ikeda M, Takahashi K, Miyamoto T, Kato N, Kasai H. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. *Cancer sci.*, published online: Feb 2, 2009.
 14. Oya-Ito T, Naitou H, Masuda S, Kinai N, Ohashi N. Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition. *Molecular Nutrition and Food Research.* 52: 360-369, 2008.
 15. Toyozumi T, Deguchi Y, Masuda S, Kinai N. Genotoxicity and estrogenic activity of 3,3'-dinitro-bisphenol A in goldfish. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 72: 2118-2123, 2008.
 16. Kinai N, Oguni I, Takabayashi F, Masuda S. Effect of tea extracts on gastric mucosal erosion and hemorrhage in *Helicobacter pylori* infected Mongolian Gerbils. *J. Clin. Biochem. Nutri.* 43: 22-23, 2008.
 17. Hirata A, Tsukamoto T, Sakai H, Takasu S, Ban H, Imai T, Totsuka Y, Nishigaki R, Wakabayashi K, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M. Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - Assessment with a liver initiation model. *Food Chem Toxicol.*, 46: 2003-2009, 2008.
 18. Deguchi Y, Wu NX, Toyozumi T, Masuda S, Nagaoka H, Watanabe T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Kinai N. Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. *Environ Toxicol.*, 23:720-727, 2008.
 19. Murai T, Mori S, Kang JS, Morimura K, Wanibuchi H, Totsuka Y, Fukushima S. Evidence of a Threshold-Effect for 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quinoxaline Liver Carcinogenicity in F344/DuCrj Rats. *Toxicol Pathol.* 36: 472-477, 2008.
 20. Terasaki M, Totsuka Y, Nishimura K, Mukaisho KI, Chen KH, Hattori T, Takamura-Enya T, Sugimura T, Wakabayashi K. Detection of endogenous DNA adducts, O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. *Cancer Sci.* 99: 1741-1746, 2008.
 21. Amanuma K, Tone S, Nagaya M, Matsumoto M, Watanabe T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Aoki Y. Mutagenicity of 2-[2-(acetyl-amino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rpsL transgenic zebrafish. *Mutat Res.*, 656: 36-43, 2008.
2. 学会発表
 1. 鈴木尚真, 竹内朋代, 寺谷工, 落谷孝広, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. 再生肝由来の切片担体を利用して幹細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術. 第15回肝細胞研究会 2008.
 2. Takezawa T, Takeuchi T, Suzuki N, Teratani T, Ochiya T, Watanabe M. A novel strategy to extrapolate toxicity *in vivo*: A cell culture system utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata derived from animals after drug administration. 15th International Congress on In Vitro Toxicology 2008.
 3. 鈴木尚真, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. 動物組織片の切片担体を利用した培養モデルの可能性. 第67回日本癌学会学術総会 2008.
 4. 上大介, 広川佳史, 米田操, 高木陽光, 森田城次, 白石泰三, 渡邊昌俊. 抗癌剤感受性試験モデルとしての前立腺癌スフェロイド. 第67回日本癌学会学術総会 2008.
 5. 葛西宏. 酸化ストレスマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析. 第8回日本NO学会学術集会 2008.
 6. 葛西宏. バイオマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析. がん予防大会2008福岡 2008.
 7. 葛西宏. 酸化ストレスマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析. 第61回日本酸化ストレス学会学術集会 2008.
 8. Kawai K, Chou P-H, Matsuda T, Matsui S, Kasai H. 4-Oxo-2-hexenal-dA adduct formation in DNA in vitro and in mouse organs. 第67回癌学会学術総会 2008.
 9. 河井一明, 周佩欣, 井上政昭, 松田知成, 葛西宏. ヒト肺組織中4-OHE-DNA付加体の検出. 日本環境変異原学会 第37回大会 2008.
 10. Li Y, Song M, Ootsuyama Y, Kawai K, Kasai H, Matsumoto Y, Yoshida R, Ogawa Y. Urea Generates a Positive

- Reaction in the 8-OHdG Analysis by ELISA Method. 日本環境変異原学会 第37回大会 2008.
11. 川口恵未, 佐々木有, 増田修二, 木苗直秀. 動物腸内菌の代謝によるアゾ色素成分による in vivo 突然変異誘発性の検討. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 12. 小山直己, 木村葵, 安井学, 高見成昭, 高橋美和, 今井俊夫, 山本歩, 汲田和歌子, 増村健一, 増田修二, 木苗直秀, 松田知成, 能美健彦, 本間正充. ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 13. 豊泉友康, 関口博太, 高林ふみ代, 出口雄也, 増田修二, 太田亮, 木苗直秀. イソフラボン類と亜硝酸塩の同時投与によるマウス胃粘膜におけるDNA損傷性の評価. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 14. 加藤竜也, 増田修二, 渡辺徹志, 戸塚ゆかり, 若林敬二, 木苗直秀. 静岡県内における居住地域及び工業地域の表層土壌抽出物の変異原性と変異原物質の検索. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 15. 平野元美, 増田修二, 小山直己, 木苗直秀, 関本征史. 糖尿病発症時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 16. 田里李奈, 平野元美, 加藤竜也, 増田修二, 木苗直秀. 糖尿病誘発ラットにおけるニトロソアミンの生成と毒性変動に関する基礎的研究. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 17. 益森勝志, 鈴木健一郎, 中嶋圓, 水橋福太郎, 田中仁, 古屋有佳子, 上田摩弥, 岩倉佳奈子, 増田修二, 木苗直秀, 林 真. コメットアッセイおよび小核試験の同時実施に関する検討. 日本環境変異原学会第37回大会 2008.
 18. Kinae N, Hirano M, Urahira T, Masuda S. Formation of Genotoxic Compounds under Physiological Conditions and their Relationship to Diabetic mellitus. The Eighth China-Japan International Symposium on Health Sciences, 2008.
 19. 増田修二. ナノ物質の遺伝毒性、第27回生命科学若手フォーラム特別セミナー、静岡市 2008.
 20. 増田修二, 木苗直秀, 桑野稔子, 井上弘子, 渡辺徹志, 永井竜児, 菊池洋, 良知昭吾. 糖尿病発症時における変異・発がん物質の生成及び遺伝毒性の変動. 2007 US フォーラム、静岡市 2008.
 21. 井上広子, 桑野稔子, 木苗直秀, 合田敏尚, 鈴木裕一, 増田修二. 女子大学生の身体状況および食習慣と血液パラメーターとの関連. 2007 US フォーラム、静岡市 2008.
 22. 伊藤創平, 丹羽康夫, 杉本収, 増田修二. テルペン合成酵素の基質特異性の改変. 2007 US フォーラム、静岡市 2008.
 23. 熊澤茂則, 増田修二, 木苗直秀. プロポリスおよびハチミツに含まれるポリフェノール成分の分析と抗酸化活性. 2007 US フォーラム、静岡市 2008.
 24. 大島寛史, 三好規之, 合田敏尚, 望月和樹, 木苗直秀, 増田修二. オゾン酸化コレステロール atheronal-A, -B の生成分子機構の解析とタンパク質付加反応の検討. 2007 US フォーラム、静岡市 2008.
 25. 木苗直秀, 出口雄也, 増田修二. Biomonitoring of aquatic environment by genotoxicity tests using goldfish. 第4回国際海洋生物学シンポジウム 2008.
 26. Totsuka Y, Ichinose T, Hiyoshi K, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo mutation assay systems. International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008)
 27. Totsuka Y, Ichinose T, Hiyoshi K, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo mutation assay systems. EEMS 2008.
 28. Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo assay systems. 第37回 日本環境変異原学会 2008.
- H. 知的財産権の出願・登録状況
(予定を含む.)
1. 特許取得
該当しない
 2. 実用新案登録
該当しない
 3. その他

