

200941012A

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  
(H20-化学—一般—007)

平成21年度 総括・分担研究報告書

研究代表者

戸塚 ゆ加里 (国立がんセンター研究所)

研究分担者

葛西 宏 (産業医科大学)  
渡邊 昌俊 (横浜国立大学大学院)  
市瀬 孝道 (大分看護大学)  
中江 大 (東京都健康安全研究センター)  
増田 修一 (静岡県立大学)

平成22 (2010) 年3月

## 目 次

I. 総括研究報告	
ナノマテリアルの遺伝毒及び発がん性に関する研究	< 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	< 1 1 >
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 —化学反応によるDNAメチル化—	< 1 5 >
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	< 1 9 >
渡邊 昌俊	
4. ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究	< 2 1 >
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	< 2 3 >
中江 大	
6. ナノマテリアルの遺伝毒性及び発がん性に関する研究	< 3 7 >
増田 修一	
III. 研究成果の刊行に関する一覧表	< 3 9 >
IV. 研究成果の刊行物・別刷	< 4 3 >

総括報告書

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 細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について、*in vitro*系で細胞生存率、ROS生成、8-OHdG検出、apoptosis、細胞周期等について検討した。特定のナノ粒子はヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。試験管内反応として過酸化水素と2価鉄あるいはメチオニンスルホキシドとOHラジカル(Fenton試薬)の組み合わせによりメチルラジカルが生じ、DNA中のdC、dGがメチル化されm5dC、m8dGが生成することを見出した。繊維状、粒子状物質により誘発される炎症、酸化ストレスが引き金となってラジカル機構によりDNAのメチル化、エピジェネティック異常が起こる可能性が考えられる。マウスに各種ナノマテリアルを気管内投与し、Fpg処理及び未処理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、有意な酸化DNA損傷性を示した。多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びマグネタイトの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、MWCNTを気管内投与したマウスの肺にMWCNTを貪食したマクロファージおよび炎症性細胞浸潤が散見され、グラニューマおよび線維化が発生していた。一方、マグネタイトを投与した場合は、被検物質を貪食したマクロファージおよびリンパ球浸潤は観察されたが、グラニューマおよび線維化の発生はほとんど認められなかった。*gpt*遺伝子の変異頻度を解析した結果、MWCNT投与群でコントロールと比較して約2倍に上昇したが、統計学的に有意ではなかった。一方、マグネタイト反復投与群では、*gpt*変異頻度は有意に上昇した。カオリン、フラーレン、カーボンブラックの肺の発がん性について検討した結果、生存マウスの肺の総腫瘍発生率は対照群が37.8%、そのうち悪性腫瘍が21.6%であったのに対し、各粒子投与群の腫瘍発生率はそれらを上まわることはなかった。医療やバイオテクノロジーの分野への応用展開が図られている磁性ナノ粒子、マグネタイトの急性毒性及び慢性毒性について検索する目的で、ラットに被験物質を気管内スプレー投与するモデルを用い、単回投与による急性毒性試験を行うと共に、反復投与による慢性毒性試験を実施中である。その結果、血液・血清生化学的検索では、マグネタイト投与による影響を認めなかった。病理学的検索において、肺の重量は、雌雄の投与群で投与用量に相関して増加し、雌雄の15.0及び45.0 mg/kg体重群で有意に増加した。解剖時の肉眼観察では、投与群ラットの肺にマグネタイトの広汎な沈着がみられ、用量相関性に肺の腫大が認められた。また、雌雄の投与群ラットのリンパ節は、灰色～淡黒色を呈し、マグネタイトのリンパ節への移行が示唆された。組織学的には、雌雄の投与群の肺において、肺胞腔内のマグネタイトの沈着と、マグネタイトを貪食した肺胞マクロファージの浸潤、また、II型肺胞上皮の腫大及び炎症細胞の浸潤を観察し、異物曝露に対する非特異的な局所の急性反応と評価できる変化が認められた。肝臓、腎臓及び心臓など他の器官においては、マグネタイトの投与に伴った変化を認めなかった。

## 分担研究者

葛西 宏	産業医科大学 職業性腫瘍学 教授
渡辺 昌俊	横浜国立大学大学院 工学研究院医工学 教授
市瀬 孝道	大分看護大学 看護学部 教授
中江 大	東京都健康安全研究センター 環境保健部 参事研究員
増田 修一	静岡県立大学 食品栄養科学部 准教授
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 室長

## 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6項目に関して研究を行った。

①各種ナノ粒子等のヒト細胞への影響について: ヒト細胞(肺癌細胞株 A549 および前立腺細胞株 LNCaP, DU-145, RWPE-1) 培養系を用い、ナノ粒子(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, カオリン) 曝露群および非曝露群を設定した。ナノ粒子を曝露させ、24、48、72 時間後に、Alamar Blue Assay にて生存細胞数を測定した。また、8-OHdG 測定、reactive oxygen species (ROS) 生成、細胞膜損傷検出(Lactate Dehydrogenase (LDH) assay), apoptosis 解析および細胞周期解析等についても検討した。

②化学反応による DNA 中シトシンのメチル化:

メチオニンスルホキシドと OH ラジカル (Fenton 試薬) 等のメチルラジカル発生系と dC あるいは DNA とを生理的条件 (37°C、pH7.3) で反応させ m5dC (m8dG) が生成するかどうかをフォトダイオードアレイ UV 検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー (HPLC)、LC/MS/MS 法および抗体法(免疫ドットプロット分析)により分析した。

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:

各種ナノマテリアルを Glyceryl trioctanoate 中に懸濁し、0.05、0.2 mg/mouse となるように調製した。懸濁液を ICR マウス (10 週齢、♂)、または C57BL/6J マウス (9 週齢、♂) の気管内に投与し、3 時間後に両肺を摘出して、30 mM EDTA-0.9%KCl 溶液を加えてホモジナイズした。細胞浮遊液を得た後、Fpg 処理及び未処理の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(多層カーボンナノチューブ、マグネタイト)および陽性対象物質である青石綿を 0.05% Tween 80 を含む生理食塩水に懸濁し、0.2 mg/body の用量で気管内に単回および反復投与を行った。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、肺からゲノム DNA を抽出して行った。更に、Spi 変異の解析も併せて行った。

#### ⑤各種ナノ素材微小粒子の肺腫瘍発生に関する研究:

カオリン、フラーレン、カーボンブラックを 0.05% Tween 80 含む生理食塩水に 1mg/ml と 3mg/ml となるように濃度調整して、ソニケーターにて懸濁後、この懸濁液、0.1 ml を ICR 雄マウスに1ヶ月間隔で5回(総投与量:マウス当たり 0.5mg と 1.5mg 量) 気管内投与し、15-16ヶ月後の肺を中心とした腫瘍発生率を調べた。対照群には 0.05% Tween 80 含む生理食塩水 0.1ml を投与した。

#### ⑥ラットにおけるマグネタイトの急性毒性ならびに慢性毒性に関する研究:

急性毒性試験は、F344/DuCrIj 系雌雄ラットに、0.5・15・45 mg/kg 体重の用量でマグネタイトを単回気管内スプレー投与し、2週間後に動物を屠殺して検索した。慢性毒性試験は、同様に 0.02・1.0・5.0 mg/kg 体重/回の用量で4週間に1回、計13回投与し、実験開始の52週間後に動物を屠殺して検索する予定で実施している。

