

エンドポイントを検出するための適切な指標を用いた短期的試験法やスクリーニング系の開発を行うことを目的とする。

## B. 方法

### 実験 1.

#### MWCNT の p53 (+/-) マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験 (用量-反応試験)

動物：雄 C57BL/6 とバッククロスした p53 ヘテロ欠失 (p53 (+/-)) マウス (9~11 週齢、一群 20 匹) を実験に使用した。

検体及び調整：検体の用量はこれまでに実施した試験での MWCNT の投与量が 3mg/animal (線維数として  $1 \times 10^9$  本/animal) であったので、その 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 ( $1 \times 10^7$  本)、0.003 mg ( $1 \times 10^6$  本)/animal とし、それぞれ単回腹腔内投与した。対照群には MWCNT を含まずに同様に調整した溶媒を投与した。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を用いた腹腔内投与慢性毒性試験

これまでに実施したフラーレンの p53 +/- マウス腹腔内投与試験において、フラーレン投与による腎障害を示唆する知見が認められたため、正常な C57BL/6 マウスにフラーレンを投与し、腎への影響を確認する実験を実施した。

動物：雄 C57BL/6Cr マウス (9 週齢、一群 30 匹) を実験に使用した。フラーレンに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、Lot no. 7B 0044-A) を用いた。フラーレンは 0.5%MC に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 1% の Tween80 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/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後約 1 年とした。

### 実験 3.

#### フラーレンのマウスを用いた腹腔内投与亜慢

#### 性・慢性毒性試験

フラーレン腹腔内投与で生じることが示唆された腎障害の発生過程を詳細に調べる目的で、C57BL/6 または p53 +/- マウスにフラーレンを投与し、経時的に腎への影響を調べる実験を実施した。なお、溶媒に用いた MC の腹腔内投与により腎障害が起こることが文献情報や予備試験で判明したことから、本実験以降は MC を溶媒に使用しないこととした。

動物：1 群 18 匹の雄 C57BL/6Cr マウス (13 週齢) または p53 +/- マウス (16~18 週) を実験に使用した。フラーレンに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、Lot no. 7B 0044-A) を用いた。フラーレンは注射用生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1% の tween80 を加えソニケーションした。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/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 2 週、8 週、6 ヶ月とし、各時点で 6 匹ずつ解剖を行った。

### 実験 4.

#### フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

フラーレン腹腔内投与で生じることが示唆された腎障害の再現性を調べる目的で、C57BL/6 にフラーレンを投与し、腎への影響を確認する実験を実施した。なお、陰性対照群として炭素からなる graphite (黒鉛) 投与群を新たに設定した。

動物：1 群 20 匹の雄 C57BL/6Cr マウス (12 週齢) を実験に使用した。フラーレンに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、Lot no. 7B 0044-A) を用いた。Graphite は Alpha Aesar graphite powder, synthetic (conduction grade, -200 mesh, 99.9995% (metal basis)、Lot no. B17U014) (和光純薬工業) を用いた。フラーレンまたは graphite は注射用生理食塩水 (大塚製薬) に懸濁後、オートクレーブし、最終濃度 0.1% の tween80

を加えソニケーションした。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。フラーレンまたは graphite は 3mg/0.5ml/animal の用量にて単回腹腔内投与した。観察期間は投与後 1 年とした。

#### 実験 5.

##### 市販化粧品中のフラーレン含量の測定

水溶性フラーレン (Radical Sponge) 5%配合美容液中のフラーレン量を測定した。なお、分析は国立医薬品食品衛生研究所環境衛生化学部五十嵐良明室長に依頼した。分析試料としてピュアリス F-RS (製造販売元：(株) シャロン、販売元 (株)：ビューティーワークス) を用いた。

フラーレン (Fulleren-C<sub>60</sub>, 純度 99.5%) は Sigma-Aldrich 社から購入した。フラーレン約 0.01 g をトルエンを加えて溶かして正確に 20 ml としたものを標準原液とした。この原液をトルエンで希釈して、0.125~10 µg/ml の標準溶液を調製し、高速液体クロマトグラフにて分析を行った。

##### (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.

##### MWCNTのp53(+/-) マウスを用いた腹腔内投与発がん性試験 (用量-反応試験)

MWCNTの発がん性の用量反応性を調べるため、雄 p53(+/-)マウスにMWCNTの3用量をそれぞれ単回腹腔内投与した。肉眼所見から、MWCNTの0.3mg/kg群で強い腹腔内臓器の癒着が観られた。また、MWCNTの0.03mg/kgでも中程度の腹腔内臓器の癒着が観られた。腹腔内に腫瘍が認められた途中死亡動物数は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等によるものであり、腹腔内に腫瘍は観られなかった。病理組織学的検査の結果、最低用量の0.003mg/kg群から用量に依存した中皮腫の発生を確認した。

#### 実験 2.

##### フラーレンのマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

雄 C57BL/6 マウスにフラーレンを投与し、腎への影響を確認する実験を実施したところ、フラーレン投与群で体重増加抑制が認められた。そこで、対照群、フラーレン投与群の動物を9ヶ月の時点で6匹ずつ途中解剖をしたところ、フラーレン投与群で6匹中5匹に腎の対縮あるいは萎縮が認められ、組織学的に尿細管の萎縮が認められた。一方、対照群では腎に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あるいは退色を認めたが、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。病理組織学的にもフラーレン投与による腎障害増加を確認した。

#### 実験 3.

##### フラーレンのマウスを用いた腹腔内投与亜慢性・慢性毒性試験

現在、投与後、5ヶ月が経過し、各投与群とも死亡は認められず、一般状態、体重に変化は認められていない。また、2及び8週目の途中解剖動物では病理組織学的検査の結果、腎に明らかな変化は認められていない。

#### 実験 4.

##### フラーレン及び graphite のマウスを用いた腹腔内投与慢性毒性試験

現時点で投与約2ヶ月が経過し、各投与群とも

死亡は認められず、一般状態、体重に変化は認められていない。

#### 実験 5.

##### 市販化粧品中のフラーレン含量の測定

水溶性フラーレン (Radical Sponge) 5%配合美容液中のフラーレン量を HPLC を用いて測定した結果、フラーレン濃度は 0.001%であることが明らかとなった。

#### 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、MWCNT の発がん性の用量反応試験を実施した。病理組織学的検査の結果、最低用量の 0.003mg/animal 投与から用量に依存して中皮腫が発生することが明らかとなった。この結果から、ヒトが  $\mu$  m 長の 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、 $\mu$  m 長の 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 (尚、文献的に報告あり)。しかし、動物実験で  $\mu$  m 長の 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。

フラーレンに関してはマウス単回腹腔内投与の結果、明らかにフラーレン投与群で肉眼的に腎の異常が認められ、組織学的にも尿細管萎縮が認められて腎障害がフラーレンにより惹起されたものと思われた。一方で、溶媒に含まれる MC 腹腔内投与は腎障害作用があることが確認されたため、フラーレン単独で腎障害が生じるか否かを含めた詳細な解析実験を実施中であり、最終的な結論を得るには、もうしばらく時間が必要で

ある。なお、市販化粧品において微量ながらフラーレンを含有することが分析により確認され、フラーレンが生体内に取り込まれた場合の慢性影響を早く明らかにする必要があると思われた。

#### E. 結論

1. ナノマテリアルの短期発がんモデルとして、雄 p53 (+/-) マウスに  $\mu$  m 長の MWCNT を単回腹腔内投与した結果、用量に依存した中皮腫の発生が確認された。
2. フラーレンの C57BL/6 マウスを用いた単回腹腔内投与試験で MC との組み合わせにおいて腎障害が確認された。
3. 腎障害作用を有する MC を除いた溶媒を用いたフラーレンの腎障害解析実験を開始した。

#### F. 健康危険情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. (2010) Involvement of macrophage inflammation protein 1 {alpha} (MIP1 {alpha}) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*. 31 : 31: 927-935.