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

（分担）研究者 戸塚 ゆ加里 国立がんセンター研究所 室長

研究要旨 化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、カーボンブラック(CB)、フラーレン及びカオリンの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、カオリン投与群では、*gpt* および *Spi* の変異頻度ともにコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。フラーレン反復投与では、両肺の *gpt* 変異頻度はコントロールに比べて優位に上昇したが、*Spi* 遺伝子の変異の上昇は認められなかった。一方、CBの反復投与では、*gpt* および *Spi* 遺伝子変異がわずかに上昇したが、統計学的に有意ではなかった。また、変異スペクトラム解析の結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。

A. 研究目的

近年、化粧品や医薬品、各種商業用品等にナノマテリアルを含む微粒子が多用されている。それに伴い、私たちはこれらの微粒子に直接的または間接的に曝露する機会が多くなってきている。これら微粒子の粒径は非常に小さいことから、細胞内へ容易に取り込まれると考えられている。しかしながら、これら微粒子のヒトに対する安全性については未だによくわかっていない。本研究では、化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、カーボンブラック(CB)、フラーレン及びカオリンの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。

B. 研究方法

10週齢の雄性 *gpt delta* マウスに、被検物質（カオリン、フラーレン及びCB）を0.05% Tween 80を含む生理食塩水に懸濁し、0.2 mg/bodyの用量で気管内反復投与を行った。最終投与2ヶ月後にマウスを屠殺し、肺を摘出し左右に分けた。3匹は病理組織学的な診断に、6-9匹は突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子変異の解析は、肺を左右に分けてゲノムDNAを抽出して行った。更に、左肺における *Spi* 変異の解析も併せて行った。

C. 研究結果

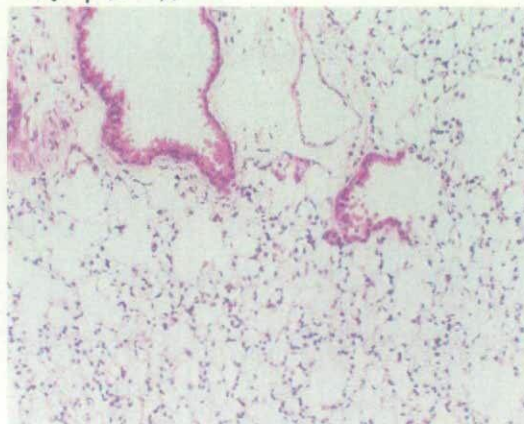
カオリン、フラーレン及びCBを反復気管内投与したときの肺組織のHE染色写真を図1に示す。コントロール群に比べ、いずれのナノ粒子を投与した群においても、ナノ粒子を貪食したマクロファージの散見、及び肉芽組織の発現が認められた。カオリン、フラーレン及びCBを投与したマウスの左右肺における *gpt* の変異頻度を図2に示す。カオリン、フラーレン、CBの反復投与における左肺の変異頻度は、いずれもコントロール群と比べ上昇し、これらのうち、カオリン、フラーレン投与群ではコントロール群に比較して有意に変異頻度が上昇する事がわかった。一方、右肺においては、カオリン及びフラーレン反復投与群でコントロール群に比べて顕著に変異頻度が上昇した。また、左肺における *Spi* 変異を解析した

所、カオリンおよびCB投与群で *Spi* 変異頻度の上昇が認められたが、フラーレン投与群ではコントロール群とほぼ同程度の変異頻度であることがわかった（図3）。

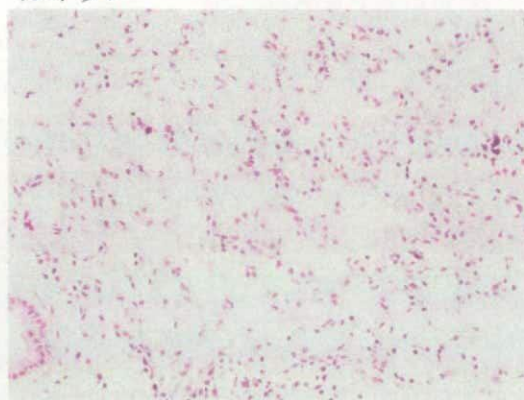
次に、左肺での変異スペクトラムを解析した結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。また、一部の微粒子投与群に A:T→T:A、G:C→A:T の増加も観察された。