#### 倫理面への配慮

本研究で行う動物実験にあたっては、国立がんセンターを含む各施設における動物実験に関する指針に則って実施し、可能な限り実験動物の苦痛軽減処置を行う。

また、ヒト由来試料を用いて研究する場合は、各研究者の所属施設の倫理委員会の承諾を得るものとする。

### C. 研究結果

#### ①各種ナノ粒子等のヒト細胞への影響について: マグネタイト、二酸化チタン、カオリンは

10  $\mu$ g/ml より、有意に A549 の細胞生存率が低下した。特にカオリンでは 200  $\mu$ g/ml で 50% の死滅を認めた。一方、前立腺癌細胞株 DU145 に対しては、マグネタイトは 1  $\mu$ g/ml から有意に細胞生存率が低下したが、同じ前立腺癌細胞株 LNCaP, 前立腺細胞株 RWPE-1 では細胞生存率の低下を認めなかった。8-OHdG を測定したところ、マグネタイトは 10  $\mu$ g/ml より、有意に A549 での 8-OHdG の生成量の増加を認めた。DU-145 では、1  $\mu$ g/ml より、8-OHdG の生成量の増加を認めた。また、マグネタイトは 10  $\mu$ g/ml より、有意に A549 での ROS の生成量の増加を認めた。DU-145 では、1  $\mu$ g/ml より、ROS の生成量の増加を認めた。さらに、マグネタイトの曝露で、A549 では apoptosis は誘導されず、DU-145 では誘導を確認した。一方、細胞周期への影響を観察した所、マグネタイト曝露下では、DU-145 細胞の細胞周期の変化は認められず、A549 では S 期への収束が認められた。

#### ②化学反応による DNA 中シトシンのメチル化:

まず試験管内において Fe<sup>2+</sup> の存在下で過酸化物質 t-Butyl hydroperoxide, Cumene hydroperoxide と dC を反応させたところ m5dC が生成することを見出した。次いでメチオキシスルホキシドと OH ラジカル(Fenton 試薬) の組み合わせによりメチルラジカルが生じ、モノマー dC の C5 位がチオキシスルホキシドの濃度に依存してメチル化され m5dC が生成することをフォトダイオードアレイ UV 検出器を接続した HPLC により見出した。更に 2 本鎖 poly(dG-dC) に対して同様の反応を行ったところ LC/MS/MS 法および抗体法(免疫ドットプロット分析)により m5dC の生成が認められた。同時にデオキシグアノシン (dG) のメチル化産物である m8dG が LC/MS/MS 法により検出された。

#### 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:

カーボンナノチューブ、フラーレン、マグネタイト、青石綿の各ナノマテリアルを気管内投与した ICR マウス肺組織における DNA の損傷性を Fpg 未処理コメットアッセイを用いて調べたところ、いずれも対照群に比べて、有意な DNA 損傷性が確認できた。

カオリン、フラーレン、青石綿を気管内投与した C57BL/6J マウス肺組織における DNA の損傷

性をFpg未処理コメットアッセイを用いて調べたところ、カオリン、フラーレン、青石綿はいずれも対照群に比べて、有意なDNA損傷性が確認できた。また、Fpg処理コメットアッセイを用いて、各ナノマテリアルの酸化的DNA損傷性を調べたところ、いずれのナノマテリアルも対照群に比べて有意なDNA損傷性がみられた。また、Fpg未処理コメットアッセイにおけるDNA損傷に比べても、有意な増強が確認できた。

#### 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：

MWCNTを気管内投与したマウス肺で、DNAの酸化傷害である8-OH-dGのレベルが溶媒対照群に比べて上昇していることが分かった。MWCNT、青石綿を投与したgpt deltaマウスの肺に、被検物質を貪食したマクロファージおよび炎症性細胞浸潤が散見され、グラニューマおよび線維化が発生していた。また、MWCNTを投与したマウスのリンパ節にも被検物質が観察された。一方、マグネタイトを投与した場合は、被検物質を貪食したマクロファージおよびリンパ球浸潤は観察されたが、グラニューマおよび線維化の発生はほとんど認められなかった。gpt遺伝子の変異頻度を解析した結果、MWCNTおよび青石綿の反復投与群でコントロールと比較して約2倍に上昇したが、統計学的に有意ではなかった。一方、マグネタイト反復投与群では、gpt変異頻度は有意に上昇した。Spi-遺伝子の変異頻度については、青石綿投与群のみがわずかに上昇したが、MWCNTおよびマグネタイトの投与によるSpi-遺伝子の変異の上昇は認められなかった。

#### ⑤各種ナノ素材微小粒子の肺腫瘍発生に関する研究：

15-16ヶ月後の生存率は、対照群：66%；カオリン0.1mgと0.3mg群：48%と42%；フラーレン0.1mgと0.3mg群：74%と54%；カーボンブラック0.1mgと0.3mg群：62%と68%であった。肺の総腫瘍発生率は、対照群：37.8%；カオリン0.1mgと0.3mg群：35.7%と16.7%；フラーレン0.1mgと0.3mg群：23.1%と20.7%；カーボンブラック0.1mgと0.3mg群：28.1%と21.1%であった。腫瘍の組織型は腺腫と腺癌であり、腺癌の発生率は対照群：21.6%；カオリン0.1mgと0.3mg群：13.2%と14.3%；フラーレン0.1mgと0.3mg群：20.5%と17.2%；カーボンブラック0.1mgと0.3mg群：21.6%と18.8%であった。ナノマテリアル投与群の総腫瘍発生率、悪性腫瘍（腺癌）の発生率は対照群と比較すると増加することはなかった。

#### ⑥ラットにおけるマグネタイトの急性毒性ならびに慢性毒性に関する研究：

急性毒性試験において、器官重量は、雌雄の15及び45mg群で肺の重量が、雄の5mg群で精巣の重量が、それぞれ有意に増加した。病理肉眼的検索においては、雌雄の全ての投与群の肺で、腫大及び浮腫と、被検物質と思われる黒色物質の沈着が認められた。これらの変化は、低濃度群に比べ、高濃度群で、より顕著であった。また、投与群の胸腺リンパ節では、軽度な腫大と灰黒色を呈する変化が4-5例中2-4例に認められた。病理組織学的検索においては、雌雄の45mg群で、気管支上皮の軽度腫大と、気管支粘膜の杯細胞の増加が有意に増加した。雄の45mg群では肺の血管周囲に浮腫が、雌の全投与群では炎症細胞の浸潤が、それぞれ有意に増加した。雌雄の全投与群においては、マグネタイトを貪食したマクロファージの浸潤及びII型肺胞上皮の増生が見られた。雌雄の15及び45mg群では肺腔内にマグネタイトの沈着及び肉芽形成が、雌雄の45mg群では異物巨細胞の浸潤が、それぞれ認められた。胸腺リンパ節においては、雌雄の投与群全例にマグネタイトと思われる褐色粒子の沈着が認められた。慢性毒性試験においては、6ヶ月間を経過して継続中であるが、経過中の一般状態と、平均体重及び平均摂餌量の推移に有意な変化を認めていない。

#### D. 考察

##### ①各種ナノ粒子等のヒト細胞への影響について：

各種ナノ粒子等の中で、マグネタイトに焦点を絞った。細胞生存率は濃度依存的に二つの異なる細胞株に対して影響を与えるも、A549に比較して、DU-145はより低濃度での曝露で低下した。DU-145はA549に比べて低濃度でDNA損傷やROSの生成を認めた。その結果として、apoptosisが誘導された。これらの一連の事象が細胞生存率の低下に結びついたと考える。一方、A549では、高曝露濃度でROSの生成やDNA損傷を認めた。しかし、apoptosisの誘導は認めず、細胞周期の異常が認められた。磁性体ナノ粒子が前立腺細胞DU-145への影響は、p53変異およびROSに対する修復機構の欠損に基づくと考えられた。A549細胞にはp53変異はなく、マグネタイトがcyclinAなどS期にかかわるタンパク質に影響を及ぼした可能性がある。同一のナノ粒子であっても、その細胞がもつ修復機構等がその表現型に重要な影響を与えると考える。