##### 2. 学会発表

菅野 純、高木篤也、広瀬明彦、小縣昭夫、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 98 回日本病理学会総会、2009 年 5 月 3 日、京都

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、菅野 純、ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性、第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会、2009 年 7

月 8 日、岩手

Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A.,  
Long-term animal testing of nanoparticles  
for detection of chronic toxicity, 4th  
International Conference on Nanotechnology  
-Occupational and Environmental Health  
(NanOE2009), 2009.8.28, Helsinki, Finland  
Jun Kanno, Atsuya Takagi, Akihiko Hirose,  
Tetsuji Nishimura, Nobutaka Fukumori, Akio  
Ogata, Norio Ohashi, and Satoshi Kitajima,  
Induction of mesothelioma in p53+/- mouse by  
intraperitoneal application of multi-wall  
carbon nanotube, The 5th International  
Congress of Asian Society of Toxicology  
(ASIATOX V), 2009.9.12, Taipei

菅野 純、ナノマテリアルの毒性一発がん性を中  
心に、第 68 回日本癌学会学術総会、2009 年 10  
月 2 日、横浜

Kanno J, Takagi A, Nishimura T, Hirose A,  
Nanomaterial toxicology - chronic toxicity  
assessment, CDBIM Symposium 21st Century  
Advances in the Molecular Toxicology of  
Environmental Chemicals and Pathogenesis of  
Disease, 2009.10.26, Tokyo

疾患生命工学センターシンポジウム、環境化学物  
質と疾患解明 分子トキシコロジーの新たな  
展開

菅野 純、カーボンナノチューブの生体への影響  
ー先端素材の安全の問題の一考察例としてー、  
日本学術振興会「材料の微細組織と機能性」第  
133 委員会第 203 回研究会、東京理科大学理窓  
会館、2009 年 10 月 23 日

Kanno, Jun, Takagi, Atsuya, Nishimura, Tetsuji,  
Hirose, Akihiko, Mesothelioma induction by  
micrometer-sized multi-wall carbon  
nanotube intraperitoneally injected to p53  
heterozygous mice., the 49th Annual Meeting  
of the Society of Toxicology, 2010.3.9, Salt  
Lake City, USA, Platform Presentation

広瀬明彦、高木篤也、西村哲治、津田洋幸、坂本

義光、小縣昭夫、中江 大、樋野興夫、菅野 純、  
ナノマテリアルの慢性影響、日本薬学会第 130  
年会、岡山、2010.3.28-30

#### H. 知的財産権の出願・登録状況 (予定も含む)

##### 1. 特許取得

特許第 4415079 号、2009 年 12 月 4 日登録、  
遺伝子の絶対発現量測定方法

##### 2. 実用新案登録

なし

##### 3. その他

なし

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

分担研究課題名: ナノマテリアルの発ガン性評価手法の開発に関する研究

分担研究者: 津田 洋幸 名古屋市立大学 津田特任教授研究室 特任教授

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 結苟 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

我々は吸入曝露肺発がんリスク短期検索法を確立した。この方法は我々が確立した経気管肺内噴霧法を用い、①発がん二段階法を応用した肺発がんプロモーション作用中期検索法を用いた肺発がん性の評価、②被検物質の短期（9日間）肺内噴霧による肺発がんプロモーション機序の検索、および③*in vitro* 発がんメカニズムの検索を行う一連の作業で、吸入曝露による肺発がんリスク評価が短期間で可能となるプロトコルの開発を行った。本研究では繊維状ナノ物質の吸入曝露による発がんリスクを予測することを目的で、被検物質として、日機装製単層カーボンナノチューブ（SWCNT）、日機装製多層カーボンナノチューブ（MWCNT-N）、また、吸入曝露による発がん性の陽性対照として、三井製多層カーボンナノチューブ（MWCNT-M）およびアスベストであるクロシドライト（CRO）を被検物質として吸入曝露による肺発がんリスクを検索した。①において、ラットを途中屠殺した群の検索した結果、MWCNT-Mは明らかな発がんプロモーション作用は見いだされなかった。②において、繊維状ナノマテリアルはいずれもCROと同様に肺胞マクロファージに貪食された。さらに③において、*in vitro*で被検ナノマテリアルを貪食させた初代培養マクロファージの培養上清は、肺胞上皮（ヒト肺がん細胞）の増殖を促進することが明らかとなった。また、この増殖促進作用に関与するサイトカイン等の因子を検索した結果、被検物質を貪食したマクロファージが分泌するサイトカインの種類は、ナノマテリアルの種類により異なることが示唆された。今後、①肺発がん性二段階中期検索法を用いてSWCNTおよびMWCNT-Nの肺発がんプロモーション作用の有無と強度を検索し、繊維状ナノマテリアルの吸入曝露による肺発がんリスク評価を行い、我々のナノマテリアルリスク評価短期検索法の開発を進める予定である。

### A. 研究目的

ナノマテリアルであるカーボンナノチューブ

(CNT)は、ポストシリコンの半導体の素材として期待され、軽量、高強度でかつしなやかな弾性力

をもち、幅広く用いられている。一方 CNT にはその形態がアスベストと酷似しているものがあることから、アスベストと同様に肺がん、肺線維症、中皮腫を発症するのではないかと危惧されている。事実、MWCNT-M をマウス腹腔内に投与すると中皮腫が発生することが分ってきた。しかし CNT を吸入曝露した場合の肺発がん性については不明なままである。

一方、吸入曝露試験を行うには特殊な設備と膨大なコストを要するため、CNT 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未だ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(株)DIMS と共同で開発した。この噴霧法を用いて、①二段階発がんモデルを用いたプロモーション作用の評価による肺発がん性中期検索法の開発(2-step lung carcinogenesis study)、②9日間投与による肺発がん機序の検索(9-days *in vivo* mechanism study)、および③ *in vitro* 発がんメカニズムの検索(*in vitro* mechanism study)を行うことで、ナノ材料の吸入曝露による肺発がんリスク評価が短期間で可能とする方法を開発している。この検索法を用いて、ナノ粒子二酸化チタニウムの噴霧曝露による肺発がんリスクとその機序を検索し、肺内に噴霧投与された二酸化チタニウムはマクロファージに貪食され、このマクロファージから分泌されたケモカインの MIP1 $\alpha$  が、肺胞上皮細胞の増殖を促進させることが判明し、肺発がんプロモーション作用のメカニズムの一端を明らかにした。