図1 微粒子の気管内投与により肺に誘発された病変

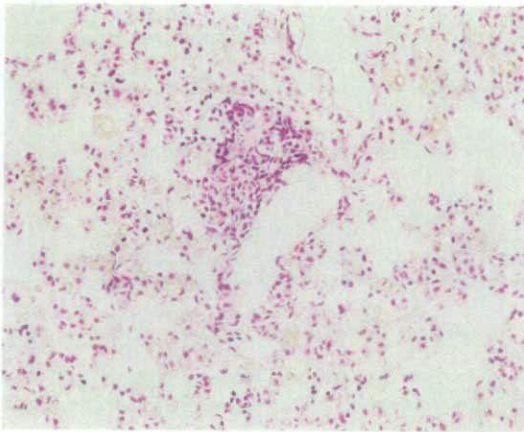
コントロール



カオリン



フラーレン



CB

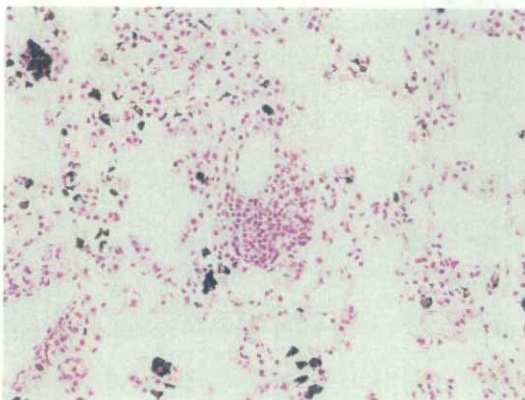


図2 *gpt* 遺伝子変異頻度

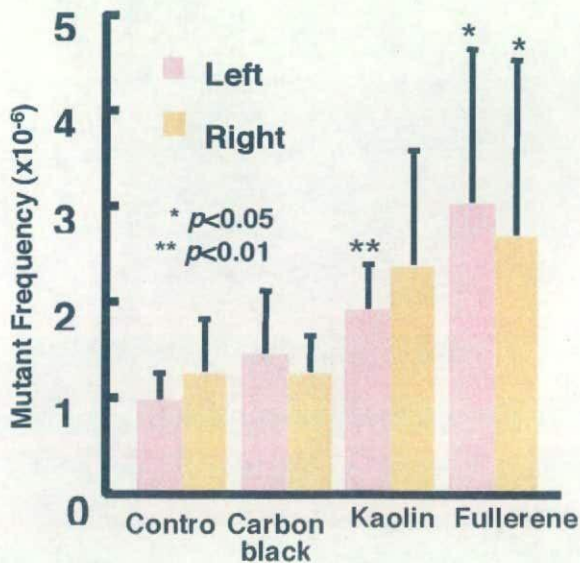
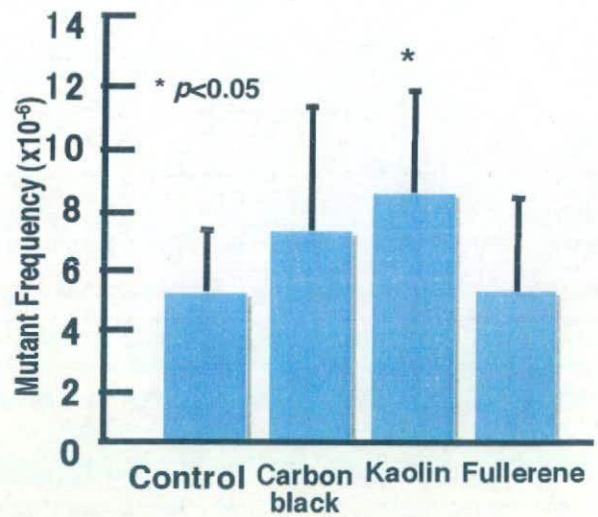


図3 左肺における *Spi* 変異頻度



D. 考察

gpt 変異の解析の結果、カオリン投与群及びフラーレン投与群ではコントロール群と比べ顕著に変異頻度が上昇することが分った。CB 投与群ではコントロール投与群に比べ、わずかに上昇したが、統計学的には有意ではなかった。

変異スペクトルの解析では、カオリン及びCBではG:C→A:T、フラーレン及びCBではA:T→T:Aの変異スペクトルが上昇していた。さらにカオリン、フラーレン及びCBの全ての投与群においてG:C→C:Gが共通してコントロール群よりも上昇していることが分った。カオリンの構成成分は主に珪酸アルミニウム、フラーレン及びCBは炭素元素と構成成分が異なるにも関わらず、共通の変異スペクトルが上昇していることから、これら3種の微粒子に共通のDNA傷害がこれらの変異を誘発していることが示唆された。

また、G:C→C:Gの変異は、自然突然変異及び変異原・がん原物質により誘発される変異の中でも非常に稀であることが知られている。最近、このG:C→C:Gの変異の誘発には8-OH-dGのさらなる酸化によって生成するスピロイミノヒダントインやグアニジノヒダントインといったDNA付加体に関与することが報告されている。このことから、本実験で用いた微粒子が*gpt delta*マウスの肺の中でこれらの酸化的損傷をDNAに起こし、G:C→C:Gの変異を誘発しているのではないかと推測した。また、カオリン投与群では、*gpt* 変異に加え、*Spi*の変異頻度もコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。このことから、

カオリンの気管内投与により点突然変異だけではなく欠失に係るような DNA 損傷が形成されていることが示唆された。

E. 結論

化粧品や商業用品等に頻繁に用いられている微粒子である、カーボンブラック、フラーレン及びカオリンの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、カオリン投与群では、*gpt* および *Spi* の変異頻度ともにコントロールと比較して顕著に上昇することがわかった。フラーレン反復投与では、両肺の *gpt* 変異頻度はコントロールに比べて優位に上昇したが、*Spi* の変異の上昇は認められなかった。一方、CB の反復投与では、*gpt* および *Spi* 遺伝子変異がわずかに上昇したが、統計学的に有意ではなかった。また、変異スペクトラム解析の結果、全ての微粒子投与群で G:C→C:G がコントロール群と比べて増加していた。これらのことから、今回用いた3種の微粒子は実験動物に対して変異原性を誘発する事が分かった。また、微粒子の構成成分に係らず、共通の DNA 損傷が誘発されていることが示唆された。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Hirata A, Tsukamoto T, Sakai H, Takasu S, Ban H, Imai T, Totsuka Y, Nishigaki R, Wakabayashi K, Yanai T, Masegi T, Tatematsu M. Carcinogenic risk of heterocyclic amines in combination - Assessment with a liver initiation model. Food Chem Toxicol., 46: 2003-2009, 2008.
2. Deguchi Y, Wu NX, Toyoizumi T, Masuda S, Nagaoka H, Watanabe T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Kinoshita N. Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity. Environ Toxicol., 23:720-727, 2008.
3. Murai T, Mori S, Kang JS, Morimura K, Wanibuchi H, Totsuka Y, Fukushima S. Evidence of a Threshold Effect for 2-Amino-3,8-dimethylimidazo-[4,5-f]quino-

xaline Liver Carcinogenicity in F344/DuCrj Rats. Toxicol Pathol. 36: 472-477, 2008.