## ②化学反応による DNA 中シトシンのメチル化：

メチルラジカルは様々な物質から、活性酸素の作用で、また代謝により生じることが知られている。生体では炎症や老化が原因でメチルラジカルが生じ、シトシンのメチル化を起こす可能性が考えられる。また DNA に直接反応する場合と、ヌクレオチドプール中に m5dCTP が生じ DNA 中に取り込まれる機構が考えられる。今後細胞レベルでこの反応が起こるかどうか、更にメチオニンスルホキシド等の物質と酸化ストレスにより実際にエピジェネティック変化が起こるかどうかを証明したい。これらの結果は粒子状・繊維状物質の吸入による肺組織の炎症、酸化ストレス誘発に伴う肺発癌にも関連すると思われる。一方 m8dG はラジカル機構による DNA のメチル化を研究するための良いマーカーになるであろう。

## 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：

本研究において、各種ナノマテリアルの遺伝毒性を、DNA 損傷を検定するコメットアッセイを用いて評価した。その結果、各ナノマテリアルを気管支に投与された ICR マウス肺細胞において、いずれのナノマテリアルを投与された群でも、DNA 損傷性が誘導されることが確認できた。また、各ナノマテリアルを気管支に投与された C57BL/6J マウス肺細胞においては、Fpg 処理コメットアッセイも併用して、酸化的 DNA 損傷性を検定した。その結果、Fpg 処理をすることにより、Fpg 未処理に比べて優位に DNA 損傷性が増強することが明らかになった。以上のことより、各ナノマテリアルの DNA 損傷性は、生成する活性酸素種により誘導されることが示唆された。今後は エンドヌクレアーゼ等の Fpg 以外の酸化的 DNA 損傷修復酵素を用いたコメットアッセイを行い、また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：

多層カーボンナノチューブの気管内投与により、肺に炎症性所見が顕著に認められたが、マグネタイトでは肺の炎症性反応が多層カーボンナノチューブと比較して弱いことがわか

った。これは、多層カーボンナノチューブは繊維状であるが、マグネタイトは球形であり、それぞれのナノマテリアルの形状の違いに起因することが示唆された。一方、*gpt* 変異解析の結果を見ると、両ナノマテリアルともにコントロールの 2 倍程度に変異頻度が上昇しており、必ずしも肺組織の炎症反応の程度と変異原性の強さは一致しなかった。これは、多層カーボンナノチューブの肺における炎症作用が強すぎて、ダメージの少ない細胞からのみゲノム DNA が抽出された可能性があると考えられる。

## ⑤各種ナノ素材微小粒子の肺腫瘍発生に関する研究：

IARC Monograph Working Group はカーボンブラック (CB) と TiO<sub>2</sub> の発がん性に関して、マウスやハムスターにおいてはネガティブ、ラットにおいてはポジティブであり、ヒトにおいては疫学調査の結果からポジティブである可能性を報告している。ラットでは Quarts や amorphous SiO<sub>2</sub> においても発がん性が示唆されている。本試験の ICR マウスの生存率が低く、発がん性を評価するには検査匹数が少なかったが、CB の発がん性に対しては先行研究と同様にネガティブであった。またカオリン粒子やフラーレンの発がん性に関してもネガティブであった。このような結果から、マウスはこれらのナノ素材粒子の発がん性に対して感受性が低い動物種と考えられる。今回試験したナノマテリアルのヒトに対する発がん性を明らかにするには、今後、ヒトに近い感受性を示すラットを用いた発がん実験を行う必要があると思われる。

## ⑥ラットにおけるマグネタイトの急性毒性ならびに慢性毒性に関する研究：

マグネタイトの毒性に関しては、Pott らが、11 週齢の Wistar ラットに 15 mg/ラットの用量で 1 週間毎に 15 回投与し (総投与量 225 mg/ラット)、2 年 6 ヶ月齢時において病理学的検索を行い、69% のラットに肺の腫瘍が認められたと報告している。一方、Steinhoff らは、8 週齢の SD ラットにマグネタイト (平均直径 0.5 μm) を 10-40 mg/kg 体重の用量で 2 週間毎に約 2 年間投与し (総投与量 1530 mg/kg 体重)、2 年 6 ヶ月齢において病理学的検索を行い、発がん性が認められなかったと報告している。一方、Zhu らは、サブミクロンサイズ (直径 280 nm) とナノ

サイズ(直径 22 nm)の酸化鉄 Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub> を 0.8 あるいは 20 mg/kg 体重の用量で雄の SD ラットに単回気管内投与し、7 日後及び 30 日後の影響を比較した結果、サブミクロンタイプのものに比べ、ナノサイズの酸化鉄の方が、肺の炎症反応及び血液凝固系に及ぼす影響が顕著であったと報告している。前述の Pott あるいは Steinhoff らの実験に用いられたマグネタイトはミクロンサイズであり、ナノサイズのマグネタイトの発がん性及び毒性に関しては本研究を端緒として詳細に検索することが必要である。

#### E. 結論

細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について、細胞生存率、ROS 生成、8-OHdG 生成、apoptosis、細胞周期等について検討した。特にマグネタイトはヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。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では、ナノ粒子の種類とその細胞がもつ特徴 (p53 遺伝子変異や修復系の異常など) が、ナノ粒子に対する反応が決まる可能性を見いだした。環境化学物質、内因性物質が関与する化学反応により DNA 中シトシン 5 位のメチル化が起こるかどうかを調べた。試験管内で dC あるいは DNA と様々なメチルラジカル発生物質を反応させ、HPLC, LC/MS/MS, 抗体法により 5-methyl-dC の生成を確認した。発癌プロモーター t-Butyl-OOH, Cumene-OOH が 2 価鉄の存在下で dC の C5 位のメチル化を起こすことを見出した。またメチオニンの酸化物メチオニンスルホキシドから OH ラジカル作用によりメチルラジカルが生じシトシンのメチル化を起こすことを見出した。ヒト発癌におけるエピジェネティック異常の原因として、炎症、喫煙、老化と関係してメチルラジカルによる DNA メチル化が起こる可能性が考えられる。またこの反応は繊維状、粒子状物質の発癌機構にも関連すると思われる。

本研究では、各種ナノマテリアルの遺伝毒性を DNA 損傷を検定するコメットアッセイを用いて評価した。その結果、いずれのナノマテリアルも DNA 損傷性を誘導し、特に DNA の酸化的修復酵素である Fpg を用いてコメットアッセイを行うことにより、DNA 損傷性は増強した。これまでに、マウス肺上皮細胞をフラー

レンやカーボンナノチューブに曝露させて、FPG 処理コメットアッセイを用いて、各ナノマテリアルの酸化的 DNA 損傷誘導性を検定した報告がある。また、カーボンナノチューブを上皮細胞に曝露させた場合、シグナル伝達や NF- $\kappa$ B などの転写因子の活性化が起こり、ヒドロキシルラジカルの生成がみられた報告もある。さらに、アスベスト繊維には Fe が含まれており、フリーラジカルを生成すると報告されている。したがって、本研究成果及びこれまでの研究報告より、各ナノマテリアルの DNA 損傷性は活性酸素種により誘導されることが示唆された。

多層カーボンナノチューブは、マウスの肺に DNA の酸化損傷を誘発することが明らかとなった。また、多層カーボンナノチューブはマウス肺にグラニューロマおよび線維化を誘発したが、マグネタイトを投与した場合はそれらの病理所見はほとんど認められなかった。一方、多層カーボンナノチューブおよびマグネタイトの投与により *gpt* 遺伝子がコントロールと比べ上昇する傾向が認められた。しかしながら、*Spi* 遺伝子の変異の上昇は認められなかった。カオリン、フラーレンやカーボンブラックはナノ素材として化粧品や医薬品、各種商業用品等に多用されている。しかし、これらの発がん性については明らかではない。本研究では ICR 系雄マウスを用いて肺に対する発がん性を検討した。その結果、これらナノ素材投与群の悪性腫瘍の発生率は対照群と比較すると増加することはなかった。ICR マウスの生存率が低く、これら粒子の発がん性を評価するには検査匹数は少なかったが、CB の発がん性に対してはネガティブであり、カオリン粒子やフラーレンに関してもネガティブであった。このような結果から、マウスはこれらのナノ素材粒子の発がん性に対して感受性が低い動物種と考えられる。DEP をはじめ、CB, TiO<sub>2</sub>, Talc, Quarts や amorphous SiO<sub>2</sub> 等の粒子の発がん性についてはラットにおいて指摘されていることから、今後、ラットを用いた発がん実験を行う必要があると考えられる。