本研究では、被検物質として、日機装製単層 CNT (SWCNT) および日機装製多層 CNT (MWCNT-N)、また発がん性陽性対照として三井製多層 CNT (MWCNT-M) およびクロシドライト (CRO) を選び、①2-step lung carcinogenesis study, ② 9-day *in vivo* mechanism study および③ *in vitro* mechanism study の開発と、実用に向けての検証を行った。

## B. 研究方法

### ① 2-step lung carcinogenesis study

気管内噴霧投与: SWCNT、MWCNT-N、MWCNT-M および CRO を 250 および 500 $\mu$ g/ml の濃度で生理食塩水/0.05% Tween20 に懸濁した。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。イソフルレン浅麻酔下で Micro-sprayer (株)DIMS を気管内に挿管し、被検物質の懸濁液を 0.5ml 肺内に直接噴霧した。

実験プロトコール: 雌雄ヒトプロト型 c-Ha-ras 遺伝子トランスジェニックラットに肺発がん物質 N-nitrosobis(2-hydroxypropyl)amine (DHPN) を最初の 2 週間 0.2% の用量で飲水投与した。その 2 週間後より、被検物質を 2 週に 1 回の割合で 20 週まで気管内噴霧投与した。肺および全身諸臓器を取り出し、パラホルムアルデヒドで 1 日固定し、病理学的に肺腫瘍性病変の発生頻度・個数の定量解析を行った。

### ② 9-day *in vivo* mechanism study

それぞれの被検物質の懸濁液 0.5ml を 2 日に 1 回の割合で合計 5 回、肺内に直接噴霧した。9 日めに屠殺剖検し、肺を採取した。右肺は肺の炎症の程度および被検物質が肺内でどの細胞に取り込まれているか、病理組織学および電顕的に検索した。左肺組織の一部から DNA を抽出し、8-OHdG level 測定キットを用いて、肺組織中の 8-OHdG level を測定し、酸化ストレスの程度を検索した。

### ③ *in vitro* mechanism study

F344 ラットに 6% チオグリコール酸を 0.5ml 肺内噴霧した。屠殺剖検し肺組織を採取し細かく刻んだ後、10% FBS 含有 RPMI 1640 で懸濁した。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き、肺組織から初代培養マクロファージを分離した。この初代培養マクロファージの培養液に最終濃度が 50 $\mu$ g/ml となるように SWCNT などの被検物質を加え、24 時間後に培養上清を回収した。このマクロファージの培養上清を、ヒト肺癌培養細胞株 A549 の培養液に加え 72 時間後に細胞数を計測し、マクロファ

ージから分泌された培養上清のヒト肺上皮細胞の細胞増殖に対する影響を Cell Counting Kit-8 を用いて測定した。さらにヒト肺線維芽細胞 CCD34 を用いて、肺線維芽細胞の細胞増殖に対する影響も併せて検索した。また、被検物質を貪食したマクロファージから、RNA を抽出し、炎症性サイトカインの mRNA level を定量的 RT-PCR を用いて測定し、被検物質を貪食することで、肺泡マクロファージが分泌する炎症性サイトカインを検索した。

(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 2-step lung carcinogenesis study

実験第 16 週で中間屠殺を行い、肺を病理組織学的に検索したところ、肺泡過形成の形成が観察された。溶媒対照群では、肺単位面積あたりの肺泡過形成の発生個数は 5.7 個であったが、MWCNT-M 250 および 500 $\mu$ g/ml 噴霧群では、それぞれ 4.6 個および 5.4 個で、有意な差は見られなかった。現在、SWCNT, MWCNT-N に関しても検索中である。

### ② 9-day *in vivo* mechanism study

肺を病理組織学的に検索すると、いずれの噴霧群でも軽度の炎症細胞浸潤巣と小型肉芽腫が散見された。SWCNT, MWCNT-N, MWCNT-M 群では炎症細胞浸潤の主体はリンパ球であったが、CRO 群では好中球であった。肺野に誘導されたマクロファージの数はいずれの噴霧群でも有意に増加し、マクロファージの細胞質に貪食されたナノマテリアルが観察できたが、肺泡上皮細胞には見られなかった。

肺組織から抽出した DNA を用いて 8-OHdG level

を測定した結果、SWCNT, MWCNT-N 群では対照群に比べて有意に上昇し CRO 群では増加傾向が見られたが、MWCNT-M 群では対照群と大きな差は見られなかった。

### ③ *in vitro* mechanism study

ナノマテリアルを貪食させた初代培養マクロファージの培養上清を用いて、ヒト肺がん細胞 (A549) に対する細胞増殖促進作用を検索した。その結果、SWCNT および MWCNT-N 噴霧群ではいずれも対照の 130%、MWCNT-M では 140%、CRO 群では 160%にまで上昇し、すべての噴霧群で有意な細胞増殖促進作用が観察できた。次に肺線維芽細胞(CCD34)に対する細胞増殖促進作用を検索した結果、SWCNT, MWCNT-N および MWCNT-M 群では大きな差はみられず、CRO 群のみで対照群の 140%程度にまで有意に上昇していた。

アスベスト吸入曝露と中皮腫の発症に関与する IL-1 $\beta$  の肺組織における発現量を定量的 RT-PCR を用いて検索した結果、SWCNT および MWCNT-N 群ではそれぞれ対照の 0.5 倍および 0.6 倍と減少傾向が見られたが、MWCNT-M 群および CRO 群ではそれぞれ 1.5 倍および 2.0 倍と有意に増加していた。一方、nTiO<sub>2</sub> を貪食したマクロファージから分泌される MIP1 $\alpha$  の発現量は、SWCNT および MWCNT-N 群ではそれぞれ 0.3 倍および 0.2 倍と有意に減少していたが、MWCNT-M 群では 1.4 倍と増加傾向、CRO 群では 2.4 倍と有意な上昇が観察された。

## D. 考察

肺泡マクロファージは、肺に吸入された異物を貪食し除去することが知られている。これまでに我々は、ナノ粒子二酸化チタニウム (nTiO<sub>2</sub>) の肺内噴霧による肺がん促進作用のメカニズムとして、nTiO<sub>2</sub> を貪食した肺泡マクロファージが関与することを明らかにした。本研究では、SWCNT, MWCNT-N MWCNT-M および CRO の肺内噴霧により、いずれの粒子も肺泡マクロファージに貪食

されている像が観察された。従って、SWCNT, MWCNT-N および MWCNT-M の吸入曝露による発がんメカニズムにも肺胞マクロファージが関与することが示唆された。