4. Terasaki M, Totsuka Y, Nishimura K, Mukaisho KI, Chen KH, Hattori T, Takamura-Enya T, Sugimura T, Wakabayashi K. Detection of endogenous DNA adducts, O6-carboxymethyl-2'-deoxyguanosine and 3-ethanesulfonic acid-2'-deoxycytidine, in the rat stomach after duodenal reflux. Cancer Sci. 99: 1741-1746, 2008.
5. Amanuma K, Tone S, Nagaya M, Matsumoto M, Watanabe T, Totsuka Y, Wakabayashi K, Aoki Y. Mutagenicity of 2-[2-(acetylamino)-4-[bis(2-hydroxyethyl)amino]-5-methoxyphenyl]-5-amino-7-bromo-4-chloro-2H-benzotriazole (PBTA-6) and benzo[a]pyrene (BaP) in the gill and hepatopancreas of rpsL transgenic zebrafish. Mutat Res., 656: 36-43, 2008.

2. 学会発表

1. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo mutation assay systems Totsuka Y, Ichinose T, Hiyoshi K, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. International Symposium on "Nanotoxicology Assessment and Biomedical, Environmental Application of Fine Particles and Nanotubes" (ISNT2008)
2. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo mutation assay systems Totsuka Y, Ichinose T, Hiyoshi K, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. EEMS 2008.
3. Genotoxicity of nanoparticles in in vivo assay systems Totsuka Y, Kato T, Masuda S, Nohmi T, Sugimura T, Wakabayashi K. 第37回 日本環境変異原学会 2008

H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他

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

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究

分担研究者 葛西 宏 産業医科大学教授

研究要旨

本研究では、酸化了的 DNA 損傷のマーカとして、血清中 8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)、細胞 DNA 中 8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)に着目し、ナノマテリアルを処理したマウス血清および肺組織 DNA、ならびに培養細胞 DNA の測定を行った。測定は、電気化学検出器(ECD)を接続した高速液体クロマトグラフィーを用いた。その結果、フェライト(酸化鉄)のマウス気管内投与により、肺組織 DNA 中の 8-OH-dG が有意に上昇した。コントロール群及び多層カーボンナノチューブ、フラーレンでは有意な上昇はみられなかった。また、フェライトナノ粒子、酸化チタンを培養細胞に作用させた場合にも、添加量に依存して細胞 DNA 中の 8-OH-dG の増加がみられた。

A. 研究目的

ナノ粒子の健康影響に関する研究の中で、ナノ粒子曝露による酸化ストレスの発生が毒性発現機構に大きく関わっている可能性が考えられている。これまでに、環境中の繊維状物質アスベストの吸入により、肺に酸化ストレス、炎症、および癌が誘発されることが知られている。ナノ粒子も、その物理化学的性状から、アスベストと同様に吸入曝露による毒性発現が注目されている。発がん物質の多くが、細胞 DNA の損傷を引き起こし、それが原因で遺伝子変異を起こす。本研究では、酸化了的 DNA 損傷マーカー、8-ヒドロキシグアノシン(8-OH-dG)の測定により、ナノ粒子の遺伝毒性・発がん性の評価ならびに疾病予防に役立てる事を目的とする。ナノ粒子の吸入曝露部位では、直接作用あるいはマクロファージの食作用に伴う活性酸素の生成により、細胞 DNA が、酸化了的損傷を受ける可能性が示唆されている。酸化了的 DNA 損傷マーカーとして、代表的な 8-OH-dG および遊離塩基 8-ヒドロキシグアノシン(8-OH-Gua)を用いることにした。それぞれのナノ粒子に関し、酸化了的 DNA 損傷の関与を証明するためには、動物に投与後、臓器 DNA あるいは尿、血清中酸化ストレスマーカーの測定が重要と考えた。本年度は、ナノマテリアル気管内投与マウス血清中の 8-OH-Gua ならびに肺の DNA 中 8-OH-dG 量を測定した。また、ナノマテリアルによる酸化了的 DNA 損傷を調査する目的で、ナノマテリアル処理した培養細胞の DNA 中 8-OH-dG 量を測定した。

B. 研究方法

マウス血清は、プロテイナーゼ K で処理後、遠心した上清に内部標準物質としてアセチルグアニンを含む希釈液を加えたものを分析試料とし、自動分析装置で 8-OH-Gua を測定した。自動分析装置では、陰イオン交換クロマトグラフィーにより分離・精製した後、アセチルグアニンマーカーのピークの位置に基き 8-OH-Gua 分画を自動的に逆相カラムに導入し、電気化学検出器(ECD)により 8-OH-Gua を測定した。この自動分析法により、ほとんど夾雑物の混入は無く、極めて精度の高い分析が可能である。マウス肺組織および培養細胞の DNA 中 8-OH-dG 量の分析は、DNA 抽出操作中の酸化を防ぐ目的で、1 mM の Desferal を加えた DNA エキストラクター WB キット(和光純薬)を用いて DNA を抽出。Nuclease P1 と alkaline phosphatase によりヌクレオシドに分解した後、ECD 検出器を備えた HPLC により行った。

(倫理面への配慮)

すべての動物実験は、産業医科大学動物実験及び飼育倫理委員会規定ならびに産業医科大学動物研究センター実験指針に従って行った。

C. 研究結果

マウスに、繊維状物質である青石綿、またはナノ粒子状のフラーレン、カオリンを、一匹あたりそれぞれ 0.2 mg 気管内投与した後、3 時間後および 3 ヶ月後の血清中遊離 8-ヒドロキシグアニン(8-OH-Gua)の測定結果を、図 1 に示した。