マグネタイトの単回気管内スプレー投与による急性毒性試験では、全用量の雌雄のラットの肺について、重量の増加ないし増加傾向が認められ、組織学的に、マグネタイトの蓄積と、異物曝露に対する非特異的な局所の急性反応と評価できる変化が組織学的検索で異物を投



与した際に見られる非特異的な局所の急性反応を観察した。以上の結果から、本条件下におけるマグネタイトの急性毒性試験の無影響量 (NOEL) は、雌雄とも 5.0 mg/kg 体重未満と考えられた。慢性毒性試験は、雌雄とも 5.0 mg/kg 体重/回を最高用量として、現在実施中である。

#### F. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. 上大介, 渡邊昌俊ら. マイクロアレイとNIA array analysisを用いた心筋分化誘導因子の探索. 医学のあゆみ229, 1085-86, 2009.
2. 渡邊昌俊 ナノ粒子メディスン はじめに 医学のあゆみ 230, 8, 493, 2009.
3. 上大介, 渡邊昌俊ら. 磁性ナノ粒子を用いたiPS細胞の誘導. 医学のあゆみ 3. 230, 8, 495-499, 2009
4. 小坂俊仁, 渡邊昌俊ら. 潰瘍性大腸炎とDNAメチル化との関連-one-carbon metabolism関連遺伝子多型を中心に- 消化器医学7, 74-80, 2009
5. Kosaka T, Watanabe M, et al. Involvement of NQO1 and SOD2 polymorphisms in ulcerative colitis. DNA and Cell Biology, 28: 625-31, 2009
6. Osada T, Watanabe M, et al. The chromosomal constitution of postmitotic neurons, assessed by neuronal nuclear transfer into oocytes and in ES cell lines derived from them. Cytogenet Genome Res. 125: 201-12, 2009.
7. Yoneda M, Watanabe M, et al. RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. Exp.Mol. Pathol. 88: 90-5, 2010.
8. Morimoto Y, Kasai H, et al. Effect of polymerized toner on rat lung in chronic inhalation study. Inhal Toxicol. 21, 898-905, 2009
9. Kasai H, Kawai K. DNA methylation at the C-5 position of cytosine by methyl radicals: a possible role for epigenetic change during carcinogenesis by environmental agents. Chem Res Toxicol. 22, 984-9, 2009
10. Tamae K, Kasai H, et al. Effect of age, smoking and other lifestyle factors on urinary 7-methylguanine and 8-hydroxydeoxyguanosine. Cancer Sci. 100, 715-21, 2009
11. Song MF, Kasai H, et al. Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. Free Radic Biol Med. 47, 41-6, 2009
12. Hirano T, Kasai H, et al. Chronic alcohol consumption prevents 8-hydroxyguanine accumulation in 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-treated mouse liver. Biochem Biophys Res Commun. 387, 316-20, 2009
13. Kawai K, Kasai H et al. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. Bioorg Med Chem Lett. 20,260-265, 2010
14. Hori A, Kasai H, et al. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. Cancer Sci. 101, 517-522, 2010
15. Koyama, N., Masuda, S., et al. Genotoxicity of acrylamide in vitro: Acrylamide is not metabolically activated in standard in vitro systems. Environ. Mol. Mutagen. 2010 in press
16. Totsuka Y, Masuda S, Ichinose T, Watanabe M et al. Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. Part Fibre Toxicol. 6:23, 2009.
17. Ohe T, Totsuka Y, et al. Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. Mutat Res. 678: 38-42, 2009.
18. Yamamoto M, Totsuka Y, et al. Molecular cloning of apoptosis-inducing Pierisin-like proteins, from two species of white butterfly, Pieris melete and Aporia crataegi. Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol. 154: 326-33, 2009.
19. Nishigaki R, Totsuka Y et al. Isolation and Identification of a Novel Aromatic Amine Mutagen Produced by the Maillard Reaction. Chem Res Toxicol.

- 22; 1588-93, 2009.
20. Nishimura K, Totsuka Y, et al. Analysis of an RNA adduct formed from aminophenylnorharman. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf)*. 53; 211-2, 2009.
  21. Sakamoto, Y., Nakae, D., et al., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fischer 344 rats. *J. Toxicol. Sci.*, 34, 65-76, 2009.
  22. Igarashi, M., Nakae, D., et al., Enhancement of lung carcinogenesis initiated with 4-(N-hydroxymethylnitrosamino)-1-(3-pyridyl)-1-butanone by the Ogg1 gene deficiency in female, but not male, mice. *J. Toxicol. Sci.*, 34, 163-174, 2009.
  23. Satoh, K., Nakae, D., et al., Increase in in utero exposure to a migrant, 4,4'-butylidenebis(6-t-butyl-m-cresol), from nitrile-butadiene rubber gloves on brain aromatase activity in male rats. *Biol. Pharm. Bul.*, 33, 2009, in press
2. 学会発表
1. 一町直樹, 渡邊昌俊ら. 前立腺癌に対するドセタキセルと磁性体ナノ粒子の併用による治療の基礎的研究. 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 (2009 年 10 月)
  2. 森田城次, 渡邊昌俊ら. 前立腺癌スフェロイドの解析 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 (2009 年 10 月)
  3. 渡邊昌俊ら. 炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌リスクについて 第 68 回日本癌学会学術総会 横浜 (2009 年 10 月)
  4. 渡邊昌俊ら. ヒト前立腺癌細胞の 3 次元培養における抗癌剤抵抗性の獲得とその機構について 第 98 回日本病理学会総会 京都 (2009 年 5 月)
  5. 上大介, 渡邊昌俊ら. ヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞との相互作用について 第 98 回日本病理学会総会 京都 (2009 年 5 月)
  6. 広川佳史, 渡邊昌俊ら. RhoB 高発現前立腺がん細胞の MMP1 発現抑制 第 98 回日本病理学会総会 京都 (2009 年 5 月)
  7. 渡邊昌俊ら. 前立腺癌における Reduced Folate Carrierx 遺伝子多型の解析 第 56 回日本臨床検査医学会学術集会 札幌 (2009 年 8 月)
  8. 武田祥吾, 渡邊昌俊ら. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発- 非ウイルス性の iPS 細胞作製を目指して- 第 9 回日本再生医療学会総会 広島 (2010 年 3 月)
  9. 李 云善, 葛西 宏ら 尿素は ELISA による 8-OH-dG 分析において陽性反応を示す 第 82 回日本産業衛生学会、福岡 (2009 年 5 月)
  10. 河井 一明, 葛西 宏 新規変異原物質 4-oxo-2-hexenal のヒト肺組織中 DNA 付加体の検出 第 82 回日本産業衛生学会、福岡 (2009 年 5 月)
  11. 宋 明芬, 葛西 宏ら 尿素は ELISA による 8-OH-dG 分析において陽性反応を示す 第 9 回日本抗加齢医学会総会、東京 (2009 年 5 月)
  12. 河井 一明, 葛西 宏ら ELISA 法による 8-OH-dG 分析において尿素は陽性反応を示す 第 62 回日本酸化ストレス学会 (福岡) 2009 年 6 月
  13. 葛西 宏ら 化学反応による DNA 中シトシン 5 位のメチル化: エピジェネティック変化に関する可能性 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
  14. 河井 一明, 葛西 宏ら 尿素は市販 8-OH-dG ELISA kit において陽性反応を示す 第 68 回日本癌学会学術総会、横浜 (2009 年 10 月)
  15. 河井 一明, 葛西 宏ら メチルラジカルによるシトシン 5 位のメチル化: 環境化学物質によるエピジェネティック変化をともなう発がん機構の可能性 第 38 回大会日本環境変異原学会、清水 (2009 年 11 月)
  16. 増田修一ら 糖尿病発症時における変異・発がん物質の遺伝毒性の変動 第 63 回日本栄養・食糧学会大会 長崎 (2009 年 5 月)
  17. 平野元美, 増田修一ら 糖尿病状態及びアルコール摂取時におけるアクリルアミドの遺伝毒性の変動、第 19 回日本メイラード学会 金沢市 (2009 年 11 月)
  18. 小山直己, 増田修一ら ライフステージ(週齢)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 38 回大会、静岡市 (2009 年 11 月)
  19. 加藤竜也, 増田修一、市瀬孝道、戸塚ゆ加里ら In vivo における 3,6-dinitrobenzoflpyrene の遺伝毒性、日