異物を貪食したマクロファージは、reactive oxygen species (ROS)を産生し異物を分解/除去するが、この ROS には 8-OHdG を形成し細胞障害や DNA-damage と関連することが報告されている。本研究では、肺組織における 8-OHdG レベルは SWCNT 群、MWCNT-N 群および CRO 群では高かったが MWCNT-M 群では対照群と差は見られなかった。従って MWCNT-M とは異なり、SWCNT や MWCNT-N では酸化ストレスと肺発がん性との関連が示唆された。

これまでに我々は、nTiO<sub>2</sub> を貪食した初代培養マクロファージの培養上清にはマクロファージから分泌された MIP1 $\alpha$  が含まれ、この培養上清は肺胞上皮細胞の促進作用を示すことを明らかにしてきた。そこで、繊維状のナノ粒子を貪食したマクロファージの培養上清にも、マクロファージ由来のサイトカイン/ケモカインが含まれ、細胞増殖促進作用を示すと考えた。

この繊維状ナノ粒子を貪食したマクロファージが分泌する因子を同定する目的で、アスベスト吸入曝露と中皮腫の発症に関与する IL-1 $\beta$  と nTiO<sub>2</sub> を貪食したマクロファージから分泌される MIP1 $\alpha$  の肺組織における発現量を検索した。その結果、CRO では IL-1 $\beta$  および MIP1 $\alpha$  が上昇したが、SWCNT, MWCNT-N および MWCNT-M では IL-1 $\beta$  と MIP1 $\alpha$  の発現パターンは異なった。これらの結果から、本研究で用いた繊維状ナノ粒子は、いずれもマクロファージに貪食された結果、肺胞上皮の増殖促進作用を示すが、マクロファージから分泌される因子は、繊維状ナノ粒子によって異なることが示唆された。来年度はこの面でさらに研究をすすめる。

#### E. 結論

本研究によって、以下の3点が明らかとなった。

(1) 本研究で用いた SWCNT, MWCNT-N,

MWCNT-M のいずれの繊維状ナノマテリアルもアスベストであるクロシドライトと同様に肺胞マクロファージに貪食され、その発がんメカニズムにマクロファージが関与することが示唆された。

(2) これらの繊維状ナノマテリアルを貪食したマクロファージは、サイトカインなどの因子を分泌し、肺胞上皮の増殖を促進するものがあることが明らかとなった。

(3) 肺胞上皮の増殖促進作用に関与する因子は、検索した繊維状ナノマテリアルの種類によって異なることが示唆された。

今後、これらの繊維状ナノマテリアルの長期間の吸入曝露動物実験との結果を反映するかを検討する目的で、①の肺発がん性二段階中期検索法を用いて SWCNT, MWCNT-N, MWCNT-M の肺発がんプロモーション作用を検索し、繊維状ナノマテリアルの吸入曝露による肺発がんリスクを総合的に評価する予定である。

#### F. 健康危機情報

なし

#### G. 研究発表

##### 1. 論文発表

1. Xu J, Futakuchi M, Iigo M, Fukamachi K, Alexander DB, Shimizu H, Sakai Y, Tamano S, Furukawa F, Uchino T, Tokunaga H, Nishimura T, Hirose A, Kanno J, Tsuda H. Involvement of macrophage inflammation protein 1 $\alpha$  (MIP1 $\alpha$ ) in promotion of rat lung and mammary carcinogenic activity of nano-scale titanium dioxide particles administered by intra-pulmonary spraying. *Carcinogenesis*. 31: 927-935.
2. Tsuda H, Futakuchi M, Fukamachi K, Shirai T, Imaida K, Fukushima S, Tatematsu M, Furukawa F, Tamano S, Ito N. A medium-term, rapid rat bioassay model for the detection of carcinogenic the potential of chemicals. *Toxicol Pathol*, in press
3. Long N, Shirai T, Hardiville S, Pierce A, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB,



- Tsuda H. Construction of a Multi Functional Helper Dependent Adenovirus Based System. Asian Pacific J Cancer Prev, in press
4. Tsuda H, Xu J, Sakai Y, Futakuchi M, Fukamachi K. Toxicology of Engineered Nanomaterials - A review of Carcinogenic Potential. Asian Pacific J Cancer Prev; 10: 975-980, 2010
  5. Tsuda H. Risk assesment studies of nanomaterials in Japan and other countries. Asian Pacific J Cancer Prev; 10, DIMS 30th Anniverrrsary Supplement: 11-12, 2010
  6. Tanaka H, Fukamachi K, Futakuchi M, Alexander DB, Long N, Tamamushi S, Minami K, Seino S, Ohara H, Joh T, Tsuda H. Mature acinar cells are refractory to carcinoma development by targeted activation of Ras oncogene in adult rats. Cancer Sci; 101: 341-346, 2010
  7. Iigo M, Alexander DB, Long N, Xu J, Fukamachi K, Futakuchi M, Takase M, Tsuda H. Anticarcinogenesis pathways activated by bovine lactoferrin in the murine small intestine. Biochimie; 91: 86-101, 2009
- 2.学会発表
1. Promotion Effects of Fulleren (C60) on Rat Lung Carcinogenesis. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
  2. Involvement of MIP1 alpha in rat lung and mammary carcinogenesis by intra-tracheal spray of nano-size titanium dioxide. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
  3. Intratracheal Administration of Nano-size TiO2, C60 and Multiwall Carbon Nanotube Elicits Different Lung Responses. 68th Annual Meeting of the Japanese Cancer Association; Yokohama: Oct. 1, 2009
  4. ナノサイズ二酸化チタニウム肺の促進作用とその機序の解析. 第25回日本毒性病理学会学術集会; 浜松: 2009年1月27日,
  5. ナノサイズ二酸化チタニウム投与による肺発がん促進作用とその機序の解析. 第36回日本トキシコロジー会学術集会; 盛岡: 2009年7月8日,
6. 二口充, 深町勝巳, 徐結苟, 津田洋幸. 肺吸入曝露による発がんメカニズムにおいてナノ粒子の種類により異なる因子の関与. 第26回日本毒性病理学会学術集会; 金沢: 2010年2月3日,
- 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 結苟

特許出願人: 公立大学法人名古屋市立大学

発明の名称: PCT 出願「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9月25日

出願番号: PCT/JP2009/004848

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

特許出願人: 津田洋幸

発明の名称: 国内優先出願「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22年3月26日

出願番号: 特願2010-58903

発明者 津田洋幸、二口 充、徐 結苟

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21年度厚生労働科学研究「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情報の集積に関する研究」  
分担研究報告書

ナノマテリアルの生体内動態解析法と短期的スクリーニング評価手法の開発に関する研究

研究分担者： 西村 哲治 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部  
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 生活衛生化学部  
清水久美子 国立医薬品食品衛生研究所 生活衛生化学部

研究要旨

投与群個体毎の各臓器中 $C_{60}$ 濃度分布幅は大きく(相対標準偏差:43.5%(肝臓)~75.3%(肺))、前処理上に問題がある可能性が考えられた。そこで、従来法に比べ定量下限値をさらに低くすること、および前処理における変動要因を最小化することを目的とし、前処理法における変動要因を最小化するための検討を行った。