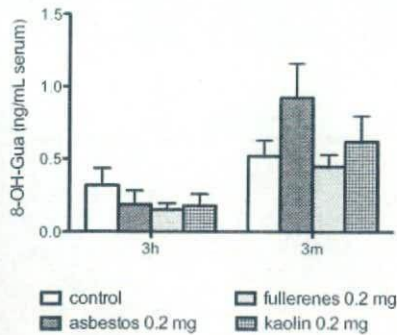


図1 マウス血清中8-OH-Guaレベル

投与3時間後では、血清中8-OH-Guaレベルに何れの物質による変化も認められなかった。投与3ヶ月後、青石綿投与群は、control群に比べて有意に高い8-OH-Guaレベルを示した。これに対し、ナノ粒子状物質のフラーレン並びにカオリンは、今回の実験条件では、血清中酸化ストレスマーカーの有意な増加を誘導しなかった。

また、マウスに青石綿、多層カーボンナノチューブ、フラーレン、フェライトを、一匹あたり0.05 mgあるいは0.2 mg 気管内投与し、3時間後の肺組織DNA中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)量を測定した結果を図2に示す。0.05 mg/mouse 投与群では、何れの物質も8-OH-dGレベルの増加を認めなかった。しかし、0.2 mg/mouse 投与群では、青石綿とフェライト投与群で、8-OH-dGレベルの有意な増加がみられた。多層カーボンナノチューブ、フラーレンは、今回の条件で酸化ストレス誘導作用を示さなかった。

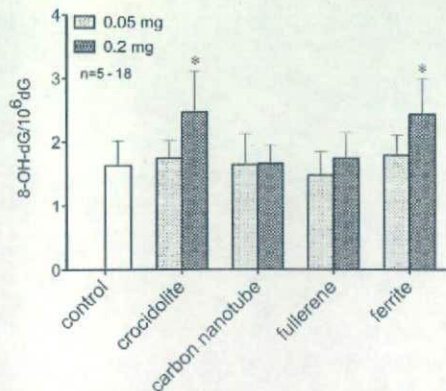


図2 マウス肺DNA中の8-OH-dGレベル

さらに、培養細胞を用いた実験において、用いた2種類の細胞DU 145、LNCaP何れにおいても、フェライトまたは酸化チタンのナノ粒子処理3日後にDNA酸化ストレスマーカー8-OH-dGの、処理濃度に依存した増加がみられた(図3)。特に、フェライトは強い酸化ストレス誘導作用を示した。

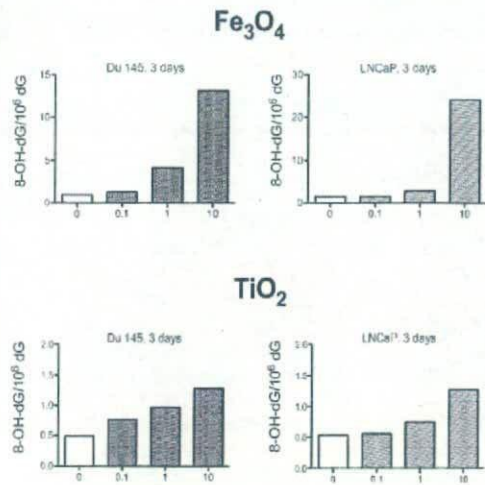


図3 培養細胞DNA中の8-OH-dGレベル

D. 考察

発がん性繊維状物質である青石綿のマウス気管内投与で、血清中8-OH-Gua及び肺組織DNA中の8-OH-dGの有意な増加がみられたことから、これらの指標は、ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する生体内酸化ストレス誘導を評価するマーカーとして有用と考えられる。マウス血清中の8-OH-Guaレベルは、今回試験したフラーレン、カオリンの投与では、変化がみられなかったが、他のナノマテリアル素材についても検討する価値があると考えられる。フラーレンについては、肺組織DNAの8-OH-dGレベルにも影響を与えなかったことから、気管内注入による酸化ストレス誘導作用は低いと思われる。フェライトは、肺組織DNAに対し青石綿と同じ投与量で、ほぼ同等の8-OH-dGを生成した。培養細胞に対しても、用量依存的にDNAに酸化傷害をもたらし、その作用もかなり強いと考えられることから、慎重な扱いが望まれる。酸化チタンも、培養細胞に対して酸化的DNA損傷を誘発したことから、in vivoの系を含めて、遺伝毒性及び発がん性に関する研究が必要と思われる。ナノマテリアルの中に、酸化的傷害をもたらす素材が見つかったことから、今後、遺伝毒性及び発がん性への関与を解明し、発がん予防に繋がるよう期待したい。

E. 結論

フェライト(酸化鉄)のマウス気管内投与により、肺組織DNA中の8-ヒドロキシデオキシグアノシン(8-OH-dG)が有意に上昇した。コントロール群及び多層カーボンナノチューブ、フラーレンでは有意な上昇はみられなかった。また、フェライトナノ粒子、酸化チタンを培養細胞に作用させた場合にも、添加量に依存して細胞DNA中の8-OH-dGの増加がみられた。ナノマテリアルの中に、酸化的DNA傷害を

もたらす素材が見つかったことから、発がん予防を目指して、遺伝毒性及遺伝毒性及び発がん性への関与を解明する必要がある。

G. 研究発表

1. 論文発表

Miyata M, Kasai H, Kawai K, Yamada N, Tokudome M, Ichikawa H, Goto C, Tokudome Y, Kuriki K, Hoshino H, Shibata K, Suzuki S, Kobayashi M, Goto H, Ikeda M, Otsuka T, Tokudome S., Changes of urinary 8-hydroxydeoxyguanosine levels during a two-day ultramarathon race period in Japanese non-professional runners. *Int J Sports Med.* 2008;29:27-33.

Nakashima T, Okada T, Asahi J, Yamashita A, Kawai K, Kasai H, Matsuno K, Gamou S, Hirano T., 8-Hydroxydeoxyguanosine generated in the earthworm *Eisenia fetida* grown in metal-containing soil. *Mutat Res.*, 654:138-144, 2008.

Ikehata H, Kawai K, Komura JI, Sakatsume K, Wang L, Imai M, Higashi S, Nikaido O, Yamamoto K, Hieda K, Watanabe M, Kasai H, Ono T., UVA1 Genotoxicity Is Mediated Not by Oxidative Damage but by Cyclobutane Pyrimidine Dimers in Normal Mouse Skin., *J Invest Dermatol.*, 128:2289-2296, 2008.

Svoboda P, Ko SH, Cho B, Yoo SH, Choi SW, Ye SK, Kasai H, Chung MH. Neopterin, a marker of immune response, and 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine, a marker of oxidative stress, correlate at high age as determined by automated simultaneous high-performance liquid chromatography analysis of human urine. *Anal Biochem.* 2008;383:236-42.