- 本環境変異原学会 第 38 回大会、静岡市  
(2009 年 11 月)
20. Totsuka Y, Masuda S, Ichinose T, Watanabe M, et. al., Genotoxicity of Nanoparticles In In Vitro Micronuclei, In Vivo Comet and Mutation Assay Systems, 10th ICEM, 2009 フィレンツェ
  21. Totsuka Y et. al., Biological activities of endogenous mutagens/carcinogens, aminophenylnorhartman and N-nitrosobile acid conjugates., 10th ICEM, 2009 フィレンツェ
  22. 戸塚ゆ加里, 市瀬孝道ら、 ナノ粒子により誘発される遺伝毒性: in vitro 小核, in vivo コメットおよび変異原性の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
  23. 山本真史, 戸塚ゆ加里ら、メソテリンプロモーターを用いたピエリシン-1 遺伝子発現による抗がん活性 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
  24. 樋口孝, 戸塚ゆ加里ら、内因性変異原・がん原物質アミノフェニルノルハルマンの RNA 付加体形成による miRNA 機能の修飾 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
  25. 西村興一, 戸塚ゆ加里ら、アミノフェニルノルハルマン由来の DNA リン酸付加体の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
  26. 松本陽子, 増田修一, 戸塚ゆ加里ら、 ナノ粒子により誘発される in vivo 遺伝毒性 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  27. 小林沙衣, 戸塚ゆ加里ら、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  28. 桐谷英昌, 戸塚ゆ加里ら、アミノフェニルノルハルマン(APNH)由来の DNA リン酸付加体の構造解析 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  29. 尾後早耶佳, 戸塚ゆ加里ら、微細粒子状物質の DNA 損傷性の評価 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  30. 西村興一, 戸塚ゆ加里ら、ニトロソ胆汁酸抱合体由来タンパク質付加体の解析 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  31. 中江 大, ナノ物質の健康影響. 第 23 回公衆衛生情報研究協議会 (2010 年 1 月, 埼玉県和光市).
  32. 中江 大ら ナノ磁性粒子マグネタイトの経気道スプレー投与による Fischer 344 ラット肺への影響. 第 26 回日本毒性病理学会年次学術集会 (2010 年 2 月, 石川県金沢市).
  33. 坂本義光, 中江 大ら、多層カーボンナノチューブ(MWCNT)で誘発したラット中皮増殖性病変における ERC/mesothelin の発現. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009 岩手.
  34. 高橋 省, 中江 大ら、アスベスト代替物による細胞および動物レベルにおける急性的酸化ストレス. 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会 2009 岩手.
  35. 斎藤育江, 中江 大ら、大気中ナノ粒子の季節変動及び日内変動. 第 50 回大気環境学会年会 2009 横浜.
  36. 斎藤育江, 中江 大ら、大気浮遊粒子中の粒径別(7 nm-10  $\mu$ m)金属濃度. 第 50 回大気環境学会年会 2009 横浜.
  37. Sakamoto Y, Nakae D, et al. Expression of ERC/mesothelin in mesothelial proliferative lesions in rats induced by multi-wall carbon nanotube. 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜.
- G. 知的財産権の出願・登録状況  
(予定を含む。)
1. 特許取得  
該当しない
  2. 実用新案登録  
該当しない
  3. その他

分担研究報告書

ナノマテリアルにより誘発される遺伝毒性の解析

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** 多層カーボンナノチューブ(MWCNT)及びマグネタイトの遺伝毒性を、トランスジェニックマウスを用いて検討した。その結果、MWCNT を気管内投与したマウスの肺にMWCNTを貪食したマクロファージおよび炎症性細胞浸潤が散見され、グラニューローマおよび線維化が発生していた。一方、マグネタイトを投与した場合は、被検物質を貪食したマクロファージおよびリンパ球浸潤は観察されたが、グラニューローマおよび線維化の発生はほとんど認められなかった。*gpt* 遺伝子の変異頻度を解析した結果、MWCNT 投与群でコントロールと比較して約2倍に上昇したが、統計学的に有意ではなかった。一方、マグネタイト反復投与群では、*gpt* 変異頻度は有意に上昇した。

G. 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。

H. 研究方法

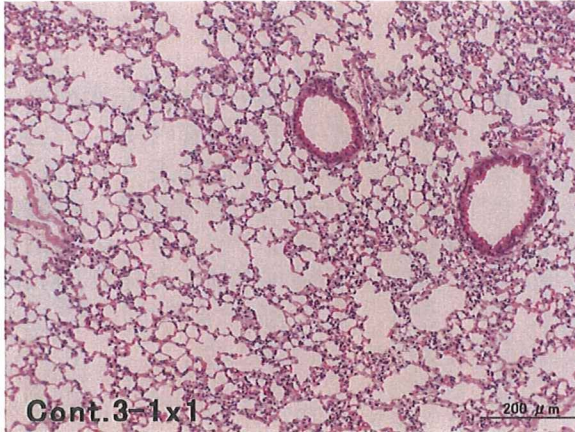
被検物質(MWCNT、マグネタイト、青石綿(陽性対象))を0.2mg/bodyの用量でICRマウスに単回気管内投与を行い、3、24、72時間後に屠殺解剖して肺において、微粒子投与により誘発されるDNA付加体の解析をLC-MS/MSを用いて行った。また、10週齢の雄性*gpt delta*マウスに、被検物質を0.05% Tween 80を含む生理食塩水に懸濁し、0.2 mg/bodyの用量で気管内に単回および反復投与を行った。最終投与2ヶ月後にマウスを屠殺し、肺を摘出した。3匹は病理組織学的な診断に、6-9匹を突然変異の解析に用いた。*gpt* 遺伝子変異の解析は、肺からゲノムDNAを抽出して行った。更に、*Spi* 変異の解析も併せて行った。

I. 研究結果

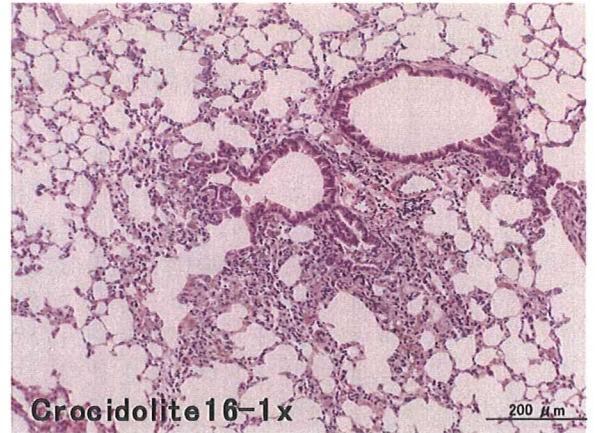
MWCNT を気管内投与したマウス肺で、DNAの酸化傷害である8-OH-dGのレベルが溶媒対照群に比べて上昇していることが分かった。MWCNT、青石綿を投与した*gpt delta*マウスの肺に、被検物質を貪食したマクロファージおよび炎症性細胞浸潤が散見され、グラニューローマおよび線維化が発生していた(図1)。また、MWCNTを投与したマウスのリンパ節にも被検物質が観察された。一方、マグネタイトを投与した場合は、被検物質を貪食したマクロファージおよびリンパ球浸潤は観察されたが、グラニューローマおよび線維化の発生はほとんど認められなかった(図1)。*gpt* 遺伝子の変異頻度を解析した結果、MWCNTおよび青石綿の反復投与群でコントロールと比較して約2倍に上昇したが、統計学的に有意ではなかった。一方、マグネタイト反復投与群では、*gpt* 変異頻度は有意に上昇した。*Spi* 遺伝子の変異頻度については、青石綿投与群のみがわずかに上昇したが、MWCNT およびマグネタイトの投与による*Spi* 遺伝子の変異の上昇は認められなかった。