凍結乾燥-粉碎・均一化-振とう抽出する方法により、従来の方法に比べて臓器当たりの定量下限値を未濃縮試料においては20倍程度、さらに濃縮により100~200倍まで大幅に向上でき、臓器の供試部位や臓器重量等によるフラーレン $C_{60}$ の定量値のばらつきを排除することが可能となった。また、従来法の抽出法に比べ操作の短時間化、簡便化が図れることができた。

A. 研究目的

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応用されているが、これらのフラーレン類をヒトが暴露した場合の健康影響、体内動態等についての情報は少なく、それらの評価が急務となっている。本研究は、生体内動態解析法開発のための基礎的研究やその開発過程で高度化された技術を用いた短期的スクリーニング評価手法の開発に資するための基礎的研究を行うことを目的としている。これまでにフラーレン $C_{60}$ の体内動態を解析するための基礎的なデータをとってきたが、 $C_{60}$ をマウスの尾静脈投与に投与した実験における体内分布の解析結果において、投与群個体毎の各臓器中 $C_{60}$ 濃度分布幅が比較的大きく(相対標準偏差:43.5%(肝臓)~

75.3%(肺))なることが示されていた。これは個体差もしくは前処理上に問題がある可能性が考えられ、本年度は、 $C_{60}$ の体内動態解析における前処理法の変動要因を最小化するための検討を行った。

B. 研究方法

フラーレン $C_{60}$ の臓器からの抽出法は、従来法に比べ定量下限値をさらに低くすること、および前処理における変動要因を最小化することを目的とし、抽出に用いる臓器量を増量し、ホモジナイズを従来法に比べ簡便にかつ均一化できる方法を選択した。

臓器重量を正確に測定後、臓器全量を、一晚、凍結乾燥し、乾燥臓器重量を測定した。ジョークラッシャーで粉碎・均一化し、乾燥

臓器 0.5 g を遠沈管に分取した。0.01 M ドデシル硫酸ナトリウム 1 mL、酢酸 1 mL を添加し、ボルテックスで十分に混和した。これにトルエン 5 mL を添加し、遮光して室温で 5 時間 280 rpm で振とう抽出した後、3500 rpm で 30 分間遠心した。トルエン層を分取し、測定溶液とした。乾燥重量が 1 g を超える臓器(肝臓)は、抽出に用いる臓器重量は 1g とし、添加するドデシル硫酸ナトリウム、酢酸、トルエンについて乾燥臓器 0.5g の時の 2 倍量を用いた。

フラーレン C<sub>60</sub> の定量については、液体クロマトグラフィー—タンデム質量分析計(LC-MS/MS)を用い、大気圧化学イオン化法(APCI)のネガティブイオンモードで測定を行った。モニターするプレカーサイオン、プロダクトイオンは、フラーレン C<sub>60</sub> ではともに  $m/z=720$ 、フラーレン C<sub>70</sub> ではともに  $m/z=840$  で、フラーレン C<sub>60</sub> の HPLC での分離は、C30 系逆相カラムの Devesil RPFULLERENE で行い、移動相はトルエン:アセトニトリル=70%:30%、流速 1 ml/min で行った。

### C. 研究結果

食用牛肝臓を用いて添加回収試験を行った。食用牛肝臓を、一晚、凍結乾燥し、ジョークラッシャーで粉碎・均一化した。遠沈管に 0.5 g および 1 g をそれぞれ 3 本分取した。乾燥臓器重量 0.5 g に対して 0.01 M ドデシル硫酸ナトリウム 1 mL、酢酸 1 mL を添加し、ボルテックスで十分に混和した後、フラーレン C<sub>60</sub> トルエン 10 ppm 標準液を 50  $\mu$ L 添加した。ボルテックスで十分に混和して添加回収試験用試料とした。乾燥臓器重量 0.5 g に対してトルエンを 5 mL 添加し、室温で遮光して 5 時間、280 rpm で振とうした。振とう後、3500 rpm で 30 分間遠心し、トルエン層を分取して LC-MS/MS によりフラーレン C<sub>60</sub> 濃度を測定した。

乾燥臓器重量 0.5 g の回収率は  $99.5 \pm 0.8\%$ 、1g の回収率は  $102 \pm 3.82\%$  と、ともに良好な回収率が得られた(図 1)。また、それぞれの相対標準偏差は 0.8%、3.8% と、試料間

回収率のばらつきも少なかった。

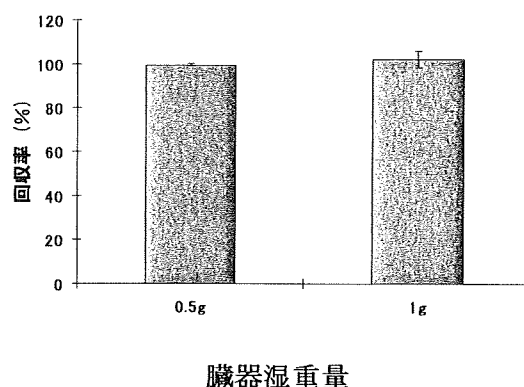


図1 フラーレン C<sub>60</sub> の添加回収(n=3)

### D. 考察

生体臓器からのフラーレン C<sub>60</sub> の抽出法について、従来法に比べ定量下限値をさらに低くすること、および前処理における変動要因を最小化することを目的として、検討した。食用牛肝臓を用いた添加回収試験の結果から、0.5g および 1.0g の臓器重量において、試料間のばらつきが数%程度と精度よく、それぞれ約 100% の回収率を得ることが確認された。本研究で検討した試料の凍結乾燥—粉碎・均一化—振とう抽出法を用いることで、従来法に比べ簡易に短時間で試料の粉碎・均一化が可能となり、また、抽出に用いる臓器量を重量が軽い臓器については全量、肝臓については約 1/3 量を用いることが可能となった。その結果、臓器当たりの定量下限値を未濃縮試料においては 20 倍程度、さらに抽出溶液を 5~10 倍程度濃縮可能であることから 100~200 倍も向上できた。このことは、臓器当たりの定量下限値を従来法の 0.5~1.0  $\mu$ g/g wet wt. から 0.05~0.005  $\mu$ g/g wet wt. に向上できたことになる。

### E. 結論

本報告で示した凍結乾燥—粉碎・均一化—振とう抽出する方法により、臓器当たりの定

量下限値を大幅に向上することができた。また、臓器の供試部位や臓器重量等によるフラーレン C<sub>60</sub> の定量値のばらつきを排除することが可能となった。また、従来の抽出法に比べ操作の短時間化、簡便化が図れることができた。

## F.健康危機情報

なし

## G. 研究発表

### 1. 論文発表

Sakamoto, Y., Nakae, D., Fukumori, N., Tayama, K., Maekawa, A., Imai, K., Hirose, A., Nishimura, T., Ohashi, N. and Ogata, A., Induction of mesothelioma by a single intrascrotal administration of multi-wall carbon nanotube in intact male Fisher 344 rats. (2009) J. Toxicol. Sci., 34 (1) 65-76.