Ishihara I, Nakano M, Ikushima M, Hara Y, Yoshimine T, Haraga M, Nakatani J, Kawamoto R, Kasai H. Effect of work conditions and work environments on the formation of 8-OH-dG in nurses and non-nurse female workers. *J UOEH.* 2008;30:293-308.

Matsumoto Y, Ogawa Y, Yoshida R, Shimamori A, Kasai H, Ohta H. The stability of the oxidative stress marker, urinary 8-hydroxy-2'-deoxyguanosine (8-OHdG), when stored at room temperature. *J Occup Health.* 2008;50:366-72.

Satou K, Hori M, Kawai K, Kasai H, Harashima H, Kamiya H. Involvement of specialized DNA polymerases in mutagenesis by 8-hydroxy-dGTP in human cells. *DNA Repair (Amst).* 2009 Jan 27. [Epub ahead of print]

K. Tamae, K. Kawai, S. Yamasaki, K. Kawanami, M. Ikeda, K. Takahashi, T. Miyamoto, N. Kato, H. Kasai, Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine, *Cancer sci.*, published online: Feb 2, 2009

2. 学会発表

葛西 宏：酸化ストレスマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析；第8回日本NO学会学術集会（仙台）2008

葛西 宏：バイオマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析；がん予防大会2008福岡（福岡市）2008

葛西 宏：酸化ストレスマーカーとしての8-OH-dG及び遊離塩基8-OH-Guaの分析；第61回日本酸化ストレス学会学術集会（京都）2008

Kawai K, Chou P-H, Matsuda T, Matsui S, Kasai H: 4-Oxo-2-hexenal-dA adduct formation in DNA in vitro and in mouse organs. ; 第67回癌学会学術集会（名古屋）2008

河井 一明・周・井上 政昭・松田 知成・葛西 宏：ヒト肺組織中4-OHE-DNA付加体の検出；日本環境変異原学会 第37回大会（沖縄）2008

Li, Y.・Song, M.・Ootsuyama, Y.・Kawai, K.・Kasai H・Matsumoto, Y.・Yoshida, R.・Ogawa, Y. : Urea Generates a Positive Reaction in the 8-OHdG Analysis by ELISA Method ; 日本環境変異原学会 第37回大会（沖縄）2008

H. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む。）

1. 特許取得

2. 実用新案登録

3. その他

ナノ材料の遺伝毒性及び発がん性に関する研究

分担研究者 渡邊 昌俊 横浜国立大学

研究要旨 前立腺細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について細胞増殖能、形態および酸化ストレスの修復機構に関与する遺伝子発現について検討した。マグネタイト以外は短期曝露において、増殖能に関して影響を及ぼさなかったが、遺伝子レベルでは影響を与えていることを確認した。酸化ストレスを含めた細胞への影響を与えるメカニズム、長期曝露の影響、マグネタイトの再検討などの必要性が明らかになった。

A. 研究目的

本研究は、ナノ粒子の遺伝毒性・発がん性を探るために、*in vitro*系でのナノ粒子の影響を検討する。一方、一般的に使用されている単層培養系での結果をヒトへ外挿するのは難しく、新しい*in vitro*系の開発を目指す。

B. 研究方法

使用細胞株は、前立腺癌細胞株 DU-145, 前立腺正常上皮細胞株 RWPE-1 を使用。ナノ粒子は、二酸化チタン、フラーレン、カーボンブラック、マグネタイトを使用。ナノ粒子曝露後、24, 48, 72 時間に、Alamar Blue Assay にて生存細胞数を測定。HE 標本を作製・観察。酸化ストレス修復酵素 *hOGGI* 遺伝子の発現解析。新しい*in vitro*系の開発として、動物担体培養系およびスフェロイド培養系での培養を試行。

(倫理面への配慮)

実験時の衛生管理に配慮、動物担体使用は、動物実験委員会に承認。

C. 研究結果

二酸化チタン、フラーレン、カーボンブラックでは増殖を認めた。曝露濃度により減少傾向を認めるも、有意差無し。*hOGGI* 遺伝子の発現について、曝露細胞間で発現パターンが異なった。新しい培養系を試みた。

D. 考察

本研究では、マグネタイト以外二酸化チタン、フラーレン、カーボンブラック曝露では、細胞増殖に有意な影響を与えなかったが、しかし、*hOGGI* 遺伝子の発現では、DU-145細胞では抑制、RWPE-1細胞では二酸化チタン、カーボンブラック曝露においては発現亢進と遺伝子レベルでの変化が誘導されている。

短期曝露の結果であるので、これが長期的曝露ではどのような影響を与えるのか注意が必要であるが、酸化ストレスの関与が疑われる。

E. 結論

ナノ粒子は、増殖能に関して影響を及ぼさなかったが、遺伝子レベルでは影響を与えていることを確認した。酸化ストレスを含めた細胞への影響を与えるメカニズム、長期曝露の影響、マグネタイトの再検討などの必要性が明らかになった。

G. 研究発表

1. 論文発表

1. Katoh, T., Yamano, Y., Tsuji, M. and Watanabe, M. Genetic polymorphisms of human cytosol glutathione S-transferases and prostate cancer. *Pharmacogenomics*, 9: 93-104, 2008.
2. Fukuta, K., Kohri, K., Fukuda, H., Watanabe, M., Sugimura, T. and Nakagama, H. Induction of multinucleated cells and apoptosis in the PC-3 prostate cancer cell line by low concentrations of polyethylene glycol 1000. *Cancer Sci* 99: 1055-1062, 2008.
3. Onsory, K., Sobti, R.C., Al-Badran, A.I., Watanabe, M., Shiraishi, T., Krishan, A., Mohan, H. and Kaur, P. Hormone receptor-related gene polymorphisms and prostate cancer risk in North Indian population. *Mol Cell Biochem.* 314: 25-35, 2008.
4. Watanabe, M., Hirokawa, Y., Tsuji, M., Yanagawa, M., Murata, T., Suzuki, H., Ichikawa, T., Katoh, T., Sugimura, Y. and Shiraishi, T. Lack of involvement of the *GNAS1* T393C polymorphism in prostate cancer risk in the Japanese population. *Anticancer Res*, 28: 3711-3716, 2008.
5. 竹澤俊明, 竹内朋代, 落谷孝広, 柳原佳奈, 寺田聡, 鈴木尚真, 渡邊昌俊. 組織病理学用の切片を動物細胞の培養担体に利用した先端研究. *Organ Biology*, 15: 107-114, 200

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

2. 学会発表

1. 鈴木尚真 竹内朋代, 寺谷工, 落谷孝広, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. 再生肝由来の切片担体を利用して幹細胞を肝細胞様細胞へ分化誘導する培養技術

第 15 回肝細胞研究会, 静岡市, 平成 20 年 6 月 27-28 日.