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



フラレーン



MWCNT

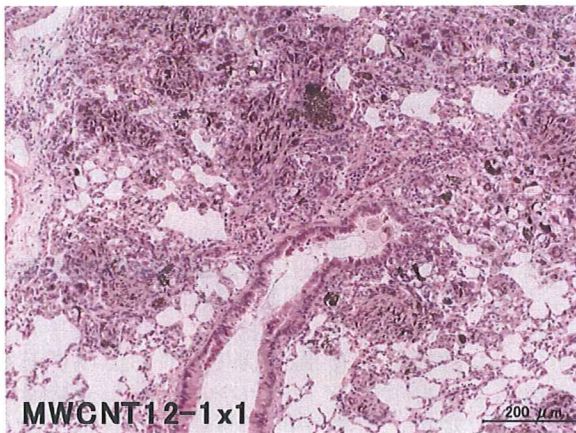
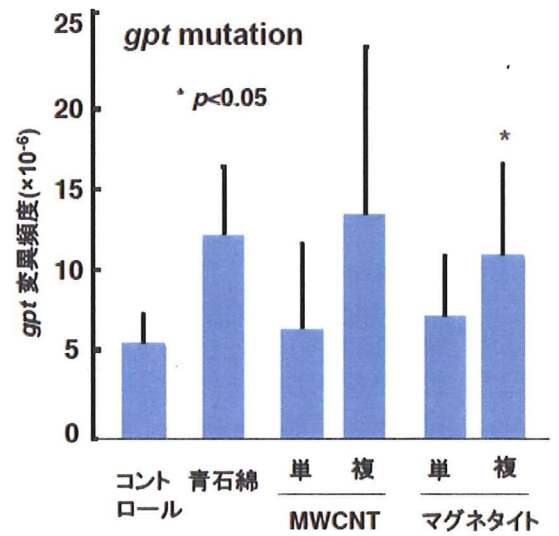
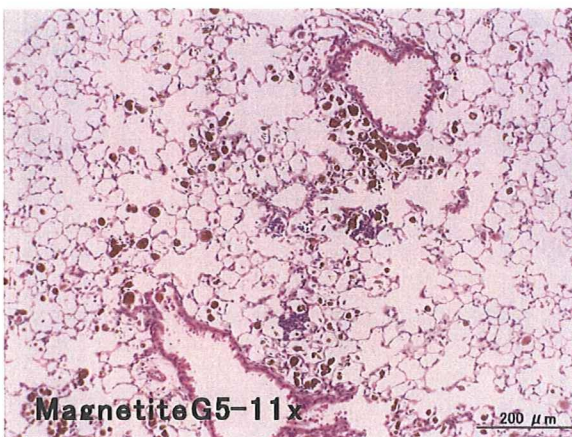


図2 *gpt* 遺伝子変異頻度



マグネタイト



#### J. 考察

多層カーボンナノチューブの気管内投与により、肺に炎症性所見が顕著に認められたが、マグネタイトでは肺の炎症性反応が多層カーボンナノチューブと比較して弱いことがわかった。これは、多層カーボンナノチューブは繊維状であるが、マグネタイトは球形であり、それぞれのナノマテリアルの形状の違いに起因

することが示唆された。一方、*gpt* 変異解析の結果を見ると、両ナノマテリアルともにコントロールの 2 倍程度に変異頻度が上昇しており、必ずしも肺組織の炎症反応の程度と変異原性の強さは一致しなかった。これは、多層カーボンナノチューブの肺における炎症作用が強すぎて、ダメージの少ない細胞からのみゲノム DNA が抽出された可能性があると考えられる。

#### K. 結論

多層カーボンナノチューブは、マウスの肺に DNA の酸化損傷を誘発することが明らかとなった。また、多層カーボンナノチューブはマウス肺にグラニューモマおよび線維化を誘発したが、マグネタイトを投与した場合はそれらの病理所見はほとんど認められなかった。一方、多層カーボンナノチューブおよびマグネタイトの投与により *gpt* 遺伝子がコントロールと比べ上昇する傾向が認められた。しかしながら、Spi 遺伝子の変異の上昇は認められなかった。

#### L. 健康危険情報

該当しない。

#### M. 研究発表

##### 2. 論文発表

24. Ohe T, Suzuki A, Watanabe T, Hasei T, Nukaya H, Totsuka Y, Wakabayashi K. (2009) Induction of SCEs in CHL cells by dichlorobiphenyl derivative water pollutants, 2-phenylbenzotriazole (PBTA) congeners and river water concentrates. *Mutat Res.* 678:38-42.
25. Yamamoto M, Nakano T, Matsushima-Hibiya Y, Totsuka Y, Takahashi-Nakaguchi A, Matsumoto Y, Sugimura T, Wakabayashi K. (2009) Molecular cloning of apoptosis-inducing Pierisin-like proteins, from two species of white butterfly, *Pieris melete* and *Aporia crataegi*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol.* 154 :326-33.
26. Nishigaki R, Watanabe T, Kajimoto T, Tada A, Takamura-Enya T, Enomoto S, Nukaya H, Terao Y, Muroyama A, Ozeki M, Node M, Hasei T, Totsuka Y, Wakabayashi K. (2009) Isolation and identification of a novel aromatic amine mutagen produced by the maillard reaction. *Chem Res Toxicol.* 22: 1588-1593.
27. Totsuka Y, Higuchi T, Imai T, Nishikawa A, Nohmi T, Kato T, Masuda S, Kinase N, Hiyoshi K, Ogo S, Kawanishi M, Yagi T, Ichinose T, Fukumori N, Watanabe M, Sugimura T, Wakabayashi K. (2009) Genotoxicity of nano/microparticles in in vitro micronuclei, in vivo comet and mutation assay systems. *Part Fibre Toxicol.* 2009 ;6(1):23.
28. Nishimura K, Totsuka Y, Higuchi T, Kawahara N, Sugimura T, Wakabayashi K. (2009) Analysis of an RNA adduct formed from aminophenylnorharman. *Nucleic Acids Symp Ser (Oxf).* 2009;(53):211-2.

##### 2. 学会発表

1. Totsuka Y et. al., Genotoxicity of Nanoparticles In In Vitro Micronuclei, In Vivo Comet and Mutation Assay Systems, 10th ICEM, 2009 フィレンツェ
2. Totsuka Y et. al., Biological activities of endogenous mutagens/carcinogens, aminophenylnorhartman and N-nitrosobile acid conjugates., 10th ICEM, 2009 フィレンツェ
3. 戸塚ゆ加里ら、 ナノ粒子により誘発される遺伝毒性：in vitro 小核、in vivo コメットおよび変異原性の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
4. 山本真史、戸塚ゆ加里ら、メソテリンプロモーターを用いたピエリシン-1 遺伝子発現による抗がん活性 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
5. 樋口孝、戸塚ゆ加里ら、内因性変異原・がん原物質アミノフェニルノルハルマンの RNA 付加体形成による miRNA 機能の修飾 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
6. 西村興一、戸塚ゆ加里ら、アミノフェニルノルハルマン由来の DNA リン酸付加体の解析 第 68 回日本癌学会学術総会 2009 横浜
7. 松本陽子、戸塚ゆ加里ら、 ナノ粒子により誘発される in vivo 遺伝毒性 第 38 回