久保田領志, 田原麻衣子, 清水久美子, 杉本直樹, 広瀬明彦, 西村哲治: 高速液体クロマトグラフィー・タンデム質量分析法による生物試料中フラーレンの分析法の開発, (2009) 国立衛研報, 第 127 号, 65-68.

広瀬明彦, 西村哲治, 菅野純: 産業用ナノマテリアルの健康影響評価法開発における課題と慢性影響研究の重要性, (2009) 国立衛研報, 第 127 号, 15-25.

### 2. 学会発表

広瀬明彦, 高木篤也, 西村哲治, 菅野純: ナノマテリアルの慢性影響研究の重要性, 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, S51 (2009.07, 盛岡)

津田洋幸, 徐結筈, 二口充, 飯郷正明, 深町勝巳, Alexander B. DAVID, 内野正, 西村哲治, 徳永裕司, 広瀬明彦, 菅野純: ナノサイズ二酸化チタニウム投与による肺発がん促進作用とその機序の解析, 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, S52 (2009.07, 盛岡)

五十嵐良明, 瀧田葉子, 小濱とも子, 内野正, 西村哲治: ラットに反復経皮投与した酸化チタン粒子の体内分布と毒性, 第 36 回日本トキシコロジー学会学術年会プログラム・要旨集, S194 (2009.07, 盛岡)

Kanno, J., Takagi, A., Nishimura, T., Hirose, A.: Long-term animal testing of nanoparticles for detection of chronic toxicity, 4<sup>th</sup> International Conference on NanOEI p38 (2009.8 Helsinki)

Tsuda, H., Xu, J., Futakuchi, M., Ligo, M., Fukamachi, K., Alexander, D. B., Shimizu, H., Uchino, T., Tokunaga, H., Nishimura, T., Kanno, J.: Promotion of rat lung and mammary gland carcinogenesis by intra-pulmonary administration of nano-size titanium dioxide-involvement of macrophage inflammation 1 (MIP1) alpha, 4<sup>th</sup> International Conference on NanOEI p52 (2009.8 Helsinki)

Nishimura, T., Shimizu, K., Kubota, R., Sugimoto, N., Hirose, A.: Cytotoxicity of multi-walled carbon nanotubes for HepG2 cells. 4<sup>th</sup> International Conference on NanOEI p100 (2009.8 Helsinki)

Hirose, A., Nishimura, T., Honnma, M., Sato, K., Miyazawa, K., Oku, N., Hino, O., Kanno, J., Tsuda, : Research strategy of focusing on the evaluation of the chronic health effects by manufactured nanomaterials in HIHS, Japan. 4<sup>th</sup> International Conference on NanOEI p95 (2009.8 Helsinki)

深町勝巳, 徐結筈, 二口充, 飯郷正明, 内野正, 西村哲治, 広瀬明彦, 菅野純, 津田洋幸: フラーレン(C60)の肺発がんプロモーション作用, 第 68 回日本癌学会学術総会, p54 (2009.10, 横浜)

津田洋幸、徐結筍、二口充、飯郷正明、深町勝巳、Alexander B. DAVID、内野正、西村哲治、徳永裕司、広瀬明彦、管野純：二酸化チタン粒子によるラット肺がん促進作用におけるマクロファージ産生ケモカイン MIP1 $\alpha$  の関与、第68回日本癌学会学術総会、p76(2009.10, 横浜)

五十嵐良明、瀧田葉子、小濱とも子、内野正、徳永裕司\*、西村哲治：経皮投与した微小金属酸化物粒子の体内分布と毒性について、フォーラム 2009：衛生化学・環境トキシコロジー（2009.11, 那覇）

久保田領志、田原麻衣子、清水久美子、杉本直樹、広瀬明彦、西村哲治：ラットを用いたフラーレンの体内動態評価、第 46 回全国衛生化学技術協議会年会（2009.11, 盛岡）

五十嵐良明、瀧田葉子、相場友里恵、小濱とも子、内野正、西村哲治：反復経皮投与したナノサイズ酸化チタンの吸収

性及び毒性について、日本薬学会第 130 年会（2010.3, 岡山）

Nishimura, T., Kubota, R., Tahara, M., Shimizu, K., Obama, T., Sugimoto, N., Kanno, J., Hirose, A., Tissue Distribution of Fullerene after Injection into Tail Vein in Rat, SOT, 49th Annual Meeting (2010.3, Salt Lake City)

#### H. 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

平成 21 年度 厚生労働科学研究費補助金(化学物質リスク研究事業)  
分担研究報告書

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

分担研究課題名: ナノ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

分担研究者: 樋野 興夫 順天堂大学 医学部 病理・腫瘍学 教授

### 研究要旨

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」於いて、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、マウス ERC ELISA系の開発を行った。

#### A. 研究目的

樋野らは、遺伝性ラット腎がんの進行過程で高発現してくる遺伝子 (Erc) を以前に発見した。このErc遺伝子産物は、血中に分泌され、遺伝性ラット腎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が予測された。そこで、ELISA系を(株)免疫生物研究所と共同でヒト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71kDaからなる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、31kDa (N-ERC/mesothelin)と40kDa (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31kDa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。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」於いて緊急性の課題である。

#### B. 研究計画・方法

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進めた。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の開発を進めた。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、それらを用いたELISA系も構築する。

(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、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。

A) まず、ラット中皮腫の腫瘍マーカーとなるラットELISA系(ラットN-ERC)の開発とその有用性を確認した。用いた実験系は1)カーボンナノチューブの腹腔内投与にて作成した中皮腫担癌ラットの血液測定によるN-ERCの高値化の確認を行った(中江らとの共同研究)。2)津田らの開発したラット膀胱癌発生系を用いて、ラットELISA系(ラットN-ERC)による発症前診断・早期発見の実証を行った。

B) 次にマウスELISA系の開発(マウスN-ERC)に成功した。

### D. 考察&結論

今後、マウス中皮腫モデルを用いてELISA試験を実施する。

- 1) 新規に開発したマウスELISA系(マウスN-ERC)を用いて、ナノマテリアル投与により発生した中皮腫担癌マウスの血液測定を行う。
- 2) その有用性を確認する。
- 3) ナノ粒子の繊維状形態に関わる早期腫瘍マーカーの開発を目指す。
- 4) ナノマテリアルによる発がん過程の解析と発がん予防・抑制の開発に資する。

### E. 健康危険情報

なし

### F. 研究発表

#### 1. 論文発表

- 1) Ishikawa K., Segawa T., Hagiwara Y., Maeda M., Abe M., Hino O.: Establishment of novel monoclonal antibody to human ERC/mesothelin useful for study and diagnosis of ERC/mesothelin-expressing cancers. *Pathol. Int.* 59:161-166, 2009
- 2) Fukamachi K., Tanaka H., Hagiwara Y., Ohara H., Joh T., Iigo M., Alexander D.B., Xu J., Long N., Takigahira M., Yonagihara K., Hino O., Saito I.: An animal model of precilical diagnosis of pancreatic ductal carcinomas. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 390: 636-641, 2009 (Corresponding Author: Dr. Hiroyuki Tsuda)
- 3) Yoshida C., Sogawa C., Tsuji A., Sudo H., Sugyo A., Uehara T., Hino O., Yoshii Y., Fujibayashi Y., Fukumura T., Koizumi M., Arano Y. and Saga T.; Development of positron emission tomography imaging by <sup>64</sup>Cu-labeled Fab for detecting ERC/mesothelin in mesothelioma mouse model. *Nuclear Medicine Communications*, in press.
- 4) Sudo H., Tsuji A., Sugyo A., Kohda M., Sogawa C., Yoshida C., Harada Y., Hino O. and Saga T.: Knockdown of COPA, identified by loss-of-function screen, induces apoptosis and suppresses tumor growth in mesothelioma mouse model. *Genomics*, in press.