2. Takezawa, T., Takeuchi, T., Suzuki, N., Teratani, T., Ochiya, T., and Watanabe, M. A novel strategy to extrapolate toxicity *in vivo*: A cell culture system utilizing TOSHI (tissue/organ sections for histopathology)-substrata derived from animals after drug administration, 15th International Congress on In Vitro Toxicology, 25 to 28 Sept 2008, Stockholm, Sweden.

3. 鈴木尚真, 渡邊昌俊, 竹澤俊明. 動物組織片の切片担体を利用した培養モデルの可能性. 第 67 回日本癌学会学術総会, 名古屋, 平成 20 年 10 月 28-30 日.

4. 上大介, 広川佳史, 米田操, 高木陽光, 森田城次, 白石泰三, 渡邊昌俊. 抗癌剤感受性試験モデルとしての前立腺癌スフェロイド. 第67回日本癌学会学術総会, 名古屋, 平成20年10月28-30日.

（分担）研究報告書

ナノマテリアルの発がん性

（分担）研究者 市瀬 孝道 大分看護大学 教授

研究要旨 本研究の目的はナノ素材（粒子）の主に肺における発がん性を明らかにすることである。ICR系雄マウスを1群50匹として、カオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類の粒子を、1回の投与量を0.1 mgと0.3 mgとして、2週間間隔で5回を気管内投与し、投与を開始してから15ヶ月目にマウスを屠殺する予定である。

A. 研究目的

ナノ素材（粒子）の主に肺における発がん性を明らかにする目的で、3種類のナノマテリアル素材を、肺の自然腫瘍発生率の比較的低いICRマウスを用いて経気道的に繰り返し投与を行い、長期飼育による発がん実験を行った。

B. 研究方法

ICR系雄マウスを1群50匹として、カオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類の粒子を、1回の投与量を0.1 mgと0.3 mgとして、2週間間隔で5回（総投与量としてマウス当り0.5mgと1.5mg量）を気管内投与した。投与を開始して15ヶ月後に全てのマウスを屠殺して、肺を中心とした腫瘍発生率を調べる。（倫理面への配慮）

本動物実験は、独立行政法人国立環境研究所の研究指針を遵守して行い、動物の飼育や屠殺に際して苦痛を排除する等の倫理面に配慮すると共に、研究を始めるにあたり、国立環境研究所の倫理委員会の承認を得て行なった。

C. 研究結果

ナノ素材（粒子）の主に肺における発がん性を明らかにする目的で、本年度は発がん実験に用いるマウスの系統及び各種ナノマテリアルとその投与量を決定し、マウスの経気道への繰り返し投与による長期発がん実験を開始した。本実験に用いるマウスは自然肺腫瘍発生率がそれほど高くないICRマウスとした。ナノマテリアルはカオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類とし、1回の投与量をマウス当り0.1 mgと0.3 mgとして、2週間間隔で5回、総投与量としてマウス当り0.5mgと1.5mg量を気管内投与した。すでに気管内投与を終了し、現在、長期飼育を継続中であるが、途中死亡のマウスや健康不良のマウスを中途屠殺して肺、その他の臓器・器官の病理標本を作成して病理観察を行なっている。

D. 考察

現在、フラーレン、カーボンブラックおよびカオリンの気管内投与を終了し、長期飼育を継続中である。投与を開始してから15ヶ月目にマウスを屠殺する予定であるが、途中死亡のマウスや健康不良のマウスを中途屠殺して肺、その他の臓器・器官の病理標本を作成して病理観察を行っている。

E. 結論

ICR系雄マウスにカオリン、フラーレン、カーボンブラックの3種類の粒子の0.1 mgと0.3 mgを2週間間隔で5回気管内投与して、15ヶ月後に肺の腫瘍発生率を調べた。投与を開始してから15ヶ月目にマウスを屠殺する予定である。

F. 健康危険情報

該当しない。

G. 研究発表

1. 論文発表
なし
2. 学会発表
なし

H. 知的財産権の出願・登録状況

（予定を含む。）

1. 特許取得
該当しない
2. 実用新案登録
該当しない
3. その他

ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究

分担研究者 増田 修一

研究要旨：ICR マウスに青石綿、カーボンナノチューブ、フラーレンを気管内投与し、コメットアッセイを用いて肺組織細胞における DNA 損傷を検定した。その結果、いずれのナノマテリアルも用量依存的に肺細胞において、有意な DNA 損傷性を示した。

A. 研究目的

ナノマテリアルは、粒径100 nm以下の粒子から構成される物質と定義されており、粒子サイズの縮小化により得られる新しい特性はさまざまな研究分野に用いられている。しかし、ナノマテリアルは皮膚、口腔、吸入により生体内に取り込まれ、炎症の誘発、細胞慢性影響など生体に影響を及ぼすことが報告されている。これまでに *in vivo* 試験系を用いたナノマテリアルの変異原性、遺伝毒性を評価した研究は極めて少ない。そこで本研究ではフラーレン、カーボンナノチューブ及び青石綿の遺伝毒性を検定するために、その曝露経路を考慮して、各ナノマテリアルをマウス気管支内に投与し、肺細胞におけるDNA損傷性を検定するため、コメットアッセイ試験を行った。

B. 研究方法

フラーレン、カーボンナノチューブ、青石綿の各ナノマテリアルをGlyceryl trioctanoateに懸濁し、0.05、0.2 mg/mouseとなるようにICRマウス(9週齢、♂)の気管支内に投与した。投与3時間後にマウスより両肺を摘出し、血液を灌流後、30 mM EDTA-0.9%KCl溶液を加えてホモジナイズした。ホモジナイズされた組織より細胞浮遊液を得た後、アガロースと混合し、プレートを作製した。アルカリ処理及び電気泳動によるコメットアッセイを行った。画像解析ソフト(comet analyzer)を付属した蛍光顕微鏡を用いて、1スライドにつき50個の細胞におけるTail momentを求めた。