- 日本環境変異原学会大会 2009 静岡
8. 小林沙衣、戸塚ゆ加里ら、メイラード反応生成物アミノベンゾアゼピノキノリノン誘導体の遺伝子毒性評価 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  9. 桐谷英昌、戸塚ゆ加里ら、アミノフェニルノルハルマン(APNH)由来の DNA リン酸付加体の構造解析 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  10. 尾後早耶佳、戸塚ゆ加里ら、微細粒子状物質の DNA 損傷性の評価 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  11. 加藤竜也、戸塚ゆ加里ら、In vivo における 3,6-dinitrobenzole]pyrene の遺伝毒性 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡
  12. 西村興一、戸塚ゆ加里ら、ニトロソ胆汁酸抱合体由来タンパク質付加体の解析 第 38 回日本環境変異原学会大会 2009 静岡

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  
—化学反応による DNA のメチル化—

分担研究者 葛西 宏 産業医科大学 職業性腫瘍学 教授

**研究要旨** 試験管内反応として過酸化物質と 2 価鉄あるいはメチオニンスルホキシド と OH ラジカル(Fenton 試薬) の組み合わせによりメチルラジカルが生じ、DNA 中の dC, dG がメチル化され m5dC, m8dG が生成することを見出した。繊維状、粒子状物質により誘発される炎症、酸化ストレスが引き金となってラジカル機構により DNA のメチル化、エピジェネティック異常が起こる可能性が考えられる。

**A. 研究目的**

発癌機構として、遺伝子変異に加えてエピジェネティック機構が最近注目されている。癌抑制遺伝子のプロモーター領域のメチル化が起こり、発現が抑制される。メチル化は酵素的に導入されることがよく知られている。しかし発癌過程でのプロモーター領域の異常メチル化がなぜ起こるかについては不明な点が多い。われわれは特に環境因子との関係を明らかにするために化学反応によりシトシン 5 位のメチル化が起こるかどうかを検討した。

**B. 研究方法**

メチオニンスルホキシドと OH ラジカル(Fenton 試薬)等のメチルラジカル発生系と dC あるいは DNA とを生理的条件(37°C、pH7.3)で反応させ m5dC (m8dG) が生成するかどうかをフォトダイオードアレイ UV 検出器を接続した高速液体クロマトグラフィー(HPLC)、LC/MS/MS 法および抗体法(免疫ドットプロット分析)により分析した。

**C. 研究結果**

まず試験管内において Fe<sup>2+</sup> の存在下で過酸化物質 t-Butyl hydroperoxide, Cumene hydroperoxide と dC を反応させたところ m<sup>5</sup>dC が生成することを見出した。次いでメチオニンスルホキシド と OH ラジカル(Fenton 試薬)の組み合わせによりメチルラジカルが生じ、モノマー dC の C5 位がチオニンスルホキシドの濃度に依存してメチル化され m<sup>5</sup>dC が生成することをフォトダイオードアレイ UV 検出器を接続した HPLC により見出した。更に 2 本鎖 poly(dG·dC) に対して同様の反応を行ったところ LC/MS/MS 法および抗体法(免疫ドットプロット分析)により m<sup>5</sup>dC の生成が認められた。同時にデオキシグアノシン (dG) のメチル化産物である m<sup>8</sup>dG が LC/MS/MS 法により検出された。

**D. 考察**

メチルラジカルは様々な物質から、活性酸素の作用で、また代謝により生じることが知られている。生体では炎症や老化が原因でメチルラジカルが生じ、シトシンのメチル化を起こす可能性が考えられる。また DNA に直接反応する場合と、ヌクレオチドプール中に m<sup>5</sup>dCTP が生じ DNA 中に取り込まれる機構が考えられる。今後細胞レベルでこの反応が起こるかどうかが、更にメチオニンスルホキシド等の物質と酸化ストレスにより実際にエピジェネティック変化が起こるかどうかを証明したい。これらの結果は粒子状・繊維状物質の吸入による肺組織の炎症、酸化ストレス誘発に伴う肺発癌にも関連すると思われる。一方 m<sup>8</sup>dG はラジカル機構による DNA のメチル化を研究するための良いマーカーになるであろう。

**E. 結論**

環境化学物質、内因性物質が関与する化学反応により DNA 中シトシン 5 位のメチル化が起こるかどうかを調べた。試験管内で dC あるいは DNA と様々なメチルラジカル発生物質を反応させ、HPLC, LC/MS/MS, 抗体法により 5-methyl-dC の生成を確認した。発癌プロモーター t-Butyl-OOH, Cumene-OOH が 2 価鉄の存在下で dC の C5 位のメチル化を起こすことを見出した。またメチオニンの酸化物質メチオニンスルホキシドから OH ラジカル作用によりメチルラジカルが生じシトシンのメチル化を起こすことを見出した。ヒト発癌におけるエピジェネティック異常の原因として、炎症、喫煙、老化と関係してメチルラジカルによる DNA メチル化が起こる可能性が考えられる。またこの反応は繊維状、粒子状物質の発癌機構にも関連すると思われる。



G. 研究発表

1. 論文発表

1. Morimoto Y, Hirohashi M, Kasai T, Oyabu T, Ogami A, Myojo T, Murakami M, Nishi K, Kadoya C, Todoroki M, Yamamoto M, Kawai K, Kasai H, Tanaka I. Effect of polymerized toner on rat lung in chronic inhalation study. *Inhal Toxicol.* 21, 898-905, 2009
  2. Kasai H, Kawai K. DNA methylation at the C-5 position of cytosine by methyl radicals: a possible role for epigenetic change during carcinogenesis by environmental agents. *Chem Res Toxicol.* 22, 984-9, 2009
  3. 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.* 100, 715-21, 2009
  4. Song MF, Li YS, Ootsuyama Y, Kasai H, Kawai K, Ohta M, Eguchi Y, Yamato H, Matsumoto Y, Yoshida R, Ogawa Y. Urea, the most abundant component in urine, cross-reacts with a commercial 8-OH-dG ELISA kit and contributes to overestimation of urinary 8-OH-dG. *Free Radic Biol Med.* 47, 41-6, 2009
  5. Hirano T, Sakai A, Ootsuyama Y, Kasai H. Chronic alcohol consumption prevents 8-hydroxyguanine accumulation in 3'-methyl-4-dimethylaminoazobenzene-treated mouse liver. *Biochem Biophys Res Commun.* 387, 316-20, 2009
  6. Kawai K, Li YS, Song MF, Kasai H. DNA methylation by dimethyl sulfoxide and methionine sulfoxide triggered by hydroxyl radical and implications for epigenetic modifications. *Bioorg Med Chem Lett.* 20, 260-265, 2010
  7. Hori A, Mizoue T, Kasai H, Kawai K, Matsushita Y, Nanri A, Sato M, Ohta M. Body iron store as a predictor of oxidative DNA damage in healthy men and women. *Cancer Sci.* 101, 517-522, 2010
2. 学会発表
  1. 李 云善・宋 明芬・河井 一明・葛西 宏・松本 由紀・吉田 吏江・小川 康恭：尿素はELISAによる8-OH-dG分析において陽性反応を示す  
第82回日本産業衛生学会、福岡（2009年5月）
  2. 河井 一明・葛西 宏：新規変異原物質 4-oxo-2-hexenalのヒト肺組織中DNA付加体の検出  
第82回日本産業衛生学会、福岡（2009年5月）
  3. 宋 明芬・李 云善・大津山 祐子・河井 一明・葛西 宏・松本 由紀・吉田 吏江・小川 康恭：尿素はELISAによる8-OH-dG分析において陽性反応を示す  
第9回日本抗加齢医学会総会、東京（2009年5月）
  4. 河井 一明・李 云善・宋 明芬・大津山 祐子・葛西 宏・太田 雅規・江口 泰正・大和 浩・松本 由紀・吉田 吏江・小川 康恭：ELISA法による8-OH-dG分析において尿素は陽性反応を示す  
第62回日本酸化ストレス学会（福岡）2009年6月
  5. 葛西 宏・河井 一明：化学反応によるDNA中シトシン5位のメチル化：エピジェネティック変化に關与する可能性  
第68回日本癌学会学術総会、横浜（2009年10月）
  6. 河井 一明・李 云善・葛西 宏：尿素は市販8-OH-dG ELISA kitにおいて陽性反応を示す  
第68回日本癌学会学術総会、横浜（2009年10月）
  7. 河井 一明・李 云善・宋 明芬・葛西