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。



平成 21 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）  
「ナノマテリアルの健康影響評価手法の総合的開発および体内動態を含む基礎的有害性情  
報の集積に関する研究」

## ナノマテリアルの遺伝毒性影響評価系における基礎的研究

分担研究者： 本間 正充 国立医薬品食品衛生研究所変異遺伝部室長  
協力研究者： 山影 康次 (財)食品薬品安全センター秦野研究所  
高橋 俊孝 (財)食品薬品安全センター秦野研究所  
浅田 晋 (財)食品薬品安全センター秦野研究所  
原 巧 (財)食品薬品安全センター秦野研究所

### 研究要旨

近年積極的な研究開発が行われているナノマテリアルについては、産業用途あるいは医薬分野での応用利用が検討されている一方、ディーゼル排ガス中のナノ粒子の健康影響やアスベストの中皮腫形成などと類似の毒性影響も懸念されている。しかしながら、ナノマテリアルに関する安全性評価はその評価法も含め十分な知見は得られていないのが現状である。

ナノマテリアルとして広く知られているカーボンナノチューブ (CNT) については、類似の形状を示すアスベストと同様のポテンシャルを持つことが報告されていることから、その染色体異常誘発作用を調べるとともに *in vitro* 二段階発がん性試験を実施し、発がんにおけるその作用段階を検討した。

2 種類の CNT (0312TH:  $\phi$  110~170 nm $\times$ 5~9  $\mu$ m および 04519DC:  $\phi$  40~70 nm $\times$ 0.5~2  $\mu$ m) で CHL/IU 細胞 (チャイニーズ・ハムスター肺由来) を処理した場合、CNT (04519DC) は染色体の構造異常および倍数性細胞ともに誘発しなかったが、CNT (0312TH) は構造異常を誘発しないものの、8  $\mu$ g/mL~211  $\mu$ g/mL の濃度範囲で倍数性細胞を誘発 (出現率: 3.4~26.8%) した。また、これらの CNT の発がん過程におけるイニシエーションおよびプロモーション作用を調べるため、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を実施した結果、10  $\mu$ g/mL までの濃度範囲では、陽性形質転換巢の増加は認められなかった。

染色体異常試験の結果、外径および長さともに長い CNT (0312TH) ではアスベストと同様に倍数性細胞が誘発されたが、その両方とも短い CNT (04519DC) では倍数性細胞が誘発されないことから、この異常誘発には CNT の形状が関与していると考えられる。

## A. 研究目的

ナノ技術が向上し、様々なナノマテリアルが開発されているが、その中のカーボンナノチューブ (CNT) は電子的、化学的にユニークであることから、様々な分野で様々な用途に用いられている。例えば、プラスの電荷を持つ CNT はマイナスの電荷を持つ DNA と結合しやすいという性質を応用し、CNT が DNA のセンサーに応用<sup>1)</sup>されているが、これは、CNT が DNA と作用し、遺伝的変異を誘発する可能性を示唆している。

また、CNT が酸化ストレスや炎症、線維症、肉芽腫の発生を促進<sup>2), 3), 4), 5), 6), 7), 8)</sup>、線維症は CNT が肺のマクロファージに結合することで細胞間の構造を変化させることが原因と考えられている<sup>9)</sup>。その他、CNT は青石綿と同様に p53<sup>+/+</sup>のトランスジェニックマウスに中皮腫を生じさせることが明らかに<sup>10)</sup>。このように CNT は、酸化ストレスや炎症反応により間接的に発がん性に関与し、また、DNA や分裂装置と直接結合することで発がん性を示すと考えられている<sup>11)</sup>。しかしながら、CNT と DNA との直接的作用である遺伝毒性作用はほとんど解明されていない。そこで本研究では、2 種の CNT を用いて染色体異常誘発作用を調べるとともに、Bhas 42 細胞を用いる形質転換試験を行い、イニシエーション作用に加えて、そのプロモーション作用を調べた。

## B. 研究方法

### (1) ナノマテリアル

ナノマテリアルとして、外径 110~170 nm で長さが 5~9  $\mu\text{m}$  の CNT (0312TH、ロット番号 : 0312TH、Aldorich-Sigma) と外径 40~

70 nm (内径 5~40 nm) で長さが 0.5~2  $\mu\text{m}$  の CNT (04519DC、ロット番号 : 04519DC、Aldorich-Sigma) の 2 種類の CNT を用いた。これらの CNT を仔ウシ血清 (CS、染色体異常試験用のロット番号 : 4J0214、JRH Biosciences、形質転換試験用のロット番号 : 29803、HyClone) に懸濁 (染色体異常試験用 : それぞれ 5.07 mg/mL および 5.127 mg/mL、形質転換試験用 : とともに 1 mg/mL) させて凍結保存した。解凍後 15 分間超音波処理し、顕微鏡下で均一性を確認したのち、染色体異常試験では 10 vol% 添加して培養液を調製し、それを原液とし培養液 (同じロットの血清を 10 vol% 含む) で希釈して試験に用いた。また、形質転換試験では、血清に懸濁した CNT を同じロットの血清で希釈し、それらを培養液 (血清を 5 vol% 含む) に 1 vol% 添加して処理を行った。

### (2) 陽性対照物質

染色体異常試験では、陽性対照物質 (既知変異原物質) として、マイトマイシン C (MMC) およびシクロホスファミド (CP) を日局注射用水に溶解して凍結保存した原液 (MMC : 20  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、CP : 1 mg/mL) を用時解凍して試験に用いた。

形質転換試験では、イニシエーターとして 3-メチルコラントレン (MCA) およびプロモーターとしてホルボール 12-ミリスタート 13-アセタート (TPA) を DMSO に溶解して原液 (MCA : 1 mg/mL、TPA : 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、TPA については凍結保存し用時解凍) を調製し、試験に用いた。

### (3) 細胞と培養条件

染色体異常試験には、チャイニーズ・ハ

ムスター肺由来の CHL/IU 細胞を用い、仔ウシ血清 (CS、ロット番号：4J0214、JRH Biosciences) を 10 vol% 添加したイーグル MEM 培養液で培養 (37°C、5%CO<sub>2</sub>) した。