(倫理面への配慮)

動物実験を行う際には、静岡県立大学動物センターの規定に基づき行った。

C. 研究結果

ICRマウスに青石綿、カーボンナノチューブ、フラーレンを0.05、0.2 mg/mouseとなるように気管内投与し、それらナノマテリアルの肺組織細胞におけるDNA損傷性をコメットアッセイを用いて検定した。その結果、いずれのナノマテリアルも用量依存的に有意にtail moment値の上昇がみられた。特に、青石綿は、2 mg/mouseの投与濃度で両肺においてtail moment値が4.0と極めて強いDNA損傷性を示した。一方、カーボンナノチューブとフラーレンにおいては、両肺のtail moment値が約2.5と、青石綿と比較して、低い値を示したが、未処理群に比べて有意なDNA損傷性を示した。また、ナノマテリアルを投与された左右の肺間におけるDNA損傷性の違いは、いずれのナノマテリアルの投与においても有意な差は認められなかった。

D. 考察

今回、ナノマテリアルをマウス気管支内に投与することにより、DNA損傷性が誘導されることが明らかになった。このナノマテリアルのDNA損傷性の要因として、活性酸素種の生成が考えられる。

これまでに、ナノマテリアルによる酸化的損傷を確認した報告がある。マウス肺上皮細胞にフラーレンとカーボンナノチューブを曝露させ、formamidopyrimidine [fapy] -DNA glycosylase (FPG) プロテイン処理・コメットアッセイを用いたところ、酸化的DNA損傷誘導されたことが報告されている。また、カーボンナノチューブを中皮細胞に曝露させたところ、シグナル伝達やNF- κ Bなどの転写因子の活性化により、ヒドロキシルラジカルの生成が促進されたことも明らかになっている。また、アスベスト繊維はFe

を含むことから、フリーラジカルを生成するといわれている。本研究では、DNA 鎖切断をコメットアッセイにより検出したが、ナノマテリアルより誘導された活性酸素種による DNA 損傷が考えられるため、今後は肺細胞 DNA への損傷が活性酸素種によるものであるか否かを明らかにするため、FPG プロテイン処理を取り入れたコメットアッセイや、活性酸素種により形成される DNA 付加体の検出を行う必要がある。

E. 結論

ナノマテリアルを用いた研究開発分野は急速に成長しており、ナノテクノロジーは化学、工業及び医療分野などさまざまな分野で発展している。したがって、ナノマテリアルは生活環境中に存在することが示唆されることから、我々は日常的に暴露されると思われる。

ナノマテリアルはその粒子のナノスケール化により、異なった特性が発揮されるが、その活性の増強が毒性発現などの生体にとって望ましくない影響を及ぼすことが懸念される。ナノマテリアルは皮膚、口腔、吸入により生体内に取り込まれ、炎症の誘発や、細胞の慢性影響の促進等が報告されている。それ故、これらナノマテリアルの生体影響、特に遺伝毒性や発がん性を評価することは、ヒトの健康を考える上で大変重要である。

本研究では、ナノマテリアルの肺組織細胞における DNA 損傷性を検討したところ、DNA 損傷性を示した。したがって、ヒトがこれらナノマテリアルに気管内暴露された場合、DNA 損傷が誘導され、最終的には発がんへと進展することが示唆された。今後は、DNA 損傷メカニズムの解明や暴露方法の検討、生体内における代謝や他臓器への影響を検討することが必要である。

G. 研究発表

1. 論文発表

(1) Deguchi, Y., Wu, N.X., Toyozumi, T., Masuda, S., Nagaoka, H., Watanabe, T., Totsuka, Y., Wakabayashi, K., Kinoue, N. Application of a new bioassay technique using goldfish for assessment of water toxicity, *Environ. Toxicol.* 23(6): 720-727 (2008).

(2) Oya-Ito, T., Naitou, H., Masuda, S., Kinoue, N., Ohashi, N. Functional analyses of neutrophil-like differentiated cell lines under a hyperglycemic condition, *Molecular Nutrition and Food Research*, 52(3): 360-369 (2008).

(3) Toyozumi, T., Deguchi, Y., Masuda, S., Kinoue, N. Genotoxicity and estrogenic activity of 3,3'-dinitro-bisphenol A in goldfish, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 72(8): 2118-2123 (2008).

(4) Kinoue, N., Oguni, I., Takabayashi, F., Masuda, S. Effect of tea extracts on gastric mucosal erosion and hemorrhage in *Helicobacter pylori* infected Mongolian Gerbils, *J. Clin. Biochem. Nutri.*, 43: 22-23 (2008).

2. 学会発表

(1) 川口恵未、佐々木有、増田修一、木苗直秀：動物腸内菌の代謝によるアゾ色素成分による *in vivo* 突然変異誘発性の検討、日本環境変異原学会第 37 回大会、プログラム要旨集, p131, 宜野湾市(2008 年 12 月)

(2) 小山直己、木村葵、安井学、高見成昭、高橋美和、今井俊夫、山本歩、汲田和歌子、増村健一、増田修一、木苗直秀、松田知成、能美健彦、本間正充：ライフステージを考慮したアクリルアミドの多臓器遺伝毒性評価、日本環境変異原学会第 37 回大会、プログラム要旨集, p117, 宜野湾市(2008 年 12 月)

(3) 豊泉友康、関口博太、高林ふみ代、出口雄也、増田修一、太田亮、木苗直秀、イソフラボン類と亜硝酸塩の同時投与によるマウス胃粘膜における DNA 損傷性の評価、日本環境変異原学会第 37 回大会、プログラム要旨集, p129, 宜野湾市(2008 年 12 月)

(3) 加藤竜也、増田修一、渡辺徹志、戸塚ゆかり、若林敬二、木苗直秀、静岡県内における居住地域及び工業地域の表層土壌抽出物の変異原性と変異原物質の検索、日本環境変異原学会第 37 回大会、プログラム要旨集, p169, 宜野湾市(2008 年 12 月)

(4) 平野元美、増田修一、小山直己、木苗直秀、関本征史、糖尿病発症時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動、日本環境変異原学会第 37 回大会、プログラム要旨集, p132, 宜野湾市(2008 年 12 月)