宏：メチルラジカルによるシトシン5位の  
メチル化：環境化学物質によるエピジェネ  
ティック変化をともなう発がん機構の可能  
性  
第38回大会日本環境変異原学会、清水（2009  
年11月）

G. 知的財産権の出願・登録状況（予定を含む  
。）

1. 特許取得  
なし
2. 実用新案登録  
なし
3. その他  
なし

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 渡辺 昌俊 横浜国立大学大学院 教授

研究要旨 細胞における各種ナノ粒子曝露の影響について、*in vitro*系で細胞生存率、ROS生成、8-OHdG検出、apoptosis、細胞周期等について検討した。特定のナノ粒子はヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。

A. 研究目的

ヒト細胞に対する各種ナノ粒子等の影響を*in vitro*系で明らかにする。

B. 研究方法

ヒト細胞（肺および前立腺細胞株）培養系を用い、各種ナノ粒子等を曝露、顕微鏡、電顕レベルでの形態観察、細胞生存率、8-OHdG測定、ROS生成測定量、細胞膜損傷（LDH assay）、apoptosis解析等を行った。

（倫理面への配慮）

ナノマテリアルに対するばく露防止等のための予防的対応について（平成21年4月21日文科省からの通知）に遵守。

C. 研究結果

ナノ粒子の中には、濃度依存的に細胞生存率が低下するものもあるが、細胞の種類によりその程度が異なる。同一粒子であっても、A549細胞とDU145細胞への影響及びapoptosisの有無、8-OHdG生成やROS生成は異なる事を認めた。

D. 考察

DU-145はA549に比べて低濃度でDNA損傷やROSの生成を認めた。その結果として、apoptosisの誘導を認め、一連の事象が細胞生存率の低下に結びついたと考える。一方、A549では、高曝露濃度でROSの生成やDNA損傷を認めたが、apoptosisが誘導されず、細胞周期の異常が認められた。磁性体ナノ粒子が前立腺細胞DU-145への影響は、p53変異およびROSに対する修復機構の欠損に基づくと考えられた。A549細胞にはp53変異はなく、S期にかかわるタンパク質に影響を及ぼした可能性がある。同一のナノ粒子であっても、その細胞がもつ修復機構等がその表現型に重要な影響を与えると考える。

E. 結論

特定のナノ粒子はヒト細胞の種類により細胞傷害が異なる事を明らかにした。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では、ナノ粒子の種類とその細胞がもつ特徴（p53遺伝子変異や修復系の異常など）が、ナノ粒子に対する反応が決まる可能性を見いだした。

G. 研究発表

3. 論文発表

29. Kosaka T., Yoshino J., Inui K., Wakabayashi T., Kobayashi T., Watanabe S., Hayashi S., Hirokawa Y., Shiraishi T., Yamamoto T., Tsuji M., Katoh T., Watanabe M. Involvement of NQO1 and SOD2 polymorphisms in ulcerative colitis. *DNA and Cell Biology*, 28: 625-631 (2009).
30. Totsuka Y., Higuchi T., Imai T., Nishikawa A., Nohmi T., Kato T., Masuda S., Kina N., Hiyoshi K., Ogo S., Kawanishi M., Yagi T., Ichinose T., Fukumori N., Watanabe M., Sugimura T., Wakabayashi K. Genotoxicity of nano/microparticles in *in vitro* micronuclei, *in vivo* comet and mutation assay systems. *Particle and Fibre Toxicology*, 6:1-11 (2009)
31. Osada T., Kakazu N., Watanabe M., Yamane H., Yagi T. The chromosomal constitution of postmitotic neurons, assessed by neuronal nuclear transfer into oocytes and in ES cell lines derived from them. *Cytogenet Genome Res.* 125: 201-12 (2009)

32. Yoneda M., Hirokawa Y.S., Ohashi A., Uchida K., Kami D., Watanabe M., Yokoi T., Shiraishi T., Wakusawa S. RhoB enhances migration and MMP1 expression of prostate cancer DU145. *Exp.Mol. Pathol.* 88: 90-5 (2010)
33. 上 大 介, 石 井 隆 雅, 梅 澤 明 弘, 渡 邊 昌 俊. マイクロアレイとNIA array analysisを用いた心筋分化誘導因子の探索. *医学のあゆみ*229 : 1085-86, (2009)
34. 渡 邊 昌 俊 ナノ粒子メディスン はじめに *医学のあゆみ* 230:493,(2009).
35. 上 大 介, 梅 澤 明 弘, 渡 邊 昌 俊. 磁性ナノ粒子を用いたiPS細胞の誘導.*医学のあゆみ* 230:495-499(2009).
36. 小 坂 俊 仁, 芳 野 純 治, 乾 和 郎, 若 林 貴 夫, 奥 嶋 一 武, 小 林 隆, 三 好 広 尚, 渡 邊 真 也, 服 部 昌 志, 林 繁 和, 白 石 泰 三, 山 本 隆 行, 渡 邊 昌 俊, 中 澤 三 郎. 潰瘍性大腸炎とDNAメチル化との関連・one-carbon metabolism関連遺伝子多型を中心に. *消化器医学*7;74-80 (2009).
2. 学会発表
1. 一 町 直 樹, 久 米 弘 記, 上 大 介, 米 田 操, 白 石 泰 三, 渡 邊 昌 俊. 前立腺癌に対するドセタキセルと磁性体ナノ粒子の併用による治療の基礎的研究. 第68回日本癌学会学術総会 横浜 (2009年10月)
2. 森 田 城 次, 上 大 介, 米 田 操, 広 川 佳 史, 白 石 泰 三, 渡 邊 昌 俊. 前立腺癌スフェロイドの解析 第68回日本癌学会学術総会 横浜 (2009年10月)
3. 渡 邊 昌 俊, 広 川 佳 史, 加 藤 貴 彦, 鈴 木 啓 悦, 市 川 智 彦, 杉 村 芳 樹, 白 石 泰 三. 炭素代謝に関わる遺伝子多型と前立腺癌リスクについて 第68回日本癌学会学術総会 横浜 (2009年10月)
4. 渡 邊 昌 俊, 上 大 介, 米 田 操, 広 川 佳 史, 白 石 泰 三. ヒト前立腺癌細胞の3次元培養における抗癌剤抵抗性の獲得とその機構について 第98回日本病理学会総会 京都 (2009年5月)
5. 上 大 介, 渡 邊 昌 俊, 長 嶋 洋 治, 青 木 一 郎. ヒト前立腺癌細胞と脂肪細胞との相互作用について 第98回日本病理学会総会 京都 (2009年5月)
6. 広 川 佳 史, 渡 邊 昌 俊, 内 田 克 典, 西 村 啓 介, 今 井 啓, 杉 本 寛 子, 福 留 寿 生, 刀 根 小 百 合, 白 石 泰 三. RhoB高発現前立腺がん細胞のMMP1発現抑制 第98回日本病理学会総会 京都 (2009年5月)
7. 渡 邊 昌 俊, 今 井 裕, 中 野 洋, 村 田 哲 也, 白 石 泰 三. 前立腺癌におけるReduced Folate Carrierx遺伝子多型の解析 第56回日本臨床検査医学会学術集会 札幌 (2009年8月)
8. 武 田 祥 吾, 上 大 介, 梅 澤 明 弘, 渡 邊 昌 俊. 磁性体ナノ粒子を用いた遺伝子導入法の開発 - 非ウイルス性のiPS細胞作製を目指して - 第9回日本再生医療学会総会 広島 (2010年3月)
- H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定を含む。)
1. 特許取得 無し
  2. 実用新案登録 無し
  3. その他 無し