形質転換試験には、接触阻止能を持ち *in vitro* 二段階発がん性試験に用いられている BALB/3T3 A31-1-1 (マウス全胎児由来) に *v-Ha-ras* 遺伝子を導入した B has 42 細胞<sup>12)、13)</sup> を用いた。培養には、ウシ胎児血清 (FBS、ロット番号：7825120、Moregate) を 5 vol% 含む Dulbecco's modified Eagle's medium/Ham's F12 を用い、CO<sub>2</sub> インキュベーター (5% CO<sub>2</sub>、37°C) 内で培養した。

#### (4) S9 mix

染色体異常試験では、代謝活性化法としてフェノバルビタールと 5,6-ベンゾフラボン を投与した 7 週齢の雄 Sprague-Dawley 系ラットの肝臓から調製した S9 (ロット番号：RAA-600、2009 年 8 月 21 日製造、キッコーマン) と 50 mmol/L グルコース-6-リン酸 (G-6-P、Sigma Chemical)、40 mmol/L β-ニコチンアミドアデニンジヌクレオチドリン酸 (β-NADP<sup>+</sup>、オリエンタル酵母工業)、330 mmol/L KCl、50 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、20 mmol/L HEPES (pH 7.2)、精製水をそれぞれ 3 : 1 : 1 : 1 : 1 : 2 : 1 の割合で混合した S9 mix を用いた (各成分の最終濃度：5 vol% S9、0.83 mmol/L G-6-P、0.67 mmol/L β-NADP<sup>+</sup>、0.83 mmol/L MgCl<sub>2</sub>、5.5 mmol/L KCl、0.67 mmol/L HEPES)。

#### (5) 染色体異常試験

CHL/IU 細胞をプラスチックディッシュ (直径 6 cm) あたり 2×10<sup>4</sup> 個播種し、培養

開始 3 日目に培養液を CNT を含む処理液と交換して短時間処理 (6 時間) および連続処理 (24 時間) を行った (図 1)。

具体的には、S9 mix 非存在下で短時間処理する場合、3 mL の処理液と交換し、S9 mix 存在下で短時間処理する場合には、2.5 mL の処理液と交換し、さらに S9 mix を 0.5 mL 添加して 6 時間処理した。処理終了後、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、培養液 (5 mL/ディッシュ) でさらに 18 時間培養した。

連続処理する場合は、5 mL の処理液と交換して 22 時間処理したのち、リン酸緩衝塩類溶液で洗浄し、培養液 (5 mL/ディッシュ) でさらに 2 時間培養した。各群 2 枚のディッシュを用いた。

培養終了の 2 時間前に、コルセミドを最終濃度が 0.1 μg/mL になるように添加し、培養終了後、細胞をはがし、細胞を遠沈管に移した。陽性対照群を除く各群については、0.5 mL の細胞懸濁液を 9 mL の ISOTON® II に加え、コールターカウンターを用いて、細胞数の測定を行った。残りの細胞懸濁液については、遠沈 (1400 rpm、5 分) し、低張液 (0.075 mol/L KCl 水溶液) を加え、約 30 分間低張処理を行った。低張処理後、固定液 [メタノール：氷酢酸=3 : 1 (v/v)] を加え常法に従ってスライド標本作製した。

作製したスライド標本を 70 vol%メタノールに軽く浸漬したのち 3 vol%ギムザ液で 8 分間染色後、水道水ですすいで風乾した。

染色体分析に先立って、分裂指数と標本あたりの分析可能な分裂中期細胞数の分析を行い、観察対象群を決定した。

ディッシュ 1 枚から得られたスライド標本 4 枚を、4 人の観察者がコード化した状

態で分析した。1 群あたり 200 個の分裂中期細胞（染色体数：23～27 本）について構造異常の種類と数を、また、1 群あたり 800 個の分裂中期細胞について倍数性細胞（染色体数が 38 本以上）の数を調べた。その結果に基づいて構造異常を持つ細胞と倍数性細胞の出現率を求めた。

ギャップおよび切断については染色分体幅よりも狭い非染色性部位をギャップ、それ以上幅の広いものを切断と定義し、ギャップについては構造異常誘発性の判定には含めないこととした。

#### (6) 形質転換試験

浅田らの方法<sup>14)</sup>および大森らの方法<sup>15)</sup>を参考にイニシエーション試験およびプロモーション試験を実施した（図 2）。

イニシエーション試験では、Bhas 42 細胞を 6 ウェルプレートの 1 ウェルあたり  $4 \times 10^3$  個播種し、播種翌日に培養液を CNT を含む処理液に交換して 3 日間処理した。播種 4 日後、播種 7 日後、播種 11 日後、播種 14 日後に新鮮な培養液と交換（1 ウェルあたり 2 mL）し、播種 21 日後に細胞をメタノール固定・ギムザ染色した。

プロモーション試験では、細胞をウェルあたり  $14 \times 10^3$  個播種し、播種 4 日後、播種 7 日後、播種 11 日後に CNT を含む処理液と交換（1 ウェルあたり 2 mL）し、10 日間処理を行い、播種 14 日後に新鮮な培養液と交換して、播種 21 日後に細胞をメタノール固定・ギムザ染色した。

各群、形質転換試験用として 6 ウェル用いた。また、同時に細胞増殖試験用として 3 ウェルを用い、同様の方法でイニシエーションおよびプロモーションの処理を行い、

播種 7 日後にホルマリン固定し、0.1 w/v% クリスタルバイオレット液で染色した。水洗・風乾後、色素を抽出液（50%エタノールおよび 0.02 mol/L 塩酸を含む）で抽出し、相対細胞増殖率（陰性対照群を 100%とした時の増殖率）を算出した。

形質転換試験用のウェルについては、大森らの方法<sup>15)</sup>を参考にし、50 個以上の細胞からなる形質転換巣で、紡錘形をなして周囲の細胞とは異なる細胞形態を示し（spindle-shaped）、細胞質が塩基性（濃い紫色）に強く染まり（basophilic）、ランダムな配列で互いに交差し（criss-cross）、積み重なりあった細胞の増殖（piling-up）を示す形質転換巣を陽性形質転換巣として計数した。

各ウェルの陽性形質転換巣数について、陰性（媒体）対照群と CNT 処理群間、陰性（媒体）対照群と陽性対照群間および無処理対照群と陰性（媒体）対照群で Dunnett 検定（ $p < 0.05$ 、上側）を行った。

### C. 研究結果

#### (1) 染色体異常試験

CHL/IU 細胞を CNT である 0312TH で処理した場合、その濃度と処理時間に依存して増殖率が低下した（表 1～3）。また、凝集した塊も認められるものの、少なくとも 8  $\mu\text{g}/\text{mL}$  を除く染色体分析を実施した濃度で細胞よりも小さい微粒子が観察された（図 3、5）。染色体分析の結果、いずれの処理条件においても、構造異常を有する細胞の統計学的に有意な増加は認められなかったが、倍数性細胞については染色体分析を実施したすべての処理群で統計学的に有意な増加が認められ、その用量依存性も認められた